



การใช้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาหมึกเพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยยีสต์

Rhodotorula mucilaginosa UP12

The Utilization of Wastewater from Fermented Fish Industry for Carotenoid Production
by *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

อรพรรณ ยะมนต์ และสุภาพร ภััสสร*

Arawan Yamon and Supaporn Passorn*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

Department of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000

*Corresponding author, e-mail: ppapon@hotmail.com

(Received: May 20, 2020; Revised: Sep 21, 2020; Accepted: Nov 9, 2020)

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารโดยใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตปลาหมึกเป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้ผลิตสารแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12 ที่แยกจากดินในเขต มหาวิทยาลัยพะเยา โดยทดลองเลี้ยงยีสต์ในสูตรอาหารปรับส่วนผสมทั้งหมด 6 สูตร ประกอบด้วยน้ำล้างปลา (C1) และน้ำล้างปลาที่เติมแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน (C2 C3 C4 C5 และ C6) เปรียบเทียบกับอาหารควบคุม yeast malt extract (YM) พบว่า อาหารสูตร C5 เหมาะสมสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์มีองค์ประกอบดังนี้ น้ำล้างปลาเติมน้ำตาลซูโครส 1% โดยมวลต่อปริมาตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% โดยมวลต่อปริมาตร ปรับพีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ระยะเวลา 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด ใกล้เคียงกับอาหารควบคุม โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์ 120.20 ± 15.25 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และปริมาณผลผลิตทั้งหมดเท่ากับ 0.47 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสูตรอาหาร C5 มีปริมาณผลผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่าอาหาร YM 1.2 เท่า ซึ่งเป็นไปได้ว่าสามารถใช้สูตรอาหาร C5 เพื่อลดต้นทุนการผลิตแคโรทีนอยด์ในภาคอุตสาหกรรม อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอื่น ๆ เพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์

คำสำคัญ : แคโรทีนอยด์ น้ำทิ้งจากการผลิตปลาหมึก *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

Abstract

A medium containing wastewater from the fermented fish industry was investigated for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* UP12 isolated from a landfill site at the University of Phayao. These yeasts were cultured in 6 different formulas, consisted of wastewater from fermented fish production (C1) and wastewater from fermented fish production with carbon and nitrogen source added (C2, C3, C4, C5 and C6), with comparison to yeast malt extract (YM). The optimum conditions for carotenoid production were achieved in a C5 medium as follows: Wastewater from fermented fish industry adding 1 %w/v of sucrose and 0.2 %w/v of ammonium sulphate at pH 5.0, with an incubation temperature of 30 °C and agitation at 100 rpm for five days. The maximum carotenoid content was equivalent to the control medium at 120.20 ± 15.25 µg/g cell dry weight and 0.47 ± 0.02 mg/L of total carotenoids production. Moreover, this study showed that the carotenoid production in C5 culture was higher than YM as 1.2-fold. It is possible that the C5 medium may be used as low-cost culture medium for industrial carotenoids production. It is also guideline for the application of wastewater from other industries for carotenoid production.

Keywords: Carotenoid, Fermented fish production wastewater, *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

