

**การผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU11
บนฝุ่นข้าวโพด แบบการหมักแห้ง
Carotenoid Production by the *Rhodotorula rubra* MJU11
on Corn Dust through Solid State Fermentation**

ณัฐพร จันทน์ฉาย¹ ศันสนีย์ บุญเกิด¹

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด เพื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์ อันเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตสัตว์เพื่อให้ได้การเจริญเติบโตที่ดี เพิ่มผลผลิตและลดปริมาณของเสียจากทางเกษตรและลดปัญหามลพิษทางอากาศจากการเผาไหม้ฝุ่นข้าวโพดของเกษตรกร โดยสภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักที่ ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 พบว่าการเจริญและผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยมีผลได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 17.98 กรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพด และมีผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 22.4 ไมโครกรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพดแห้ง และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยการออกแบบการทดสอบแบบ Central Composite Design (CCD) พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8 ต่อ 1 โดยมีการเจริญเท่ากับ 82.09 กรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพด และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 72.01 ไมโครกรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพดแห้ง

คำสำคัญ : แคโรทีนอยด์ *Rhodotorula rubra* ฝุ่นข้าวโพด การหมักแบบแห้ง Central Composite Design (CCD)

Abstract

This study aimed to produce carotenoid from the yeast *Rhodotorula rubra* MJU11 on corn dust which can be used as animal feed. The feed is a key factor in animal production to increase growth and productivity. It also reduces the amount of waste from agriculture and reduces air pollution from the burning corn dust by farmers. The initial fermentation condition was carried out at 50% moisture content, 30 °C and initial pH 7.0. The results showed that the highest yield of biomass and carotenoid was obtained at the 48th hours of fermentation with 17.98 g dry weight/g corn dust and amount of carotenoid 22.4 µg/g dry weight corn dust. Central Composite Design (CCD) was used to optimize the condition of cell growth and carotenoid production. It was found that optimum condition was pH 7.0, 50% initial moisture content and C:N Ratio was 8: 1 with the biomass of 82.09 g dry weight/g corn dust and carotenoids 72.01 µg/g dry weight corn dust.

Keywords: carotenoids, *Rhodotorula rubra*, corn dust, Solid-state fermentation, Central Composite Design (CCD)

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่ จ.แพร่ 54140

คำนำ

ในปัจจุบันมีการเพาะปลูกข้าวโพดเพิ่มมากขึ้นทุกปี อันเนื่องมาจากความต้องการของผู้บริโภคเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะความต้องการเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทำให้มีปริมาณของฝู่นข้าวโพดที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำฝู่นข้าวโพดมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ แต่ส่วนใหญ่จะถูกนำไปให้เป็นอาหารสัตว์ (มนัสนันท์, 2548)

อาหารสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตสัตว์เพื่อให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี และมีผลผลิตที่เพิ่มขึ้น โดยเป็นแหล่งโภชนาที่สัตว์จะนำไปใช้ ซึ่งอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ในปัจจุบันได้มีการผสมแควโรตีนอยด์ลงในอาหาร เช่น อาหารไก่ และอาหารปลา เป็นต้น เพื่อเป็นการเพิ่มสีของเนื้อหรือไข่แดงให้มีสีที่เข้มขึ้น และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค แต่ปัญหาการใช้แควโรตีนอยด์ในปัจจุบัน คือ ใช้แควโรตีนอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งมีราคาแพง เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้แควโรตีนอยด์จากธรรมชาติมีความสำคัญ และได้รับความต้องการในปริมาณที่สูง การผสมยีสต์ที่ผลิตแควโรตีนอยด์ในอาหารสัตว์โดยตรงช่วยให้อาหารสัตว์นั้นมีโปรตีนและแควโรตีนอยด์เพิ่มขึ้นได้ จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแควโรตีนอยด์ได้ คือ เชื้อยีสต์ *Rhodotorula rubra* ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารสีแควโรตีนอยด์โดยสามารถนำไปใช้ทดแทนสารสีสังเคราะห์จากทางเคมีได้ แควโรตีนอยด์ที่พบมากที่สุดเป็นยีสต์ *R. rubra* คือ ไลโคปีน ซึ่งพบมากถึง 40.68 ไมโครกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ แอสต้าแซนทิน เท่ากับ 38.63 ไมโครกรัมต่อกรัม, ลูทีน เท่ากับ 20.29 ไมโครกรัมต่อกรัม และ เบต้า-แคโรทีน เท่ากับ 8.89 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (สวติศรี, 2549 และ Chanchay, 2013) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวจะต้องมีการผลิตยีสต์ให้ได้ปริมาณมาก ซึ่งก่อให้เกิดต้นทุนที่สูง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณยีสต์ที่ผลิตแควโรตีนอยด์ในฝู่นข้าวโพดโดยตรงโดยใช้ฝู่นข้าวโพดเป็นสารอาหารน่าจะช่วยลดต้นทุนและเพิ่มคุณค่าโภชนาการของฝู่นข้าวโพดสำหรับอาหารสัตว์โดยตรง

โดยวิธี Solid state fermentation เป็นสภาวะที่ง่ายต่อการนำผลผลิตไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารสัตว์ไม่จำเป็นต้องคัดแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสามารถให้คุณค่าทางโภชนาที่สูงต่อสัตว์ด้วย โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อประเมินอิทธิพลของสารอาหารที่สำคัญ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแควโรตีนอยด์โดยแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ได้ถูกนำมาใช้ในการประเมินอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่าง และความชื้น ต่อการผลิตแควโรตีนอยด์ (Y_p) โดยแบบจำลองสมการพหุนามกำลังสองไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการใช้ CCD นั้นเป็นกระบวนการออกแบบการทดลองเพื่อลดปัจจัยการทดลองอื่น ๆ ทำให้ได้ผลได้เร็วขึ้น คือ มนัสนันท์ และคณะ (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและผลได้ปริมาณแควโรตีนอยด์ของยีสต์ *R. glutinis* DM28 บนรำข้าวโดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 ต่อ 1 โดยการเจริญเท่ากับ 88.2 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว และปริมาณแควโรตีนอยด์เท่ากับ 2.12 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว สุมาลี (2552) ศึกษาการเจริญของยีสต์ *R. rubra* โดยการทดลองแบบ CCD พบว่าการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ให้ผลได้ปริมาณแควโรตีนอยด์เท่ากับ 0.0685 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

Chanchay (2013) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *R. rubra* ของการผลิตแควโรตีนอยด์พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่ง ไนโตรเจนที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และมีสารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์สามารถผลิตแควโรตีนอยด์ได้ปริมาณมากถึง 30.39 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากเลี้ยงเชื้อยีสต์จากแผนการทดลองแบบ CCD ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 23.77 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 3.19 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 3.19 กรัมต่อลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 6.69 และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบเลี้ยงเชื้อยีสต์ในห้องปฏิบัติการพบว่า สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้เท่ากับ 235.84 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

การใช้ฝุ่นข้าวโพดผสมแคโรทีนอยด์ที่ได้จากยีสต์ *R. rubra* เพื่อเป็นอาหารสัตว์โดยตรง โดยใช้ฝุ่นข้าวโพดเป็นสารอาหารจึงอาจสามารถลดปัญหาของค่าใช้จ่ายที่สูง เพิ่มคุณค่าโภชนาการของฝุ่นข้าวโพด และลดปัญหามลพิษทางอากาศจากการเผาไหม้ฝุ่นข้าวโพดของเกษตรกร โดยอาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของการเพาะเลี้ยงสัตว์ที่เกษตรกรควรใส่ใจมากขึ้น และยังเป็นการนำเอาของเสียทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์

