รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตแอสทาแซนทีนจากยีสต์เพื่อนำมาใช้เพิ่มคุณค่าทางอาหารและเป็นสีผสมอาหารและ/หรือสีย้อมผ้า

Production of Astaxanthin from Yeast for Food Enrichment and Natural Dye for Food and/or Textile Use

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล
นางศิริวรรณ วิชัย
นางสาวสุภาวดี ศรีแย้ม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทุนอุดหนุนการวิจัยสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประจำปี 2543

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การผลิตแอสทาแซนทีนจากยีสต์เพื่อนำมาใช้เพิ่มคุณค่าทางอาหารและเป็นสีผสมอาหาร และ/หรือ สีย้อมผ้า" เป็นโครงการหนึ่งในหลายโครงการที่ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีงบประมาณ 2543 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ได้ในการสนับสนุนการวิจัยในโครงการนี้ซึ่งทำให้นักวิจัยสามารถทำการค้นคว้าวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาประเทศได้มากขึ้นและทำให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี อีกทั้งยังเป็นการสร้างนักวิจัยใหม่โดยที่มีนักศึกษาบัณฑิตศึกษาได้ปริญญาดุษฎีบัณฑิตโดยโครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์เรื่องการผลิตสีจากจุลินทรีย์ 1 คน

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้ให้สถานที่ตลอดจนการใช้เครื่องมือ สารเคมีที่จำเป็นสำหรับการวิจัยจนงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การผลิตแอสทาแซนทีนจากยีสต์เพื่อนำมาใช้เพิ่มคุณค่าทางอาหารและเป็นสีผสมอาหาร และ/หรือสีย้อมผ้า

ผู้เขียนรายงานการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล

ยีสต์ผลิตสี 73 ไอโซเลทที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติโดยใช้อาหาร YM (Yeast extract Malt extract medium) ยีสต์ 3 ไอโซเลทคือ 3B1, 3F2 และ 3R4 สามารถผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ และได้รับการบ่งชี้สายพันธุ์เป็น *Rhodotorula glutinis* เซลล์ยีสต์ของไอโซเลทเหล่านี้ประมาณไอโซเลทละ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถูกเลี้ยงในอาหารที่เติมเอทิลมีเธนซัลโฟเนท (ethylmetanesulfonate, EMS) ปริมาณ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ 0.002-1.56 % และมีจำนวนยีสต์กลายพันธุ์ (มิวแทนท์) ทั้งหมด 53 มิวแทนท์ นำมิวแทนท์ที่มีโคโลนีสีต่างๆกันคือ แดงเข้ม ชมพูเข้ม เหลือง และส้มมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM เพื่อเลือกมิวแทนท์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงสุด พบว่ามิวแทนท์ *Rhodotorula glutinis* mB34 ผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงสุดและสูงกว่าสายพันธุ์เดิมประมาณ 1.7 เท่า

การเพิ่มผลผลิตคาร์โรทีนอยด์ศึกษาโดยเลี้ยงมิวแทนท์ *Rhodotorula glutinis* mB34 ในอาหารเหลว YM ในถังหมัก โดยแปรผันปริมาณสารอาหารต่างๆ ของอาหาร YM เป็นยีสต์สกัด 0.1, 0.3, 0.5 และ 10 %(w/v) มอลท์สกัด 0.05, 0.1, 0.3 และ 0.5%(w/v) เปปโตน 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 %(w/v) และ กลูโคส 1, 3, 5 และ 7 %(w/v) โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 ในถังหมักที่ใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ mB34 และสกัดสารคาร์โรทีนอยด์มาวิเคราะห์หาปริมาณโดย UV-visible spectrophotometry วัดปริมาณ β-carotene และ astaxanthin ที่ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงสูงสุด 448 และ 474 นาโนเมตรตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า มิวแทนท์ mB34 เจริญได้ดีและผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงในอาหารเหลว YM ที่ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 0.3 %(w/v) มอลท์สกัด 0.3 %(w/v) เปปโตน 0.5 %(w/v) และกลูโคส 3.0 %(w/v) ปริมาณคาร์โรทีนอยด์ทั้งหมดที่ผลิตได้และปริมาณเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง คือ 1,657.58 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 9.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในภาวะการเลี้ยงนี้มิวแทนท์ *Rhodotorula glutinis* mB34 จะผลิตastaxanthin ได้ในปริมาณที่สูงกว่า β-carotene

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abtract

Title Production of Astaxanthin from Yeast for Food Enrichment and Natural Dye for Food and/or Textile Use

Report by Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul

Seventy-three isolates of pigmented yeasts were isolated from natural sources by using Yeast extract Malt extract (YM) medium. The three isolates of pigmented yeast, 3B1, 3F2, and 3R4 produced higher carotenoids than the other isolates and were classified as *Rhodotorula glutinis*. The yeast cells of these isolates about 10^8 cells/ml were treated with 30 μg/ml ethylmethanesulfonate (EMS) for 1 h which gave 0.002-1.56 % survival rate and 53 mutants were obtained. Sixteen mutants with deep-red, deep-pink, yellow and orange colonies were cultured in YM medium to select the one that could produce highest carotenoid content. The *Rhodotorula glutinis* mB34 mutant gave highest carotenoid production and higher than the parent strain (*Rhodotorula glutinis* 3B1) about 1.7 times.

The increase production of carotenoids pigment was studied by culturing *Rhodotorula glutinis* mB34 mutant in yeast-malt extract medium in fermenter. The mB34 strain was cultivated in various concentrations of ingredient of yeast-malt extract broth containing 0.1, 0.3, 0.5 and 1.0 %(w/v) yeast extract; 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5 %(w/v) malt extract; 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 %(w/v) peptone and 1, 3, 5 and 7 %(w/v) glucose with initial pH at 5.0 in fermenter working volume 1.5 litres with aeration rate 1.5 vvm and stirrer speed 300 rpm. The yeast mB34 was harvested and carotenoids were extracted and analyzed by UV-visible spectrophometry. β-carotene and astaxanthin were determined at maximum absorbance at 448 and 474 nm, respectively. It was found that the mB34 grew well and produced higher carotenoids pigment in yeast-malt extract medium containing 0.3 %(w/v) yeast extract, 0.3 %(w/v) malt extract, 0.5 %(w/v) peptone and 3 %(w/v) glucose than other concentration. The total pigments of mB34 and dry cell mass was 1,657.58 μg/L and 9.8 g/L, respectively at 72 h. The *Rhodotorula glutinis* mB34 produced more astaxanthin content than β-carotene at this culture condition.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและงานที่มีมาก่อน	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.4 หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	5
1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1.6 วิธีดำเนินการวิจัย	10
1.7 ขอบข่ายของการวิจัย	10
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	11
2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	11
2.1.1 สารเคมี	11
2.1.2 อุปกรณ์	12
2.1.3 จุลินทรีย์	13
2.2 วิธีการทดลอง	13
2.2.1 การแยกยีสต์ที่ผลิตสีได้จากดิน ใบไม้ เปลือกไม้ และดอกไม้	13
2.2.2 การบ่งชี้สายพันธุ์ของยีสต์ที่ผลิตสี	13
2.2.3 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์	13
2.2.4 การทำให้ยีสต์ผลิตคาร์โรทีนอยด์เกิดการผ่าเหล่า	13
2.2.5 การคัดเลือกมิวแทนท์ยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง	14
2.2.6 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงมิวแทนท์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงที่คัดเลือกแล้ว	14

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.2.6.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตคาร์โรทีนอยด์มากที่สุด	14
2.2.6.2 การปรับสูตรอาหารเพื่อผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้มากที่สุด	15
ก. การหาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม	15
ก.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส	16
ก.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ β-carotene และ astaxanthin	17
ข.การหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและสัดส่วนของสารอาหารที่เหมาะสม	17
บทที่ 3 ผลการทดลอง	18
3.1 การแยกยีสต์ที่ผลิตสีและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์	18
3.1.1 การบ่งชี้ชนิดของยีสต์ผลิตสี	19
3.1.2 การตรวจสอบการผลิตคาร์โรทีนอยด์โดยยีสต์ผลิตสี	20
3.2 การเพิ่มผลผลิตสารให้สีโดยทดลองทำการกลายพันธุ์	21
3.2.1 การทดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี Methanesulfonic acid ethyl ester (EMS) และการคัดเลือก	21
3.2.2 การศึกษาการผลิตสารสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์โดยยีสต์กลายพันธุ์ 16 ไอโซเลท	23
3.3 การหาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง	25
3.3.1 การหาระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง	25
3.3.2 การปรับสูตรอาหารเพื่อผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้มากที่สุด	25
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	33
4.1 การแยกและบ่งชี้ชนิดของยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตได้สูงสุด	33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2 การศึกษาการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ให้ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง	34
4.3 การปรับสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ให้ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง	34
4.4 สรุปผลการวิจัย	35
เอกสารอ้างอิง	36

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและงานที่มีมาก่อน

Astaxanthin (3, 3'-dihydroxy-β, β'-carotene-4, 4'-dione) สามารถพบได้ในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ได้แก่ *Mycobacterium lacticola*, *Brevibacterium* sp.(Simpson และคณะ, 1981) และ *Agrobacterium aurantiacum* (Yokoyama และคณะ, 1994) สาหร่ายสีเขียวได้แก่ *Haematococcus* sp. (Johnson และคณะ, 1977; Kobayashi และคณะ, 1993) *Neochloris wimmeri* และ *Chlamydomonas nivalis* (Johnson และคณะ, 1980) เชื้อรา ได้แก่ *Peniophora* sp. (Goodwin, 1980) และยีสต์ ได้แก่ *Phaffia rhodozyma* โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus plurialis* และยีสต์ *Phaffia rhodozyma* นั้นเหมาะสมที่จะได้รับการพัฒนาให้มีการผลิต astaxanthin ในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ (Vazquez และ Martin, 1998) ทั้งนี้ความต้องการ astaxanthin นับวันจะเพิ่มมากขึ้นซึ่งเกิดจากสาเหตุดังต่อไปนี้

1.1.1) อุตสาหกรรมการผลิต salmon และ trout เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเพื่อเพิ่มสีของเนื้อปลาทั้งสองชนิด ความต้องการ astaxanthin จึงสูงขึ้น (Meyer และ Du Preez, 1994)

1.1.2) อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเพื่อเพิ่มสีของเนื้อสัตว์ และไข่แดง ความต้องการ astaxanthin จึงสูงขึ้น (Meyer และ Du Preez, 1994)

1.1.3) astaxanthin ที่ได้จากธรรมชาติ เมื่อใช้เป็นอาหารสัตว์จะให้สีและรสชาติที่เฉพาะตัว เป็นที่พอใจของผู้บริโภคมากกว่าการใช้ synthetic astaxanthin (Johnson และคณะ, 1980)

1.1.4) FDA ระงับการใช้ synthetic astaxanthin ในฟาร์มปลา และสัตว์ปีก ดังนั้นจึงมีความต้องการ astaxanthin ที่มาจากแหล่งธรรมชาติสูงขึ้น (FDA, 1996; Haad, 1988;Kobayashi และคณะ, 1991)

1.1.5) จากการศึกษาพบว่า lycopene และ astaxanthin นอกจากจะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอแล้ว ยังมีคุณสมบัติในการช่วยป้องกันการเกิดของเซลล์มะเร็งและส่งเสริมการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Giovannucci และคณะ, 1995; Jyonouchi และคณะ,1991)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.6) ปัจจุบัน astaxanthin ที่ได้จากธรรมชาติมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง(Girad และคณะ, 1994)

จากประโยชน์ดังกล่าวมาทำให้ทราบว่าความต้องการ astaxanthin มาจากแหล่งธรรมชาติ นับวันจะสูงขึ้นโดยนักวิทยาศาสตร์ได้ประมาณว่าในปี ค.ศ. 2000 ความต้องการ astaxanthin จะสูงถึง 100,000 กิโลกรัม (Meyer และคณะ, 1993) ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะได้มีการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตดังกล่าวโดยอาศัยกระบวนการต่างๆ ทั้งการปรับปรุงพันธุ์ของจุลินทรีย์ และพัฒนาขบวนการผลิตให้มีศักยภาพสูงขึ้น