บทนำ

แคโรทีนอยด์เป็นสารสีธรรมชาติที่ได้รับความนิยมสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสียหายของเซลล์ และเนื้อเยื่อ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งชนิดต่าง ๆ (Cardoso et al. 2017, p. 126) ปัจจุบัน แคโรทีนอยด์จึงเป็นที่นิยมสำหรับกลุ่มผู้บริโภคอาหารเสริม จากข้อมูลความต้องการแคโรทีนอยด์ในตลาดโลกจาก The Global Market รายงานว่าในปี ค.ศ. 2017 มูลค่าทางการตลาดของแคโรทีนอยด์สูงถึง 1.5 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ และคาดว่าในปี ค.ศ. 2022 จะมีมูลค่าสูงถึง 2.0 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ เพิ่มขึ้นคิดเป็น 5.7 % ในช่วงปี ค.ศ. 2017- 2020 (Tang et al. 2019, p. 507) แสดงถึงแนวโน้มความต้องการแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นในอนาคต แคโรทีนอยด์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ การผลิตแคโรทีนอยด์ทำได้ทั้งในพืช และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามแคโรทีนอยด์ผลิตจากพืชมีข้อจำกัดด้านเวลา ฤดูกาล พื้นที่เพาะปลูก และขั้นตอนที่ซับซ้อนในการสกัด ซึ่งต่างจากการผลิตโดยจุลินทรีย์ที่มีขั้นตอนการสกัดง่ายกว่า เนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน อีกทั้งยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม (Elsanhoty et al. 2017, p. 21)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มีหลายชนิดส่วนใหญ่ผลิตได้จากรา ยีสต์ แบคทีเรีย และไลแคนบางชนิด ในช่วงปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula sp.* สายพันธ์ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการใช้เป็นแหล่งผลิตแคโรทีนอยด์ สามารถผลิต เบต้า-แคโรทีน ได้สูงถึง 70 % ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Tang et al. 2019, p. 508) อย่างไรก็ตามพบว่าอุปสรรคสำคัญของการผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์มาจากปัญหาด้านต้นทุนที่เกิดจากวัตถุดิบสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ เป็นที่มาของการศึกษาวิจัยการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula sp.* โดยใช้ของเสียในแหล่งอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ในประเทศบราซิลมีการรายงานการใช้กลีเซอรินจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และน้ำข้าวโพดเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนในการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* UCP1555 (Andrade et al. 2016, p. 212) และในประเทศไต้หวันมีการใช้กากน้ำตาล และของเสียจากโรงงานซอสมะเขือเทศในการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* F-1 (Cheng & Yang, 2016, p. 270) นอกจากนี้ปัจจัยทางด้านแหล่งอาหารแล้วนั้นอุณหภูมิในการเลี้ยงยีสต์ก็มีความสำคัญ โดยยีสต์ *Rhodotorula sp.* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ช่วงอุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส ดังเช่นรายงานการศึกษาในยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 โดยทดสอบการผลิตแคโรทีนอยด์ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด เท่ากับ 14.59 ± 0.55 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Passorn et al. 2016, pp. 15-20) ดังนั้นในประเทศไทยจึงมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำทิ้งในโรงงานผลิตอาหารมาเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อสร้างสารที่มีมูลค่าสูงได้เช่นเดียวกัน ในจังหวัดพะเยามีพื้นที่การจัดตั้งวิสาหกิจชุมชนทำปลาสามจำนวนมาก การผลิตปลาสามของจังหวัดพะเยาถือว่าเป็นการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในกระบวนการผลิตปลาสามในแต่ละวันมีการใช้น้ำมาก โดยเฉพาะขั้นตอนการล้างเนื้อปลา ซึ่งน้ำที่ได้จากการล้างมีเลือด โปรตีน ไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในเนื้อปลา และมีรายงานองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียจากโรงงานปลาสามในปี 2556 (โรงงานปลาสามศรีพน) กล่าวว่ามีความ BOD (Biological Oxygen Demand, ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์) เท่ากับ 764 มิลลิกรัมต่อลิตร COD (Chemical Oxygen Demand, ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์) เท่ากับ 212.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจนทั้งหมด 19.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ไขมัน และน้ำมัน เท่ากับ 160.40 มิลลิกรัมต่อลิตร (Meksagul & Suwannapat, 2013, p. 4) จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมปลาสามยังคงมีสารอินทรีย์ปริมาณสูงที่อาจนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะน้ำทิ้งในขั้นตอนการล้างปลาจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาสามในจังหวัดพะเยา

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาความเหมาะสมของการใช้น้ำล้างปลาจากกระบวนการผลิตปลาสามมาเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่แยกได้จากดินในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา โดยศึกษาปัจจัยด้านองค์ประกอบของสูตรอาหาร ค่าความเป็นกรดต่าง และระยะเวลาการเลี้ยงยีสต์ ที่มีผลต่อปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ และการเจริญของ *R. mucilaginosa* UP12 ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งในโรงงานมาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการพัฒนาการผลิตแคโรทีนอยด์ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 โดยใช้สูตรอาหารต่าง ๆ ที่ประกอบด้วยน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาสด ร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสูตรอาหารสำหรับเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12

