วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2559 : 34 (2) : 122-132

การผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด แบบการหมักแห้ง

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

ณัฐพร จันทร์ฉาย[1] ศันศนีย์ บุญเกิด[1]

บทคัดย่อ

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

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

Abstract

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

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

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่ จ.แพร่ 54140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ในปัจจุบันมีการเพาะปลูกข้าวโพดเพิ่มมากขึ้นทุกๆ ปี อันเนื่องมาจากความต้องการของผู้บริโภคเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะความต้องการเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทำให้มีปริมาณของฝุ่นข้าวโพดที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำฝุ่นข้าวโพดมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ แต่ส่วนใหญ่จะถูกนำไปให้เป็นอาหารสัตว์ (มนัสนันท์, 2548)

อาหารสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตสัตว์เพื่อให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี และมีผลผลิตที่เพิ่มขึ้น โดยเป็นแหล่งโภชนะที่สัตว์จะนำไปใช้ ซึ่งอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ในปัจจุบันได้มีการผสมแคโรทีนอยด์ลงในอาหาร เช่น อาหารไก่ และอาหารปลา เป็นต้น เพื่อเป็นการเพิ่มสีของเนื้อหรือไข่แดงให้มีสีที่เข้มขึ้น และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค แต่ปัญหาการใช้แคโรทีนอยด์ในปัจจุบัน คือ ใช้แคโรทีนอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งมีราคาแพง เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้แคโรทีนอยด์จากธรรมชาติมีความสำคัญ และได้รับความต้องการในปริมาณที่สูง การผสมยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารสัตว์โดยตรงช่วยให้อาหารสัตว์นั้นมีโปรตีนและแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นได้ จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแคโรทีนอยด์ได้ คือ เชื้อยีสต์ *Rhodotorula rubra* ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารสีแคโรทีนอยด์โดยสามารถนำไปใช้ทดแทนสารสีสังเคราะห์จากทางเคมีได้ แคโรทีนอยด์ที่พบมากที่สุดในยีสต์ *R. rubra* คือ ไลโคปีน ซึ่งพบมากถึง 40.68 ไมโครกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ แอสต้าแซนทิน เท่ากับ 38.63 ไมโครกรัมต่อกรัม, ลูทีน เท่ากับ 20.29 ไมโครกรัมต่อกรัม และ เบต้า-แคโรทีน เท่ากับ 8.89 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (สาวิตรี, 2549 และ Chanchay, 2013) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวจะต้องมีการผลิตยีสต์ให้ได้ปริมาณมาก ซึ่งก่อให้เกิดต้นทุนที่สูง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ในฝุ่นข้าวโพดโดยตรงโดยใช้ฝุ่นข้าวโพดเป็นสารอาหารน่าจะช่วยลดต้นทุนและเพิ่มคุณค่าโภชนาการของฝุ่นข้าวโพดสำหรับอาหารสัตว์โดยตรง

โดยวิธี Solid state fermentation เป็นสภาวะที่ง่ายต่อการนำผลผลิตไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารสัตว์ไม่จำเป็นต้องคัดแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสามารถให้คุณค่าทางโภชนะที่สูงต่อสัตว์ด้วย โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อประเมินอิทธิพลของสารอาหารที่สำคัญ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ได้ถูกนำมาใช้ในการประเมินอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่าง และความชื้น ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ (Y_1) โดยแบบจำลองสมการพหุนามกำลังสองไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการใช้ CCD นั้นเป็นกระบวนการออกแบบการทดลองเพื่อลดปัจจัยการทดลองอื่น ๆ ทำให้ได้ผลได้เร็วขึ้น คือ มนัสนันท์ และคณะ (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. glutinis* DM28 บนรำข้าวโดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 ต่อ 1 โดยการเจริญเท่ากับ 88.2 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 2.12 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว สุมารี (2552) ศึกษาการเจริญของยีสต์ *R. rubra* โดยการทดลองแบบ CCD พบว่าการทดลองที่เหมาะสมที่สุด ในกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ให้ผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 0.0685 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

Chanchay (2013) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *R. rubra* ของการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และมีสารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากถึง 30.39 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากเลี้ยงเชื้อยีสต์จากแผนการทดลองแบบ CCD ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 23.77 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 3.19 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 3.19 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 6.69 และอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบเลี้ยงเชื้อยีสต์ในห้องปฏิบัติการพบว่าสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้เท่ากับ 235.84 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

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

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เพื่อมุ่งเน้นการใช้ฝุ่นข้าวโพดให้เกิดประโยชน์โดยใช้เป็นสารอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MJU11 พร้อมศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตขึ้น เพื่อเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ และเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **จุลินทรีย์**

R. rubra MJU11 จากห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

2. **ศึกษาการเจริญของยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด**

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 continued

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิเคราะห์การเจริญ

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

5. วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ Foss *et al*. (1984)

เก็บตัวอย่างชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม เติมสารละลาย 90 เปอร์เซ็นต์ Acetone ตวงด้วยกระบอกตวงปริมาณ 30 มิลลิลิตร ในขวดสีชา ใช้แท่งแก้วคนเป็นครั้งคราว เป็นเวลานาน 30 นาที กรองตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรองนำสารละลายที่ได้ (Acetone extract) นำมา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Ethyl acetate 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่หลอดทดลอง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 472 นาโนเมตร (Blank test ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) หักลบค่า Absorbance ที่วัดได้ จากนั้นนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณแคโรทีนอยด์จากสมการ

$$E^{1\%}_{1\,cm} = 1,900$$

1. Absorbance – 10% of Absorbance .....(a)

2. $\frac{(a) \times 10,000}{1,900}$ .....(b)

3. $\frac{(b) \times [(\text{Acetone extract 5 ml}) + (\text{Distilled water 1 ml}) + (\text{Ethyl acetate 2 ml}) \times (\text{Acetone 30 ml})}{(\text{sample 5 g}) \times (\text{Acetone extract 5 ml}) \times 1,000,000}$ .....(c)

4. (c) = Carotenoid contents (ไมโครกรัมต่อกรัมวัตถุแห้ง)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด

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

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด พบว่ายีสต์ *R. rubra* MJU11 เจริญได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 โดยมีผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 22.4 ไมโครกรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพดแห้ง (Figure 1) และผลได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 17.98 กรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพด (Figure 2) หลังจากนั้นการเจริญจะลดลง ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณความชื้นในฝุ่นข้าวโพดลดลง ทำให้ยีสต์ตายเนื่องจากขาดน้ำที่ใช้ในกระบวนการแมทาบอลิซึม วรรณภา (2529) กล่าวว่าความสำพันธ์ระหว่างการเจริญกับปริมาณแคโรทีนอยด์เป็นแบบ Uniphase ซึ่งเป็นแบบการสร้างสารทุติยภูมิในช่วงต้นของการเจริญ ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์แบบ Uniphase อาจมาจากการเติบโตอย่างรวดเร็วของยีสต์ทำให้เกิดสภาพจำกัดอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมนัสนันท์ และคณะ (2548) ที่ทำการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *R. glutinis* DM28 บนรำข้าวแบบการหมักแห้ง เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์โดยทำการหมักที่สภาวะความชื้นเริ่มต้น 49.6 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.21 พบว่าการเจริญ และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 144 ของการบ่ม โดยมีผลได้ปริมาณเซลล์ 54.0 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.65 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว และต่างจาก Chanchay (2013) พบว่าระยะเวลาที่ยีสต์ *R. rubra* เจริญได้ดีที่สุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 72 ในอาหารเหลวและยังต่างจาก Tinoia *et al*. (2004) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิต แคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. glutinis* พบว่าจำนวนเซลล์แห้งที่ได้เท่ากับ 10.35 กรัมต่อลิตร และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 3.48 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยใช้ H_2SO_4-hydroyzed 23.63 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.91 อุณหภูมิ 30.3 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นเวลา94.78 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

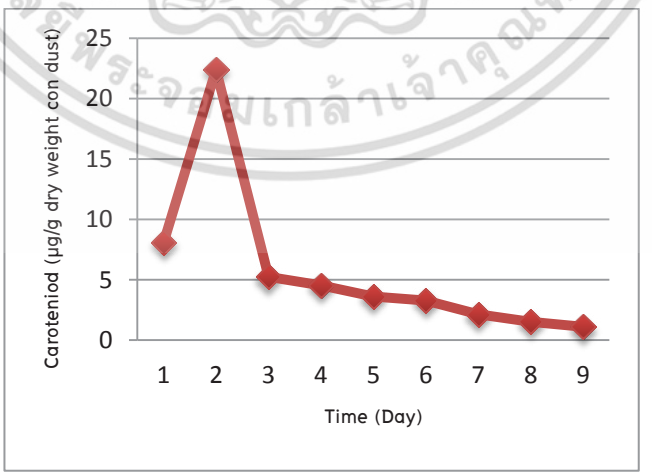

Figure 1 The amount of carotenoid from yeast *R. rubra* MJU11 on corn dust through solid state fermentation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

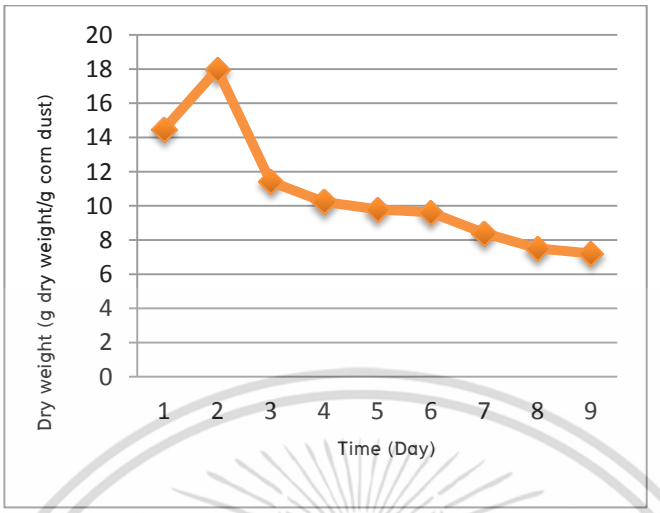

Figure 2 The growth of the yeast *R. rubra* MJU11 on corn dust through solid state fermentation.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Final Equation in Terms of Coded Factors:

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

$R^2 = 0.9961$

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

$R^2 = 0.9522$

จากผลการทดลองของความชื้น และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU11พบว่า เปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงสุดคือ 55 เปอร์เซ็นต์ และต่ำสุดคือ 45 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีการเปรียบเทียบผลการผลิตแคโรทีนอยด์ใน Figure 3

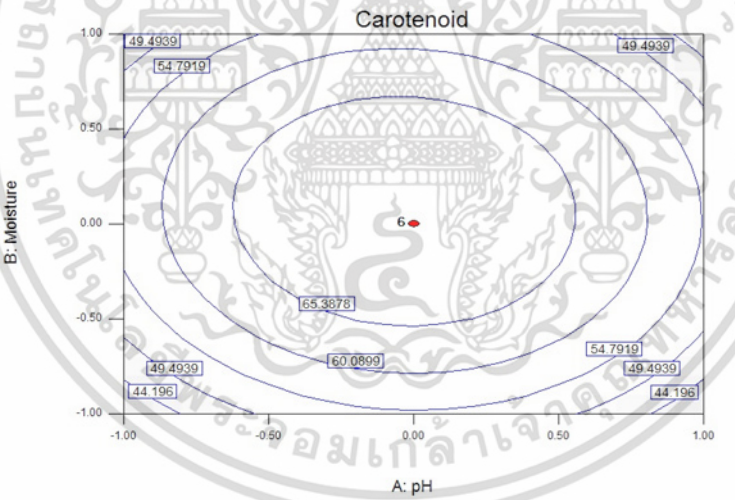

Figure 3 Shows the relation between the acidity - alkalinity (A), moisture (B) and the ratio of carbon per nitrogen (C) are associated with amount of carotenoids.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

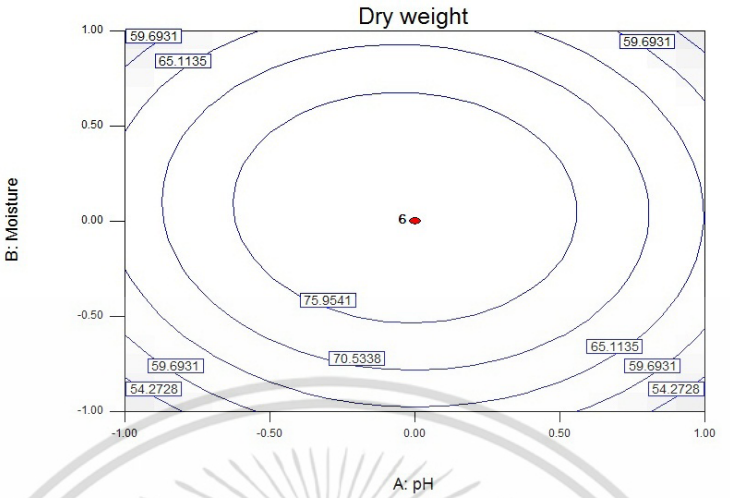

Figure 4 Shows the relation between the acidity - alkalinity (A), moisture (B) and the ratio of carbon per nitrogen (C) are associated with cell dry weight.

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU11 บนฝุ่นข้าวโพด แบบการหมักแห้ง พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 8 ต่อ 1 และระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีผลได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 82.09 กรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพด และผลได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 72.01 ไมโครกรัมต่อกรัมฝุ่นข้าวโพดแห้ง สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ซึ่งเป็นการลดปริมาณของเสียจากทางเกษตร และ ลดปัญหามลพิษทางอากาศจากการเผาไหม้ฝุ่นข้าวโพดของเกษตรกรอีกด้วย ซึ่งสามารถนำผลการศึกษาในครั้งนี้ไปใช้ในการผลิตแคโรทีนอยด์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้จริง

เอกสารอ้างอิง

จริยา คลังทรัพย์. (2551). สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ Rhodotorula rubra. ปัญหาพิเศษบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ. 56 หน้า.

พจนีย์ มณีโชติ และดวงพร คันธโชติ. (2529). การเจริญของยีสต์ Rhodotorula rubra TISTR 5127 ในน้ำข้าวฟ่างหวานเพื่อเป็นแหล่งอาหารโปรตีน และแคโรทีนอยด์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร. กรุงเทพฯ.

มนัสนันท์ โรจนกมลสันต์, ชาลี มะลิซ้อน และ วรพจน์ สุนทรสุข. (2548). การผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ Rhodotorula glutinis DM28 บนรำข้าว. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี.

วรรณภา ทาบโลกา. (2529). ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัส ที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). ยีสต์ : ความหลากหลาย และเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมารี สุขเถียร์. (2552). สภาวะที่เหมาะสมบางประการสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ Rhodotorula rubra. ปัญหาพิเศษบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ. 68 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. (2531). การผลิตเบต้า-แคโรทีน โดยยีสต์ (Rhodotorula pallida). [Online]. แหล่งที่มา http://www.geocities.ws/asa chai/cas2.htm. วัน 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ที่สืบค้นข้อมูล.

Chanchay, N. (2013). Optimal Condition for Growth of *Rhodotorula rubra* and Antioxidation Characteristics of Its Carotenoids. PhD Thesis. : Chiang Mai University.135 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foss, P., Storebakken,T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. and Streiff, K. (1984). Carotenoids in diets for salmonids I: Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. Aquaculture., 41: 213-226

Tinoia, J., Rakariyathama, N. and Deming, R.L. (2004). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Pro. Biochem., 40 : 2551–2557.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้