ปัจจุบันสีสังเคราะห์ได้เข้ามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้นก่อให้เกิดมลภาวะอันเนื่องมาจากการใช้สีสังเคราะห์ดังกล่าวในการย้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งสีที่ใช้ผสมอาหาร ซึ่งเป็นผลกระทบอย่างมากต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมนอกเหนือจากมลภาวะเป็นพิษอันเนื่องมาจากสาเหตุอื่นๆ ที่เพิ่มพูนขึ้นทุกนาทีในสิ่งแวดล้อมรอบๆตัวเรา ด้วยเหตุจึงมีผู้สนใจและตระหนักถึงคุณค่าของสีธรรมชาติกันมากขึ้นเพื่อใช้เป็นสีผสมอาหารและสีย้อมผ้า โดยที่สีเหล่านี้จะพบในสิ่งมีชีวิตในพืชและจุลินทรีย์ วงควัตถุให้สีในพืชและจุลินทรีย์บางชนิด นอกเหนือจากที่จะใช้ผสมให้อาหารมีสีสวยชวนรับประทานแล้ว ยังมีโครงสร้างโมเลกุลที่มีประโยชน์ในการเสริมคุณค่าทางอาหารอีกด้วย คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะผลิตสีธรรมชาติจากยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าไม่เป็นพิษภัยต่อผู้บริโภค และใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารกันมานานแล้ว ยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมักพบในที่มีแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆ ดังนั้นหากต้องการแยกเชื้อยีสต์จึงมักต้องใช้ Enrichment Technique โดยแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาพเป็นกรด มีพีเอชในช่วง 3.5 – 5.0 หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูง 30– 40 % ซึ่งจะช่วยลดการเจริญของแบคทีเรีย หรือการแยกเชื้อโดยการเติมสารปฏิชีวนะ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และแบคทีเรีย สำหรับสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น actinomycin, streptomycin, penicillin, chloramphenicol ฯลฯ และสำหรับสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น diphenyl และ rose bengal หรืออีกวิธีหนึ่งคือการแยกเชื้อโดยใช้เทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน เป็นการกรองเชื้อราซึ่งมีเส้นใยออกไปก่อน ดังนั้นสารละลายที่ได้จะมีแบคทีเรียและยีสต์ นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ต่อไป

ในการศึกษายีสต์ผลิตสีนั้นจะทำได้ง่าย ทั้งนี้เนื่องจากโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสี เช่น สีส้ม สีแดง หรือสีเหลือง จึงสามารถเก็บเชื้อไปศึกษาและจัดจำแนกได้ง่ายขึ้น โดยการจัดหมวดหมู่นั้นอาศัยการจัดจำแนกตามหนังสือ The yeast : a taxonomic study

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค.ศ. 1984 โดย Kreger – Van Rij เป็นหลัก และใช้เอกสารอื่นๆที่เกี่ยวข้อง เช่น การจัดจำแนกยีสต์โดย Reed และ Nagodawithana (1991)

ก) Subdivision Ascomycotina ยีสต์นี้จะสร้างสปอร์แบบมีเพศเรียกว่า แอสโค-สปอร์(ascospore) โดยอาศัยความแตกต่างทางด้านรูปร่างของเซลล์ ลักษณะการแตกหน่อ หรือการแบ่งเซลล์แบบ fission และจำนวนแอสโคสปอร์ต่อแอสคัส ทำให้แยกออกเป็น subfamily familyและ genus ต่างๆ ยีสต์ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน Subdivision นี้ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบยีสต์ที่มีสีอยู่ใน Subdivision นี้

ข) Subdivision Basidiomycotina ยีสต์ชนิดนี้จะสร้างสปอร์แบบมีเพศ เรียกว่า แบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) และที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่แตกต่างจาก Subdivision แรก คือ โคโลนีจะทำปฏิกิริยากับ diazonium blue B ให้สีแดงเข้ม ใน Subdivision นี้สามารถจัดจำแนกออกเป็น family และ genus ต่างๆ ได้โดยอาศัยลักษณะการสร้าง เทลิโอสปอร์ (teliospore) และบัลลิสโตสปอร์ (ballistospore) ยีสต์ที่สร้างสีได้บาง genus จัดอยู่ใน Subdivision นี้โดยให้โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีชมพู สีแดง สีเหลือง หรือสีส้ม เช่น *Sporidiobolus* และ *Rhodosporidium*

ค) Subdivision Deuteromycotina เป็นยีสต์ที่ยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบมีเพศ โดยไม่พบว่ามีการสร้าง แอสโคสปอร์ หรือ แบสิดิโอสปอร์ โดยในการจัดจำแนกนั้นจะแบ่งออกเป็นกลุ่มที่คล้ายคลึงกับ ascomycotina กลุ่มที่คล้ายคลึงกับ basidiomycotina กลุ่มที่คล้ายคลึงกับทั้ง ascomycotina และ basidiomycotina และกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มที่สร้างบัลลิสโตสปอร์ ทั้งนี้การจัดจำแนกเป็นกลุ่มดังกล่าวอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยาด้วย ยีสต์สร้างสีที่จัดอยู่ใน Subdivision นี้ มีอยู่ 2 genus คือ *Rhodotorula* และ *Phaffia*

ยีสต์ผลิตสี หมายถึง ยีสต์ที่สามารถสร้าง pigment ในกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งมีโครงสร้างเป็น long chain polyisoprenoid hydrocarbon และ oxygen containing xantophylls เช่น ยีสต์ใน Genus *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Cryptococcus* (Simpson และคณะ 1971) และ *Phaffia* (Phaff และคณะ, 1972) ตัวอย่างของคาร์โรทีนอยด์ที่ได้จากจุลินทรีย์ (microbial carotenoids) เช่น carotene, lycopene, lutein, zeaxanthin, canthaxanthin, astaxanthin และ rhodoxanthin ในที่นี้ขอยกตัวอย่างคาร์โรทีนอยด์ ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มสีในไข่แดงและเนื้อ เช่น β-carotene, lycopene, xanthophylls และ astaxanthin (Byong, 1996)

β-carotene เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างวิตามินเอ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตได้มีทั้งสาหร่าย เชื้อรา และยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ใน genus *Rhodotorula*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Lycopene เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ β-carotene

Xanthophylls เป็นกลุ่มของสารคาร์โรทีนอยด์ซึ่งประกอบด้วย lutein, canthaxanthin, cryptoxanthin, neoxanthin, violaxanthin และ zeaxanthin

Astaxanthin เป็น pigment สีแดง ซึ่งผลิตได้จากยีสต์ *Phaffia rhodozyma*

ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* เป็นยีสต์ที่สามารถผลิต astaxanthin ได้สูงจึงมีศักยภาพที่จะผลิตเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น สัตว์ปีกและปลา (Salmon, Trout) เพื่อเพิ่มสีในไข่แดงและเนื้อ (Johnson และคณะ, 1977/1980; Johnson และ Grau, 1980) นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ (Matsuno, 1991) ถึงแม้ว่า astaxanthin จะสามารถสังเคราะห์ได้ทางเคมีเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว แต่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US Food and Drug Aministration) ไม่ให้การยอมรับ (FDA, 1996) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาและพัฒนาการผลิต astaxanthin จากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิต astaxanthin ได้จากธรรมชาติ

1.2.2 เพื่อปรับปรุงพันธุกรรมให้ยีสต์ที่คัดเลือกได้ผลิต astaxanthin ได้สูงขึ้น

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของยีสต์ในการผลิต astaxanthin ได้มีประสิทธิภาพสูงสุด

1.2.4 เพื่อทดลองใช้ astaxanthin ที่ผลิตได้ในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารสีผสมอาหารและ/หรือสีย้อมผ้า

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถแยกและคัดเลือเชื้อยีสต์ที่ผลิต astaxanthin ได้จากธรรมชาติ เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่นๆ ต่อไป และการแยกอาจทำให้ได้พบยีสต์ที่ผลิตรงควัตถุให้สีชนิดอื่นที่มีประโยชน์เช่นกัน

1.3.2 สามารถปรับปรุงพันธุกรรมและหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ยีสต์ผลิต astaxanthin ได้สูงขึ้น

1.3.3 สามารถนำ astaxanthin ที่ผลิตได้ไปใช้ในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารสำหรับอาหารสัตว์และใช้เป็นสีผสมอาหาร และ/หรือ สีย้อมผ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.4.1 อุตสาหกรรมอาหาร

1.4.2 อุตสาหกรรมสีย้อม

1.4.3 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Phaff และคณะ ในปี 1972 ได้แยกยีสต์ที่สร้าง pigment ได้จากยางของต้นไม้ที่เจริญบนภูเขาในรัฐอลาสก้าและญี่ปุ่น โดยยีสต์ที่แยกได้นี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากยีสต์ที่สร้าง pigment ใน genus อื่นๆ จึงให้ชื่อว่า *Rhodozyma montanae* และในเวลาต่อมาได้ถูกเปลี่ยนเป็น *Phaffia rhodozyma* เพื่อเป็นเกียรติแด่ผู้ที่ค้นพบ จากการศึกษาต่อมาพบว่ายีสต์ Phaffia นี้นอกจากจะแตกต่างจากยีสต์ที่สร้าง pigment อื่นๆ ที่ความสามารถในการหมักน้ำตาลแล้วยังพบว่ายีสต์ชนิดนี้สร้าง pigment ที่เป็น astaxanthin เป็นหลักไม่ใช่ β-carotene, torulene หรือ torularhodin เช่น ยีสต์ genus อื่นๆ

โดยปกติ astaxanthin พบมากในทะเล (Weedon, 1971) โดยพบในสาหร่าย เชื้อรา และสัตว์น้ำขนาดเล็กอื่นๆ ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้นับเป็นผู้ผลิต astaxanthin (Kanemitsu และ Aoe, 1958; Schiedt และคณะ, 1981/1985) ให้กับสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ไม่ใช่เฉพาะสัตว์น้ำแต่รวมถึงสัตว์ปีกด้วย (Fox, 1962 ; Weedon, 1971) ดังนั้น pigment ที่ได้จากเปลือกของสัตว์น้ำขนาดเล็กจึงมีความต้องการสูงขึ้นเรื่อยๆ ในการผลิต astaxanthin จากยีสต์นั้นเริ่มจากการศึกษากันโดยทีมงานนักวิทยาศาสตร์ที่สำคัญคือ Johnson และ Lewis ได้รายงานในปี 1977 เรื่องการใช้ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* เป็น pigment source สำหรับปลาแซลมอน และสัตว์ทะเลอื่นๆ จากนั้น นักวิทยาศาสตร์ทั้งสองท่านได้ทำการศึกษาถึงองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ซึ่งพบว่าประกอบไปด้วย ash 6%, total nitrogen 4.8% (ซึ่งต่ำกว่าปกติเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ชนิดอื่น), total carbohydrate 40% (สูงกว่าปกติทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้มีผนังเซลล์ที่หนาและมีความสามารถในการสร้าง capsule) , total lipid 17% (ซึ่งสูงกว่ายีสต์ชนิดอื่นๆ) โดยพบว่ากรดไขมัน ที่พบว่าเป็นองค์ประกอบมากคือ oleic และ linoleic มีองค์ประกอบของ RNA 8.2 % และพบ astaxanthin ถึง 85 % ของคาร์โรทีนอยด์ทั้งหมด (total carotenoids) โดยเมื่อคิดเป็นความเข้มข้นได้ 30-800 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญของเชื้อ

Johnson และ Lewis ได้ศึกษาการเจริญและผลิต astaxanthin ของ *Phaffia rhodozyma* ใน synthetic media ที่มีกลูโคส 1.5-2.0 % พบว่ายีสต์มีการเจริญพร้อมๆ กับการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลิต astaxanthin และมีการสังเคราะห์ β-carotene เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (6 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์) และจากการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ดังกล่าวในอาหาร growth medium ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M yeast nitrogen base 50 มิลลิลิตร, 9.6 % (w/v) bacto peptone และน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ปริมาณ 200 มิลลิกรัม พบว่ากลูโคส และซูโครส ส่งเสริมการเจริญของเชื้อมากกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ และเซลโลไบโอส (cellobioses) จะส่งเสริมการสร้าง astaxanthin (625 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์) นอกจากนั้น มอลโตส ซูโครส ซัคซิเนต (succinate) กลูโคโนแลคโตน (gluconolactone) ไซโลส และแมนนิทอล สามารถช่วยส่งเสริมการผลิต astaxanthin เช่นเดียวกันโดยให้ผลผลิตถึง 479-541 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ สำหรับแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) 0.25-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญและผลิต astaxanthin และการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) แทนเปปโตน (peptone) นั้นก็ไม่มีผลต่อการเจริญและผลิตด้วยเช่นกัน แต่ในทางตรงกันข้าม การเติม yeast extract ลงในอาหาร vitamin-free-medium ในความเข้มข้น 9.1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการผลิต astaxanthin สูงขึ้นจาก 156 เป็น 524 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ และเมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการเจริญและการผลิต astaxanthin พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.5-6.0 ที่อุณหภูมิ 14-25°ซ ในการศึกษาความต้องการออกซิเจนนั้น ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีออกซิเจนน้อยกว่า 30 mmol oxygen/l นั้นจะทำให้มีการผลิต astaxanthin ลดลงและมีการสะสม β-carotene สำหรับความต้องการปริมาณของแสงในการผลิต astaxanthin นั้นพบว่า แสงไม่มีผลต่อการเจริญและผลิต astaxanthin ของยีสต์ *Phaffia rhodozyma*

จากความพยายามที่จะผลิต astaxanthin ของ Johnson และ Lewis ทำให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและค้นคว้ากลายเป็นพื้นฐานสำคัญของนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านที่ให้ความสนใจในการที่จะเพิ่มศักยภาพในการผลิต astaxanthin ของยีสต์ *Phaffia rhodozyma* และสำหรับ John และ Lewis เองก็ยังไม่หยุดที่จะทำงานวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ ดังนั้นจึงเริ่มมีผลงานออกมาจากนักวิจัยหลายกลุ่ม ในช่วงต้นปี 1990

