

การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงเพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเป็นซับสเตรต

Selection of Carotenoid-Rich Yeast Strains for Single Cell Protein Production Using Low-Cost Carbon Sources as the Substrates

ชุตินา แก้วกระจาย* และอาณนัท ทวีทรัพย์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
ถนนปรีดิพนมยงค์ ตำบลประตูลี้ อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

วิมลพรรณ รุ่งพรหม

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
ถนนปรีดิพนมยงค์ ตำบลประตูลี้ อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

Chutima Kaewkrajay* and Arnon Thaweessup

Division of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat
University, Pridi Banomyong Road, Pratuchai, Phra Nakhon Si Ayutthaya, 13000

Wimolpun Rungprom

Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat
University, Pridi Banomyong Road, Pratuchai, Phranakhon Si Ayutthaya, 13000

บทคัดย่อ

การคัดเลือกยีสต์ที่มีสีจากคลั่งยีสต์ จำนวน 37 สายพันธุ์ พบว่ามียีสต์ที่โดดเด่นในการผลิตแคโรทีนอยด์ 6 สายพันธุ์ คือ AQA1-2, AQA4-3, AQA6-4, AQA11-1, AQA14-2 และ AQA17-2 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2589 ± 69 , 2534 ± 61 , 2528 ± 278 , 2239 ± 269 , 2190 ± 442 และ 2755 ± 43 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ถูกจัดจำแนกโดยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ large subunit (LSU) rRNA gene จัดจำแนกเป็น *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sakaguchia oryzae*, *Goffeauzyma aciditolerans*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cystobasidium calyptogenae* และ *R. paludigena* ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ของเหลือทิ้งและผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากากน้ำตาลมีความเหมาะสมที่สุด โดยยีสต์ที่

*ผู้รับผิดชอบบทความ : kchutima@aru.ac.th

ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด คือ สายพันธุ์ AQA1-2 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง คือ อาหารเหลว กากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และยีสต์เอ็กแทรกซ์ 0.5 กรัมต่อลิตร เมื่อจัดจำแนกชนิดของรงควัตถุด้วยวิธี thin layer chromatography พบว่าทุกสายพันธุ์ผลิต β -carotene และบางสายพันธุ์มีการผลิต torulene และ torularhodin ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นข้อมูลในการศึกษาระดับที่สูงขึ้น อันเป็นประโยชน์ต่อการลดต้นทุนการผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ : แคโรทีนอยด์; แหล่งคาร์บอนราคาถูก; การจัดจำแนก; ยีสต์

Abstract

The six dominant carotenogenic yeast strains were selected from 37 strains of colored yeast. They are named as AQA1-2, AQA4-3, AQA6-4, AQA11-1, AQA14-2 and AQA17-2 which produced 2589 ± 69 , 2534 ± 61 , 2528 ± 278 , 2239 ± 269 , 2190 ± 442 and 2755 ± 43 $\mu\text{g/L}$ of carotenoids concentration respectively, after they were cultivated in YM broth with incubated at 30°C , shaking speed of 160 rpm for 96 h. The identification was performed based on nucleotide sequence at D1/D2 region of the large subunit (LSU) rRNA gene. They were identified as *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sakaguchia oryzae*, *Goffeauzyma aciditolerans*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cystobasidium calyptogenae* and *R. paludigena*, respectively. Several wastes and by-product from industries such as sugarcane blackstrap molasses, rice straw hydrolysate and crude glycerol were used as low-cost carbon sources for carotenoids, the highest concentration was found from AQA1-2 strain and sugarcane blackstrap molasses was the best for carotenoids production. The optimum conditions were 60 g/L molasses, 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L KH_2PO_4 and 0.5 g/L yeast extract. The β -carotene pigment was observed from all strains and other pigments such as torulene and torularhodin were also found by using thin-layer chromatography. The results of this research can be further studied in advance research and significantly reduce cost for industrial application.

Keywords: carotenoid; low-carbon source; D1/D2 region; yeast

1. บทนำ

แคโรทีนอยด์เป็นสารสีที่มีความสำคัญในทางอาหารและเภสัชอุตสาหกรรม พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ผัก ผลไม้ ซึ่งสังเคราะห์ได้จากสีที่เกิดขึ้น มีตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีแดง สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ carotene (β -carotene, α -carotene, lycopene)

และ xanthophyll (astaxanthin, β -cryptoxanthin, canthaxanthin, capsanthin, fucoxanthin, lutein, zeaxanthin) [1] แคโรทีนอยด์บางชนิดใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามิน นอกจากนี้ยังมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น การใช้แคโรทีนอยด์ในรูปของ bioactive phytochemical เพื่อลดความเสี่ยงของ

การเกิดโรค อาทิ โรคมะเร็ง โรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือด หัวใจ กล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน และต่อที่ดวงตา [2-5] นอกจากนี้ยังใช้เป็นสีธรรมชาติในการผสมกับอาหารสัตว์ซึ่งเป็นที่ยอมรับมากกว่าการใช้สังเคราะห์ [6] ด้วยเหตุผลที่กล่าวมา การได้รับอาหารที่มีแคโรทีนอยด์สูงจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง แหล่งของแคโรทีนอยด์นอกจากจะพบได้ในผักและผลไม้แล้ว อีกแหล่งหนึ่งที่ได้จัดได้ว่ามีบทบาทสำคัญและสามารถพัฒนาการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ คือ จุลินทรีย์ ทั้งนี้เพราะสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ปริมาณมาก ๆ ในระยะเวลาที่จำกัด สามารถสกัดแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากและสามารถพัฒนาการผลิตไปสู่ตลาดระหว่างประเทศได้มากขึ้นอันเป็นการตอบรับกับความต้องการของผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี [7]