ดังนั้นการศึกษานี้ในครั้งนี้เพื่อมุ่งเน้นการใช้ฝุ่นข้าวโพดให้เกิดประโยชน์โดยใช้เป็นสารอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MJU11 พร้อมศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตขึ้น เพื่อเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ และเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์

R. rubra MJU11 จากห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

2. ศึกษาการเจริญของยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด

ปิเปตเซลล์ยีสต์ปริมาณ 10^8 เซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และใส่ในอาหารฝุ่นข้าวโพด 5 กรัม คลุกให้เข้ากัน (ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ; ฝุ่นข้าวโพด 5 กรัม ในน้ำ 12.3 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์การเจริญ และนำไปวิเคราะห์ผลได้ของปริมาณแคโรทีนอยด์ซึ่งต้องคำนวณในรูปของน้ำหนักแห้งของฝุ่นข้าวโพด 1 กรัม ซึ่งการทดลองแต่ละชุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลการศึกษาที่ได้ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์โดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ต่อไป

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ในการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Design-Expert ในการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) โดยมีค่าตอบสนอง (Response : Y) ได้แก่ น้ำหนักเซลล์แห้ง (การเจริญ) และปริมาณแคโรทีนอยด์ ปัจจัยตัวแปรอิสระ (Factor of independent variable : A, B and C) ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความชื้น (เปอร์เซ็นต์) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C : N Ratio) โดยศึกษาปัจจัยตัวแปรอิสระ 5 ระดับ แสดงใน Table 1 ตามระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญสูงสุดของยีสต์ *R. rubra* บนฝุ่นข้าวโพดจากการศึกษาข้อที่ 2 และการออกแบบการทดลองแสดงใน Table 2

Table 1 The experimental design with three variables for cultivation of *R. rubra* and carotenoid production.

Factor	Code value	Actual value
pH (X_1)	-1.68	5.32
	-1	6
	0	7
	1	8
	1.68	8.68

Table 1 continued

Factor	Code value	Actual value
Moisture (%) (X_2)	-1.68	33.2
	-1	40
	0	50
	1	60
	1.68	66.8
C : N Ratio (X_3)	-1.68	4.64
	-1	6
	0	8
	1	10
	1.68	11.36

Table 2 Central Composite Design (CCD) to evaluate of pH, moisture and C:N source on growth of *R. rubra* and carotenoid production.

Experiment	Code value		
	pH	Moisture	C : N Ratio
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.68	0	0
10	1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	1.68	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

4. วิเคราะห์การเจริญ

วิเคราะห์จำนวนเซลล์จากวิธีการ Total plate count บนอาหารยูน Yeast Malt Extract (YM) และนำไปเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับน้ำหนักแห้ง

5. วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ Foss et al. (1984)

เก็บตัวอย่างซึ่งน้ำหนัก 0.5 กรัม เติมน้ำละลาย 90 เปอร์เซ็นต์ Acetone ตวงด้วยกระบอกตวงปริมาณ 30 มิลลิลิตร ในขวดสีชา ใช้แท่งแก้วคนเป็นครั้งคราว เป็นเวลานาน 30 นาที กรองตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรองน้ำ สารละลายที่ได้ (Acetone extract) นำมา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำละลาย Ethyl acetate 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่หลอดทดลอง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 472 นาโนเมตร (Blank test ใช้ น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) หักลบค่า Absorbance ที่วัดได้ จากนั้นนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณแคโรทีนอยด์จากสมการ

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1,900$$

1. Absorbance – 10% of Absorbance(a)
2. $\frac{(a) \times 10,000}{1,900}$ (b)
3. $(b) \times [(Acetone \text{ extract } 5 \text{ ml}) + (Distilled \text{ water } 1 \text{ ml}) + (Ethyl \text{ acetate } 2 \text{ ml}) \times (Acetone \text{ } 30 \text{ ml})] \dots\dots\dots(c)$
 $\frac{(sample \text{ } 5 \text{ g}) \times (Acetone \text{ extract } 5 \text{ ml}) \times 1,000,000}{(c) = Carotenoid \text{ contents (ไมโครกรัมต่อกรัมวัตถุแห้ง)}}$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฟืนข้าวโพด