Polulyakh และคณะ (1991) ได้ศึกษาการผลิตคาร์โรทีนอยด์ของ *Phaffia rhodozyma* 10 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงในอาหาร wort agar บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 30°ซ เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์คาร์โรทีนอยด์ พบว่าคาร์โรทีนอยด์ที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิ 20 และ 30°ซ จะแตกต่างกันโดยที่อุณหภูมิ 20°ซ นั้น พบว่า เป็น astaxanthin 80-85% ในขณะที่อุณหภูมิ 30°ซ จะพบว่า torulene 30% และ torularhodin 60-65% เป็นหลัก สำหรับการผลิต β-carotene ด้วยปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cyclization ตามด้วยปฏิกิริยา oxidation เป็น astaxanthin

ได้มีความพยายามที่จะผลิต astaxanthin ให้สูงขึ้นโดยทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* โดย An และคณะ (1989) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Phaffia rhodozyma* uc D-FST 67-210 โดยใช้แสงยูวีและสารมิวตาเจน เช่น EMS และ NTG พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้นั้นสามารถผลิต astaxanthin ได้มากขึ้นกว่าเดิม 2-5 เท่า Meyer และคณะ (1993) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Phaffia rhodozyma* โดยใช้ NTG พบว่า มิวแทนท์ที่ได้เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นผลผลิตเซลล์และอัตราการเจริญจะลดลง แต่มีการผลิต astaxanthin สูงขึ้น (1,688 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์) และการใช้แมนนิทอลและซัคซิเนตเป็นแหล่งของคาร์บอนจะเพิ่มการผลิต astaxanthin สูงขึ้นเป็น 1,973 และ 1,926 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ เมื่อใช้วาลีน (valine) เป็นแหล่งไนโตรเจนจะ ส่งเสริมการผลิต astaxanthin เช่นกันและมีค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-5.5 นอกจากนั้น Meyer และคณะยังพบว่า การเติม กรดอะซิติก (acetic acid) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต acetyl coA สำหรับการสร้าง astaxanthin จะลดลง แต่ถ้าความเข้มข้นสูงถึง 2 กรัม การเจริญของเชื้อจะหยุดโดยทันที ทั้งนี้เนื่องจากกรดอะซิติกจะเป็นพิษต่อเซลล์ และเมื่อได้ศึกษาต่อไปถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต astaxanthin ของมิวแทนท์ที่คัดเลือกได้ (Meyer และ Du Preez, 1994) พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 22°ซ ค่าพีเอช เท่ากับ 5 โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่ำๆ ทั้งนี้เมื่อใช้การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous culture) โดยใช้ sucrose hydrolysate อัตราการให้แหล่งคาร์บอนที่ทำให้ผลิต astaxanthin ได้สูงสุด คือ 0.043 h^{-1} ได้ผลผลิตเซลล์ 0.48 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท และสำหรับการผลิต astaxanthin ของมิวแทนท์ที่ได้โดยการเลี้ยงในอาหาร grape juice medium (Meyer และ Du Preez, 1994c) พบว่าสามารถผลิต astaxanthin ได้ 2,120 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ ในระยะ stationary growth phase นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อเติม yeast extract ลงใน grape juice medium พบว่า การผลิต astaxanthin สูงขึ้น

Pilar และคณะ (1995) พบว่าการเติม mevalonic acid 0.1 % ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยส่งเสริมการผลิต astaxanthin สูงขึ้นกว่า 400 %

ยังมีความพยายามของนักวิจัยอีกหลายกลุ่มที่จะทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* เพื่อให้ผลิต astaxanthin ได้สูงขึ้น Shiro และคณะ ได้ทำการกลายพันธุ์ *Phaffia rhodozyma* ที่ทนต่อ diphenylamine ซึ่งเป็นสารยับยั้งการผลิต astaxanthin พบว่า มิวแทนท์ที่ทนต่อ diphenylamine (DPA) นั้น เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี DPA จะผลิต astaxanthin ได้สูงขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากการกลายพันธุ์แล้วการคัดเลือกใช้สับสเตรท(substrate) กระบวนการผลิตและการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจ Okabue และ Lewis (1984) ได้ทดลองใช้ alfalfa residual juice (ARJ) เป็นสับสเตรท สำหรับการเจริญและสร้าง pigment ของ *Phaffia rhodozyma* พบว่า ARJ ส่งเสริมการเจริญแต่ยับยั้งการผลิต astaxanthin ซึ่งการยับยั้งนั้นเกิดมาจากสาร saponin ซึ่งพบใน ARJ

Haad (1988) ได้รายงานว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ในอาหารกากน้ำตาล (molass) ที่มีความเข้มข้น 1-10% (w/v) เชื้อสามารถผลิต astaxanthin ได้สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกากน้ำตาลเพิ่มขึ้นแต่การเจริญจะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของกลูโคสในกากน้ำตาลมากกว่า 4 % จากการทดลองดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะนำกากน้ำตาลมาใช้ในการผลิต astaxanthin ในระดับอุตสาหกรรม

Fontana และคณะ (1996) ได้พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อง่ายๆ สำหรับการผลิต astaxanthin โดยใช้ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ATTC 24202 พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย diluted sugar cane juice, urea และ sodium phosphate สามารถทำให้เชื้อผลิต astaxanthin ได้สูงถึง 1,300 ไมโครกรัมต่อกรัมทั้งนี้เนื่องมาจากยีสต์ชนิดนี้มีเอนไซม์ invertase และ urease จึงน่าจะนำใช้ในการพัฒนาการผลิตต่อไป และเมื่อศึกษาต่อไปโดยใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆในการหมัก astaxanthin ของ *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202 พบว่า brown sugar,sugar cane juice และ hydrolysed bagassed นั้นเหมาะสมสำหรับการผลิต astaxanthin โดยการเติม urea 1 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยส่งเสริมให้การผลิตสูงขึ้น

Reynders และคณะ (1996) รายงานให้ทราบว่ายีสต์ *Phaffia rhodozyma* คุณสมบัติเป็น Crabtree positive yeast ดังนั้นเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ การเจริญและการผลิต astaxanthin ของเชื้อจะลดลง ดังนั้นจึงสามารถแก้ปัญหาได้โดยการหมักแบบ Fed-batch จากการทดลองเมื่อใช้ molass medium และใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบดังกล่าวภายในระยะเวลา 27 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิต astaxanthin ได้ 380 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์

Gill และคณะ (1996) รายงานว่าการผลิต astaxanthin โดย *Phaffia rhodozyma* mutant HT-SFOIC ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย glucose 25 กรัมต่อลิตร, malt extract 4 กรัมต่อลิตร, urea 1 กรัมต่อลิตร และ monosodium phosphate 0.3 กรัมต่อลิตร จะให้ astaxanthin สูงสุด

Parajo และคณะ (1997) รายงานว่าการหมัก astaxanthin โดย *Phaffia rhodozyma*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ATCC 24228 ในอาหาร xylose medium พบว่ามีการสังเคราะห์ไซลิทอล และ pigment เกิดขึ้น โดย pigment นั้นพบ astaxanthin มากที่สุด รองลงมาคือ echineone, 3-hydroxyechinenone และ canthaxanthin และพบ xylitol 22 กรัมต่อลิตร เมื่อ xylose ความเข้มข้นเริ่มต้น 42 กรัมต่อลิตร และในปี 1998 ทีมงานวิจัยดังกล่าวได้รายงานผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคาร์โรทีนอยด์ เมื่อใช้ xylose medium ที่เติม KNO_3 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่า *Phaffia rhodozyma* NRRL 17268 สามารถผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงสุด และคาร์โรทีนอยด์ที่ผลิตขึ้น 58 มิลลิกรัมต่อลิตร มี astaxanthin มากที่สุดถึง 5.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* มีผนังเซลล์ที่แข็งแรงและสร้างแคปซูล (capsule) หุ้มอีกชั้นหนึ่งดังนั้นกระเพาะอาหารของปลา และสัตว์ปีกจึงไม่สามารถจะช่วยเซลล์ยีสต์นี้ได้ (Johnson และ Lewis,1979; Johnson และคณะ,1980) เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องย่อยผนังเซลล์ของยีสต์ก่อนเพื่อให้ได้ astaxanthin ที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่กล้ามเนื้อหรือไข่แดงของปลาและสัตว์ปีก ปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวได้มีนักวิจัยที่จะพยายามแก้ไขโดยใช้เอนไซม์จาก *Bacillus circulans* ในการทำลายผนังเซลล์ของยีสต์ (Okabue และ Lewis,1983) กรรมวิธีที่ใช้คือ หลังจากเลี้ยงยีสต์ให้ผลิต astaxanthin ได้สูงแล้วจึ้งเติม *B.circulans* ลงไป หรืออีกวิธีการหนึ่งคือ การใช้ freeze-dried cell (Johnson และ Grau,1980) ก็จะทำลายผนังเซลล์ของยีสต์ได้เช่นเดียวกัน แต่จาก 2 วิธีดังกล่าวนั้น astaxanthin ที่ได้ไม่ทำให้สีของปลาและไข่สดเหมือนกับการใช้การสกัด ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาวิธีการที่จะนำ astaxanthin จากเซลล์ของยีสต์ไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในกรรมวิธีดังกล่าวนี้ด้วยจึงเป็นปัญหาที่น่าสนใจที่จะศึกษากันต่อไป

สำหรับในประเทศไทยนั้นเท่าที่ค้นคว้ามายังไม่มีรายงานเรื่องการแยกยีสต์ *Phaffia rhodozyma* จากธรรมชาติเพื่อการผลิต astaxanthin ทั้งๆที่ประเทศไทยก็เป็นประเทศหนึ่งที่มีฟาร์มสัตว์จำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะแยกเชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* จากธรรมชาติ เช่น ดิน ใบไม้ ต้นไม้ เปลือกไม้ รวมถึงการแยกจากแหล่งที่มียีสต์อยู่จำนวนมาก เช่น อาหารหมักดองต่างๆเพื่อนำมาศึกษาการผลิต astaxanthin และคาร์โรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ และนำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาปรับปรุงพันธุ์ตลอดทั้งศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเพื่อให้ยีสต์ผลิต astaxanthin ได้สูงขึ้นซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น การใช้ astaxanthin เป็นองค์ประกอบในอาหารสัตว์ สีผสมอาหาร สีย้อมผ้า เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอาง และ cosmetics อื่นๆ ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาการผลิต astaxanthin ที่มีราคาถูกจากยีสต์โดยใช้วัตถุดิบเหลือใช้ทางด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมซึ่งเป็นการป้องกันมลภาวะที่เกิดจากวัตถุเหลือใช้เหล่านั้นและยังนำมาทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดได้อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6 วิธีดำเนินการวิจัย

1.6.1 ทำการแยกเชื้อยีสต์ที่สร้าง pigment จากดิน เปลือกไม้ ใบไม้ ดอกไม้ และอาหารหมักดอง และทำการจำแนกเชื้อยีสต์ที่ผลิตสีที่แยกได้เป็น genus ต่างๆ

1.6.2 ทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิต pigment ได้สูงโดยเฉพาะ astaxanthin

1.6.3 ทำการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ที่แยกได้โดยการใช้แสงยูวี และ สารมิวตาเจน เช่น NGT หรือ EMS และคัดเลือกมิวแทนท์ที่ผลิต astaxanthin ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมและอาจลองใช้วิธีโปรโตพลาสต์ฟิวชันหากวิธีแรกไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

1.6.4 ศึกษาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิต astaxanthin และทดลองผลิตในถังหมักและศึกษาวิธีการสกัด astaxanthin ออกจากเซลล์ยีสต์

1.6.5 ทดลองใช้ astaxanthin ที่ผลิตได้ในแง่ของการผสมในอาหาร และ/หรือ ใช้เป็นสีย้อมผ้า

1.7 ขอบข่ายของการวิจัย

การวิจัยนี้จะเลือกศึกษายีสต์ที่ผลิตสีโดยเฉพาะ astaxanthin โดยแยกยีสต์เองจากธรรมชาติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid	BDH
Acetone	Merck
Ammonium solution	BDH
4-Aminoantipyrine	Sigma
Bacto agar	Difco laboratories
Bacto peptone	Difco laboratories
Benzene	Merck
Chloroform	Merck
Diethyl ether	BDH
$FeCl_3.6H_2O$	Carlo erba
Glucose	SK
Glucose anhydrous	Fluka
Glucose oxidase	Sigma
Glucose peroxidase	Sigma
Hydrochloric acid	J.T Baker
Hydrogen peroxide	Carlo erba
Malt extract	Merck
Methanol	Merck
Magnesium ribbon	M&B
Petroleum ether	J.T Baker
Phenol	Carlo erba