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตแคโรทีนอยด์ ได้แก่ การผลิต β -carotene จากสาหร่ายขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ที่มีการผลิตอย่างเป็นการค้าแล้วในประเทศออสเตรเลีย อิสราเอล และสหราชอาณาจักร [8] มีการผลิต astaxanthin จากสาหร่ายขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis* ออกจำหน่ายในระดับการค้าในประเทศสหราชอาณาจักร ญี่ปุ่น และอินเดีย [7] การผลิตโคโรทีนอยด์จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก PY202 ที่แยกได้จากดินโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี มีความโดดเด่นในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ [9] ซึ่งนอกจากสาหร่ายขนาดเล็กแล้ว จุลินทรีย์อื่น ๆ ก็เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ไม่ว่าจะเป็นยีสต์ แบคทีเรีย และราเส้นสาย กรณีของยีสต์จัดได้ว่ามีความโดดเด่นทั้งนี้เพราะมียีสต์หลายสกุลที่ให้โคโรทีนที่มีสี โดยสีที่พบ เช่น เหลือง ส้ม ชมพู แดง โดยเฉพาะยีสต์ที่มีสีแดงหรือเรียกว่า red yeast ซึ่งมีการสะสมแคโรทีนอยด์ไว้มาก red yeast จัดอยู่ในคลาสเบซิไดโอไมซีตัส (basidiomycetous yeast) มีสกุลที่โดดเด่น ได้แก่ *Rhodotorula*,

Rhodospiridium และ *Sporobolomyces* เป็นต้น โดยสารสีที่พบส่วนใหญ่เป็นสารพวก β -carotene, γ -carotene, torulene และ torularhodin [10]

โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein, SCP) คือ เซลล์ของจุลินทรีย์ที่ทำให้แห้งเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารคนหรืออาหารสัตว์ ยีสต์ที่นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ เรียกว่าฟีดยีสต์ (feed yeast) หรือฟอดเดอร์ยีสต์ (fodder yeast) ปัจจุบันอาหารสัตว์ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้อุดมไปด้วยแร่ธาตุนานาชนิด มีการเติมส่วนผสมของธัญพืชหรือผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ กากนมถั่วเหลือง กากนมถั่วเขียว และปลาป่น เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้อาหารสัตว์ที่ได้มีคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วน สัตว์ที่กินอาหารเข้าไปจะมีสุขภาพดี ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูง และจากความต้องการแหล่งโปรตีนเหล่านี้ในปริมาณมาก จึงส่งผลให้มีราคาสูงขึ้น ยีสต์จึงเข้ามามีบทบาทในการเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ทั้งนี้เพราะยีสต์มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 40-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และยังประกอบด้วยวิตามินและเกลือแร่หลายชนิดที่เป็น trace element ของสัตว์ เช่น วิตามินบีรวม โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี [11] อีกทั้งการผลิตเซลล์ยีสต์สามารถผลิตได้จำนวนมาก ใช้พื้นที่การผลิตน้อย ระยะเวลาการผลิตสั้น การผลิตไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล และสภาพดินฟ้าอากาศ วัตถุดิบที่นำมาใช้เลี้ยงยีสต์ก็มีราคาถูก ได้แก่ ไชร์ปจากโกโก้ เวียจากโรงงานนม กลีเซอรอล และกากน้ำตาล เป็นต้น [12-15]

การใช้ยีสต์เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้อง พบว่าสัตว์ที่กินเข้าไปจะมีสุขภาพดี ให้ผลผลิตสูง มีลักษณะโครงสร้างที่ดี โดยยีสต์จะไปมีส่วนช่วยกระตุ้นให้แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้สัตว์มีกิจกรรมการย่อยเซลล์ลูลอสได้ดีขึ้น [16] นอกจากนี้การใช้ยีสต์เป็นอาหารสัตว์ให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้องยังเป็นทางเลือกที่ต่อนึ่งที่จะใช้แทนยาปฏิชีวนะ [17-19]

จากการทดลองของ Marrero และคณะ [20] ที่ได้ทดสอบทางด้านชีวเคมีและสัณฐานวิทยา พบว่ายีสต์ 25 สายพันธุ์จัดอยู่ในสกุล *Candida tropicalis* มีความเหมาะสมที่จะใช้เติมเข้าไปในอาหารสัตว์ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* และจากการสำรวจความต้องการด้านอาหารเสริมในสัตว์ของตลาดโลก พบว่าความต้องการจุลินทรีย์ในการเติมเข้าไปในอาหารสัตว์นั้นมีไม่จำกัด ทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ถูกจำหน่ายในราคาที่ค่อนข้างสูง การศึกษาวิจัยสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์จึงมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่ง [21-22]

ดังนั้นงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยต์ได้สูง จากยีสต์มีสีทั้งหมด 37 สายพันธุ์ ที่จัดเก็บไว้ในสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา และจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ศึกษาความสัมพันธ์ของยีสต์ดังกล่าวจากต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยต์ของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวเพื่อนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยต์ได้สูง

นำยีสต์มีสี 37 สายพันธุ์ ที่จัดเก็บไว้ในสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง yeast extract malt extract (YM) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จากนั้นตั้งยีสต์มา 1 ลูกป ใสลงในอาหารเหลว

YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อ ทดสอบการผลิตแคโรทีนอยต์โดยใช้อาหารเหลว YM เป็น main medium ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่กล้าเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น OD ที่ 600 nm (OD_{600}) 1.0 แล้วนำไปบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยปราศจากแสง เก็บตัวอย่างที่ 96 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที [12] เซลล์ที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์การเจริญและปริมาณแคโรทีนอยต์

2.2 การจัดจำแนกและเก็บรักษายีสต์สาย

พันธุ์ที่คัดเลือกได้

นำยีสต์ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาฉีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง YM ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง รูปร่าง ลักษณะ และการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการจำแนกตามวิธี Kurtzman และ Robnetette [23] วิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้ primer NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') เริ่มสกัด ดีเอ็นเอโดยนำเซลล์ยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง มาทำซัสเพนชันในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำไปไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้ความร้อนที่น้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำกลับมาแช่น้ำแข็งในกล่องน้ำแข็ง หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์กับน้ำด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารสกัดดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปขยายปริมาณโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) (MultiGene OptiMax; Labnet International, Inc) โดยมีส่วน