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฟืนข้าวโพด เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 216 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ และการเจริญ และแสดงผลดัง Table 3

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฟืนข้าวโพด พบว่ายีสต์ *R. rubra* MJU11 เจริญได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 22.4 ไมโครกรัมต่อกรัมฟืนข้าวโพดแห้ง (Figure 1) และผลได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 17.98 กรัมต่อกรัมฟืนข้าวโพด (Figure 2) หลังจากนั้นการเจริญจะลดลง ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณความชื้นในฟืนข้าวโพดลดลง ทำให้ยีสต์ตายเนื่องจากขาดน้ำที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม วรรณภา (2529) กล่าวว่าความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับปริมาณแคโรทีนอยด์เป็นแบบ Uniphase ซึ่งเป็นแบบการสร้างสารทุติยภูมิในช่วงต้นของการเจริญ ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์แบบ Uniphase อาจมาจากการเติบโตอย่างรวดเร็วของยีสต์ทำให้เกิดสภาพจำกัดอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมนัสนันท์ และคณะ (2548) ที่ทำการศึกษาล้างยีสต์ *R. glutinis* DM28 บนรำข้าวแบบการหมักแห้ง เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์โดยทำการหมักที่สภาวะความชื้นเริ่มต้น 49.6 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.21 พบว่าการเจริญ และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 144 ของการบ่ม โดยมีผลได้ปริมาณเซลล์ 54.0 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.65 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว และต่างจาก Chanchay (2013) พบว่าระยะเวลาที่ยีสต์ *R. rubra* เจริญได้ดีที่สุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 72 ในอาหารเหลวและยังต่างจาก Tinoia et al. (2004) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิต แคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. glutinis* พบว่าจำนวนเซลล์แห้งที่ได้เท่ากับ 10.35 กรัมต่อลิตร และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 3.48 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยใช้ H_2SO_4 -hydrolyzed 23.63 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.91 อุณหภูมิ 30.3 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นเวลา 94.78 ชั่วโมง

Table 3 The growth and carotenoid production of yeast *R. rubra* MJU11 on corn dust through solid state fermentation.

Time (Hour)	Dry weight (g/g corn dust)	Carotenoid ($\mu\text{g/g}$ dry weight corn dust)
24	14.48 ± 0.13^b	8.07 ± 0.01^b
48	17.98 ± 0.26^a	22.4 ± 0.07^a
72	11.42 ± 0.27^c	5.24 ± 0.03^c
96	10.23 ± 0.24^d	4.54 ± 0.04^d
120	9.80 ± 0.41^f	3.61 ± 0.04^e
144	9.62 ± 0.07^e	3.28 ± 0.03^f
168	8.41 ± 0.27^g	2.14 ± 0.02^g
192	7.51 ± 0.06^h	1.52 ± 0.01^h
216	7.21 ± 0.01^i	1.10 ± 0.04^i

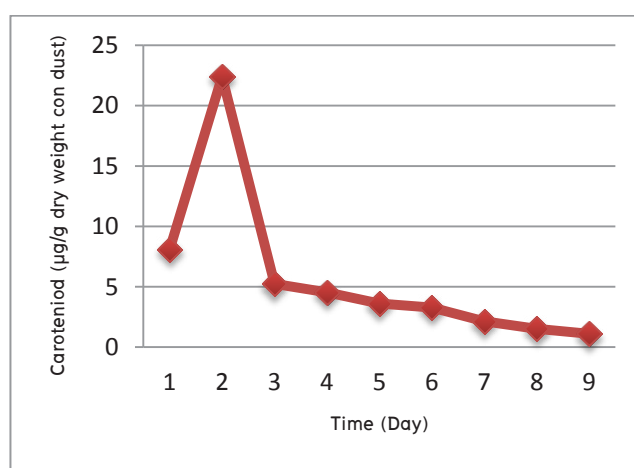


Figure 1 The amount of carotenoid from yeast *R. rubra* MJU11 on corn dust through solid state fermentation.

