

ผลของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงยีสต์
Rhodotorula mucilaginosa ต่อสมบัติเชิงคุณภาพและปริมาณของคาร์โบไฮเดรตจากยีสต์



นางสาว วิจิตรา สานพภา

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF WASTE WATER FROM DIFFERENT FOOD INDUSTRIES USED AS
CULTURING MEDIUM FOR *Rhodotorula mucilaginosa* ON QUALITATIVE AND
QUANTITATIVE PROPERTIES OF YEAST CAROTENOIDS



MISS WICHITRA SANOPPA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* ต่อสมบัติเชิงคุณภาพและปริมาณของคาร์ทีนอยด์จากยีสต์

โดย

นางสาววิจิตรา สานพภา


สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

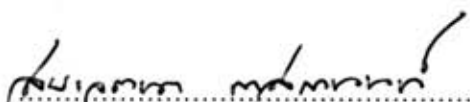

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมนี สงวนดีกุล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชนิษฐา ธนานวงค์)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นายสมเจตนา ภาสกาพันธ์)

วิจิตรา สานพภา : ผลของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆที่นำมาใช้เป็นอาหาร
เลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* ต่อสมบัติเชิงคุณภาพและปริมาณของคาโรทีนอยด์
จากยีสต์. (EFFECTS OF WASTE WATER FROM DIFFERENT FOOD INDUSTRIES
USED AS CULTURING MEDIUM FOR *Rhodotorula mucilaginosa* ON QUALITATIVE
AND QUANTITATIVE PROPERTIES OF YEAST CAROTENOIDS)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา, 130 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของการใช้น้ำทิ้งมะม่วงทองเค็ม น้ำทิ้งมะม่วงทองหวาน น้ำทิ้งน้ำนม และ
น้ำกะทิเจือจางในการเพาะเลี้ยง *Rhodotorula mucilaginosa* ต่อสมบัติเชิงคุณภาพและปริมาณของ
คาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตขึ้น เมื่อนำน้ำทิ้งมาปรับสูตรเพื่อใช้ในการเลี้ยงยีสต์พบว่า สูตรที่เหมาะสมของน้ำทิ้งแต่
ละประเภทคือ น้ำทิ้งมะม่วงทองเค็มสูตรครบส่วน และน้ำกะทิสูตเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 : 19 โดยมีการ
ปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของน้ำทิ้งมะม่วงทองเค็มและน้ำกะทิเป็น 1% และ 0.2% ตามลำดับ
ส่วนน้ำทิ้งมะม่วงทองหวานคือ สูตรเจือจางน้ำทิ้งด้วยน้ำอัตราส่วน 1 : 1 ปรับแหล่งไนโตรเจนให้เป็น 0.2% และ
น้ำทิ้งน้ำนมสูตรครบส่วนที่ไม่ปรับสารอาหาร เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญและการสร้างคาโรทีนอยด์ของ
ยีสต์พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งมะม่วงทองเค็มมีอัตราการเจริญสูงสุด มีการเจริญในระยะ stationary phase
นานที่สุด (5 วัน) และให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุดคือ 11.2 กรัมต่อลิตร ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้ง
มะม่วงทองหวาน น้ำกะทิเจือจาง และน้ำทิ้งน้ำนมมีอัตราการเจริญต่ำกว่าตามลำดับ แต่มีการเจริญในระยะ
stationary phase เท่ากัน (4 วัน) และให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งเท่ากับ 10.2 6.0 และ 5.6 กรัมต่อลิตร
ตามลำดับ ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งมะม่วงทองหวานสามารถสร้างคาโรทีนอยด์รวมซึ่งคำนวณในค่าของ
เบตาแคโรทีนสะสมไว้ในเซลล์ได้สูงสุด 77 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงทองเค็ม
น้ำนม และน้ำกะทิเจือจางจะผลิตคาโรทีนอยด์รวมสูงสุดเท่ากับ 76 72 และ 66 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง
ตามลำดับ รูปแบบของคาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งทุกชนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะ stationary
phase องค์ประกอบทางเคมีและขนาดเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงทองเค็ม และทองหวานจะใกล้เคียงกับ
การเลี้ยงใน YM broth และเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งเหล่านี้จะมีรูปร่างทรงกลม ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำกะทิเจือ
จางจะมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากการเลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ เซลล์ที่ได้เป็นทรงกลม
ขนาดเล็ก ส่วนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากน้ำทิ้งน้ำนมมีองค์ประกอบของโปรตีนในปริมาณสูงสุดและเซลล์มีรูปร่างเป็น
วงรี ทั้งนี้รูปแบบของคาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงทองเค็ม ทองหวาน และน้ำกะทิเจือจางจะมี
ความคล้ายกัน กล่าวคือประกอบด้วยโทรูลินในปริมาณสูงสุด และมีโทรูลาโรดินและเบตาแคโรทีนเป็น
องค์ประกอบรองตามลำดับ ในขณะที่คาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนมจะมีรูปแบบที่แตกต่างจาก
น้ำทิ้งชนิดอื่น โดยพบว่ามีความปริมาณโทรูลาโรดินสูงสุด รองลงมาคือโทรูลินและเบตาแคโรทีน ตามลำดับ

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อผู้คิด.....*วิจิตรา สานพภา*
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....*ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา*

4872602523 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD: CAROTENOIDS / TORULENE / TORULARHODIN /BETA-CAROTENE /

WICHITRA SANOPPA : EFFECTS OF WASTE WATER FROM DIFFERENT FOOD INDUSTRIES USED AS CULTURING MEDIUM FOR *Rhodotorula mucilaginosa* ON QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PROPERTIES OF YEAST CAROTENOIDS. ADVISOR: ASST.PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 130 pp.

This research investigated influence of using salted pickled mango-, sweetened pickled mango-, milk waste water, and diluted coconut milk for culturing *Rhodotorula mucilaginosa*, on quantitative and qualitative properties of carotenoids produced by the yeast. When waste waters were formulated for culturing yeast, the suitable formulas of each formulated waste water were whole salted pickled mango waste water and coconut milk diluted with water at 1: 19 ratio. Waste water from both sources was adjusted to 1% carbon and 0.2% nitrogen. For sweetened pickled waste water, the formula was the waste water diluted with water at 1:1 ratio and adjusted to 0.2% nitrogen. Milk waste water formula was the waste water without nutrients adjusting. When growth rate and carotenoids production of yeast cultured in each formulated waste water were compared, yeast culturing in salted pickled mango waste water performed the highest growth rate and had the longest period of the stationary phase (5 days), and also yielded the largest amount of cell dry weight up to 11.2 g/l. The growth rate of yeast cultured in different formulated waste water was descending in the following order; sweetened pickled mango-, diluted coconut milk and milk waste water, while the period of the stationary phase were similar (4 days), and yielded 10.2 6.0 and 5.6 g/l cell dry weights, respectively. Yeast cultured in sweetened pickled mango waste water could maximally accumulated total carotenoids calculated as β -carotene 77 μ g/g. Yeast cultured in salted pickled mango-, milk- waste water and diluted coconut milk could maximally accumulated carotenoids 76 72 and 66 μ g/g, respectively. Carotenoid profile from yeast cultured in all waste waters was not changed throughout the stationary phase. The chemical composition and size of yeast cell cultured in salted- and sweetened-pickled mango waste were similar to those in YM broth. Shape of yeast cell cultured in these media was symmetrically rounded. The chemical composition of yeast cell cultured in diluted coconut milk was significantly different from that of yeast cell cultured in other waste waters. The cell was small and round. The protein content in cell cultured in milk waste water was the highest and the shape of yeast cell was oval. The carotenoid profile from yeast cultured in salted pickled mango-, sweetened pickled mango- waste water, diluted coconut milk was similar in that their carotenoids contained the largest amount of torulene following by torularhodin and beta-carotene, respectively. The carotenoid profile from yeast cultured in milk waste water was different in that it contained the largest amount of torularhodin following by torulene and beta-carotene, respectively.

Department : Food Technology

Field of Study : Food Technology

Academic Year : 2008

Student's Signature..... *Wichitza Sanoppa*

Advisor's Signature..... *Cheunjit Prakitchaiwattana*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ ต้องขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาให้คำแนะนำแนวทางในการดำเนินงานวิจัย และการติดตามเอาใจใส่อย่างใกล้ชิด ตลอดจนตรวจแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ ดร.ชนิษฐา รัตนวงษ์ และคุณสมเจตนา ภาสกาพันธ์ ที่ได้สละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณบริษัท ผลไม้แปรรูปรพพร จำกัด และโรงงานนม โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำดื่มมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน และน้ำนมมาใช้ในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร และเคมีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องเครื่องมือและอุปกรณ์ รวมถึงความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตเพื่อการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆทุกคน ที่ให้การช่วยเหลือในทุกๆอย่างและสร้างความทรงจำที่ดีในรั้วจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	2
2.1 คาโรทีนอยด์ (carotenoids).....	2
2.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารคาโรทีนอยด์.....	2
2.3 ชนิดและประเภทของคาโรทีนอยด์.....	3
2.4 คุณสมบัติและหน้าที่หลักของสารคาโรทีนอยด์.....	6
2.5 การใช้คาโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม.....	10
2.5.1 อุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์.....	10
2.5.2 อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชภัณฑ์.....	11
2.6 การผลิตและการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์.....	11
2.6.1 การผลิตคาโรทีนอยด์โดยการสังเคราะห์ทางเคมี.....	11
2.6.2 การผลิตคาโรทีนอยด์โดยวิธีทางชีวภาพ.....	13
2.7 ยีสต์.....	17
2.8 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	18
2.9 ขั้นตอนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์.....	20
2.10 การใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารต่างๆสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ เพื่อผลิตสารกลุ่มคาโรทีนอยด์.....	25
3 การดำเนินงานวิจัย.....	30
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	40

บทที่		
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	85
	รายการอ้างอิง.....	87
	ภาคผนวก.....	94
ภาคผนวก ก	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	95
ภาคผนวก ข	การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์.....	107
ภาคผนวก ค	ขั้นตอนการสกัดคาโรทีนอยด์ และการวิเคราะห์ค่าโรทีนอยด์เชิงปริมาณและคุณภาพ.....	109
ภาคผนวก ง	การวิเคราะห์ขนาดพื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์.....	114
ภาคผนวก จ	ภาพเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในแหล่งอาหารชนิดต่างๆ.....	115
ภาคผนวก ฉ	โครมาโทแกรมของสารคาโรทีนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ที่สกัดจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ.....	118
ภาคผนวก ช	โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ที่สกัดจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยง ในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน.....	121
ภาคผนวก ซ	Absorption spectrum ของสารคาโรทีนอยด์ที่ได้จากเพาะเลี้ยง ในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ.....	123
ภาคผนวก ฌ	การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	126
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	130

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คาโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากแหล่งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	15
2.2	องค์ประกอบหลักของคาโรทีนอยด์ที่สามารถผลิตได้จากยีสต์ชนิดต่างๆ.....	16
2.3	วงศ์และสกุลของยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i>	18
2.4	ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> เพื่อการเจริญเติบโต.....	19
2.5	องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสังเคราะห์ YM broth และน้ำกะทิ.....	28
3.1	ค่าความยาวคลื่นต่างๆจากงานวิจัยอ้างอิงที่เลือกมาประเมินในงานวิจัยนี้.....	34
3.2	สารอาหารขั้นต่ำที่ต้องปรับเตรียมให้เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i>	36
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารคาโรทีนอยด์ที่สกัดจากยีสต์ในช่วงความยาวคลื่นที่ 452 นาโนเมตรในแต่ละรอบการสกัด.....	41
4.2	เปอร์เซ็นต์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่สามารถสกัดได้จากยีสต์ ในแต่ละรอบการสกัด.....	41
4.3	ค่าพื้นที่ใต้กราฟและ Retention time ของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิด ที่ค่าความยาวคลื่นต่างๆ.....	46
4.4	ตารางสรุปสภาวะต่างๆของการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ด้วย RP-HPLC.....	47
4.5	ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยาของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด.....	51
4.6	ปริมาณสารอาหารหลักในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดที่มีการปรับสูตร.....	54
4.7	ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม.....	57
4.8	ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน.....	58
4.9	ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนม.....	59

ตารางที่	หน้า	
4.10	ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง.....	60
4.11	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลอง และจากงานวิจัยอ้างอิงที่ใช้น้ำทิ้งชนิดใกล้เคียงกันกับงานวิจัย.....	62
4.12	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม.....	64
4.13	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน.....	66
4.14	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง.....	68
4.15	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำมัน.....	70
4.16	องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth.....	74
4.17	พื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์แสดงในค่าพื้นที่ผิวของยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth.....	77
4.18	ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดภายหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์.....	78
4.19	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอาหารหลักภายหลังจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด.....	79
4.20	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดและอาหารมาตรฐาน YM broth.....	81

ตารางที่	หน้า
ณ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของผลผลิตน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน และน้ำนม ที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร.....	126
ณ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของผลผลิตน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำกะทิที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร.....	126
ณ.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณคาร์บอนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และดองหวานที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร.....	127
ณ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณคาร์บอนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำนม และน้ำกะทิเจือจางสูตรคัดเลือกในวันที่ 6-12 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร.....	128
ณ.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำนม น้ำกะทิเจือจาง และอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth.....	128
ณ.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของขนาดของเซลล์ยีสต์ แสดงในค่าพื้นที่ผิวของยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยง ในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำนม น้ำกะทิเจือจาง และอาหารเลี้ยงเชื้อ มาตรฐาน YM broth.....	129
ณ.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณคาร์บอนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดและอาหารมาตรฐาน YM broth.....	129

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างโมเลกุลไอโซปรีน.....	2
2.2	โครงสร้างหลักของคาโรทีนอยด์.....	2
2.3	โครงสร้างทางเคมีของสารคาโรทีนอยด์กลุ่มแคโรทีน.....	3
2.4	ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารคาโรทีนอยด์กลุ่มแคโรทีน (carotene).....	4
2.5	ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารคาโรทีนอยด์กลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll)....	6
2.6	โครงสร้างของ all-trans beta-carotene, 9-cis beta-carotene และ retinol (vitamin A).....	7
2.7	การตัดพันธะคู่ในโมเลกุลของเบตาแคโรทีนเปลี่ยนไปเป็นเรตินอลหรือวิตามินเอ..	7
2.8	สมการการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนพลังงานสูงเป็นออกซิเจนพลังงานต่ำ โดยคาโรทีนอยด์.....	8
2.9	การกำจัด peroxy radicals (ROO ^o) ของเบตาแคโรทีน.....	9
2.10	การสังเคราะห์ (R-(+))- α -ionone ((R)-1 ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ในกระบวนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์โดยวิธีทางเคมี.....	12
2.11	กระบวนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์โดยวิธีทางเคมี โดยเริ่มต้นจาก (R)-1 และ (S)-1.....	12
2.12	วิธีการสังเคราะห์ของ IPP (Iso pentenyl pyrophosphate).....	21
2.13	วิธีการสังเคราะห์ของ Lycopene.....	22
2.14	ชีวสังเคราะห์ของสารคาโรทีนอยด์ต่างๆจากสาร Phytoene.....	24
4.1	ตัวอย่างโครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ มาตรฐาน YM broth โดยใช้ Acetonitrile : Methanol : Hexane ที่อัตราส่วน 40 : 54 : 6 เป็น Mobile phase ที่อัตราส่วน 40 : 54 : 6 เป็น Mobile phase.....	42
4.2	พื้นที่ใต้กราฟของพีคของสารเบตาแคโรทีนมาตรฐานที่ความยาวคลื่นต่างๆ คือ 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร.....	43
4.3	พื้นที่ใต้กราฟของพีคของสารโทรูลินอ้างอิงที่ความยาวคลื่นต่างๆ คือ 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร.....	43
4.4	พื้นที่ใต้กราฟของพีคของสารโทรูลาโรดินอ้างอิงที่ความยาวคลื่นต่างๆ คือ 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร.....	44