ผสมดังนี้ 10x PCR buffer (3 μ L), 25 mM $MgCl_2$ (2.4 μ L), 2.5 mM dNTP mixtures (2.4 μ L), 10 pmol NL1 (0.9 μ L), 10 pmol NL4 (0.9 μ L), *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) (0.15 μ L), DNA template solution (3 μ L) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จนมีปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยการ run บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ขนาดของ amplicon ที่ได้ประมาณ 600 base pairs แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (TIANquick Midi Purification kit, TIANGEN, China) ตามวิธีที่แนะนำใน protocol และตรวจสอบ purified PCR product อีกครั้งด้วยการ run บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ก่อนส่งไปหาลำดับเบสที่ First Base (Malaysia) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบความเหมือนในฐานข้อมูลของ GenBank และศึกษาความสัมพันธ์ของยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์จากสายพันธุ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้ MEGA software version 7.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นของแต่ละเคลดจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap 1,000 ซ้ำ

2.3 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับห้องปฏิบัติการ

เพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็งเยือก YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จากนั้นดิงยีสต์มา 1 ลูก ใส่ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อ

ทดสอบการผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารเหลวที่ใช้เป็น main medium ที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ (1) แหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส กากน้ำตาล สาร

สกัดหยาบกลีเซอรอล และฟางข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร (2) ความเข้มข้นของคาร์บอนเริ่มต้น 20, 40, 60, 80 กรัมต่อลิตร (3) ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้น 0, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร (4) ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเริ่มต้น 0, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร และ (5) ความเข้มข้นของ yeast extract เริ่มต้น 0, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

ปริมาตรของ main medium ที่ใช้ คือ 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่กล้าเชื้อให้ main medium มีความเข้มข้นเริ่มต้น OD ที่ 600 nm (OD_{600}) 1.0 นำไปบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยปราศจากแสง เมื่อสิ้นสุดการหมักนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์การเจริญด้วยเครื่อง spectrophotometer/ น้ำหนักเซลล์แห้ง สกัดและวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยวิธีทางเคมี

2.4 ศึกษาชนิดของรงควัตถุด้วย thin layer chromatography

เตรียม TLC chamber ให้อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมปิโตรเลียมอีเธอร์ : อะซีโตน (80:20 v/v) ชิดเส้นบน TLC plate chromatography ให้สูงจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร เพื่อเป็นระดับที่ใช้ในการหยดสาร และชิดเส้นได้จากขอบบน 2 เซนติเมตร เพื่อเป็นระดับบอกการเคลื่อนที่สิ้นสุดของตัวทำละลายโดยให้ระยะห่างของทั้งสองเส้นอยู่ที่ 10 เซนติเมตร หยดสารสกัดแคโรทีนอยด์บน TLC plate ที่ระดับชิดล่าง รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำที่เดิม 2-3 ครั้ง นำไปแช่ใน TLC chamber ปลอยไว้จนกระทั่ง mobile phase เคลื่อนที่ถึงขีดบอกระดับที่ขีดไว้ นำ TLC plate ออกจาก

chamber แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย พร้อมทั้งระยะทางที่แถบสีต่าง ๆ ปรากฏขึ้น คำนวณค่า R_f เปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่มีการรายงานมาก่อนหน้านั้น [24]

2.5 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์การเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer UV/Vis Lambda 25) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางสารละลายเซลล์ให้วัดค่าความขุ่นได้ในช่วง 0.1-1.0 ด้วยน้ำกลั่น และวิเคราะห์น้ำหนักแห้งโดยนำตะกอนเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 รอบ ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักเซลล์คงที่ [7]

วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Aksu และคณะ [25] นำตะกอนเซลล์ไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และอะซิโตน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ก่อนทำให้เซลล์แตกด้วย glass bead (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร) ประมาณ 0.2 กรัม ด้วยเครื่อง ultrasonicate ที่ความยาวคลื่น 37 kHz เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป vortex ต่ออีก 1 นาที (ดัดแปลงจาก Tangtua [26]) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสเก็บไว้ ส่วนตะกอนเซลล์ให้ล้างด้วยสารละลายดังข้างต้นอีกครั้ง นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน β -carotene

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS [27] ใช้ D-glucose ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4,

0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น standard ดูดสารละลายกลูโคสที่แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายกลูโคส ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) นำลูกแก้วปิดปากหลอดทดลอง นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นต่ออีก 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน โดยทดลอง 3 ซ้ำ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างให้ทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน กลูโคส แต่เปลี่ยนจากสารละลายกลูโคสเป็นสารละลายตัวอย่าง

การไฮโดรไลซ์ฟางข้าวดัดแปลงจาก กุสุมาวดี [28] โดยนำฟางข้าวมาบดให้ละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดรู 30 mesh จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เก็บไว้ในสภาวะแห้ง) เติมนกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราส่วนฟางข้าวต่อปริมาณกรดซัลฟิวริก 1 : 10 และนำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมนโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อปรับ pH ให้เป็น 10.0 แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน DNS

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย one-way ANOVA และ post hoc test-Duncan ($p < 0.05$) จากการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างและจัดกลุ่ม

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูง

การเลี้ยงยีสต์ที่มีสีในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์การเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ พบว่าจากยีสต์มีสี 37 สายพันธุ์ มี 6 สายพันธุ์ ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูง คือ มากกว่า 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้แก่ ยีสต์สายพันธุ์ AQA1-2, AQA4-3, AQA6-4, AQA11-1, AQA14-2 และ AQA17-2 โดยผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2589 ± 69 , 2534 ± 61 , 2528 ± 278 , 2239 ± 269 , 2190 ± 442 และ 2755 ± 43 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์ดังกล่าวพบว่าแต่ละสายพันธุ์ให้ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่ามีความแตกต่างกันโดยสายพันธุ์ AQA1-2, AQA4-3, AQA11-1