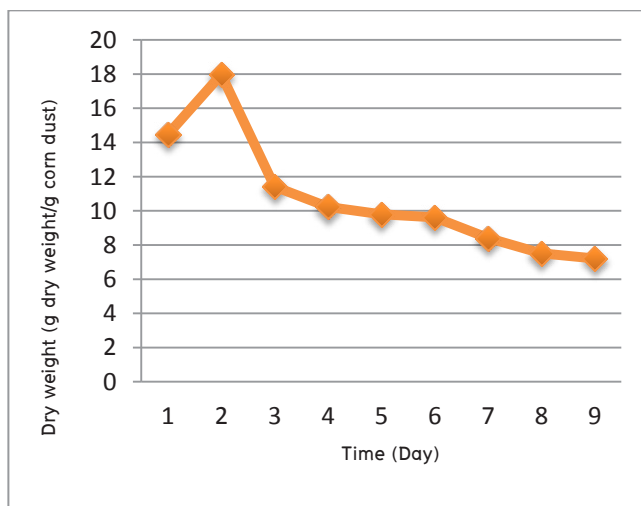


Figure 2 The growth of the yeast *R. rubra* MJU11 on corn dust through solid state fermentation.

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ในการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยการออกแบบการทดลอง แบบ Central Composite Design (CCD)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ในการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียม ซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน ศึกษาปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เปอร์เซ็นต์ความชื้น และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ และการเจริญ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ทำการหมัก 48 ชั่วโมง และแสดงผลดัง Table 4

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ในการเจริญ และผลได้ในการการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) หลังจากหมักเชื้อยีสต์ 48 ชั่วโมง (Table 4) พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8 ต่อ 1 โดยมีผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 72.01 ไมโครกรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพดแห้ง และการเจริญเท่ากับ 82.09 กรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพด แตกต่างจากมนัสนันท์ และคณะ (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. glutinis* DM28 บนรำข้าว โดยการออกแบบการทดลองแบบ CCD พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 ต่อ 1 โดยการเจริญเท่ากับ 88.2 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 2.12 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว และสุมาวี (2552) ศึกษาการเจริญของยีสต์ *R. Rubra* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน คือ กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตรโดยการทดลองแบบ CCD พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 0.0685 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และต่างจาก Chanchay (2013) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *R. rubra* ของการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่ง ไนโตรเจนที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และมีสารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากถึง 30.39 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากเลี้ยงเชื้อยีสต์จากแผนการทดลองแบบ CCD ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 23.77 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 3.19 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยการเจริญเติบโตที่

ปริมาณ 3.19 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 6.69 และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ในห้องปฏิบัติการพบว่าสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้เท่ากับ 235.84 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Table 4 The optimal condition for carotenoid production and dry weight by *R. rubra* MJU11 using CCD.