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Potassium hydroxide	Carlo erba
Sodium azide	Merck
Sodium carbonate	Carlo erba
Sodium hydrogen phosphate	Fluka
Sodium hydroxide	Fluka
Standard astaxanthin	Sigma
Standard β-carotene	Fluka
Sulfuric acid	J.T Baker
Trichloroacetic acid	Carlo erba
Yeast extract	Difco laboratories

2.1.2 อุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Analytical Balance	Satorius
Autoclave Model HL-42A-DY	Hirayama
Centrifuge Model 6060	Centuration Scientific
Drying Oven	Gallenkamp
Fermenter ขนาด 2 ลิตร	-
Glass bead	-
Incubator shaker Model 3032	GLF
pH meter	Corning
Sonicator Model Sonifier 450	Sithiporn associates
Spectophotometer, Spectronic 21	Milton roy
TLC aluminium sheet siliga gel 60 F	Merck
UV-VIS spectrophotometer Model U2000	Hitachi Japan
Vortex genie 2	Scientific
Water bath	Gallenkamp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 จุลินทรีย์

ใช้ยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ที่แยกได้จากดิน ใบไม้ เปลือกไม้และดอกไม้

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การแยกยีสต์ที่ผลิตสีได้จากดิน ใบไม้ เปลือกไม้ และดอกไม้

ตักดินด้วยใบมีดที่เผาฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนใบ เปลือกและดอกไม้ นำมาล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อและตัดในสภาพปลอดเชื้อใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว YM เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางตัวอย่างทั้งหมดด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อแล้วเขี่ยลงบนจานอาหารวุ้น YM (yeast extract malt extract agar) บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกแยกเฉพาะยีสต์ที่ผลิตสีได้ 73 ไอโซเลทเพื่อนำมาคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตสารคาร์โรทีนอยด์ต่อไป

2.2.2 การบ่งชี้สายพันธุ์ของยีสต์ที่ผลิตสี

การบ่งชี้ชนิดของยีสต์ผลิตสีใช้วิธีดูลักษณะรูปร่างสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของยีสต์ตามวิธีของ Kreger van Rij, 1984 และยืนยันโดยส่งจุลินทรีย์ไปทำการตรวจสอบที่หน่วยตรวจสอบจุลินทรีย์ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

2.2.3 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์

ทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์จากยีสต์ผลิตสีในขั้นต้น โดยเลี้ยงยีสต์แต่ละไอโซเลทในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเซลล์ออกมาทำการสกัดสารคาร์-โรทีนอยด์จากเซลล์แล้ววัดปริมาณคาร์โรทีนอยด์ทั้งหมดที่สกัดได้โดยวิธีของ Meyer และคณะ (1993)แล้วคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆไว้ 4 ไอโซเลท ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ได้ถูกบ่งชนิดเป็น *Rhodotorula glutinis*โดยสภาวิจัยแห่งชาติ อย่างไรก็ตามปริมาณคาร์โรทีนอยด์ที่ได้ยังมีปริมาณต่ำจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณการผลิตโดยการทำการผ่าเหล่าและหาสภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงต่อไป

2.2.4 การทำให้ยีสต์ผลิตคาร์โรทีนอยด์เกิดการผ่าเหล่า

ได้คัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงสุด 3 ชนิด คือ 3B1, 3F2 และ 3R4 มาทำการศึกษาให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้เซลล์ยีสต์แต่ละไอโซเลทประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร มาใส่ Ethylmethanesulfonic acid (EMS) ความเข้มข้น 30 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรและเขย่าเบาๆ เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดอัตราการอยู่รอดและตรวจหายีสต์ผ่าเหล่าที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้โดยการเขี่ยเชื้อบนจานอาหารวุ้น YM บ่ม 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกยีสต์ผ่าเหล่าที่ผลิตสีได้เพื่อนำไปตรวจหาการผลิตคาร์โรทีนอยด์ต่อไป

2.2.5 การคัดเลือกมิวแทนท์ยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง

นำยีสต์ที่รอดชีวิตจากการทำ treatment ด้วย EMS ในข้อ 2.2.4 ที่ผลิตสารสีแดงเข้ม ชมพูเข้ม ชมพูอ่อน สีส้ม และเหลือง จำนวนทั้งสิ้น 16 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารวุ้น PDA และ YM เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมก่อนการผ่าเหล่าแล้วดูสีที่ผลิตขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารต่างชนิดและเปรียบเทียบอัตราการเจริญด้วย จากนั้นก็นำมิวแทนท์ทั้ง 16 ไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหาร YM เป็นเวลา 5 วัน เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม สกัดและหาปริมาณคาร์โรทีนอยด์ที่ผลิตโดยยีสต์แต่ละไอโซเลท แล้วเลือกมิวแทนท์ที่สามารถผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง เพื่อเลี้ยงในอาหารเหลวและปรับภาวะการเลี้ยงต่อไป

2.2.6 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงมิวแทนท์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงที่คัดเลือกแล้ว

2.2.6.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตคาร์โรทีนอยด์มากที่สุด

เลี้ยงยีสต์ใน YM medium โดยใช้ flask 250 มิลลิลิตร จำนวน 54 flasks (duplicate) แล้วทำการเก็บ sample ทุกๆ 12 ชั่วโมงจนกระทั่งการผลิตรงควัตถุมากขึ้น สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นได้ จึงเริ่มเก็บทุกๆ 6 ชั่วโมง การวัดอัตราการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช และการผลิตคาร์โรทีนอยด์ในอายุต่างๆ ทำการวัดจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า OD_{620} และน้ำหนักแห้งซึ่งทำได้โดย นำแต่ละ flask แบ่งมา 15 มิลลิลิตรมาเซนตริ-ฟิวจ์ที่ 4,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที resuspend ด้วยน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตรนำไปวัดค่า OD_{620} นำสารละลายที่ได้ไปอบที่ 150°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณหาน้ำหนักแห้งที่เกิดขึ้น ทำการวัดค่าพีเอชโดยนำอาหารที่เหลือ 15 มิลลิลิตร มาวัดค่าพีเอชทำการวัดปริมาณคาร์โรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตได้ โดยขั้นตอนต่อไปนี้

ก. กราฟมาตรฐานของ astaxanthin

เตรียมสารละลายมาตรฐาน astaxanthin 0.2 กรัมต่อลิตร นำมาเจือจางโดยเติมสารดังตารางที่ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารเพื่อทำกราฟมาตรฐานของ astaxanthin

หลอดที่ / สาร	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.2 กรัมต่อลิตร standard astaxanthin (มิลลิลิตร)	10	8	6	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0
Ethanol (มิลลิลิตร)	0	2	4	6	8	9	9.5	9.75	9.875	10

เตรียมสารละลายมาตรฐาน นำแต่ละหลอดไปวัดค่า A_{476} โดยใช้หลอดที่ 10 เป็น blank นำไปทำกราฟมาตรฐาน

ข. การทำกราฟมาตรฐานของ β-carotene

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ β-carotene ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นหลอดที่ 1 ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 เตรียมโดยนำหลอดที่ 1 มาเจือจางปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติม ethanol ให้มีปริมาตรรวม 4 มิลลิลิตร หลอดที่ 3 เตรียมโดยนำหลอดที่ 1 มา 2 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวทำละลายให้มีปริมาตรรวม 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดที่ 3 มาเจือจาง 50% ต่อไปเรื่อยๆ เพื่อเป็นหลอดที่ 4, 5,6,.....,11หลอดที่ 12 มีเฉพาะตัวทำละลาย (ethanol) เป็น blank นำทุกหลอดมาวัดค่า A_{484} นำค่าที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า A_{484} และความเข้มข้น

ค. การหาปริมาณคาร์โรทีนอยด์

นำสารละลายเซลล์ที่ได้จากข้อ ค. มาเซนตริฟิวส์ 450 รอบต่อนาที 15 นาที 2 ครั้ง resuspend ด้วย ethanol 10 มิลลิลิตร เติมเม็ดแก้วพร้อมทั้งนำไปวอร์เทกซ์เพื่อทำให้เซลล์แตกเป็นเวลาครึ่งชั่วโมงโดยเลือกความเร็วในการวอร์เทกซ์เร็วที่สุดเอาเม็ดแก้วออกแล้วนำสารละลายไปปั่นแยก ดูดเอาชั้นของสารละลายออกนำไปวัดค่า A_{484}นำไปหาปริมาณคาร์โรทีนอยด์ โดยการหาจากกราฟมาตรฐาน นำปริมาณคาร์โรทีนอยด์เปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งเซลล์

2.2.6.2 การปรับสูตรอาหารเพื่อผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้มากที่สุด

ก. การหาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

ได้ทำการทดลองเลี้ยงยีสต์ผ่าเหล่าสารพันธุ์ *Rhodotorula glutinis* :mB34 เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมของ *Rhodotorula glutinis* : 3B1 ในอาหารเหลวที่เป็น Yeast-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Malt extract (YM) โดยใช้ yeast extract 3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5 % และแปรผันปริมาณกลูโคส เป็น 1, 3, 5 และ 7% โดยน้ำหนักตามลำดับ

ทำการเตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยเชื้อดังกล่าวจากอาหารวุ้น YM ลงในอาหารเหลว YM ที่มีสูตรอาหารต่างๆ กันดังข้างบน เขย่าที่ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมอาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาตร 1.5 ลิตร ใส่ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ เลี้ยงในสภาวะโดยให้อากาศ 1.5 vvm และกวนด้วยใบพัดที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีและที่ค่าพีเอชของสารละลายเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกๆ 8 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์การเจริญของเซลล์โดยวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรน้ำเลี้ยง 1 ลิตรปริมาตรกลูโคสที่เหลือโดยใช้วิธีทางเอนไซม์ (Kunst และคณะ, 1984) และทำการสกัดและหาปริมาณคาร์โรทีนอยด์ที่เซลล์ยีสต์ผลิตขึ้นโดยใช้วิธีของ Meyer และคณะ (1993) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ก.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส(Kunst และคณะ, 1984)

วิธีการเตรียมสารเคมีใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและกลูโคสเปอร์ออกซิเดส

<u>สารรีเอเจนต์ A</u>

เตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ 100 มิลลิโมลที่มี 4-อะมิโน-แอนติไพริน 0.8 มิลลิโมล ปรับค่าพีเอช 7.0 และละลายเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 80 มิลลิกรัม เอนไซม์กลูโคสเปอร์ออกซิเดส 0.25 มิลลิกรัมและโซเดียมเอไซด์ 48.75 มิลลิกรัม ลงในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ปริมาณ 500 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นี้ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

<u>สารรีเอเจนต์ B</u>

สารละลายฟีนอล 560 มิลลิโมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

<u>สารรีเอเจนต์ผสม</u>

ทำการผสมกันระหว่างสารรีเอเจนต์ A กับสารรีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 100 ต่อ 2 (v/v)

<u>สารละลายกลูโคสมาตรฐาน</u>

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานโดยให้กลูโคสมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.02 ถึง 0.25 กรัมต่อลิตร

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

ผสมตัวอย่างปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร กับสารรีเอเจนต์ผสมปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20^{o}ซ นานประมาณ 45-60 นาที จนสารละลายมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สีชมพู นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตรด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

ก.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ β-carotene และ astaxanthin (Meyer คณะ, 1993)

นำตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร แยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ล้างเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ยีสต์ไปทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดสีโดยใช้คลื่นความถี่สูง (sonicator) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาสกัดสีโดยใส่อะซิโตน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วแยกเซลล์ออกจากอะซิโตนโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายสีที่สกัดได้เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วนำสารละลายสีที่อยู่ในชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 448 และ 474 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ β-carotene และ astaxanthin ตามลำดับ

ข.การหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและสัดส่วนของสารอาหารที่เหมาะสม

ได้ทำการศึกษาการผลิตคาร์โรทีนอยด์โดยการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ผ่าเหล่าสายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis* :mB34 ในอาหารเหลว YM โดยปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของสารละลายทีละอย่าง คือ 0.1, 0.3, 0.5 และ 1.0 %(w/v) yeast extract, 0.05, 0.1, 0.3 และ 0.5 % (w/v) malt extract , 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 %(w/v) peptone ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 0.3 % (w/v) ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เลี้ยงโดยมีค่าอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm และกวนด้วยใบพัดที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เก็บสารตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์และปริมาณ β-carotene และ astaxanthin ที่เซลล์ผลิตขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การแยกยีสต์ที่ผลิตสีและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์