และ AQA17-2 มีการเจริญ OD ที่ 600 nm (OD_{600}) 25.6, 26.1, 31.6 และ 25.6 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ AQA6-4 และ AQA14-2 ที่มีการเจริญ 12.9 และ 10.5 ตามลำดับ

3.2 การจัดจำแนกยีสต์ที่คัดเลือกได้

เมื่อนำยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ มาจัดจำแนกด้วยวิธีซีวโมเลกุลบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene พบว่าสายพันธุ์ AQA1-2, AQA4-3, AQA6-4, AQA11-1, AQA14-2 และ AQA17-2 จัดจำแนกเป็น *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sakaguchia oryzae*, *Goffeauzyma aciditolerans*, *Rhodospordium toruloides*, *Cystobasidium calyptogenae* และ *R. paludigena* ตามลำดับ โดยมีความเหมือนกับ type strain ดังตารางที่ 1

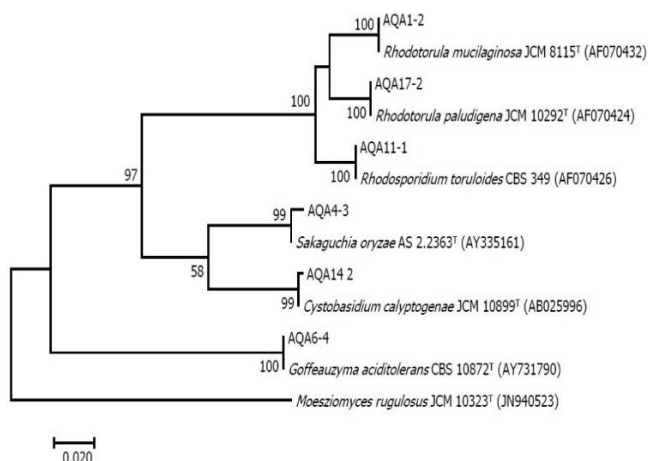
ตารางที่ 1 การจัดจำแนกยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์บริเวณ D1/D2 region ของ LSU rRNA gene

strain	Closet species	Identities		Gap	Substitution		Result of identification
		No.	%		No.	%	
AQA1-2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> JCM 8115 ^T	540/541	99.80	1	0	0.00	<i>R. mucilaginosa</i>
AQA4-3	<i>Sakaguchia oryzae</i> AS 2.2363 ^T	455/461	98.70	4	2	0.40	<i>S. oryzae</i>
AQA6-4	<i>Goffeauzyma aciditolerans</i> CBS 10872 ^T	518/518	100.00	0	0	0.00	<i>G. aciditolerans</i>
AQA11-1	<i>Rhodospordium toruloides</i> CBS 349 ^T	538/538	100.00	0	0	0.00	<i>Rh. toruloides</i>
AQA14-2	<i>Cystobasidium calyptogenae</i> JCM 10899 ^T	568/569	99.80	0	1	0.20	<i>C. calyptogenae</i>
AQA17-2	<i>Rhodotorula paludigena</i> JCM 10292 ^T	556/556	100.00	0	0	0.00	<i>R. paludigena</i>

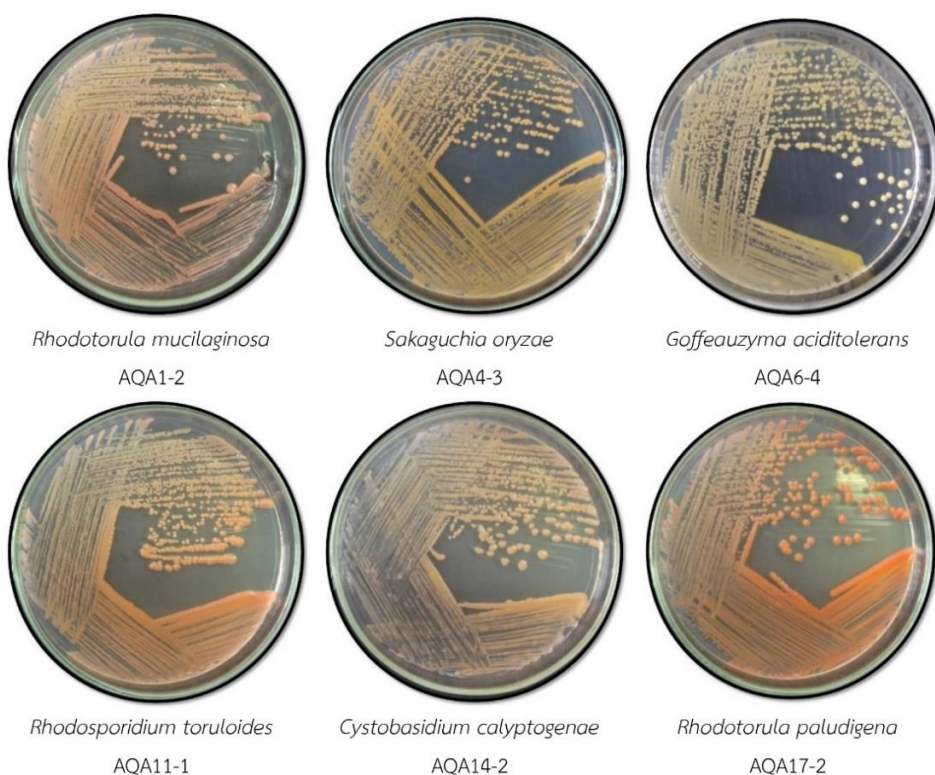
^T หมายถึง type strain

ผลการจัดจำแนก พบว่ายีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ จัดอยู่ในไฟลัมเบซิดิโอไมโคตา (phylum: Basidiomycota) ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ของยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ นี้ได้จากต้นไม้วิวัฒนาการ (รูปที่ 1) เมื่อพิจารณาลักษณะและสีของโคโลนีของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์