Experiment	Code value			Actual value			Dry weight	Carotenoid
	pH	Moisture	C:N Ratio	pH	Moisture	C:N Ratio		
	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)		
1	-1	-1	-1	6	40	6	40.01	30.54
2	1	-1	-1	8	40	6	41.01	31.38
3	-1	1	-1	6	60	6	37.65	27.91
4	1	1	-1	8	60	6	38.92	28.32
5	-1	-1	1	6	40	10	32.89	23.17
6	1	-1	1	8	40	10	29.87	20.21
7	-1	1	1	6	60	10	53.18	42.63
8	1	1	1	8	60	10	41.05	31.40
9	-1.68	0	0	5.32	50	8	39.99	29.55
10	1.68	0	0	8.68	50	8	39.76	29.72
11	0	-1.68	0	7	33.2	8	40.87	30.99
12	0	1.68	0	7	66.8	8	41.70	31.78
13	0	0	-1.68	7	50	4.64	69.58	58.71
14	0	0	1.68	7	50	11.36	38.87	28.15
15	0	0	0	7	50	8	80.64	69.42
16	0	0	0	7	50	8	82.09	72.01
17	0	0	0	7	50	8	82.09	72.01
18	0	0	0	7	50	8	81.09	70.93
19	0	0	0	7	50	8	80.64	69.42
20	0	0	0	7	50	8	80.64	69.42

Note : Dry weight (g/g corn dust) and Carotenoid (µg/g dry weight corn dust)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (A), ความชื้น (B) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C) เช่นกัน โดยมีความสัมพันธ์กับผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ในลักษณะที่เป็นเส้นโค้ง (Quadratic) และผลจากปัจจัยร่วมกัน (Interaction effect) ของค่าความเป็นกรด-ด่าง (A), ความชื้น (B) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C) แสดงดังในสมการ Y1 และ Figure 3 และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (A), ความชื้น (B) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C) โดยมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักเซลล์แห้งในลักษณะเส้นโค้ง แสดงดังในสมการ Y2 และ Figure 4

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\text{Carotenoid (Y1)} = 21.02 - 0.13A + 0.2B - 0.31C - 6.80A^2 - 6.70B^2 - 6.26C^2 - 0.13AB - 0.31AC + 0.65BC ;$$

$$R^2 = 0.9961$$

$$\text{Dry weight (Y2)} = 81.32 - 0.97A + 2.08B - 3.83C - 15.37A^2 - 14.87B^2 - 10.30C^2 - 1.11AB - 2.18AC + 4.49BC ;$$

$$R^2 = 0.9522$$

จากผลการทดลองของความชื้น และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU11 พบว่า เปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงสุดคือ 55 เปอร์เซ็นต์ และต่ำสุดคือ 45 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีการเปรียบเทียบผลการผลิตแคโรทีนอยด์ใน Figure 3

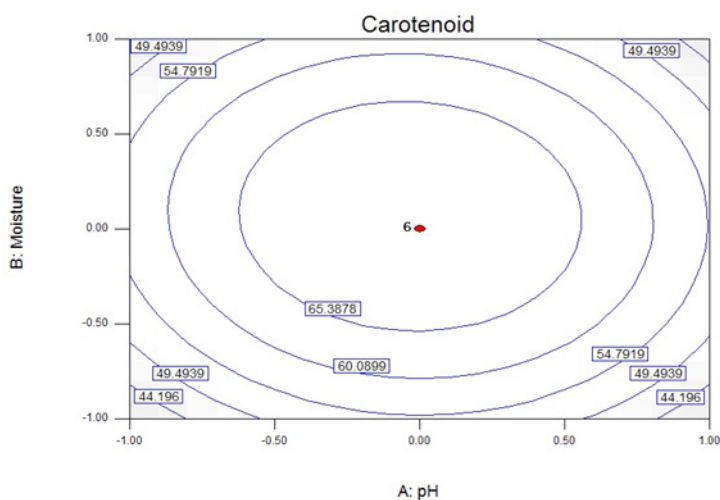


Figure 3 Shows the relation between the acidity - alkalinity (A), moisture (B) and the ratio of carbon per nitrogen (C) are associated with amount of carotenoids.