การแยกยีสต์ที่ผลิตสีจากแหล่งธรรมชาติ อาทิเช่น ดิน ใบไม้ เปลือกไม้ ดอกไม้ ผักผลไม้ อาหารหมักดอง น้ำผึ้ง น้ำตาลจากต้นปาล์ม เนยและเนื้อหวาน โดยใช้เทคนิคที่แพร่กระจายลงบนจานอาหารที่มี YM, PDA สิ่งสกัดจากมอลท์ แล้วเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสีที่ขึ้นบนจานอาหารดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ที่ผลิตสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ได้ในปริมาณที่สูง (สีเข้ม) ผลการแยกพบว่า แยกได้ยีสต์ทั้งหมด 179 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) เป็นยีสต์ที่ให้สีอื่นๆ 72 ไอโซเลท ยีสต์ให้สีดำ 11 ไอโซเลท และอีก 96 ไอโซเลทไม่มีสี (ตารางที่ 3.2) จากนั้นได้ทำการแยกยีสต์ที่ผลิตสีออกมาและศึกษารูปร่างลักษณะตลอดจนสมบัติทางชีวเคมี เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ 8 ไอโซเลท อยู่ในสายพันธุ์ *Sporidiobolus* ยีสต์ 4 ไอโซเลท จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Phodosporidium* ยีสต์ 60 ไอโซเลท เป็นจีนัส *Rhodotorula* ที่เหลือ 11 ไอโซเลท เป็น black yeast ยีสต์ทุกไอโซเลทยกเว้น black yeast สามารถผลิต carotenoid pigments และบางไอโซเลทผลิต flavonoids ด้วย สำหรับ black yeast นั้นผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลดำเมลานิน จากยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้พบว่ามี 4 ไอโซเลท คือ 3B1, 3F2, 3A1 และ 2B2 ผลิตรงควัตถุกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ เมื่อเลี้ยงในสารอาหารชนิดเดียวกัน ภาวะการเลี้ยงและเวลาที่ใช้เลี้ยงเหมือนกัน ยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลทนี้จัดอยู่ในจีนัส *Rhodotorula glutinis* ซึ่งได้ทำการคัดเลือกมาศึกษาการผลิต astaxanthin ต่อไป

ตารางที่ 3.1 ยีสต์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติและอาหารหมักดอง

Sources	No. of isolates
Soils	39
Leaves	25
Barks	13
Flowers	38
Fruits and vegetables	30
Fermented foods	24
Honey	2
Palm sugar	1
Butter	1
Sweet meats	6
Totals	179

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.2 จำนวนไอโซเลทของยีสต์ที่ผลิตสี ยีสต์ผลิตสีดำและยีสต์ที่ไม่ผลิตสี

Yeast isolates	No. of isolates
Pigments	72
Black yeasts	11
Non-pigment yeasts	96
Totals	179

3.1.1 **การบ่งชี้ชนิดของยีสต์ผลิตสี** ผลในตารางที่ 3.3 แสดงรูปร่างลักษณะสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของยีสต์ที่ผลิตสีตามวิธีของ Kreger-van Rij (1984) ในการบ่งชี้ชนิดของยีสต์ จำนวนของสกุลยีสต์บอกไว้ด้านล่างของตาราง ยีสต์ที่เลี้ยงได้เป็นสีแดงและเหลืองเนื่องจากผลิตรงควัตถุกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ไม่สามารถ assimilate inositol, urease positive และ ไม่เกิดการหมักซึ่งเป็นลักษณะเด่นเฉพาะของยีสต์สกุล *Rhodotorula* เซลล์แตกหน่อหลายชั้นและมักจะเกิดแคปซูล นอกจากนี้ Ballistospores ไม่เกิดขึ้นและมี 2-3 สายพันธุ์ที่อาจผลิต pseudo หรือ true mycelium (Harrison, 1984) Genus *Rhodosporidium* เป็นขั้นสมบูรณ์ของ *Rhodotorula* ในบางสายพันธุ์จึงสามารถผลิต Ballistospores ได้ยีสต์สกุลนี้เป็นยีสต์แตกหน่ออาจเกิด psuedomycelium, true mycelium ทั้งที่มีการเชื่อมติดและไม่มี ส่วน Genus *Rhodosporidium* จะแสดงการเกิด teliospore แต่ไม่มี Ballistospores ลักษณะเฉพาะของยีสต์ *Rhodosporidium* ได้รวบรวมไว้โดย Banno (1984) การเกิด Ballistospores เป็นการแพร่พันธุ์ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของยีสต์ Basidiumcetous genus *Sporiobolus* (Nyland, 1984)

ตารางที่ 3.3 ลักษณะเฉพาะของยีสต์ผลิตสีสายพันธุ์ต่างๆ

Characteristics	Reactions		
	Rhodotorula	*Rhodosporidium*	*Sporidiobolus*
Fermentation	-	-	-
Spore formation:			
Ascospore	-	-	-
Basidiospore	-	+	+
Teliospore	-	+	+
Ballistospore	-	-	+
DBB	+	+	+
Urease	+	+	+
Pseudo/True mycelium	v	+	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.3 ลักษณะเฉพาะของยีสต์ผลิตสีสายพันธุ์ต่างๆ(ต่อ)

Characteristics	Reactions		
	Rhodotorula	*Rhodosporidium*	*Sporidiobolus*
Assimilaion of :			
Nitrate	V	+	+
Inositol	1	-	-
Galactose	+	+	+
Lactose	v	-	-
L-arabinose	v	+	+
Cellobiose	v	+	v
Raffinose	+	+	v
Maltose	+	+	v
Rhamnose	v	-	-
Erythritaf	-	-	-
Melezitose	v	+	v
Melibiose	v	+	+
No. of genera	60	4	8

+ positive reaction ; - negative reaction ; v some strains give a positive reaction, other a negative one

3.1.2 **การตรวจสอบการผลิตคาร์โรทีนอยด์โดยยีสต์ผลิตสี** ยีสต์ผลิตสีที่แยกได้ทั้งหมดสามารถผลิตสารสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ได้และบางไอโซเลทยังสามารถผลิตสารกลุ่มฟลาโว-นอยด์ได้ด้วย สำหรับยีสต์ผลิตสีดำพบว่าเป็นเมลานิน การผลิตคาร์โรทีนอยด์ของยีสต์แต่ละไอโซเลทศึกษาโดยการเลี้ยงยีสต์ใน flask 200 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ค่าพีเอช 4.5 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำเซลล์ยีสต์มาสกัดคาร์โรทีนอยด์และหาปริมาณตามวิธีของ Meyer และคณะ (1993) ได้ผลดังสรุปในตารางที่ 3.4

ผลการทดลองขั้นนี้เป็นขั้นคัดเลือกหายีสต์ที่สามารถผลิตสารสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ได้ในปริมาณสูงซึ่งพบว่า มียีสต์ 4 ไอโซเลทคือ 3B1, 3F2, 2A1 และ 2B2 สามารถผลิตสารกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ ทั้ง 4 ไอโซเลทที่ถูกบ่งชี้เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis* โดยสำนักงานคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ (TISTR, Thailand) อย่างไรก็ตามผลผลิตคาร์โรทีนอยด์ของยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลท ต่ำกว่าที่มีผู้รายงานไว้ (Frengova และคณะ, 1992, 1995 ; Muncherova and Augustin, 1995) ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์จะต้องนำมาปรับปรุงภาวะการเลี้ยงหรืออาหารเพื่อผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.4 คาร์โรทีนอยด์ที่ผลิตโดยยีสต์ผลิตสีไอโซเลทต่างๆปริมาณเป็นไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง

Groups	Yeast isolates	Total carotenoids (µg/g of yeasts)
1	K10, K11, B,KB1, GG, FF, M2, E17, E18, I17, I1, I2, J2, U	9-11
2	B4, B6, B7	25-29
3	C1, D, KK82, KK11, KK96, 2KK1, 2KK2, 2KK3, 2KK4, 2KK5, 2KK6, 2KK7, 2KK8, 2KK9, 2KK10, 2KK11, 2KK12, 2KK13, 2KK14, S1, E2, E6, E7, E9, KK, KK5, D2, D3, S2, E5, E16, B8	31-45
4	G1, G2, E3, E4, 3R1, 3R6, 3R2, 3R3, 3F1, B3	46-50
5	E8, E10, 3R4, 3R5, 3G1, 3B2, 3B3, 3G2, 3D1	80-90
6	2A1, 2B2, 3F2, 3B1	109-150

3.2 การเพิ่มผลผลิตสารให้สีโดยทดลองทำการกลายพันธุ์

3.2.1 การทดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี Methanesulfonic acid ethyl ester (EMS) และการคัดเลือก

เริ่มนำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาทำการศึกษาการเพิ่มผลผลิตสารให้สีโดยทดลองทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี Methanesulfonic acid ethyl ester (EMS) โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 2.0 x 10^8 cells/ml และเติม EMS ในอัตราส่วน 30 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.5) สามารถคัดเลือกมิวแทนท์ทั้งหมด 16 ไอโซเลทที่ทำให้โคโลนีสีต่างๆ กัน โดยแบ่งเป็นมิวแทนท์ที่ได้จาก 3B1 เท่ากับ 10 ไอโซเลท มิวแทนท์ของ 3R4 เท่ากับ 4 ไอโซเลท และมิวแทนท์ ของ 3F2 เท่ากับ 2 ไอโซเลท โดยมิวแทนท์ทั้ง 16 ไอโซเลท เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ให้โคโลนีต่างๆ กัน คือ โคโลนีสีชมพูเข้ม สีเหลือง สีเหลืองส้ม สีชมพู และสีชมพูจางๆ จากมิวแทนท์ทั้ง 16 ไอโซเลทนั้น มิวแทนท์ B34 (mB34) ซึ่งให้โคโลนีสีชมพูเข้มสร้างคาร์โรทีนอยด์สูงและสูงกว่าสายพันธุ์เดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.5 การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ไอโซเลท 3B1, 3F2 และ 3R4 โดยการเติม EMS ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาวะที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์	3B1	3F2	3R4
ความหนาแน่นของเซลล์ (cells/ml)	2.03×10^8	1.95×10^8	2.21×10^8
เติม EMS (μl/ml)	30	30	30
การบ่มเชื้อพร้อมเขย่า (ชั่วโมง)	1	1	1
จำนวนโคโลนี (control)	1.8×10^8	1.64×10^8	1.72×10^8
จำนวนโคโลนี (mutant)	3.68×10^3	2.56×10^6	2.09×10^6
อัตราการตาย (%)	99.998	98.44	9.79
อัตราการรอดชีวิต (%)	0.002	1.56	1.21

จากผลการทดลองได้มิวแทนท์ทั้งหมด 53 มิวแทนท์ โดยที่ได้จากการกลายพันธุ์ของ 3B1 35 มิวแทนท์ จาก 3F2 5 มิวแทนท์และจาก 3R4 13 มิวแทนท์ (ตารางที่ 3.6) จากนั้นจึงคัดเลือกมิวแทนท์ที่ให้โคโลนีสีต่างๆ กันคือแดงเข้ม ชมพูเข้ม ชมพูอ่อน ส้ม และเหลืองรวม 16 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.7)

ตารางที่ 3.6 มิวแทนท์ทั้งหมดจาก *Rhodotorula glutinis* 3B1, 3F2 และ 3R4

สายพันธุ์เดิม	มิวแทนท์	สีโคโลนี	จำนวน
3B1	MB1-mB35	เหลือง แดงเข้ม ชมพูเข้ม ชมพูอ่อน	35
3F2	MF1-mF5	ส้ม ชมพูอ่อน	5
3R4	MR1-mR13	ส้ม ชมพูอ่อน	13
		รวมทั้งหมด	53

ตารางที่ 3.7 มิวแทนท์ยีสต์ 16 ไอโซเลทที่มีสีของโคโลนีต่างกันที่คัดเลือก

กลุ่ม	มิวแทนท์	สีโคโลนี	จำนวน
1	mB32	เหลือง	1
2	mB34, mB35	แดงเข้ม	2
3	mB7, mB9	ชมพูเข้ม	2
4	mF1, mR5, mR13,	ส้ม	3
5	mB1, mB2, mB6, mF2, mB28, mB33, mR3, mR4	ชมพูอ่อน	8
		รวมทั้งหมด	16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำมิวแทนท์ mB34 ที่ให้สีแดงเข้มมาทดลองเลี้ยงในอาหารวุ้นที่ต่างกันคือ YPD และ YM เทียบกับสายพันธุ์ 3B1 เดิม พบว่ามิวแทนท์นี้ให้สีแดงเข้มบนอาหารวุ้น YPD และเป็นสีชมพูบนอาหาร YM ในขณะที่สายพันธุ์ 3B1 เดิมจะให้สีชมพูบนอาหารทั้งสองชนิด

ในทำนองเดียวกันมิวแทนท์ B9 (mB9) และ mB7 จะให้สีชมพูเข้มบนอาหารวุ้น YM และ YPD และ 3 ไอโซเลทของมิวแทนท์ให้สีส้ม mF1, mR5 และ mR13 และ มิวแทนท์กลุ่มสุดท้ายจะได้สีชมพูอ่อนและเจริญเติบโตช้า

3.2.2 การศึกษาการผลิตสารสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์โดยยีสต์กลายพันธุ์ 16 ไอโซเลท