AQA1-2 โคโลนีมีสีแดงอมชมพู AQA4-3 โคโลนีมีสีเหลืองส้ม AQA6-4 โคโลนีมีสีเหลือง AQA11-1 โคโลนีมีสีส้ม AQA14-2 โคโลนีมีสีส้มอ่อน และ AQA17-2 โคโลนีมีสีส้มเข้ม (รูปที่ 2) และเมื่อบ่มเชื้อนานขึ้น โคโลนีจะมีสีเข้มขึ้น



รูปที่ 1 สายพันธุ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ AQA1-2, AQA4-3, AQA6-4, AQA11-1, AQA14-2 และ AQA17-2 ซึ่งสร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) algorithm โดยใช้โปรแกรม MEGA software version 7.0



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของยีสต์สายพันธุ์ AQA1-2, AQA4-3, AQA6-4, AQA11-1, AQA14-2 และ AQA17-2 บนอาหารแข็ง YM เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

โดย red yeast ที่มีการรายงานการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดี ได้แก่ *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium toru-*

loides), *R. mucilaginosa* [12,15,29,30] *S. ruberrimus* [14] *Sporidiobolus pararoseus* [31] ซึ่งยีสต์เหล่านี้โดดเด่นด้านการผลิตแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูง

3.3 การทดสอบเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

การคัดเลือกยีสต์ในเบื้องต้น ได้ยีสต์ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ที่มีความโดดเด่นในการผลิตแคโรทีนอยด์ เมื่อนำยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีของเหลือทิ้งและผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กากน้ำตาล ฟางข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ และสารสกัดหยาบบกลีเซอรอล โดยใช้อาหารเหลว YM เป็นชุดควบคุม ปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นให้น้ำตาลในปริมาณที่เท่ากัน คือ 20 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์การเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์ ผลการทดลองพบว่าอาหารเหลวที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด โดยสายพันธุ์ AQA1-2 ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด ตามด้วย AQA4-3, AQA17-2, AQA14-2, AQA6-4 และ AQA11-1 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่า AQA1-2 มีการเจริญมากที่สุด วัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 4.0 กรัมต่อลิตร และผลิตแคโรทีนอยด์เท่ากับ

1734±35 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนการใช้สารสกัดหยาบบกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีรองลงมา โดยผลการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์ AQA11-1 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 900±167 ไมโครกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเจริญมีค่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์อื่น ๆ ส่วนอาหารที่ใช้ฟางข้าวผ่านการไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์มีการผลิตแคโรทีนอยด์ได้น้อยสุด สายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงในอาหารเหลวชนิดนี้ คือ AQA1-2 และ AQA4-3 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 654±103 และ 646±167 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดย AQA1-2 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า AQA4-3 เพียงเล็กน้อย สำหรับอาหารเหลว YM ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ยีสต์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดี แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลแล้ว พบว่าสายพันธุ์ AQA4-3 ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ได้ใกล้เคียงกัน ส่วนสายพันธุ์ AQA14-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์น้อยกว่าอาหารเหลวที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแคโรทีนอยด์ของยีสต์ 6 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาล สารสกัดหยาบบกลีเซอรอล และฟางข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 96 ชั่วโมง

C-sources/yeast strains	AQA1-2	AQA4-3	AQA6-4	AQA11-1	AQA14-2	AQA17-2
กากน้ำตาล						
แคโรทีนอยด์ (µg/L)	1734±35 ^a	1697±278 ^a	609±255 ^b	409±139 ^c	1525±290 ^a	1587±87 ^b
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	4.0	2.6	2.4	2.4	3.1	2.7
สารสกัดหยาบบกลีเซอรอล						
แคโรทีนอยด์ (µg/L)	552±49 ^b	528±0 ^b	693±95 ^b	900±167 ^b	458±175 ^c	656±169 ^c
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.4	0.5	0.6	0.4	0.3	0.5
ฟางข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์						
แคโรทีนอยด์ (µg/L)	654±103 ^b	646±167 ^b	479±104 ^b	528±157	360±128 ^c	374±43 ^c
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	0.26	0.17	0.15	0.19	0.23	0.20
อาหารเหลว YM (control)						
แคโรทีนอยด์ (µg/L)	2656±390 ^a	1611±227 ^a	1540±308 ^a	1350±104 ^a	924±14 ^b	2037±69 ^a
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	5.9	4.3	4.4	5.8	5.7	4.9

ผลการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์นั้นพบว่ากากน้ำตาลมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารสกัดหยาบกลีเซอรอลและฟางข้าวที่ผ่านการไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้การผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลยังให้ผลใกล้เคียงกับการใช้อาหารเหลว YM ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุด คือ *Rhodotorula mucilaginosa* AQA1-2 และพบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลกับอาหารเหลว YM ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ในปี ค.ศ. 2016 Cheng และ Yang [15] รายงานการใช้ของเหลือทิ้งจากอาหาร ได้แก่ ซอสมะเขือเทศ กากน้ำตาล และเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *R. mucilaginosa* F-1 พบว่ายีสต์มีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 2611.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ขณะที่อาหารเหลว YM ที่ใช้เป็นชุดควบคุม ของเสียจากซอสมะเขือเทศ และของเสียจากเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2337.5, 2234.9 และ 1107.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ดังนั้นสายพันธุ์ AQA1-2 จึงถูกคัดเลือกไว้สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

3.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์สายพันธุ์ AQA1-2

การนำยีสต์ *R. mucilaginosa* AQA1-2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อ

