

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์โดย *Rhodotorula rubra* MJU11
ร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* KK-03 ในปลาป่น
Optimal Conditions for Carotenoids Production by *Rhodotorula rubra* MJU11
in Combination with *Lactobacillus acidophilus* KK-03 in Fish Meal

ณัฐพร จันทรฉาย* เยาวพา พุกการะเวก และณัฐรี นาระกันทา

Nuttaporn Chanchay*, Yaowapha Pukkarawake and Nutnaree Naragunta

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่ 54140

Department of Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Phrae, Thailand 54140

*Corresponding author: nuttapornchanchay@gmail.com

Received: January 18, 2021

Revised: February 23, 2022

Accepted: April 18, 2022

Abstract

This study aims to determine the optimum conditions for the production of carotenoids from *Rhodotorula rubra* MJU11 after fermentation of fish meal in combination with *Lactobacillus acidophilus* KK-03 to eliminate contaminated microorganisms in fish meal. The conditions examined were optimal timing, humidity, carbon source, and nitrogen source for *R. rubra* MJU11 growth. The result showed that at 48 hours, *R. rubra* MJU11 had the highest growth with 2.3198 grams dry cell weight and carotenoids content was 14.8987 $\mu\text{g/g}$ dry weight. Optimal moisture content was 40 percent and found that fish meal already contained sufficient nutrients for the yeast, thus eliminating the need for additional carbon and nitrogen sources. It was also found that fermentation of fish meal by using *L. acidophilus* KK-03 reduced the microbial contamination in fish meal. From the research results, it can be developed into animal feed formulas to add value to animal feed products at the feed industry level further.

Keywords: carotenoid, *Rhodotorula rubra* MJU11, *Lactobacillus acidophilus* KK-03, probiotic, fish meal

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula rubra* MJU11 หลังจากการหมักปลาป่นร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* KK-03 เพื่อทำสายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลาป่น โดยสภาวะที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ ระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *R. rubra*

MJU11 ความชื้น แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่าช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง เชื้อ *R. rubra* MJU11 มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.3198 กรัม และมีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 14.8987 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณความชื้นที่เหมาะสมเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในปลาป่นมีสารอาหารที่เพียงพอสำหรับยีสต์อยู่แล้วจึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักปลา

ปนโดยใช้เชื้อ *L. acidophilus* KK-03 สามารถลดปริมาณ จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลาป่นได้ และทำให้เชื้อ *R. rubra* MJU11 ผลิต แครอทินอยด์ได้ในปริมาณสูง จากผลการวิจัย ที่ได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นสูตรอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มมูลค่า ให้ผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ต่อไปได้

คำสำคัญ: แครอทินอยด์, *Rhodotorula rubra* MJU11
Lactobacillus acidophilus KK-03
โปรไบโอติก ปลาป่น

คำนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในปัจจุบันนี้มีระบบ ป้องกันรักษาสุขภาพอนามัยที่ดี มีการใช้ยาปฏิชีวนะและ สารเคมีที่เติมลงในอาหารสัตว์ เพื่อให้สัตว์สามารถให้ ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ผลของการใช้ยาและสารเคมี นี้ทำให้เกิดปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จาก สัตว์ จึงมีการใช้สารเสริมชีวนะ (Probiotics) และอาหาร เสริมชีวนะ (Prebiotics) มาทดแทน เนื่องจากมีความ ปลอดภัยในการใช้สูง (Lakkhun *et al.*, 2013) นอกจากนี้ สารเสริมชีวนะยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และเพิ่มภูมิคุ้มกันอีกด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อกล่าวถึง อาหารสัตว์ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมมีความแตกต่างกัน ไปตามวัตถุประสงค์การใช้และประเภทของสัตว์ ซึ่งวัตถุดิบ เกษตรที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ได้แก่ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ กากถั่วเหลือง ปลาป่น กระดูกป่น มันสำปะหลังอัดเม็ด โดยถ้าหากเก็บวัตถุดิบเหล่านี้ไว้นาน จะเกิดการย่อยสลายและเกิดเชื้อรา แบคทีเรีย ซึ่งส่งผล ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อันจะนำไปสู่ผลกระทบต่อสัตว์ ที่บริโภคอาหารสัตว์ได้ ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จึงมักมี การฆ่าเชื้อวัตถุดิบเหล่านี้ก่อนด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น กระบวนการให้ความร้อน ซึ่งการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนแบบนี้มี ความยุ่งยาก และอาจมีค่าใช้จ่ายสูง ด้วยเหตุนี้จึงมีความ