นำน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาสดมาต้มให้เดือด จากนั้นนำมากรองตะกอนออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่กรองได้มาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ (C1) และเป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร (C2-C6) โดยเติมน้ำตาลซูโครส (1% โดยมวลต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5% โดยมวลต่อปริมาตร ดังแสดงในตาราง 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสูตรอาหาร C1, C2, C3, C4, C5 และ C6 สำหรับเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบหลัก	น้ำตาลทราย (Sucrose) (% โดยมวลต่อปริมาตร)	แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) (% โดยมวลต่อปริมาตร)
C1		0	0
C2		1	0
C3	น้ำทิ้งจากโรงงานผลิต	0	0.2
C4	ปลาสด	0	0.5
C5		1	0.2
C6		1	0.5

จากนั้นนำอาหารสูตรต่าง ๆ มาวิเคราะห์ทางเคมี ดังนี้ ค่าปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Chemical oxygen demand (COD)) ด้วยวิธีรีฟลักซ์แบบเปิด (open reflux) (APHA, AWWA & WPCF, 2005, p. 5220) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol sulfuric acid method (Dubois *et al.* 1956, p. 350)

2. ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในอาหารสูตรต่างๆ ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *R. mucilaginosa* UP12

นำโคโลนีเดียยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 บนจานอาหารแข็ง YM agar ใส่ลงในอาหารเหลว YM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นขยายปริมาณโดยย้ายลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *R. mucilaginosa* UP12 ที่ได้เป็นหัวเชื้อลงเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบตามในตาราง 1 โดยอาหารทั้ง 6 สูตร รวมทั้งอาหารชุดควบคุม คือ อาหารเหลว YM ผ่านการปรับความเป็นกรดต่างที่ระดับ (pH) 4 5 และ 6 นำอาหารหนึ่งขวดแล้วจึงเติมหัวเชื้อ 10% จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ข้าง จากนั้นนำมาวัดประสิทธิภาพของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 2 วัน ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยวัดปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Cell dry weight) คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหาร (Total carbohydrate) และปริมาณแคโรทีนอยด์ (Carotenoid content)

3. การหาน้ำหนักแห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ (Tansin, 2010, p. 34)

นำเชื้อ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ตามระยะเวลาที่ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำไปหาน้ำหนักแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ได้จากการปั่นเก็บตะกอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงยีสต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยเติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ glass bead ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร จำนวน 2-3 เม็ด นำไปเขย่าผสมอย่างรุนแรงด้วยเครื่อง Vortex mixer จากนั้นเติมสารละลาย บีโตนีเอมอีเทอร์ : โซเดียมคลอไรด์ :

อะซิโตน ในอัตราส่วน 1:1:1 จำนวน 6 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายสีส้มใสด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Extinction coefficient) เท่ากับ 2100

คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ดังสมการ (An *et al.* 1989, p. 117-118)

$$\text{แคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)} = \frac{(\text{ปริมาณปิโตเลียมอีเทอร์ (มล.)}) (A_{474} \times 100)}{(21) (\text{น้ำหนักแห้ง})}$$

4. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาสด

การศึกษานี้ใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการล้างปลาเพื่อเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ปรับสูตรอาหารโดยเติมแหล่งคาร์บอนด้วยน้ำตาลซูโครส และเติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหาร วัดจากค่าซีโอดี และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ตารางที่ 2) จากผลการวิเคราะห์ พบว่าปริมาณสารอินทรีย์ที่เปรียบเทียบจากค่าซีโอดีในสูตรอาหาร YM มีปริมาณสูงสุด รองลงมา คือ สูตร C6 โดยอาหารสูตร C1 เป็นน้ำล้างปลาผ่านการต้ม และกรองตะกอนยังคงมีสารอินทรีย์ที่สามารถเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ได้ เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลซูโครสส่งผลให้ค่าซีโอดีสูงขึ้นอย่างชัดเจนจากการตรวจพบในอาหารทั้งสามสูตร คือ อาหารสูตร C2, C5 และ C6 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูงกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ เช่นกัน

ตารางที่ 2 ค่าซีโอดี และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหาร C1, C2, C3, C4, C5, C6 และ YM