รูปที่	หน้า
4.5 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม.....	63
4.6 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน.....	65
4.7 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง.....	67
4.8 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งนํานม.....	69
4.9 รูปร่างเซลล์ยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth.....	75
4.10 รูปร่างเซลล์ยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม.....	75
4.11 รูปร่างเซลล์ยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน.....	76
4.12 รูปร่างเซลล์ยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง.....	76
4.13 รูปร่างเซลล์ยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งนํานม.....	77
4.14 รูปแบบของคาร์บอนอยด์จากยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดและอาหารมาตรฐาน YM broth.....	82
ก.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารละลายกลูโคส.....	101
ก.2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์โพแทสเซียมซอร์เบต.....	105
ก.3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์.....	106
จ.1 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth เป็นเวลา 10 วัน..	115
จ.2 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มเป็นเวลา 10 วัน.....	115
จ.3 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานเป็นเวลา 10 วัน.....	116
จ.4 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งนํานมเป็นเวลา 10 วัน.....	116
จ.5 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจางเป็นเวลา 10 วัน.....	117
ข.1 โครมาโทแกรมของคาร์บอนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ.....	118
ข.2 โครมาโทแกรมของคาร์บอนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ.....	119
ข.3 โครมาโทแกรมของคาร์บอนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งนํานมวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ.....	119

รูปที่	หน้า	
ด.4	โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยง ในน้ำกะทิเจือจางวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ.....	120
ช.1	โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน น้ำหึ่งมะม่วงดองเค็ม.....	121
ช.2	โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน น้ำหึ่งมะม่วงดองหวาน.....	121
ช.3	โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน น้ำกะทิเจือจาง.....	122
ช.4	โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน น้ำหึ่งน้ำมัน.....	122
ช.1	กราฟ absorbtion spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth.....	123
ช.2	กราฟ absorbtion spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในน้ำหึ่งมะม่วงดองเค็ม.....	123
ช.3	กราฟ absorbtion spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในน้ำหึ่งมะม่วงดองหวาน.....	124
ช.4	กราฟ absorbtion spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในน้ำหึ่งน้ำมัน.....	124
ช.5	กราฟ absorbtion spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในน้ำกะทิเจือจาง.....	125

บทที่ 1

บทนำ

คาร์โบไฮเดรตหลายชนิดมีบทบาทต่ออุตสาหกรรมต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เวชภัณฑ์ อาหาร และอาหารสัตว์ ซึ่งสารบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอที่สำคัญ และหลายๆชนิดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งใช้เป็นสารให้สีในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ สารคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดเป็นสารที่มีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ สารคาร์โบไฮเดรตที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมเหล่านี้ ได้แก่ เบตาแคโรทีน และแอสตาแซนทิน การผลิตสารคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ถือเป็นวิธีทางเลือกใหม่ที่มีการพัฒนาต่อเนื่องจนกระทั่งเป็นกระบวนการผลิตทางการค้าในปัจจุบัน ซึ่งแหล่งที่มีศักยภาพแหล่งหนึ่งที่นิยมนำมาผลิตก็คือ ยีสต์ ข้อดีของการผลิตจากยีสต์คือ สามารถเลี้ยงได้ง่าย ใช้เวลาและพื้นที่ในการผลิตน้อย มีความหลากหลายของสายพันธุ์ที่สามารถคัดเลือกเพื่อนำมาผลิตคาร์โบไฮเดรตชนิดจำเพาะได้ดี ที่สำคัญคือสามารถใช้ของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงได้ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ ชนิดของน้ำทิ้งที่มีรายงานการนำมาใช้ในการเลี้ยงยีสต์ในการผลิตคาร์โบไฮเดรตได้แก่ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำอุน่เข้มข้น น้ำอุน่เหลือทิ้งจากการทำไวน์ วัสดุจากโรงงานผลิตแป้งข้าวโพด น้ำทิ้งจากโรงงานผักดอง น้ำกะทิ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตมันฝรั่ง และน้ำทะเลเทียม (Shih และ Hang, 1996; Parajo และคณะ, 1998; Buzzini และ Martini, 1999; Bhosale และ Gadre, 2001b; Dominguez-Bocanegra และ Torres-Munoz, 2004) ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งถือเป็นทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งเหล่านั้นด้วย ปัจจุบันนอกจากเบตาแคโรทีนและแอสตาแซนทินซึ่งเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่มีบทบาทเชิงอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางแล้ว ยังมีคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ที่น่าสนใจซึ่งมีคุณสมบัติโดดเด่นในแง่ของการเป็นสารต้านออกซิเดชันคือ โทรูลินและโทรูลาโรดิน (บุษบา ยงสมิทธิ, 2540; Bhosale, 2001) ซึ่งยีสต์กลุ่ม *Rhodotorula* เป็นยีสต์กลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตคาร์โบไฮเดรตชนิดโทรูลินสูงสุด รองลงมาคือ โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน ตามลำดับ งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาการผลิตคาร์โบไฮเดรตจากยีสต์จะมุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกและปรับสมบัติของน้ำทิ้งสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อเพิ่มผลผลิตคาร์โบไฮเดรตในเชิงปริมาณเท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารต่อการผลิตคาร์โบไฮเดรตทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกแหล่งอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรตชนิดจำเพาะที่ต้องการได้

บทที่ 2

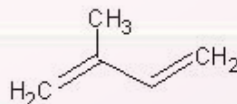
วารสารปริทัศน์

2.1 คาโรทีนอยด์ (carotenoids)

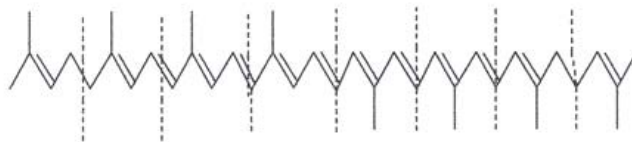
คาโรทีนอยด์ เป็นกลุ่มรงควัตถุที่พบได้แพร่หลายตามธรรมชาติ ซึ่งให้สีเหลือง สีส้ม จนถึงสีแดง พบได้ทั่วไปใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างคาโรทีนอยด์ได้ แต่คาโรทีนอยด์มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ (นิตยา ไชยเนตร, 2538 และ วีระศักดิ์ สามี, 2548)

2.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารคาโรทีนอยด์

คาโรทีนอยด์ เป็นสารประกอบในกลุ่มเตตระเทอร์เพน (tetraterpenes) ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 40 อะตอม ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) 8 หน่วยที่เกิดพันธะโควาเลนต์กัน (รูปที่ 2.1) และทำให้เกิดคอนจูเกชันของพันธะคู่เป็นสายยาว (extensive conjugated double bond) ในลักษณะสมมาตรที่มีคาร์บอนข้างละ 20 อะตอม (รูปที่ 2.2) (วีระศักดิ์ สามี, 2548; Bhosale, 2001)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลไอโซพรีน
ที่มา : Packer (1992)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของคาโรทีนอยด์
ที่มา : Bhosale (2001)

จากโครงสร้างพื้นฐานของคาโรทีนอยด์ดังกล่าวส่งผลให้คาโรทีนอยด์มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ที่สำคัญดังนี้

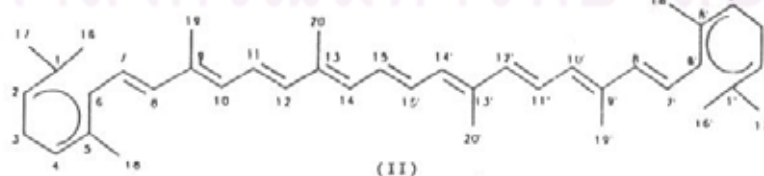
1. มีความสามารถในการละลายได้ในไขมัน เนื่องจากโมเลกุลของสารกลุ่มคาโรทีนอยด์จะประกอบไปด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) หรือมีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีผลทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน
2. มีความสามารถในการละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน (acetone) เฮกเซน (hexane) ปีโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) ไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) ฯลฯ
3. มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงสเปกตรัม สมบัติการดูดกลืนแสงของคาโรทีนอยด์นี้ขึ้นอยู่กับสายพันธะคู่คอนจูเกต (conjugated double bonds) ภายในโมเลกุล คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของคาโรทีนอยด์จะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (บุษบา ยงสมิทธิ, 2540; Goodwin, 1980; Bhosale, 2001)
4. มีความไวต่อแสง UV light fluorescent white light อากาศ ความร้อน และความเป็นกรด (วีระศักดิ์ สามี, 2548; Goodwin, 1980)

2.3 ชนิดและประเภทของคาโรทีนอยด์

คาโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามโครงสร้างหลักของโมเลกุลดังนี้ (วีระศักดิ์ สามี, 2548)

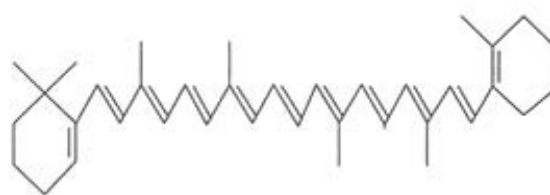
1. Hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene)

เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) (รูปที่ 2.3) ดังนั้นจึงทำให้สารคาโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ไม่มีขั้ว และสามารถละลายได้ในไขมัน ตัวอย่างคาโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบตาแคโรทีน (beta-carotene) แอลฟาแคโรทีน (alpha-carotene) ไลโคพีน (lycopene) โทรูลีน (torulene) ฯลฯ



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารคาโรทีนอยด์กลุ่มแคโรทีน
ที่มา : บุษบา ยงสมิทธิ (2540)

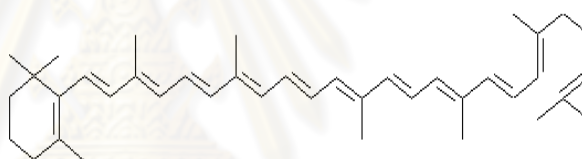
1. Beta - Carotene



2. Alpha - Carotene



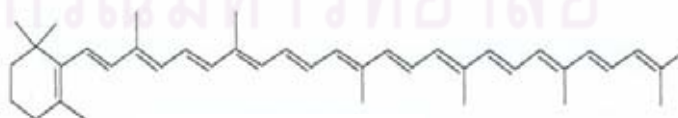
3. Gamma - carotene



4. Lycopene



5. Torulene



รูปที่ 2.4 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารคาโรทีนอยด์กลุ่มแคโรทีน (carotene)

ที่มา : Bhosale (2001) และ Sperstad และคณะ (2006)

2. Oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll)

เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) และมีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล ดังนั้นจึงทำให้สารคาโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้มีความมีขั้วมากกว่า ดังนั้นจึงมีความสามารถละลายในไขมันได้น้อยกว่าคาโรทีนอยด์กลุ่มแคโรทีน ตัวอย่างคาโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) แคนตาแซนทิน (canthaxanthin) โทรูลารโอดิน (torularhodin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin)

1. Lutein



2. Zeaxanthin



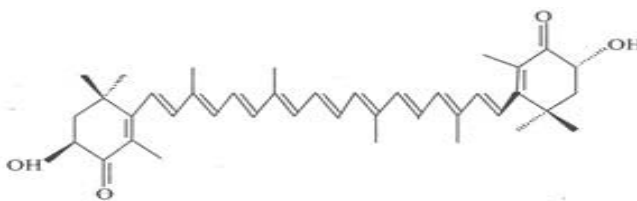
3. Canthaxanthin



4. Torularhodin



5. Astaxanthin



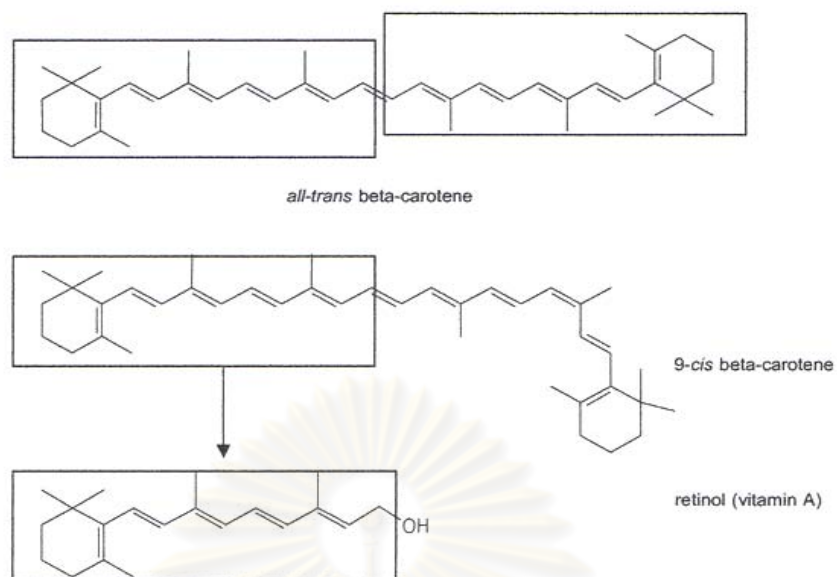
รูปที่ 2.5 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารคาโรทีนอยด์กลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ที่มา : Bhosale (2001) และ Sperstad และคณะ (2006)

2.4 คุณสมบัติและหน้าที่หลักของสารคาโรทีนอยด์

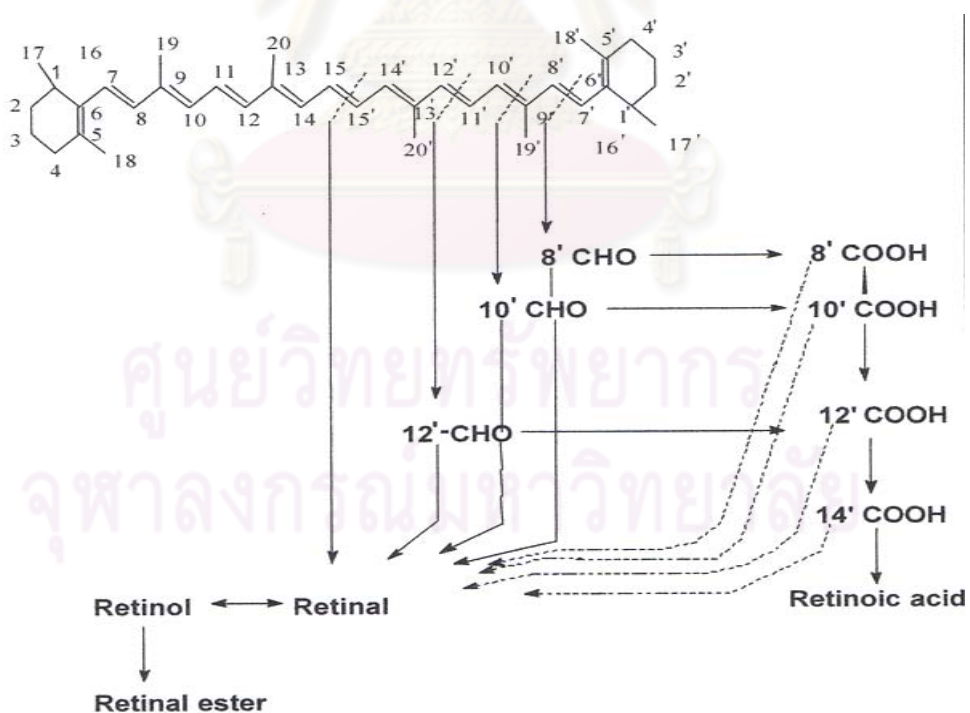
คาโรทีนอยด์หลายชนิดในปัจจุบันมีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายๆประเภทไม่ว่าจะเป็น อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ ซึ่งคุณสมบัติและหน้าที่หลักของสารคาโรทีนอยด์มีดังนี้

1. สารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ

คาโรทีนอยด์หลายชนิดมีโครงสร้างที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเพื่อสังเคราะห์วิตามินเอได้ เช่น เบตาแคโรทีน โทรูลีน โทรูลาโรดิน ฯลฯ (Bhosale, 2001) ซึ่งวิตามินเอเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการมองเห็น การสร้างสเปิร์ม การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ฯลฯ เบตาแคโรทีนตามธรรมชาติมี 2 ไอโซเมอร์ คือ *all-trans* isomers และ *cis* isomers (รูปที่ 2.6) (วีระศักดิ์ สามี, 2548) ในการเปลี่ยน *all-trans* isomers เป็นเรตินอลหรือวิตามินเอนั้นเป็นผลมาจากการตัดพันธะคู่ของสายโมเลกุลเบตาแคโรทีนที่ตำแหน่ง 8' 10' และ 12' ด้วยเอนไซม์หลายชนิด เช่น β -carotene 15,15' dioxygenase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะคู่ทำให้ได้ retinaldehyde โดย retinaldehyde 1 โมเลกุล จะเปลี่ยนไปเป็นเรตินอลด้วยเอนไซม์ retinal reductase และโมเลกุลอื่นในเบตาแคโรทีนจะถูกออกซิไดส์ไปเป็น retinoic acid (รูปที่ 2.7) (Wang และคณะ, 1991; Hinds และคณะ, 1997; Bhosale, 2001) ทั้งนี้มีรายงานวิจัยพบว่าสารโทรูลีนและโทรูลาโรดินมีคุณสมบัติเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอได้เช่นเดียวกับเบตาแคโรทีน แต่ประสิทธิภาพยังดีน้อยกว่าเบตาแคโรทีนและคุณสมบัติดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแพร่หลายเท่านี้ และในปัจจุบันได้มีการนำสารโทรูลาโรดินมาใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา (Ershov และคณะ, 1992; Eugenia และคณะ, 1996; Bhosale, 2001)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ *all-trans beta-carotene*, *9-cis beta-carotene* และ *retinol (vitamin A)*
ที่มา : วีระศักดิ์ สามี (2548)



รูปที่ 2.7 การตัดพันธะคู่ในโมเลกุลของเบตาแคโรทีนเปลี่ยนไปเป็นเรตินอลหรือวิตามินเอ
ที่มา : Bhosale (2001)

2. สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันถือเป็นหน้าที่หลักๆและมีความสำคัญลำดับต้นๆของประโยชน์ของคาโรทีนอยด์ สารในกลุ่มคาโรทีนอยด์หลายชนิด เช่น เบตาแคโรทีน ไลโคพีน โทลูซีน โทรูลาโรดิน ลูทีน ซีแซนทีน แคนตาแซนทีน และแอสตาแซนทีน เป็นสารต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระต่างๆ ที่มีผลต่อร่างกายมนุษย์ คาโรทีนอยด์ดังกล่าวมีบทบาทต่อการต้านออกซิเดชันที่เกิดจากสารกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) เช่น singlet oxygen และ oxygen radicals ซึ่งสารกลุ่ม ROS มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของสารต่างๆในร่างกาย เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และการทำลาย DNA ในร่างกายมนุษย์ นำไปสู่ความเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคหัวใจ มะเร็ง และเร่งการเสื่อมสภาพของระบบต่างๆในร่างกาย ปัจจัยภายนอกที่มีผลให้ปริมาณ ROS ในร่างกายเพิ่มขึ้น ได้แก่ ความเครียด การสูบบุหรี่ คิวทันท์ไอเสียรถยนต์ ฯลฯ มีงานวิจัยทางการแพทย์หลายงานวิจัย ได้ระบุว่าคาโรทีนอยด์เป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีกลไกที่เป็นไปได้หลายกลไก เช่น สามารถกำจัด singlet oxygen (1O_2) โดยใช้กลไกทางฟิสิกส์ เนื่องจาก singlet oxygen สามารถถ่ายเทพลังงานให้กับคาโรทีนอยด์ซึ่งสามารถดูดกลืนพลังงานได้ดี (1Car) มีผลทำให้ได้ singlet oxygen เปลี่ยนแปลงเป็นออกซิเจนที่มีพลังงานต่ำลงคือ triplet oxygen (3O_2) ซึ่งจะไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ และได้คาโรทีนอยด์ที่มีพลังงานสูง (3Car) จากนั้นคาโรทีนอยด์จะคายพลังงานออกมาในรูปความร้อน (heat) และได้คาโรทีนอยด์กลับมาเหมือนเดิม (1Car) (วีระศักดิ์ สามี, 2548; Sakaki และคณะ, 2001; Cantrell และคณะ, 2003; Wertz และคณะ, 2004; Sperstad และคณะ, 2006)

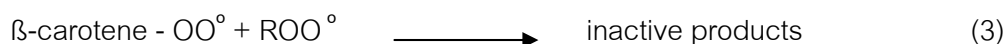
ตัวอย่างสมการทางฟิสิกส์ของการเปลี่ยนแปลง singlet oxygen ไปเป็นออกซิเจนพลังงานต่ำที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อโดยอาศัยคาโรทีนอยด์ แสดงในสมการที่ (1) และ (2) ในรูปที่ 2.8 ดังนี้



รูปที่ 2.8 สมการการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนพลังงานสูงเป็นออกซิเจนพลังงานต่ำโดยคาโรทีนอยด์ ที่มา : Cantrell และคณะ (2003) และ Wertz และคณะ (2004)

ส่วน peroxy radicals ถือได้ว่าเป็น ROS อีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่อร่างกายมาก คาโรทีนอยด์ชนิดเบตาแคโรทีนสามารถจับกับ peroxy radicals (ROO°) ดังกล่าวแล้ว

เปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (inactive products) ได้ ดังแสดงในสมการที่ (1) (2) และ (3) ในรูปที่ 2.9 (Packer และคณะ, 1992)



รูปที่ 2.9 การกำจัด peroxy radicals (ROO[°]) ของเบตาแคโรทีน

ที่มา : Packer และคณะ (1992)

3. สารลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ

มีรายงานการศึกษาหลายงานวิจัยระบุว่า คาโรทีนอยด์มีคุณสมบัติในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งได้ ซึ่งคาโรทีนอยด์ชนิดที่มีความสามารถดังกล่าว ได้แก่ เบตาแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน คริปโตแซนทีน ไลโคพีน โทรูลีน โทรูลาโรดิน ลูทีน ซีแซนทีน แคนตาแซนทีน และแอสตาแซนทีน ฯลฯ (วีระศักดิ์ สามี, 2548; Youping และคณะ, 1997; Dawson, 2000; Yasuhiro และคณะ, 2000; Bhosale, 2001) สารคาโรทีนอยด์มีบทบาทในการลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ดังนี้

มะเร็งตับ คาโรทีนอยด์ที่มีบทบาทในการลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งดังกล่าวได้ ได้แก่ เบตาแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน คริปโตแซนทีน ไลโคพีน ลูทีน ซีแซนทีน และแอสตาแซนทีน มีผลในการลดระดับของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งจะไปทำลาย DNA ในร่างกายเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ (Youping และคณะ, 1997; Dawson, 2000; Yasuhiro และคณะ, 2000)

มะเร็งปอด คาโรทีนอยด์ที่มีบทบาทในการลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งดังกล่าวได้ ได้แก่ เบตาแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน คริปโตแซนทีน ลูทีน และซีแซนทีน มีผลในการลดระดับของการเกิดออกซิเจนพลังงานสูง (singlet oxygen) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดมะเร็งปอด (Bhosale, 2001) แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยรายงานว่าเมื่อให้เบตาแคโรทีนกับผู้สูบบุหรี่ พบว่าอัตราการตายและอัตราการเกิดมะเร็งปอดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผู้สูบบุหรี่ที่ไม่ได้รับเบตาแคโรทีน ซึ่งจากรายงานสามารถสรุปได้อย่างคร่าวๆ ว่าการสูบบุหรี่หรือร่วมกับการได้รับเบตาแคโรทีนจะมีผลทำให้โอกาสการเกิดมะเร็งในปอดเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเบตาแคโรทีนจะไปมีผลเร่งการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างของสารก่อมะเร็งให้มีประสิทธิภาพในการก่อมะเร็งเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้มีการสะสมของสารก่อมะเร็งที่ปอดมากขึ้น (วีระศักดิ์ สามิ, 2548)

มะเร็งต่อมลูกหมาก คาโรทีนอยด์ที่มีบทบาทในการลดอัตราการเกิดมะเร็งดังกล่าวได้ ได้แก่ เบตาแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน ไลโคพีน เป็นต้น (Williams และคณะ, 2000; Bhosale, 2001) มีรายงานว่าไลโคพีนถือเป็นสารคาโรทีนอยด์ที่มีความสามารถในการลดการเกิดมะเร็งดังกล่าวได้สูง (วีระศักดิ์ สามิ, 2548; Bhosale, 2001)

นอกจากนี้แล้วในการศึกษาวิจัยทางการแพทย์พบว่า การบริโภคผักผลไม้ที่มีสารคาโรทีนอยด์ในปริมาณสูงจะแปรผกผันกับการเกิดโรคมะเร็งปอด หลอดลม กระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่ รั้งไข่ และคอ (วีระศักดิ์ สามิ, 2548)

จากคุณสมบัติและหน้าที่หลักของคาโรทีนอยด์ดังกล่าวนี้ ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์และสัตว์ และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชภัณฑ์

2.5 การใช้คาโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม

2.5.1 อุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์

คาโรทีนอยด์ชนิดที่มีบทบาทต่ออุตสาหกรรมดังกล่าว ได้แก่ เบตาแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน คริปโตแซนทิน ไลโคพีน ลูทีน ซีแซนทิน แคนตาแซนทิน แอสตาแซนทิน ฯลฯ ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์ที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมคือ ใช้เป็นสารให้สีในอาหาร เนื่องจากคาโรทีนอยด์เป็นกลุ่มรงควัตถุซึ่งให้สีเหลือง สีส้ม จนถึงสีแดง จึงได้มีการพัฒนานำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์ต่างๆ มากมาย เช่น ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ผลิตภัณฑ์นมและไขมัน ผลิตภัณฑ์จากไข่ มาการีน เนยเหลว เนยแข็ง พาสต้า น้ำสลัด เครื่องดื่มน้ำอัดลมโดยเฉพาะน้ำส้ม ไอศกรีม ของหวาน ซุป ผลิตภัณฑ์เนื้อ ฯลฯ ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์คาโรทีนอยด์ที่นิยมใช้คือ เบตาแคโรทีน แคนตาแซนทิน และแอสตาแซนทิน โดยใช้เป็นสารให้สีในเนื้อปลาเทราท์ กุ้ง กุ้ง และอุตสาหกรรมสัตว์ปีกจำพวกไก่ไข่ ปัจจุบันคาโรทีนอยด์กลุ่มแซนโทฟิลล์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ได้เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ในการนำไปเป็นสารให้สีในเนื้อสัตว์กันมาก เช่น การใช้แอสตาแซนทินจากยีสต์เพื่อเพิ่มสีของเนื้อปลาแซลมอนจะใช้ได้ดีกว่าแอสตาแซนทินจากการสังเคราะห์ทางเคมี และการใช้แซนโทฟิลล์จากจุลินทรีย์ในการเพิ่มสีของไข่ไก่ (บุษบา ยงสมิทธิ, 2540; Braeunlich, 1978) และในปัจจุบันกำลังมีการพัฒนาปรับปรุงการนำโพรตีนไปใช้เป็นสารเพิ่มสีในไข่ไก่ และเนื้อสัตว์ได้เช่นเดียวกัน (Harasawa และคณะ, 1984)

2.5.2 อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชภัณฑ์

คาโรทีนอยด์ที่มีบทบาทต่ออุตสาหกรรมนี้ ได้แก่ เบตาแคโรทีน ไลโคพีน ลูทีน ไฟโตอีลัน ไฟโตฟูอีลัน แอสตาแซนทีน เป็นต้น ปัจจุบันจึงได้มีการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะผลิตเป็นเครื่องสำอางบำรุงผิวหน้าชนิดต่างๆ มีส่วนผสมของเบตาแคโรทีนซึ่งมีผลช่วยป้องกันผิวถูกทำลายจากแสงแดดและปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตลอดจนช่วยในการชะลอความแก่ ซึ่งเบตาแคโรทีนเป็นสารต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดริ้วรอยมีผลทำให้แก่ก่อนวัยอันควร (Frank และคณะ, 2000; Hong และ Jihong, 1999; Nobuhiko และคณะ, 2000) นอกจากนี้ประโยชน์การนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวพรรณต่างๆแล้ว ยังมีการนำประโยชน์ในด้านการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระไปใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ซึ่งผลิตจากแหล่งผลิตทางชีวภาพ (บุษบา ยงสมิทธิ, 2540)

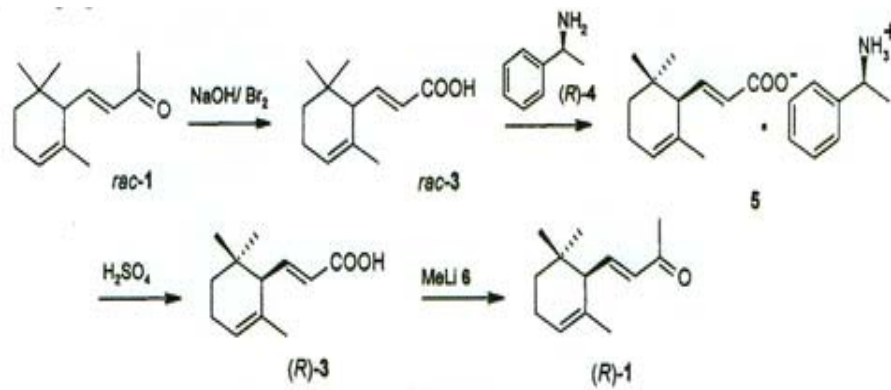
2.6 การผลิตและการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์

การผลิตคาโรทีนอยด์ในปัจจุบันแบ่งการผลิตออกเป็น 2 วิธี คือ การผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี และการผลิตโดยวิธีทางชีวภาพ