จากผลการทดลองของความชื้น และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของปริมาณเซลล์แห้งจากยีสต์ *R. rubra* MJU11 พบว่า เปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงสุด คือ 55 เปอร์เซ็นต์ และต่ำสุดคือ 45 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีการเปรียบเทียบผลปริมาณเซลล์แห้งใน Figure 4

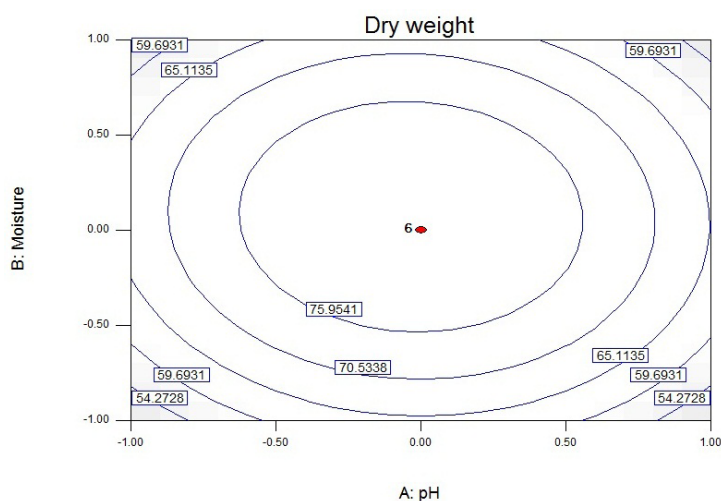


Figure 4 Shows the relation between the acidity - alkalinity (A), moisture (B) and the ratio of carbon per nitrogen (C) are associated with cell dry weight.

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฟืนข้าวโพด แบบการหมักแห้ง พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 8 ต่อ 1 และระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีผลได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 82.09 กรัมต่อกรัมฟืนข้าวโพด และผลได้ปริมาณ แคโรทีนอยด์เท่ากับ 72.01 ไมโครกรัมต่อกรัมฟืนข้าวโพดแห้ง สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ซึ่งเป็นการลดปริมาณของ เสียจากทางเกษตร และ ลดปัญหามลพิษทางอากาศจากการเผาไหม้ฟืนข้าวโพดของเกษตรกรอีกด้วย ซึ่งสามารถ นำผลการศึกษาในครั้งนี้ไปใช้ในการผลิตแคโรทีนอยด์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้จริง

เอกสารอ้างอิง

- จริยา คลังทรัพย์. (2551). สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *Rhodotorula rubra*. ปัญหาพิเศษบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัย แม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ. 56 หน้า.
- พจนีย์ มณีโชติ และดวงพร คันธโชติ. (2529). การเจริญของยีสต์ *Rhodotorula rubra* TISTR 5127 ในน้ำข้าวฟ่างหวานเพื่อเป็นแหล่ง อาหารโปรตีน และแคโรทีนอยด์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร. กรุงเทพฯ.
- มนัสนันท์ ใจจนกมลสันต์, ซาลี มะลิซ้อน และ วรพจน์ สุนทรสุข. (2548). การผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula glutinis* DM28 บนรำข้าว. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี.
- วรรณภา ทาบโลกา. (2529). ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัส ที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สาวิตร์ ลิมทอง. (2549). ยีสต์ : ความหลากหลาย และเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมาลี สุขเกียรติ. (2552). สภาวะที่เหมาะสมบางประการสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula rubra*. ปัญหาพิเศษบัณฑิต ศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ. 68 หน้า.
- สุริลักษณ์ รอดทอง. (2531). การผลิตเบต้า-แคโรทีน โดยยีสต์ (*Rhodotorula pallida*). [Online]. แหล่งที่มา http://www.geocities.ws/asa_chai/cas2.htm. วัน 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ที่สืบค้นข้อมูล.
- Chanchay, N. (2013). Optimal Condition for Growth of *Rhodotorula rubra* and Antioxidation Characteristics of Its Carotenoids. PhD Thesis. : Chiang Mai University. 135 p.

- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. and Streiff, K. (1984). Carotenoids in diets for salmonids I: Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture.*, 41: 213-226
- Tinoia, J., Rakariyathana, N. and Deming, R.L. (2004). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Pro. Biochem.*, 40 : 2551–2557.