จำเป็นในการพัฒนาวิธีการฆ่าเชื้อวัตถุดิบด้วยวิธีที่ง่ายและ ประหยัดมากขึ้น โดยการหมักวัตถุดิบร่วมกับสารเสริม ชีวนะในสภาวะกรดเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหลังการ จัดเตรียมวัตถุดิบ และเพิ่มสารสีให้กับอาหารสัตว์เพื่อเพิ่ม คุณภาพของเนื้อสัตว์และไข่ไก่ โดยเน้นไปที่สารสีกลุ่ม แครอทินอยด์ เพื่อลดการนำเข้าแครอทินอยด์สังเคราะห์ จากต่างประเทศซึ่งมีมูลค่าสูง (Simova *et al.*, 2003; Chanchay, 2016) แครอทินอยด์ที่ได้จากธรรมชาติจึงมี ความสำคัญ โดยเฉพาะแครอทินอยด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เพื่อนำไปสู่การแก้ไขปัญหาและประยุกต์ใช้จริงในระดับ อุตสาหกรรมสัตว์ในอนาคต

ในการผลิตแครอทินอยด์ทางเทคโนโลยีชีวภาพจาก การใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่ช่วยเพิ่มมูลค่าของของเสียที่ใช้แล้วและลดผลกระทบต่อ สิ่งแวดล้อม ส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคและมีศักยภาพ ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น (Besarab *et al.*, 2018; Cipolatti *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020); Chanchay (2016) ได้ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแครอทินอยด์โดย *Rhodotorula rubra* MJU11 ร่วมกับสารเสริมชีวนะ (แลคติก) จากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ในฟუნ ข้าวโพดอาหารสัตว์ พบว่าหลังจากหมักฟუნข้าวโพดร่วมกับ *L. acidophilus* ที่สภาวะกรดแล้วสามารถป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในฟუნข้าวโพดได้ และให้ปริมาณแครอทินอยด์ สูงสุด และจากงานวิจัยของ Simova *et al.* (2003) ได้ทำ การทดลองการใช้ประโยชน์จากการหมักเชื้อ Lactic acid bacteria ร่วมกับยีสต์ที่สามารถสร้างแครอทินอยด์ได้

ดังนั้นการศึกษารั้วนี้มุ่งเน้นการผลิตสารสีแครอ ทินอยด์จากเชื้อ *R. rubra* MJU11 จากการหมักปลาป่นแบบ อาหารแข็งร่วมกับสารเสริมชีวนะ *L. acidophilus* KK-03 เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลาป่นและเพื่อสร้างกรด แลคติกในระดับห้องปฏิบัติการ พร้อมศึกษาสภาวะ ที่เหมาะสมต่อการผลิตแครอทินอยด์ของ *R. rubra* MJU11 ได้แก่ ระยะเวลาในการเจริญเติบโต ความชื้น แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

อุปกรณ์และวิธีการ

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเจริญ

ของ *L. acidophilus* KK-03

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* KK-03 บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่สภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารแข็ง คัดเลือกมาประมาณ 5-10 โคโลนี ละลายลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% (w/v) จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นของสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้มีความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับค่า McFarland standard No. 0.5 โดยเจือจางสารละลายให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.09-0.1 ซึ่งจะมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปิเปตถ่ายเชื่อดังกล่าวที่ 10 % (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ข้าง ในถังไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35°C. และทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อด้วยวิธีการ Spread plate ในอาหารแข็ง MRS และตรวจหาปริมาณเชื้อว่าที่ชั่วโมงใดมีการเจริญเติบโตมากที่สุด

การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลาปนด้วยเชื้อ

L. acidophilus KK-03 ในการหมักเชื้อ

L. acidophilus KK-03 ร่วมกับปลาปน

นำหัวเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 ที่เตรียมตามระยะเวลาในข้อที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หมักร่วมกับปลาปนจำนวน 500 กรัม (10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังหมักไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37°C. และมีการปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 40-45 เปอร์เซ็นต์ (Phromthep, 2010) จากนั้นทำการตรวจสอบจุลินทรีย์ในปลาปนเริ่มต้นและหัวเชื้อเริ่มต้นก่อนทำการหมัก จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างตามระยะเวลาที่เหมาะสมในข้อที่ 1 มาทำการตรวจสอบเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 และเชื้ออื่น ๆ ในอาหาร PCA