2.6.1 การผลิตคาโรทีนอยด์โดยการสังเคราะห์ทางเคมี

ตัวอย่างการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ชนิด E-group (Pfander และคณะ, 1997)

การสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ชนิด E-group นี้เริ่มจากการใช้คาโรทีนอยด์ที่เป็นอีแนนทิโอเมอร์ (Enantiomer) ของ (S-(-)- α -ionone (หรือ (R)-1) และ (R-(+)- α -ionone (หรือ (S)-1) เป็นสารตั้งต้น นำอีแนนทิโอเมอร์ของสารทั้งสองชนิดนี้มาสังเคราะห์ร่วมกับ (6'R)- α -carotene โดยใช้เมทิลไฮดราโซน (Methylhydrazone) ทำให้ได้ racemic α -ionone (rac-1) ซึ่งจะถูกละลายเป็น C12-acid rac-3 หลังจากนั้นจึงเติมฟีนิลอะทิลามีน ((R)-(+)-1-phenylathylamine : ((R)-4) ได้สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นเกลือ ทำให้ตกผลึกซ้ำ (Recrystallize) 10 ครั้ง แล้วจึงเติมกรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) จะเกิดเป็น C-12 acid (R)-3 ซึ่งจะถูกละลายเป็น (R-(+)- α -ionone ((R)-1 แสดงในรูปที่ 2.10

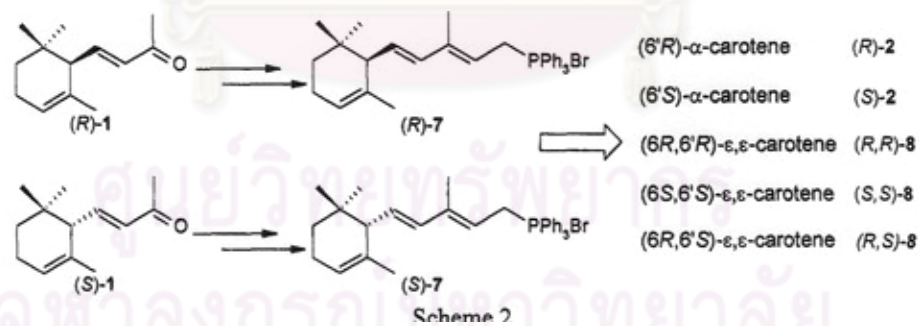


รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์ (R-(+))- α -ionone ((R)-1) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (Intermediate)

ในกระบวนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์โดยวิธีทางเคมี

ที่มา : Pfander และคณะ (1997)

ถ้าสังเคราะห์ด้วย (S-(-))- α -ionone ((S)-1) จะใช้ (S-(-))-1-phenylethylamine ในการทำปฏิกิริยาภายหลังจากได้ (R)-1 หรือ (S)-1 ต่อความยาวของ α -ionone ทั้งสองชนิดให้กลายเป็น C15-phosphonium salts ชนิด (R)-7 หรือ (S)-7 ทำปฏิกิริยาได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ได้แก่ (6'R)- α -carotene หรือ (R)-2 และ (6'S)- α -carotene หรือ (S)-2 และสามารถเกิดสเตอริโอไอโซเมอร์ได้เป็นคาโรทีนอยด์สามชนิด ได้แก่ (6R,6'R)- ϵ,ϵ -carotene (หรือ (R,R)-8), (6S,6'S)- ϵ,ϵ -carotene (หรือ (S,S)-8) และ (6R,6'S)- ϵ,ϵ -carotene (หรือ (R,S)-8) แสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 กระบวนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์โดยวิธีทางเคมี โดยเริ่มต้นจาก (R)-1

และ (S)-1

ที่มา : Pfander และคณะ (1997)

การผลิตคาโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า จึงสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากเพียงพอต่อความต้องการใน

แต่ละครั้งการผลิต แต่ในการผลิตดังกล่าวยังมีปัญหาและข้อจำกัดในการใช้อยู่มาก เช่น มีขั้นตอนในการผลิตที่ยุ่งยากซับซ้อน และมีรายงานว่าคาโรทีนอยด์ที่ผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมีจะมีความแตกต่างกับคาโรทีนอยด์ที่ผลิตได้โดยวิธีทางชีวภาพในด้านโครงสร้าง ซึ่งจะทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพในการนำไปใช้ไม่ดีเท่าที่ควร เช่น เมื่อนำไปผสมในอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์น้ำจะดูดซึมได้ไม่ดีเท่ากับคาโรทีนอยด์ที่ผลิตโดยวิธีทางชีวภาพ (นฤมล ใบบัด, 2546) อีกทั้งปัจจุบันผู้บริโภคมีแนวโน้มในการระมัดระวังในการบริโภคสารสังเคราะห์มากขึ้น

2.6.2 การผลิตคาโรทีนอยด์โดยวิธีทางชีวภาพ

การผลิตสารคาโรทีนอยด์ในทางชีวภาพนั้น ถือเป็นวิธีการผลิตที่เป็นทางเลือกที่นิยมและเป็นที่สนใจกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากการผลิตทางชีวภาพมีแหล่งการผลิตหลากหลายชนิด ได้แก่ แหล่งจากพืช สัตว์ สาหร่าย และจุลินทรีย์

1. การผลิตคาโรทีนอยด์จากพืช

คาโรทีนอยด์ที่พบมากในพืช คือ เบตาแคโรทีน ถือเป็นคาโรทีนอยด์ที่มีมากในพืชผักผลไม้ทั่วไป คาโรทีนอยด์จะพบทั่วไปในพืชผักผลไม้ที่มีสี ไม่ว่าจะเป็นสีส้ม แดง เหลือง ฯลฯ เช่น แครอท มะเขือเทศ มะละกอ ส้ม มะม่วง กัลฉวย บร็อคโคลี่ มันเทศ แตงโม องุ่นแดง ผักโขม พักทอง เป็นต้น ซึ่งถือว่าเบตาแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอที่สำคัญ ผักผลไม้ส่วนใหญ่จะมีเบตาแคโรทีนอยู่ประมาณ 40-615 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักผลสด (Bhosale, 2001) นอกจากนี้เบตาแคโรทีนจะเป็นคาโรทีนอยด์ที่พบได้ส่วนใหญ่ในพืชแล้ว ยังพบคาโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ แอลฟาแคโรทีน ไลโคพีน ลูทีน ซีแซนทีน คีโรฟิโตแซนทีน เป็นต้น

2. การผลิตคาโรทีนอยด์จากสัตว์

คาโรทีนอยด์ในสัตว์มีปริมาณน้อย เนื่องจากสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ได้ แต่จะสะสมคาโรทีนอยด์ได้จากอาหารที่กินไปเท่านั้น คาโรทีนอยด์ชนิดที่พบมากในสัตว์น้ำได้แก่ ลูทีน ซีแซนทีน และแคนตาแซนทีน คาโรทีนอยด์ชนิดที่พบมากในสัตว์พวกครัสเตเชียคือ แอสตาแซนทีน เบตาแคโรทีน และคีโรฟิโตแซนทีน สัตว์พวกครัสเตเชียได้แก่ กุ้ง กุ้ง ปู ฯลฯ สัตว์จำพวกนี้ไม่สามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ขึ้นเองได้ แต่สามารถสะสมจากอาหาร เมื่ออาหารถูกย่อยคาโรทีนอยด์จะถูกดูดซึมผ่านผนังอาหารร่วมกับไขมัน ส่งผ่านไปสะสมในส่วนต่างๆ ของร่างกาย ทำให้เกิดสีที่ตา เลือด ไข่ เปลือก ตับ รังไข่ และอวัยวะสืบพันธุ์ คาโรทีนอยด์ชนิด แอสตาแซนทีนเป็นคาโรทีนอยด์ที่พบในครัสเตเชียเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะกุ้งทะเลพบ

แอสตาแซนทินสูงถึง 65-98% ของปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด และยังเป็นรงควัตถุสำคัญที่ทำให้กุ้งมีสีส้มแดงเมื่อต้มสุก เบตาแคโรทีนเป็นคาโรทีนอยด์อีกชนิดที่สำคัญ และพบในสัตว์ครึ่งตาเซียนในปริมาณที่น้อยกว่าแอสตาแซนทิน โดยจะแพร่กระจายอยู่ทั่วร่างกายพบเบตาแคโรทีนที่เปลือกของกุ้งกุลาดำประมาณ 3.6 เปอร์เซ็นต์ของคาโรทีนอยด์รวม ส่วนแซนโทฟิลชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แอสตาแซนทินที่พบในสัตว์พวกครึ่งตาเซียนคือ คริปโตแซนทิน พบในปริมาณน้อยและสะสมในเลือด ไช้ และที่ตา กลุ่มที่พบมากพบได้ใน isopod (*Asellus aquaticus*) และที่เปลือกของ *Carcinus maenas* (มุทิตา ธรรมสังคม, 2545; Goodwin, 1980)

3. การผลิตคาโรทีนอยด์จากสาหร่าย

การผลิตคาโรทีนอยด์ด้วยวิธีนี้ได้มีการนำไปใช้ทางค้า ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งที่มีศักยภาพที่ดีแหล่งหนึ่ง คาโรทีนอยด์ที่สามารถผลิตได้จากสาหร่ายได้แก่ เบตาแคโรทีน และแอสตาแซนทิน สาหร่ายชนิดที่สามารถผลิตเบตาแคโรทีนคือ *Dunaliella* sp. ซึ่ง *Dunaliella* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ไม่มีผนังเซลล์ สามารถผลิตเบตาแคโรทีนได้ในระดับสูงเมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเกลือและแสงในระดับที่เหมาะสม ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* sp. ทางการค้าในสภาวะเปิดใกล้ทะเลสาบน้ำเค็มในประเทศออสเตรเลีย และที่ Nucara True Aroma Therapy รัฐไอโอวา ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Bhosale, 2001) นอกจากนี้ยังมีสาหร่าย *Haematococcus* sp. ซึ่งมีความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทิน ถือเป็นสาหร่ายชนิดที่มีศักยภาพสูงในการผลิตแอสตาแซนทินมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับอุตสาหกรรม ปัจจุบันหลายประเทศได้ให้ความสนใจในเรื่องนี้โดยผลิตเพื่อการค้า และตลาดใหญ่ที่ต้องการสินค้าประเภทนี้ก็คือ อุตสาหกรรมการผลิตปลาแซลมอน ปลาเทราท์ และอุตสาหกรรมสัตว์ปีก (นฤมล ใบบัด, 2546)

4. การผลิตคาโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์

ปัจจุบันคาโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ถือเป็นแหล่งที่มีบทบาทแหล่งหนึ่ง โดยที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีความสามารถในการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์แตกต่างกันไป จุลินทรีย์ที่สามารถนำมาผลิตคาโรทีนอยด์ได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ ดังแสดงตารางที่ 2.1 ดังนี้

ตารางที่ 2.1 คาโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากแหล่งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ชนิดของคาโรทีนอยด์	แหล่งจุลินทรีย์
เบตาแคโรทีน (Beta-carotene)	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Phycomyces blakesleeanus</i> * <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Sporobolomyces pararoseus</i> <i>S. shibatanus</i> <i>S. pararoseus</i> <i>Rhodospiridium diobovatum</i> <i>Candida utilis</i> ** <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Agrobacterium aurantiacum</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Escherichia coli</i> ***
แอลฟาแคโรทีน (Alpha-carotene)	<i>P. rhodozyma</i> **
แอสตาแซนทิน (Astaxanthin)	<i>P. rhodozyma</i> <i>Rhodotorula</i> sp. ** <i>Mycobacterium lacticola</i> <i>Brevibacterium</i> sp. ***
แคนตาแซนทิน (Canthaxanthin)	<i>P. rhodozyma</i> ** <i>Corynebacterium michiganese</i> <i>Brevibacterium</i> sp. <i>Rhodococcus maris</i> ***
ไลโคพีน (Lutein)	<i>P. rhodozyma</i> <i>C. utilis</i> ** <i>Rhodopseudomonas capsulate</i> <i>A. aurantiacum</i> <i>E. coli</i> <i>Streptomyces chrestomyceticus</i> ***
โทรูลาโรดิน (Torularhodin)	<i>Rhodotorula</i> spp. <i>P. rhodozyma</i> <i>Rhodospiridium diobovatum</i> , <i>S. pararoseus</i> **

* หมายถึง จุลินทรีย์จำพวกรา ** หมายถึง จุลินทรีย์จำพวกยีสต์

*** หมายถึง จุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย

ที่มา : Bhosale (2001)

ในปัจจุบันการผลิตคาโรทีนอยด์ในทางการค้าจากจุลินทรีย์ มักจะนิยมผลิตจากยีสต์คาโรทีนอยด์ชนิดที่ยีสต์สามารถผลิตได้ทางการค้า คือ แอสตาแซนทิน และเบตาแคโรทีน โดยที่ยีสต์ชนิด *P. rhodozyma* เป็นยีสต์สีแดงที่สามารถผลิตแอสตาแซนทินและถูกนำมาใช้ผลิตในทางการค้าเป็นอย่างมาก จากการประมาณการของ Johnson และ Schroeder (1995) คาดว่าในปี ค.ศ.2000 จะมีการใช้แอสตาแซนทินไปในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต่างๆ ทั่วทั้งโลกมีมูลค่าสูงถึง 455 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในที่นี้เป็นแอสตาแซนทินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีอยู่สูงถึง 305 ล้านดอลลาร์สหรัฐ แต่เมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มการบริโภคในปัจจุบัน พบว่าผู้คนส่วนใหญ่เริ่มมีความระมัดระวังใส่ใจในการบริโภคอาหารที่มีสารเคมีสังเคราะห์เจือปน ดังนั้นการใช้แอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากธรรมชาติซึ่งก็คือยีสต์น่าจะปลอดภัยและได้รับความไว้วางใจจากผู้บริโภคมากกว่า แอสตาแซนทินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากราคาขายของแอสตาแซนทินที่ผลิตจากแหล่งธรรมชาติมีมูลค่าสูงมากถึง 2500-3000 ดอลลาร์สหรัฐต่อ 1 กิโลกรัม (นฤมล ไบพัด, 2546) จึงเป็นที่สนใจให้ผู้วิจัยพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ดังกล่าวให้มีความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทินได้มากขึ้น นอกจากนี้แล้วยังมียีสต์อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับการนำมาผลิตเชิงการค้าเช่นเดียวกับ *P. rhodozyma* คือ *Rhodotorula* spp. ซึ่งเป็นยีสต์สีแดงสามารถเจริญได้อย่างอิสระตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้ และเป็นยีสต์เซลล์เดี่ยว โดยทางพันธุกรรมทั่วไปของยีสต์ *R. glutinis* และยีสต์ในกลุ่ม *Rhodotorula* อื่นๆ จะสามารถผลิตคาโรทีนอยด์ชนิดโทรูลิน โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตแกมมาแคโรทีนได้แต่ผลิตในปริมาณน้อย (Perrier และคณะ, 1995) จากข้อมูลรายงานการวิจัยต่างๆ สามารถชี้บ่งได้ว่ายีสต์ต่างสายพันธุ์กันย่อมมีความสามารถในการผลิตคาโรทีนอยด์ได้แตกต่างกันไปทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ดังนี้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบหลักของคาโรทีนอยด์ที่สามารถผลิตได้จากยีสต์ชนิดต่างๆ