ได้ทำการวัดการสะสมของคาร์โรทีนอยด์โดยมิวแทนท์ยีสต์ 16 ไอโซเลทเพื่อคัดเลือกมิวแทนท์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงสุดและสูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ผลดังตารางที่ 3.8 ซึ่งพบว่ามิวแทนท์ mB34 สามารถผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ และสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จึงทำการคัดเลือกเพื่อไปศึกษาองค์ประกอบหลักของสารสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์โดย Thin layer chromatography TLC และการวิเคราะห์ด้วย HPLC ต่อไป ตลอดจนการศึกษาการผลิตในถังหมักต่อไป รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะสีของโคโลนีของมิวแทนท์ mB34 เลี้ยงบนอาหารวุ้น YM เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสารคาร์โรทีนอยด์สกัดได้

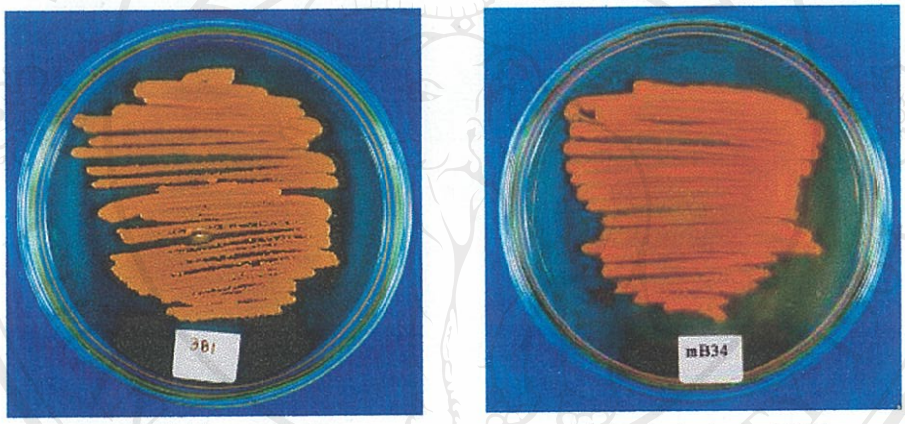
ตารางที่ 3.8 ปริมาณคาร์โรทีนอยด์ที่ผลิตโดยมิวแทนท์ 16 ไอโซเลทเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

สายพันธุ์เดิม	มิวแทนท์	คาร์โรทีนอยด์ (μg/g yeast)
3B1		153.08
	mB1	122.67
	mB2	187.34
	mB6	156.55
	mB7	168.64
	mB9	189.37
	mB28	105.46
	mB32	98.27
	mB33	76.54
	mB34	262.51
	mB35	201.34
3F2		121.68
	mF1	182.64
	mF2	167.33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.8 ปริมาณคาร์โรทีนอยด์ที่ผลิตโดยมิวแทนท์ 16 ไอโซเลทเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม (ต่อ)

สายพันธุ์เดิม	มิวแทนท์	คาร์โรทีนอยด์ (μg/g yeast)
3B1		145.23
	MR3	157.38
	MR4	100.35
	MR5	182.44
	mR13	67.34



Wild type strain Mutant strain (mB34)

Carotenoid pigment

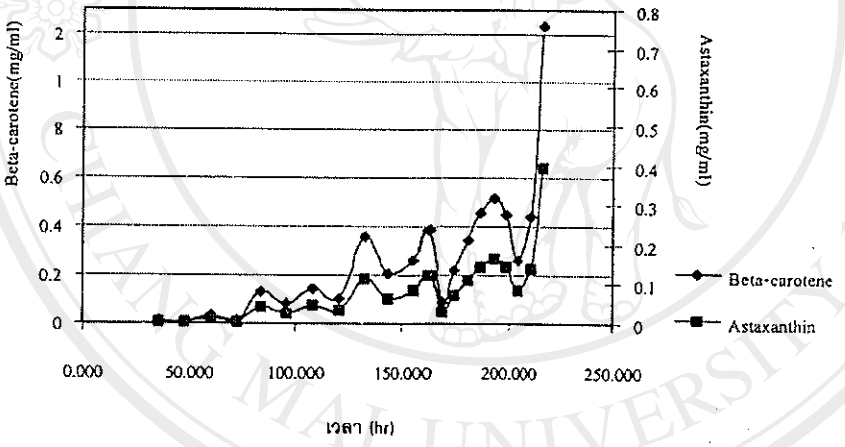
รูปที่ 3.1 การเจริญและผลิตสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ของมิวแทนท์ยีสต์ mB34 เลี้ยงบนอาหารวุ้น YM เทียบกับ สายพันธุ์เดิมและสารคาร์โรทีนอยด์ที่สกัดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การหาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง

3.3.1 การหาระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง

ในการทดลองนี้ได้เลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงที่นำไปศึกษาการกลายพันธุ์หนึ่งในสามชนิดคือ 3R4 มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลว YM และติดตามการผลิตสารคาร์โรทีนอยด์หลัก 2 ชนิด คือ β-carotene และ astaxanthin ในช่วงเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 36 ถึง 216 ชั่วโมงได้ผลดังรูปที่ 3.2 ซึ่งพบว่า มีแนวโน้มในการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้สูงเมื่อเลี้ยงในเวลา 190 ชั่วโมง หรือประมาณ 8 วันขึ้นไป โดยที่จะมีปริมาณ β-carotene สูงกว่า astaxanthin ประมาณ 4 เท่า ตลอดช่วงการเลี้ยงจากการศึกษาพบว่าการสร้างสารคาร์โรทีนอยด์มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มของจำนวนเซลล์



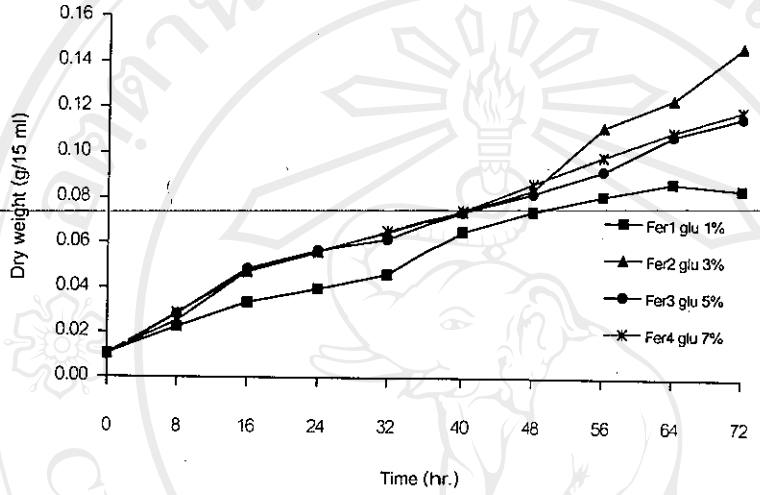
รูปที่ 3.2 ปริมาณของ β-carotene และ astaxanthin ที่ผลิตโดยยีสต์ 3R4 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM ในช่วงเวลาต่างๆ

3.3.2 การปรับสูตรอาหารเพื่อผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้มากที่สุด

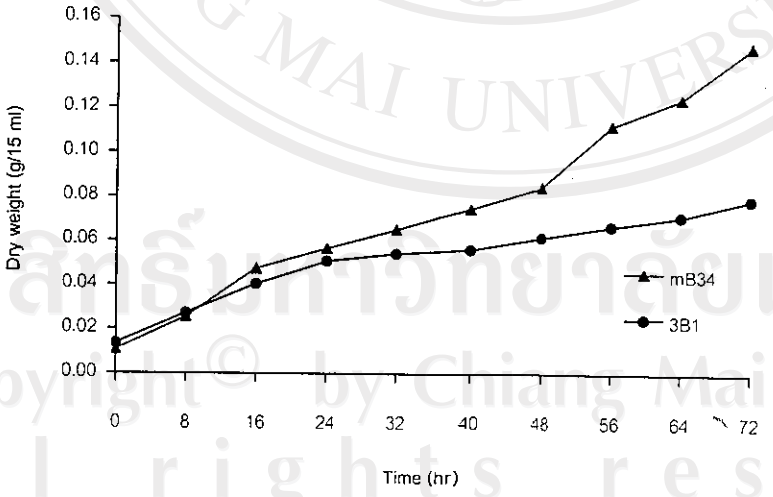
มิวแทนท์ยีสต์ที่เลือกมาศึกษาคือ mB34 ซึ่งสามารถผลิตสีกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเหลว YM ปริมาตร 1.5 ลิตร ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตคาร์โรทีนอยด์ของมิวแทนท์ยีสต์ mB34 และสายพันธุ์เดิม 3B1 เมื่อเลี้ยงในถังหมัก 2.0 ลิตร อาหารเหลว YM ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์ 0.3 % (w/v) สิ่งสกัดจากมอลท์ 0.3 % (w/v) และเปปโตน 0.5 % (w/v) ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสต่างๆกันจาก 1, 3, 5 และ 7 %(w/v) ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 แล้วเก็บเซลล์ยีสต์และน้ำเลี้ยงในช่วงเวลาการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงทุกๆ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวัดการเจริญเติบโตในอาหารเหลว YM ที่มีกลูโคสปริมาณต่างๆ กัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.3 ซึ่งพบว่าที่ปริมาณกลูโคส 3% มิวแทนท์ยีสต์เจริญได้ดีที่สุดโดยเฉพาะในช่วงตั้งแต่ 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป รูปที่ 3.4 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของมิวแทนท์ยีสต์ mB34 กับสายพันธุ์เดิมในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 0.3% (w/v) ซึ่งพบว่ามิวแทนท์ยีสต์ mB34 เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิม 3B1 ในภาวะการเลี้ยงแบบเดียวกัน



รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของมิวแทนท์ยีสต์ mB34 ในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆกัน



รูปที่ 3.4 การเจริญเติบโตของมิวแทนท์ยีสต์ mB34 และสายพันธุ์เดิม 3B1 ในระหว่างการหมักในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 3.0 %(w/v) มอลท์สกัดและยีสต์สกัดอย่างละ 0.3 %(w/v)และเปปโตน 0.5 %(w/v)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการผลิต β-carotene และ astaxanthin โดยมิวแทนท์ยีสต์ mB34 เลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคสต่างๆกัน เทียบกับสายพันธุ์เดิมที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 3.0 %(w/v) แสดงในตารางที่ 3.9 ซึ่งพบว่าสารคาร์โรทีนอยด์หลัก 2 ชนิดคือ β-carotene และ astaxanthin ถูกผลิตโดย mB34 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 0.3 %(w/v) ได้ในปริมาณสูงกว่าเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสอื่นๆ และยังผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกันคือ ที่เวลาการเลี้ยง 72 ชั่วโมง mB34 มิวแทนท์จะมีปริมาณเซลล์ 9.8 กรัมต่อลิตร และผลิต β-carotene และ astaxanthin เป็น 602.41 และ 1,055.17 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์เดิม (3B1) มีปริมาณเซลล์ 5.33 กรัมต่อลิตร ผลิต β-carotene 150.41 และ astaxanthin 296.08 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งมิวแทนท์ยีสต์และสายพันธุ์เดิมผลิต astaxanthin มากกว่า β-carotene ประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 3.9 ค่าน้ำหนักแห้ง ปริมาณ β-carotene และ astaxanthin ที่เพาะเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ใน ถังหมักโดยแปรผันค่าความเข้มข้นของกลูโคส 1, 3, 5 และ 7 %(w/v)

Time (h)	Glucose Conc. (%)	Dry weight (g/L)	β-carotene (μg/L)	Astaxanthin (μg/L)
0	1	0.67	-	25.19
	3	0.80	-	48.40
	5	0.73	-	29.67
	7	0.73	-	40.54
	Native 3	0.66	-	19.92
24	1	2.53	129.74	243.28
	3	4.20	195.97	296.27
	5	3.40	86.91	241.40
	7	3.93	97.72	228.06
	Native 3	3.33	15.05	79.05
48	1	4.73	337.01	549.20
	3	6.40	369.47	653.82
	5	4.73	303.15	446.46
	7	5.93	300.71	358.59
	Native 3	4.07	87.02	192.23
72	1	5.67	470.50	806.67
	3	9.80	602.41	1055.17
	5	7.53	545.17	888.99
	7	7.93	544.32	891.33
	Native 3	5.33	150.41	296.08

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตสารคาร์โรทีนอยด์โดยการปรับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร YM ได้แก่ ยีสต์สกัด มอลท์สกัด และ เปปโตน โดยคงความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 0.3 % (w/v) ตารางที่ 3.10 แสดงการแปรผันค่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 3.0 %(w/v) เปปโตน 0.5%(w/v) และมอลท์สกัด 0.3%(w/v) พบว่าในทุกช่วงที่นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ β-carotene และ astaxanthin จะสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 0.3 %(w/v) และที่เวลาการเลี้ยง 72 ชั่วโมงจะมีปริมาณเซลล์แห้ง 9.8 กรัมต่อลิตร β-carotene 602.41 ไมโครกรัมต่อลิตร และ astaxanthin 1,055.17 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณ astaxanthin จะมีมากกว่า β-carotene ประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 3.10 ค่าน้ำหนักแห้ง ปริมาณ β-carotene และ astaxanthin ที่เพาะเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ในถังหมักในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 3.0 %(w/v) เปปโตน 0.5%(w/v) และมอลท์สกัด 0.3 %(w/v) โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0.10, 0.30, 0.50 และ 1.0 %(w/v)