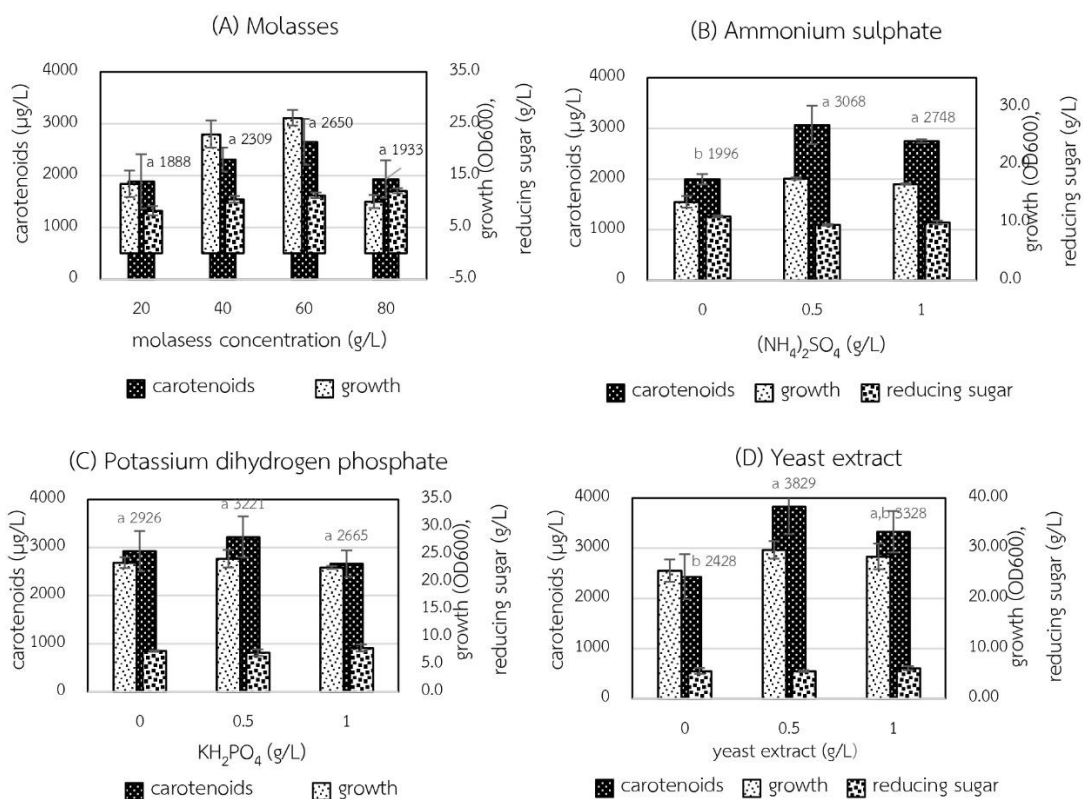
ลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 2650 ± 440 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่าที่สภาวะน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีการเจริญสูงสุด ส่วนอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 20, 40 และ 80 กรัมต่อลิตร ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 1888 ± 524 , 2309 ± 229 และ 1933 ± 362 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (รูปที่ 3A)

การศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ที่ไม่เติมและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้น 4.5 ผลการทดลองพบว่าในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด โดยผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 3068 ± 382 ไมโครกรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่ามีน้ำตาลคงเหลือน้อยสุด (9.6 ± 0.15 กรัมต่อลิตร) ส่วนสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2748 ± 35 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างจากสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 1996 ± 101 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้น้อยกว่าการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมซัลเฟตนั้น มีผลต่อการผลิต

แคโรทีนอยด์ของยีสต์ (รูปที่ 3B)

นำยีสต์ *R. mucilaginosa* AQA1-2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ที่ไม่เติมและเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 พบว่าในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีการเจริญสูงสุด

ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 3221 ± 425 ไมโครกรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่ามือน้ำตาลคงเหลือน้อยสุด (7.1 ± 0.58 กรัมต่อลิตร) ส่วนสภาวะที่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2926 ± 416 และ 2665 ± 276 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากทั้ง 3 สภาวะ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (รูปที่ 3C)



รูปที่ 3 ปริมาณแคโรทีนอยด์ การเจริญ และน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* AQA1-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี (A) กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (B) แอมโมเนียมซัลเฟต (C) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และ (D) ยีสต์เอ็กแทรกซ์

เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ที่ไม่เติมและเติมยีสต์เอ็กแทรกซ์ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้น 4.5 พบว่าในอาหาร

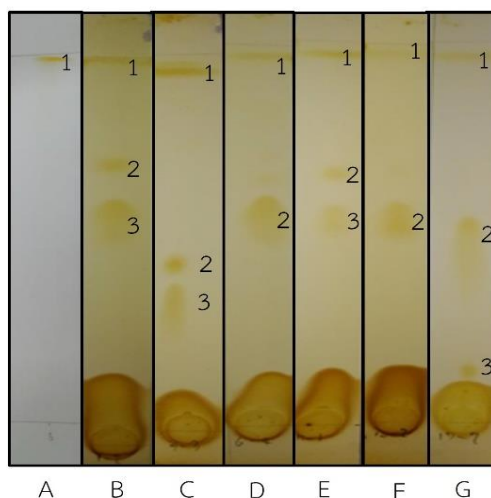
เหลวจากน้ำตาลที่เติมยีสต์เอ็กแทรกซ์ 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีการเจริญสูงสุด ผลิตภัณฑ์น้อยได้สูงสุด เท่ากับ 3829 ± 549 ไมโครกรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุด การหมักพบว่ามีน้ำตาลคงเหลือน้อยสุด คือ 5.9 ± 0.2 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะที่เติมยีสต์เอ็กแทรกซ์ 1 กรัมต่อลิตร ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 3328 ± 412 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าสภาวะที่เติมยีสต์เอ็กแทรกซ์ 0.5 กรัมต่อลิตร อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนอาหารเหลวจากน้ำตาลที่ไม่เติมยีสต์เอ็กแทรกซ์ ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2428 ± 449 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าอาหารเหลวจากน้ำตาลที่เติมยีสต์เอ็กแทรกซ์เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงว่า ยีสต์เอ็กแทรกซ์มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ (รูปที่ 3D)

รายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. glutinis* YB-252 แบบ solid-state fermentation โดยใช้ polyurethane foam (PUF) เป็นตัวค้ำจุน โดยใช้ Plackett-Burman design ในการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ผลการทดลองพบว่า treatment ที่ 6 และ 8 ที่จัดสภาวะของการเพาะเลี้ยงยีสต์ตามลำดับ ดังนี้ พีเอช (4, 6) อุณหภูมิ (25, 30 °C) คาร์บอน (40, 40 g/L) ความชื้น (90, 90 %) เวลา (48, 72 h) ปริมาณกล้าเชื้อ (10^6 , 10^8 cells/mL) และตัวเหนียวนา (125, 125 ppm of imidazole) ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 340 และ 323 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ [32] ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ QS1, QS2 และ QS3 พบว่าเพปโตน ไดโพลแซเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมอะซิเตท และน้ำทั้งจากปาล์ม เป็นส่วนประกอบหลักที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ [33] จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีการใช้ปัจจัยและสภาวะสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่าง

กันไป การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์นั้น ๆ จึงมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด

3.5 จำแนกชนิดรงควัตถุของแคโรทีนอยด์ด้วย TLC

การแยกชนิดรงควัตถุของแคโรทีนอยด์ที่ผลิตโดยยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วย TLC ที่มีสารละลายผสมปิโตรเลียมอีเธอร์ : อะซีโตน (80:20 v/v) เป็น mobile phase พบว่าแยกรงควัตถุของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ได้ 2-3 รงควัตถุ โดยสายพันธุ์ AQA1-2, AQA4-3, AQA11-1, AQA17-2 มี 3 รงควัตถุ ส่วนสายพันธุ์ AQA6-4 และ AQA14-2 มี 2 รงควัตถุ เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งของรงควัตถุกับตำแหน่งของ β -carotene ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน พบว่าทุกสายพันธุ์มีการผลิต β -carotene (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 รงควัตถุที่แยกโดยวิธี TLC ของยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ (A) β -carotene, (B) AQA4-3, (C) AQA6-4, (D) AQA11-1, (E) AQA14-2 และ (G) AQA17-2

เมื่อนำค่าที่ได้จากการแยกรงควัตถุด้วย TLC มาคำนวณค่า R_f ของแต่ละรงควัตถุ พบว่ามีค่า R_f

ดังตารางที่ 3 ปี ค.ศ. 2010 Latha และ Jeevaratnam [24] รายงานการแยกรงควัตถุ 3 ชนิด ของแคโรทีนอยด์ ว่าทั้ง 3 รงควัตถุมีค่า R_f และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นต่างกัน ดังนี้ fraction 1 สีเหลือง มีค่า R_f 0.92 และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 446 นาโนเมตร ระบุเป็น β -carotene ส่วน fraction 2 สีส้ม มีค่า R_f 0.78 และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 479 นาโนเมตร ระบุเป็น torulene และ fraction 3 สีแดง มีค่า R_f 0.20 และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 515 นาโนเมตร ระบุเป็น torularhodin ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทดลอง พบว่าตำแหน่งที่ 2 มีค่า R_f 0.78 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์ AQA1-2 ที่หมายเลข 2 มีค่า R_f 0.74 อาจเป็นไปได้ว่ารงควัตถุนี้คือ torulene และเมื่อพิจารณาที่รงควัตถุตำแหน่งที่ 3 มีค่า R_f 0.20 ซึ่งสายพันธุ์ AQA17-2 ที่ตำแหน่งหมายเลข 3 มีค่า R_f 0.14 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่ารงควัตถุนี้คือ torularhodin

ตารางที่ 3 ค่า R_f ของรงควัตถุที่แยกด้วยวิธี TLC ของยีสต์ 6 สายพันธุ์

strains	R_f value		
	No. 1	No. 2	No. 3
AQA1-2	0.98	0.74	0.63
AQA4-3	0.96	0.45	0.37
AQA6-4	0.97	0.61	-
AQA11-1	0.97	0.70	0.54
AQA14-2	0.97	0.54	-
AQA17-2	0.96	0.52	0.14

รงควัตถุของแคโรทีนอยด์ที่พบในยีสต์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันบ้างขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์นั้น ๆ จากรายงานการใช้ mass spectrometry จำแนกชนิดของรงควัตถุที่พบในยีสต์ *Sporobol-*

myces ruberrimus H110 พบว่ามี torularhodin, torulene, β -carotene และ γ -carotene เป็นองค์ประกอบ [14] จากการแยกรงควัตถุด้วย TLC ของ *R. mucilaginosa* F-1 พบว่ามี β -carotene, torulene และ torularhodin เป็นองค์ประกอบ [15] นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการผลิต β -carotene จากยีสต์ *Sporidiobolus pararoseus* และ *R. glutinis* [29,31] เห็นได้ว่ายีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทสำคัญในการผลิตแคโรทีนอยด์และสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

4. สรุป

การคัดเลือกยีสต์มีสี 37 สายพันธุ์ พบว่ามียีสต์ 6 สายพันธุ์ ที่มีความโดดเด่นในการผลิตแคโรทีนอยด์คือ AQA1-2, AQA4-3, AQA6-4, AQA11-1, AQA14-2 และ AQA17-2 ซึ่งภายหลังจัดจำแนกโดยวิธีชีวโมเลกุลบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene พบว่าเป็น *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sakaguchia oryzicola*, *Goffeauzyma aciditolerans*, *Rhodospidium toruloides*, *Cystobasidium calyptogenae* และ *R. paludigena* ตามลำดับ และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีของเหลือทิ้งและผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากากน้ำตาลมีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมากที่สุด โดยสายพันธุ์ที่มีความโดดเด่นในการผลิตแคโรทีนอยด์คือ AQA1-2 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และยีสต์เอ็กแทรกซ์ 0.5 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์หาชนิดของรงควัตถุด้วยวิธี TLC ของยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยใช้ β -carotene เป็น standard พบว่ายีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์

ผลิต β -carotene และมีรงควัตถุอื่นอย่าง torulene และ torularhodin เป็นองค์ประกอบด้วย ซึ่งการจำแนกชนิดของรงควัตถุนี้เป็นเพียงการศึกษาในเบื้องต้น การยืนยันชนิด จำนวน และปริมาณที่แน่นอนของรงควัตถุสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ด้วย LC-MS ซึ่งจะเป็นการศึกษาในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