ชนิดของยีสต์	องค์ประกอบหลักของคาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตได้
<i>P. rhodozyma</i>	Astaxanthin , Echinenone , 3 - Hydroxyplectanixanthin , Phoenicoxanthin
<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	γ - carotene , Torulene , β - carotene, Torularhodin , Neurosporene , Phytoene , Phytofluene

ชนิดของยีสต์	องค์ประกอบหลักของคาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตได้
<i>R. aurantiaca</i>	γ - carotene , Torulene , β - carotene , Torularhodin , Neurosporene , Phytoene , Phytofluene , Echinenone
<i>R. glutinis</i>	γ - carotene , Torulene , β - carotene , Torularhodin , Neurosporene , Phytoene , Phytofluene , δ - carotene , β - zeaxanthin
<i>R. gracilis</i>	γ - carotene , Torulene , Neurosporaxanthin , β - carotene , Torularhodin , Phytoene , Phytofluene , δ - carotene , β - zeaxanthin

ที่มา : Goodwin (1980)

2.7 ยีสต์

ยีสต์ คือ จุลินทรีย์เซลล์เดี่ยวมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลมรี สามเหลี่ยม เป็นต้น ขนาดของเซลล์ยีสต์มีความแปรผันมาก บางชนิดมีความยาวของเซลล์ 2-3 ไมโครเมตร ในขณะที่บางชนิดยาว 20-50 ไมโครเมตร ส่วนความกว้างของเซลล์ผันแปรน้อยกว่าคือ ระหว่าง 1-10 ไมโครเมตร ภายในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโครงสร้างต่างๆ ดังนี้คือ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) เพอริพลาสซึม (periplasm) ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) นิวเคลียส (nucleus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) แวกิวโอล (vacuole) และ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) (สวาทรี ลิมทอง, 2549) ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน น้ำ และส่วนต่างๆ ของพืช

การผลิตคาโรทีนอยด์จากยีสต์ถือว่าเป็นแหล่งที่มีศักยภาพแหล่งหนึ่งที่มีความน่าสนใจนำมาผลิต ซึ่งการผลิตคาโรทีนอยด์จากยีสต์มีข้อดีที่แตกต่างจากการผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นและสาหร่ายดังนี้

1. ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว จึงสามารถเลี้ยงได้ง่าย ส่งผลให้สามารถขยายขนาดการทดลองได้กว้างขึ้น
2. ยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ส่งผลให้ได้ปริมาณผลผลิตสูง
3. ยีสต์สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี
4. สามารถนำยีสต์ในรูปเซลล์แห้งไปใช้ในอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้ดี

นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ใช้พื้นที่น้อยในการผลิต สามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในปริมาณสูง และมีลักษณะเด่นคือ สามารถในการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยง และยังพบว่ายีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ได้ต่างชนิดกัน ยีสต์ที่ได้รับความสนใจนำมาใช้ในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ *R. mucilaginosa* ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (Shih และ Hang, 1996; Parajo และคณะ, 1998; Buzzini และ Martini, 1999; Dominguez-Bocanegra และ Torres-Munoz, 2004; Tinoi และคณะ, 2005)

2.8 *Rhodotorula mucilaginosa*

จัดอยู่ในวงศ์และสกุลดังแสดงในตารางที่ 2.3 ดังนี้

ตารางที่ 2.3 วงศ์และสกุลของยีสต์ *R. mucilaginosa*

Kingdom:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Class:	Urediniomycetes
Order:	Sporidiales
Family:	Sporidiobolaceae
Genus:	<i>Rhodotorula</i>

ที่มา : Barnett และคณะ (2000)

R. mucilaginosa เป็นยีสต์สายพันธุ์หนึ่งซึ่งเดิมสามารถพบได้ในแหล่งน้ำเค็ม จึงสามารถทนเค็มได้ มีชื่อเดิมคือ *R. rubra* สามารถพบได้ในอากาศ ดิน ทะเลสาบ มหาสมุทร ฯลฯ เซลล์ยีสต์สายพันธุ์นี้จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5-10 ไมโครเมตร สามารถเจริญในอาหาร

เลี้ยงเชื้อได้หลากหลายเช่น SDA (Sabaroud's Dextrose Agar) Malt extract Malt agar PDA (Plate count agar) Corn meal agar ฯลฯ สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิช่วง 25-37 องศาเซลเซียส โคลินของยีสต์ชนิดนี้จะมีสีส้ม สีชมพูจนถึงสีแดงเข้ม ที่ผิวของโคลินบางชนิดจะเรียบหรือย่น และมีลักษณะด้านจนถึงเป็นเงา มีรูปร่างหลากหลายเช่น รูปร่างกลม กลมรี รูปแพร์ ฯลฯ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และไม่มีความสามารถในการหมักน้ำตาล (Rose และคณะ, 1977; Barnett และคณะ, 2000)

ยีสต์ชนิดนี้มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ *R. mucilaginosa* เพื่อการเจริญเติบโต

แหล่งคาร์โบไฮเดรต	ความสามารถในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	แหล่งคาร์โบไฮเดรต	ความสามารถในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอน
D-Glucose	+	Xylitol	+
D-Galactose	+,-	D-Mannitol	+,-
L-Sorbose	+,-	Ribitol	+,-
D-Glucosamine	-	Erythritol	-
D-Ribose	+	L-Arabinitol	+,-
D-Xylose	+	D-Glucitol	+,-
D และ L-Arabinose	D (+) , L(+,-)	Galactitol	+,-
L-Rhamnose	+,-	Salicin	+,-
Sucrose	+	Arbutin	+,-
Maltose	+,-	Melibiose	-
α , α -Trehalose	+	Melezitose	+,-
Cellobiose	+,-	Inulin	-
Lactose	-	myo - Inositol	-
Raffinose	+	Starch	-

+ หมายถึง ยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตนี้ได้

- หมายถึง ยีสต์ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตนี้ได้

ที่มา : Barnett และคณะ (2000)

นอกจากคาร์โบไฮเดรตมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์แล้ว ยีสต์ยังต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเช่นเดียวกันซึ่งแหล่งไนโตรเจนทั่วไปที่ *R. mucilaginosa* สามารถใช้ในการเจริญได้เช่น ไนเตรต ไนไตรท์ เบปโติน ฟอสเฟต ฯลฯ นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ยีสต์ต้องการแล้ว ยีสต์ยังต้องการแร่ธาตุและวิตามินต่างๆ เพื่อเสริมการเจริญให้ได้ยิ่งขึ้น ได้แก่ Biotin Pyridoxine และ Niacin ฯลฯ (Barnett และคณะ, 2000)

ยีสต์ชนิดนี้จะสร้างรงควัตถุคือคาโรทีนอยด์เพื่อป้องกันอันตรายของรังสีและแสงซึ่งองค์ประกอบหลักของคาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ชนิดนี้สามารถผลิตได้คือ โทรูลีน โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน ซึ่งปัจจุบันโทรูลีนมีการยอมรับนำมาใช้เป็นสีในไข่ไก่ และเนื้อสัตว์ (Harasawa และคณะ, 1984) ส่วนโทรูลาโรดินปัจจุบันใช้เป็นส่วนประกอบในยาหยอดตา (Setsuo และ Sakaki, 1996) ซึ่งคาโรทีนอยด์ทั้งสองชนิดดังกล่าวมีรายงานว่ามีความสมบัติเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ (Ershov และคณะ, 1992 และ Eugenia และคณะ, 1996)

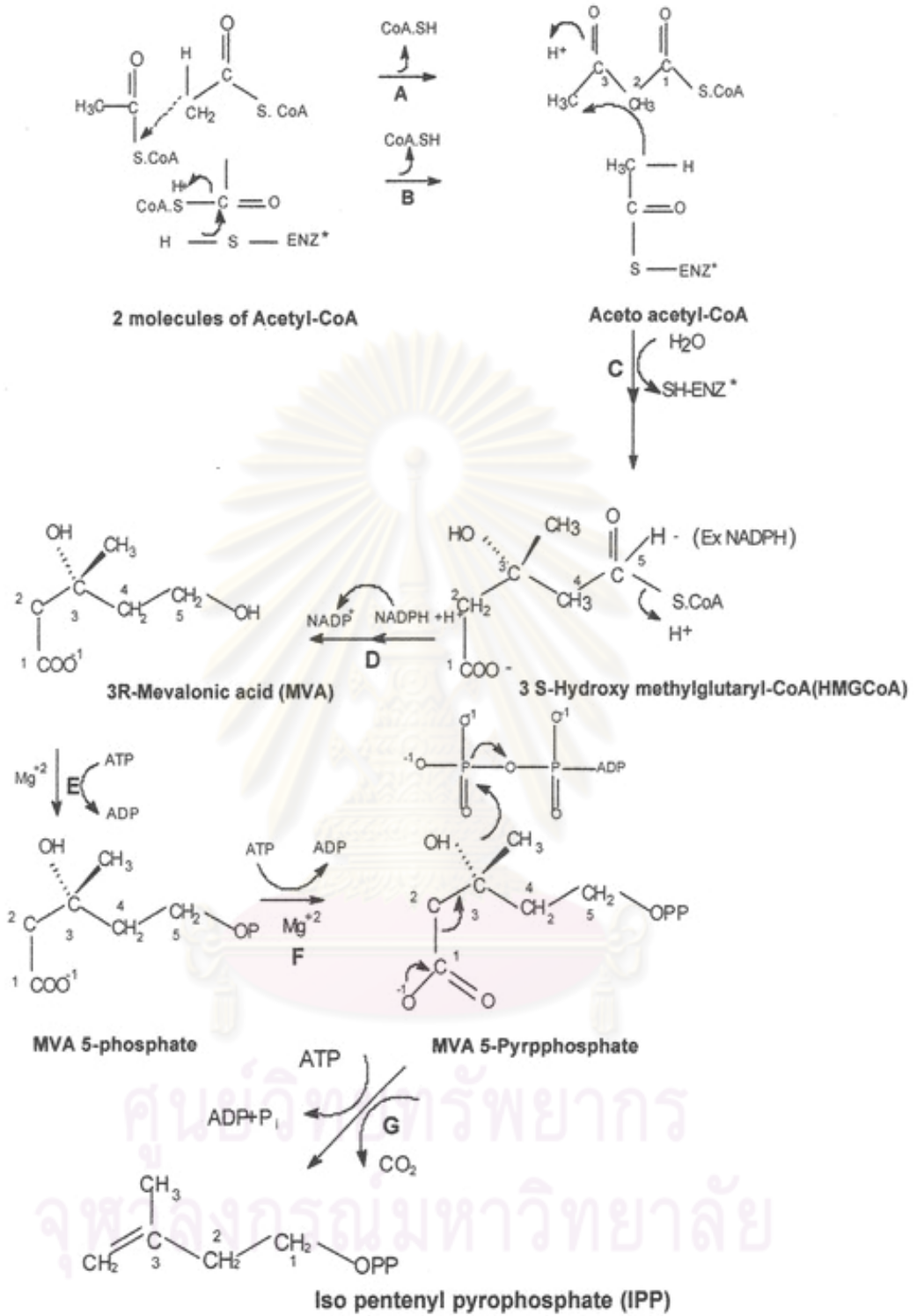
2.9 ขั้นตอนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์

ในขั้นตอนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์จากยีสต์จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์ โดยสารตั้งต้นที่เป็นกุญแจสำคัญสำหรับการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ของจุลินทรีย์ในกลุ่มฟังไจ และพืชสังเคราะห์แสงคือ อะซิติล โคเอ (Acetyl CoA) ซึ่งสังเคราะห์ของคาโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1. การสังเคราะห์ isopentyl pyrophosphate (IPP) (บุษบา ยงสมิทธิ, 2549; Goodwin, 1980; Bhosale, 2001; Frengova และคณะ, 2008)

ขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนการเปลี่ยน Acetyl – CoA เป็น 3-hydroxyl-3-methyl glutaryl CoA ด้วยเอนไซม์ HMG-CoA synthase สารเทอร์ปีนอยด์ทั้งหลายรวมทั้งคาโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์มาจาก Mevalonic acid (MVA) ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก HMG-CoA และจาก MVA จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น Isopentenyl pyrophosphate (IPP) และ Dimethyl allyl pyrophosphate (GPP) ซึ่งเป็นไอโซเมอร์กัน โดยปฏิกิริยา phosphorylation และ decarboxylation แสดงดังรูปที่

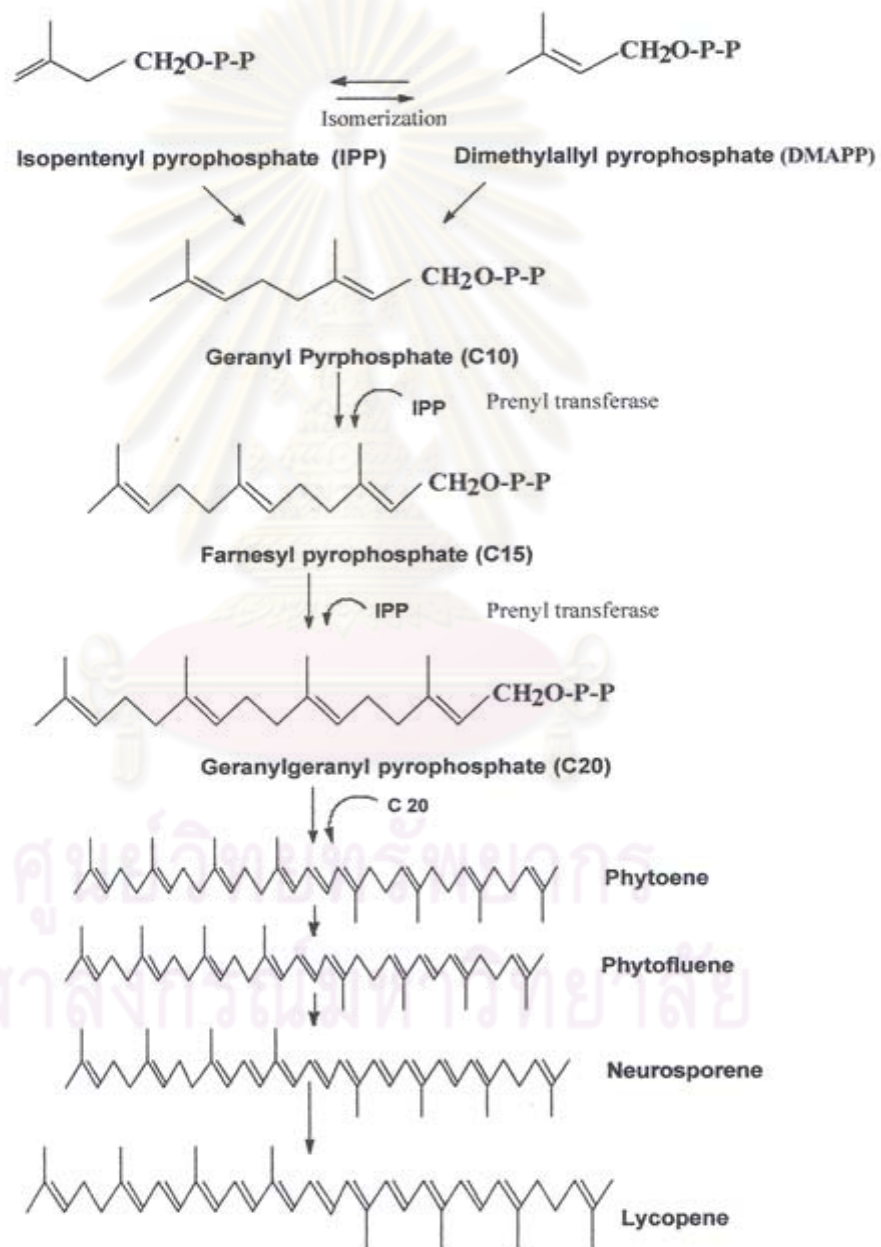
2.12



รูปที่ 2.12 วิธีการสังเคราะห์ของ IPP (Iso pentenyl pyrophosphate)
 ที่มา : Bhosale (2001)