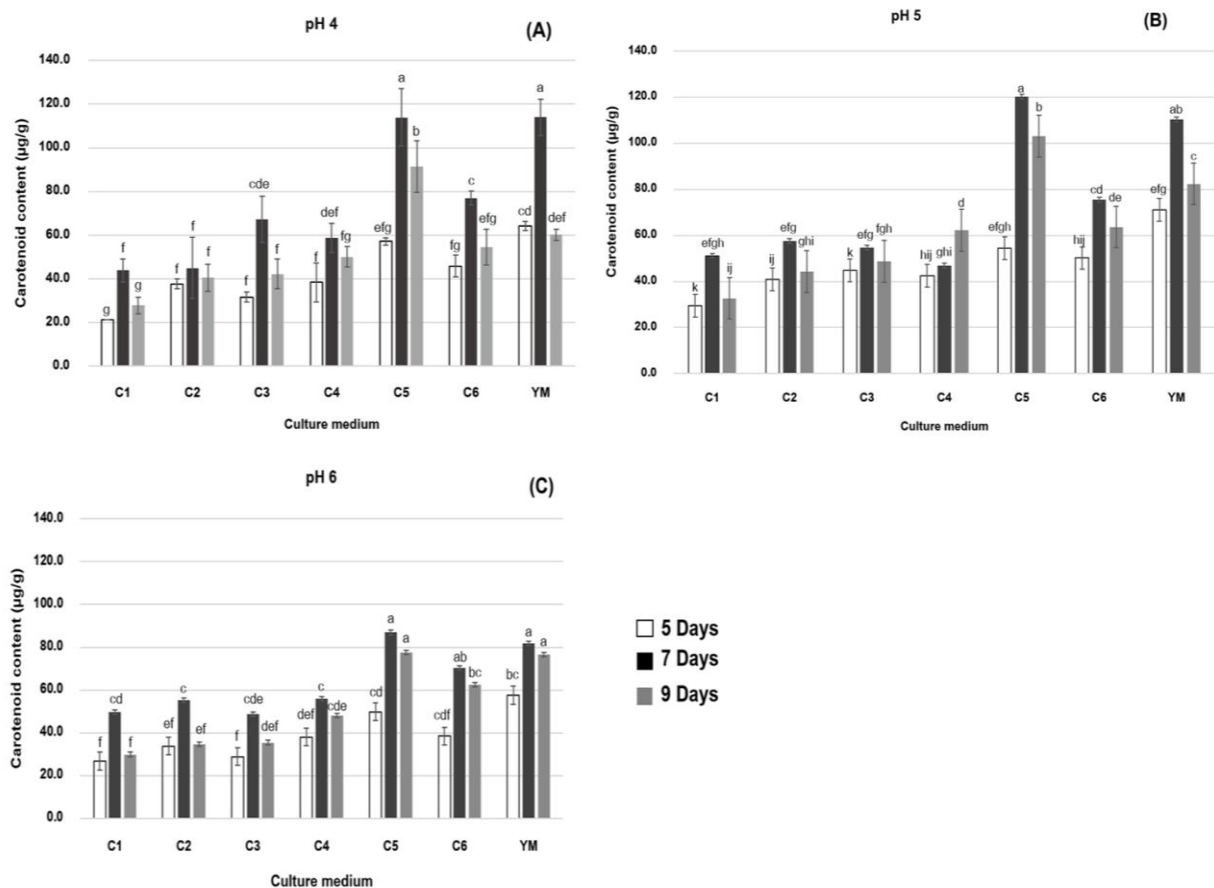
สูตรอาหาร	ซีโอดี (COD) (กรัมต่อลิตร)	คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCD) (กรัมต่อลิตร)
C1	4.27 ^d ± 0.64	3.35 ^b ± 0.02
C2	8.60 ^c ± 0.40	7.25 ^a ± 0.01
C3	4.73 ^d ± 0.50	3.47 ^b ± 0.01
C4	4.27 ^d ± 0.80	3.47 ^b ± 0.04
C5	8.33 ^c ± 0.46	7.15 ^a ± 0.02
C6	9.47 ^{ab} ± 0.30	7.29 ^a ± 0.03
YM	10.47 ^a ± 0.61	7.45 ^a ± 0.03

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ และค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ใน *R. mucilaginosa* UP12

จากการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 6 สูตร โดยใช้อาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงยีสต์ YM เป็นชุดควบคุม และปรับพีเอชของอาหาร เท่ากับ 4 5 และ 6 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเซลล์ *R. mucilaginosa* UP12 จากการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารทุกชนิด ดังแสดงใน ภาพที่ 1 พบว่า การผลิตแคโรทีนอยด์ในเซลล์จะเพิ่มขึ้นในช่วง 5 ถึง 7 วัน โดยพบปริมาณการแคโรทีนอยด์สูงสุดหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และมีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจนในวันที่ 9 นอกจากนี้การเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอช 6 พบปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ต่ำกว่าที่พีเอช 4 และ 5 ปริมาณแคโรทีนอยด์ใน