(Plate count agar) และอาหาร MRS วัดค่า pH และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้น

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *R. rubra* MJU11 ภายหลังหมักร่วมกับ *L. acidophilus* KK-03 จากข้อที่ 2

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของ *R. rubra* MJU11 (McFarland standard No. 0.5) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรมาตรฐาน (Basal medium) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในเครื่องเขย่า (Shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Chanchay, 2013) จากนั้นวิเคราะห์เชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร PCA

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการหมัก *R. rubra* MJU11 เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ โดยทำการเติมหัวเชื้อ *R. rubra* MJU11 10 เปอร์เซ็นต์ (McFarland standard No. 0.5) ในปลาปนที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 และทำการยับยั้งการเจริญของเชื่อดังกล่าวแล้ว ปริมาตร 100 กรัม ในถุงพลาสติก ปรับความชื้นมาตรฐานเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณน้ำหนักรูปร่าง และเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปศึกษาสภาวะความชื้นที่เหมาะสมต่อไป

การหาสภาวะความชื้นที่เหมาะสมในการหมักเชื้อ

R. rubra MJU11 ร่วมกับปลาปนที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 ในระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด

ทำการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมโดยกำหนดเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ 40, 45, 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรูปร่าง จากนั้นเลือกสภาวะความชื้นที่เหมาะสมที่สุด เพื่อศึกษาหาปริมาณแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อไป

การหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการหมัก *R. rubra* MJU11 ร่วมกับปลาป่นภายหลังการหมักด้วย *L. acidophilus* KK-03 เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์

ทำการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส โดยกำหนดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาที่เหมาะสมในข้อ 3 และความชื้นที่เหมาะสมในข้อ 4 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ วิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง และเลือกปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เพื่อศึกษาหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อไป

การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมัก *R. rubra* MJU11 ร่วมกับปลาป่นเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์กับปลาป่นหมักภายหลังการหมักด้วย *L. acidophilus* KK-03

ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนจาก Fish soluble โดยกำหนดปริมาณ Fish soluble ที่ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามระยะเวลาที่เหมาะสมในข้อ 3 ความชื้นที่เหมาะสมในข้อ 4 และปริมาณแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในข้อ 5 จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ และวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง

วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์น้ำหนักรเซลล์แห้งโดยการชั่งน้ำหนักรสด หลังหมัก จากนั้นนำไปอบ และชั่งน้ำหนักรแห้งหลังอบ วิเคราะห์หาน้ำหนักรเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์โดยตามวิธีการของ Foss *et al.* (1984)

ผลการวิจัย

ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของ

***L. acidophilus* KK-03**

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 พบว่าในช่วงเวลาที่ 0 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 2.8×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ช่วงเวลาที่ 12 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1.26×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ช่วงเวลาที่ 24 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1.37×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ช่วงเวลาที่ 36 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6.57×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ช่วงเวลาที่ 48 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 7.67×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ช่วงเวลาที่ 60 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 2.8×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และช่วงเวลาที่ 72 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1.0×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Figure 1) และเมื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายพบว่าเชื้อเป็นแกรมบวก มีลักษณะเป็นพออนเดี่ยว และเรียงตัวเป็นคู่

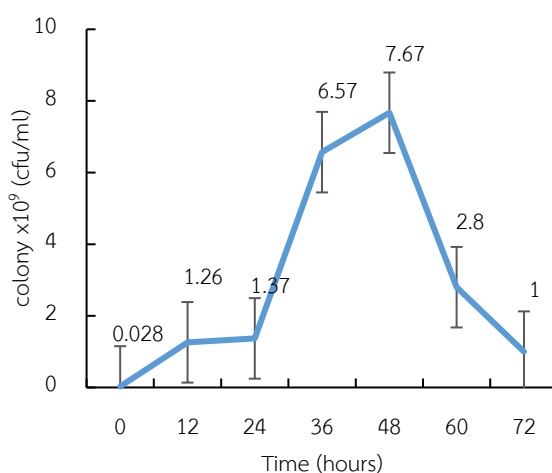


Figure 1 Growth curve of *L. acidophilus* KK-03

การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลาป่นด้วยเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 ในการหมักเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 ร่วมกับปลาป่น

จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำตัวอย่างปลาป่นมา สกัดด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และ เพาะเลี้ยงบนอาหาร PCA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์ ที่ปนเปื้อนในปลาป่น เท่ากับ 1.8×10^{10} โคโลนีต่อกรัม ซึ่ง เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีโคโลนีสีขาว ขนาดใหญ่ ขอบหยัก มีลักษณะเหนียว และมีวงกลมตรงกลาง

จากการเก็บตัวอย่างปลาป่นหมักเพื่อดูปริมาณ เชื้อ *L. acidophilus* KK-03 บนอาหารแข็ง MRS พบว่า ชั่วโมงที่ 48 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 1.7×10^8 โคโลนีต่อกรัม ค่า pH เท่ากับ 6.56 และปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้น คือ 10.47 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำมา ทดสอบการย้อมสีแกรม พบว่าเชื้อมีลักษณะเป็นท่อน เดียว เรียงตัวเป็นคู่ และเป็นแกรมบวก ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ ที่ปนเปื้อนในปลาป่นมีจำนวน เท่ากับ 8.0×10^7 โคโลนีต่อ กรัม ซึ่งมีการปนเปื้อนน้อยลงจากปลาป่นเริ่มต้น ซึ่ง สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ 3 ชนิด จาก ลักษณะโคโลนีที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งมีลักษณะโคโลนี สีขาวขุ่น ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ขอบใส ลักษณะเหนียว มีวงกลมตรงกลางนูน ที่ความชื้นในการหมัก 50 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *R. rubra* MJU11 ภายหลังหมักร่วมกับ *L. acidophilus* KK-03

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *R. rubra* MJU11 ใน หัวเชื้อเริ่มต้นในอาหารสูตรมาตรฐาน มีจำนวนเชื้อ เท่ากับ 1.56×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และลักษณะ โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PCA มีสีชมพู มั่นเยิ้ม ขอบวาว ทั้งหมด เมื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการ ผลิตแคโรทีนอยด์ และเจริญเติบโตของเชื้อ *R. rubra* MJU11 (Table 1) พบว่าที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง *R. rubra* MJU11 มีความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ ได้มากที่สุด โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์ 13.80 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 0 และชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 12.59 และ 10.47 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่ามีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ชุด ควบคุมและชั่วโมงที่ 72 ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 2.32 กรัม รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 0 และชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณ น้ำหนักเซลล์แห้ง คือ 2.17 และ 2.10 กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

Table 1 Optimal timing for carotenoids production of *R. rubra*

Hours	Dry cell weight (g)	Carotenoids content ($\mu\text{g/g}$ dry weight)
0	2.17 ± 0.01^{ab}	12.59 ± 0.32^b
24	1.70 ± 0.01^e	7.88 ± 0.15^e
48	2.32 ± 0.02^a	13.80 ± 0.06^a
72	2.09 ± 0.01^{bc}	10.19 ± 0.16^c
96	1.93 ± 0.00^d	9.14 ± 0.10^d
control	2.10 ± 0.01^{bc}	10.47 ± 0.01^c

The control unit is an unfilled fish meal with *R. Rubra*.

ความชื้นที่เหมาะสมในการหมักเชื้อ *R. rubra* MJU11 ร่วมกับปลาป่น ที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 ในระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด

จากการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ (Table 2) พบว่าที่ปริมาณความชื้น 40 เปอร์เซ็นต์ *R. rubra* MJU11 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด เท่ากับ 14.89 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือที่ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 45 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 13.80 และ 12.76 ไมโครกรัม

ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้พบว่าที่ปริมาณความชื้น 40 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 2.60 กรัม รองลงมาคือที่ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.37 และ 2.10 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

Table 2 Optimum moisture determination for *R. rubra* MJU11 carotenoids production

Moisture content (percent)	Dry cell weight (g)	Carotenoids content ($\mu\text{g/g}$ dry weight)
40	2.60 $\pm$ 0.03 ^a	14.89 $\pm$ 0.26 ^a
45	2.16 $\pm$ 0.01 ^c	12.76 $\pm$ 0.07 ^c
50	2.37 $\pm$ 0.02 ^b	13.80 $\pm$ 0.02 ^b
55	1.94 $\pm$ 0.01 ^d	10.40 $\pm$ 0.28 ^d
60	1.80 $\pm$ 0.04 ^c	7.43 $\pm$ 0.56 ^e
control	2.10 $\pm$ 0.01 ^c	10.47 $\pm$ 0.01 ^d

The control unit is an unfilled fish meal with *R. rubra* MJU11.

ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการหมัก *R. rubra* MJU11 ร่วมกับปลาป่น เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์กับปลาป่นหมักภายหลังการหมักด้วย *L. acidophilus* KK-03

จากผลการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ (Table 3) พบว่าสภาวะที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส *R. rubra* MJU11 มีความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 14.89 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ สภาวะที่เติมน้ำตาลกลูโคส 5

และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 11.61 และ 11.26 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าที่ปริมาณกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 2.78 กรัม รองลงมาคือ ที่ปริมาณกลูโคส 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.73 และ 2.69 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p \geq 0.05$)

Table 3 Carbon sources for *R. rubra* MJU11 carotenoids production

Glucose content (percent)	Dry cell weight (g)	Carotenoids content ($\mu\text{g/g}$ dry weight)
0	2.60 $\pm$ 0.02 ^d	14.90 $\pm$ 0.26 ^a
5	2.63 $\pm$ 0.01 ^{cd}	11.61 $\pm$ 0.05 ^b
10	2.69 $\pm$ 0.00 ^{bc}	11.24 $\pm$ 0.17 ^b
15	2.73 $\pm$ 0.00 ^{ab}	9.50 $\pm$ 0.05 ^d
20	2.78 $\pm$ 0.01 ^a	7.44 $\pm$ 0.20 ^e
control	2.10 $\pm$ 0.01 ^e	10.47 $\pm$ 0.01 ^c

The control unit is an unfilled fish meal with *R. rubra* MJU1.

ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมัก *R. rubra* ร่วมกับปลาป่น เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์กับปลาป่น ภายหลังการหมักด้วย *L. acidophilus* KK-03

จากการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนจาก Fish soluble ที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ (Table 4) พบว่าที่ปริมาณ fish soluble ไม่มีผลต่อการผลิต แคโรทีนอยด์เช่นเดียวกับกลูโคส คือ สภาวะที่ไม่เติม Fish soluble สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด คือ 14.90 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ สภาวะที่มีการเติม Fish soluble 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณ

แคโรทีนอยด์ เท่ากับ 13.50 และ 12.44 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และพบว่าที่ปริมาณ Fish soluble 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 2.64 กรัม รองลงมาคือ ที่ปริมาณ Fish soluble 1.5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ คือ 2.62 และ 2.60 กรัม ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

Table 4 Nitrogen sources for *R. rubra* MJU11 carotenoids production

Fish soluble content (percent)	Dry cell weight (g)	Carotenoids content ($\mu\text{g/g}$ dry weight)
0	2.60 $\pm$ 0.02 ^{abc}	14.90 $\pm$ 0.27 ^a
0.5	2.47 $\pm$ 0.03 ^{cd}	13.50 $\pm$ 0.16 ^b
1.0	2.57 $\pm$ 0.04 ^c	12.44 $\pm$ 0.21 ^c
1.5	2.62 $\pm$ 0.00 ^{ab}	12.08 $\pm$ 0.05 ^{cd}
2.0	2.64 $\pm$ 0.04 ^a	11.80 $\pm$ 0.40 ^d
control	2.10 $\pm$ 0.01 ^e	10.47 $\pm$ 0.00 ^e

The control unit is an unfilled fish meal with *R. rubra* MJU11.

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 พบว่าช่วงเวลาที่ 48 มีจำนวนเชื้อสูงที่สุดเท่ากับ 7.67×10^9 โคโลนีต่อมิลลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rooj *et al.* (2010) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตเมตาบอไลต์โดยโพรไบโอติก *Lactobacilli* เพื่อเพิ่มการดูดซึมกลูโคสโดยเซลล์ Caco-2 ผลการทดลองพบว่า *L. acidophilus* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่ 37°C. มีการเจริญมากที่สุดที่ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน

จากนั้นทำการหมักปลาปนร่วมกับเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 เพื่อศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลาปนด้วยเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนในปลาปนเท่ากับ 1.7×10^8 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งลดลงจากปริมาณเริ่มต้น คือ 8.0×10^7 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dinev *et al.* (2017) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชและทำให้อาหารเน่าเสียของ *L. acidophilus* ผลการทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งได้ คือ แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* spp. เป็นต้น และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Charoenjiratakul *et al.* (1996) ที่ได้ทำการคัดแยก *Lactobacillus* spp. จากนมเปรี้ยว ผลการทดลองพบว่าได้เชื้อจากการแยก 5 ไอโซเลท คือ *L. acidophilus* 2 ไอโซเลท *L. casei* 2 ไอโซเลท และ *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* 1 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้นี้สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่า *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli*

จากผลการวิจัยสภาวะความชื้นที่เหมาะสมในการหมัก *R. rubra* MJU11 ร่วมกับปลาปน คือ ที่ปริมาณความชื้น 40 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ ที่ปริมาณความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย

Chanchay and Boonkerd (2016) ที่ได้ทำการศึกษากการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด แบบการหมักแห้ง โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และผลที่ได้ในการผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD (Central composite design) ผลการทดลองพบว่า ปริมาณความชื้นที่เหมาะสม คือ 50 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน แต่เนื่องมาจากการทดลองนี้เป็นการหมักร่วมกับฝุ่นข้าวโพดแบบการหมักแห้ง ความชื้นที่เหมาะสมจึงแตกต่างจากในงานวิจัยที่ทำการหมักร่วมกับปลาปนเล็กน้อย รวมถึงสภาพของภาชนะที่บรรจุ อาจทำให้เชื้อได้รับอากาศที่ไม่เพียงพอ และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิห้อง ที่ทำการหมักไม่คงที่และแสงที่ไม่สามารถควบคุมได้ แต่ในการทดลองทั้งสองนั้นให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

จากการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนจาก Fish soluble พบว่าสภาวะที่ไม่เติมกลูโคสให้ปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุดเนื่องจากในปลาปนหลังจากการหมักร่วมกับเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *R. rubra* MJU11 แล้ว เมื่อมีการเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มอาจจะทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *R. rubra* MJU11 (Substrate inhibition) หรือเชื้อ *R. rubra* MJU11 อาจต้องการแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลชนิดอื่นแทน และแหล่งไนโตรเจนจาก Fish soluble ที่ปริมาณต่าง ๆ ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhosale and Gadre (2001) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตเบต้า-แคโรทีนจากเชื้อ *R. glutinis* สายพันธุ์กลาย พบว่าอัตราส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนไม่ส่งผลต่อการสะสมเม็ดสีแคโรทีนอยด์ของเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณของแคโรทีนอยด์ไม่แปรผันกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากขึ้นจะทำให้ได้เซลล์มากขึ้น แต่ไม่มีการผลิตแคโรทีนอยด์

จึงทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่สัมพันธ์กับปริมาณกลูโคส ในการผลิตแคโรทีนอยด์ทางเทคโนโลยีชีวภาพจากการใช้ ของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่ช่วยเพิ่มมูลค่าของของเสียที่ใช้แล้วและลดผลกระทบต่อ สิ่งแวดล้อม และมีศักยภาพในเชิงพาณิชย์มากขึ้น (Besarab *et al.*, 2018; Cipolatti *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020) ในปัจจุบันองค์ความรู้การศึกษาการผลิต แคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์ทั้งการศึกษาสภาวะ ที่เหมาะสมในการผลิต การใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทาง คณิตศาสตร์ในการวางแผนการผลิต การหาแหล่งอาหาร ใหม่ ๆ ในการผลิตทั้งจากของเสียทางการเกษตรและ ภาควัสดุต่าง ๆ มีมากขึ้นทั้งการนำไปใช้ ประโยชน์และศึกษาหน้าที่ของแคโรทีนอยด์ที่หลากหลาย ขึ้น สอดคล้องกับ Besarab *et al.* (2018) กล่าวว่า การ ค้นพบหน้าที่ที่สำคัญใหม่ ๆ ของสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่ดัดแปลงอาจกระตุ้นแรงจูงใจในการผลิตตรงตัวที่ หลากหลายทางชีวภาพและขยายขอบเขตของ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการผลิต

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต แคโรทีนอยด์โดย *R. rubra* MJU11 ร่วมกับสารเสริมชีวิต จากเชื้อ *L. acidophilus* KK-03 ในปลาป่น คือ ความชื้น มาตรฐาน 40 เปอร์เซ็นต์ ไม่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่ง ไนโตรเจน ระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยสภาวะนี้จะทำให้ *R. rubra* MJU11 มีการเจริญและสามารถผลิตสารสีแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด แต่เนื่องจากในระดับอุตสาหกรรม อาหารสัตว์นั้นต้องมีความปลอดภัยต่อสัตว์สูงมาก จึงควร ใช้กรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพที่เพียงพอ ในปริมาณที่ไม่ เป็นอันตรายต่อสัตว์ หรือใช้การฆ่าเชื้อระบบอื่นร่วมด้วย เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อสัตว์และไม่สะสมในร่างกายสัตว์ ในระยะยาว โดยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้นี้สามารถ พัฒนาเป็นสูตรอาหารสำหรับสัตว์เพื่อเพิ่มมูลค่าของ ผลิตภัณฑ์ให้มีมูลค่ามากยิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นแหล่ง

อาหารสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์จาก *R. rubra* MJU11 เพื่อพัฒนาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

- Besarab, N.V., K.M. Gerasimovich, A.V. Kanterova and G.I. Novik. 2018. Biosynthetic production of carotenoids using yeast strains of genus *Rhodotorula* on the ceap beer wort substrate. **Microbiol Biotech Food Sci.** 7(4): 383-386.
- Bhosale, P.B. and R.V. Gadre. 2001. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 55(4): 423-427.
- Chanchay, N. 2013. **Optimal Condition for Growth of *Rhodotorula rubra* and Antioxidation Characteristics of Its Carotenoids.** Doctoral Dissertation. Chiangmai University. 135 p.
- _____. 2016. Optimal condition for carotenoid production by *Rhodotorula rubra* in conjunction with probiotic from *Lactobacillus acidophilus* by using corn dust as substrates. **Phrawarun Agriculture Journal** 13(1): 61-69. [in Thai]
- Chanchay, N. and S. Boonkerd. 2016. Carotenoid production by the *Rhodotorula rubra* MJU11 on corn dust through solid state fermentation. **King Mongkut's Agricultural Journal** 34(2): 122-132. [in Thai]

- Charoenjiratakul, W., M. Ongsakul and P. Singchai. 1996. The Inhibition Effect of *Lactobacillus* spp. from Drinking Yogurt to *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. pp. 301-305. **In Proceedings of the 18th Congress on Science and Technology of Thailand**. Songkla: Prince of Songkla University. [in Thai]
- Cipolatti, E.P., R.D. Remedi, C.S. Sa, A.B. Rodrigues, J.M.C. Ramos, C.A.V. Burkert, E.B. Furlong, and J.F.M. Burkert. 2019. Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. **Biocatal. Agric. Biotechnol.** 20: 1014-1019.
- Dinev, T., G. Beev, S. Denev, D. Dermendzhieva, M. Tzanova, and E. Valkova. 2017. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. **Agricultural Science and Technology** 9(1): 3-9.
- Foss, P., T. Storebakken, K. Schiedt, S. Laaen-Jensen, E. Austreng and K. Streiff. 1984. Carotenoid in diets for salmonids, I: pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. **Aquaculture** 41(3): 213-226.
- Lakkhun, A., P. Prasom, C. Phucharoen, T. Lorwatcharasopon, J. Phayom and N. Leksawat, 2013. **Production Technology of Animal Pellets**. 8 p. *In* Research Report. Chiang Mai: Chiangmai University. [in Thai]
- Phromthep, K. 2010. **Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* in So-hjurt drink**. Master Thesis. Khon Kaen University. 94 p. [in Thai]
- Rooj, K.A., K. Yasuhino and K.R. Buddington 2010. Metabolites produced by probiotic *Lactobacilli* rapidly increase glucose uptake by Caco-2 cells. **BMC Microbiology** 10(16): 1-10.
- Silva, J., F.L.H. Silvab and J.E.S. Ribeiro. 2020. Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolysate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 30(2020): 101847.
- Simova, D.E., I.G. Frengova and M.D. Beshkova. 2003. Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra-lactobacillus Casei* subsp. *casei* co-cultures in whey ultrafiltrate. **Journal of Biosciences** 58(3-4): 225-229.