2. การสังเคราะห์ Phytoene (บุษบา ยงสมิทธิ, 2549; Bhosale, 2001; Frengova และคณะ, 2008)

จากนั้นมีการรวมตัว (condensation) หัวท้ายของไอโซพรีน ของ 2 ไอโซเมอร์คือ IPP และ GPP ได้เป็นสาร Geranyl pyrophosphate (GPP) และมีการเติม IPP ไป 2 ครั้งระหว่างปฏิกิริยาโดยมีเอนไซม์ prenyl transferase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็นสาร Farnesyl pyrophosphate (FPP) และ Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) ตามลำดับ จากนั้น GGPP เกิดการรวมตัวกัน 2 โมเลกุลได้ Phytoene แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 วิธีการสังเคราะห์ของ Lycopene

ที่มา : Bhosale (2001)

3. การสังเคราะห์สารคาโรทีนอยด์ต่างๆ (บุษบา ยงสมิทธิ, 2549; Bhosale, 2001 ; Frengova และคณะ, 2008)

Phytoene ในจุลินทรีย์กลุ่มฟังไจพบในรูปการจัดหมู่ที่ตำแหน่ง 15 เป็นแบบซิส (15-cis Confriguration) และจะเปลี่ยนหมู่เป็นแบบทรานส์ (trans configuration) โดยผ่านปฏิกิริยา isomerization และได้ทรานส์คาโรทีนอยด์ (trans carotenoids) ปฏิกิริยาการเกิดวง (cyclization) ของแคโรทีนไม่อิ่มตัวและไม่เป็นวง (unsaturated acyclic carotenes) ทำให้วงบีตา (β -rings) ความสัมพันธ์ชีวสังเคราะห์ระหว่างสารคาโรทีนอยด์ ดังลำดับดังนี้ (แสดงดังรูปที่ 2.14)

3.1 การเปลี่ยนรูปสารเป็น Lycopene จาก Phytoene โดยปฏิกิริยา dehydrogenation
4 ขั้นตอน

3.2 การเปลี่ยนรูปสารเป็น Spheroidene จาก Lycopene โดยมีการเติมโมเลกุลของน้ำที่พันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 2 ปฏิกิริยา dehydrogenation ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ปฏิกิริยา methylation ของหมู่ OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และจากนั้นสาร Spheroidene จะถูกเปลี่ยนรูปเป็นสาร Spheroidenone โดยปฏิกิริยาการเติมหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2

3.3 การเปลี่ยนรูปสารเป็น Gamma - carotene, Beta - carotene และ Alpha - carotene จาก Lycopene โดยปฏิกิริยาการเกิดวง (cyclization) ที่ปลาย 1 และ 2 ได้สารที่มีปลายบีตาที่ตำแหน่ง 1 (1 β end group) ได้สาร Gamma - carotene ปฏิกิริยาการเกิดวง ได้สารที่มีปลายบีตาที่ตำแหน่ง 2 (2 β end group) ได้สาร Beta - carotene และปฏิกิริยาการเกิดวง ได้สารที่มีปลายบีตาที่ตำแหน่ง 1 และปลายซีตาที่ตำแหน่ง 1 (1 β - และ ϵ end group)

3.4 การเปลี่ยนรูปสารเป็นสาร Torulene จาก Gamma - carotene โดยปฏิกิริยา dehydrogenation ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3' และ 4' และ Torulene จะถูกเปลี่ยนรูปเป็น Torularhodin โดยปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนที่ปลายโครงสร้าง

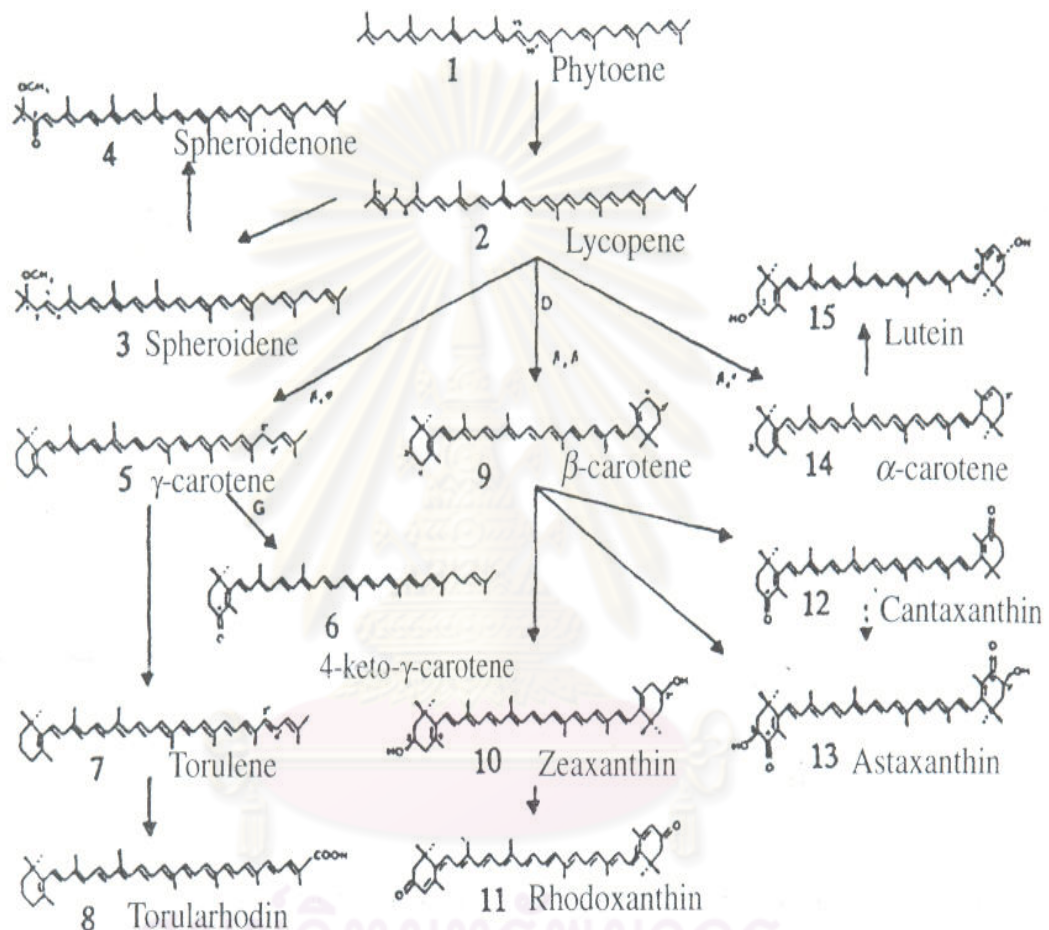
3.5 การเปลี่ยนรูปสารเป็น 4-keto- γ -carotene จาก Gamma - carotene โดยปฏิกิริยาการเติมหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่ง 4, hydroxylation และ dehydrogenation ตามลำดับ

3.6 การเปลี่ยนรูปสารเป็นสาร Zeaxanthin จาก Beta - carotene โดยปฏิกิริยา hydroxylation ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 3' และปฏิกิริยาสามารถพบในการเปลี่ยนรูปเป็นสาร Lutein จาก Alpha - carotene

3.7 การเปลี่ยนรูปสารเป็น Rhodoxanthin จาก Zeaxanthin โดยการเติมหมู่ OH ตำแหน่งที่ 5, การสูญเสียไฮโดรเจนที่มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 4', การสูญเสียโมเลกุลของน้ำ และการเกิดปฏิกิริยา Hydroxylation ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 3' ตามลำดับ

3.8 การเปลี่ยนรูปสารเป็น Canthaxanthin จาก Beta - carotene โดยการเติมหมู่คีโตที่ตำแหน่งที่ 4 และ 4', hydroxylation และ dehydrogenation ตามลำดับ

3.9 การเปลี่ยนรูปสารเป็น Astaxanthin จาก Beta - carotene โดยปฏิกิริยา hydroxylation ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 3', การเติมหมู่ OH ตำแหน่งที่ 5, การสูญเสียไฮโดรเจนที่มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 4' และการสูญเสียโมเลกุลของน้ำที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 3'



รูปที่ 2.14 ชีวสังเคราะห์ของสารคาโรทีนอยด์ต่างๆ จากสาร Phytoene
ที่มา : บุษบา ยงสมิทธิ (2540)

โดยทั่วไปยีสต์ *R. mucilaginosa* จะสามารถผลิตคาโรทีนอยด์เพื่อป้องกันอันตรายของรังสีและแสงที่สามารถทำลายเซลล์ยีสต์ได้ ซึ่งรูปแบบหลักของคาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ชนิดนี้สามารถผลิตได้คือ โทรูลีนมากที่สุด เบตาแคโรทีน และโทรูลาโรดิน ตามลำดับ (Simpson และคณะ, 1964; Perrier และคณะ, 1995; Bhosale, 2001; Aksu และ Eren, 2005; Sperstad และคณะ, 2006) ซึ่งองค์ประกอบหลักของคาโรทีนอยด์นี้ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน

Yeast malt extract (YM Broth) และแหล่งอาหารต่างๆที่มีปริมาณสารอาหารคือ คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนในปริมาณที่เพียงพอเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *R. mucilaginosa* องค์ประกอบหลักของคาร์บอนอยด์คาร์บอนอยด์จะเปลี่ยนแปลงไปได้ก็ต่อเมื่อมีการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในภาวะที่แตกต่างจากปกติหรือภาวะที่ทำให้ยีสต์เกิดความเครียด เช่น การเพาะเลี้ยงยีสต์ที่ให้อากาศสูงกว่าปกติ หรือการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งอนุมูลอิสระดังกล่าวนี้เกิดขึ้นได้จากการเติมสาร duroquinone H_2O_2 และเอทานอลระหว่างเพาะเลี้ยง รวมถึงเกิดจากการฉายแสงขาวระหว่างการเพาะเลี้ยง

2.10 การใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารต่างๆสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตสารกลุ่มคาร์บอนอยด์

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* เพื่อผลิตคาร์บอนอยด์ในระดับห้องปฏิบัติการจะนิยมใช้อาหารสังเคราะห์ เช่น malt extract และ yeast malt extract (YM) มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่างๆมาเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตสารคาร์บอนอยด์สู่ระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากการลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในด้านวัตถุดิบ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าว วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมจะมีสารอาหารที่ยีสต์สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้จะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับประเภทของอุตสาหกรรมอาหาร วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่างๆที่นำมาใช้ได้แก่ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำอุนเข้มข้น น้ำอุนเข้มข้นเหลือทิ้งจากการทำไวน์ กลูโคสไซรัป โมลาสจากบีท น้ำทิ้งจากโรงงานนุ่นเส้น วัสดุจากโรงงานผลิตแป้งข้าวโพด น้ำทิ้งจากโรงงานกะหล่ำปลีดองผักดอง น้ำกะทิ โมลาสเกรดต่ำ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตมัสตาร์ด น้ำตาลไซโลส น้ำทะเลเทียม น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผงชูรส และ whey ultrafiltration เป็นต้น (Haard, 1988; Shih และ Hang, 1996; Frengova และคณะ, 1997; Parajo และคณะ, 1998; Buzzini และ Martini, 1999; Bhosale และ Gadre, 2001b; Dominguez-Bocanegra และ Torres-Munoz, 2004; Simova และคณะ, 2004; Aksu และ Eren, 2005; Tinoi และคณะ, 2005; Xue และคณะ, 2008)

มีผู้ศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตรและน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักมาใช้ดังนี้ Aksu และ Eren (2005) ศึกษาการใช้ Molasses sucrose เป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* เพื่อผลิต

คาโรทีนอยด์ โดยที่ไม่มีการปรับสูตรอาหาร มีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักรเซลลียีสต์แห้งเท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาโรทีนอยด์รวม (Total carotenoids) เท่ากับ 89 มิลลิกรัมต่อลิตร

Buzzini และ Martini (1999) ศึกษาการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ น้ำทิ้งจากการผลิตน้ำองุ่นเข้มข้น (concentrated grape must) น้ำองุ่นเหลือทิ้งจากการทำไวน์ (grape must) กลูโคสไซรัป (glucose syrup) โมลาสจากบีท (beet molasses) วัสดุจากโรงงานผลิตแป้งถั่วเหลือง (soybean flour extract) และวัสดุจากโรงงานผลิตแป้งข้าวโพด (maize flour extract) มาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. Glutinis* จากการทดลองมีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักรเซลลียีสต์แห้งดังนี้ 6.5, 7.4, 7.5, 9.3, 4.8 และ 5.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับของแหล่งอาหาร และผลิตสารคาโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 5.95, 3.37, 1.80, 3.09, 4.24 และ 3.82 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับของแหล่งอาหาร

Parajo และคณะ (1998) ศึกษาการใช้น้ำตาลไซโลสเป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. Rhodozyma* โดยมีการปรับสูตรอาหารโดยการเติม yeast extract, malt extract, peptone และ KNO_3 มีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักรเซลลียีสต์แห้งเท่ากับ 9.1 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคาโรทีนอยด์ชนิดที่ยีสต์ *P. rhodozyma* ผลิตได้ในน้ำตาลไซโลสคือ แอสตาแซนทีน โดยสามารถผลิตได้ถึง 5.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Tinoi และคณะ (2005) ศึกษาการนำน้ำทิ้งแป้งถั่วเขียวจากโรงงานผลิตขุันทันเส้นใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน และสารสกัดจากมันเทศ (*Ipomoea batatas* Lamk) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. glutinis* โดยมีการนำน้ำทิ้งแป้งถั่วเขียวมาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ส่วนสารสกัดจากมันเทศได้จากการนำมันเทศ 100 กรัมมาสกัดด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000xg นำส่วนใสที่ได้ไปใช้ จากการทดลองพบว่า ณ สภาวะที่ดีที่สุดจะมีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักรเซลลียีสต์แห้งเท่ากับ 10.35 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 3.48 มิลลิกรัมต่อลิตร

มีผู้ศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตร และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักมาใช้ดังนี้ Aksu และ Eren (2005) ศึกษาการใช้ Whey lactose sugars เป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. Mucilaginoso* เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ โดยมีการปรับสูตรอาหารให้ใกล้เคียงอาหารสังเคราะห์โดยเติม yeast extract malt extract $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ มีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักรเซลลียีสต์แห้งเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 35 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