Time (h)	Yeast extract Conc. (%)	Dry weight (g/L)	β-carotene (μg/L)	Astaxanthin (μg/L)
0	0.10	0.87	-	65.25
	0.30	0.80	-	48.40
	0.50	0.80	-	44.06
	1.00	0.87	-	38.68
24	0.10	2.53	133.03	283.82
	0.30	4.20	196.01	296.27
	0.50	3.33	86.05	182.02
	1.00	2.13	94.23	188.51
48	0.10	3.87	224.27	392.99
	0.30	6.40	369.47	653.82
	0.50	4.07	205.25	341.47
	1.00	3.07	191.26	349.30
72	0.10	5.27	311.88	537.86
	0.30	9.80	602.41	1055.17
	0.50	7.40	531.69	710.77
	1.00	3.80	234.80	428.94

ในทำนองเดียวกันได้ทำการเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ mB34 ในอาหารเหลว YM โดยแปรผันความเข้มข้นของมอลท์สกัดและมีกลูโคส 3.0 %(w/v) ยีสตสกัด 0.3 %(w/v) และเปปโตน 0.5 %(w/v) ได้ผลสรุปในตารางที่ 3.11 ซึ่งพบว่าแนวโน้มของการใช้มอลท์สกัดที่ให้ปริมาณเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

β-carotene และ astaxanthin เหมือนกับผลที่แปรผันค่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 0.3 % (w/v) ดังนั้นปริมาณที่เหมาะสมของยีสต์สกัดและมอลท์สกัดจะเหมือนกันคือ 0.3 %(w/v) ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0.3 % (w/v) ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0.3 %(w/v) และเปปโตน 0.5 % (w/v)

ตารางที่ 3.11 ค่าน้ำหนักแห้ง ปริมาณ β-carotene และ astaxanthin ที่เพาะเลี้ยง มิวแทนท์ยีสต์ในถังหมักในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 3.0 %(w/v) เปปโตน 0.5 %(w/v) และยีสต์สกัด 0.3 %(w/v) โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของมอลท์สกัด 0.05, 0.1, 0.3 %(w/v)

Time (h)	Malt extract Conc. (%)	Dry weight (g/L)	β-carotene (μg/L)	Astaxanthin (μg/L)
0	0.05	0.67	-	82.81
	0.10	0.73	-	73.33
	0.30	0.80	-	48.40
	0.50	0.73	-	101.67
24	0.05	2.53	138.82	268.51
	0.10	2.80	183.01	312.68
	0.30	4.20	196.01	296.27
	0.50	2.27	211.18	183.60
48	0.05	3.87	328.45	557.82
	0.10	4.54	287.29	541.58
	0.30	6.40	369.47	653.82
	0.50	4.73	315.49	539.36
72	0.05	5.27	262.24	425.92
	0.10	6.78	424.29	749.19
	0.30	9.80	602.41	1055.17
	0.50	5.40	413.21	742.61

การแปรผันค่าความเข้มข้นของเปปโตนในอาหารเหลว YM ที่มีกลูโคส 3.0 %(w/v) ยีสต์สกัดและมอลท์สกัด อย่างละ 0.3 %(w/v) ให้ผลไปในทางเดียวกันกล่าวสรุปในตารางที่ 3.12คือ ที่ความเข้มข้นของเปปโตนเป็น 0.5 %(w/v) จะมีปริมาณเซลล์ β-carotene และ astaxanthin สูงกว่าความเข้มข้นอื่น และที่ 72 ชั่วโมง ของการเลี้ยงจะมีปริมาณเซลล์แห้ง 9.8 กรัมต่อลิตร β-carotene 602.41 ไมโครกรัมต่อลิตรและ astaxanthin 1,055.17 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณ astaxanthin ที่ผลิตจะมีประมาณ 2 เท่าของ β-carotene

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลขหมู่ ว.ว.
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 579.562
ส 473ก
c.2

ตารางที่ 3.12 ค่าน้ำหนักแห้ง ปริมาณ β-carotene และ astaxanthin ที่เพาะเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ในถังหมักในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 3.0 %(w/v) ยีสต์สกัด 0.3 %(w/v) และมอลท์สกัด 0.3 %(w/v) โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของเปปโตน 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 %(w/v)

Time (h)	Pepton Conc. (%)	Dry weight (g/L)	β-carotene (μg/L)	Astaxanthin (μg/L)
0	0.2	0.31	-	30.75
	0.3	0.35	-	28.98
	0.4	0.52	-	26.91
	0.5	0.80	-	48.40
24	0.2	2.58	9.47	65.45
	0.3	2.47	39.91	126.44
	0.4	2.87	60.61	159.37
	0.5	4.20	196.01	296.27
48	0.2	5.33	118.01	244.33
	0.3	4.93	134.79	285.15
	0.4	5.24	125.97	267.50
	0.5	6.40	369.47	653.82
72	0.2	6.18	187.93	322.59
	0.3	6.17	216.38	338.49
	0.4	6.48	217.92	450.75
	0.5	9.80	602.41	1055.17

เมื่อพิจารณาดูการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ (ตารางที่ 3.13-3.16) พบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลูโคสเป็น 3.0 %(w/v) นั้นเมื่อเลี้ยงได้ที่ 72 ชั่วโมงจะมีปริมาณกลูโคสเหลืออยู่เพียง 13.37 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของมอลท์สกัด 0.3 %(w/v) ยีสต์สกัด 0.3 %(w/v) และเปปโตน 0.5 %(w/v) ค่าพีเอชเป็นกรดมากขึ้นเมื่อเวลาการเลี้ยงนานขึ้นและที่ 72 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะลดลงเป็น 3.6 จากเริ่มต้นประมาณค่าพีเอช 4.9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.13 ค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ในถังหมักโดยแปรผันค่าความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0.10, 0.30, 0.50 และ 1.00 %(w/v)

Time (h)	Glucose Residual (g/L)				pH			
	0.10	0.30	0.50	1.00	0.10	0.30	0.50	1.00
0	29.00	30.10	32.22	31.73	4.90	4.95	4.90	4.80
8	27.60	28.73	31.25	25.03	4.45	4.50	4.50	4.50
16	25.20	26.25	28.37	23.17	4.20	4.00	4.30	4.30
24	23.40	22.65	27.62	22.30	4.15	3.85	4.05	4.15
32	22.60	20.84	24.78	21.67	4.20	3.80	3.95	4.20
40	20.80	19.30	20.02	20.25	4.10	3.60	3.90	4.25
48	20.00	18.00	19.83	19.85	4.10	3.70	4.00	4.15
56	16.60	17.50	18.69	16.13	4.00	3.75	4.00	4.10
64	16.40	13.76	17.21	14.64	4.00	3.80	4.00	4.15
72	14.70	13.37	15.57	13.21	4.00	3.60	3.95	4.20

ตารางที่ 3.14 ค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ในถังหมักโดยแปรผันค่าความเข้มข้นของมอลท์สกัด 0.05, 0.10, 0.30 และ 0.50 %(w/v)

Time (h)	Glucose Residual (g/L)				pH			
	0.05	0.10	0.30	0.50	0.05	0.10	0.30	0.50
0	29.95	30.02	30.10	29.43	4.90	4.80	4.95	4.80
8	28.90	29.37	28.73	26.40	4.80	4.60	4.50	4.70
16	27.77	27.73	26.25	24.40	4.30	4.50	4.00	4.55
24	26.76	23.56	22.65	23.66	4.35	4.40	3.85	4.45
32	24.37	21.01	20.84	23.00	4.45	4.35	3.80	4.20
40	23.43	19.23	19.30	22.36	4.45	4.40	3.60	4.20
48	21.94	18.10	18.00	21.80	4.40	4.30	3.70	4.15
56	20.45	16.05	17.50	20.58	4.30	4.20	3.75	4.15
64	19.81	13.89	13.76	15.80	4.30	4.15	3.80	4.20
72	15.03	13.60	13.37	12.60	4.25	4.00	3.60	4.10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.15 ค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ในถังหมักโดยแปรผันค่าความเข้มข้นของเปปโตน 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 %(w/v)

Time (h)	Glucose Residual (g/L)				pH			
	0.20	0.30	0.40	0.50	0.20	0.30	0.40	0.50
0	30.02	29.30	29.98	30.10	4.84	4.84	4.93	4.95
8	28.91	28.76	28.88	28.73	4.70	4.60	4.67	4.50
16	26.52	27.01	27.96	26.25	4.66	4.52	4.42	4.00
24	24.56	26.23	27.01	22.65	4.53	4.44	4.26	3.85
32	22.17	23.34	22.90	20.84	4.50	4.24	4.10	3.80
40	21.81	21.18	21.22	19.30	4.19	4.01	3.98	3.60
48	19.20	19.80	19.65	18.00	3.62	3.76	3.73	3.70
56	18.77	17.70	18.53	17.50	3.55	3.90	3.80	3.75
64	16.89	16.79	15.44	13.76	3.60	3.55	3.67	3.80
72	15.59	16.06	14.60	13.37	3.64	3.48	3.46	3.60

ตารางที่ 3.16 ค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ในถังหมักโดยแปรผันค่าความเข้มข้นของกลูโคส 1.0, 3.0, 5.0 และ 7.0 %(w/v)

Time (h)	Glucose Residual (g/L)				pH			
	1.0	3.0	5.0	7.0	1.0	3.0	5.0	7.0
0	9.80	30.10	50.49	70.76	4.50	4.95	4.50	4.80
8	8.35	28.73	49.20	65.73	4.15	4.50	4.20	4.10
16	6.33	26.25	45.65	63.91	3.85	4.00	4.05	4.05
24	4.87	22.65	42.26	58.07	3.90	3.85	3.80	4.15
32	3.05	20.84	39.20	52.63	3.90	3.80	3.95	4.10
40	1.28	19.30	36.30	48.60	3.90	3.60	4.10	4.00
48	0.62	18.00	35.35	47.58	4.05	3.70	3.90	4.00
56	0.38	17.50	34.91	46.78	4.10	3.75	3.85	4.10
64	0.14	13.76	34.11	44.68	4.30	3.80	3.75	4.05
72	0.09	13.37	33.46	42.59	4.40	3.60	3.75	4.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 การแยกและบ่งชี้ชนิดของยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตได้สูงสุด

ไอโซเลทของจุลินทรีย์ให้สีส่วนใหญ่แยกได้จากดิน และพืชทั้งที่เป็นส่วนใบ เปลือกต้น และดอก โดยการตัดส่วนที่ต้องการในภาวะไร้เชื้อ ใส่ในอาหารเหลว YM และเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเจือจางตัวอย่างทั้งหมด แล้วเขี่ยลงบนอาหารวุ้น YM บ่มที่ 30 ° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจัดกลุ่มจุลินทรีย์ให้สีที่แยกได้ตามแหล่งที่แยกพบว่าได้ยีสต์ผลิตสีทั้งหมด 73 ไอโซเลท เป็นยีสต์สีดำ 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อราผลิตสี 4 ไอโซเลท และแบคทีเรียจากเห็ดสีแดงหรือเห็ดน้ำนม 1 ไอโซเลท คณะผู้วิจัยได้เลือกเฉพาะยีสต์ผลิตสีมาศึกษาต่อ และเลือกเฉพาะยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงมาศึกษาต่อ การบ่งชี้ชนิดของยีสต์ผลิตสีดูจากรูปร่างลักษณะของยีสต์ สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีของ Kreger van Rij (1984) ซึ่งพบว่ามียีสต์ผลิตสีใน genus *Rhodotorula* 60 ไอโซเลท *Rhodosporidium* 4 ไอโซเลท และ *Sporidiobolus* 8 ไอโซเลท ยีสต์ใน genus *Rhodotorula* ที่แยกได้จะมีโคโลนีเป็นสีชมพูหรือสีส้ม เมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้น YM และบางไอโซเลทเป็นแบบ mucoid colonies ไอโซเลททั้งหมดมีลักษณะใหญ่ กลม ไม่เกิดการหมัก เป็น urease positive yeast และพบในแหล่งธรรมชาติ มีการแบ่งตัวโดยการแตกหน่อแบบ multilateral budding และไม่มีความเป็นพิษ (Kreger van Rij ,1984)

การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์แต่ละไอโซเลททำโดย เลี้ยงยีสต์ผลิตสีในอาหารเหลว YM แล้วสกัดคาร์โรทีนอยด์จากเซลล์ และวัดปริมาณโดยวิธีทางสเปคโทรสโคปี ซึ่งรวบรวมวิธีโดย Meyer และคณะ(1993) ผลการทดลองพบกลุ่มยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงสุดอยู่ 4 ไอโซเลท คือผลิตได้ 109 – 150 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ยีสต์ ได้แก่ไอโซเลท 2A1, 3R4, 3F2, SB1 ซึ่งยังผลิตได้ปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับที่มีผู้รายงานไว้ (Girad และคณะ, 1994, Johnson and Schroeder, 1995) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการปรับสภาวะการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงขึ้นเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรจะศึกษา อีกทางหนึ่งที่น่าจะทำได้ก็คือการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงขึ้นโดยการศึกษาการทำให้เกิดการกลายพันธุ์(mutation)แล้วคัดเลือกมิวแทนท์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การศึกษาการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ให้ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง

จากการศึกษาการผลิตคาร์โรทีนอยด์ของยีสต์ผลิตสีจาก 16 สายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตได้สูงสุด 3 สายพันธุ์ คือ 3R4, 3F2 และ 3B1 มาทำการกลายพันธุ์ สำนักงานสภาวิจัยแห่งชาติได้บ่งชี้ยีสต์ทั้ง 3 ชนิด ว่าเป็นยีสต์ในสกุล *Rhodotorula glutinis* ซึ่ง *Rhodotorula glutinis* 3B1 เป็นยีสต์ที่ผลิตโคโลนีสีส้ม ยีสต์แต่ละไอโซเลทประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตรนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่เติม ethylmethane sulfonate ความเข้มข้น 30 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และกวนเบาๆ ที่ 25° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งจะมีอัตราการอยู่รอดของยีสต์ 0.002 – 1.56 % จากนั้นก็คัดเลือกมิวแทนท์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้ ซึ่งพบว่าจาก *Rhodotorula glutinis* 3B1 จะมีมิวแทนท์เกิดขึ้น 35 ไอโซเลท ส่วน *Rhodotorula glutinis* 3F2 เกิดขึ้น 5 มิวแทนท์ และ *Rhodotorula glutinis* 3R4 เกิด 13 มิวแทนท์ ให้สีต่างๆกันรวมทั้งหมด 53 มิวแทนท์ จากนั้นได้ทำการเลือก โคโลนีของมิวแทนท์ที่มีสีต่างๆกันคือ แดงเข้ม ชมพูเข้ม ชมพูอ่อน เหลืองและส้ม ทั้งหมด 16 ไอโซเลท มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 5 วัน เทียบกับสายพันธุ์เดิม แล้วสกัดหาปริมาณคาร์โรทีนอยด์ที่ผลิตขึ้น พบว่ามิวแทนท์ *Rhodotorula glutinis* mB34 สามารถผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูงสุด และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม เมื่อนำมิวแทนท์ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* mB34 มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น YPD และ YM เทียบกับสายพันธุ์เดิม *Rhodotorula glutinis* 3B1 พบว่ามิวแทนท์จะให้สีแดงเข้มบนอาหารวุ้น YPD และสีชมพูบนอาหาร YM ขณะที่สายพันธุ์แม่ *Rhodotorula glutinis* 3B1 จะเป็นสีชมพูบนอาหารทั้งสองชนิด ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการผลิตสารคาร์โรทีนอยด์ของมิวแทนท์ที่คัดเลือกไว้อาจจะทำให้มีปริมาณมากขึ้นได้โดยการปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสม

4.3 การปรับสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงมิวแทนท์ยีสต์ให้ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง

ในการปรับสูตรอาหารนั้นใช้อาหารเหลว YM ที่มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ yeast extract 0.3 %(w/v), malt extract 0.3 %(w/v), peptone 0.5 %(w/v) และ glucose 1 %(w/v) มาทำการแปรผันความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสเป็นอันดับแรกตั้งแต่ 1, 3, 5 และ 7 %(w/v) ผลการทดลองพบว่าปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมคือ 3.0 %(w/v) ที่ทำให้การผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในเวลา 14, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ โดยวัดจากการหาสารคาร์โรทีนอยด์ 2 ชนิด คือ β-carotene และ astaxanthin ซึ่งในทุกช่วงของเวลาในการเลี้ยงจะมีการผลิต astaxanthin มากกว่า β-carotene ประมาณ 2 เท่าเสมอ ปริมาณกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงได้ 72 ชั่วโมง พบว่าอยู่ในระดับต่ำมาก และ ค่าพีเอชของน้ำเลี้ยงจากเริ่มต้นประมาณ 5 ก็ลดลงเป็นกรดมากขึ้นประมาณ 1 หน่วยพีเอช ส่วนการแปรผันองค์ประกอบของสารอาหารอื่นๆ เมื่อคงความเข้มข้นของกลูโคส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหมาะสมที่ 3.0 %(w/v) พบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือปริมาณที่ใช้ในสูตรอาหาร YM โดยทั่วไป จากผลการทดลองเลี้ยงในอาหารวุ้น YPD แล้วได้สีแดงเข้มนั้นน่าจะทำการทดสอบอีกครั้งโดยการเลี้ยง mB34 ในอาหารเหลว YPD ตามความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยไม่มีสิ่งสกัดจากมอลท์เพิ่มเติม เพื่อดูว่าการผลิตคาร์โรทีนอยด์จะมีปริมาณสูงขึ้นหรือไม่ ซึ่งจะได้ดำเนินการต่อไป

4.4 สรุปผลการวิจัย

ทำการแยกยีสต์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้จากดินและพืช และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์ได้สูง 3 ไอโซเลท ซึ่งเป็นยีสต์ *Rhodotorula glutinis* 3B1, 3F2 และ 3R4 มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี ได้มิวแทนท์ที่ผลิตคาร์โรทีนอยด์สูงสุด และสูงกว่าสายพันธุ์เดิม คือ *Rhodotorula glutinis* mB34 มาศึกษาการเพิ่มผลผลิตคาร์โรทีนอยด์ในอาหารเหลว YM ที่ปรับสูตรอาหารพบว่าสูตรอาหารเหลว YM ที่เหมาะสมคือ ยีสต์สกัด และมอลท์สกัดอย่างละ 0.3 %(w/v) เปปโตน 0.5 %(w/v) และกลูโคส 3.0 % (w/v) ซึ่งทำให้ได้คาร์โรทีนอยด์ทั้งหมดเป็น 1,657.58 ไมโครกรัมต่อลิตร และเซลล์ยีสต์แห้ง 9.8 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 72 ชั่วโมง และในภาวะเช่นนี้มิวแตนท์ *Rhodotorula glutinis* mB34 จะผลิต และ astaxanthin ในปริมาณที่สูงกว่า β-carotene

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

Andrew, A.G., Phaff, H.J. and Starr, M.P. (1976) *Phytochemistry* . 15:1003-1007.

An, G.H., Schuman, D.B. and Johnson, E.A. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* 55:116-123.

Banno, I. (1984) In *"The Yeast : A Taxonomic study"* (N.J.W.Kreger-van Rij, ed.) 3 rd edition. Elseiver Science Publisher, Amsterdam.

Butler, M.J., Lazarovits, G., Higgins, V.J. and Lachanu, M.A. (1989) *Can. J. Microbiol.* 35:728-734.

Byong, H. Lee. (1996) In *"Fundamental of Food Biotechnology".*

FDA. (1996) *Color additive status list. FDA,* Washington D.C.

Fontana, J.D., Guimarases, M.F., Martins, N.T., Fontana, C.A. and Baron, M. (1996) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57/58:413-422.

Fox, D.L. (1962) *Comp. Biochem. Physiol.* 6:1-40.

Fransworth, N.R. (1966) *J. Farm. Sci.* 55:225-269.

Frengova, G.I., Simova, E.D. and Beshkova, D.M. (1995) *Biotechnol. Lett.* 17:1001-1006.

Frengova, G.I., Simova, E.D., Pavlova, K., Beshkova, D.M. and Grigorova, D. (1992) *Biotechnol. Bioeng.* 44:888-894.

Gill, H.A., Chul, H.K., Eui, S.C. and Sang, K.R. (1996) *J. Ferment. Bioeng.* 82:515-518.

Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm. E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. and Willet, W.C. (1995) *J. Natl. Cancer. Inst.* 87:1767-1776.

Girad, P., Fal connier, B., Bricout, J. and Vladescu, B. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:183-191.

Goodwin, T.W. (1980) *The Biochemistry of the Carotenoids.* 2 nd. Edition. Chapman and Hall, London.

Haad, N.F. (1988) *Biotechnol. Lett.* 10:609-619.

Harrison, F.C. (1984) In *"The Yeast : A Taxonomic study"* (N.J.W.Kreger-van Rij, ed.)3 rd edition. Elseiver Science Publisher, Amsterdam.

Johnson, E.A. and Grau. C.R. (1980) *Poultry Sci.* 59:1777-1782.

Johnson, E.A., Conklin, D.E. and Lewis, M.J. (1977) *J. Fish. Res. Board. Can.* 34:2417-2421.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Johnson, E.A.and Lewis, M.J. (1997) *J. Gen. Microbiol.* 115:173-183.

Johnson, E.A., Villa, T.G. and Lewis, M.J. (1980) *Aquaculture.* 20:12-134.

Jyonouchi, H., Hill, J., Tomita, Y. and Good, R.Aa. (1991) *Nutr. Cancer.* 16:93-105.

Kanemitsu, T. and Aoe, T. (1958) *Bull Jpn. Soc. Sci. Fish.* 24:209-215.

Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S. (1991) *J. Ferment. Bioeng.* 71:335-339.

Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59:867-873.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1984) *The Yeast : A Taxonomic study* 3 rd edition. Elseiver Science Publisher, Amsterdam.

Krinsky, N.I. (1989) *Carotenoids:Chemistry and Biochemistry.* Plenum New York.

Kunst, A., Draeger, B. and Ziegenborn, J. (1984) *"Colorimetric Methods with Glucose Oxidase and Peroxidase"* In method of enzymatic analysis 3 rd edition. Weinheim:Verlag Chemic.

Matsuno, T. (1991) *Pure Appl. Chem.* 63:81-88.

Meyer, P.S. and Du Preez, J.C. (1993) *Biotechnol. Lett.* 15:919-924.

Meyer, P.S. and Du Preez, J.C. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:780-785.

Meyer, P.S. and Du Preez, J.C. (1994c) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:178-183.

Meyer, P.S., Du Preez, J.C. and Killan, S.G. (1993) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9:514-520.

Meyer, P.S., Du Preez, J.C. and Killan, S.G. (1993) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:240-241.

Miller, M.W. (1984) In *"The Yeast : A Taxonomic study"* (N.J.W.Kreger-van Rij, ed.) 3 rd edition. Elseiver Science Publisher, Amsterdam.

Miller, M.W., Yoneyarna, M. and Soneda, M. (1976) *Inter. J. System. Bacteriol.* 26:286-291.

Muncherova, D. and Augustin, J. (1995) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:240-241.

Nelis, H.J. and De Leenheer, A.P. (1991) *J. Appl, Microbiol.* 70:181-191.

Nyland, G. (1984) In *"The Yeast : A Taxonomic study"* (N.J.W.Kreger-van Rij, ed.) 3 rd edition. Elseiver Science Publisher, Amsterdam.

Okabue, R.N. and Lewis, M.J. (1983) Biotechnol. Lett. 5:731-734.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Okabue, R.N. and Lewis, M.J. (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:33-39.

Parajo, J.C., Santos, V. and Vazquez, M. (1997) *Biotechnol Lett.* 19:139-141.

Parajo, J.C., Santos, V. and Vazquez, M. (1998) *Process Biochem.* 33:181-187.

Perrier, V., Dubreucq, E. and Galzy, P. (1995) *Arch. Microbiol.* 164: 173-179.

Phaff, H.J., Miller, M.W., Yonyama, M. and Soneda, M. (1972) In G. terui (ed.) Proceeding of the 4 the IFS:*Fermentation Technology Today, Tokyo.* Society of Fermentation Technology, Osaka.

Pilar, C., Trinidad, M., Jorse, B.V. and Tomas, G.V. (1995) *Biotechnol. Lett.* 17:575-578.

Polulyakh, O.V., Podoprigora, O.I., Eliseev, S.A. and Ershov, Y. (1991) *Appl. Biochem. Microbiol.* 27:411-414.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. (1991) *Yeast Technology.* 2 nd. Edition. An avi Book, New York.

Reynders, M.B., Rawlings, D.E. and Harrison, STL. (1996) *Biotechnol. Lett.* 18:645-654.

Rose, A.H. and Harrison, J.S. (1993) *The Yeast Vol. 5 Yeast Technology.*

Schiedt, K., Leuenberger, F.J., Vecchi, M. and Glinz, E. (1985) Pure Appl. Biochem. 57:658-692.

Shailaja, S. and Willium, J.P. (1989*) Appl. and Environ. Microbiol.* 55:1811-1817.

Shiro, N., Toshihide, K., Naumichi, N. and Namthip, C. (1997) *J. Ferment. Bioeng.* 83:429-434.

Simpson, K.L., Katayama, T. and Chichester, C.O. (1981) *Carotenoids as colorants and vitamin A Precursors.* Academic Press, London.

Simpson, K.L., Chichester, C.O. and Phaff, H.J. (1971) In *"The Yeasts vol. 2"* Academic Press, London.

Vazquez, M. and Martin, A.M. (1998) *Biotechnol. Bioeng.* 57:314-320.

Weedon, B.C.L. (1971) In O. Isler (ed.) *Carotenoids Birkhauser Verlag.* Basel.

Yokoyama, A., Izumida, H. and Miki (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:1842-1844.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved