การศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จาก *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยใช้น้ำมะพร้าว

STUDIES OF CARBON AND NITROGEN SOURCES FOR CAROTENOID PRODUCTION BY *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 USING COCONUT JUICE

สุภาพร พัฒนวิริยะศิริกุล

SUPHAPORN PATTANAVIRIYASIRIKUL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-SC-M-020 051

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จาก *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยใช้น้ำมะพร้าว

STUDIES OF CARBON AND NITROGEN SOURCES FOR CAROTENOID PRODUCTION BY *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 USING COCONUT JUICE

T123715

สุภาพร พัฒนะวิริยะศิริกุล

SUPHAPORN PATTANAVIRIYASIRIKUL

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....123715
วัน, เดือน, ปี.....23 ก.ค. 2555

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-SC-M-020-051

STUDIES OF CARBON AND NITROGEN SOURCES FOR CAROTENOID PRODUCTION BY *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 USING COCONUT JUICE

SUPHAPORN PATTANAVIRIYASIRIKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGDUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2012

KMITL-2012-SC-M-020-051

COPYRIGHT 2012

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จาก *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยใช้น้ำมะพร้าว Studies of Carbon and Nitrogen Sources for Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 Using Coconut Juice
นักศึกษา	นางสาวสุภาพร พัฒนะวิริยะศิริกุล
รหัสประจำตัว	50068354
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		**ลายมือชื่อ**
รศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
ดร.วรภัทร์	สงวนไชยไผ่วงศ์	
รศ.อรไท	สุขเจริญ	
ผศ.ดร.เหมือนหมาย	อภินทนาพงศ์	
รศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 22 ตุลาคม พ.ศ. 2555 เวลา 13.30 – 16.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 423 ชั้น 4 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่.....**เดือน**.....**พ.ศ**.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จาก *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยใช้น้ำมะพร้าว
นักศึกษา	สุภาพร พัฒนะวิริยะศิริกุล
รหัสประจำตัว	50068354
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์

บทคัดย่อ

ศึกษาการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นสับสเตรทและศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยมีน้ำตาล 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน (กลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แลคโตส และแมนนิทอล) จากนั้นเลือกชนิดของน้ำตาลและทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 27.32 กรัมต่อลิตร และ 7.74 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนพบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 27.40 กรัมต่อลิตร และ 15.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน (4, 5, 6 และ 7) พบว่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 เหมาะสมที่สุด โดยให้ปริมาณเซลล์แห้ง 27.44 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 2.27 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้แคโรทีนอยด์ 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล การศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรซึ่งมีสภาวะที่แตกต่างกัน พบว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75 เหมาะสมที่สุด ให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 28.08 กรัมต่อลิตร และ 12.99 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าในสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีบีตา-แคโรทีนเพียงชนิดเดียว

คำสำคัญ: แคโรทีนอยด์, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, น้ำมะพร้าว

Thesis Title	Studies of Carbon and Nitrogen Sources for Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 Using Coconut Juice.
Student	Suphaporn Pattanaviriyasirikul
Student ID	50068354
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2012
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong
Thesis Co-Advisor	Assist. Prof. Dr. Muanmai Apintanapong

Abstract

Growth and carotenoid production of *Rhodotorula glutinis* TISRT 5159 was studied using coconut juice as co-substrate with the addition of five sugars, including glucose, sucrose, galactose, lactose and mannitol. The suitable sugar was then chosen to study the optimization of added sugar concentration. It was found that the highest dry cell weight and carotenoid concentration were 27.32 g/l and 7.74 mg/l, respectively, when added 45 g/l sucrose to the medium. The effects of nitrogen sources were investigated. The maximum dried cell weight and total carotenoid concentration of 27.40 g/l and 15.85 mg/l, respectively, were found when used each 2.5 g/l of yeast extract and ammonium sulfate. Then, the studies of different initial medium pH (4, 5, 6 and 7) were compared. The results showed that the optimum pH was 6 (the highest dried cell weight of 27.44 g/l, carotenoid productivity 2.27 mg/l/day and yield 0.36 mg/g sugar). The cultivation in bioreactor was studies in different conditions, and the optimized condition was 75% dissolved oxygen. It was found that the weight of dried cell 28.08 g/l and total carotenoid concentration of 12.99 mg/l. The HPLC analysis showed that only β- carotene was synthesized.

Keyword: Carotenoids, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, Coconut juice

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีจากความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งให้คำปรึกษาในการทำวิจัยตลอดจนคอยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์ทั้งสองท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล รองศาสตราจารย์อรไท สุขเจริญ และ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันและคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ และดร.วิมลมาศ บุญมี ที่ช่วยให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจอยู่เสมอ จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคุณสมัคร แสงจันทร์ ที่คอยช่วยเหลือและช่วยดูแลอุปกรณ์ถังหมักตลอดจนอำนวยความสะดวกต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จ คุณประสิทธิ์ แผ้วบาง และคุณวิทยา เขียวเขิน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเบิกสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่มธุรา อุณหศิริกุล พี่อมรรัตน์ สุวรรณโพธิ์ศรี พี่ศักรินทร์ บุญล้ำ พี่เทอดศักดิ์ ขจรบุญ และพริ้มเพรา เชียวสธนกุล ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจและอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานและสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดาและพี่ชายที่ทั้งคอยให้กำลังใจ เข้าใจ และให้การสนับสนุนทุกด้านจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุภาพร พัฒนะวิริยะศิริกุล

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญรูปภาพ	VII
สารบัญตาราง	XI
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 แคโรทีนอยด์ (Carotenoid)	5
2.1.1 ประวัติการค้นพบแคโรทีนอยด์	5
2.1.2 โครงสร้างและชนิดของแคโรทีนอยด์	6
2.1.3 แหล่งที่พบแคโรทีนอยด์	8
2.1.4 หน้าที่ของแคโรทีนอยด์	14
2.1.5 ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์	15
2.2 *Rhodotorula*	20
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์ *Rhodotorula*	20
2.2.2 วิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	20
2.2.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์	22

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.3 น้ำมะพร้าว	27
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	32
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	32
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี	32
3.3 วิธีการวิจัย	34
3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อและน้ำมะพร้าว	34
3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับฟลาสก์	34
3.3.3 การศึกษาสภาวะการให้อากาศและการกวนในการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวน	36
3.3.4 การศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159	37
3. 4 วิธีการวิเคราะห์	37
3.4.1 การวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง	37
3.4.2 การสกัดแคโรทีนอยด์จากเซลล์ยีสต์	38
3.4.3 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก	39
3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	40
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	41
4.1 ผลชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์	41
4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์	47

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.3 ผลแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์	52
4.4 ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์	57
4.5 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์	63
4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร	70
4.7 ผลการศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์	77
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	81
อ้างอิง	83
ภาคผนวก	92
ภาคผนวก ก	93
ภาคผนวก ข	94
ภาคผนวก ค	96
ภาคผนวก ง	107
ประวัติผู้เขียน	163

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของไลโคพีน (ก) บีตา-แคโรทีน (ข) แอลฟา-แคโรทีน (ค) ซีแซนทีน (ง) ลูทีน (จ)..... 5

2.2 โครงสร้างของโครซีทิน (ก), ไบซิน (ข) และเอปซิลอน, เอปซิลอน-แคโรทีน (ค)... 6

2.3 โครงสร้างไอโซปรีน..... 7

2.4 โครงสร้างของไลโคพีน..... 7

2.5 โครงสร้าง อาร์,อาร์แอสทาแซนทิน (r,r-astaxanthin)..... 8

2.6 วิถีชีวสังเคราะห์จาก acetyl-CoA ถึงบีตา-แคโรทีน, โทรูลีนและโทรูลาโรดีน ใน *Rhodotorula* sp. และแอสทาแซนทินใน *P. rhodozyma/X. dendrorhous*..... 23

4.1 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า 42

4.2 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีซูโครส 15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า..... 42

4.3 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มี กาแลคโตส15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์..... 44

4.4 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มี แลคโตส15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์..... 44

4.5 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มี แมนนิทอล15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์..... 45

4.6 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มี ซูโครส25 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า..... 49

4.7 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มี ซูโครส 35 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงฟลาสก์เขย่า..... 49

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.8 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีซูโครส45 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า..... 50

4.9 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า..... 54

4.10 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรท 5 กรัมต่อลิตร..... 54

4.11 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงฟลาสก์เขย่า..... 55

4.12 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 เป็นระยะเวลา 7 วัน..... 59

4.13 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 เป็นระยะเวลา 7 วัน..... 59

4.14 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า..... 60

4.15 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอช เริ่มต้น 4.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า 65

4.16 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอช เริ่มต้น 5.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า..... 65

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.17 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอช เริ่มต้น 6.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า..... 66

4.18 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 7.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์..... 66

4.19 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที 72

4.20 ปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตรโดยมีอัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที..... 72

4.21 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยมีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 60 73

4.22 ปริมาณออกซิเจนละลายและความเร็วรอบการกวนในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตรโดยมีอัตราการให้อากาศ 5.40 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 240-480 รอบต่อนาที..... 73

4.23 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยมีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 75..... 74

4.24 ปริมาณออกซิเจนละลายและความเร็วรอบการกวนในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตรโดยมีอัตราการให้อากาศ 5.70 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 300-540 รอบต่อนาที..... 74

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.25 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานบีตา-แคโรทีน (ก) และสารสกัดจากเชื้อ *R.glutinis* TISTR 5159 (ข) ที่วิเคราะห์โดยใช้ HPLC..... 78

4.26 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานซีแซนทีน (ก) สารมาตรฐานลูทีน (ข) และสารสกัดจากเชื้อ *R.glutinis* TISTR 5159 (ค) ที่วิเคราะห์โดยใช้ HPLC..... 79

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แหล่งของพืชที่มีบีตา-แคโรทีน บีตา-คริปโตแซนทีน ลูทีน ไลโคพีนและซีแซนทีน โดย ต่ำ = 0-.0.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปานกลาง 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สูง 0.5-2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ สูงมาก >2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม..... 9

2.2 การใช้ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ..... 19

2.3 เปรียบเทียบมวลเซลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Rhodotorula* sp. 20 ที่เจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน..... 21

2.4 แสดงองค์ประกอบของน้ำมะพร้าว..... 28

2.5 ปริมาณสารอนินทรีย์และวิตามินในน้ำมะพร้าว..... 29

2.6 ปริมาณกรดอะมิโนและกรดอินทรีย์ในน้ำมะพร้าว..... 30

4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มี น้ำตาลแตกต่างกัน..... 46

4.2 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลแตกต่างกัน..... 46

4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหาร ที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน..... 51

4.4 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน..... 51

4.5 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหาร ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น แหล่งไนโตรเจน..... 56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.6 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นไนโตรเจน..... 56

4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน..... 61

4.8 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน..... 62

4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 4.0 5.0 6.0 และ 7.0..... 68

4.10 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 4.0 5.0 6.0 และ 7.0..... 68

4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่กำหนดสภาวะแตกต่างกัน 3 แบบ..... 75

4.12 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่กำหนดสภาวะแตกต่างกัน 3 แบบ..... 76

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วย isoprene 8 หน่วย ต่อกันในรูปแบบหัวต่อหางโดยมีอะตอมคาร์บอนมากสุด 40 อะตอม สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามโครงสร้างทางเคมี คือ พวกแคโรทีน ซึ่งโครงสร้างจะประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนและไฮโดรเจน เช่น บีตา-แคโรทีน (β-carotene) หรือไลโคพีน (lycopene) กับกลุ่มที่สองคือ แซนโทฟิลล์ (xantophylls) ภายในโครงสร้างประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน, ไฮโดรเจนและออกซิเจน เช่น ลูทีน (lutein) หรือ ซีแซนทีน (zeozanthin) มีแคโรทีนอยด์มากกว่า 600 ชนิดในธรรมชาติโดยพบได้ทั้งในพืช รา แบคทีเรีย สาหร่าย และสัตว์บางชนิด (Mattea และคณะ, 2009) ปัจจุบันได้มีการนำแคโรทีนอยด์มาใช้เป็นสีผสมอาหารทางการค้าและเป็นแหล่งของรงควัตถุให้กับปลาและหอยที่เลี้ยงในกระชัง ไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบว่าแคโรทีนอยด์เหล่านั้นมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระจึงคาดว่าจะมีการนำแคโรทีนอยด์มาใช้ทางยาและอาหารเสริมกว้างขึ้น (Lee และ Dannert, 2002)

ปัจจุบันนี้มีการตื่นตัวในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น ดังนั้นสารสีที่มาจากธรรมชาติเพื่อใช้สำหรับผสมอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอางค์หรือยา หรืออาหารเสริมสุขภาพจึงได้รับความนิยม การผลิตแคโรทีนอยด์ที่ได้จากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจมากขึ้น โดยแหล่งที่มานั้นมีทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่การผลิตแคโรทีนอยด์จากพืชและสัตว์นั้นต้องการพื้นที่มากสำหรับการเพาะปลูกหรือเพาะเลี้ยง อีกทั้งใช้เวลานานในการเจริญเติบโต ดังนั้นการผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์จึงมีความน่าสนใจมากกว่าเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ ใช้พื้นที่น้อยและระยะเวลาที่สั้นกว่า แคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ประกอบด้วย แบคทีเรีย เช่น *Flavobacterium* และ *Micrococcus* (Nelis และ Enheer, 1991) สาหร่าย เช่น *Dunaliella* และ *Haematococcus* รา เช่น *Blakeslea trispora* (Lampila และคณะ, 1985) และยีสต์ในจีนัส *Phaffia, Rhodotorula* และ *Sporobolomyces* (Simpson และคณะ, 1964; Johnson และ Lewis, 1979 และ Heyman และคณะ, 1974) ปัจจุบันยีสต์ *Rhodotorula* หลายสายพันธุ์ถูกนำมาใช้สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตแคโรทีนอยด์

เนื่องจากสะดวกต่อการขยายขนาดการหมักเพราะเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียวและอัตราการเจริญสูง ใช้ระยะเวลาสั้นในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ เชื้อ *Rhodotorula glutinis* เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถผลิตนิวโรสปอรีน (neurosporene) บีตา-ซีคาโรทีน (β-zeacarotene) แกมมา-แคโรทีน (γ-carotene) บีตา-แคโรทีน (β-carotene) โทรูลีน (torulene) และโทรูลาโรดีน (torularhodin) ได้ (Maldonade และคณะ, 2007) อย่างไรการผลิตในระดับอุตสาหกรรมยังคงต้องการลดต้นทุนในการผลิต งานวิจัยบางส่วนจึงมีแนวทางเพื่อศึกษาการนำวัตถุดิบเหลือทิ้งมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์ จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *Rhodotorula glutinis* สามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรและวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรได้หลายชนิด อาทิ การใช้น้ำหางนม (whey) (Frengova และคณะ, 1994) น้ำอ้อย (sugar cane juice) (Florencio และคณะ, 1998) ถ่านหินที่ผ่านการย่อย (peat hydrolysate) (Vazquez และ Martin, 1998) น้ำองุ่นหมัก (grspe must) (Buzzini, 2000) น้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) (Buzzini, 2001) และกากน้ำตาลอ้อย (sugar cane molasses) (Bhosale และ Gadre, 2001) เป็นต้น การศึกษาการใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งเพื่อเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจเนื่องจากสามารถนำไปใช้เพื่อช่วยลดต้นทุนด้านวัตถุดิบและช่วยลดปริมาณของเสียที่จะทิ้งได้

เนื่องจากประเทศไทยมีการส่งออกมะพร้าวเป็นอันดับ 6 ของโลก โดยข้อมูลจากสหประชาชาติในปี ค.ศ. 2008 ได้ระบุว่าประเทศไทยมีการส่งออกมะพร้าวประมาณ 1.72 ล้านตัน ซึ่งข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรและศูนย์สารสนเทศ กระทรวงพาณิชย์ ได้ระบุว่าประเทศไทยมีการนำเข้าและส่งออกมะพร้าวทั้งลูกในปี พ.ศ. 2552 จำนวน 30,263 ตัน โดยมะพร้าวหนึ่งลูกนั้นจะมีน้ำมะพร้าวประมาณ 0.5 ลิตร ฉะนั้นจะมีน้ำมะพร้าวเหลือทิ้งประมาณ 60,526,000 ลิตรต่อปี จากการศึกษาของ Yong (2009) ได้วิเคราะห์ไว้ว่าน้ำมะพร้าวแก่จะมีส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ น้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็กและวิตามินซี Sujarit และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตแอสทาแซนทินจากเชื้อ *Phaffia rhodozyma* โดยใช้น้ำมะพร้าวร่วมกับการเติมกรดซิตริกลงไป พบว่าสามารถผลิตแอสทาแซนทินภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาได้ 753 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ฉะนั้นน้ำมะพร้าวจึงเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำน้ำมะพร้าวมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยการวิจัยมีการศึกษาชนิดของน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและผลิตแคโรทีนอยด์ในการเลี้ยง

แบบฟลาสก์เขย่าเมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมจึงนำมาขยายขนาดและเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยศึกษาสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมระหว่างการเพาะเลี้ยง

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1. เพื่อศึกษาชนิดของน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยมีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

1.2.2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร

1.2.3 เพื่อศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ที่เชื้อ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ผลิตได้

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ในระดับฟลาสก์ด้วยอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ

1.3.1.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

1.3.1.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

1.3.1.3 ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

1.3.2 การศึกษาสภาวะการให้อากาศและการกวนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดลอง

1.3.3 การศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์โดยการใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ

1.4.2 สามารถใช้เป็นข้อมูลในการขยายขนาดการผลิตจากระดับฟลาสก์เป็นระดับถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร

1.4.3 สามารถนำของเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงการผลิตแคโรทีนอยด์จาก *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ต่อไป

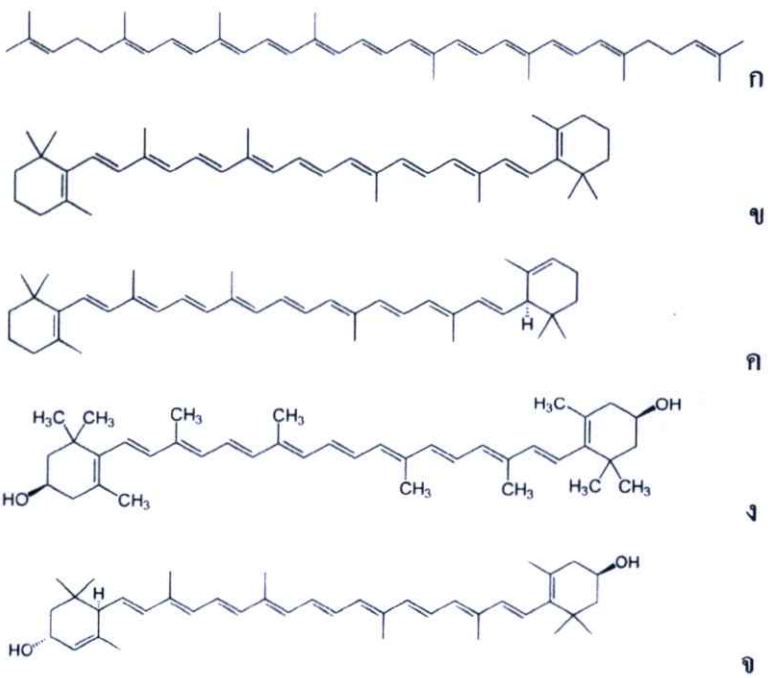
บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 แคโรทีนอยด์ (Carotenoid)

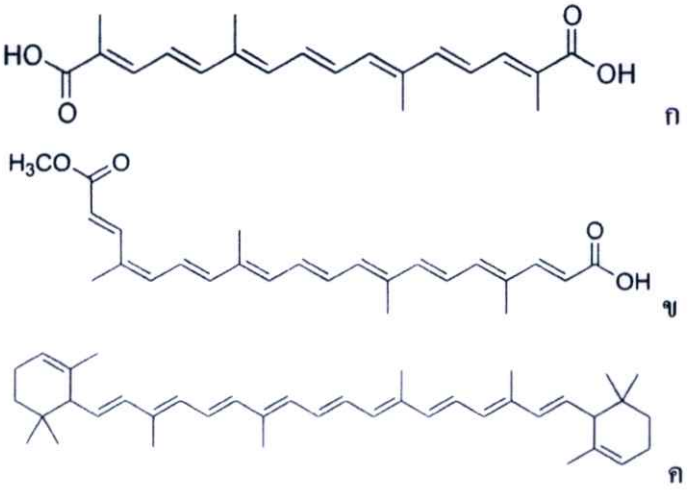
2.1.1 ประวัติการค้นพบแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์จัดเป็นรงควัตถุจากธรรมชาติที่เป็นที่รู้จักกันดีมากที่สุดชนิดหนึ่ง โดยมีการศึกษามาตั้งแต่ก่อนศตวรรษที่ 19 มีชื่อเรียกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของมัน ในปี ค.ศ. 1907 Willstatter และ Mieg ศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ โดยสารสีชนิดแรกที่หาสูตรโครงสร้างได้คือ แคโรทีน (carotene, $C_{40}H_{56}$) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll, $C_{40}H_{56}O_2$) ที่แยกได้จากใบไม้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1930 มีการรายงานเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ เช่น ไลโคพีน (lycopene), บีตา-แคโรทีน (β-carotene), แอลฟา-แคโรทีน (α-carotene), ซีแซนทีน (zeaxanthin) และลูทีน (lutein) ดังภาพที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไลโคพีน (ก) บีตา-แคโรทีน (ข) แอลฟา-แคโรทีน (ค) ซีแซนทีน (ง) ลูทีน (จ)
ที่มา: Eugster และคณะ (1967)

และในปีเดียวกันได้มีรายงานเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์เพิ่มเติมอีก 3 ชนิด คือ โครซีติน (crocetin,$C_{20}H_{24}O_4$), ไบซิน (bixin) และเอปซิลอน เอปซิลอน-แคโรทีน (ε,ε –Carotene) ดังที่แสดงในภาพที่ 2.2



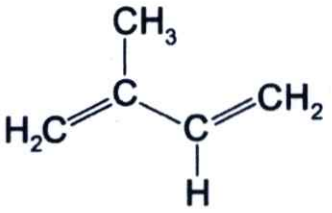
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของโครซีทิน (ก) ไบซิน (ข) และเอปซิลอน, เอปซิลอน-แคโรทีน (ค)

ที่มา: Eugster และคณะ (1967)

หลังจากนั้นได้มีการศึกษาและรายงานเกี่ยวกับโครงสร้างของแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในปี ค.ศ. 1971 มีรายงานโครงสร้างแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นมากถึง 230 ชนิด ต่อมาในปี 1987 จำนวนโครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์เพิ่มจำนวนขึ้นมาประมาณ 450 ชนิด และในปี 1993 ได้มีรายงานว่าแคโรทีนอยด์มีมากกว่า 600 โครงสร้างและมีแนวโน้มที่จะมากขึ้นอีกในอนาคต

2.1.2 โครงสร้างและชนิดของแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม C_{40} tetraterpenoids ประกอบด้วย isoprene 8 หน่วย ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอมต่อกันเป็นสายคาร์บอนที่มีพันธะคู่และเดี่ยวสลับกันแต่ต่างกันที่ปลายสุดของสายคาร์บอน (รูปที่ 2.3) สมบัติการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของ conjugated double bonds ที่ทำหน้าที่เสมือนโครโมฟอร์ (chromophore) ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด แคโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอนน้อยหรือมากกว่า 40 คาร์บอนนั้น อาจอยู่ในรูปสายยาว (acyclic) เช่น ไลโคพีน หรือ วงกลม (cyclic) เช่น บีตา-แคโรทีน และมีการจัดเรียงพันธะคู่แบบซิสและทรานส์ (cis, trans configuration) หรือเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (oxygenation) ซึ่งทำให้สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่



รูปที่ 2.3 โครงสร้างไอโซปรีน

ที่มา: Freeman และ Beattie (2008)

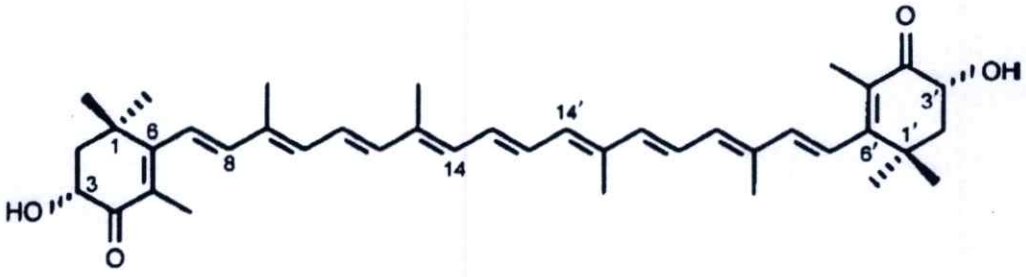
1. แคโรทีน เป็นโมเลกุลของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene โดยคาร์บอนจะเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเดี่ยวสลับพันธะคู่และที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างจะมีอะตอมของคาร์บอนมาเกาะกันเป็นวง เรียกว่า วงแหวนไอโอโนน (Ionone ring) ตัวอย่างเช่น บีตา-แคโรทีน แอลฟา-แคโรทีน และไลโคพีน (รูปที่ 2.4) เป็นต้น บีตาแคโรทีนพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารแต่งสีอาหารจำพวกเนย เครื่องดื่มและเป็นอาหารเสริม ทำให้สีของเนื้อสัตว์เข้มขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระของบีตา-แคโรทีนทำให้สารนี้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ บีตา-แคโรทีนยังมีส่วนในการป้องกันโรคมะเร็งอีกด้วย (Britton, 1983)

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของไลโคพีน

ที่มา: Bunghez และคณะ (2011)

2. แซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่มีโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและมีการเพิ่มอนุพันธ์ของออกซิเจนเป็นองค์ประกอบด้วย เช่น คีโตน ไฮดรอกซี อัลดีไฮด์ คาร์บอกซี หรืออีพอกไซด์ ตัวอย่างเช่น แคนทาแซนทีน (Canthaxanthin) แอสตาแซนทิน (astaxanthin) (รูปที่ 2.5) เป็นต้น เป็นสารประกอบที่เกิดจากการเติมออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุลของแคโรทีน สามารถเข้าไปสะสมในส่วนต่างๆ ของร่างกายสัตว์ปีกได้ เช่น นกและไก่มีความสามารถที่จะสะสมแคโรทีนอยด์ได้

มากในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ผิวหนัง ขนนก เนื้อเยื่อไขมันและไข่แดง (Durrer และคณะ, 2004) ซึ่งจะให้สีตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีแดงอมส้ม



รูปที่ 2.5 โครงสร้าง อาร์,อาร์แอสทาแซนทิน

ที่มา: Christian และคณะ (2005)

2.1.3 แหล่งที่พบแคโรทีนอยด์

2.1.3.1 พืช

แคโรทีนอยด์ที่พบในเนื้อเยื่อพืชสีเขียวทั้งหมดไม่ใช่แค่ใบเท่านั้น ยังรวมถึงลำต้น ผลไม้สีเขียวและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วและถั่วเขียว เพราะคลอโรฟิลล์มีอยู่ในโครงสร้างสังเคราะห์-แสงคลอโรพลาสต์ คลอโรฟิลล์ประกอบด้วยโปรตีนรงควัตถุ (pigment-protein complex) ของกระบวนการสังเคราะห์แสง 1 และ 2 ที่ประกอบด้วยแคโรทีนอยด์ องค์ประกอบแคโรทีนอยด์ของคลอโรพลาสต์พืชมีในปริมาณคงที่ซึ่งองค์ประกอบหลักที่พบได้แก่ บีตา-แคโรทีน ร้อยละ 25-30 ลูทีน ร้อยละ 45-50 วิโอลาแซนทิน (violaxanthin) ร้อยละ 15 และนีโอแซนทิน (neoxanthin) ร้อยละ 15 (Britton และ Khachik, 2009) ส่วนคีโตแคโรทีนอยด์บางชนิด (ketocarotenoid) เช่น โรโดแซนทิน (rhodoxanthin) จะพบในพวกพืชเมล็ดเปลือยและปรง จะไม่ปรากฏในคลอโรพลาสต์แต่จะมีในพลาสติดที่เป็นหยดน้ำมัน (Johnson และ Schroeder, 1995)

ตารางที่ 2.1 แหล่งของพืชที่มีบีตา-แคโรทีน บีตา-คริปโตแซนทีน ลูทีน ไลโคพีนและซีแซนทีน โดย ต่ำ = 0-.0.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปานกลาง 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สูง 0.5-2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ สูงมาก >2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

แคโรทีนอยด์	พืช	ส่วนประกอบ
บีตา-แคโรทีน	แอพริคอท	สูง-สูงมาก
	บรอคโคลิ	สูมาก
	แครอท	สูงมาก
	เกรปฟรุ๊ต	ต่ำ-ปานกลาง
	ผักใบเขียว	ปานกลาง-สูงมาก
ไลโคพีน	แอพริคอท	ต่ำ
	แครอท	สูง
	แตงโม	สูง-สูงมาก
ซีแซนทีน	พริก	สูงมาก
	พลับ	ปานกลาง
	ข้าวโพดหวาน	ปานกลาง
ลูทีน	บรอคโคลิ	สูงมาก
	ผักใบเขียว	สูงมาก
	พริก	สูงมาก
	ฟักทอง	ปานกลาง-สูงมาก
บีตา-คริปโทแซนทีน	มะละกอ	ปานกลาง-สูง
	พริก	ปานกลาง
	พลับ	สูง

ที่มา: Britton และ Khachik (2009)

2.1.3.2 แบคทีเรีย

สารสีแคโรทีนอยด์ที่พบในแบคทีเรียมี 2 กลุ่มคือ เป็นกลุ่มการเกิดแคโรทีนอยด์ในสภาพอาศัยสารอาหารเคมีชีวภาพ (chemoorganotropic carotenogenesis) และสภาพสังเคราะห์แสง (photosynthetic carotenogenesis) เช่น ในเชื้อ *Sarcina litoratis, Cellulomonas dehydrogenans, Halobacterium cutirubrum, Brevibacterium* สร้างแคนทาแซนทิน ขณะที่ *Flavobacterium* สร้างซีแซนทิน (Ben-Amotz และ Avron, 1983)

จากการศึกษาของ Tang และคณะ (2007) โดยการทำกลายพันธุ์ให้กับเชื้อพบว่าสามารถผลิตแคนทาแซนทินได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในเชื้อ *E. coli* เมื่อเทียบกับยีนเริ่มต้นผลิตแคนทาแซนทินได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ และแคนทาแซนทินที่ผลิตโดยเชื้อ *Methylomonas* เมื่อมียีนกลายพันธุ์จะผลิตแคนทาแซนทินดีขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์

Khodaiyan และคณะ (2007) ได้ศึกษาสภาวะการผลิตแคนทาแซนทินจากเชื้อ *Dietzia natronolimnaea* HS-1 จากน้ำหางนมชีส (cheese whey) โดยได้ศึกษาทั้งหมด 6 ปัจจัย คือ พีเอช ความเข้มแสง เปอร์เซ็นต์เชื้อ ความเข้มข้นน้ำตาลแลคโตสในน้ำหางนม ยีสต์สกัด และโพแทสเซียม-ฟอสเฟต (KH_2PO_4) พบว่ามี 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและสภาวะที่เหมาะสมของทั้ง 3 ปัจจัยนั้นได้แก่ พีเอช 7.66, ความเข้มข้นแลคโตสจากหางนม 55.54 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 7.36 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคนทาแซนทินสูงสุด 2871 ± 76 ไมโครกรัมต่อลิตร

2.1.3.3 สาหร่าย

ในสาหร่ายมีสารแคโรทีนอยด์มากมาย (Goodwin, 1980) พบในสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyceae) ในรูปของบีตาแคโรทีน ลูทีนและอีพอคซี-แคโรทีนอยด์ (epoxy-carotenoids) เหมือนที่พบในพืชชั้นสูงโดยจะเห็นเป็นสีส้มหรือสีแดง ส่วนในสาหร่ายกลุ่ม Rhodophyceae มีสารแคโรทีนอยด์ใกล้เคียงกับที่พบในกลุ่ม Chlorophyceae แต่จะมีสารแซนโทฟิลล์ เช่น ไดโทแซนทิน (diatoxanthine) อยู่ด้วย ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) สร้างสารบีตา-แคโรทีน เอคไคนีโนน (echinenone) ซีแซนทินและแคนทาแซนทิน และพบว่ามีการสร้างแรมโนไซด์ แคโรที-นอยด์ (rhamnoside carotenoid) ที่ไม่ธรรมดา เช่น ไมโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophylls) อีกด้วย

มีรายงานกล่าวถึงสาหร่ายเซลล์เดียว *Scenedesmus obliquus* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เก็บไว้ในที่มืดจะพบแต่สารเริ่มต้น เช่น แกมมา-แคโรทีน นิวโรสปอรีน (neurosporene), ไลโคพีน และบีตา-ซีคาโรทีน (β-zeacarotene) โดยไม่สร้างแอลฟาหรือบีตา-แคโรทีนและแซนโทฟิลล์ แต่เมื่อเปลี่ยนไปให้แสงพบว่าสารเริ่มต้นลดลง แต่พบสารแคโรทีนอยด์สุดท้ายโดยการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซิส-ทรานซิสโซเมอร์เรส (cis-transisomerase) และไซเคลส (cyclase) ในส่วนผิวเมมเบรน (cytoplasmic membrane) (บุษบา, 2542) และยังมีการศึกษาเพื่อสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายอีกมากมายตามมา

ปรียาภรณ์ (2538) ได้ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลินาโดยวิธีการเลี้ยงแบบต่างๆ จากการสำรวจและคัดแยกสาหร่ายสไปรูลินาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ พบสาหร่ายสไปรูลินาบริเวณคลองเลียบสนามม้านางเลิ้ง เขตดุสิต กรุงเทพฯ จากการศึกษาการเจริญเติบโต โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร Zarrouk ในห้องปฏิบัติการ 24 วัน พบว่า สาหร่ายสไปรูลินามีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.285 วัน$^{-1}$ และอัตราการแบ่งตัวเท่ากับ 2.432 วัน จากการศึกษาวิธีการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาที่มีผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์พบว่า วิธีที่ 2 (เลี้ยงในอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร) ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุด คือ 2.0 มิลลิกรัมแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์ รองลงมาคือวิธีที่ 1 (เลี้ยงในอาหารเหลวในหลอดทดลอง) วิธีที่ 3 (เลี้ยงในทรายบริสุทธิ์) วิธีที่ 4 (เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ) และวิธีที่ 5 (เลี้ยงในหลอดวุ้นเอียง) ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 1.486 1.31 , 0.856 และ 0.79 มิลลิกรัมแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ

Harker และคณะ (1996) ได้ศึกษาการเจริญจากการสังเคราะห์อาหารเอง (autotrophic growth) และการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *Haematococcus pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ใบพัดกวนแบบมีแสงขนาด 30 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 2 ระยะ คือ ที่สภาวะธรรมดาก่อนและหลัง จากนั้นเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไป ระหว่างขั้นตอนแรกสภาวะที่ใช้ คือ จะรักษาระดับของความเข้มแสง, ระดับไนโตรเจนและฟอสเฟตให้อยู่ในอัตราสูงที่สาหร่ายเจริญเติบโตได้ จากนั้นเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่จึงค่อยเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไป ทำให้สาหร่ายมีแอสทาแซนทินเพิ่มขึ้น 95 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์มีการสะสมแอสทาแซนทินเพิ่มสูงขึ้น 2.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Yuan และคณะ (2002) ได้ศึกษาส่วนประกอบแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorococcum* ส่วนประกอบแคโรทีนอยด์ที่อยู่ในเซลล์ของสาหร่ายที่ผลิตคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid-producing alga) จะพบสารบีตา-แคโรทีน ลูทีนและซิสไอโซเมอร์ของคีโตแคโรทีนอยด์บางชนิด เซลล์ของสาหร่าย *Chlorococcum* สามารถผลิตคีโตแคโรทีนอยด์เอสเทอร์ได้ปริมาณมากเหมือนกับสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เอสเทอร์ของแอสทาแซนทิน (astaxanthin) และอะโดนิแซนทิน (adonixanthin) และแคนทาแซนทินอิสระเป็นแคโรทีนอยด์หลักในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* ในขณะที่แคนทาแซนทินเป็นแคโรทีนอยด์หลักของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เพียงชนิดเดียว สาหร่าย *Chlorococcum* อาจจะสังเคราะห์แอสทาแซนทินจากบีตา-แคโรทีนผ่านทางแคนทาแซนทินและอะโดนิแซนทินในแนวขนานตามลำดับที่ซึ่งควบคุมได้โดยสภาวะการเพาะเลี้ยง

2.1.3.4 ราและยีสต์

เชื้อราที่สร้างแคโรทีน (carotenogenic fungi) มีมากมายหลายชนิดโดยเฉพาะ Order Mucorales จะเห็นการเจริญและสร้างสารสีในเส้นใยและก้านชูสปอร์บนอาหารแข็งหรือในอาหารเหลว ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าของ *Phycomyces blakesleeanus* (วงศ์ Mucoraceae) และ *Blakeslea trispora* (วงศ์ Cnoanopheraceae) นอกจากนั้นก็ยังมี *Mucor mucedo, Ustilago violacea, Neurospora crassa* และ *Fusarium aquaeductum* และยีสต์ เช่น *Rhodotorula glutinis* (บุษบา, 2542) แซนโทฟิลล์เป็นแคโรทีนอยด์รูปหนึ่งที่พบในเชื้อราและยีสต์ Fiasson และคณะ (1970) เป็นกลุ่มแรกที่ได้จำแนกแซนโทฟิลล์ และแคนทาแซนทินในเห็ดสปีชีส์ *Can:harellus cinnabarinus* สารแซนโทฟิลล์ในเชื้อรามีจำกัด ในขณะที่กลุ่มยีสต์จะพบสารนี้มากกว่า เช่น พบในเชื้อยีสต์กลุ่ม Rhodotorulae สร้างสารโทรูลาโรดิน (torularhodin) ในขณะที่ยีสต์ในคลาส Basidiomycetes คือ *Phaffia rhodozyma* พบว่ามีสารแอสทาแซนทินซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ปฐมภูมิ (primary carotenoids) (Andrews และคณะ, 1976) แคโรทีนอยด์ที่พบได้ในราและยีสต์ เช่น แอสทาแซนทิน บีตา-แคโรทีน โทรูลีน โทรูลาโรดิน ซึ่งทราบได้จากการศึกษาของนักวิจัยหลายคน

Chumpolkulwong และคณะ (1997) ศึกษาการเพิ่มแอสทาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* สายพันธุ์กลายที่คัดแยกมาจากเชื้อที่ต้านต่อยาไดฟีนิลามีน (diphenylamine) การส่งเสริมการผลิตแอสทาแซนทินโดยเชื้อ *Phaffia rhodozyma* โดยคัดเลือกเชื้อที่ผลิตแอสทาแซนทินสูงที่มาจาก

การต้านการยับยั้งกระบวนการชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ โดยเชื้อสายพันธุ์ปรกติจะมีสีชมพูเนื่องจากภายในเซลล์มีการสะสมแอสทาแซนทิน แต่โคโลนีมีการเปลี่ยนกลับไปเป็นสีขาวเมื่อเจริญในอาหารที่มีการยับยั้งกระบวนการชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ระหว่างการทดสอบสารประกอบยาไดฟีนิลามีน (DPA) เป็นตัวที่ใช้ในการคัดเลือกการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพที่สุดโดยไม่มีผลต่อจำนวนและขนาดการทำให้กลายพันธุ์และการคัดเลือกจะเลือกเชื้อที่ต้านยาไดฟีนิลามีนซึ่งจะมีสีชมพูเจริญบนจานเพาะเชื้อที่เติมไดฟีนิลามีนและเชื้อกลายพันธุ์ที่ต้านยาฟีนิลามีนนี้จะสามารถผลิตแอสทาแซนทินได้มากขึ้น 2 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปรกติ

Parajo และคณะ (1997) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Phaffia rhodozyma* ที่เจริญในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลส (xylose) เป็นแหล่งคาร์บอนและมีสารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท หรือโพแทสเซียมไนเตรท ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรขึ้นไป แล้วเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยพบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมไนเตรท 0.2 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสทาแซนทิน 4.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองโดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของไซโลส ยีสต์สกัด มอลท์สกัด และเปปโตน และแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ที่เหมาะสมจะทำให้ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 5.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Aksu และ Eren (2005) ได้ทำการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula mucilaginosa* โดยศึกษาผลกระทบของพีเอช อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ น้ำตาลเริ่มต้น ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและตัวกระตุ้น ได้แก่ น้ำมันเมล็ดฝ้ายและ Tween 80 เพิ่มเติมลงไป พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผลิตแคโรทีนอยด์คือ 7.0 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แคโรทีนอยด์ทั้งหมดและผลได้แคโรทีนอยด์ (production yield) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 2.4 วีวีเอ็ม แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นใช้ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร จึงจะให้แคโรทีนอยด์สูงสุด น้ำมันเมล็ดฝ้ายช่วยส่งเสริมการผลิตแคโรทีนอยด์โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสน้อยลง แหล่งคาร์บอนที่เลือกนำมาศึกษา คือ น้ำตาลกลูโคส กากน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลแลคโตสจากหางนมโดยให้ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์สูงสุด 89 มิลลิกรัมต่อลิตรของน้ำหมัก เมื่อใช้กากน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ขณะที่ได้ผลิตได้สูงสุด 35 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสจากหางนม 13.2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร

Liu และ Wu (2007) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเซลล์และการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ผ่านแบบจำลองทางสถิติ โดยมี 7 ปัจจัย คือ พีเอชและส่วนประกอบของอาหารที่เพาะเลี้ยงอีก 6 ปัจจัย วิเคราะห์ด้วย Plackett-Burman design พบว่ากลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต และพีเอช เป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทั้งต่อการเจริญของเซลล์และชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์ ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยเหล่านี้พบว่าปริมาณกลูโคส 34.3 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2.95 กรัมต่อลิตร และพีเอช 5.85 เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ และกลูโคส 19.3 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.81 กรัมต่อลิตร และพีเอช 5.19 เหมาะสมต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์

2.1.4 หน้าที่ของแคโรทีนอยด์

สารแคโรทีนอยด์พบมากในพืชสังเคราะห์แสง จุลินทรีย์ในกลุ่มพวกเชื้อราและแบคทีเรียสังเคราะห์แสง บทบาทโดยทั่วไปของแคโรทีนอยด์ คือ ป้องกันการถูกทำลายของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยแสง (lethal photo-oxidation) (Blum, 1941) โดยเฉพาะความเสียหายที่เกิดจากการแผ่รังสีของคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (visible light)

Griffiths และคณะ (1955) ได้รายงานการทำงานของกลุ่มนักวิจัยที่ได้วิจัยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจำพวก non-sulphur bacteria เช่น *Rhodopseudomonas spheroids* ที่ถูกทำให้เชื้อกลายพันธุ์ไม่มีสารสีแคโรทีนอยด์ (blue-green mutant) แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งจะสะสมเฉพาะสารไฟโทอีนที่ไม่มีสี ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ใช้ไฟโทอีนเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ที่ดึงหมู่ไฮโดรเจนออกไปทำให้เกิดสีแคโรทีนอยด์ได้ เมื่อเลี้ยง *R. spheroids* ในสภาพมีอากาศและมีแสงพบว่าเชื้อมีการเจริญปกติ แต่เกิดการยับยั้งการสร้างสารสีทั้งแบคเทอริโอฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ ในขณะที่สายพันธุ์กลาย blue-green mutant มีการเจริญปกติในสภาพขาดอากาศแต่มีแสง หรือมีอากาศแต่ไม่มีแสง (มืด) แต่ถ้าเลี้ยงในสภาพมีอากาศและมีแสง พบว่าการเจริญลดลงทันที มีการตายเกิดขึ้นซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยา photodynamic action ซึ่งเป็นผลกระทบเนื่องจากแสงและอากาศร่วมกัน ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า แคโรทีนอยด์ทำหน้าที่ในการป้องกันการทำลายของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยแสง

นอกจากนี้การทดลองของ Goldstrohm และ Lily (1965) ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่ต้องการแสงในการสร้างสี (photochromogenic fungus) เช่น *Dacryopinax spathularia* เมื่อเจริญในที่มืดจะไม่สร้างสี แต่เมื่อได้รับแสงแดด (2,000-70,000 fe) นาน 2 ชั่วโมง เชื้อราเหล่านี้ตายไปกว่า 89 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่เลี้ยงในสภาพที่มีแสงและเกิดสีแต่แรกจะรอดชีวิตและเจริญได้ทั้งหมด

และจากการทดลองของ Bendix และ Allen (1962) พบผลของ photodynamic effect ต่อสาหร่ายสกุล *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardii* และ *C. pyrenoidosa* โดยพบว่าสายพันธุ์กลายที่ไม่สร้างสีจะไวต่อแสงมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่

2.1.5 ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์

2.1.5.1 อุตสาหกรรมอาหาร

ใช้เป็นสีผสมอาหาร (food colorant) โดยเฉพาะสารบีตา-แคโรทีนจะใช้ผสมในอาหารประเภทไขมันต่างๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาร์การีน นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เช่น น้ำส้ม อุตสาหกรรมเบเกอรี่ เช่น ขนมปัง คุกกี้ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ลูกอม เป็นต้น (Britton และคณะ, 2009)

การใช้เป็นอาหารสัตว์จะใช้ชีวมวลโดยตรงเติมลงไปเป็นส่วนผสมของอาหารไม่จำเป็นต้องนำไปสกัดแยกแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดออกมา ซึ่งส่วนมากจะนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารปลาหลายชนิด เช่น ปลาแซลมอล ปลาเทราท์ รวมไปถึงสัตว์จำพวกกุ้ง กั้งและปูต่างๆ นอกจากนี้ยังนำไปเป็นส่วนประกอบของอาหารสุกร รวมไปถึงอาหารสำหรับสัตว์ปีกอีกด้วย ตามธรรมชาติสัตว์เหล่านี้จะได้รับรงควัตถุเหล่านี้จากอาหารที่มีอยู่จำกัด ทำให้สีของเนื้อผลิตภัณฑ์มีสีสันจืดจางไม่สวยงามและขายได้ในราคาต่ำ ดังนั้น สารแคโรทีนอยด์ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อ ไข่ มีสีสันสวยงามทำให้มีราคาสูงขึ้นและเป็นที่ต้องการในท้องตลาดจึงเป็นที่นิยมของผู้เพาะเลี้ยง

แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) และแอสทาแซนทินใช้มากในแวดวงเทคโนโลยีชีวภาพของเม็ดสี (pigment biotechnology) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จำพวกไข่ไก่ซึ่งเป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าไข่ที่เลี้ยงในฟาร์มเกษตรกรทั่วไปเมื่อได้รับอาหารพวกพืชพอเพียง เช่น ข้าวโพดที่สมบูรณ์ด้วยแซนโทฟิลล์ ชื่อ คริปโทแซนทิน (cryptoxanthin) ซีแซนทิน (zeaxanthin)

และลูทีนก็จะให้ไข่แดงมีสีสวยรวมทั้งหนังและลำตัวไก่ด้วย แต่เมื่อมีการขยายการเลี้ยงไก่ใหญ่ขึ้นเป็นจำนวนมากมายมหาศาล สูตรอาหารเปลี่ยนไปเพื่อความประหยัด เป็นพวกข้าวฟ่าง ข้าวสาลี หรือข้าวบาร์เลย์แทนเป็นผลให้ไข่แดงหรือหนังไก่สีไม่สวย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสนใจที่จะมีการผลิตแซนโทฟิลส์จากจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมนี้ (บุษบา, 2542) มีการค้นพบโดย Braeunlich (1978) พบว่าแซนโทฟิลส์สามารถดูดซึมในไข่แดงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสารแคโรทีนอยด์อื่นๆ ที่ปกติเมื่อสัตว์กินเข้าไปก็จะเปลี่ยนไปเป็นวิตามินเอในส่วนของลำไส้มากกว่าจะไปสะสมในไข่แดงและยิ่งกว่านั้น Braeunlich ยังรายงานเพิ่มเติมอีกว่า dihydroxy หรือ diketoxanthophylls ดีกว่า monohydroxy, monoketo หรือ epoxycarotenoids ในการทำให้ไข่แดงสีสวย Margalith และ Meydev (1968) ใช้ยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* ในรูปผงแห้งโดยวิธีสเปรย์มาผสมในอาหารสัตว์เข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้ไข่แดงสีสวย Johnson และคณะ (1980) ใช้ *Phaffia rhodozyma* ที่สร้างแอสทาแซนทินสำหรับเพิ่มสีให้ไก่ไข่และไก่พันธุ์ Japanese quail หรือไก่กระทง โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกทำให้แตกมาผสมกับข้าวโพดเหลืองหรือดอกดาวเรือง

2.1.5.2 เป็นสารตั้งต้นวิตามินเอ (Provitamin A)

วิตามินเอ เป็นส่วนประกอบสำคัญของคอร์เนีย และยังมีผลต่อการเจริญเติบโต การสร้างกระดูกและระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังป้องกันการติดเชื้อระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ และระบบขับปัสสาวะ ทำให้ผิวและผมแข็งแรง วิตามินเอ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. อยู่ในรูปแบบวิตามินอยู่แล้ว (Proformed Vitamin A) หรือเรียกว่า Retinol ซึ่งได้มาจากเนื้อสัตว์ เช่น น้ำมันตับปลา
2. กำลังจะเป็นวิตามินเอ (Provitamin A) เป็นสารที่เมื่อเข้าสู่รางกายจึงได้รับการเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ พบมากในผักสีต่างๆ เช่น แครอท ผักโขม

สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์บางชนิด เช่น บีตา-แคโรทีน คริปโตแซนทีนและลูทีนมีคุณสมบัติเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (Provitamin A) โดยโมเลกุลของบีตา-แคโรทีนจะถูกตัดตรงกลางด้วยเอนไซม์ β- carotene 15, 15'-oxyganse วิตามินเอหรือสารตั้งต้นวิตามินเอนั้นร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้จึงมีการนำสารพวกบีตา-แคโรทีน ลูทีนและซีแซนทินมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโดยเฉพาะลูทีนนั้นมีการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหลายยี่ห้อด้วยกัน เนื่องจากพบว่าภายใน จอประสาทตาของคนเรามีร่องเล็กๆ อยู่จุดหนึ่งที่มีเซลล์รับภาพจอประสาทตา ซึ่งเป็นจุดที่แสง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตกกระทบและทำให้คนเราสามารถมองเห็นภาพที่ชัดเจนในแต่ละวัน ซึ่งบริเวณเซลล์รับภาพนี้มีสารสีเหลืองหรือลูทีนอยู่หนาแน่นมากที่สุด โดยจะพบได้ตรงชั้นเนื้อเยื่อที่หล่อเลี้ยงเส้นประสาท ซึ่งจุดดังกล่าวเป็นจุดที่สำคัญมากต่อการมองเห็น หากบริเวณดังกล่าวเสื่อมหรือเสียไปอาจทำให้สูญเสียการมองเห็นหรือตาบอดได้ โดยสารลูทีนในเซลล์รับภาพของจอประสาทตานี้ จะทำหน้าที่สำคัญ คือ คอยกรองแสงสีฟ้า ซึ่งเป็นอันตรายต่อจอประสาทตาและเป็นแสงที่หลีกเลี่ยงได้ยากเพราะมีอยู่ทั่วไปรอบๆ ตัวเรา พบได้ทั้งแสงจากดวงอาทิตย์ แสงจากโทรทัศน์ แสงจากจอคอมพิวเตอร์ แสงจากหลอดไฟ เป็นต้น นอกจากนี้ ลูทีนยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในดวงตาของคนเราอีกด้วย เพราะดวงตาของเราจะมีสารอนุมูลอิสระอยู่เป็นจำนวนมากซึ่งจะเป็นตัวทำลายเซลล์รับภาพและทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับจอประสาทตาทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ได้ ลูทีนจึงถือเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญในการปกป้องจอประสาทตา โดยลูทีนจะทำงานร่วมกันกับกรดไขมันดีเอชเอและเอเอซึ่งมีส่วนช่วยในการเสริมสร้างพัฒนาการด้านการมองเห็นของเด็ก โดยดีเอชเอและเอเอจะทำหน้าที่เหมือนเป็นหลอดไฟ ส่วนลูทีนจะทำหน้าที่เหมือนเป็นสารเคลือบหลอดไฟไม่ให้เสื่อมเร็ว และนอกจากลูทีนจะพบมากในดวงตาของคนเราแล้ว ยังพบได้ในสมองในส่วนที่เกี่ยวกับการมองเห็นถึง ร้อยละ 66 จึงเชื่อว่าลูทีนมีส่วนช่วยในการรับภาพและส่งต่อไปยังสมองได้ดีขึ้นอีกด้วย (สรายุทธ, 2552)

2.1.5.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

อนุมูลอิสระ (radical หรือ free radical) หมายถึง สารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอมหรือโมเลกุล โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะเวลามีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิล อยู่เป็นจำนวนน้อยๆ มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และร่างกายก็จะมีระบบของการต้านอนุมูลอิสระขจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้ออกไป แต่ถ้าร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป เช่น ได้รับจากอาหารบางชนิดจากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูงๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเลต การแผ่รังสี (radiation) รังสี x-ray หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถของระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายจะขจัดหมด หรือในภาวะที่จำนวนสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง เช่น ผู้สูงอายุ ก็จะทำให้มีสารอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดเจนเพอออกไซด์โดยรวมเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) มากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายได้ อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะ low density lipoprotein) โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม

123715

ดีเอ็นเอและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะไม่กล่าวถึงรายละเอียดในที่นี้ ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด Alzheimer's disease หรือโรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่ เป็นต้น สารแคโรทีนอยด์ ได้แก่ บีตา-แคโรทีน แอสตาแซนทิน ไลโคปีน เป็นต้น มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารแคโรทีนอยด์จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเนื้องอกและใช้เป็นสารป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดการขยายตัวของก้อนมะเร็งในปอดและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในการต้านมะเร็ง บีตา-แคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ มีบทบาทสำคัญในการรักษาสุขภาพและเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง ทั้งนี้โดยปกติร่างกายของมนุษย์เราสามารถเปลี่ยนบีตา-แคโรทีนไปเป็นวิตามินเอได้ตามปริมาณที่ร่างกายต้องการ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เสมือนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย โดยบีตา-แคโรทีนจะทำปฏิกิริยาต้านการสลายออกซิเจนระหว่างอนุมูลอิสระกับสารสำคัญในเซลล์ที่มีชีวิต โดยจะเข้าไปแย่งทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้วขับถ่ายออกไปตามระบบขับถ่ายต่างๆ ของร่างกาย เซลล์ในร่างกายจึงไม่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระดังกล่าว (บุษบา, 2542)

แคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ มีการนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน ทั้งในรูปของสารให้สี วิตามิน สารถนอมอาหารและใช้เป็นยา ดังสรุปในตารางที่ 2.2

จะเห็นได้ว่าปัจจุบันแคโรทีนอยด์นั้นได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ เคมี อาหาร ยา และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารสำหรับสัตว์น้ำ เช่น การเพาะเลี้ยงปลาแซลมอน ปลาเทราท์ และกุ้ง ซึ่งนิยมนำสารสีแคโรทีนอยด์มาผสมในอาหารเพื่อปรับปรุงคุณภาพด้านสีของเนื้อสัตว์น้ำเหล่านี้ให้เป็นที่ยอมรับของตลาดและผู้บริโภค โดยทั่วไปแคโรทีนอยด์มีราคาจำหน่ายอยู่ที่ประมาณ 2,500-3,000 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม และทุกๆ ปี ปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่จำหน่ายมีมูลค่าถึง 200 ล้านเหรียญสหรัฐ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Malea และคณะ, 2005) ถึงแม้ว่าร้อยละ 95 ของแคโรทีนอยด์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้มาจากการสังเคราะห์ก็ตาม แต่ความต้องการที่จะผลิตแคโรทีนอยด์จากแหล่งธรรมชาตินั้นมีเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากไม่มีสารประเภทโลหะหนักตกค้างและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Bocaneegra และคณะ, 2004)

ตารางที่ 2.2 การใช้ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ

แคโรทีนอยด์	สี	การใช้ประโยชน์
แซนโทฟิลิดแคโรทีนอยด์		เติมลงในอาหารสัตว์
แคนทาแซนทิน	ส้ม-แดง	ขนม นม ไขมัน สารสีในอาหาร
แอสทาแซนทิน		มาร์การีนและอาหาร
		แซลมอน ปลาเทราส์ กุ้ง
		สารต้านอนุมูลอิสระ
แคโรทีนอยด์ที่ไม่ใช่แซนโทฟิลล์		โปรวิตามินเอ
		วิตามินเอ
แคโรทีนอยด์กลุ่มแซนโทฟิลล์		สารต้านอนุมูลอิสระ
		สารเสริมภูมิคุ้มกัน
		ต้านเนื้องอก ต้านมะเร็ง
บีตา-แคโรทีนออยด์	เหลือง	เนย มาการีน ชีส
	ส้ม	อาหารไขมัน ไข่ พาสต้า
		สลัด ผลิตภัณฑ์นม ข้าวโพดคั่ว มะเขือเทศ
		เป็นต้น และสารต้านมะเร็ง
β-carotene 8'-apo-β-		เครื่องดื่ม
Carotene-8' al	เหลือง	ขนมและของหวาน
(water-dispersible preparation)		ซุปและผลิตภัณฑ์เนื้อ
แคนทาแซนทีน		ยา สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านมะเร็ง

ที่มา: Khachik และคณะ (1992), Margalith (1992)

2.2 *Rhodotorula*

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์ *Rhodotorula*

เชื้อ *Rhodotorula* เป็นยีสต์ที่สร้างรงควัตถุ จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota อยู่ในชั้น Urediniomycetes และจัดอยู่ในลำดับ Sporidiales การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการสร้างสี รวมไปถึงคุณสมบัติทางเมทาบอลิกบางประการ เช่น การใช้อินโนซิทอล (inositol) เป็นต้น เชื้อ *Rhodotorula* ที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ประกอบด้วย *R. glutinis* *R. gracilis* *R. rubra* และ *R. mucilaginosa* ดังแสดงในตารางที่ 2.3 เชื้อ *R. glutinis* เป็นยีสต์สีส้ม-แดงพบทั่วไปในดินและน้ำ มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยวที่มีรูปร่างหลายแบบ คือ เซลล์มีรูปร่างกลม รูปไข่หรือทรงยาว จัดเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ การสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อหลายทิศทาง สร้างเส้นใยที่แท้จริง แต่ไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) บางครั้งพบว่ามีการสร้างแคปซูลจึงทำให้ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกและโคโลนีที่ปรากฏจะมีสีส้มจนถึงแดง มีเมือก เนื่องมาจากสารแคโรทีน-นอยด์ที่เชื้อสร้างขึ้นภายในเซลล์และพบว่ายีสต์ชนิดนี้สารมารถสร้างสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้หลายชนิด ได้แก่ บีตา-แคโรทีน โทรูลีนและโทรูลาโรดิน ซึ่งจัดเป็นลักษณะเด่นของยีสต์ชนิดนี้ (สิรินดาและพิพัฒน์, 2551) โดยจากการศึกษาพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ช่วงพีเอชเท่ากับ 6 และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Aksu และ Eren, 2005)

2.2.2 วิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

Simpson และคณะ (1964) และ Goodwin (1980) ได้วิจารณ์วิถีทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์โดยยีสต์และวิถีชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับ 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1). การเปลี่ยน acetyl CoA ไปเป็น 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA (HMG-CoA) โดยเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากนั้น HMG-CoA จะเปลี่ยนเป็นสารประกอบ C_6 , mevalonic acid (MVA) เป็นสารตั้งต้นตัวแรกของชีวสังเคราะห์เทอร์พรีนอยด์ MVA จะเปลี่ยนต่อไปเป็น isopentenyl pyrophosphate (IPP) โดยอาศัยปฏิกิริยาการสลายฟอสเฟตโดย MVA kinase ตามด้วยปฏิกิริยาการดึงหมู่คาร์บอกซิล

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบมวลเซลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Rhodotorula* sp. ที่เจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

Rhodotorula sp. and microbial associations	แหล่งคาร์บอน	มวลเซลล์ (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มก./ก. เซลล์แห้ง)	References
R. gracilis CFR 1 AU	กลูโคส	2.40	26	Somashekar & Joseph, 2000
R. glutinis 32	กลูโคส	23.90	5.4	Bhosal & Gadre, 2001
R. glutinis CCT 2186	น้ำตาลอ้อย	6.70	0.197	Sguina, et al., 2002
R. rubra	น้ำตาลอ้อย	4.40	0.427	Sguina, et al., 2002
R. rubra	ถั่วสกัด	4.80	1.26	Martin, et al., 1993
R. glutinis KCTC	กากน้ำตาล น้ำแป้งถั่วเขียว	11.70	0.295	Park, et al., 2005
R. glutinis TISTR	สกัด	10.35	0.345	Tinoi, et al., 2005
R. glutinis DBVPG 3853	น้ำองุ่น	6.30	1.1	Buzzini, 2000
R. mucilaginosa CRUB 0195	น้ำเชื่อมข้าวโพด	10.60	0.156	Libkind & Brook, 2006
R. glutinis 32	กากน้ำตาล	78.00	2.36	Bhosale & Gadre, 2001
R. mucilaginosa NRRL-2502	การน้ำตาลหัวบีท	4.20	21.2	Aksu & Eren, 2005
R. mucilaginosa NRRR-2502	หางนม	2.40	29.2	Aksu & Eren, 2005
R. glutinis DBVPG 3503+ *D. castellii* DBVPG 3503	น้ำเชื่อมข้าวโพด	15.30	0.535	Buzzini, 2001
R. glutinis 22P+ *L. helveticus* 12A	หางนม	30.20	0.268	Frengova, et al., 1994
R. rubra GED5+ *K. lactis* MP 11	หางนม	24.30	0.421	Frengova, et al., 2004
R. rubra GED2+ *L. casei* Ha1	หางนม	27.00	0.448	Frengova, et al., 2003
R. rubra GED2+ *L. bulgaricus* 2-11 + *S. thermophilus* 15 HA	หางนม	26.00	0.503	Simova, et al., 2004

ที่มา: Frengova และ Beshkova (2009)

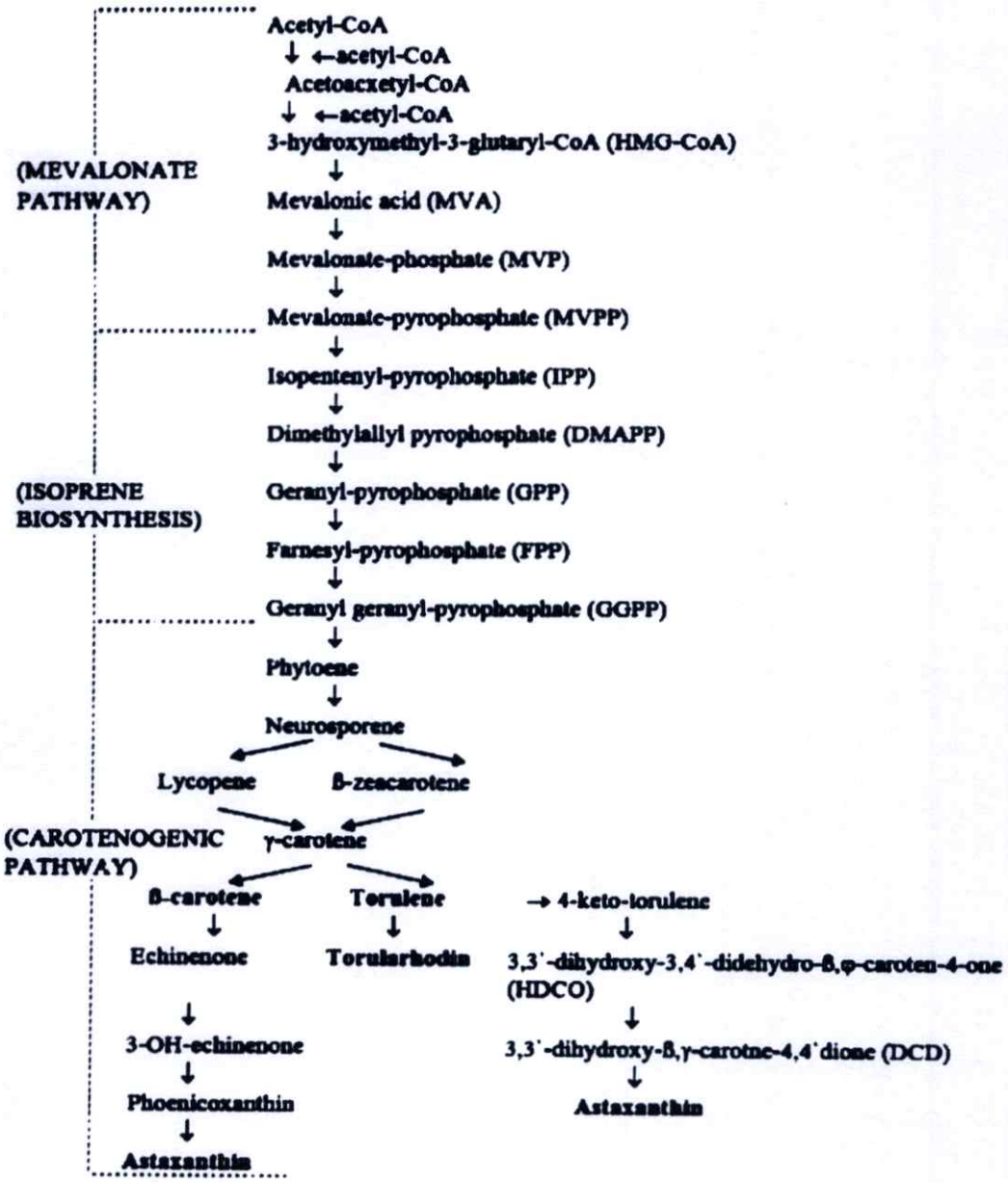
2). IPP เป็น isomerize กับ dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) โดยการเติม 3 โมเลกุลของ IPP ไปที่ DMAPP ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดการสลายโดยเอนไซม์ prenyl transferase ได้เป็น สารประกอบ C_{20} geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP) จากนั้นเกิดการควบแน่นของ GGPP 2 โมเลกุล ได้เป็นไฟโตอีน (phytoene) ซึ่งเป็น C_{40} carotene ตัวแรกของวิถีการสังเคราะห์ และขั้นตอนที่ 3). เกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันต่อเนื่องกัน 4 ขั้นตอน ได้เป็นสารไลโคพีน (lycopene) ซึ่งไลโคพีนนี้เป็นสารตั้งต้นของแคโรทีนอยด์แบบวงและเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นบีตา-แคโรทีน แกมมา-แคโรทีน โทรูลีน โทรูลาโรดีนและแอสทาแซนทิน ดังแสดงในภาพที่ 2.7

2.2.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

2.2.3.1 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถดูดซึมไปใช้ได้ มียีสต์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ โดยปกติน้ำตาลกลูโคสไม่ได้ใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการหมักในอุตสาหกรรมโดยสับสเตรทสำหรับการหมักในอุตสาหกรรมชนิดที่เป็นน้ำตาลมักเป็นมอลโตส ซูโครส ฟรุกโตส ไซโลสและแลคโตส ในการหมักหากมีการเติมกลูโคสสูงๆ จะมีผลทำให้ไมโทคอนเดรียถูกกดดัน เรียก Crabtree effect ทำให้ยีสต์มีการหายใจลดลง มียีสต์บางชนิดเท่านั้นที่ไวต่อกลูโคสความเข้มข้นสูง ส่วน *Rhodotorula* เป็นยีสต์ที่ไม่ผลิตเอทานอลมีกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนทำให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูง

ยีสต์มีไนโนโตรเจนภายในเซลล์ประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ปริมาณรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต มักใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงยีสต์เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย นอกจากอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้วยังมีอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์พิวรีนและเอมีนใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์บางชนิดได้



รูปที่ 2.6 วิถีชีวสังเคราะห์จาก acetyl-CoA ถึงบีตา-แคโรทีน, โทรูลีนและโทรูลาโรดีน ใน *Rhodotorula* sp. และแอสทาแซนทินใน *P. rhodozyma/X. dendrorhous*

ที่มา: Frengova และ Beshkova (2009)

Voaides และ Dima (2011) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodotorula* sp. โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกันได้แก่ กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอลและฟรุกโตส พบว่าแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมีผลสำคัญต่อการเจริญของเซลล์และชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ รวมทั้งสายพันธุ์ที่แตกต่างกันด้วย โดยเชื้อ *Rhodotorula* sp. Rd1 และ Rd2 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดในอาหารที่มีซูโครส ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 370 และ 526 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Rhodotorula* sp. Rd3 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 198 ไมโครกรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีกลีเซอรอล

Parajo และคณะ (1998) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *Phaffia rhodozyma* ที่เซลล์เจริญบนไซโลส อิทธิพลของส่วนประกอบในอาหารต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *Phaffia rhodozyma* สายพันธุ์ NRRL,Y-17268 ในการหมักที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีส่วนผสมของสารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมไนเตรท หรือโพแทสเซียมไนเตรท ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียม ไนเตรท 0.2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสทาแซนทิน 4.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Yimyoo และคณะ (2011) ได้ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodosporidium paludigenum* DMKU3-LPK4 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนได้แก่ ยีสต์สกัด ยูเรีย โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต ผงชูรส ถั่วเหลืองบด ถั่วเขียวบด และน้ำแช่ข้าวโพด โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน 20:1, 40:1, 60:1, 80:1 และ 100:1 พีเอช 5 6 7 และ 8 พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อาหารที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.56 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 3.42 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์แห้ง 7.59 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 132 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Rhodosporidium paludigenum* สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้โดยมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Hu และคณะ (2007) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสทาแซนทินจากเชื้อ *Phaffia rhodozyma* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทดลองโดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวมีอิทธิพลต่อการผลิตแอสทาแซนทินอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นได้ทำการทดลองโดยผสมแหล่งไนโตรเจน

ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรทและเนื้อสกัด ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสำคัญมากต่อการผลิตแอสทาแซนทิน โดยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.28 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไนเตรท 0.49 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1.19 กรัมต่อลิตร ให้ชีวมวล 7.71 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลได้แอสทาแซนทิน 1.00 มิลลิกรัมต่อกรัม

2.2.3.2 แสง

กระบวนการผลิตแคโรทีนอยด์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดถูกควบคุมโดยแสง อย่างไรก็ตามความเข้มแสงและวิธีการให้แสงแตกต่างกันออกไปตามแต่ชนิดของจุลินทรีย์ การปรับปรุงผลได้แคโรทีนอยด์จะไม่คำนึงว่าจะลดหรือเพิ่มช่วงเวลาหรือความเข้มแสงซึ่งมี 2 ทฤษฎีเกี่ยวกับ photoinduction ทฤษฎีแรก การปรับปรุงปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นผลโดยตรงกับการปรับการเจริญของจุลินทรีย์ (Ausich, 1997) ดังนั้นผลของแสงต่อการเจริญของจุลินทรีย์แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแสงสีขาวที่กระตุ้นการผลิตแคโรทีนอยด์ ทฤษฎีที่สอง การเพิ่มการสะสมแคโรทีนอยด์ของเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม) เกี่ยวข้องกับการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ในกรณีนี้มันมีความสำคัญต่อระดับของเอนไซม์ชีวสังเคราะห์ที่แสงสีขาวมีผลในการกระตุ้น

Tada และคณะ (1990) ได้รายงานไว้ว่า *Rhodotorula* sp. สามารถทนต่อความเข้มแสงได้ 5000 ลักซ์ และเชื้อ *R. glutinis* สายพันธุ์กลายสามารถเจริญได้ในที่มีแสง 1000 ลักซ์ (Bhosol และ Gadre, 2002) งานวิจัยของ Vazquez (2001) ได้ศึกษาผลของแสงต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* อิทธิพลของแสงต่อกระบวนการสร้างแคโรทีนอยด์ต่อเชื้อ 6 สายพันธ์ ได้แก่ ATCC 24202, ATCC 24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24261 และ NRRL Y-10921 ของเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ที่เจริญบนอาหารที่มีไซโลส พบว่าทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบนี้สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ในที่มีแสงได้ดีกว่าในที่มืด ซึ่งสายพันธุ์ ATCC 24228 จะผลิตแคโรทีนอยด์และแอสทาแซนทินได้มาก 2.45 และ 2.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.2.3.3 อุณหภูมิ

เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ มันนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงวิถีชีวสังเคราะห์รวมถึงวิถีชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยผลของอุณหภูมิขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์และมักแสดงออกมาในรูปของการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทั้งหลาย (Martin และคณะ, 1993; Johnson และ Lewis, 1979; Longo และคณะ, 1992; Vijayalakshmi และคณะ, 2001; Aksu และ Eren, 2005) ยีสต์บางสายพันธุ์มีสัดส่วนรงควัตถุแตกต่างกัน (โทรูลีน โทรูลาโรดีน บีตา-แคโรทีน และแอสทาแซนทีน) จากการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Buzzini และ Martin, 1999; Simpson และคณะ, 1964; Bhosale และ Gadre, 2002; Polulyakh และคณะ 1991; Hayman และคณะ 1974) อุณหภูมิมีผลต่อการควบคุมเอนไซม์ β-carotene synthetase และ Torulene synthetase (Hayman และคณะ 1974)

Simpson และคณะ (1964) ได้ศึกษารูปแบบชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* 48-23T เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสพบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อจะสังเคราะห์บีตา-แคโรทีน โทรูลาโรดีนและโทรูลีนในความเข้มข้นประมาณร้อยละ 30 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะสังเคราะห์บีตา-แคโรทีนร้อยละ 64 ส่วนโทรูลีนและโทรูลาโลดีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

Bhosale และ Gadre (2002) ได้ศึกษาชีวสังเคราะห์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแกมมา-แคโรทีนเป็นตัวที่เกิดปฏิกิริยาของสายการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จากปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนและคาร์บอกซี่ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์โทรูลีนซึ่งเป็นที่รู้กันว่ามันต้องอาศัยอุณหภูมิที่เกี่ยวกับเอนไซม์ ปฏิกิริยาลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลงเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของการสังเคราะห์บีตา-แคโรทีน น่าจะเป็นไปได้ว่าด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้การสะสมบีตา-แคโรทีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 90 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด จากการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* สายพันธุ์กลายที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเพิ่มขึ้นร้อยละ 71 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2.3.4 อากาศ

กระบวนการสร้างสารแคโรทีนอยด์เป็นกระบวนการที่มีอากาศและอัตราการไหลของอากาศในการเพาะเลี้ยงยีสต์เป็นปัจจัยสำคัญต่อการดูดซึมสารอาหารเพื่ออัตราการเจริญ มวลเซลล์และการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ผลของอากาศนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วย ได้มีรายงานไว้ว่าค่าที่เหมาะสมของอัตราการไหลของอากาศและการกวนอยู่ในช่วง 0.5-1.9 ลิตรต่อนาที และ 180-900 รอบ

ต่อนาที ตามลำดับ สำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *Rhodotorula* และ *Phaffia* (Kusdiyantini และคณะ, 1998; Moriel และคณะ, 2005; Ramirez และคณะ, 2006; Vazquez และ Martin, 1998; Bhosale และ Gadre, 2002; Chan และ Ho, 1999; Hu และคณะ,2007; Simova และคณะ, 2003)

Simova และคณะ (2003) รายงานว่าการให้อากาศกับเชื้อผสมระหว่าง *R. rubra* และ *L. casei* ไม่ได้มีอิทธิพลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์เท่านั้นแต่ยังมีผลต่อส่วนประกอบแคโรทีนอยด์ที่สร้างขึ้นด้วย อัตราการไหลของอากาศที่เพิ่มสูงขึ้นสัมพันธ์กับสัดส่วนของบีตา-แคโรทีน ซึ่งเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 42 เป็นร้อยละ 60 สัดส่วนของโทรูลาโรดีนลดลงจากร้อยละ 44 เป็นร้อยละ 29 ขณะที่สัดส่วนของโทรูลีนเปลี่ยนเพียงเล็กน้อยจากร้อยละ 9.5 ไปเป็นร้อยละ 11

2.3 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวแก่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ไม่มีค่าทางเศรษฐกิจมักจะถูกขายในราคาต่ำ น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งของสับสเตรทที่มีค่า เช่น เป็นแหล่งคาร์บอน คือ มีกลูโคสและฟรุกโตส แหล่งไนโตรเจน เช่น อาร์จินิน อะลานิน ซิสทีน ฯลฯ แร่ธาตุ เช่น ฟอสฟอรัส โซเดียม ตะกั่ว ทองแดง กำมะถันและคลอไรด์ ในน้ำมะพร้าวมีสารอาหารเป็นส่วนประกอบสูงซึ่งเป็นสารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีการนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับเชื้อ *Acetobacter xylinum* เพื่อผลิตเซลลูโลสแบคทีเรียสำหรับนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้ามากมายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นี้ นอกจากนี้เชื้อ *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบสามารถใช้น้ำมะพร้าวเพื่อสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์นอกเซลล์และแซนแทนกัม (xanthan gum) ได้

Yong และคณะ (2009) ได้ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างน้ำมะพร้าวในระยะ 6 เดือน กับระยะ 12 เดือน โดยในน้ำมะพร้าวนั้นจะมีสารประกอบต่างๆ มากมาย ทั้งน้ำตาล แร่ธาตุ วิตามินและกรดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2, 2.3 และ 2.4

จากการศึกษาของ Yong และคณะ (2009) พบว่าน้ำมะพร้าวประกอบด้วยแซ็กคาโรสซึ่งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอินเวิร์ส (inverter sugar) เมื่อมะพร้าวแก่เต็มที่ น้ำมะพร้าวอ่อนประกอบด้วยน้ำตาลร้อยละ 4.0 – 5.0 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) แต่น้ำตาลในน้ำมะพร้าวแก่ส่วนใหญ่เป็น non-reducing sugar ซึ่งมีประมาณร้อยละ 2 ต่อมามีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลในน้ำมะพร้าวจาก

ระยะซึ่งเป็นมะพร้าวอ่อนจนเมื่อมะพร้าวแก่ พบว่าเมื่อผลมะพร้าวอ่อนเจริญเป็นมะพร้าวแก่ปริมาณและชนิดน้ำตาลจะเปลี่ยนไปโดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงระยะหนึ่งจะลดลง

ตารางที่ 2.4 แสดงองค์ประกอบของน้ำมะพร้าว

ส่วนประกอบต่างๆ	มะพร้าวอ่อน 6 เดือน	มะพร้าวแก่ 12 เดือน
Proximate	ก./ 100 ก.	ก./ 100 ก.
น้ำ	94.18	94.45
โปรตีน	5.82	5.55
ไขมันทั้งหมด	0.12	0.52
เถ้า	0.87	0.47
คาร์โบไฮเดรต	4.76	4.41
เส้นใย	วัดค่าไม่ได้	วัดค่าไม่ได้
น้ำตาลทั้งหมด	5.23	3.42
ซูโครส	0.06	0.51
กลูโคส	2.61	1.48
ฟรุกโตส	2.55	1.43

ที่มา: Yong และคณะ, 2009

ตารางที่ 2.5 ปริมาณสารอนินทรีย์และวิตามินในน้ำมะพร้าว

ส่วนประกอบต่างๆ	มะพร้าวอ่อน 6 เดือน	มะพร้าวแก่ 6 เดือน
สารอนินทรีย์	มก./ 100 ก.	มก./ 100 ก.
แคลเซียม	27.35	31.64
เหล็ก	0.02	0.02
แมกนีเซียม	6.4	9.44
ฟอสฟอรัส	4.66	12.77
โพแทสเซียม	203.7	257.52
เกลือ	1.75	16.1
สังกะสี	0.07	0.02
ทองแดง	0.01	0.03
แมงกานีส	0.12	0.08
กำมะถัน	0.58	0
อะลูมิเนียม	0.07	0.06
โบรอน	0.05	0.08
วิตามิน	มก./ 100 ก.	มก./ 100 ก.
วิตามินซี	7.41	7.08
วิตามินบี 1	Trace	0.01
วิตามินบี 2	0.01	0.01
วิตามินบี 3	วัดค่าไม่ได้	วัดค่าไม่ได้

ที่มา: Yong และคณะ, 2009

น้ำมะพร้าวนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น Reyes และคณะ (2004) ได้นำน้ำมะพร้าวมาเลี้ยง *Bacillus megaterium* เพื่อผลิต poly-B-hydroxybutyrate (PHB) เปรียบเทียบกับการใช้กากน้ำตาล, น้ำกลั่นวุ้นมะพร้าว และหางนมพบว่า น้ำมะพร้าวดีที่สุดและช่วยลดค่าใช้จ่ายได้ 37 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอาหารธรรมดา

ตารางที่ 2.6 ปริมาณกรดอะมิโนและกรดอินทรีย์ในน้ำมะพร้าว

กรดอะมิโน	มะพร้าวอ่อน 6 เดือน	มะพร้าวแก่ 12 เดือน
	มก./ก. ตัวอย่างที่สกัดไขมันออก	มก./ก. ตัวอย่างที่สกัดไขมันออก
อะลานีน	1.13	3.88
อาจินีน	0.13	0.81
กรดแอสปาติก	1.60	0.76
กรดกลูตามิก	3.44	3.75
ไลซีน	4.72	3.41
เมไทโอนีน	0.22	0.21
ฟีนิลอลานีน	0.26	0.00
โพรลีน	0.52	0.95
เซอรีน	0.64	1.06
ทรีโอนีน	0.20	0.33
วาลีน	0.91	0.82
กรดอินทรีย์	มก./ก. ตัวอย่างที่สกัดไขมันออก	มก./ก. ตัวอย่างที่สกัดไขมันออก
ทาร์ทาริก	1.6	2.4
มาริก	317	307
ซิตริก	วัดค่าไม่ได้	24.8
อะซีติก	วัดค่าไม่ได้	1.3
พีเอช	4.7 ±0.1	5.2 ±0.1

ที่มา: Yong และคณะ, 2009

Unagul และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตกรด docosahexaenoic acid (DHA) จากเชื้อ *Schizochytrium mangrovei* Sk-02 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนผสมของอาหาร 33 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ชีวมวลและดีเอชเอสูงขึ้นเกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอาหารที่เติมน้ำตาลเริ่มต้นในระดับเดียวกัน น้ำมะพร้าวที่เติมลงไปนั้นช่วยส่งเสริมการเจริญคล้ายกับการเติมธาตุอาหารรอง (trace element) ช่วยให้มีชีวมวลเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า โดยมีดีเอชเอเพิ่มสูงขึ้นพร้อมกัน

Sujarit และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตแอสทาแซนทินจากเชื้อ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 โดยใช้น้ำมะพร้าวไทยเป็นสับสเตรทร่วมกับการเติมกรดซิตริกลงไป การเพาะเลี้ยงด้วยฟลาสก์เขย่าจะมีการเติมกรดซิตริกลงไป 3 ระดับ คือ 0.05, 0.10 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าที่ความเข้มข้นกรด 0.15 เปอร์เซ็นต์ ดีที่สุด ให้ปริมาณเซลล์ 13.64 กรัมต่อลิตร และแอสทาแซนทิน 1052 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ที่เวลา 84 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเดิม 3 เท่า ในการเพาะเลี้ยงด้วยถังหมัก 2 ลิตร โดยให้อากาศ 1, 2 และ 3 วีวีเอ็ม ที่ความเร็วรอบการกวน 540 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้น 5.5 ได้ผลผลิตแอสทาแซนทิน 3880, 4593 และ 753 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมที่สุดคือ 2 วีวีเอ็ม ซึ่งจะให้ผลได้แอสทาแซนทินสูงกว่าระดับฟลาสก์เขย่าที่ไม่เติมกรดซิตริก 15 เท่า

จากตัวอย่างงานวิจัยเหล่านี้จะเห็นได้ว่าน้ำมะพร้าวมีสารอาหารที่มากพอสำหรับการนำมาเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* สายพันธุ์ TISTR 5159 ได้จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงสูตรยีสต์สกัดมอลต์สกัด (yeast extract - malt extract agar slant, YM) (ภาคผนวก ก 3) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์	บริษัท
1. กรวยแยก (Separate funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร	Isolab
2. กระบอกตวง (Graduate cylinder) ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร	Vitlab
3. ขวดแก้ว (Erlenmayer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร แบบหลุม	Pyrex
5. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)	Pyrex
6. โถดูดความชื้น (Desiccator)	Duran
7. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร	Pyrex
8. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร	HBG
9. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร	Pyrex
10. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Rotary shaker)	Oskon
11. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)	Hiclave
12. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)	Issco
13. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)	WTB binder
14. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Denver Instrument
15. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)	Falcan
16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer)	Unicon
17. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Adventure
18. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Olympus

	บริษัท
19. เครื่องไมโครเวฟ	Samsung
20. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	Sanyo
21. ไมโครปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร	Rainin
22. ไมโครปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร	Labnet
23. ไมโครปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร	Labnet
24. คิวเวต	Starna
25. ถังหมักขนาด 5 ลิตร (BIOSTAT B)	B. Braun Biotech International
26. เครื่องชั่ง	Adventure
27. เครื่องผสมสาร (Vortex)	Scientific Industries
28. กระดาษกรอง GF/C	Whatman

สารเคมี	บริษัท
1. กรดไฮโดรคลอริกซัลฟิวริค 98% (H_2SO_4)	Merck Schuchardt OHG
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	VWR Internation. Ltd
3. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	Fisher Scientific
4. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether)	Panreac Quimica SAU
5. อะซีโตน (Acetone)	Fisher Scientific
6. ยีสต์สกัด-มอลต์สกัด (Yeast extract-malt extract, YM)	HiMedia
7. ยีสต์สกัด	HiMedia
8. มอลต์สกัด	HiMedia
9. น้ำตาลกลูโคส	Fluka Bochemical
10. น้ำตาลแมนนิทอล	Univar
11.น้ำตาลกาแลคโตส	Univar
12.น้ำตาลซูโครส	Univar
13.น้ำตาลแลคโตส	LabChem
14. วุ้นผง (Agar)	Fluka
15. แอมโมเนียมซัลเฟส $(NH_4)_2SO_4$	Univar
16. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)	Univar

	บริษัท
17. แมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4 : 7 H_2O$)	Univar
18. แอมโมเนียมไนเตรท ($N_2H_4NO_3$)	Fluka
19. แอมโมเนียมคลอไรด์	Merck

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อและน้ำมะพร้าว

เขี่ยเชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* สายพันธุ์ TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารวุ้นเอียงที่บ่มที่อุณหภูมิห้องอายุ 24 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเหลวสูตรยีสต์สกัดมอลต์สกัด (YM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 1 ลูป นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดค่าความขุ่นของเชื้อยีสต์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Buzzini และ Martinim, 1999) โดยปรับค่าความขุ่นให้ได้ 0.5 (จะได้เซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อไป

น้ำมะพร้าวแก่ที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบเป็นน้ำมะพร้าวแก่ได้มาจากตลาดหัวตะเข้ นำน้ำมะพร้าวมาทำการกรองผ่านสำลีและกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำไปใช้แทนน้ำกลั่นตามขั้นตอนการทดลอง โดยน้ำมะพร้าวที่นำมาใช้นี้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์น้ำมะพร้าวแก่โดยศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 1.67 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ฟรุกโตส 0.30 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และกลูโคส 0.32 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และมีไนโตรเจนทั้งหมด 0.08 เปอร์เซ็นต์

3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับฟลาสก์

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะของการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้สูตรอาหารที่ดัดแปลงจากสูตรของ Aksu และ Eren (2007) (ภาคผนวก ก 1) เป็นสูตรพื้นฐานโดยใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่นตามสูตรเดิม แล้วทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแทนสูตรเดิมตามขั้นตอนการทดลอง

3.3.2.1 การศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

ใช้อาหารเหลวตามสูตรของ Aksu และ Eren (2007) โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แลคโตส และแมนนิทอล นำน้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำมะพร้าว 1 ลิตร แทนน้ำกลั่นตามสูตรเดิม ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.5 แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ นำอาหารแต่ละสูตรปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นนำมาเติมหัวเชื้อจากข้อ 3.3.1 ร้อยละ 5 (โดยปริมาตร) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ในแต่ละฟลาสก์ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด

นำสูตรอาหารที่ให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดไปศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาล 15 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร ทำการเตรียมอาหารและเพาะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด

3.3.2.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด จากข้อ 3.3.2.1 มาศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยการแปรผันชนิดของไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเตรต ใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร แทนแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเดิม (ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร) ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.5 จากนั้นนำอาหารแต่ละสูตรปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเตรียมอาหารและเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อที่ 3.3.2.1 ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด

นำสูตรอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมมาศึกษาร่วมกับยีสต์สกัดโดยใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 ดังนี้ สูตรที่ 1 ใช้ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนอนินทรีย์ 3.5 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 2 ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนอนินทรีย์ 2.5 กรัมต่อ

ลิตร และสูตรที่ 3 ใช้ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนอนินทรีย์ 1.5 กรัมต่อลิตร ทำการปรับพีเอชเป็น 5.5 จากนั้นนำอาหารแต่ละสูตรปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเตรียมอาหารและเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อที่ 3.3.2.1 ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด

3.3.2.3 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

เตรียมอาหารสูตรที่ใช้น้ำตาลที่เหมาะสมตามการทดลองจากข้อ 3.3.2.1 ยีสต์สกัด และไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมตามที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.3.2.2 ที่ให้แคโรทีนอยด์สูงสุด ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 N หรือ กรดไฮโดรคลอริก 2 N จากนั้นนำอาหารที่ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นแล้วนำมาเติมหัวเชื้อและเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดียวกับข้อ 3.3.2.2 ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด เลือกสูตรอาหารที่ให้แคโรทีนอยด์สูงสุดไปศึกษาต่อ

3.3.3 การศึกษาสภาวะการให้อากาศและการกวนในการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวน

ในการศึกษานี้ใช้ถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร รุ่น BIOSTAT B ใบพัดเป็นชนิด disc turbine ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 64 มิลลิเมตร ประกอบด้วยใบพัด 2 ชุด (แต่ละชุดมี 6 ใบพัด) ถังหมักมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 160 มิลลิเมตร สูง 345 มิลลิเมตร และมีระบบควบคุมค่าพีเอช ออกซิเจนละลาย อุณหภูมิในถังหมัก ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดลองจากข้อ 3.3.2. ปริมาตร 3 ลิตร ใส่ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นต่อชุดอุปกรณ์ถังหมักแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.1 ลงไปร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ศึกษาสภาวะการให้อากาศและการกวนในการเพาะเลี้ยงดังนี้

แบบที่ 1 กำหนดความเร็วรอบการกวนที่ 150 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 วีวีเอ็ม (3 ลิตรต่อนาที) ไม่มีการกำหนดค่าออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบบที่ 2 กำหนดค่าออกซิเจนละลายร้อยละ 60 ตั้งค่าอัตราการให้อากาศสูงสุด 5.40 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 240-480 รอบต่อนาที โดยใช้ Cascade mode

แบบที่ 3 กำหนดค่าออกซิเจนละลายร้อยละ 75 ตั้งค่าอัตราการให้อากาศสูงสุด 5.70 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 300-540 รอบต่อนาที โดยใช้ Cascade mode

แต่ละการทดลองทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์ พีเอช และน้ำตาลทั้งหมด

3.3.4 การศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159

นำตัวอย่างที่ได้จากกากรสกัดแคโรทีนอยด์ไปวิเคราะห์บีตา-แคโรทีน ลูทีน และซีแซนทีนโดยใช้ HPLC Agilent รุ่น 1200 สำหรับการศึกษาบีตา-แคโรทีนจะใช้คอลัมน์ water Bondapak C-18 รุ่น micro bondapak ขนาด 4.6 X 300 มิลลิเมตร โดยใช้สารละลาย เมทานอล : อะซีโตไนไทล์ : คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 47:42:11 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น ยูวี-450 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Munzuroglu และคณะ (2003)

การศึกษาลูทีนและซีแซนทีน โดยใช้ HPLC ชนิดเดียวกัน คอลัมน์ Princesphere C-30 ขนาด 4.6 X 150 มิลลิเมตร โดยใช้สารละลายเมทานอล : อะซีโตไนไทล์ : เมทิลีนคลอไรด์ : น้ำ ในอัตราส่วน 50:30:15:5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น ยูวี-450 นาโนเมตร ตามวิธีของ Melendez-Martinez และคณะ (2003) ผลการวิเคราะห์ที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับแคโรทีนอยด์มาตรฐานบีตา-แคโรทีน ซีแซนทีนและลูทีน โดยการทดลองนี้ส่งตรวจที่ศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

3. 4 วิธีการวิเคราะห์

3.4.1 การวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักของ *R. glutinis* TISTR 5159 มา 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง GF/C นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นนำมาชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ค่าที่ได้จากการชั่งน้ำหนักนำไปคำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) $= \frac{(W2-W1)}{V} \times 1000$

W1 คือ น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักเซลล์กับกระดาษกรอง (กรัม)

V คือ ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

3.4.2 การสกัดแคโรทีนอยด์จากเซลล์ยีสต์

การสกัดแคโรทีนอยด์ใช้วิธีการของ Calo และคณะ (1995) นำตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) 1 นาที แล้วเติมสารละลายอะซิโตน (acetone) 5 มิลลิลิตร ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) 1 นาที เพื่อสกัดแคโรทีนอยด์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการแยกส่วนใสออกจากเศษเซลล์โดยนำส่วนใสใส่ในกรวยแยกเติมสารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) 10 มิลลิลิตร ถ้าไม่เกิดการแยกให้เติมสารละลายอิ่มตัว โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) เล็กน้อย ทำการเขย่าเพื่อแยกสารละลายออกจากกันและเก็บส่วนที่มีสีแคโรทีนอยด์ซึ่งละลายอยู่ในชั้นของปิโตรเลียมอีเทอร์ ทำการวิเคราะห์ปริมาณของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และนำมาคำนวณโดยใช้สูตรของ Gross (1991)

แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง) $= \frac{A \times V \times 10^3}{A_{1cm}^{1\%} \times 100 \times G}$

A = ค่าการดูดกลืนแสง

V = ปริมาตรของสารสกัดแคโรทีนอยด์ (มิลลิลิตร)

G = น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

$A_{1cm}^{1\%}$ = specific absorbance/extinction coefficient ($E_{1cm}^{1\%}$), มีค่าเท่ากับ 2500

แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร) $= \frac{A \times V \times 10^3}{A_{1cm}^{1\%} \times 100 \times M}$

A = ค่าการดูดกลืนแส

V = ปริมาตรของสารสกัดแคโรทีนอยด์ (มิลลิลิตร)

M = ปริมาตรตัวอย่างที่นำมาสกัด (มิลลิลิตร)

$A_{1cm}^{1\%}$ = specific absorbance/extinction coefficient ($E_{1cm}^{1\%}$), มีค่าเท่ากับ 2500

อัตราการผลิตแคโรทนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน) $= \frac{\text{แคโรทีนอยด์สูงสุด}}{\text{เวลา}}$

ผลได้แคโรทีนอยด์ต่อสับสเตรท (มิลลิกรัม/กรัมน้ำตาล) $= \frac{\text{แคโรทีนอยด์สูงสุด}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้}}$

3.4.3 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดทำตามวิธีของ Dubois (1956) ตามขั้นตอนดังนี้

1. นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมฟีนอลร้อยละ 5 ลงไป 1.0 มิลลิลิตร ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 98 ลงไป 5 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็วโดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยลงข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้ม 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ 1) ดำเนินการตามข้อ 1-4
6. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำตาลกลูโคส (ตารางภาคผนวกที่ 2)
7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัม/ลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times (1000)}$$

3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลจากผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistics Version 20 และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan's multiple rang analysis ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

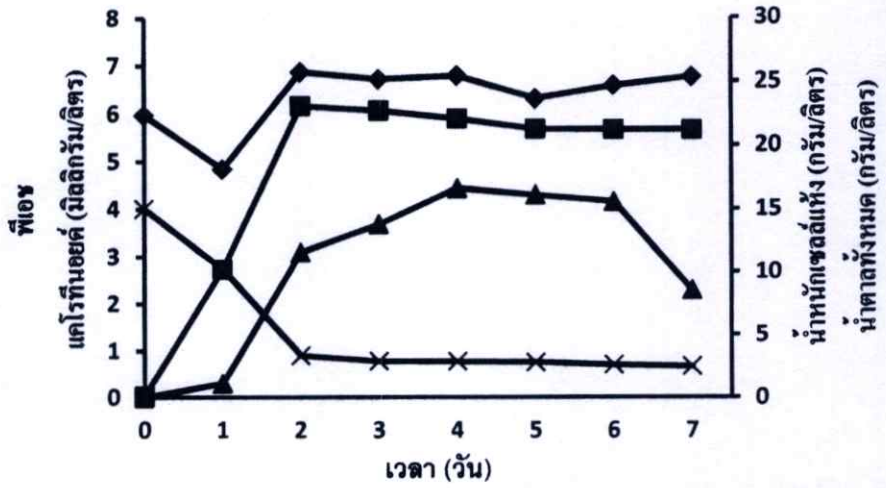
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

ในการทดลองโดยใช้อาหารเหลวตามสูตรของ Aksu และ Eren (2007) โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่น เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.5 พบว่าการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แลคโตส และแมนนิทอล มีผลการศึกษาดังนี้

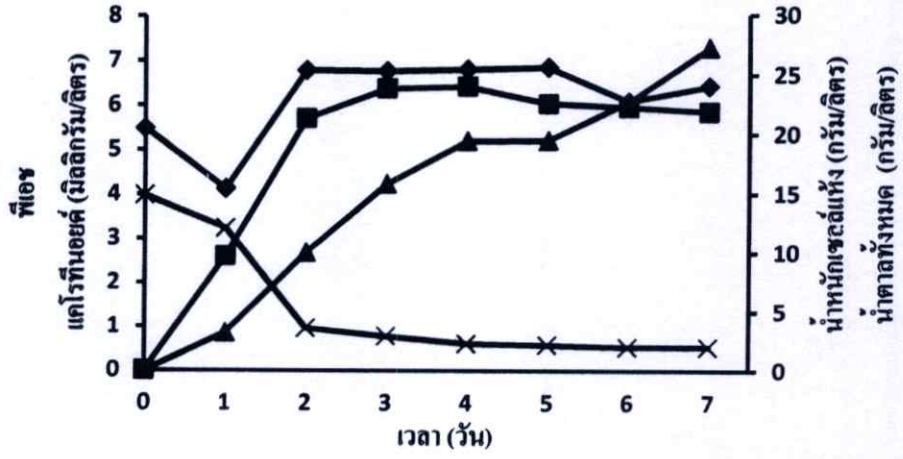
เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีการเจริญของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 อย่างรวดเร็วในสองวันแรก โดยมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 23.10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อจะเข้าสู่ระยะคงที่ การใช้น้ำตาลมีแนวโน้มลดลงเมื่อการเจริญเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในวันสุดท้ายเท่ากับ 2.51 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชพบว่ามีการลดลงในช่วงวันที่ 1 จากนั้นเพิ่มขึ้นและเมื่อการเจริญเข้าสู่สภาวะคงที่ ค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่าเล็กน้อยระหว่าง 6.31-6.87 การผลิตแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามการเจริญ และคงที่ในวันที่ 4 จากนั้นลดลงในวันที่ 6 การผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดมีค่า 4.43 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเจริญ ดังแสดงในรูปที่ 4.1

เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในสามวันแรก โดยมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 24.05 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 หลังจากนั้นการเจริญจะอยู่ในสภาวะคงที่และมีแนวโน้มที่การเจริญจะลดลงในวันที่ 7 มีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในสองวันแรก จากนั้นการใช้น้ำตาลลดลงและคงที่ตั้งแต่วันที่ 4-7 มีน้ำตาลทั้งหมดในวันท้าย 2.01กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชพบว่าลดลงเหลือ 4.13 ในช่วงวันที่ 1 จากนั้นเพิ่มขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.41-6.80 การผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้าย แม้ว่าการเจริญมีแนวโน้มลดลงก็ตาม โดยมีแคโรทีนอยด์สูงสุด 7.27 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×); น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



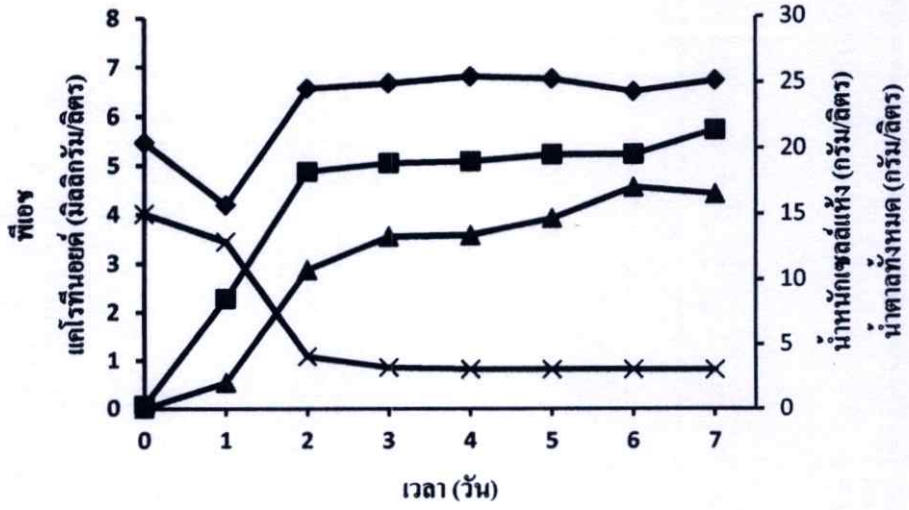
รูปที่ 4.2 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีซูโครส 15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×); น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)

เมื่อมีการใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ในสองวันแรก จากนั้นเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่โดยในวันที่ 6 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 19.54 กรัมต่อลิตร เชื้อมีอัตราการใช้น้ำตาลสูงในช่วงสองวันแรกจากนั้นอัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อลดลงเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ และวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีน้ำตาลเหลือ 3.03 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อเจริญและมีอัตราการใช้น้ำตาลสูง ส่งผลให้พีเอชลดลงเหลือ 4.19 ในวันแรก หลังจากนั้นพีเอชมีค่าสูงขึ้นและคงที่อยู่ระหว่าง 6.56-6.79 การผลิตแคโรทีนอยด์ในวันแรกมีปริมาณน้อยมาก จากนั้นเมื่อเข้าสู่วันที่ 2 เริ่มมีการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้นและมีแคโรทีนอยด์สูงสุด 4.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 และเริ่มมีการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงในวันที่ 7 ดังรูปที่ 4.3

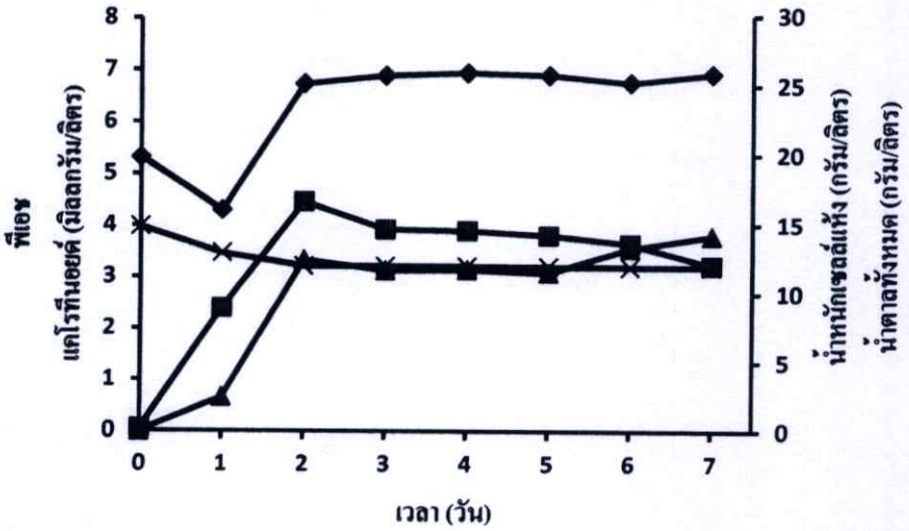
เมื่อเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 โดยมีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อมีการเจริญได้อย่างรวดเร็วในช่วงสองวันแรกและมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 16.73 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 จากนั้นปริมาณเซลล์แห้งลดลงและคงที่อยู่ระหว่าง 14.27-14.71 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3-5 และปริมาณเซลล์แห้งจะลดลงเหลือ 12.07 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย เชื้อมีการใช้น้ำตาลแลคโตสได้น้อยและคงที่เมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่ พีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงในช่วงวันแรกและหลังจากนั้นเพิ่มสูงขึ้นและคงที่อยู่ระหว่าง 6.73-6.93 สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์ในวันแรกผลิตได้น้อย จากนั้นจะเริ่มสูงขึ้นในวันที่ 2 โดยมีค่า 3.34 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจะเริ่มคงที่ในวันที่ 3-5 (3.08-3.14 มิลลิกรัมต่อลิตร) และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดในวันที่ 7 คือมีแคโรทีนอยด์ 3.79 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.4

เมื่อใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 สามารถเจริญได้สูงสุดในวันที่สอง คือมีปริมาณเซลล์แห้ง 19.16 กรัมต่อลิตร จากนั้นการเจริญจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือน้ำหนักเซลล์แห้ง 6.03 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย เมื่อมีการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องส่งผลให้มีอัตราการใช้น้ำตาลลดลงด้วย และจะคงที่ตั้งแต่วันที่ 2-7 โดยในวันสุดท้ายมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 6.09 กรัมต่อลิตร การเปลี่ยนแปลงของพีเอชพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่สองและจะคงที่ไปจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง มีค่าพีเอชระหว่าง 6.61-6.87 การผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 1-3 จากนั้นแคโรทีนอยด์ที่ผลิตมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องตามการเจริญที่ลดลง และมีแคโรทีนอยด์สูงสุด 3.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ดังรูปที่ 4.5



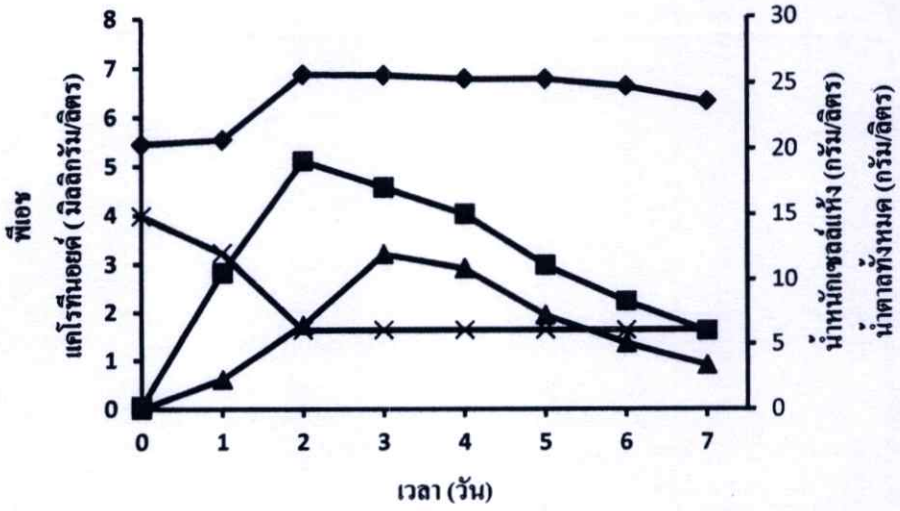
รูปที่ 4.3 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีกาแลคโตส15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.4 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแลคโตส15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.5 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแมนนิทอล 15 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)

เชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 สามารถใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เพื่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ จากตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อจะเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 24.05 กรัมต่อลิตร และแคโรทีนอยด์สูงสุด 7.27 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย 1 กรัมเซลล์แห้งจะให้ปริมาณแคโรทีนอดย์สูงสุด 0.33 มิลลิกรัม น้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญรองลงมาคือน้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณเซลล์แห้ง 23.10 กรัมต่อลิตร และแคโรทีนอยด์ 4.43 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์แห้ง 0.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง รองจากน้ำตาลซูโครส แต่มีปริมาณเซลล์แห้งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกันน้ำตาลชนิดอื่น ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 4.53 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากน้ำตาลกลูโคส ($p > 0.05$) น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์ต่ำสุดเมื่อกับน้ำตาลอื่นๆ

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลแตกต่างกัน

ชนิดของน้ำตาล	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)
กลูโคส	23.10 ±0.94^{b} (วันที่ 2)	4.43 ±0.05^{b} (วันที่ 4)	0.20 ±0.00^{d} (วันที่ 4)
ซูโครส	24.05 ±0.09^{a} (วันที่ 4)	7.27 ±0.28^{a} (วันที่ 7)	0.33 ±0.01^{a} (วันที่ 7)
กาแลคโตส	19.54 ±0.04^{c} (วันที่ 6)	4.53 ±0.51^{b} (วันที่ 6)	0.23 ±0.03^{c} (วันที่ 6)
แลคโตส	16.81± 0.01^{d} (วันที่ 2)	3.78 ±0.20^{c} (วันที่ 7)	0.28 ±0.01^{b} (วันที่ 7)
แมนนิทอล	19.16 ±0.07^{c} (วันที่ 2)	3.20 ±0.04^{d} (วันที่ 3)	0.19 ±0.00^{d} (วันที่ 4)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c และ d แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลแตกต่างกัน

ชนิดของน้ำตาล	อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)	ผลได้แคโรทีนอยด์จากการใช้น้ำตาล (มิลลกรัม/กรัม)
กลูโคส	1.11 ±0.01^{a} (วันที่ 4)	0.37 ±0.00^{c} (วันที่ 4)
ซูโครส	1.04 ±0.04^{a} (วันที่ 7)	0.57 ±0.02^{b} (วันที่ 7)
กาแลคโตส	0.76 ±0.08^{b} (วันที่ 6)	0.38 ±0.05^{c} (วันที่ 6)
แลคโตส	0.54 ±0.03^{c} (วันที่ 7)	1.26 ±0.07^{a} (วันที่ 7)
แมนนิทอล	1.07 ±0.01^{a} (วันที่ 3)	0.36 ±0.00^{c} (วันที่ 3)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c และ d แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากข้อมูลการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 1.11, 1.07 และ 1.04 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส แมนนิทอล และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับน้ำตาลกาแลคโตสและแลคโตสให้อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์รองลงมา เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างน้ำตาลซูโครสและกลูโคสผลพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ผลได้ของแคโรทีนอยด์จากการใช้น้ำตาลซูโครสจะมีค่าสูงกว่า คือ 0.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ในขณะที่ผลได้แคโรทีนอยด์จากการใช้น้ำตาลกลูโคสมีค่าน้อยกว่า ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ดังนั้นในสูตรอาหารนี้จึงเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากมีราคาถูกและให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Buzzini และ Martini (1999) ที่ใช้วัตถุดิบทางการเกษตรจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ น้ำอ้อยเข้มข้น น้ำเชื่อมกลูโคส กากน้ำตาลจากหัวบีท แป้งถั่วเหลืองสกัด และแป้งข้าวโพดสกัด พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเข้มข้น (820 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร จะให้แคโรทีนอยด์สูงสุด 915.4 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และการศึกษาของ Voaides และ Dima (2011) พบว่าเมื่อเลี้ยง *R. glutinis* สายพันธุ์ Rd1, Rd2 และ Rd3 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์ Rd1 และ Rd2 เจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสายสายพันธุ์ Rd1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 370 ไมโครกรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ Rd2 มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 526 ไมโครกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าวแก่ที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส 1.67, 0.30 และ 0.32 กรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีแหล่งของวิตามินและฮอร์โมนที่จะช่วยเร่งการเจริญของยีสต์

4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

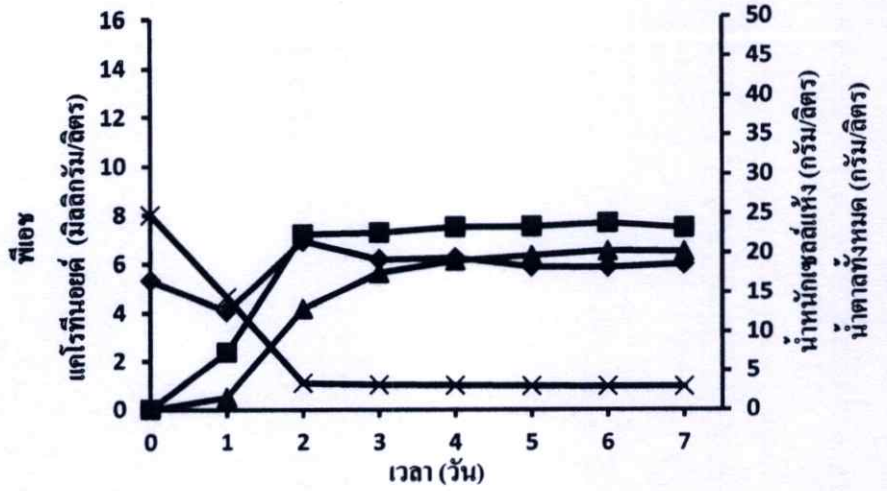
จากงานวิจัยของ Buzzini และ Martini (1999) ที่รายงานเกี่ยวกับการใช้แหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีผลให้เกิดการผลิตแคโรทีนอยด์มากขึ้น จึงนำซูโครสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมาใช้ทดลองในขั้นตอนต่อมา ในการทดลองได้แปรผันปริมาณซูโครสในอาหารโดยใช้น้ำตาลซูโครสที่

ความเข้มข้น 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับผลจากการทดลองที่ใช้น้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 โดยใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลการทดลองดังนี้

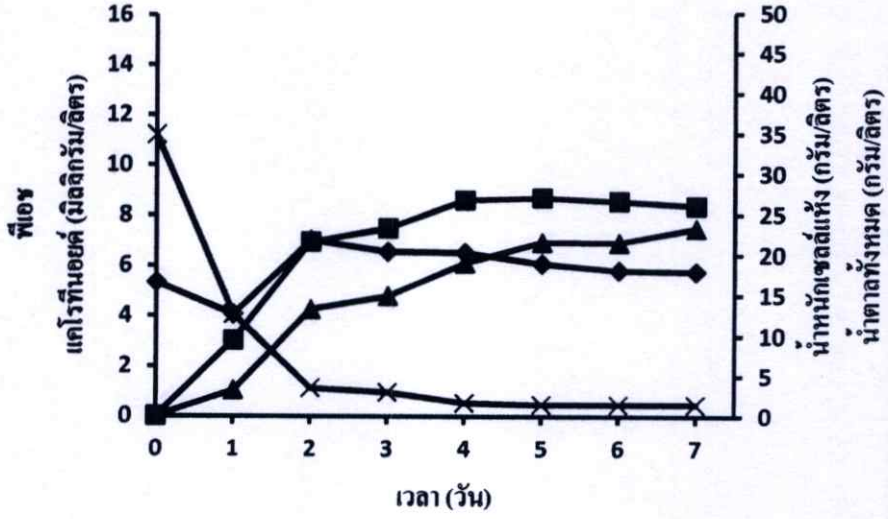
เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เจริญอย่างรวดเร็วในช่วงสองวันแรก จากนั้นการเจริญจะคงที่ไปจนถึงวันสุดท้าย ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 23.84 กรัมต่อลิตร ในช่วงสองวันแรกมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วและการใช้น้ำตาลลดน้อยลงเมื่อการเจริญเข้าสู่สภาวะคงที่ ในวันสุดท้ายมีน้ำตาลเหลือ 2.94 กรัมต่อลิตร ส่วนพีเอชมีค่า 4.07 ในวันที่ 1 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้น 6.16-6.92 ในวันที่ 2-4 และลดลงมาอีกเล็กน้อยในวันที่ 5-7 การผลิตแคโรทีนอยด์มีปริมาณน้อยในวันแรก จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นในวันที่สองและมีแนวโน้มคงที่ในวันที่ 5-7 แคโรทีนอยด์สูงสุด 6.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 4.6

เมื่อนำน้ำตาลซูโครส 35 กรัมต่อลิตร ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นในช่วงสามวันแรกจากนั้นอัตราการเจริญเริ่มลดลงและมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 27.12 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 หลังจากนั้นการเจริญเริ่มลดลง ในช่วงเริ่มต้นของการเจริญเชื้อจะมีการนำน้ำตาลไปใช้ในปริมาณมากแต่เมื่อการเจริญของเชื้อเริ่มคงที่การใช้น้ำตาลลดลงโดยมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือในวันสุดท้าย 1.45 กรัมต่อลิตร ส่วนพีเอชมีค่าลดลงในช่วงวันที่ 1 จากนั้นเมื่อการเจริญคงที่การเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะสูงขึ้นและคงที่อยู่ระหว่าง 5.75-6.55 สำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงสี่วันแรกตามการเจริญ จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและสูงสุดในวันที่ 7 โดยมีแคโรทีนอยด์ 7.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.7

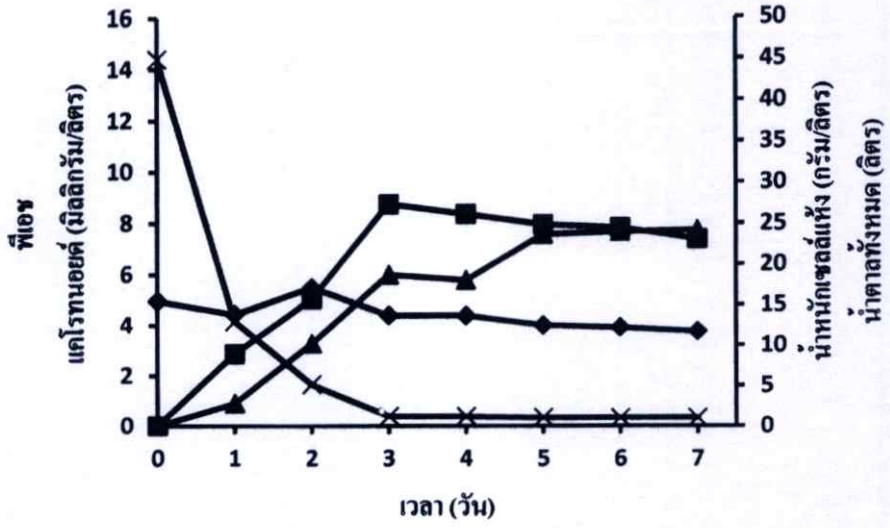
ในการใช้น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 พบว่าการเจริญจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 27.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 จากนั้นการเจริญจะลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันสุดท้าย เมื่อมีน้ำตาลเริ่มต้นในปริมาณสูงๆ เชื้อจะมีการเจริญและใช้น้ำตาลในปริมาณมากอย่างรวดเร็ว และเมื่อการเจริญลดลงการใช้น้ำตาลลดลงตามและมีน้ำตาลเหลือในวันสุดท้าย 1.05 กรัมต่อลิตร การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในช่วงวันแรกพีเอชมีค่าลดลง 4.44 และเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยมีค่าระหว่าง 3.75-4.40 ในวันแรกเชื้อมีการผลิตแคโรทีนอยด์ได้น้อย จากนั้นมีการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องแม้ว่าการเจริญลดลงโดยมีแคโรทีนอยด์สูงสุด 7.74 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.6 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีซูโครส 25 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.7 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีซูโครส 35 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงฟลาสก์เขย่า
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.8 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีซูโครส 45 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)

จากตารางที่ 4.3 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร เทียบกับความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร พบว่ามีปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ 27.32 กรัมต่อลิตร และ 7.74 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.34 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ($p \leq 0.05$) เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 35 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุด 27.12 กรัมต่อลิตร และ 7.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 25 กรัมต่อลิตร การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้น้อยกว่าชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.4 พบว่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 1.11 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือ 1.07 และ 1.04 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 35 กรัมต่อลิตร และ 15 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) เป็นแหล่งคาร์บอน ชุดควบคุมให้ปริมาณผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุด 0.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล รองลงมาคือ คือ 0.29 0.22 และ 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้ซูโครสเข้มข้น 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเชื้อมีความต้องการน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงจึงจะเจริญได้ดี

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

น้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)
ชุดควบคุม	24.05 ±0.09^{c} (วันที่ 4)	7.27 ±0.28^{b} (วันที่ 7)	0.33 ±0.01^{a} (วันที่ 7)
25	23.84 ±0.03^{d} (วันที่ 6)	6.46 ±0.01^{c} (วันที่ 7)	0.28 ±0.00^{b} (วันที่7)
35	27.12 ±0.05^{b} (วันที่ 5)	7.46 ±0.01^{b} (วันที่ 7)	0.29 ±0.00^{b} (วันที่7)
45	27.32 ±0.09^{a} (วันที่ 3)	7.74 ±0.00^{a} (วันที่ 7)	0.34 ±0.00^{a} (วันที่7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c และ d แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม: น้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.4 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

น้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)	ผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาล (มิลลกรัม/กรัม)
ชุดควบคุม	1.04 ±0.04^{b} (วันที่ 7)	0.57 ±0.02 ^{a} (วันที่ 7)
25	0.92 ±0.00^{c} (วันที่ 7)	0.29 ±0.00^{b} (วันที่ 7)
35	1.07 ±0.00^{b} (วันที่ 7)	0.22 ±0.00^{c} (วันที่ 7)
45	1.11 ±0.00^{a} (วันที่ 7)	0.18 ±0.00^{d} (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c d และ e แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม: น้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น แต่มีผลได้แคโรทีนอยด์ที่น้อยกว่าชุดควบคุม ดังนั้นแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ และพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลมากขึ้นผลผลิตแคโรทีนอยด์จะสูงขึ้นด้วย ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์จึงเลือกน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นในลำดับต่อไป เนื่องจากน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 45 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อมีอัตราการผลิต แคโรทีนอดย์สูงกว่าระดับความเข้มข้นอื่น โดยให้ค่าอัตราการผลิต 1.11 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน

เชื้อยีสต์มีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ นอกเหนือจากชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมแล้ว ความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* จากการศึกษาของ Aksu และ Eren (2007) ที่ได้ศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแลคโตส พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 125 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจาก *R. glutinis* แล้วยังพบว่า *R. mucilaginosa* สามารถใช้ซูโครสเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Aksu และ Eren (2005) พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2.5 – 20 กรัมต่อลิตร เชื้อ *R. mucilaginosa* จะผลิตแคโรทีนอยด์ 86 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลอง *R. glutinis* TISTR 5159 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 7.74 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้ซูโครส 45 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลสูงขึ้นการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จะสูงขึ้นตามซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aksu และ Eren (2007)

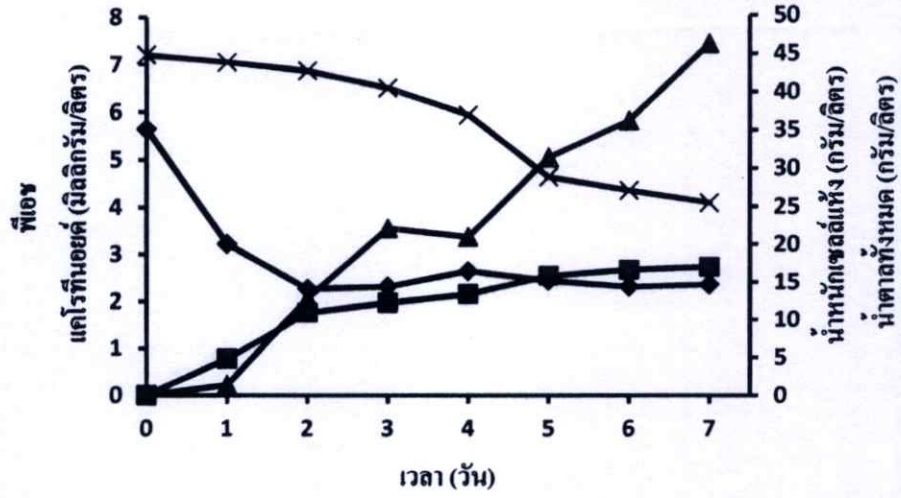
4.3 ผลแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

ในการทดลองโดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 45 กรัมต่อลิตร สำหรับแหล่งไนโตรเจนใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ (แทนยีสต์สกัด มอลต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตในสูตรเดิม) แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อ 5.5 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ให้ผลการทดลองเป็นดังนี้

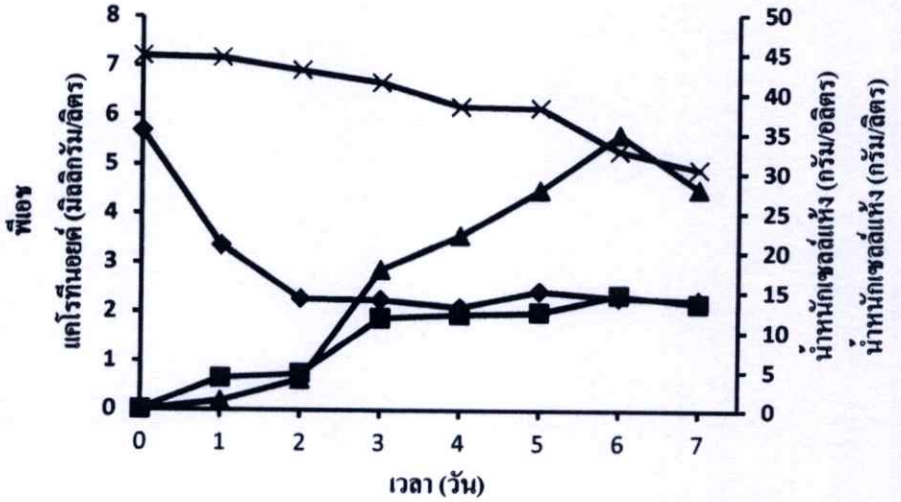
การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ พบว่ามีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีแนวโน้มที่การเจริญจะเข้าสู่ระยะคงที่ในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 17.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ผลของน้ำตาลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลอย่างช้าๆ และมีน้ำตาลคงเหลือ 25.51 กรัมต่อลิตร หลังการเพาะเลี้ยงครบ 7 วัน สำหรับพีเอชนั้นจะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ช่วงวันที่ 2-7 ค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย คือมีค่าระหว่าง 2.27-2.64 ในการผลิตแคโรทีนอยด์จะค่อยๆ ผลิตเพิ่มมากขึ้นในแต่ละวันตามการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้น และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 7.41 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 4.9

ในการใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ให้กับเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จะสังเกตเห็นว่าเชื้อมีการเจริญช้าในช่วงสองวันแรก จากนั้นการเจริญเพิ่มสูงขึ้นมากในวันที่สาม ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 14.64 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 การใช้น้ำตาลพบว่าเชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลได้น้อย และในวันสุดท้ายมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 30.51 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชลดต่ำลงเมื่อมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นโดยมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 2.09-2.42 ในช่วงวันที่ 2-7 การผลิตแคโรทีนอยด์จะผลิตได้เพิ่มขึ้นในแต่ละวันตามการเจริญของเชื้อ และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 5.59 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ดังแสดงในรูปที่ 4.10

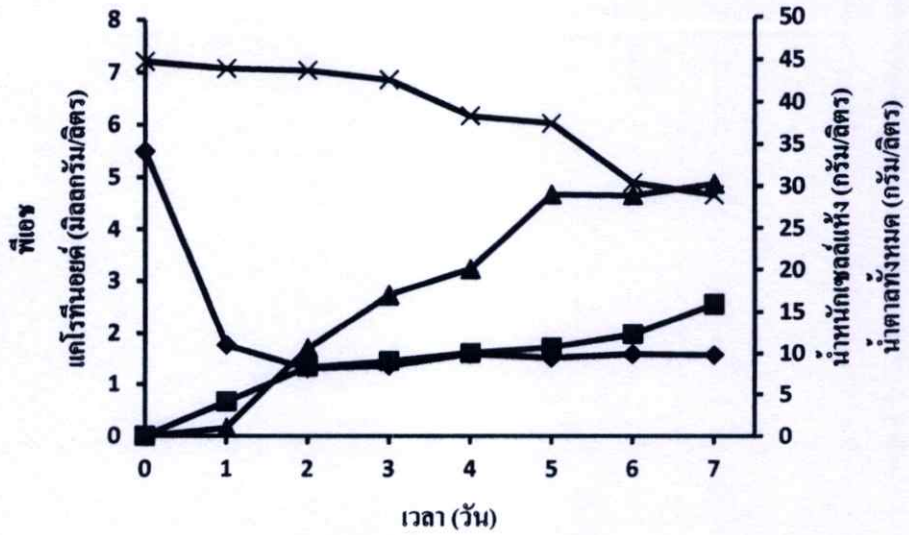
จากการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้เชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการเพาะเลี้ยง 7 วัน โดยสองวันแรกมีการเจริญสูงจากนั้นการเจริญช้าลงและมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 15.92 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย การใช้น้ำตาลของเชื้อในอาหารสูตรนี้พบว่ามีการใช้น้ำตาลน้อยในสามวันแรก จากนั้นการใช้น้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและหลังการเพาะเลี้ยงครบ 7 วัน มีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 28.95 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อในอาหารสูตรนี้ส่งผลให้พีเอชมีความเป็นกรดสูง โดยค่าพีเอชเท่ากับ 1.77 ในวันที่ 1 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้น และคงที่ระหว่าง 1.52-1.60 ในวันที่ 4-7 การผลิตแคโรทีนอยด์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเนื่องในห้าวันแรกที่ทำการเพาะเลี้ยงจากนั้นเริ่มมีค่าคงที่และแคโรทีนอยด์ผลิตได้สูงสุด 4.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.9 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.10 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรท 5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงฟลาสก์เขย่า
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.11 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงฟลาสก์เขย่า
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์แทนแหล่งไนโตรเจนเดิมที่มียีสต์สกัดและมอลต์สกัด พบว่าการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมียีสต์สกัด มอลต์สกัดเป็นส่วนประกอบอยู่ในสูตรอาหาร การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยให้ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 17.03 กรัมต่อลิตร และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 7.41 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (0.44 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) รองลงมาคืออาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรทให้แคโรทีนอยด์สูงสุด 5.59 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.5

ผลจากการใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอนินทรีย์พบว่าอาหารชุดควบคุมซึ่งมียีสต์สกัดและมอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมอยู่ด้วย เชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จะมีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูงกว่าอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) รองลงมาคืออาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งมีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 1.16 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้แคโรทีนอยด์ 0.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล แอมโมเนียมไนเตรทให้ผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุด

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)
ซูโครส 45 กรัม/ลิตร	27.32 ±0.09^{a} (วันที่ 3)	7.74 ±0.00^{a} (วันที่ 7)	0.34 ±0.00^{c} (วันที่ 7)
แอมโมเนียมซัลเฟต	17.03 ±0.01^{b} (วันที่ 7)	7.41 ±0.02^{b} (วันที่ 7)	0.44 ±0.00^{a} (วันที่ 7)
แอมโมเนียมไนเตรท	14.64 ±0.07^{d} (วันที่ 6)	5.59 ±0.06^{c} (วันที่ 6)	0.38 ±0.00^{b} (วันที่ 6)
แอมโมเนียมคลอไรด์	15.92 ±0.09^{c} (วันที่ 7)	4.85 ±0.07^{d} (วันที่ 7)	0.43 ±0.00^{a} (วันที่ 5)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c และ d แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.6 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจน	อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ มิลลิกรัม/ลิตร/วัน	ผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาล (มิลลิกรัม/กรัม)
ชุดควบคุม	1.11 ±0.00^{a} (วันที่ 7)	0.18 ±0.00^{d} (วันที่ 7)
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.06 ±0.00^{b} (วันที่ 7)	0.38 ±0.00^{b} (วันที่ 7)
แอมโมเนียมไนเตรท	0.93 ±0.01^{c} (วันที่ 6)	0.46 ±0.01^{a} (วันที่ 6)
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.69 ±0.01^{d} (วันที่ 7)	0.30 ±0.00^{c} (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c และ d แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ส่วนผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุด 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียม-ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกแอมโมเนียมซัลเฟตไปศึกษาต่อเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเมื่อใช้ร่วมกับยีสต์สกัด เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงกว่าแอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 โดยแหล่งแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์แต่ละชนิดสามารถแตกตัวและให้ประจุที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เชื้อสามารถดูดซึมและผลิตสารได้ต่างกัน จากการทดลองพบว่าค่าพีเอชมีความเป็นกรดสูงกว่าอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมอยู่ด้วย และการใช้น้ำตาลลดน้อยลง ส่งผลให้การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงตามไปด้วย จากงานวิจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ จากการศึกษาของ Aksu และ Eren (2005) พบว่าเชื้อ *Rhodotorula mucilaginosa* จะผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 63.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ต่อมา Aksu และ Eren (2007) ได้ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ 0.5–5 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *R. glutinis* ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 58.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง ดังนั้นแอมโมเนียมซัลเฟตจึงเป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้

4.4 ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

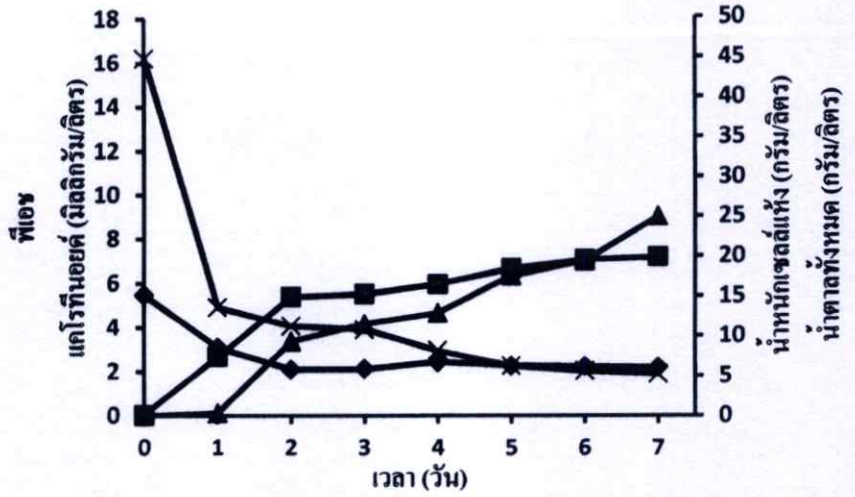
จากผลการทดลองใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวพบว่าการเจริญของเชื้อลดลง จึงศึกษาต่อโดยการนำยีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มาใช้ร่วมกับแอมโมเนียม-ซัลเฟตด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยอาหารที่ทดลองในขั้นตอนนี้ประกอบด้วยซูโครส 45 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ โพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้น 5.5 ให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

จากการใช้ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เจริญอย่างรวดเร็วในสองวันแรก และมีการใช้น้ำตาลสูง ค่าพีเอชลดลงจากเดิม

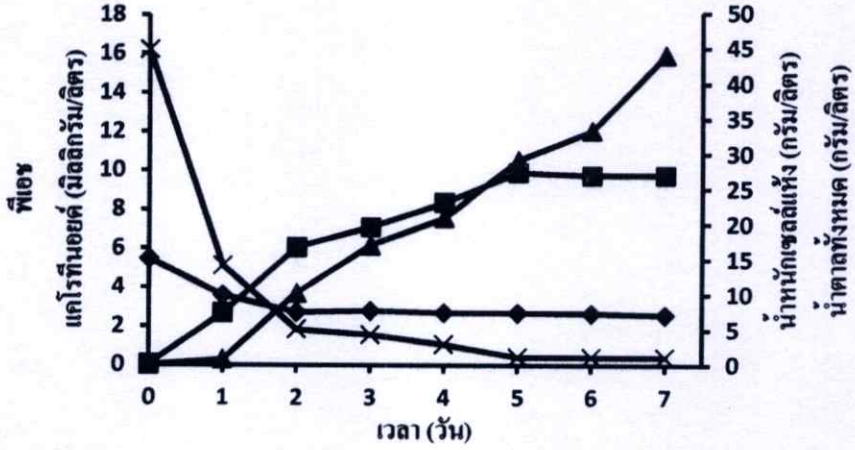
2.09 ในวันที่ 2 จากนั้นการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยมีเซลล์แห้งสูงสุด 19.85 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และการใช้น้ำตาลลดน้อยลงเมื่อการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อย น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือหลังการเพาะเลี้ยง 5.22 กรัมต่อลิตร และพีเอชคงที่มีค่าระหว่าง 2.09-2.42 ในช่วงวันที่ 2-7 เชื้อจะเริ่มผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้นในวันที่ 2 และจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นทุกวัน ตามปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จนเข้าสู่วันที่ 7 เชื้อจะผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 8.99 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.12

เมื่อใช้ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญอย่างต่อเนื่องในช่วงห้าวันแรกจากนั้นการเจริญลดลงและคงที่ ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 27.40 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 และปริมาณเซลล์แห้งของวันที่ 6 และ 7 คงที่อยู่ที่ 26.97 กรัมต่อลิตร ในสภาวะนี้พบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีโดยการใช้น้ำตาลสูงในช่วงสองวันแรกจากนั้นการใช้น้ำตาลลดลงเมื่อการเจริญน้อยลง โดยมีน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือ 1.10 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย การเปลี่ยนแปลงของพีเอชแปรผันตามการเจริญ เมื่อการเจริญสูงขึ้นค่าพีเอชจะลดลง ค่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่า 2.56 ในวันสุดท้าย แคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันสุดท้ายตามการเจริญของเชื้อและมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 15.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ดังแสดงในรูปที่ 4.13

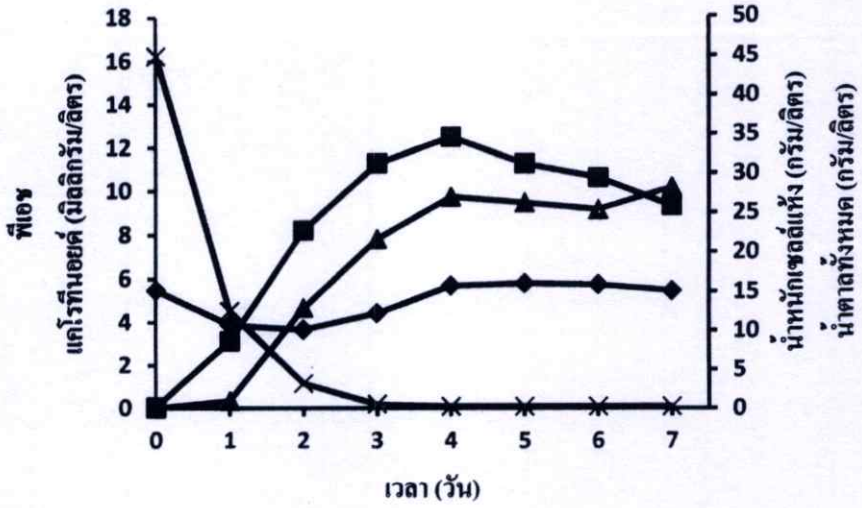
ในอาหารที่มียีสต์สกัดความเข้มข้น 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงสี่วันแรก และมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 34.63 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 และมีการใช้น้ำตาลได้ดีโดยจะใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วงสามวันแรกตามการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อการเจริญลดลงการใช้น้ำตาลจะคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง โดยน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือมี 0.21 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชลดลงต่ำสุด 3.66 ในวันที่ 2 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่ค่า 5.44-5.78 ตามการเจริญและการใช้น้ำตาลที่ลดลง การผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในสี่วันแรกตามการเจริญที่เพิ่มขึ้น จากนั้นการผลิตแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มที่จะคงที่และมีแคโรทีนอยด์สูงสุด 10.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย ดังแสดงในรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.12 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×); น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.13 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×); น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.14 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่มียีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×); น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)

จากตารางที่ 4.7 เมื่อมีการใช้แหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอย่างเดียว ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) 34.63 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร 3 ที่มียีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร และแคโรทีนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ 15.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ($p \leq 0.05$) ในอาหารสูตร 2 ซึ่งมียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดรองลงมา คือ 27.40 และ 27.32 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร 2 และชุดควบคุม 1 ซึ่งไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดรองลงมา 10.15 และ 8.99 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเชื้อเจริญในอาหารสูตร 2 และสูตร 1 ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.8 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อใช้อาหารสูตร 2 ที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 2.26 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือ 1.45 และ 1.28 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อใช้อาหารสูตร 3 และสูตร 1 ตามลำดับ ผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ 0.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ($p \leq 0.05$) เมื่อใช้อาหารชุดควบคุม 2 คือมีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่ง

ไนโตรเจน รองลงมาคือ 0.36 และ 0.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้อาหารสูตร 2 และสูตร 3 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกอาหารที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เพราะให้แคโรทีนอยด์และอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)
ชุดควบคุม 1	27.32 ±0.09 ^{b} (วันที่ 3)	7.74 ±0.00 ^{d} (วันที่ 7)	0.34 ±0.00^{e} (วันที่7)
ชุดควบคุม 2	17.03 ±0.01 ^{d} (วันที่ 7)	7.41 ±0.02 ^{e} (วันที่ 7)	0.44 ±0.00^{c} (วันที่ 7)
สูตร 1	19.85 ±0.04 ^{c} (วันที่ 7)	8.99 ±0.37 ^{c} (วันที่ 7)	0.45 ±0.02^{b} (วันที่ 7)
สูตร 2	27.40 ±0.03 ^{b} (วันที่ 5)	15.85 ±0.01^{a} (วันที่ 7)	0.59 ±0.00^{a} (วันที่ 7)
สูตร 3	34.63 ±0.01 ^{a} (วันที่ 4)	10.15 ±0.05 ^{b} (วันที่ 7)	0.39 ±0.00^{d} (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c dและ e แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ชุดควบคุม 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

สูตร 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

สูตร 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

สูตร 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.8 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจน	อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ มิลลิกรัม/ลิตร/วัน	ผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาล (มิลลิกรัม/กรัม)
ชุดควบคุม 1	1.11 ±0.00 ^{d} (วันที่ 7)	0.18 ±0.00 ^{d} (วันที่ 7)
ชุดควบคุม 2	1.06 ±0.00 ^{c} (วันที่ 7)	0.38 ±0.00 ^{a} (วันที่ 7)
สูตร 1	1.28 ±0.05 ^{c} (วันที่ 7)	0.23 ±0.01 ^{c} (วันที่ 7)
สูตร 2	2.26 ±0.00 ^{a} (วันที่ 7)	0.36 ±0.00 ^{b} (วันที่ 7)
สูตร 3	1.45 ±0.01 ^{b} (วันที่ 7)	0.23 ±0.00 ^{c} (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c d และ e แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ชุดควบคุม 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

สูตร 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

สูตร 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

สูตร 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีความต้องการแหล่งไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ จากการศึกษาในตอนแรกที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์แทนไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เชื้อมีการเจริญและใช้น้ำตาลลดลงทำให้ผลผลิตลดลง แต่เมื่อใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตการเจริญ การใช้น้ำตาลและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อสูงขึ้นกว่าเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เพราะในยีสต์สกัดมีสารอาหารหลายชนิดผสมอยู่ ได้แก่ กรด อะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุอื่นๆ โดยมีโปรตีนรวมร้อยละ 73-75 และโพลีแซคคาไรด์ร้อยละ 0.5-5 (Sommer, 1987) จากงานวิจัยต่างๆ ที่ได้มีการศึกษานำแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มาใช้ เช่น การศึกษาของ Tinoi (2005) มีการนำน้ำแป้งถั่วเขียวจากโรงงานผลิตวุ้นเส้นมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

ให้กับเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้น 0-100 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำแป้งถั่วเขียวเข้มข้น 23.63 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุด 10.35 กรัมต่อลิตร และ 3.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเทียบกับผลการทดลองที่ได้นั้นมีความแตกต่างกัน โดยผลการทดลองที่ได้จะใช้ปริมาณไนโตรเจนรวม 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ Tinoi และให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์ที่สูงกว่า และจากการศึกษาของ Aksu และ Eren (2007) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร และซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อ *R. glutinis* ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 125 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้พบว่า ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่ใช้มีความใกล้เคียงกัน การศึกษาของ Hui และคณะ (2007) ที่ได้ศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Phaffia rhodozyma* พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.28 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไนเตรท 0.49 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด 1.19 กรัมต่อลิตร ให้ผลชีวมวล 7.71 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลได้แอสทาแซนทีน 1.00 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ดังนั้นจากการทดลองและงานวิจัยอื่นๆ จึงสรุปได้ว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เป็นเชื้อยีสต์ที่มีความต้องการแหล่งไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์จึงจะเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดี

4.5 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์

ในการทดลองโดยใช้อาหารที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 45 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร โดยมีโพแทสเซียมฟอตเฟสและแมกนีเซียมซัลเฟตตามสูตรเดิม จากนั้นปรับพีเอชเริ่มต้น 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ให้ผลของการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ดังต่อไปนี้

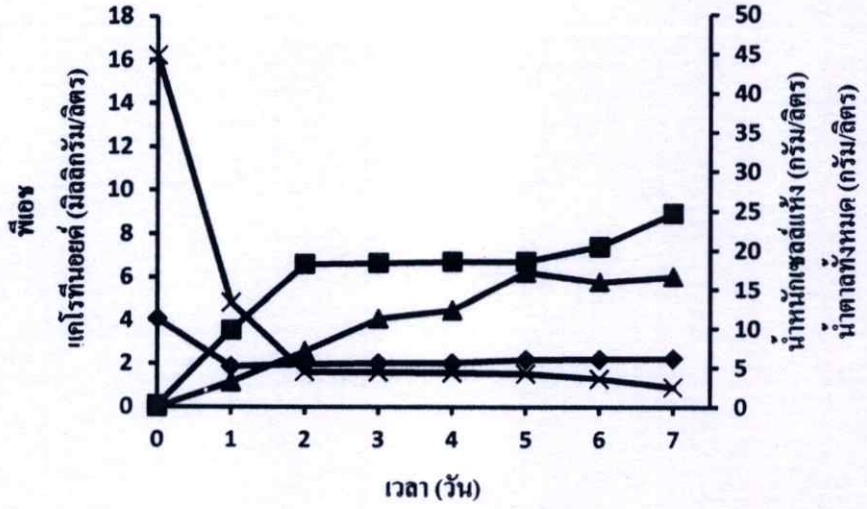
เมื่อใช้อาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงสองวันแรก จากนั้นเชื้อจะอยู่ในสภาวะคงที่ มีปริมาณเซลล์แห้งที่ 18.33-18.63 กรัมต่อลิตร จากนั้นในวันที่หกและเจ็ดการเจริญจะเพิ่มสูงขึ้นและมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 24.74 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย ช่วงสองวันแรกมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว และมีการใช้น้ำตาลลดลงเมื่อการเจริญคงที่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 2.53 กรัมต่อลิตร จากการเจริญและใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วของเชื้อส่งผลให้ค่าพีเอชมีความเป็นกรดสูง โดยค่าพีเอชลดลงเหลือ 1.88 ในวันแรก และค่อยๆ เพิ่มขึ้นมาเล็กน้อยมีค่าระหว่าง 2.02-2.22 ตั้งแต่วันที่ 3-7 สำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์นั้นพบว่า แคโรทีนอยด์ค่อยๆ ผลิต

สูงขึ้น ควบคู่ไปกับการเจริญที่สูงขึ้น และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 6.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 จากนั้นลดลงเหลือ 6.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย ดังแสดงในรูปที่ 4.15

เมื่อมีการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสองวันแรก จากนั้นการเจริญเข้าสู่สภาวะคงที่ในวันที่ 3-5 มีปริมาณเซลล์แห้ง 18.15-18.63 กรัมต่อลิตร การเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 6 มีปริมาณเซลล์แห้ง 21.53 กรัมต่อลิตร และลดลงเล็กน้อยในวันสุดท้าย การใช้น้ำตาลสูงสุดในช่วงสองวันแรกตามการเจริญ เมื่อการเจริญลดลงการใช้น้ำตาลลดลงด้วย และมีน้ำตาลเหลือในวันสุดท้าย 3.50 กรัมต่อลิตร ส่วนพีเอชมีค่าลดลงเหลือ 2.19 ในวันแรก จากนั้นค่าพีเอชจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นมีค่าระหว่าง 2.26-3.39 ในช่วงวันที่ 2-7 การผลิตแคโรทีนอยด์ในช่วงสี่วันแรกจะค่อยๆ ผลิตเพิ่มขึ้น เมื่อเข้าสู่วันที่ 5 เชื้อจะผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตามการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้น และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 11.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่สุดท้าย ดังแสดงในรูปที่ 4.16

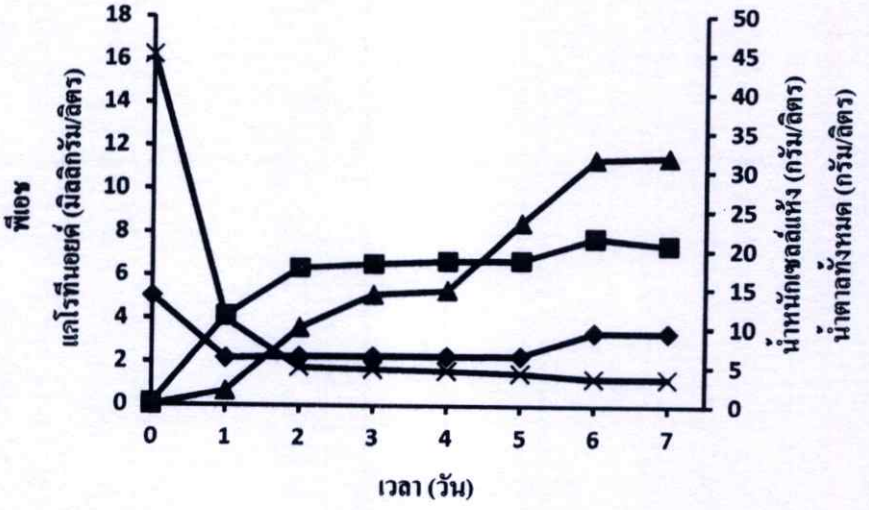
เมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.0 พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญได้ดีโดยมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 5 จากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง เซลล์แห้งสูงสุด 27.44 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 การใช้น้ำตาลของเชื้อลดลงเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ ในวันสุดท้ายมีน้ำตาลเหลือ 1.10 กรัมต่อลิตร ส่วนพีเอชพบว่ามีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายโดยในช่วงวันที่ 2-7 มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย มีค่าพีเอช 2.56-2.77 การผลิตแคโรทีนอยด์จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกไปจนถึงวันสุดท้ายแม้ว่าการเจริญจะเข้าสู่ระยะคงที่แล้วก็ตามและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 15.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันสุดท้าย ดังแสดงในรูปที่ 4.17

เมื่อมีการปรับพีเอชเริ่มต้น 7.0 เชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงสี่วันแรก จากนั้นการเจริญเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 6 และ 7 ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 24.43 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 การใช้น้ำตาลของเชื้อจะลดลงเมื่อเข้าสู่วันที่ 3 และหลังจากนั้นการใช้น้ำตาลมีแนวโน้มคงที่แปรผันตามการเจริญที่ลดลง มีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 2.54-2.87 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4-7 สำหรับค่าพีเอชพบว่าลดลงอย่างต่อเนื่องในสองวันแรกจากนั้นค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 3-7 ซึ่งมีค่าระหว่าง 2.99-4.71 การผลิตแคโรทีนอยด์ในวันแรกผลิตได้น้อย จากนั้นในวันที่ 2 การผลิตจะเพิ่ม-



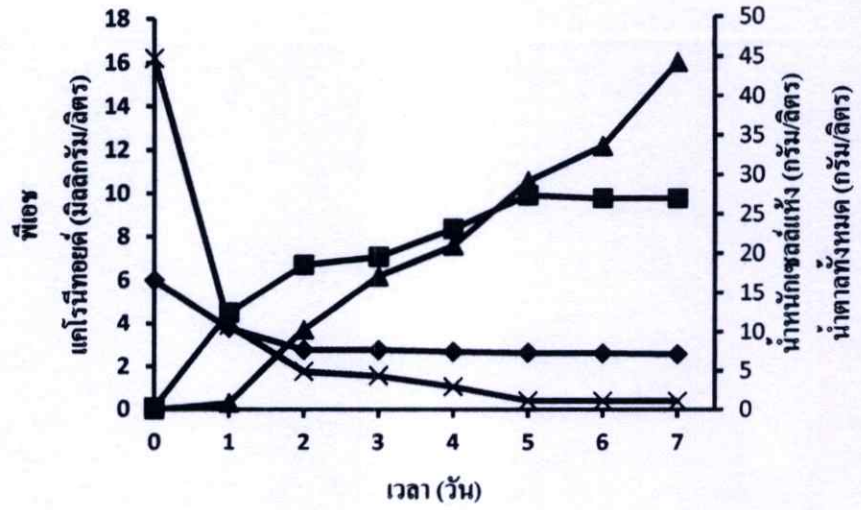
รูปที่ 4.15 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 4.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



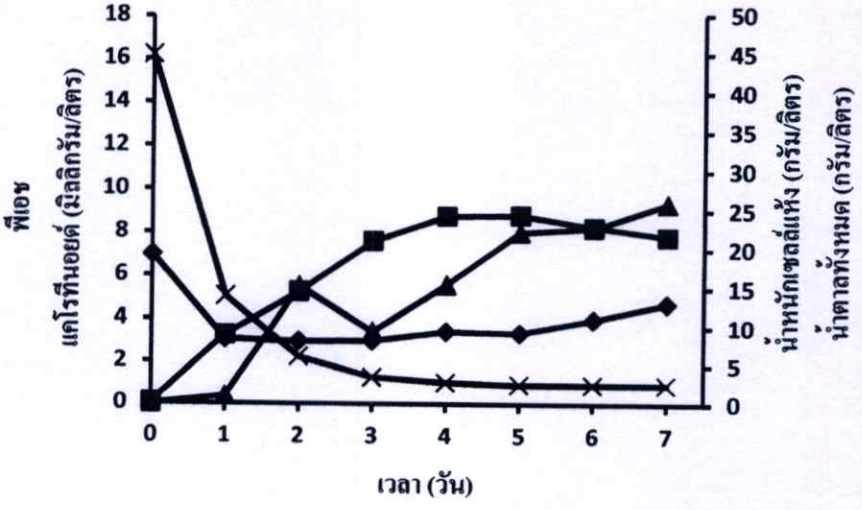
รูปที่ 4.16 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอช เริ่มต้น 5.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.17 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอช เริ่มต้น 6.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.18 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 เมื่อใช้อาหารที่ปรับพีเอช เริ่มต้น 7.0 ในการเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)

สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นเชื้อจะผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันสุดท้ายและมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 9.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.18

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 เทียบกับชุดควบคุมที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 พบว่าในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 5.5 และ 6.0 มีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 27.40 และ 27.44 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) รองลงมาคือ 24.74 24.43 และ 21.53 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 7.0 และ 5.0 ตามลำดับ การผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) 15.93 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออาหารมีพีเอชเริ่มต้น 6.0 โดย 1 กรัมเซลล์ให้แคโรทีนอยด์สูงสุด 0.59 มิลลิกรัม รองลงมาคือชุดควบคุม เชื้อผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 15.85 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 11.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่เจริญในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 7.0 จะผลิตแคโรทีนอยด์ได้น้อยที่สุด ดังตารางที่ 4.9

ในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นที่ค่าต่างๆ พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาลสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0 โดยมีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 2.27 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้แคโรทีนอยด์ 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งผลได้แคโรทีนอยด์ของอาหารที่มีพีเอช 6.0 ให้ค่าไม่แตกต่างจากอาหารชุดควบคุม ($p > 0.05$) อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์รองลงมาคือชุดควบคุม และอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 ซึ่งมีค่า 2.26 และ 1.64 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน สำหรับอาหารที่มีพีเอช 7.0 และ 4.0 ให้ค่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์น้อยที่สุด ตามลำดับ ผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาลรองลงมาคือ 0.28 0.22 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัม จากอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 7.0 และ 4.0 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 สามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 6.0 จึงเลือกค่าพีเอชนี้สำหรับใช้ในการศึกษาระดับถังหมักต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhosale และ Gadre (2000) ที่ได้ศึกษาเชื้อ *R. glutinis* NCIM 3353 ที่ถูกทำกลายพันธุ์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ให้ชีวมวลและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 16 กรัมต่อลิตร และ 86 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารที่มีพีเอช 6.0

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 4.0 5.0 6.0 และ 7.0

พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)
ชุดควบคุม	27.40 ±0.01[a] (วันที่ 5)	15.85 ±0.05[b] (วันที่ 7)	0.59 ±0.00[b] (วันที่ 7)
4.0	24.74 ±0.02[b] (วันที่ 7)	6.21 ±0.01[e] (วันที่ 5)	0.33 ±0.00[e] (วันที่ 5)
5.0	21.53 ±0.03[d] (วันที่ 6)	11.46 ±0.02[c] (วันที่ 7)	0.56 ±0.00[c] (วันที่ 7)
6.0	27.44 ±0.03[a] (วันที่ 5)	15.93 ±0.03[a] (วันที่ 7)	0.59 ±0.00[a] (วันที่ 7)
7.0	24.43 ±0.04[c] (วันที่ 5)	9.33 ±0.01[d] (วันที่ 7)	0.43 ±0.00[d] (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c d และ e แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม : พีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางที่ 4.10 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น 4.0 5.0 6.0 และ 7.0

พีเอช	อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ มิลลิกรัม/ลิตร/วัน	ผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาล (มิลลิกรัม/กรัม)
ชุดควบคุม	2.26 ±0.00 [b] (วันที่ 7)	0.36 ±0.00 [a] (วันที่ 7)
4.0	1.24 ±0.00 [e] (วันที่ 7)	0.15 ±0.00 [d] (วันที่ 7)
5.0	1.64 ±0.00 [c] (วันที่ 7)	0.28 ±0.00 [b] (วันที่ 7)
6.0	2.27 ±0.00 [a] (วันที่ 7)	0.36 ±0.00 [a] (วันที่ 7)
7.0	1.33 ±0.00 [d] (วันที่ 7)	0.22 ±0.00 [c] (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c d และ e แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ชุดควบคุม : พีเอชเริ่มต้น 5.5

ต่อมางานวิจัยของ Tinoi และคณะ (2005) ได้ศึกษาพีเอช 3.0-8.0 พบว่าเชื้อ *R. glutinis* สามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดในอาหารที่พีเอช 5.91 ให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุด 10.35 กรัมต่อลิตร และ 3.48 มิลลิกรัมต่อลิตร และการศึกษาของ Aksu และ Eren (2007) ที่ได้ศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตั้งแต่ 3.0-8.0 พบว่าเชื้อ *R. glutinis* เจริญได้สูงสุดเมื่ออาหารมีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ให้ปริมาณเซลล์แห้ง 4.9 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด 63.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออาหารมีพีเอชเริ่มต้น 6.0 จากรายงานการวิจัยและผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกัน โดยเชื้อ *R. glutinis* จะเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 ซึ่งปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์ที่ได้ไม่เท่ากันเนื่องจากปัจจัยอื่นๆ เช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ซึ่งมีผลต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยเช่นกัน และจากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกพีเอช 6.0 สำหรับการศึกษาในลำดับต่อไป เนื่องจากเป็นค่าพีเอชเริ่มต้นที่ทำให้มีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด และมีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 2.27 มิลลิกรัมต่อกรัมต่อวัน และผลได้แคโรทีนอยด์ 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นค่าอื่น

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับฟลาสก์พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้น 6.0 จะให้ปริมาณเซลล์แห้ง 27.44 กรัมต่อลิตร แคโรทีนอยด์ 15.93 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 2.27 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้แคโรทีนอยด์ 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าอาหารในผลการทดลองที่ 4.2 ที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตรเป็นส่วนประกอบ โดยผลของอาหารสูตรนี้ให้ปริมาณเซลล์แห้ง 27.32 กรัมต่อลิตร แคโรทีนอยด์ 7.74 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 1.11 ซึ่งพบว่าการผลิตแคโรทีนอยด์และอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่าอาหารสูตรเดิม 2 เท่า

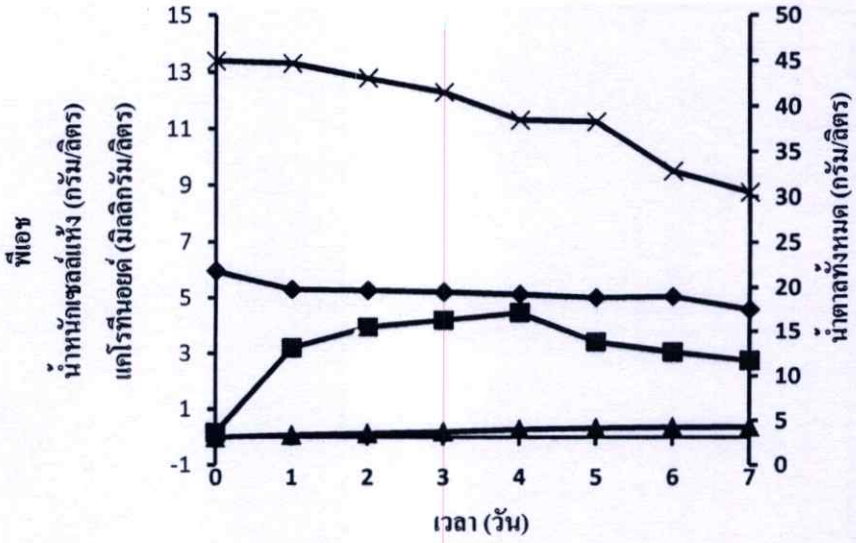
4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ในถังหมักใบพัดกวน ขนาด 5 ลิตร

ในการเพาะเลี้ยงระดับถังหมักใช้สูตรอาหารประกอบด้วย ซูโครส 45 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร แทนน้ำตาลและแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเดิม (กลูโคส 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร) โพแทสเซียมฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอช 6.0 นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักใบพัดกวนซึ่งใช้อาหารปริมาตร 3 ลิตร และมีเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไปร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ทำการเพาะเลี้ยงโดยการกวนและให้อากาศที่ต่างกันให้ผลการศึกษาดังนี้

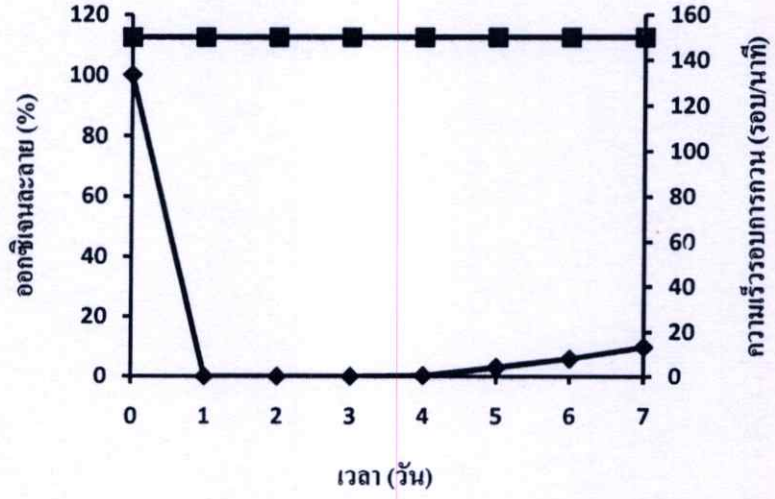
เมื่อนำเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มาเลี้ยงในถังหมักและกำหนดให้ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที พบว่าการเจริญวันแรกมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว จากนั้นการเจริญช้าลงและเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ในช่วงวันที่ 2-4 หลังจากนั้นปริมาณเซลล์เริ่มลดลง การเจริญของเชื้อที่สภาวะนี้ให้ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 4.47 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 เนื่องจากการเจริญของเชื้อน้อยจึงทำให้มีการใช้น้ำตาลได้น้อย และในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 30.51 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าพีเอชนั้นมีการค่าลดลงเล็กน้อยตั้งแต่วันแรกไปจนวันสุดท้าย โดยวันแรกพีเอชมีค่า 5.31 และค่าลดลงเหลือ 4.59 ในวันที่ 7 ในการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อที่สภาวะนี้ให้ผลผลิตน้อยมากเมื่อเทียบกับผลการศึกษาในระดับฟลาสก์ โดยวันแรกมีแคโรทีนอยด์ 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 0.38 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง จากการกำหนดความเร็วรอบการกวนและอัตราการให้อากาศคงที่ 150 รอบต่อนาที และ 3 ลิตรต่อนาที ตามลำดับ พบว่าเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้นอากาศจะถูกใช้ไปจนหมดค่าออกซิเจนละลายในอาหารมีค่าเท่ากับ 0 ตั้งแต่วันที่ 1-3 และเมื่อเชื้อมีการเจริญลดลงปริมาณออกซิเจนละลายเริ่มมีค่าสูงขึ้น และในวันที่ 7 มีค่าออกซิเจนละลายเหลือร้อยละ 10 ดังแสดงในรูปที่ 19 และ 20 ผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์และแคโรทีนอยด์ที่น้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในฟลาสก์เนื่องจากปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารลดต่ำลงถึง 0

ในการเพาะเลี้ยงที่กำหนดให้มีการละลายของออกซิเจนร้อยละ 60 พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญเติบโตดี การเจริญจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงสี่วันแรก ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 28.73 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 จากนั้นการเจริญเริ่มลดลงในวันที่ 6 เชื้อมีการใช้น้ำตาลปริมาณมากในวันแรก จากนั้นการใช้น้ำตาลลดลงเมื่อการเจริญเริ่มคงที่ น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในวันสุดท้ายหลังการเพาะเลี้ยงมี 1.03 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงโดยมีค่า 3.84 ในวันที่ 1 จากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอีกอย่างต่อเนื่องจนมีค่าพีเอชต่ำสุด 1.67 ในวันที่ 6 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อพบว่าเชื้อผลิตแคโรทีนอยด์อย่างรวดเร็วระหว่างวันที่ 1-3 จากนั้นการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีแคโรทีนอยด์สูงสุด 11.24 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 เมื่อมีการใช้ความเร็วรอบการกวนและให้อากาศสูงขึ้น พบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้น ค่าออกซิเจนละลายลดลงเหลือ 0 ในวันที่ 1 ความเร็วรอบการกวนสูงขึ้นช่วยให้มีออกซิเจนละลายเพิ่มขึ้นมีค่าร้อยละ 24.6 ในวันที่สอง เมื่อเชื้อมีการเจริญลดลงปริมาณออกซิเจนละลายจะเพิ่มสูงขึ้น และในวันสุดท้ายมีค่าออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำหมักร้อยละ 70 ดังแสดงในรูปที่ 21 และ 22

ผลการทดลองเมื่อกำหนดให้มีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 75 เชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะสองวันแรก จากนั้นมีแนวโน้มการเจริญคงที่ในระยะวันที่ 3-5 และปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 28.08 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ในช่วงวันแรกมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว จากนั้นการใช้น้ำตาลเริ่มลดลง ในวันที่ 7 มีน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 1.11 กรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชลดลงในวันแรกมีค่า 2.57 เมื่อการใช้น้ำตาลและเจริญน้อยลงค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าพีเอช 5.38 การผลิตแคโรทีนอยด์ในวันที่ 1 มีปริมาณน้อยมาก จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสี่วันแรกและเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อช้าลงและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 12.99 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 สำหรับค่าออกซิเจนละลายพบว่าลดลงเหลือร้อยละ 39.4 เมื่อความเร็วรอบการกวนสูงขึ้นปริมาณออกซิเจนละลายเพิ่มสูงขึ้นแปรผันกับการเจริญที่ลดลง และในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงระดับออกซิเจนละลายเท่ากับร้อยละ 80.5

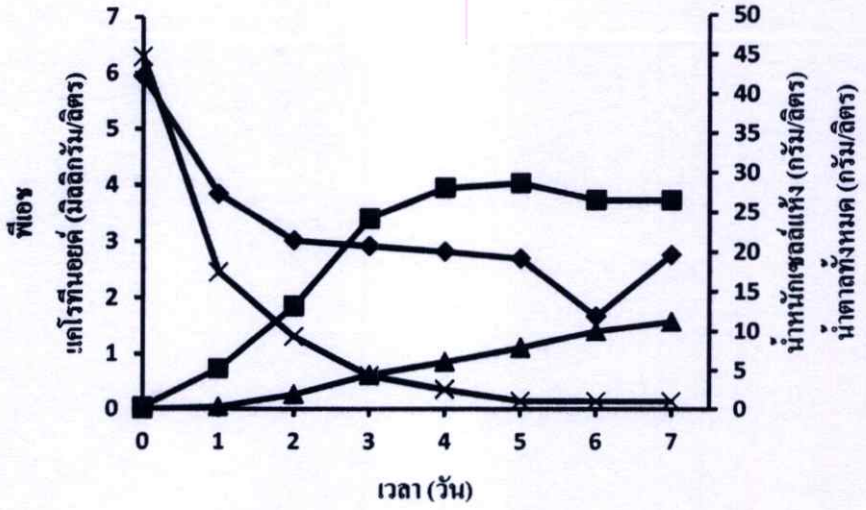


รูปที่ 4.19 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis*TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×);น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



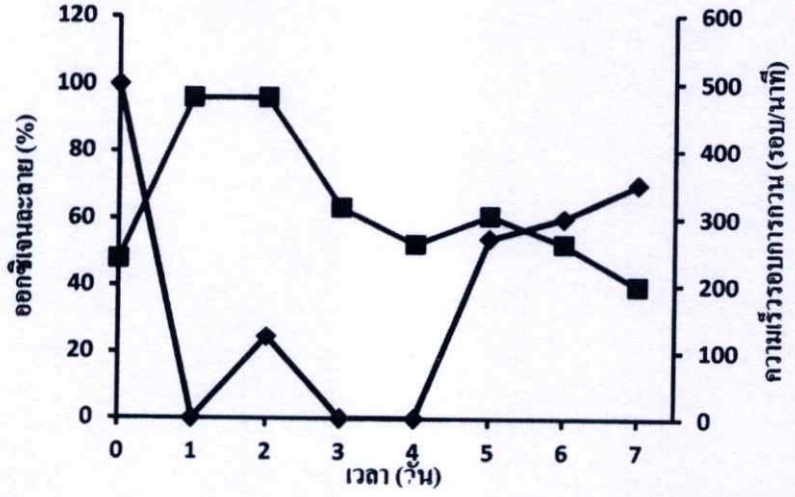
รูปที่ 4.20 ปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ*R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที

ความเร็วรอบการกวน (■) และปริมาณออกซิเจนละลาย (◆)



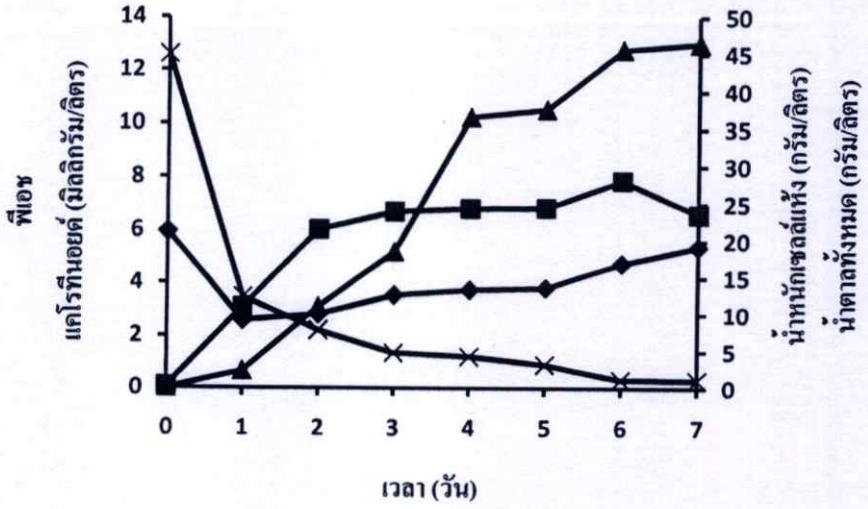
รูปที่ 4.21 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยมีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 60

พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×); น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)

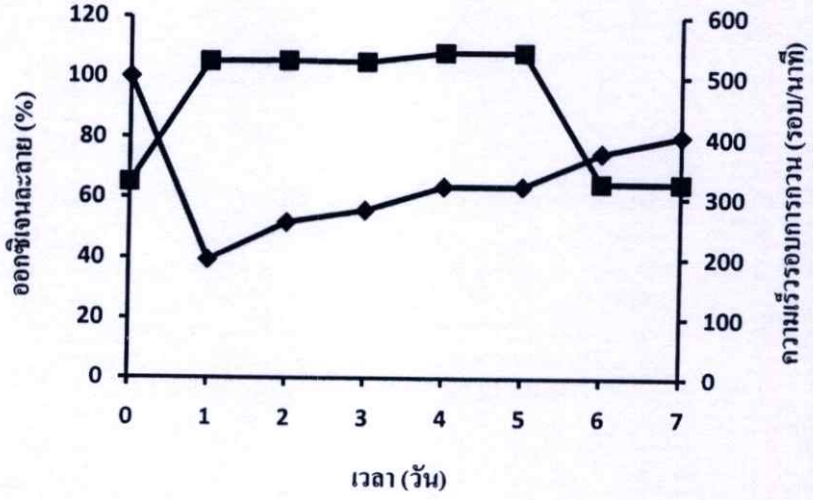


รูปที่ 4.22 ปริมาณออกซิเจนละลายและความเร็วรอบการกวนในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการให้อากาศ 5.40 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 240-480 รอบต่อนาที

ความเร็วรอบการกวน (■) และปริมาณออกซิเจนละลาย (◆)



รูปที่ 4.23 การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อ *R. glutinis*TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยมีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 75
พีเอช (◆); น้ำตาลทั้งหมด (×); น้ำหนักเซลล์แห้ง (■); แคโรทีนอยด์ (▲)



รูปที่ 4.24 ปริมาณออกซิเจนละลายและความเร็วรอบการกวนในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตรโดยมีอัตราการให้อากาศ 5.70 ลิตรต่อนาที และความเร็วรอบการกวน 300-540 รอบต่อนาที
ความเร็วรอบการกวน (◆) และปริมาณออกซิเจนละลาย (■)

ตารางที่ 4.11 เมื่อมีการนำเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มาเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่สภาวะต่างกัน 3 แบบ โดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในระดับฟลาสก์ พบว่าการเจริญดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในถังหมักและกำหนดให้มีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 60 รองลงมาคือกำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75 ถัดมาคือการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ และการเพาะเลี้ยงในถังหมักโดยมีความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที มีการเจริญน้อยที่สุด ซึ่งมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด 28.73, 28.08, 27.44 และ 4.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ได้จากเชื้อที่เจริญในระดับฟลาสก์ รองลงมาคือการเลี้ยงในถังหมักที่กำหนดออกซิเจนละลายร้อยละ 75 และ 60

ตารางที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่กำหนดสภาวะแตกต่างกัน 3 แบบ

สภาวะ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)
ชุดควบคุม	27.44 ±0.03^{c} (วันที่ 5)	15.93 ±0.03^{a} (วันที่ 7)	0.59 ±0.00^{a} (วันที่ 7)
แบบที่ 1	4.47 ±0.00^{d} (วันที่ 4)	0.38 ±0.00^{d} (วันที่ 7)	0.14 ±0.00^{d} (วันที่ 7)
แบบที่ 2	28.73 ±0.01^{a} (วันที่ 5)	11.24 ±0.01^{c} (วันที่ 7)	0.42 ±0.00^{c} (วันที่ 7)
แบบที่ 3	28.08 ±0.02^{b} (วันที่ 6)	12.99 ±0.02^{b} (วันที่ 7)	0.55 ±0.00^{b} (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c และ d แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม : การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

แบบที่ 1: กำหนดอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการไหลของอากาศ 3 ลิตรต่อนาที

แบบที่ 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 60

แบบที่ 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 75

ส่วนสภาวะที่มีความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที ให้แคโรทีนอยด์ต่ำสุด โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 15.93, 12.99, 11.24 และ 0.38 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.12 พบว่าเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 มีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ รองลงมาคือการเลี้ยงในถังหมักที่มีการกำหนดออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 75 และ 60 และในสภาวะที่มีความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที มีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ต่ำสุด โดยมีค่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 2.27, 1.86, 1.61 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับฟลาสก์ รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่กำหนดให้มีออกซิเจน-

ตารางที่ 4.12 อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุดจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่กำหนดสภาวะแตกต่างกัน 3 แบบ

สภาวะ	อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ มิลลิกรัม/ลิตร/วัน	ผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาล (มิลลิกรัม/กรัม)
ชุดควบคุม	2.27 ±0.00 [a] (วันที่ 7)	0.36 ±0.00 [a] (วันที่ 7)
แบบที่ 1	0.05 ±0.00 [d] (วันที่ 7)	0.03 ±0.00 [d] (วันที่ 7)
แบบที่ 2	1.61 ±0.00 [c] (วันที่ 7)	0.26 ±0.00 [c] (วันที่ 7)
แบบที่ 3	1.86 ±0.00 [b] (วันที่ 7)	0.30 ±0.00 [b] (วันที่ 7)

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c และ d แสดงถึงความสัมพันธ์ในสดมภ์เดียวกัน ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ชุดควบคุม : การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

แบบที่ 1: กำหนดอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการไหลของอากาศ 3 ลิตรต่อนาที

แบบที่ 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 60

แบบที่ 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 75

ละลายร้อยละ 75 และ 60 ส่วนการเพาะเลี้ยงที่ใช้ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที ให้ผลได้แคโรทีนอยด์ต่ำสุด ซึ่งมีค่าผลได้แคโรทีนอยด์ดังนี้ 0.36, 0.30, 0.26 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

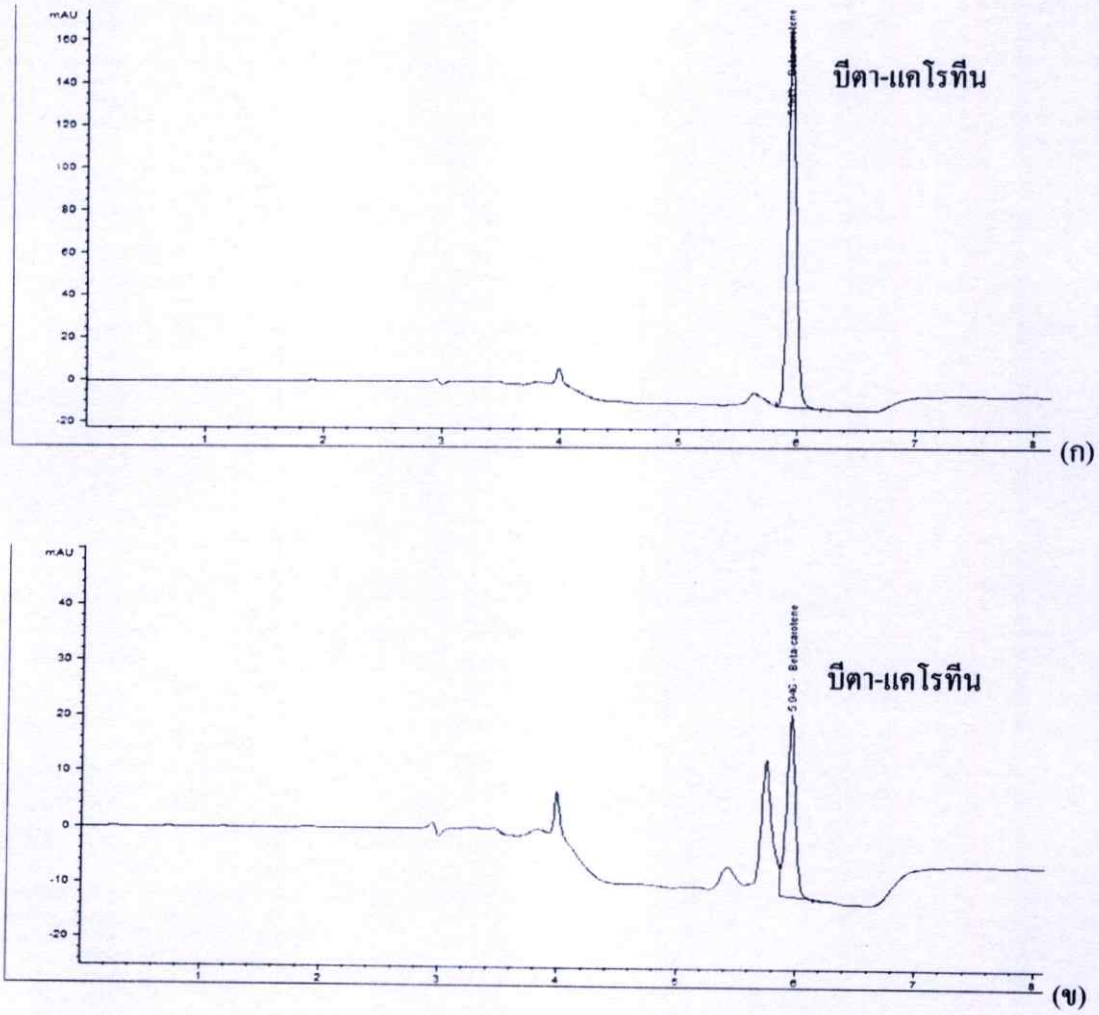
จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้แสดงให้เห็นว่าอากาศเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 โดยพบว่าเชื้อนี้ต้องการอากาศในการเจริญ ปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ร้อยละ 60 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 11.24 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 1.61 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายเป็นร้อยละ 75 จะได้แคโรทีนอยด์ 12.99 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 1.86 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Aksu และ Eren (2007) ที่ได้ศึกษาอัตราการให้อากาศ 0.0, 1.2 และ 2.4 วีวีเอ็ม พบว่าการให้อากาศมากขึ้นส่งผลให้มีแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้น โดยการให้อากาศ 2.4 วีวีเอ็ม ได้ปริมาณเซลล์แห้ง 5.4 กรัมต่อลิตร และแคโรทีนอยด์ 105.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Malisorn และ Suntornsuk (2007) พบว่าเชื้อ *R. glutinis* DM28 จะผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดได้ 201 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อมีการกำหนดออกซิเจนละลายร้อยละ 80 จากผลการทดลองที่ได้นี้จึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงแคโรทีนอยด์ในถังหมักซึ่งมีการกำหนดค่าออกซิเจนละลายร้อยละ 75 เหมาะสมที่สุดเนื่องจากให้ปริมาณเซลล์และแคโรทีนอยด์สูงกว่าสภาวะอื่นที่ได้ทำการทดลอง

4.7 ผลการศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์

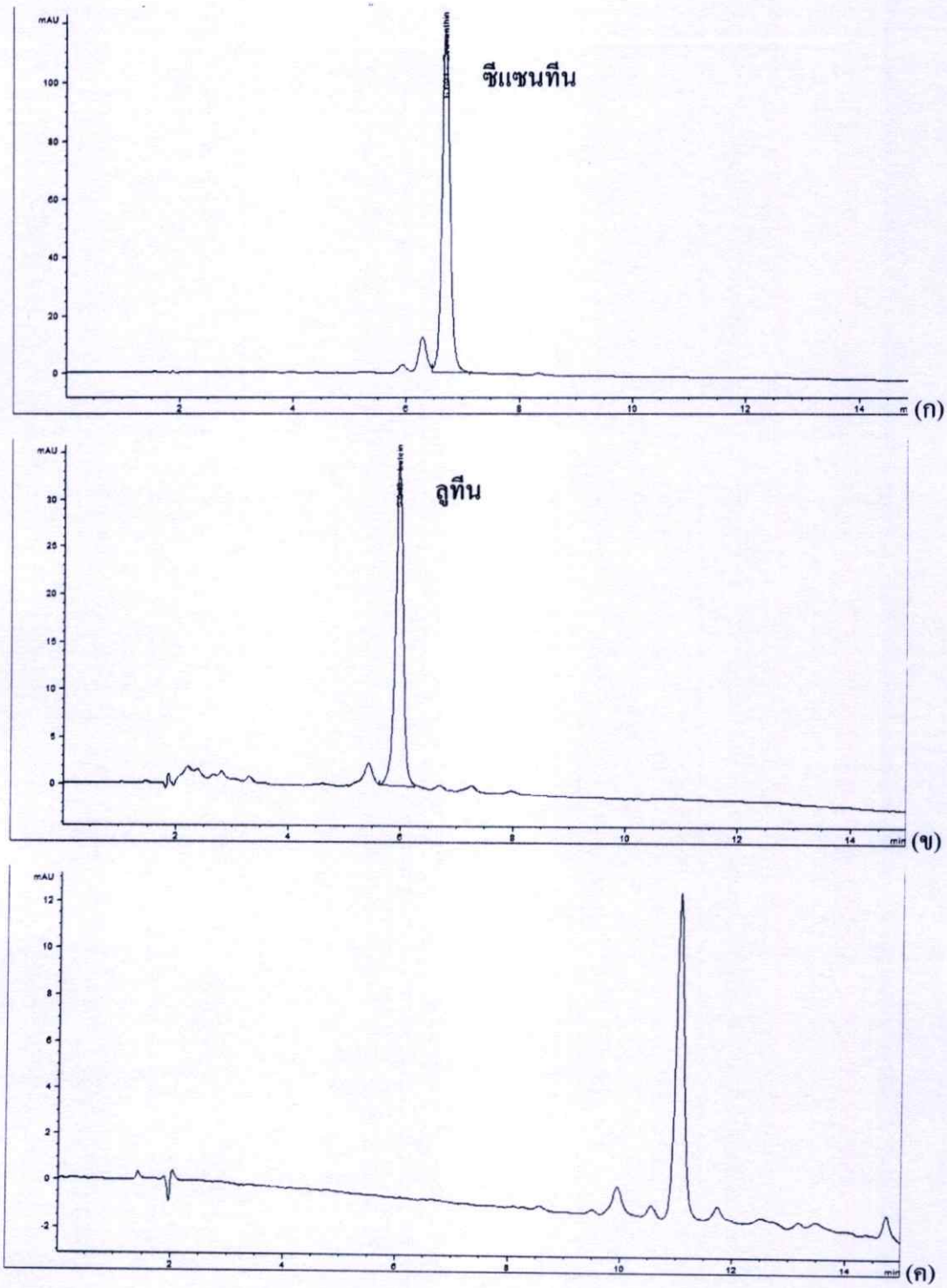
การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ด้วยเครื่อง HPLC เมื่อใช้สารแคโรทีนอยด์มาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ บีตา-แคโรทีน ลูทีน และซีแซนทีน พบว่าสารสกัดแคโรทีนอยด์มีบีตา-แคโรทีน เมื่อใช้คอลัมน์ water Bondapak C-18 ดังแสดงในรูปที่ 4.25 และเมื่อวิเคราะห์หาลูทีนและซีแซนทีนด้วยคอลัมน์ Princesphere C-30 ไม่พบสารลูทีนและซีแซนทีน ดังแสดงในรูปที่ 4.28 เมื่อนำผลการวิเคราะห์ของสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 พบว่าสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้นั้น ประกอบด้วย บีตา-แคโรทีน 199.42 ไมโครกรัมต่อสารสกัด 100 มิลลิลิตร และไม่พบสารลูทีนและซีแซนทีนเมื่อนำมาเทียบกับโครมาโตแกรมมาตรฐาน