เซลล์ที่สกัดได้จากการเลี้ยงในอาหาร YM มีปริมาณใกล้เคียงกับอาหารสูตร C5 ในขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์เลี้ยงในอาหารกลุ่ม C1 C2 C3 และ C4 มีปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะส่งเสริมให้เซลล์ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้น ดังเช่นที่พบในเซลล์ที่เจริญในอาหารสูตร C2 C3 และ C4 และจากการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร C5 และ C6 ซึ่งมีการเติมแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เท่ากัน (ซูโครส 1% โดยมวลต่อปริมาตร) แต่แตกต่างกันที่ปริมาณการเติมไนโตรเจน พบว่า ในอาหารสูตร C6 เติมน้ำมันเมล็ดพืชที่ความเข้มข้น 0.5 %โดยมวลต่อปริมาตร มีการสร้างแคโรทีนอยด์ในเซลล์ได้น้อยกว่าที่พบในอาหารสูตร C5 เติมน้ำมันเมล็ดพืชที่ความเข้มข้น 0.2 %โดยมวลต่อปริมาตร



ภาพที่ 1 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C1, C2, C3, C4, C5, C6 และ YM ที่ pH 4 (a) pH 5 (b) pH 6 (c) บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ
หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

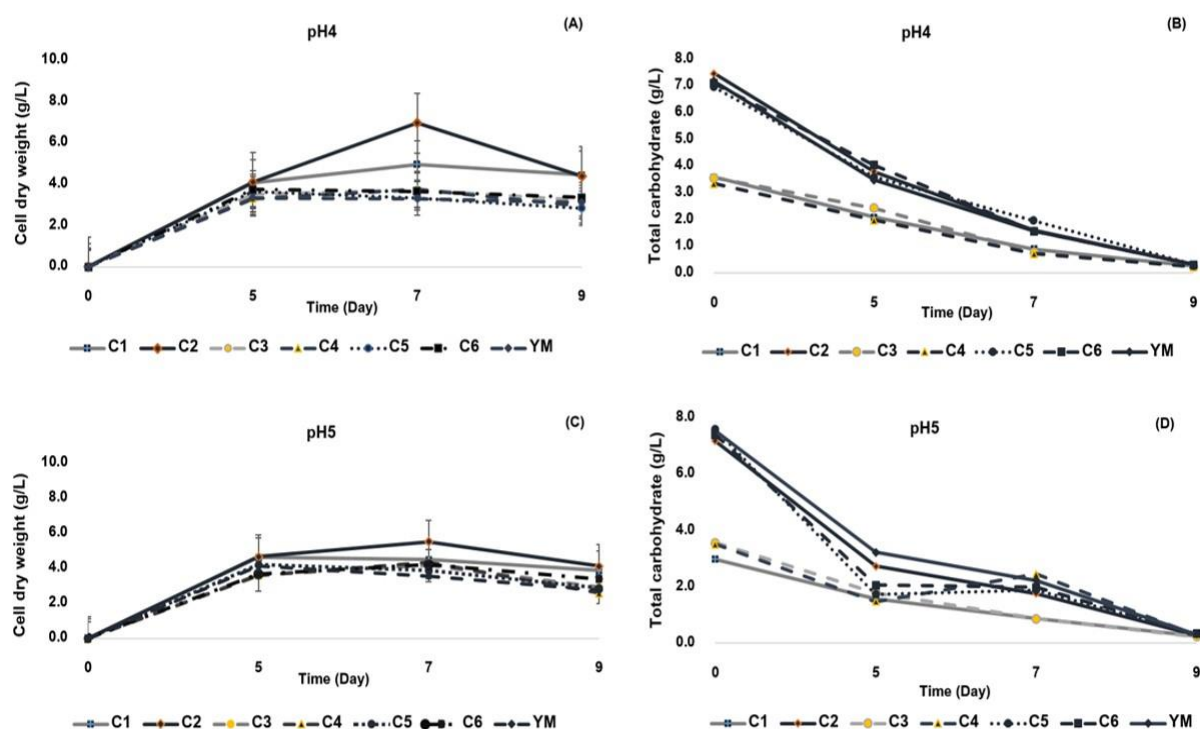
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ใน *R. mucilaginosa* UP12 โดยคัดเลือกจากสภาวะที่พบปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดของอาหาร 3 สูตร คือ C1 C5 และ YM จากการเลี้ยงในวันที่ 7 ที่พีเอชของอาหาร เท่ากับ 5 ดังแสดงใน ตารางที่ 3 พบว่า *R. mucilaginosa* UP12 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C5 และ YM มีปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ (Carotenoid content) สูงสุดอยู่ในช่วง 104.23 – 135.35 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณมากกว่าที่พบจากการเลี้ยงในสูตรอาหาร C1 ประมาณ 2.5 เท่า แต่กลับพบว่า การเลี้ยงในอาหารสูตร C1 มีปริมาณเซลล์แห้งมากกว่าประมาณ 1.2 เท่า เมื่อเทียบประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ของทั้งสามชนิด และแสดงให้เห็นว่าการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในสูตรอาหาร C5 สามารถให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด (Carotenoid product) และมากกว่าอาหาร YM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณ 1.2 เท่า