6. รายการอ้างอิง

- [1] Martins, N. and Ferreira, I.C.F.R., 2017, Wastes and by-products: Upcoming sources of carotenoids for biotechnological purposes and health-related applications, Trends Food Sci. Technol. 62: 33-48.
- [2] Astorg, P., 1997, Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research, Trends Food Sci. Technol. 8: 406-413.
- [3] Gaziano, J.M. and Hennekens, C.H., 1993, The role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease, Annu. N.Y. Acad. Sci. 691: 148-155.
- [4] Krinsky, N.I. and Johnson, E.J., 2005, Carotenoid actions and their relation to health and disease, Mol. Aspects Med. 26: 459-516.
- [5] Olson, J. A., 1999, Carotenoids and human health, Archivos Latino-americanos de Nutricion. 49: 75-115.
- [6] Bhosale, P. and Gadre, R.V., 2001, β -carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 327-332.
- [7] Maldonado, I.R., Rodriguez-Amaya, D.B. and Scamparini, A.R.P., 2008, Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem, Food Chem. 107: 145-150.
- [8] Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G.A., 2005, Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality, Trends Food Sci. Technol. 16: 389-406.
- [9] นิมนนารักษ์ อยู่คงแก้ว, ปรียานุช เจริญสุข, ปิไลดา เชิดชูเกียรติศักดิ์ และธัญนันท์ วรณจง บรอดเคิลเฮอร์สท์, 2560, มวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ PY202 ภายใต้สภาวะหมักโซโทรฟิก, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 25: 591-605.
- [10] Simpson, K.L, Chichester, C.O. and Phaff, H.J., 1971, Carotenoid pigments of yeast, In A.H. Rose & J.S. Harrison (Eds.), The yeasts (Vol. 2, pp. 493-515), New York, Academic Press.
- [11] Reed, G. and Nagodawithana, T.W., 1991, Yeast Technology. 2nd Ed., An AVI book, New York.
- [12] Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T. and Haronikova, A., 2012, Use of several waste substrates

- for carotenoid-rich yeast biomass production, J. Environ. Manage. 95: S338-S342.
- [13] Freitas, C., Parreira, T.M., Roseiro, J., Reis, A., de Silva, T.L., 2014, Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry, Bioresour. Technol. 158: 355-359.
- [14] Cardoso, L.A.C, Jackel, S., Karp, S.G., Framboisier, X., Chevalot, I. and Marc, I., 2016, Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol, Bioresour. Technol. 200: 374-379.
- [15] Cheng, Y.T. and Yang, C.F., 2016, Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes, J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 61: 270-275.
- [16] Garcia, P.A.H., Bueno, A.L., Martinez, G.D.M, Gama, J.R.B., Perez, F.X.P., Ordaz, R.L., and Garcia, J.A.M., 2015, Effects of feeding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), organic selenium and chromium mixed on growth performance and carcass traits of hair lambs, J. Integr. Agric. 14: 575-582.
- [17] Tripathi, M.K, Karim, S.A., 2011, Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb, Livest. Sci. 135: 17-25.
- [18] Durmic, Z., Moate, P.J., Eckard, R., Revell, D.K., Williams, R. and Vercoe, P.E., 2013, In vitro screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation, J. Sci. Food Agric. 94: 1191-1196.
- [19] Elghadour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Martinez Castaneda, J.S., Camacho, L.M., Kholif, A.E. and Vazquez Chagoyan, J.C., 2015, Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low-quality roughages in ruminants, J. Integr. Agr. 14: 526-533.
- [20] Marrero, Y., Castillo, Y., Burrola, E., Lovaina, T. Rosa, C.A., Ruiz, O., Gonzalez, E. and Basso, L.C., 2011, Morphological, biochemical, and molecular identification of the yeast Levica 25: A potential ruminal microbial additive, Global Veterinaria 7: 60-65.
- [21] Chaucheyras, F., Walker, N.D., Bach, A., 2008, Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future, Anim. Feed Sci. Technol. 14: 5-26.
- [22] Lee, J.H., Lim, Y.B., Koh, J.H., Baig, S.Y., Shin, H.T., 2002, Screening of thermotolerant yeast for use as microbial feed additive, J. Microbiol. Biotechnol. 12: 162-165.
- [23] Kurtzman, C.P., and C.J. Robnett., 1998, Identification and phylogeny of ascomycete yeasts from analysis of

- nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 331-371.
- [24] Latha, B.V. and Jeevaratnam, K., 2010, Purification and characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source, *Glob. J. Biotechnol Biochem*. 5: 166-174.
- [25] Aksu, Z. and Eren, A.T., 2007, Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*, *Biochem. Eng. J.* 35: 107-113.
- [26] Tangtua, J., 2014, Evaluation and comparison of microbial cells disruption methods for extraction of pyruvate decarboxylase, *IFRJ* 21: 1331-1336.
- [27] Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31: 426.
- [28] กุสุมาวดี ฐานเจริญ, 2558, การปรับสภาพฟางข้าวเพื่อผลิตไบโอเอทานอลโดยเชื้อ *Kluyvero myces marxianus*, *ว.วิจัยราชภัฏพระนคร* 10(2): 123-133.
- [29] Schneider, T., Graeff-Honninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Hetrick, M. and Pham, P., 2013, Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents, *Energy* 61: 34-43.
- [30] Yoo, A.Y., Alnaeeli, M., Park, J.K., 2016, Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01, *Pro. Biochem.* 51: 463-473.
- [31] Valduga, E., Ribeiro, A.H.R., Cence, K., Colet, R., Tiggemann, L., Zeni, J. and Toniazzo, G., 2014, Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3: 207-213.
- [32] Hernandez-Almanza, A., Montanez-Saenz, J., Martinez-Avila, C., Rodriguez-Herrera, R. and Aguilar, C.N., 2014, Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation, *Food Biosci.* 7: 31-36.
- [33] Elsanhoty, R.M., Al-Turki, I.A. and Ramadan, M.F., 2012, Screening of medium components by Plackett-Burman design for carotenoid production using date (*Phoenix dactylifera*) wastes, *Ind. Crop. Prod.* 36: 313-320.