ได้มีการศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์จากเชื้อยีสต์ *R. glutinis* พบว่ายีสต์ชนิดนี้สามารถผลิตสารบีตา-แคโรทีนเพียงชนิดเดียว ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้แตกต่างจากงานวิจัยของ Buzzini และคณะ

(2007) พบว่าเชื้อ *R. glutinis* DBVG 6081 สามารถผลิตสารโทรูลาโรดิน โทลูลีน บีตา-แคโรทีน และแกมมา-แคโรทีนได้ และจากงานวิจัยของ Park และคณะ (2007) ได้ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแคโรทีนอยด์ และทำการการวิเคราะห์สารสีที่เชื้อผลิตด้วย HPLC และ Silica gel TLC plate จากเชื้อ *R. glutinis* KCTC 7989 พบสารบีตา-แคโรทีน โทรูลีน และโทรูลาโรดีน



รูปที่ 4.25 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานบีตา-แคโรทีน (ก) และสารสกัดจากเชื้อ *R.glutinis* TISTR 5159 (ข) ที่วิเคราะห์โดยใช้ HPLC



ภาพที่ 4.26 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานซีแซนทีน (ก) สารมาตรฐานลูทีน (ข) และสารสกัดจากเชื้อ *R.glutinis* TISTR 5159 (ค) ที่วิเคราะห์โดยใช้ HPLC

Simpson และคณะ (1964) ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. glutinis* พบว่า สารสารตั้งต้นในการผลิตสารแคโรทีนอยด์คือสารไฟโตอีนแล้วเปลี่ยนเป็นแกมมา-แคโรทีน จากนั้น แกมมา-แคโรทีนสามารถเปลี่ยนเป็นบีตา-แคโรทีนหรือโทรูลีนได้ สำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ของ เชื้อ *R. glutinis* DM28 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้น้ำหัวไชเท้าดองเกลือเป็นสับสเตรท พบว่ายีสต์ ผลิตบีตา-แคโรทีนได้ 92 ไมโครกรัมต่อลิตร (Malisorn และ Suntornsuk, 2009)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาหาแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 โดยใช้สูตรอาหารที่ดัดแปลงจาก Aksu และ Eren (2007) โดยมีส่วนประกอบคือ กลูโคส 15 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร แทนน้ำกลั่นตามสูตรเดิม ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์โดยนำน้ำตาลทั้งหมดห้าชนิดมาเปรียบเทียบกัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส กาแลคโตส และแมนนิทอล พบว่าน้ำตาลซูโครสดีที่สุด ให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์ 24.05 กรัมต่อลิตร และ 7.27 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 1.04 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้แคโรทีนอยด์ต่อการใช้น้ำตาล 0.57 มิลลิกรัมต่อกรัม จากนั้นนำมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 15 25 35 และ 45 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 45 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุด 27.32 กรัมต่อลิตร และ 7.74 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์และผลได้แคโรทีนอยด์ 1.11 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ เมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์สูงสุด 17.03 กรัมต่อลิตร และ 7.41 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ 1.06 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้แคโรทีนอยด์ 0.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล จากนั้นนำมาศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.5 และ 3.5 กรัมต่อลิตร 2.5 และ 2.5 กรัมต่อลิตร กับ 3.5 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุด ให้ปริมาณเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์ 27.40 กรัมต่อลิตร และ 15.85 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตและผลได้แคโรทีนอยด์ 2.26 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล หลังจากนั้นนำมาศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่ 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 พบว่าเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยง

เชื้อ 6.0 ทำให้การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ดีที่สุด คือมีเซลล์แห้ง 27.44 กรัมต่อลิตร และแคโรทีนอยด์ 15.93 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตและผลได้แคโรทีนอยด์ 2.27 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์

จากนั้นนำมาศึกษาในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยเปรียบเทียบ 3 สภาวะ คือ กำหนดให้มีความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และกำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60 และ 75 พบว่าการกำหนดให้ออกซิเจนละลายร้อยละ 75 สามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 28.08 กรัมต่อลิตร และ 12.99 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตและผลได้แคโรทีนอยด์สูงสุด 1.86 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.30 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งน้อยกว่าผลการทดลองจากระดับฟลาสก์ จากการวิเคราะห์สารสกัดแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ด้วย HPLC พบสารบีตา-แคโรทีน 199.42 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ไม่พบสารลูทีนและซีแซนทีนในตัวอย่างสารสกัด

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษานี้ยังไม่ได้ศึกษาบางปัจจัย เช่น การให้แสง อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ครอบคลุมทุกปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์
2. นอกจากสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์แล้วควรมีการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่จะช่วยส่งผลให้ได้ผลผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นด้วย เช่น การใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ การใช้กรดซิตริก หรือ TWEEN 80 เป็นต้น

บรรณานุกรม

บุษบา ยงสมิทธ์, 2542. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตร

ปรียาภรณ์ แจ้งการกิจ, 2538. การผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลินาโดยวิธีการเลี้ยงแบบต่างๆ วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, ปีที่ 6 ฉบับที่ 6 หน้า 4-10

สรายุทธ สุภาพรรณชาติ, 2552. สารลูทีนกับจอประสาทตา นิตยาสารหมอชาวบ้าน เล่มที่ 358. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน

สิรินดา ยุ่นฉลาด และ พิพัฒน์ รวมตะคุ, 2551. แคโรทีนอยด์รงควัตถุเพื่อสุขภาพพบในผักและผลไม้เท่านั้นหรือ. วารสารศูนย์วิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ปีที่ 16 ฉบับที่ 4 หน้า 13-19

Aksu, Z. and Eren, A.T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochem. 40: 2985–2991.

Aksu, Z. and Eren, A.T. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochem. Eng. J. 35: 107-113.

Andrew, A. G., Phaff, H.J. and Starr, M.P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma* are pigmented fermenting yeast. Phytochemistry 15: 1009-1011.

Ausich, R.L. 1997. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. Pure Appl. Chem. 69: 2169–2173.

Bendix, S. and Allen, M.B. 1962. Ultra-violet induced mutants of *Chlorella pyrenoidosa* Arch. Mikrobiol. 41: 115-141.

Ben-Amotz, A. and Avron, M.B. 1983. On the factors which determine the massive β-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella salina.* Plant Physiol. 72: 593-597.

Bhosale, P. and Gadre, R.V. 2001. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. Lett. Appl. Microbiol. 33: 12–16.

Bhosale, P. and Gadre, R.V. 2001. β-Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 327-332.

Bhosale, P. and Gadre, R.V. 2002. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. Lett. Appl. Microbiol. 34: 349-353.

Blakeslee, A.F. 1904. Sexual reproduction in the Mucorinae. Proc. M. acad. Arts Sci. 40: 205-319.

Blum, H.F. 1941. Photodynamic Action and Diseases Caused by Light Van Nostrand Reinhold, New York.

Bocanegra, A.R.D., Legarreta, I.G., Jeronimo, F.M. and Campocosio, A.T. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technol. 92: 209-214.

Braeunlich, K. 1978. The chemistry and action of pigment in poultry diets. World Poultry Congr. 15: 236-240.

Bramley, P.M. and Mackenzie, A. 1988. Regulation of carotenoids biosynthesis. Curr. Top. Cell. Regul. 29: 291-345.

Britton, G. 1983. The biochemistry natural pigments. Cambridge University. Press. Cambridge: 23-73

Britoon, G. and Khachik, F. 2009. Carotenoid in food. Carotenoids 5: 45-66

Britton, G., Liaaen-Jenses, S. and Pfander, H. 2009. Nutrition and Health. Carotenoids 5: 47-49

Bunghez, I.R., Raduly, M., Doncea, S., Aksahin, I. and Ion, R.M., 2011. Lycopene determination in tomatoes by different spectral techniques (UV-VIS, FTIR and HPLC). J. Nanomaterial and Biostructures 6, 3: 1349-1356.

Buzzini, P. and Martin, A. 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. Bioresource Technol. 71: 41-44.

Buzzini, P. 2000. An optimization study of carotenoids production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24: 41-45.

Buzzini, P. 2001. Batch and fed-batch carotenoids production by *Rhodotorula glutinis Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. J. Appl. Microbiol. 90: 843-847.

Calo P., Velazquez, J.B., Sieiro, C., Blanco, P., Longo, E. and Villa, T.G., 1995. Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. J. Agric. Food Chem. 43: 1396-1399.

Cerda-Olmedo, E. 1989. Production of carotenoids with fungi, Biotechnology of Vitamins and Growth Factors. Elsevier Applied Science, New York, 29-42.

Chan, H.Y. and Ho, K.P. 1999. Growth and carotenoid production by pH-stat cultures of *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Lett. 21: 953-958.

Chumpolkulwong, N., Kakizono, T., Nagai, S. and Nishio, N. 1997. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. J. Ferment. Bioeng. 83: 429-434.

Christian, K., Holger, M., Horst, S., Helmut, A., Karl, K., Hans, D.M. and Hans, B. 2005. Structure investigations on assembled astaxanthin molecules. J. Molecular Structure 750: 109-115

Ciegler, A. 1965. Microbial carotenogenesis. Adv. Appl. Microbiol. 7: 1-34.

Dubois, M. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 31: 350-356.

Durrer, S. Schlmid, P. and Schlumpf, M. 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filter-an update. Toxicology 205: 113-122.

Eugster, H. P., Jones, B. F., and Sheppard, R. A. 1967. New hydrous sodium silicates from Kenya, Oregon and California; possible precursors of chart. Geological Society of America, Program Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, 60.

Fiasson, J.L., Petersen, R.H., Bouchez, M.P. and Aspin, N. 1970. Cobtribution biochimique a la connaissance taxinomique decertains champeqnons canthareollides et clavarioides. Rev. Mycol. 34: 357-364.

Florencio, J.A., Soccol, C.R., Furlanetto, T.M.B., Bonfim, N., Fontana, J.D. 1998. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. Bioprocess Eng. 19: 161-164.

Freeman, B.C. and Beattie, G.A. 2008. An Overview of Plant Defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.

Frengova, G., Simova, E., Pavlova, K., Beshkova, D. and Grigorova, D.1994. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultra-filtrate. Biotechnol. Bioeng. 44: 888–894.

Frengova, G.I., Simova, E.D. and Beshkova, D.M. 2003. Carotenoid production by lactose-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultra-filtrate. Z. Naturforsch. 58: 562–567.

Frengova, G., Simova, E. and Beshkova, D. 2004. Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra*. Appl. Biochem. Biotechnol. 112: 133–141.

Frengova, G.I. and Beshkova, D.M. 2009. Carotenoid from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeast of biotechnological importance. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 163-180.

Goldstrohm, D.D. and Lily,V.G. 1965. The effect of light on the survival of pigmented and nonpigmented cells of *Facryopinax spathularia*. Mycologia. 57: 612-623.

Goodwin, T.W. 1972. Carotenoid in fungi and non-photosynthetic bacteria. Ind. Microbiol. 11: 29-88.

Goodwin, T.W. 1980. Biosynthesis of carotenoids. The biochemistry of the carotenoids 1, Chapman and Hall, London. 33-77.

Griffiths, M., Sistrom, W.R.G., Cohen-Bazire and Stanier, R.Y. 1955. Function of carotenoids in photosynthesis Nature, 176: 1211-1214

Gross, J. 1991. Pigment in vegetables: Chlorophyll and carotenoids. Van Nostrand Reinhold. New York

Harker, M., Tsavalos, A.J. and Young, A.J. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technol. 55: 207-214

Herzberg, G. 1971. The spectra and structures of simple free radicals, http://th.wikipedia.org.

Hayman, E.P., Yokoyama, C.O., Chichester, C.O., Simpson, K.L. 1974. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. J. Bacteriol. 120: 1339-1343.

Hu, Z.C., Zeng, Y.G., Wang, Z. and Shen, Y.C. 2006. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Enzyme Microb. Technol. 39: 586–590.

Hu, Z.C., Zheng, Y.G., Wang, Z. and Shen, Y.C. 2007. Production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* ZJUT46 with fed-batch fermentation in 2.0 m3 fermenter. Food Technol. Biotechnol. 45: 209–212.

Ichiyama, S., Shimokata, K. and Tsukamura, M. 1988. Relationship between mycobacterial species and their carotenoids pigment. Microbiol. Immunol. 32: 473-479.

Johnson, E.A. and Lewis, M. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 115: 173–183.

Johnson, E.A., Lewis, M.J. and Grau, C.R. 1980. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma* Poultry. Sci. 59: 1777-1782.

Johnson, E.A. and Schroeder, W.A. 1995. Microbial carotenoid. Biotechnology 53: 134-135.

Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B. and Lusby, W.R. 1992. Seperation and quantitation of carotenoid in foods. Methods Enzymol. 213: 347-359

Khodaiyan, F.; Razavi, S.H.; Emam-Djomeh, Z.; Mousavi, S.M.A., Hejazi, M.A. 2007. Effect of culture condition on Canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 195-201.

Kusdiyantini, E., Gaudin, P., Goma, G. and Blanc, P.J. 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. Biotechnol. Lett. 20: 929–934.

Lampila, L.E., Wallen S.E., Dulerman L.B., Lowry S.R. 1985. The effect of illumination of growth and β-carotene content of *Blakeslea trispora* grown in whey. Lebensmittel Wiss Technol. 18: 370-373.

Libkind, D., van Brook, M. 2006. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. World J. Microbiol. Biotechnol. 22: 687–692.

Lee, P.C and Dannert, S.C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 1-11.

Liu, Y.S. and Wu, J.Y. 2007. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. Biochem. Eng. J. 36: 182-189.

Longo, E., Siero, C., Velazquez, J.B., Calo, P., Cansado, J. and Villa, T.G. 1992. Astaxanthin production from *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Forum Eur. 9: 565–567.

Lopez-Diaz, I. and Cerda-Olmedo, E. 1980. Relationship of photocarotenogenesis to other behavior and regulatory responses in *Phycomyces*. Planta. 150: 134-139.

Maldonade, I.R., Rodriguez-Amaya, D.B. and Scamparini, A.R.P. 2007. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. Food chemistry 107: 145-150.

Malea, M.C.B., Brindley, C., Rio, E.D., Acien, F.G., Fernandez, J.M. and Molina, E. 2005. Modeling cf and accumulation of carotenoid in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. Biochem. Eng. J. 26: 107-114.

Malisorn, C. and Suntornsuk, W. 2007. Optimization of β-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. Bioresource Technol. 99: 2281-2287.

Malisorn, C. and Suntornsuk, W. 2009. Improve β-carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. Biochem. Eng. J. 43: 27-32

Margalith, P. and Meydav, S. 1968. Some observations on the carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula macilaginosa.* Phytochem. 7: 765-8

Margalith, P.Z. 1992. Pigment Microbiology. Chapman & Hall, London.

Mark, A.S., Cynthia, A. Ma., Thanyanun, N., Phillip, C., Wright and Roberto E. Armenta, 2012. Compartive analysis of β-carotene hydroxylase genes for astaxanthin biosynthesis. Natural Products Article.

Martin, A., Lu, C. and Patel, T. 1993. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. J. Ferment. Bioeng. 76: 321–325.

Mattea, F., Martin, A., Cocero, M.J. 2009. Carotenoid processing with supercritical Fluids. J. Food Eng. 93: 255-265.

Melendez-Martinez, A.J.; Vicario, I.M. and Heredia, F.J. 2003. A Routine High-Performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juice. J. Agri. Food Chem. 51: 4219-4224

Moriel, D.G., Chociai, M.B., Machado, I.M.P., Fontana, J.D. and Bonfim, T.M.B. 2005. Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *PhaYa rhodozyma* in fed-batch process. Braz. Arch. Biol. Technol. 48: 397–401.

Munzuroglu, O., Karatas, F. and Geckil, H. 2003. The vitamin and selenium contents of apricot fruit of different varieties cultivated in different geographical regions. Food Chem. 83: 205-212.

Nelis H., De Enheer, A.P., 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. J. App. Bacteriol. 70: 181-191.

Ni, H., Chen, Q., Ruan, H., Yang, Y., Li, L., Wu, G., Hu, Y. and He, G. 2007. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 8: 365–370.

Parajo, J.C., Santos, V. and Vazquez, M. 1997. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. Process Biochem. 33: 181-187.

Park, P.K., Cho, D.H., Kim, E.Y. and Chu, K.H. 2007. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 429–434.

Perrier, V., Dubreucq, E. and Galzy, P. 1995. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. Arch. Microbiol. 164: 173–179.

Polulyakh, O.V., Podoprigova, O.I., Eliseev, S.A., Ershov, Y.V., Bykhovsky, V.Y. and Dmitrovski, A.A. 1991. Biosynthesis of torulene and torularhodin in the yeast *Phaffia rhodozyma*. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 27: 541–545.

Ramirez, J., Obledo, N., Arellano, M. and Herrera, E. 2006. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fed-batch culture using a low cost medium feeding. E-Gnosis. 4: 1–9.

Reyes, G.D., Mercado, S.M., So, R.S. and Alviar, C.C. 2004. Production of biodegradable plastic from local strains of *Bacillus megaterium*. Philippine Agric. Sci. 87: 76-86.

Sguina, F.M., Yamashita, F., Pereira, J.L. and Mercadante, A.Z. 2002. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *Rhodotorula glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. Food Biotechnol. 16: 227–235.

Simpson, K.L., Nakayama, T.O.M., Chichester, C.O. 1964. Biosynthesis of yeast carotenoids. J. Bacteriol. 88: 1688-1694.

Simova, E.D., Frengova, G.I., Beshkova, D.M. 2003. Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra-Lactocacillus casei* subsp. *casei* co-cultures in whey ultra-filtrate. Z. Naturforsch. 58: 225–229.

Simova, E.D., Frengova, G.I. and Beshkova, D.M. 2004. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultivated with yogurt starter cultures in whey ultra-filtrate. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31: 115–121.

Somashekar, D. and Joseph, R. 2000. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. World J. Microbiol. Biotechnol. 16: 491–493.

Sommer, R. 1987. Hefeautolysate-Herstellung, Eigenschaften and anwendungen BDL-speaktrum 3, Bund Deutscher Lebensmittle e.v. Rhenania Fachverlag, Hamburg.

Sujarit, C., Yongesmith, B., H-kittikun, A. and Siripatana, C. 2010. Citric acid regulates astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 in Thai coconut water. Inter. Food Research J. 17: 947-960.

Sutter, R.P. 1975. Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 127-130.

Suzue, G., Tsukada, K. and Tanaka,S. 1967. A new triterpenoid from a mutant of *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Acta. 144: 186-188.

Tada, M., Tsubouchi, M., Matsuo, K., Takimoto, H., Kimura, Y. and Takagi, S. 1990. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta*. VIII. Effect of mevinolin on photoinduced carotenogenesis. Plant Cell Physiol. 31: 319–323.

Tang, X.S., Shyr. J., Tao, L., Sedkova, N. and Cheng, Q. 2007. Improvement of a CrtO-type of beta-carotene ketolase for Canthaxanthin production in *Methylomonas* sp., Metab. Eng. 9: 348-354.

Tinoi, J., Rakariyatham, N. and Deming, R.L. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process Biochem. 40: 2551-2557.

Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantharika, M., Tanticharoen, M. and Verduyn, C. 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahezaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. Bioresource Technol. 98: 281-287.

Van den Ende, H. and Stegwee, D. 1971. Physiology of sex in Mucorales. Bot. Rev. 37: 22-36.

Vazquez, M. and Martin, A.M. 1998. Mathematical model for *Phaffia rhodozyma* growth using peat hydrolysates as substrate. J. Sci. Food Agric. 76: 481–487.

Vazquez, M. 2001. Effect of light on carotenoid profile on *Xanthophyllomyces dendrorhous* strain (formerly *Phaffia rhodozyma)*. Food Technol. Biotechnol. 39: 123-128.

Vijayalakshmi, G., Shobha, B., Vanajakshi, V., Divakar, S. and Manohar, B. 2001. Response surface methodology for optimization of growth parameters for the production of carotenoids by a mutasnt strain of *Rhodotorula gracilis*. Eur. Food Res. Technol. 213: 234–239.

Voaides, C. and Dima, R. The effect of carbon source on carotenoid production by *Rhodotorula* sp. Archiva. Zootechnica. 14: 75-83.

Waldenstedt, L., Inborr, J., Hansson, I. and Elwinger, K. 2003. Effect of astaxanthin-rich algal meal (*Haematococcus pluvalis)* on growth performance caecal campylobacter and clostridial counts and tissue astaxanthin concentration of broiler chicken. Anim. Feed Sci. Tech. 108: 119-132.

Willstatter, R. and Mieg, W. 1907. Ueber die Gelben Begleiter des Chlorophylls, Justus Liebigs Anal. Chem. 355: 1-28.

Yimyoo, T., Yongmanitchai, W. and Limtong, S. 2011. Carotenoid production by *Rhodosporidium paludigenum* DMKU3-LPK4 using glycerol as the carbon source. Kasetsart J. 45: 90-100.

Yuan, J.P., Chen, F., Liu, X., and Li, X.Z. 2002. Carotenoid composition in the green microalga Chlorococcum. Food Chem. 76: 319–325.

Yong, J.W.H., Ge, L., Fei, Y. Ng and Tan, S.N. 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (Cocos nucifera L.) Water Molecules. 14: 5144-5164.

Zheng, Y.G., Hu, Z.C., Wang, Z. and Shen, Y.C. 2006. Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Food Bioprod. Process 84: 164–166.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารในการทดลอง

1. สูตรอาหารของ Aksu และ Eren (2007)

กลูโคส	15	กรัม
ยีสต์สกัด	2.5	กรัม
มอลต์สกัด	2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
โพแทสเซียมฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. สูตรอาหารเหลวยีสต์สกัด มอลต์สกัด (Yeast extract malt extract broth)

กลูโคส	10	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

3. สูตรอาหารแข็งยีสต์สกัด มอลต์สกัด (Yeast extract malt extract slant)

กลูโคส	10	กรัม
ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมกลูโคสมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

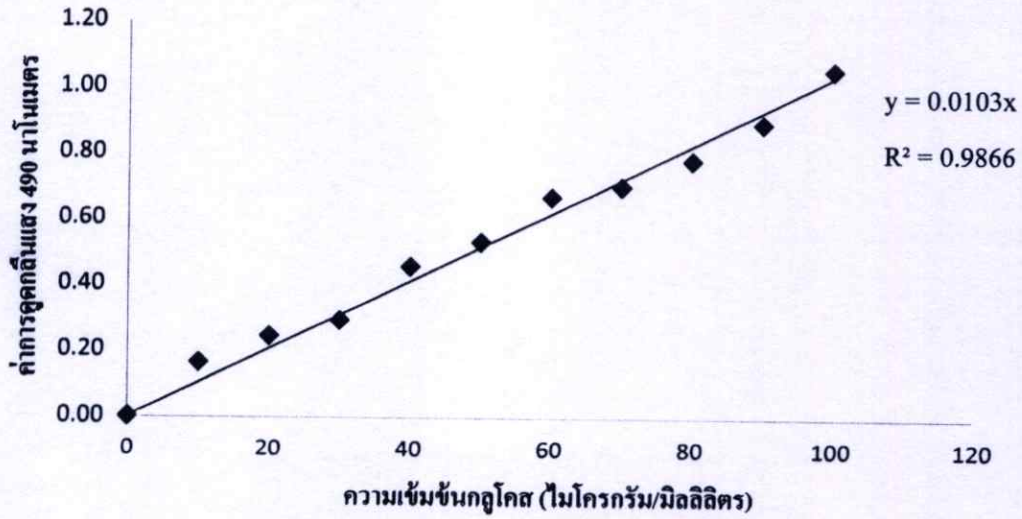
1. ชั่งน้ำตาลกูลโคส (glucose anhydrous) 2 กรัม จากนั้นละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร (volume metric flask) ให้ได้ปริมาณ 10 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายที่ได้มาทำความเจือจางจนได้น้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายกลูโคสมาตรฐานมาเจือจางดังตารางที่ 1

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

หลอดที่	สารละลายกลูโคส 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	0	1000	0
2	50	950	10
3	100	900	20
4	150	850	30
5	200	800	40
6	250	750	50
7	300	700	60
8	350	650	70
9	400	600	80
10	450	550	90
11	500	500	100

ตารางผนวกที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร
0	0
10	0.163
20	0.242
30	0.291
40	0.454
50	0.528
60	0.665
70	0.697
80	0.775
90	0.886
100	1.046



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.97	0.12	0.00	0.00	15.03
1	4.84	10.24	0.03	0.30	10.29
2	6.87	23.10	0.13	3.09	3.37
3	6.72	22.74	0.16	3.68	2.93
4	6.79	22.09	0.20	4.43	2.89
5	6.31	21.28	0.20	4.29	2.84
6	6.58	21.23	0.20	4.15	2.63
7	6.76	21.20	0.16	2.28	2.51

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีซูโครส 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.48	0.05	0.00	0.00	14.95
1	4.13	9.77	0.09	0.86	12.14
2	6.78	21.37	0.13	2.68	3.62
3	6.76	23.89	0.18	4.23	2.93
4	6.80	24.05	0.22	5.19	2.29
5	6.84	22.61	0.23	5.20	2.18
6	6.07	22.27	0.27	6.06	2.01
7	6.41	21.91	0.33	7.27	2.01

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีกาแลคโตส 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.47	0.27	0.00	0.00	15.05
1	4.19	8.54	0.06	0.54	12.91
2	6.56	18.26	0.16	2.87	4.07
3	6.66	18.91	0.19	3.55	3.21
4	6.79	19.03	0.19	3.57	3.08
5	6.74	19.53	0.20	3.91	3.05
6	6.48	19.54	0.23	4.54	3.05
7	6.70	21.38	0.21	4.40	3.03

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีแลคโตส 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.32	0.22	0.00	0.00	14.95
1	4.30	9.00	0.07	0.66	13.01
2	6.73	16.73	0.16	3.34	12.07
3	6.88	14.71	0.21	3.13	12.04
4	6.93	14.61	0.22	3.14	12.02
5	6.88	14.27	0.22	3.08	11.99
6	6.73	13.64	0.26	3.55	11.96
7	6.89	12.07	0.28	3.79	11.94

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีแมนนิทอล 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.45	0.21	0.00	0.00	14.95
1	5.54	10.59	0.06	0.61	12.10
2	6.87	19.16	0.09	1.74	6.11
3	6.85	17.10	0.19	3.20	6.10
4	6.77	15.07	0.19	2.91	6.10
5	6.76	11.15	0.17	1.94	6.10
6	6.61	8.34	0.16	1.35	6.09
7	6.30	6.03	0.15	0.90	6.09

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีซูโครส 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.34	0.06	0.00	0.00	25.03
1	4.07	7.39	0.07	0.51	14.52
2	6.92	22.51	0.18	4.16	3.39
3	6.16	22.69	0.25	5.63	3.18
4	6.22	23.36	0.26	6.11	3.10
5	5.85	23.42	0.27	6.31	3.02
6	5.83	23.84	0.27	6.50	2.96
7	5.95	23.21	0.28	6.46	2.94

ตารางภาคผนวกที่ 9 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีซูโครส 35 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.33	0.06	0.00	0.00	35.03
1	4.07	9.49	0.11	1.05	12.72
2	7.01	21.67	0.20	4.26	3.56
3	6.55	23.37	0.20	4.78	3.04
4	6.51	26.85	0.23	6.10	1.69
5	6.07	27.12	0.26	6.92	1.47
6	5.80	26.68	0.26	6.89	1.47
7	5.75	26.11	0.29	7.46	1.45

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีซูโครส 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	4.97	0.06	0.00	0.00	45.00
1	4.44	8.96	0.10	0.91	12.99
2	5.48	15.76	0.21	3.28	5.17
3	4.40	27.32	0.22	5.99	1.24
4	4.39	26.11	0.22	5.78	1.22
5	4.00	24.82	0.30	7.56	1.06
6	3.91	24.45	0.31	7.67	1.05
7	3.75	23.06	0.34	7.74	1.05

ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.65	0.09	0.00	0.00	45.03
1	3.22	4.89	0.05	0.23	44.05
2	2.27	11.00	0.19	2.06	42.89
3	2.31	12.31	0.29	3.55	40.58
4	2.64	13.43	0.25	3.36	37.01
5	2.43	15.87	0.32	5.03	28.91
6	2.30	16.66	0.35	5.80	27.14
7	2.35	17.03	0.44	7.41	25.51

ตารางภาคผนวกที่ 12 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรท 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.69	0.06	0.00	0.00	45.00
1	3.35	4.12	0.05	0.19	44.73
2	2.26	4.69	0.13	0.63	43.10
3	2.24	11.72	0.24	2.85	41.53
4	2.09	12.16	0.29	3.54	38.47
5	2.42	12.43	0.36	4.46	38.30
6	2.29	14.64	0.38	5.59	32.82
7	2.24	13.55	0.33	4.48	30.51

ตารางภาคผนวกที่ 13 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.50	0.07	0.00	0.00	45.07
1	1.77	4.16	0.04	0.16	44.18
2	1.31	8.37	0.20	1.71	43.91
3	1.36	9.07	0.30	2.73	42.76
4	1.6	10.08	0.32	3.22	38.44
5	1.52	10.79	0.43	4.65	37.52
6	1.59	12.35	0.38	4.63	30.48
7	1.57	15.92	0.30	4.85	28.95