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ของ *R. mucilaginosa* UP12 เลี้ยงในอาหาร C1, C5 และ YM ปรับพีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เวลา	สูตรอาหาร	พีเอช 5		
		ปริมาณแคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
7 วัน	C1	51.16±2.37 ^b	4.50±0.13 ^a	0.23±0.01 ^c
	C5	120.20±15.25 ^a	3.87±0.28 ^b	0.47±0.02 ^a
	YM	110.37±6.14 ^a	3.55±0.28 ^b	0.39±0.02 ^b

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

การเจริญของ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่พีเอช 4 และ 5 โดยเทียบจากปริมาณน้ำหนักแห้ง และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ดังแสดงใน ภาพที่ 2 พบว่า น้ำหนักแห้งเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 0 – 5 และค่อนข้างคงที่ในวันที่ 7 โดยมีแนวโน้มที่ลดลงในวันที่ 9 (ภาพที่ 2 A, C) ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ลดลง และหมดลงในช่วงวันที่ 9 เช่นกัน (ภาพที่ 2 B, D) โดยปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดพบในอาหารสูตร C2 ที่ระยะเวลา 7 วัน พีเอช ของอาหาร เท่ากับ 4 และ 5 เท่ากับ 6.95 ± 0.18 และ 5.52 ± 0.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในอาหารสูตร C3 ที่พีเอช 6 ในวันที่ 5 มีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 5.59 ± 0.20 กรัมต่อลิตร (ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ในขณะที่อาหารสูตร C1 และ C5 ที่พีเอช 5 ในวันที่ 5 พบปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.62 ± 0.52 และ 4.20 ± 0.20 กรัมต่อลิตร อาหารสูตร C4 พบปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.34 ± 0.20 กรัมต่อลิตร ที่ระดับพีเอช 5 ในวันที่ 7



ภาพที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของ *R. mucilaginosa* UP12 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ C1-C6 และ YM ที่มี pH 4 (A, B) และ pH 5 (C, D) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

น้ำทิ้งจากขั้นตอนการล้างปลาในอุตสาหกรรมการผลิตปลาสามารถนำมาเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 และผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้เช่นเดียวกับรายงานการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* จากน้ำทิ้งแหล่งอุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารอื่น ๆ การเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ในครั้งนี้ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุด คือ C5 ประกอบด้วยน้ำล้างปลาเติมน้ำตาลซูโครส 1 % โดยมวลต่อปริมาตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 % โดยมวลต่อปริมาตร

ปรับพีเอช 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ระยะเวลาการเลี้ยง 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด เท่ากับ 120.20 ± 15.25 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากรายงานวิจัยส่วนใหญ่การเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน หรือแร่ธาตุอื่นๆ เพิ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังเช่นการศึกษาของ Elsanhoty *et al.* (2017, p. 21) เกี่ยวกับชนิดของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่แยกจากบริเวณผิวของพืชผัก พบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์ชนิดนี้สามารถใช้ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ซูโครส และเด็กซ์ทริน ตามลำดับ และแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมเรียงตามลำดับ คือ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย สำหรับการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เมื่อเปรียบเทียบผลการใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าการใช้ซูโครสจากอาหารสูตร C5 มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้กลูโคสจากอาหาร YM ทั้งในด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการผลิตแคโรทีนอยด์ อาจเนื่องมาจากในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ได้จากน้ำลำชั้นส่วนของปลานั้นมีปริมาณสารอินทรีย์ประเภทไขมัน และโปรตีนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้เหมาะสมเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ YM อย่างไรก็ตามการสร้างแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ยังพบปริมาณน้อยกว่าที่รายงานโดย Aksu & Eren (2005) ศึกษาการเลี้ยง *R. mucilaginosa* NRRL-2502 ด้วยน้ำตาลซูโครสที่ได้จากกากน้ำตาล (molass) ปรับให้มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (2 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน ทำให้เซลล์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดถึง 21.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดที่ 4.2 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นทำให้ *R. mucilaginosa* NRRL-2502 มีการเจริญ และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการผลิตแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร YM ในช่วงพีเอช 4-5 ระยะเวลา 5 วัน พบว่า *R. mucilaginosa* UP12 มีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์อยู่ในช่วง 64.28 - 71.06 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับ *R. mucilaginosa* -137 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบแคโรทีนอยด์ปริมาณ 64.4 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Maldonado. *et al.*, 2007, p. 65) อีกทั้งยังพบปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ *R. mucilaginosa* UP12 จากการศึกษารั้งนี้สูงกว่าเคยมีรายงานของ Passorn *et al.* (2016, p. 20) โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 14.59 ± 0.55 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อาจเนื่องมาจากการปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง ในอาหารเหลว YM ให้มีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น (ค่าความเป็นกรดต่าง 4-5) ทำให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 มากขึ้น

ถึงแม้ว่ายีสต์สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง แต่อย่างไรก็ตามค่าพีเอช ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ ดังเช่น ในอาหารที่ปรับค่าพีเอชของอาหาร เท่ากับ 5 เหมาะสมสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 สอดคล้องกับการรายงาน Cheng & Yang (2016, p. 270) การทดลองเลี้ยง *R. mucilaginosa* F-1 ในอาหาร YM โดยปรับพีเอชของอาหาร ในช่วง 4-7 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ระยะเวลาการเลี้ยง 7 วัน พบว่า ในอาหารที่มีพีเอช 5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 317.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษายีสต์ *R. mucilaginosa* MTCC11835 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส:กลีเซอรอล ในอัตราส่วน 1:2 เปปโตน ความเข้มข้น 0.5% และ ทวีน 20 ความเข้มข้น 2.5 mM ที่พีเอชของอาหาร เท่ากับ 6.5 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์สูงที่สุดเท่ากับ 21.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Dhaliwal & Chandra., 2015, p. 1161) ซึ่งผลของความเป็นกรด-ด่างของอาหารต่อการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้น เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ และการรักษาค่าความเป็นกรด-ด่าง ของไซโทพลาสซึมให้คงที่ (pH homeostasis) โดยอาศัยกิจกรรมของเมแทบอลิซึม ดังเช่นการรายงานผลของความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* การเพิ่มขึ้นของพีเอชในช่วง 4 ถึง 9 ทำให้กระบวนการหายใจภายในเซลล์เพิ่มขึ้นตามค่าพีเอชที่สูงขึ้น และจะหยุดการเจริญที่พีเอช 8 (Pena *et al.* 2007, p. 5)

จากข้อมูลการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เพื่อผลิตสารแคโรทีนอยด์ในเบื้องต้นนี้ แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรที่มีเพียงน้ำลำปลาอย่างเดียวยังไม่ประสิทธิภาพพอในการผลิตแคโรทีนอยด์ การเติมปริมาณคาร์บอน และไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ส่งเสริมการผลิตเซลล์ยีสต์ และสร้างแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวต่อไปนอกจากหาสูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงยีสต์ที่เหมาะสมมากขึ้นแล้ว การปรับปรุงสายพันธุ์ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อพัฒนาการผลิตแคโรทีนอยด์ *R. mucilaginosa* UP12 ตัวอย่างเช่นในรายงานการปรับปรุงยีสต์ *R. mucilaginosa* KC8 โดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์

ร่วมกับการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารแคโรทีนอยด์ทำให้ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าเดิมถึง 121 % (Wang *et al.* 2017, p. 425) การขยายปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อนำไปสู่การผลิตที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ และตรงตามความต้องการของผู้ผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม

สรุปผลการวิจัย

การเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 โดยใช้ น้ำล้างปลาจากโรงงานปลาสด เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในอาหารสูตร C5 เมื่อเติมแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน โดยการเติมน้ำตาลซูโครส 1% โดยมวลต่อปริมาตร และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าอาหารเหลว YM ที่เป็นชุดควบคุม เมื่อนำมาทดสอบความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยกำหนดค่าพีเอชที่ใช้ทดสอบ คือ 4 5 และ 6 พบว่า ในอาหาร C5 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดทั้ง 3 จุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกสูตรอาหาร รองลงมา คือ อาหารเหลว YM C6 C2 C1 และ C4 ซึ่งผลิตแคโรทีนอยด์ได้เท่ากับ 110.37 ± 6.14 75.57 ± 6.68 57.56 ± 10.20 54.76 ± 4.02 51.15 ± 2.37 และ 46.85 ± 1.99 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังนั้นสูตรอาหารเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ อาจสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในอนาคตซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ยา อาหารเสริม อาหารสัตว์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี 2561 (สัญญาเลขที่ RD61010) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Cardoso, L., Karp, S., Vendruscolo, F., Kanno, K., Zoz, L. & Carvalho, J. (2017). Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. *IntechOpen*, 125-141.
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y. & He, Z., (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced their Production. *Journal of Microbiol Biotechnol*, 29(4), 507-517.
- Kot, AM., Blazejak, S., Kurcz, A., Gientka, I. & Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis*-Potential Source of Lipid, Carotenoids and Enzyme for Use in Industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 6013-6117.
- Andrade, RSF., Lima, RA., Ribeaux, DR., Araújo, HWC., Franco, LO., Pessoa-Júnior, A., *et al.* (2016). Production of β -Carotene by a Newly Isolated *Rhodotorula Glutinis* UCP1555 Strain and Cytotoxic Effect Evaluation. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 10, 212-220.
- Tábita Veiga Dias Rodrigues , Thalita D. Amore , Erika Carvalho Teixeira and Janaina Fernandes de Medeiros Burker (2019) Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts. *Food technology and Biotechnology*, 57(3), 388-398
- Cheng, Y. & Yang, C. (2016). Using Strain *Rhodotorula mucilaginosa* to Produce Carotenoids Using Food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270-275.
- Meksagul, K. & Suwannapat, P. (2013). Impact study for Environmental Management standard of ISO 14000 to Implementation in Sonviang Mai Preserved Fish Factory (Sriton Preserved Fish) Phayao. *The 31st IE Network Conference*, October 16-18, 2013. Pattaya, Chonburi.(in Thai)
- Passorn, S., Sookwanna, N. & Auputinan, P. (2016). Screening of Carotenogenic Yeasts from Natural Soil at the University of Phayao. *Burapha Science Journal*, 21(3), 15-22. (in Thai)
- APHA, AWWA & WPCF. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23th ed.). Washington D.C.: American Public Health Association.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, JK., Rebers, PA. & Smith, F. (1956). Calorimetric Method for



- Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350 -356.
- Tansin, K. (2010). *Enhancement of Carotenoid Production by Phaffia rhodozyma and it's Stability*. Thesis. Master of Science, Silpakorn University, Thailand. (in Thai)
- Elsanhoty, RM., Al-Turki, AI. & Abd EL- Razik, MM. (2017). Production of Carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their Application as Colorant agent In Sweet Candy. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 14(2), 21-26.
- Aksu, Z. & Eren, A. (2005). Carotenoids Production by the Yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of Agricultural Wastes as a Carbon Source. *Process Biochemistry*, 40(9), 2985-2991.
- Maldonade. IR., Scamparini, ARP. & Rodriguez-Amaya, DB. (2007). Selection and Characterization of Carotenoid-Producing Yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 65-70.
- Dhaliwal, MK. & Chandra, N. (2015). Optimization of Carotenoids Production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), 1161-1165.
- Wang, Q., Liu, D., Yang, Q. & Wang, P. (2017). Enhancing Carotenoid Production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by Combining Mutation and Metabolic Engineering. *Annals Of Microbiology*, 67(6), 425-431.
- Pena, A, Helber, N.S.S, Alvarez, Calahorra M. and Ramirez J. (2015). Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiology Societies*, 20(2), 1-13.