ตารางภาคผนวกที่ 14 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มียีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียม-ซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.49	0.13	0.00	0.00	45.03
1	3.10	7.41	0.02	0.12	13.67
2	2.09	14.95	0.23	3.37	11.29
3	2.11	15.31	0.27	4.16	10.85
4	2.42	16.51	0.28	4.65	8.20
5	2.26	18.45	0.34	6.31	6.26
6	2.22	19.54	0.36	6.97	5.60
7	2.17	19.85	0.45	8.99	5.22

ตารางภาคผนวกที่ 15 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มียีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียม ซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.48	0.18	0.00	0.00	45.00
1	3.60	7.44	0.04	0.30	14.22
2	2.72	16.81	0.22	3.70	5.13
3	2.78	19.64	0.31	6.14	4.37
4	2.69	23.15	0.33	7.54	2.98
5	2.67	27.40	0.38	10.50	1.19
6	2.64	26.97	0.44	12.00	1.15
7	2.56	26.97	0.59	15.85	1.10

ตารางภาคผนวกที่ 16 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มียีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียม-ซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.48	0.13	0.00	0.00	45.03
1	3.88	8.67	0.04	0.33	12.52
2	3.66	22.79	0.20	4.66	3.18
3	4.42	31.29	0.25	7.79	0.52
4	5.68	34.63	0.28	9.72	0.21
5	5.78	31.25	0.30	9.45	0.21
6	5.72	29.44	0.31	9.13	0.21
7	5.44	25.83	0.39	10.15	0.21

ตารางภาคผนวกที่ 17 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	4.08	0.23	0.00	0.00	45.00
1	1.88	9.87	0.12	1.17	13.40
2	1.98	18.33	0.14	2.58	4.51
3	2.02	18.45	0.22	4.07	4.45
4	2.03	18.61	0.24	4.46	4.37
5	2.18	18.63	0.33	6.21	4.26
6	2.20	20.54	0.28	5.76	3.62
7	2.22	24.74	0.24	6.00	2.53

ตารางภาคผนวกที่ 18 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0.00	5.03	0.27	0.00	0.00	45.03
1.00	2.19	11.47	0.06	0.66	11.05
2.00	2.26	17.65	0.20	3.59	4.91
3.00	2.27	18.15	0.27	5.11	4.65
4.00	2.28	18.55	0.29	5.30	4.47
5.00	2.30	18.63	0.47	8.45	4.19
6.00	3.38	21.53	0.53	11.35	3.52
7.00	3.39	20.63	0.56	11.46	3.50

ตารางภาคผนวกที่ 19 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.99	0.26	0.00	0.00	45.03
1	3.79	12.55	0.02	0.30	10.82
2	2.77	18.61	0.20	3.72	4.93
3	2.76	19.63	0.31	6.17	4.36
4	2.68	23.17	0.33	7.56	2.96
5	2.63	27.44	0.38	10.53	1.17
6	2.61	27.02	0.45	12.12	1.14
7	2.56	27.00	0.59	15.93	1.10

ตารางภาคผนวกที่ 20 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 7.0

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	6.98	0.27	0.00	0.00	45.00
1	3.07	9.08	0.04	0.38	14.05
2	2.97	14.63	0.23	5.51	6.21
3	2.99	21.08	0.23	3.42	3.54
4	3.41	24.32	0.27	5.57	2.87
5	3.34	24.43	0.33	8.00	2.58
6	3.97	22.91	0.38	8.19	2.55
7	4.71	21.65	0.43	9.33	2.54

ตารางภาคผนวกที่ 21 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร โดยกำหนดให้มีความเร็ว-รอบการกวน 150 รอบต่อนาที และมีอัตราการไหลของอากาศ 3 ลิตรต่อนาที

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.97	0.17	0.00	0.00	44.98
1	5.31	3.20	0.03	0.09	44.73
2	5.28	3.95	0.04	0.14	43.10
3	5.21	4.20	0.05	0.19	41.53
4	5.13	4.47	0.06	0.29	38.47
5	5.02	3.41	0.10	0.33	38.30
6	5.06	3.04	0.12	0.36	32.82
7	4.59	2.75	0.14	0.38	30.51

ตารางภาคผนวกที่ 22 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.95	0.34	0.00	0.00	44.98
1	3.84	5.27	0.06	0.33	17.52
2	3.01	13.23	0.15	1.94	9.34
3	2.91	24.31	0.18	4.44	4.32
4	2.81	28.11	0.22	6.14	2.58
5	2.69	28.73	0.28	7.93	1.08
6	1.67	26.57	0.38	10.01	1.05
7	2.75	26.55	0.42	11.24	1.03

ตารางภาคผนวกที่ 23 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง แคโรทีนอยด์และน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่เจริญในถังหมักใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)
0	5.95	0.34	0.00	0.00	44.97
1	2.57	11.03	0.06	0.66	12.41
2	2.81	21.55	0.14	3.10	7.89
3	3.54	23.95	0.22	5.19	4.83
4	3.74	24.37	0.42	10.24	4.32
5	3.81	24.44	0.43	10.53	3.22
6	4.74	28.08	0.45	12.76	1.15
7	5.38	23.60	0.55	12.99	1.11

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 24 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Descriptives								
Sugar	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Manximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Glucose	3	23.1000	.93552	.54012	20.7760	25.4240	22.54	24.18
Sucrose	3	24.0467	.09238	.05333	23.8172	24.2761	23.94	24.10
Galactose	3	19.5400	.04000	.02309	19.4406	19.6394	19.50	19.58
Lactose	3	16.8133	.01155	.00667	16.7846	16.8420	16.80	16.82
Mannitol	3	19.1600	.07211	.04163	18.9809	19.3391	19.08	19.22
Total	15	20.9000	2.75005	.71006	19.3771	22.4229	16.80	24.18

ตารางภาคผนวกที่ 25 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	106.927	4	26.732	150.066	.000
Within Groups	1.781	10	.178		
Total	108.709	14			

ตารางภาคผนวกที่ 26 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Sugar	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Lactose	3	16.7267			
Mannitol	3		19.1600		
Galactose	3		19.5400		
Glucose	3			22.7400	
Sucrose	3				24.0467
Sig.		1.000	.296	1.000	1.000

ตารางภาคผนวกที่ 27 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Descriptives								
Sugar	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Glucose	3	4.4333	.04726	.02728	4.3159	4.5507	4.38	4.47
Sucrose	3	7.2733	.28378	.16384	6.5684	7.9783	7.02	7.58
Galactose	3	4.5333	.50807	.29333	3.2712	5.7954	4.24	5.12
Lactose	3	3.7833	.20207	.11667	3.2814	4.2853	3.55	3.90
Mannitol	3	3.2000	.04000	.02309	3.1006	3.2994	3.16	3.24
Total	15	4.6447	1.46761	.37894	3.8319	5.4574	3.16	7.58

ตารางภาคผนวกที่ 28 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29.388	4	7.347	95.829	.000
Within Groups	.767	10	.077		
Total	30.154	14			

ตารางภาคผนวกที่ 29 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Sugar	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Lactose	3	3.2000			
Mannitol	3		3.7833		
Glactose	3			4.4333	
Glucose	3			4.5333	
Sucrose	3				7.2733
Sig.		1.000	1.000	0.668	1.000

ตารางภาคผนวกที่ 30 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์แห้งที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Descriptives								
Sugar	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Glucose	3	.2000	0.00000	0.00000	.2000	.2000	.20	.20
Sucrose	3	.3333	.01528	.00882	.2954	.3713	.32	.35
Galactose	3	.2333	.02309	.01333	.1760	.2907	.22	.26
Lactose	3	.2833	.01155	.00667	.2546	.3120	.27	.29
Mannitol	3	.1900	0.00000	0.00000	.1900	.1900	.19	.19
Total	15	.2480	.05672	.01465	.2166	.2794	.19	.35

ตารางภาคผนวกที่ 31 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์แห้งจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.043	4	.011	60.056	.000
Within Groups	.002	10	.000		
Total	.045	14			

ตารางภาคผนวกที่ 32 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์แห้งจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Sugar	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Lactose	3	.1900			
Mannitol	3	.2000			
Galactose	3		.2333		
Glucose	3			.2833	
Sucrose	3				.3333
Sig.		.383	1.000	1.000	1.000

ตารางภาคผนวกที่ 33 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159

Descriptives								
Sugar	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Glucose	3	1.1100	0.01000	0.00577	1.0852	1.1348	1.10	1.12
Sucrose	3	1.0367	0.04041	0.02333	.9363	1.1371	1.00	1.08
Galactose	3	0.7567	0.08083	0.04667	.5559	.9575	.71	.85
Lactose	3	0.5433	0.02887	0.01667	.4716	.6150	.51	.56
Mannitol	3	1.0667	0.01528	0.00882	1.0287	1.1046	1.05	1.08
Total	15	0.9027	0.02889	0.0591	.7759	1.0294	.51	1.12

ตารางภาคผนวกที่ 34 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.715	4	0.179	95.736	.000
Within Groups	.019	10	.002		
Total	.733	14			

ตารางภาคผนวกที่ 35 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Sugar	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Lactose	3	0.5433		
Galactose	3		0.7567	
Sucrose	3			1.0367
Mannitol	3			1.0667
Glucose	3			1.1100
Sig.		1.000	1.000	0.075

ตารางภาคผนวกที่ 36 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Descriptives								
Sugar	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Glucose	3	.3667	0.00577	0.00333	.3523	.3810	.36	.37
Sucrose	3	.5733	0.02517	0.01453	.5108	.6358	.55	.60
Galactose	3	.3767	0.04619	0.02667	.2619	.4914	.35	.43
Lactose	3	1.2600	0.06928	0.0400	1.0879	1.4321	1.18	1.30
Mannitol	3	.3633	0.00577	0.00333	.3490	.3777	.36	.37
Total	15	.5880	0.35887	0.09266	.3893	.7867	.35	1.30

ตารางภาคผนวกที่ 37 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.788	4	0.447	292.758	.000
Within Groups	.015	10	.002		
Total	1.803	14			

ตารางภาคผนวกที่ 38 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

Sugar	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Mannitol	3	0.3633		
Glucose	3	0.3667		
Galactose	3	0.3767		
Sucrose	3		0.5733	
Lactose	3			1.26
Sig.		0.698	1.000	1.000

ตารางภาคผนวกที่ 39 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Sucrose (g/l)	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	24.0467	.09238	0.05333	23.8172	24.2761	23.94	24.10
25	3	23.8433	.03055	.01764	23.7674	23.9192	23.81	23.87
35	3	27.1233	.04933	.02848	27.0008	27.2459	27.09	27.18
45	3	27.3233	.09452	.05457	27.0885	27.5581	27.25	27.43
Total	12	25.5842	1.71639	.49548	24.4936	26.6747	23.81	27.43

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 40 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32.364	3	10.788	2071.323	.000
Within Groups	.042	8	0.005		
Total	32.406	11			

ตารางภาคผนวกที่ 41 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Sucrose (g/l)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
25	3	23.8433			
control	3		24.0467		
35	3			27.1233	
45	3				27.3233
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 42 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Sucrose (g/l)	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	7.2733	.28378	0.16384	6.5684	7.9783	7.02	7.58
25	3	6.4600	.01000	.00577	6.4352	6.4848	6.45	6.47
35	3	7.4567	.00577	.00333	7.4423	7.4710	7.45	7.46
45	3	7.7433	.00577	.00333	7.7290	7.7577	7.74	7.75
Total	12	7.2333	.51259	.14797	6.9076	7.5590	6.45	7.75

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 43 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ต่อลิตรจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.729	3	.910	45.087	.000
Within Groups	.161	8	.020		
Total	2.890	11			

ตารางภาคผนวกที่ 44 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส

Sucrose (g/l)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
25	3	6.4600		
Control	3		7.2733	
35	3		7.4567	
45	3			7.7433
Sig.		1.000	.153	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 45 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Sucrose (g/l)	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	3	.3333	.01528	.00882	.2954	.3713	.32	.35
25	3	.2800	0.00000	0.00000	.2800	.2800	.28	.28
35	3	.2900	0.00000	0.00000	.2900	.2900	.29	.29
45	3	.3400	0.00000	0.00000	.3400	.3400	.34	.34
Total	12	.3108	.02811	.00811	.2930	.3287	.28	.35

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 46 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.008	3	.003	47.000	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.009	11			

ตารางภาคผนวกที่ 47 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส

Sucrose (g/l)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
25	3	.2800	
35	3	.2900	
control	3		.3333
45	3		.3400
Sig.		.147	.316

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 48 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของอัตราการการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Sucrose (g/l)	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	1.0367	.04042	0.02333	0.9363	1.1371	1.00	1.08
25	3	.9200	.00000	.00000	0.9200	.9200	.92	.92
35	3	1.0667	.00577	.00333	1.0523	1.0810	1.06	1.07
45	3	1.1100	.00000	.00000	1.1100	1.1100	1.11	1.11
Total	12	1.0333	.07560	.02182	0.9853	1.0814	.92	1.11

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 49 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.060	3	.020	47.627	.000
Within Groups	.003	8	.000		
Total	.063	11			

ตารางภาคผนวกที่ 50 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Sucrose (g/l)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
25 g	3	.9200		
Control	3		1.0367	
35 g	3		1.0667	
45 g	3			1.0667
Sig.		1.000	.110	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 51 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Sucrose (g/l)	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	.5733	.02517	.01453	.5108	.6358	.55	.60
25	3	.2900	.00000	.00000	.2900	.2900	.29	.29
35	3	.2200	.00000	.00000	.2200	.2200	.22	.22
45	3	.1800	.00000	.00000	.1800	.1800	.18	.18
Total	12	.3158	.16099	.04647	.2135	.4181	.18	.60

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 52 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลน้ำตาลซูโครสเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.284	3	.095	597.526	.000
Within Groups	.001	8	.000		
Total	.285	11			

ตารางภาคผนวกที่ 53 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน

Sucrose (g/l)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
45	3	.1800			
35	3		.2200		
25	3			.2900	
Control	3				.5733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 54 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives								
Nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	27.3233	.09452	.05457	27.0885	27.5581	27.25	27.43
$(NH_4)_2SO_4$	3	17.0333	.01155	.00667	17.0046	17.0620	17.02	17.04
NH_4NO_3	3	14.6400	.06928	.04000	14.4679	14.8121	14.60	14.72
NH_4Cl	3	15.9200	.08718	.05033	15.7034	16.1366	15.82	15.98
Total	12	18.7292	5.25779	1.51779	15.3885	22.0698	14.60	27.43

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 55 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	304.045	3	101.348	18884.768	.000
Within Groups	.043	8	.005		
Total	304.088	11			

ตารางภาคผนวกที่ 56 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียม-ไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Nitrogen	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
NH_4Cl	3	4.8500			
NH_4NO_3	3		5.5900		
$(NH_4)_2SO_4$	3			7.4100	
Control	3				7.7433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 57 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives								
Nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	7.7433	.00577	.00333	7.7290	7.7577	7.74	7.75
$(NH_4)_2SO_4$	3	7.4100	.02646	.01528	7.3443	7.4757	7.38	7.43
NH_4NO_3	3	5.5900	.06245	.03606	5.4349	5.7451	5.54	5.66
NH_4Cl	3	4.8500	.07000	.04041	4.6761	5.0239	4.80	4.93
Total	12	6.3983	1.26738	.36586	5.5931	7.2036	4.80	7.75

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 58 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.650	3	5.883	2468.490	.000
Within Groups	.019	8	.002		
Total	17.669	11			

ตารางภาคผนวกที่ 59 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียม-ซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Nitrogen	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
NH_4Cl	3	4.8500			
NH_4NO_3	3		5.5900		
$(NH_4)_2SO_4$	3			7.4100	
Control	3				7.7433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 60 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้ จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives								
Nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	0.3400	0.0000	0.0000	0.3400	0.340	0.34	0.34
$(NH_4)_2SO_4$	3	0.4367	0.00577	0.00333	0.4223	0.451	0.43	0.44
NH_4NO_3	3	0.3800	0.0000	0.0000	0.3800	0.380	0.38	0.38
NH_4Cl	3	0.4333	0.02887	0.01667	0.3616	0.505	0.40	0.45
Total	12	0.3975	0.04372	0.01262	0.3697	0.4253	0.34	0.45

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 61 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.019	3	.006	29.679	.000
Within Groups	.002	8	.000		
Total	.021	11			

ตารางภาคผนวกที่ 62 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์แห้งจากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียม-ซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Nitrogen	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Control		.3400		
NH_4NO_3			.3800	
NH_4Cl				.4333
$(NH_4)_2SO_4$				.4367
Sig.		1.000	1.000	.789

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 63 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของอัตราการการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียม-ซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives								
Nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	1.1100	.00000	.00000	1.1100	1.1100	1.11	1.11
$(NH_4)_2SO_4$	3	1.0567	.00577	.00333	1.0423	1.0710	1.05	1.06
NH_4NO_3	3	.9300	.01000	.00577	0.9052	0.9548	0.92	0.94
NH_4Cl	3	.6933	.00577	.00333	0.6790	0.7077	0.69	0.70
Total	12	.9475	.16788	.04846	0.8408	1.0542	0.69	1.11

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 64 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.310	3	.103	2477.533	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.310	11			

ตารางภาคผนวกที่ 65 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Nitrogen	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
NH_4Cl	3	.6933			
NH_4NO_3	3		.9300		
$(NH_4)_2SO_4$	3			1.0567	
Control	3				1.1100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 66 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Descriptives								
Nitrogen	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	.1800	.00000	.00000	.1800	.1800	.18	.18
$(NH_4)_2SO_4$	3	.3800	.00000	.00000	.3800	.3800	.38	.38
NH_4NO_3	3	.4633	.00577	.00333	.4490	.4777	.46	.47
NH_4Cl	3	.3033	.00577	.00333	.2890	.3177	.30	.31
Total	12	.3317	.10895	.03145	.2624	.4009	.18	.47

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 67 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.130	3	.043	2608.667	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.131	11			

ตารางภาคผนวกที่ 68 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร

Nitrogen	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Control	3	.1800			
NH_4Cl	3		.3033		
$(NH_4)_2SO_4$	3			.3800	
NH_4NO_3	3				.4633
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: control: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 69 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Medium	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control 1	3	27.3233	.09452	.05457	27.0885	27.5581	27.25	27.43
Control 2	3	17.0333	.01155	.00667	17.0046	17.0620	17.02	17.04
Medium 1	3	19.8533	.04163	.02404	19.7499	19.9568	19.82	19.90
Medium 2	3	27.4000	.03464	.02000	27.3139	27.4861	27.38	27.44
Medium 3	3	34.6333	.01155	.00667	34.6046	34.6620	34.62	34.64
Total	15	25.2487	6.44117	1.66310	21.6817	28.8157	17.02	34.64

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 70 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	580.817	4	145.204	59836.948	.000
Within Groups	.024	10	.002		
Total	580.842	14			

ตารางภาคผนวกที่ 71 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Control 2	3	17.0333			
Medium 1	3		19.8533		
Control 1	3			27.3233	
Medium 2	3			27.4000	
Medium 3	3				34.6333
Sig.		1.000	1.000	.086	1.000

หมายเหตุ: Control 1: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: อาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 72 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Medium	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control 1	3	7.7433	.00577	.00333	7.7290	7.7577	7.74	7.75
Control 2	3	7.4100	.02646	.01528	7.3443	7.4757	7.38	7.43
Medium 1	3	8.9933	.37541	.21674	8.0608	9.9259	8.66	9.40
Medium 2	3	15.8500	.01000	.00577	15.8252	15.8748	15.84	15.86
Medium 3	3	10.1533	.04509	.02603	10.0413	10.2653	10.11	10.20
Total	15	10.0300	3.17866	.82073	8.2697	11.7903	7.38	15.86

หมายเหตุ: Control 1: อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: อาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 73 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	141.167	4	35.292	1227.109	.000
Within Groups	.288	10	.029		
Total	141.454	14			

ตารางตารางภาคผนวกที่ 74 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Medium	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Control 2	3	7.4100				
Control 1	3		7.7433			
Medium 1	3			8.9933		
Medium 3	3				10.1533	
Medium 2	3					15.8500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 75 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Medium	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control 1	3	.3400	0.00000	0.00000	.3400	.3400	.34	.34
Control 2	3	.4367	.00577	.00333	.4223	.4510	.43	.44
Medium 1	3	.4533	.01528	.00882	.4154	.4913	.44	.47
Medium 2	3	.5900	0.00000	0.00000	.5900	.5900	.59	.59
Medium 3	3	.3900	0.00000	0.00000	.3900	.3900	.39	.39
Total	15	.4420	.08703	.02247	.3938	.4902	.34	.59

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 76 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) จากเชื้อ*R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.106	4	.026	494.563	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.106	14			

ตารางภาคผนวกที่ 77 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Medium	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Control 1	3	.3400				
Medium 3	3		.3900			
Control 2	3			.4367		
Medium 1	3				.4533	
Medium 2	3					.5900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 78 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียม-ซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Medium	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control 1	3	1.1100	.00000	.00000	1.1100	1.1100	1.11	1.11
Control 2	3	1.0567	.00577	.00333	1.0423	1.0710	1.05	1.06
Medium 1	3	1.2833	.05132	.02963	1.1559	1.4108	1.24	1.34
Medium 2	3	2.2633	.00577	.00333	2.2490	2.2777	2.26	2.27
Medium 3	3	1.4500	.01000	.00577	1.4252	1.4748	1.44	1.46
Total	15	1.4327	.45355	.11711	1.1815	1.6838	1.05	2.27

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 79 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.874	4	.719	1283.167	.000
Within Groups	.006	10	.001		
Total	2.880	14			

ตารางภาคผนวกที่ 80 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Medium	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Control 2	3	1.0567				
Control 1	3		1.1100			
Medium 1	3			1.2833		
Medium 3	3				1.4500	
Medium 2	3					2.2633
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 81 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Medium	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control 1	3	.1800	.00000	.00000	.1800	.1800	.18	.18
Control 2	3	.3800	.00000	.00000	.3800	.3800	.38	.38
Medium 1	3	.2267	.01155	.00667	.1980	.2554	.22	.24
Medium 2	3	.3600	.00000	.00000	.3600	.3600	.36	.36
Medium 3	3	.2300	.00000	.00000	.2300	.2300	.23	.23
Total	15	.2753	.08245	.02129	.2297	.3210	.18	.38

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 82 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.095	4	.024	889.750	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.095	14			

ตารางภาคผนวกที่ 83 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน

Medium	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Control 1	3	.1800			
Medium 1	3		.2267		
Medium 3	3		.2300		
Medium 2	3			.3600	
Control 2	3				.3800
Sig.		1.000	.448	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control 1: น้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร

Control 2: แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

Medium 1: ยีสต์สกัด 1.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.5 กรัมต่อลิตร

Medium 2: ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร

Medium 3: ยีสต์สกัด 3.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 84 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Initial pH	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	27.4000	.03464	.02000	27.3139	27.4861	27.38	27.44
4	3	24.7400	.02000	.01155	24.6903	24.7897	24.72	24.76
5	3	21.5333	.03055	.01764	21.4574	21.6092	21.50	21.56
6	3	27.4400	.03464	.02000	27.3539	27.5261	27.42	27.48
7	3	24.4333	.04163	.02404	24.3299	24.5368	24.40	24.48
Total	15	25.1093	2.27081	.58632	23.8518	26.3669	21.50	27.48

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 85 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	72.181	4	18.045	16504.793	.000
Within Groups	.011	10	.001		
Total	72.192	14			

ตารางภาคผนวกที่ 86 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
5	3	21.5333			
7	3		24.4333		
4	3			24.7400	
Control	3				27.4000
6	3				27.4400
Sig.		1.000	1.000	1.000	.169

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 87 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Initial pH	N	Mean	Std. Deviation	Std.Erro	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	15.8500	.01000	.00577	15.8252	15.8748	15.84	15.86
4	3	6.2133	.01155	.00667	6.1846	6.2420	6.20	6.22
5	3	11.4600	.01732	.01000	11.4170	11.5030	11.45	11.48
6	3	15.9333	.03215	.01856	15.8535	16.0132	15.91	15.97
7	3	9.3300	.01000	.00577	9.3052	9.3548	9.32	9.34
Total	15	11.7573	3.89797	1.00645	9.5987	13.9160	6.20	15.97

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 88 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	212.716	4	53.179	159536.67	.000
Within Groups	.003	10	.000		
Total	212.719	14			

ตารางภาคผนวกที่ 89 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
4	3	6.2133				
7	3		9.3300			
5	3			11.4600		
Control	3				15.8500	
6	3					15.9333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 90 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Initial pH	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	.5877	.00058	.00033	.5862	.5891	.59	.59
4	3	.3337	.00058	.00033	.3322	.3351	.33	.33
5	3	.5553	.00058	.00033	.5539	.5568	.56	.56
6	3	.5903	.00058	.00033	.5889	.5918	.59	.59
7	3	.4310	0.00000	0.00000	.4310	.4310	.43	.43
Total	15	.4996	.10488	.02708	.4415	.5577	.33	.59

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 91 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.154	4	.039	144377.750	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.154	14			

ตารางภาคผนวกที่ 92 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
pH 4	3	.3337				
pH 7	3		.4310			
pH 5	3			.5553		
Control	3				.5877	
pH 6	3					.5903
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 93 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของอัตราการการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Initial pH	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	3	2.2633	.00577	.00333	2.2490	2.2777	2.26	2.27
4	3	1.2400	.00000	.00000	1.2400	1.2400	1.24	1.24
5	3	1.6400	.00000	.00000	1.6400	1.6400	1.64	1.64
6	3	2.2733	.00577	.00333	2.2590	2.2877	2.27	2.28
7	3	1.3300	.00000	.00000	1.3300	1.3300	1.33	1.33
Total	15	1.7493	.45967	.11869	1.4948	2.0039	1.24	2.28

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 94 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.958	4	.739	55461.750	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	2.958	14			

ตารางภาคผนวกที่ 95 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
4	3	1.2400				
7	3		1.3300			
5	3			1.6400		
Control	3				2.2633	
6	3					2.2733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 96 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Descriptives								
Initial pH	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	.3600	.00000	.00000	.3600	.3600	.36	.36
4	3	.1500	.00000	.00000	.1500	.1500	.15	.15
5	3	.2800	.00000	.00000	.2800	.2800	.28	.28
6	3	.3600	.00000	.00000	.3600	.3600	.36	.36
7	3	.2200	.00000	.00000	.2200	.2200	.22	.22
Total	15	.2740	.08424	.02175	.2273	.3207	.15	.36

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 97 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.099	4	.025		
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.099	14			

ตารางภาคผนวกที่ 98 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

Initial pH	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
4	3	.152667				
7	3		.220000			
5	3			.276000		
Control	3				.361033	
6	3					.362667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5

ตารางภาคผนวกที่ 99 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Descriptives								
Condition	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	27.4400	.03464	.02000	27.3539	27.5261	27.42	27.48
1	3	4.4733	.00577	.00333	4.4590	4.4877	4.47	4.48
2	3	28.7267	.01155	.00667	28.6980	28.7554	28.72	28.74
3	3	28.0800	0.02000	0.01155	28.0303	28.1297	28.06	28.10
Total	12	20.4256	11.96995	3.98998	15.3891	28.9709	4.47	28.74

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 100 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1256.587	3	418.862	948367.899	.000
Within Groups	.004	8	.000		
Total	1256.591	11			

ตารางภาคผนวกที่ 101 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของน้ำหนักเซลล์แห้งเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Condition	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	4.4733			
Control	3		27.4400		
3	3			28.0800	
2	3				28.7267
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 102 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Descriptives								
Condition	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	15.9333	.03215	.01856	15.85	16.0132	15.91	15.97
1	3	.3800	.00000	.00000	.38	0.38	0.38	0.38
2	3	11.2433	.01155	.00667	11.21	11.272	11.23	11.25
3	3	12.9867	.01528	.00882	12.95	13.0246	12.97	13.00
Total	12	10.1358	6.13800	1.77189	6.24	14.0357	0.38	15.97

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 103 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	414.423	3	138.141	394688.849	.000
Within Groups	.003	8	.000		
Total	414.426	11			

ตารางภาคผนวกที่ 104 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Condition	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	.3800			
2	3		11.2433		
3	3			12.9867	
Control	3				15.9333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 105 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Descriptives								
Condition	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	.590333	.0005774	.0003333	.588899	.591768	.5900	.5910
1	3	.137000	0.000000	0.000000	.137000	.137000	.1370	.1370
2	3	.423667	.0005774	.0003333	.422232	.425101	.4230	.4240
3	3	.550333	.0005774	.0003333	.548899	.551768	.5500	.5510
Total	12	.425333	.1853666	.0535107	.307557	.543110	.1370	.5910

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 106 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.378	3	.126	503955.556	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.378	11			

ตารางภาคผนวกที่ 107 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ของเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Condition	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	.137000			
2	3		.423667		
3	3			.550333	
Control	3				.590333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางภาคผนวกที่ 108 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของอัตราการการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Descriptives								
Condition	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	2.2733	.00577	.00333	2.2590	2.2877	2.27	2.28
1	3	.0500	.00000	.00000	0.0500	0.0500	0.05	0.05
2	3	1.6067	.00577	.00333	1.5923	1.6210	1.60	1.61
3	3	1.8567	.00577	.00333	1.8423	1.8710	1.85	1.86
Total	12	1.4467	.87819	.25351	0.8887	2.0046	0.05	2.28

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 109 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.483	3	2.828	113110.222	.000
Within Groups	.000	8	.000		
Total	8.483	11			

ตารางภาคผนวกที่ 110 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang analysis ของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Condition	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	.0500			
2	3		1.6067		
3	3			1.8567	
Control	3				2.2733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 111 ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Descriptives								
Condition	N	Mean	Std. Deviation	Std.Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Control	3	.3600	.00000	.00000	0.3600	0.3600	0.36	0.36
1	3	.0300	.00000	.00000	0.0300	0.0300	0.03	0.03
2	3	.2600	.00000	.00000	0.2600	0.2600	0.26	0.26
3	3	.3000	.00000	.00000	0.3000	0.3000	0.30	0.30
Total	12	.2375	.13053	.03768	0.1546	0.3204	0.03	0.36

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ตารางภาคผนวกที่ 112 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.187	3	.062		
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.187	11			

ตารางภาคผนวกที่ 113 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's One-Way ANOVA ของผลได้แคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักใบพัดกวนที่มีสภาวะแตกต่างกัน

Condition	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	.026033			
2	3		.255867		
3	3			.296100	
Control	3				.362700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ: Control: การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

Condition 1: ความเร็วรอบการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที

Condition 2: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 60

Condition 3: กำหนดให้มีออกซิเจนละลายร้อยละ 75

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุภาพร พัฒนะวิริยะศิริกุล
วัน/เดือน/ปี	เกิดเมื่อ 31 สิงหาคม 2527
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 100/8 หมู่ 7 หมู่บ้านศิรินเทพ 9 ซอยราษฎร์พัฒนา 14 ถ.ราษฎร์พัฒนา แขวงสะพานสูง เขตสะพานสูง กรุงเทพฯ 10240
การศึกษา	2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปัญหาพิเศษ	การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดินในถ้ำ จ. ราชบุรี