Simova และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ whey ultrafiltrate เป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* GED2, *R. rubra* GED4, *R. rubra* GED5, *R. rubra* GED6 และ *R. rubra* GED8 ร่วมกับกล้าเชื้อผลิตโดยเกิร์ตชนิดต่างๆคือ *Lactobacillus bulgaricus* 2-11, *L. bulgaricus* 2-12, *L. bulgaricus* 1-9, *Streptococcus thermophilus* 15HA, *S. thermophilus* 15a และ *S. thermophilus* 18a โดยที่ไม่มีการปรับสูตรอาหาร จากผลการทดลองมีผลทำให้ผลผลิตเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วย *R. rubra* GED6 ร่วมกับ *L. bulgaricus* 2-11 และ *S. thermophilus* 15HA เท่ากับ 15.3 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์รวมได้สูงสุดเท่ากับ 4.72 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาองค์ประกอบหลักของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพาะเลี้ยงยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติกเหล่านี้พบว่ามียีสต์ปริมาณสารเบตาแคโรทีนเพิ่มขึ้น 47.2 % จากปกติที่เพาะเลี้ยงยีสต์เพียงชนิดเดียว เนื่องจากยีสต์ *R. rubra* ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตแต่แบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติกสามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างกรดแลคติก และยีสต์ *R. rubra* สามารถนำกรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้

Frengova และคณะ (1997) ศึกษาการใช้ cheese whey ultrafiltrate เป็นอาหารเพาะเลี้ยง *R. glutinis* ร่วมกับ *L. helveticus* โดยที่ไม่มีการปรับสูตรอาหาร จากการทดลองมีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักรวมของยีสต์แห้งเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาร์บอนไดออกไซด์รวมเท่ากับ 248 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ในการทดลองได้ศึกษาองค์ประกอบหลักของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพาะเลี้ยงยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียพบว่ามียีสต์ปริมาณสารโทรูลาโรดินสูงถึง 171 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง โทรูลินและ เบตาแคโรทีนเท่ากับ 37.20 และ 25.50 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง รองลงมาตามลำดับ

มีผู้ศึกษานำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบหลักมาใช้ดังนี้ Dominguez - Bocanegra และ Torres -Munoz (2004) ศึกษาการใช้น้ำกะทิที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบหลักเป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. rhodozyma* สายพันธุ์ mutant R1 เพื่อผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งในประเทศเม็กซิโกจะนิยมใช้กากมะพร้าวไปใช้ในอุตสาหกรรมแชมพู ลูกกวาด และอาหาร อย่างกว้างขวาง จึงมีของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมดังกล่าวเป็นจำนวนมาก ซึ่งก็คือ น้ำกะทิ ดังนั้นน้ำกะทิจึงเป็นสิ่งที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมดังกล่าว ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากในองค์ประกอบทางเคมีของน้ำกะทิจึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์เพื่อผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ได้เป็นอย่างดีดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสังเคราะห์ YM broth และน้ำกะทิ

องค์ประกอบของอาหาร	อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth (กรัมต่อลิตร)	น้ำกะทิ (กรัมต่อลิตร)
Glucose	10	-
Carbohydrates total	-	16
Yeast extract	3	-
Peptone	5	-
Malt extract	3	-
Sodium	-	0.25
Magnesium	-	0.1
Potassium	-	2.94
Chlorite	-	1
Distilled water	1	-

ที่มา : Dominguez - Bocanegra และ Torres -Munoz (2004)

โดยในการทดลองดังกล่าวจะไม่มี การปรับสูตรอาหาร จากการทดลองมีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหมักเซลล์ยีสต์แห้งเท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาร์บอนอยด์รวม ซึ่งเป็น แอสตาแซนทินเท่ากับ 1850 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งและน้ำทิ้งที่มีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบหลัก แร่ธาตุที่สำคัญคือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เช่น Shih และ Hang (1996) ศึกษาการใช้ น้ำทิ้งจาก โรงงานกะหล่ำปลีสด ซึ่ง มีเกลือเป็นองค์ประกอบหลัก 2.25 % และน้ำทิ้งจากโรงงานดังกล่าวมี ผลทำให้ค่า BOD (Biochemical oxygen demand) มากกว่า 11000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาใช้ เพาะเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* เพื่อผลิตคาร์บอนอยด์ โดยไม่มี การปรับสูตรอาหาร จากการทดลองมีผล ทำให้ผลผลิตน้ำหมักเซลล์ยีสต์แห้งเท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาร์บอนอยด์รวมเท่ากับ 1041 ไมโครกรัมต่อลิตร หรือ 131 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังพบว่าในน้ำทิ้ง ดังกล่าวมีปริมาณกรดแลคติกอยู่สูง ซึ่งกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสำหรับการ เจริญเติบโตของยีสต์ *R. rubra* และเนื่องจากการใช้กรดแลคติกของยีสต์ดังกล่าวจะมีผลทำให้ค่า BOD ในน้ำทิ้งลดลงน้อยกว่า 3200 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ปริมาณเกลือในน้ำทิ้งภายหลังการ เพาะเลี้ยงไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งจากปริมาณ BOD ที่ลดลงดังกล่าวถือเป็นการลดปัญหา สิ่งแวดล้อมได้ทางหนึ่ง

Bhosale และ Gradre (2001b) ศึกษาการใช้ให้น้ำทะเลเทียมซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ NaCl 23.1 กรัม Na_2SO_4 1 กรัม KCl 0.61 กรัม H_3BO_4 0.021 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.1 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.41 กรัม NaHCO_3 0.191 กรัม $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.031 กรัม และ Na_4EDTA 0.0003 กรัม เป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. glutinis* จากผลการทดลองมีผลทำให้ได้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 16 กรัมต่อลิตร และผลิตสารคาโรทีนอยด์รวมได้เท่ากับ 86 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกลือในน้ำทะเลเทียมดังกล่าวมีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของยีสต์ *R. glutinis* (Komemushi และคณะ, 1994)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน ได้จากบริษัท ผลไม้แปรรูปวรพร จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2550 โดยการดองมะม่วงในน้ำดองเค็มของโรงงานนี้จะใช้เวลา 1 -12 เดือน โดยแบ่งดองในบ่อดองเค็มจำนวน 12 บ่อ เมื่อสิ้นสุดการดองในแต่ละเดือนจะทิ้งน้ำดองเค็มดังกล่าว และนำมะม่วงที่ผ่านการดองเค็มแล้วไปดองหวานเป็นเวลา 6 วันในบ่อที่เตรียมไว้ต่อไป ในงานวิจัยนี้จึงเลือกน้ำมะม่วงดองเค็มที่ได้จากการดองเค็มเป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งถือเป็นช่วงกลางของการหมักมะม่วงดองเค็มเป็นตัวแทนน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มและเป็นช่วงที่โรงงานมีความสะดวกในการให้ไปเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งเพื่อมาใช้ในการวิจัย ในขณะที่น้ำมะม่วงดองหวานที่นำมาเป็นตัวแทนของน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานเป็นน้ำดองที่ได้จากการดองหวานเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งเป็นน้ำดองหวานในวันสุดท้ายที่รอการกำจัดทิ้ง เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งในกล่องควบคุมความเย็นระหว่างการเดินทางมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร นำตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมี คือ BOD (Biochemical Oxygen Demand) และสมบัติทางจุลินทรีย์โดยทันทีที่ดั่งนี้ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และปริมาณยีสต์และรา (Yeast-Mold count) และเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้วิจัยในขั้นตอนต่อไป

น้ำทิ้งน้ำนมได้จากโรงงานผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ในวันที่ผลิตน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์รสจืด โครงการสวนพระองค์ สวนจิตรลดา เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 17 สิงหาคม 2550 โดยน้ำทิ้งน้ำนมเป็นน้ำทิ้งที่ได้จากการล้างท่อหลังจากเสร็จกระบวนการผลิตทันที เก็บตัวอย่างในกล่องควบคุมความเย็นระหว่างการเดินทางมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร นำไปตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมี คือ BOD (Biochemical Oxygen Demand) และสมบัติทางจุลินทรีย์โดยทันทีที่ดั่งนี้ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และ ปริมาณยีสต์และรา (Yeast-Mold count) และเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้วิจัยในขั้นตอนต่อไป

น้ำกะทิ ใช้ น้ำกะทิเข้มข้น UHT ตราขาวเกาะ น้ำหนักสุทธิ 250 มิลลิลิตร ของบริษัท อ่าพลฟู้ดส์ จำกัด มาทำเชื้อจางเพื่อประเมินในการเลี้ยงยีสต์ โดยเป็นตัวแทนของน้ำทิ้งจากโรงงานกะทิ

ในขั้นตอนการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี คือ ปริมาณวัตถุกันเสีย (โพแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์) จะตรวจวิเคราะห์เฉพาะในน้ำที่ม้วนงวดองหวานและดองเค็ม

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

1. Absolute ethanol (C ₂ H ₅ OH) (Mallinckrodt, Mexico)	AR grade
2. Acetone ((CH ₃) ₂ CO) (Merck, Germany)	AR grade
3. Acetonitrile (CN ₃ CN) (Merck, Germany)	HPLC grade
4. Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄) (Fluka, Switzerland)	AR grade
5. Boric acid (H ₃ BO ₃) (Merck, Germany)	AR grade
6. Hydrochloric acid (HCl) (Ajax Finechem, New Zealand)	AR grade
7. D-glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) (Merck, Germany)	AR grade
8. Diethyl ether (C ₄ H ₁₀ O) (BDH, England)	AR grade
9. Dimethoxy sulfoxide (DMSO)(Riedel-de Haen, Germany)	AR grade
10. Hexane (C ₆ H ₁₄) (Merck, Germany)	HPLC grade
11. Iso-propanol (CH ₃ CHOHCH ₃) (Merck, Germany)	HPLC grade
12. Silver nitrate (AgNO ₃) (Merck, Germany)	AR grade
13. Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)	AR grade
14. Sulfuric acid (H ₂ SO ₄) (J.T Baker, USA)	AR grade
15. Methanol (CH ₃ OH) (Merck, Germany)	HPLC grade
16. Potassium Chromate (K ₂ CrO ₄) (Fluka, Switzerland)	AR grade
17. Selenium reagent mixture (Merck, Germany)	AR grade
18. Petroleum ether (Merck, Germany)	AR grade
19. Beta-carotene (Sigma, USA)	AR grade
21. Peptone from casine (Merck, Germany)	AR grade
22. Plate dextrose agar (PDA) (Merck, Germany)	AR grade
23. Yeast malt extract broth (YM broth) (Himedia, India)	AR grade

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Autoclave (SS-320 TOMY, Japan)

2. Centrifuge (Hettich, ROTANTA 460R, Germany และ Hettich, MIKKO 22R, Germany)
3. Colony counter (Suntex 560, China)
4. Digestion unit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BUCHI, K-424, Switzerland)
5. Distillation unit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BUCHI, B-324, Switzerland)
6. Hot air oven (Mettmert, USA และ WTC binder 78532 Tuttlingen, Germany)
7. Furnace (Carbolite, CWF 1200, England)
8. Hand-Held Refractometer (ATAGO N-1 α Brix 0-32%, Japan)
9. High performance liquid chromatography (Agilent รุ่น 1100, Agilent technologies, USA, Detector คือ Multiple UV-Visible, Software ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ HP Chemstation software, Hewlett-Packard, Germany)
10. HPLC column (Luna C18 (2) 100A. 150 × 4.6 mm, Phenomenex, USA)
11. pH meter (Mettler Toledo, 204)
12. Micropipette P 200 และ P 1000 (Gilson, France)
13. Weight balance (Sartorius BP 310, Germany)
14. Rotary evaporator (Eyela, SB 651, Japan)
15. Security guard semi-prep guard cartridge system 10mm ID รุ่น KJO - 4282 สำหรับ HPLC column (Phenomenex, USA)
16. Shaker (New Brunswick Scientific, USA)
17. Spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA และ V-350 PCY Jasco, Korea)
18. TLC Chamber และแผ่น TLC 20 × 20 cm aluminium silica gel plate (Merck, Germany)
19. Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)
20. Water bath (Mettmert, USA)
21. 0.45 μ m filter membrane (Nylon) (Kanto Chemical, Japan)

จุลินทรีย์

1. *Rhodotorula mucilaginosa* FRR 5980 (AWRI, Australia)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ค่าโรทีนอยด์จากยีสต์

R. mucilaginosa FRR 5980

3.1.1 การสกัดคาโรทีนอยด์จากเซลล์ยีสต์ และวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมด้วย UV-Vis Spectrophotometry

ดัดแปลงจากวิธีของ Tinoi และคณะ (2005) และ Park และคณะ (2007)

เพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน Yeast malt extract (YM Broth) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร และผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) จากนั้นเติมเมล็ดเชื้อ *R. mucilaginosa* อายุ 20 ชั่วโมง 1 % หรือเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบ orbital shaking 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์เปียกที่ได้ไปสกัดคาโรทีนอยด์โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารที่ใช้สกัด (วิธีการแสดงในภาคผนวก ค) นำสารสกัดคาโรทีนอยด์ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่คำนวณเทียบเท่ากับแคโรทีนด้วย UV-Vis Spectrophotometry ตามวิธีของ Peterson และคณะ (1957) และ Tinoi และคณะ (2005) นำเซลล์ที่เหลือมาสกัดซ้ำและนำไปวัดหาปริมาณคาโรทีนอยด์ที่เหลือจนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใกล้เคียง 0 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ในระหว่างขั้นตอนการสกัดจะต้องทำในที่มืด ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องแก้วที่ใช้ในระหว่างขั้นตอนการสกัดจะหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันการสัมผัสแสง

3.1.2 การวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ด้วย Reversed Phase High – Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

ดัดแปลงจากวิธีของ Bhosale (2001) และ Tinoi และคณะ (2005)

นำสารสกัดคาโรทีนอยด์จากยีสต์มาไล่อากาศออกด้วยก๊าซไนโตรเจน นำมากรองผ่านแผ่นกรองชนิดไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และใส่ในขวดสีชาขนาด 2 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างใส่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

การศึกษาสภาวะต่างๆของการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตด้วย RP-HPLC มีดังต่อไปนี้

3.1.2.1 ตรวจสอบ Mobile phase และค่าความยาวคลื่น (λ)

ทดสอบหาตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็น Mobile phase และแปรอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยทดลองปรับอัตราส่วนของ Mobile phase ชนิดต่างๆ จนกระทั่งแยกพีคของสารคาร์โบไฮเดรต (โทรูลีน โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และมีพีคของสารอื่นที่ไม่ต้องการปรากฏอยู่น้อยที่สุด

Mobile phase และอัตราส่วนของ Mobile phase ที่นำมาใช้ศึกษาคือ Acetonitrile : Methanol : Hexane (54 : 40 : 6) ดัดแปลงมาจาก Bhosale (2001) และ Tinoi และคณะ (2005)

ทั้งนี้จึงต้องมีการหาค่าความยาวคลื่นที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของคาร์โบไฮเดรตด้วย HPLC จะนำสารคาร์โบไฮเดรตอ้างอิงแต่ละชนิด คือ เบตาแคโรทีนมาตรฐาน (Sigma, USA) โทรูลีน และโทรูลาโรดินจาก *R. mucilaginosa* ที่แยกได้ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) (วิธีแยกสารแสดงในภาคผนวก ค) มาใช้ในการประเมิน โดยการทำ ความยาวคลื่นที่ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงสุดสำหรับสารคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด

ประเมินและเลือกช่วงความยาวคลื่น โดยอ้างอิงจากรายงานการวิจัยต่างๆแสดงในตารางที่ 3.1 ดังนี้

ตารางที่ 3.1 ค่าความยาวคลื่นต่างๆจากงานวิจัยอ้างอิงที่เลือกมาประเมินในงานวิจัยนี้

ค่าความยาวคลื่น (λ)	งานวิจัยอ้างอิง
457	Bhosale (2001)
489	Bhosale และGadre (2001a)
498	Bhosale และGadre (2001a)
515	Perrier และคณะ (1995)

3.2 การตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยาของน้ำทิ้งจาก โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

3.2.1 ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.2.1.1 pH โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH meter) (AOAC, 2005)

3.2.1.2 ปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยใช้ Hand Refractometer (AOAC, 2005)

3.2.2 ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.2.2.1 BOD โดยวิธี In-house Method (ISO 5815-1989)

3.2.2.2 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Phenol-sulfuric acid (AOAC, 2005)

3.2.2.3 ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2005)

3.2.2.4 ปริมาณไขมัน โดยวิธี Mojonnier (AOAC, 2005)

3.2.2.5 ปริมาณเถ้า โดยวิธี Dry ashing (AOAC, 2005)

3.2.2.6 ปริมาณกรดทั้งหมด โดยวิธี Titratable acidity (AOAC, 2005)

3.2.2.7 ปริมาณเกลือ โดยวิธีของ Mohr (AOAC, 2005)

3.2.2.8 ปริมาณวัตถุกันเสีย โฟแทสเซียมซอร์เบต (Stafford, 1976) และโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ (Li และ Zhao, 2006) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (วัดเฉพาะตัวอย่างน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานและน้ำทิ้งมะม่วงคองเค็ม)

3.2.3 ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางจุลชีววิทยา

3.2.3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (AOAC, 2005)

3.2.3.2 ปริมาณยีสต์และรา (Yeast-Mold count) (AOAC, 2005)

วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก และภาคผนวก ข

3.3 การคัดเลือกน้ำทิ้งเพื่อคัดเลือกสูตรสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตสารกลุ่มคาโรทีนอยด์

ปรับเตรียมน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร 4 ชนิดคือ น้ำทิ้งมะม่วงคองเค็ม น้ำทิ้งมะม่วงคองหวาน น้ำทิ้งนํ้านม และน้ำกะทิเข้มข้น สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยแปรสัดส่วนของน้ำทิ้งกับน้ำกลั่นดังต่อไปนี้

- 1.) น้ำทิ้งมะม่วงคองเค็มจะแปรสูตรทั้งหมด 5 สูตร โดยแปรสัดส่วนของน้ำคองเค็ม : น้ำกลั่น ดังนี้คือ 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 และสูตร 1 : 0 (สูตรครบส่วน)
- 2.) น้ำทิ้งมะม่วงคองหวานจะแปรสูตรทั้งหมด 5 สูตร โดยแปรสัดส่วนของน้ำคองหวาน : น้ำกลั่นดังนี้คือ 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 และสูตร 1 : 0 (สูตรครบส่วน)
- 3.) น้ำทิ้งนํ้านมจะแปรสูตรทั้งหมด 5 สูตร โดยแปรสัดส่วนของนํ้านม : น้ำกลั่น ดังนี้คือ 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 และสูตร 1 : 0 (สูตรครบส่วน)
- 4.) น้ำกะทิเข้มข้นจะแปรสูตรทั้งหมด 6 สูตร โดยแปรสัดส่วนของน้ำกะทิเข้มข้น : น้ำกลั่น ดังนี้คือ 1 % (1 : 99), 5 % (1 : 19), 10 % (1 : 9), 15 % (1 : 5.7), 20 % (1 : 4) และ 25 % (1 : 3)

นำน้ำที่ปรับสูตรมาปรับปริมาณสารอาหารหลักได้แก่ สารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนให้ได้ปริมาณขั้นต่ำที่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ รวมถึงค่า pH ให้เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารอาหารขั้นต่ำที่ต้องปรับเตรียมให้เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa*

การปรับ	ค่าการปรับ	แหล่งอ้างอิง
แหล่งคาร์บอน ใช้น้ำตาลกลูโคส	1 %	อ้างอิงตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (Yeast malt extract ,YM broth)
แหล่งไนโตรเจน ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต	0.2 %	Aksu และ Eren (2005)
พีเอช (pH)	6.0 ± 0.2	Tinoi และคณะ (2005)

นำน้ำที่ปรับสูตรแล้ว 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อมาใช้ในการทดลองเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยเติมกล้าเชื้อ *R. mucilaginosa* อายุ 20 ชั่วโมง ให้มีเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะการเลี้ยงแบบ orbital shaking 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

การทดลองควบคุมคือ การเลี้ยงยีสต์ด้วย Yeast malt extract (YM broth) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเดียวกัน

ตรวจสอบผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ดังต่อไปนี้

3.3.1 ตรวจสอบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

เก็บตัวอย่างคัลเจอร์ที่เวลา 144 ชั่วโมง นำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10000xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (Bhosale, 2001)

3.3.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวมที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนด้วย UV-Vis Spectrophotometry (วิธีการแสดงในภาคผนวก ค)

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

คัดเลือกสูตรที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากผลน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ได้โดยต้องไม่ต่ำกว่าค่าที่ได้จากรายงานจากงานวิจัยที่ใช้อ้างอิง

งานวิจัยที่ใช้อ้างอิงแสดงดังต่อไปนี้

- 1.) น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม อ้างอิงจาก Shih และ Hang (1996)
- 2.) น้ำทิ้งมะม่วงดองหวานน้ำตาลทราย อ้างอิงจาก Aksu และ Eren (2005)
- 3.) น้ำทิ้งนํ้านม อ้างอิงจาก Aksu และ Eren (2005)
- 4.) น้ำกะทิเข้มข้น อ้างอิงจาก Dominguez - Bocanegra และ Torres - Munoz (2004)

3.4.1 การศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตคาร์บอไฮเดรตของยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือกชนิดต่างๆ

นำน้ำทิ้งสูตรที่คัดเลือกทั้ง 4 ชนิดจากข้อ 3.3 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร มาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะเดียวกันเป็นเวลา 288 ชั่วโมง การทดลองควบคุมคือ การเลี้ยงยีสต์ด้วย YM broth ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเดียวกัน ประเมินผลการเพาะเลี้ยงดังต่อไปนี้

3.4.1 ตรวจสอบปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

โดยเก็บตัวอย่างคัลเจอร์ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยนำไปตกตะกอนเซลล์และนำไปอบวิธีการทดลองเหมือนข้อ 3.3.1

3.4.2 ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี Yeast Mold count ทุกๆ 24 ชั่วโมง (วิธีการแสดงในภาคผนวก ข)

3.4.3 วิเคราะห์ปริมาณและรูปแบบของคาร์บอไฮเดรต

นำเซลล์ยีสต์ในทุกชนิดน้ำทิ้งที่เจริญในช่วงระยะ stationary phase ของยีสต์มาวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอไฮเดรตรวมทั้งคำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนด้วย UV-Vis Spectrophotometry (วิธีแสดงในภาคผนวก ค) และวิเคราะห์รูปแบบของคาร์บอไฮเดรตด้วย Reversed phase HPLC ตามสภาวะที่ประเมินได้จากข้อ 3.1 (วิธีแสดงในภาคผนวก ค)

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.5 การศึกษาอิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งต่อคุณสมบัติของเซลล์ยีสต์ และการผลิตคาร์ทีนอยด์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

เพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งสูตรที่คัดเลือกตามที่ประเมินในข้อ 3.4 ให้ได้ผลผลิตเซลล์ยีสต์ประมาณ 20 กรัม (เซลล์เปียก) เพื่อนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.5.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ขนาดรูปร่างของเซลล์ยีสต์ และการใช้สารอาหารของยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งต่างๆ

3.5.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์โดยการวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เถ้า และความชื้น (วิธีการแสดงในภาคผนวก ก)

3.5.1.2 วิเคราะห์ขนาดและรูปร่างของเซลล์ยีสต์ วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Hari และคณะ (1992) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง)

3.5.1.3 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี ของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ดังนี้

3.5.1.3.1 ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.5.1.3.1.1 pH โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด ต่าง (pH meter) (AOAC, 2005)

3.5.1.3.1.2 ปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยใช้ Hand Refractometer (AOAC, 2005)

3.5.1.3.2 ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.5.1.3.2.1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Phenol sulfuric acid (AOAC, 2005)

3.5.1.3.2.2 ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2005)

3.5.1.3.2.3 ปริมาณไขมัน โดยวิธี Soxhlet (AOAC, 2005)

3.5.1.3.2.4 ปริมาณเถ้า โดยวิธี Dry ashing (AOAC, 2005)

3.5.1.3.2.5 ปริมาณเกลือ โดยวิธีของ Mohr (AOAC, 2005)

วิธีการทดลองแสดงในภาคผนวก ก

3.5.2 วิเคราะห์ปริมาณและรูปแบบของคาโรทีนอยด์

นำเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในทุกชนิดน้ำทิ้งเป็นเวลาตามที่ประเมินในข้อ 3.4 มาวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนด้วย UV-Vis Spectrophotometry (วิธีแสดงในภาคผนวก ค) และวิเคราะห์รูปแบบของคาโรทีนอยด์ด้วย Reversed phase HPLC ตามสภาวะที่ประเมินได้จากข้อ 3.1 (วิธีแสดงในภาคผนวก ค)

ทำการทดลอง 2 ชั้น วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ต่อสมบัติเชิงปริมาณและรูปแบบของคาร์โบไฮเดรตจากยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยาของน้ำทิ้ง 4 ชนิด คือ น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน น้ำทิ้งนํ้านม และน้ำกะทิ จากนั้นจึงปรับเตรียมน้ำทิ้งดังกล่าวสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ โดยคัดเลือกสูตรที่ดีที่สุดและประเมินช่วงการเจริญและการผลิตคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ เพื่อประเมินหาเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรต จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งเพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งต่อคุณสมบัติของเซลล์ยีสต์และการผลิตคาร์โบไฮเดรตทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ

4.1 การประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตจากยีสต์

R. mucilaginosa FRR 5980

ในงานวิจัยนี้จะต้องศึกษาคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ดังนั้นจึงต้องมีการประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคาร์โบไฮเดรตจากเซลล์ยีสต์ก่อนทำการวิเคราะห์ ตลอดจนการประเมินหาสภาวะต่างๆ ในการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตด้วย Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ดังนี้

4.1.1 การสกัดคาร์โบไฮเดรตจากเซลล์ยีสต์

ในการทดลองนี้เป็นการประเมินหาจำนวนรอบการสกัดที่เหมาะสมที่สุดที่มีผลทำให้สกัดคาร์โบไฮเดรตออกจากเซลล์ยีสต์ได้ปริมาณมากที่สุด โดยการนำสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ในแต่ละรอบไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วย UV-Vis Spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร (แสดงผล absorption spectrum ของคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ ในภาคผนวก ข) ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมที่คำนวณในค่าของเบตาแคโรทีน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากการประเมินรอบการสกัดสารคาร์โบไฮเดรตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าในการสกัดรอบที่ 1 สามารถสกัดคาร์โบไฮเดรต โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.40 ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์การสกัดในรอบที่ 2 พบว่ายังคงเหลือสารคาร์โบไฮเดรตอยู่ในเซลล์ยีสต์ทั้งนี้พิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่

ยังสามารถ วัดได้เท่ากับ 0.04 แต่ในการสกัดรอบที่ 3 ตรวจไม่พบคาโรทีนอยด์ในสารสกัด โดยค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเท่ากับ 0

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารคาโรทีนอยด์ที่สกัดจากยีสต์ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตรในแต่ละรอบการสกัด

รอบของการสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร
รอบที่ 1	0.40 ± 0.02
รอบที่ 2	0.04 ± 0.01
รอบที่ 3	0.00

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์รวม และแปลงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่สกัดได้ในแต่ละรอบการสกัด แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่สกัดได้โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในการสกัดรอบที่หนึ่งมีค่าสูงถึง 78.87% ซึ่งถือว่าเป็นคาโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ที่สกัดได้ และคาโรทีนอยด์ส่วนที่เหลือสามารถสกัดได้เกือบทั้งหมดภายในรอบการสกัดที่ 2 ดังนั้นสภาวะในการสกัดคาโรทีนอยด์จากเซลล์ยีสต์สำหรับใช้ตลอดการทดลองนี้คือ การสกัดคาโรทีนอยด์จากตะกอนเซลล์ยีสต์ใน DMSO ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดเอทิลอีเธอร์จำนวน 2 รอบการสกัด

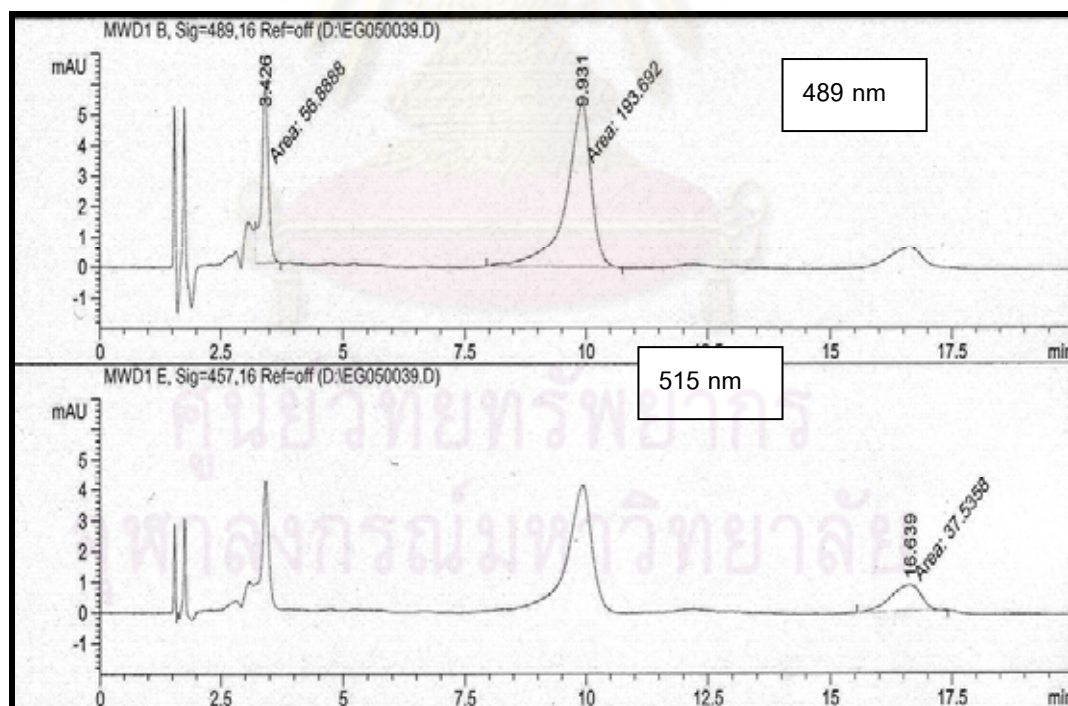
ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่สามารถสกัดได้จากยีสต์ในแต่ละรอบการสกัด

รอบของการสกัด	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมโดยคำนวณเทียบเท่า เบตาแคโรทีนที่สกัดได้ (%)
รอบที่ 1	78.87 ± 0.65
รอบที่ 2	21.13 ± 0.65
รอบที่ 3	0.00 ± 0.00

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

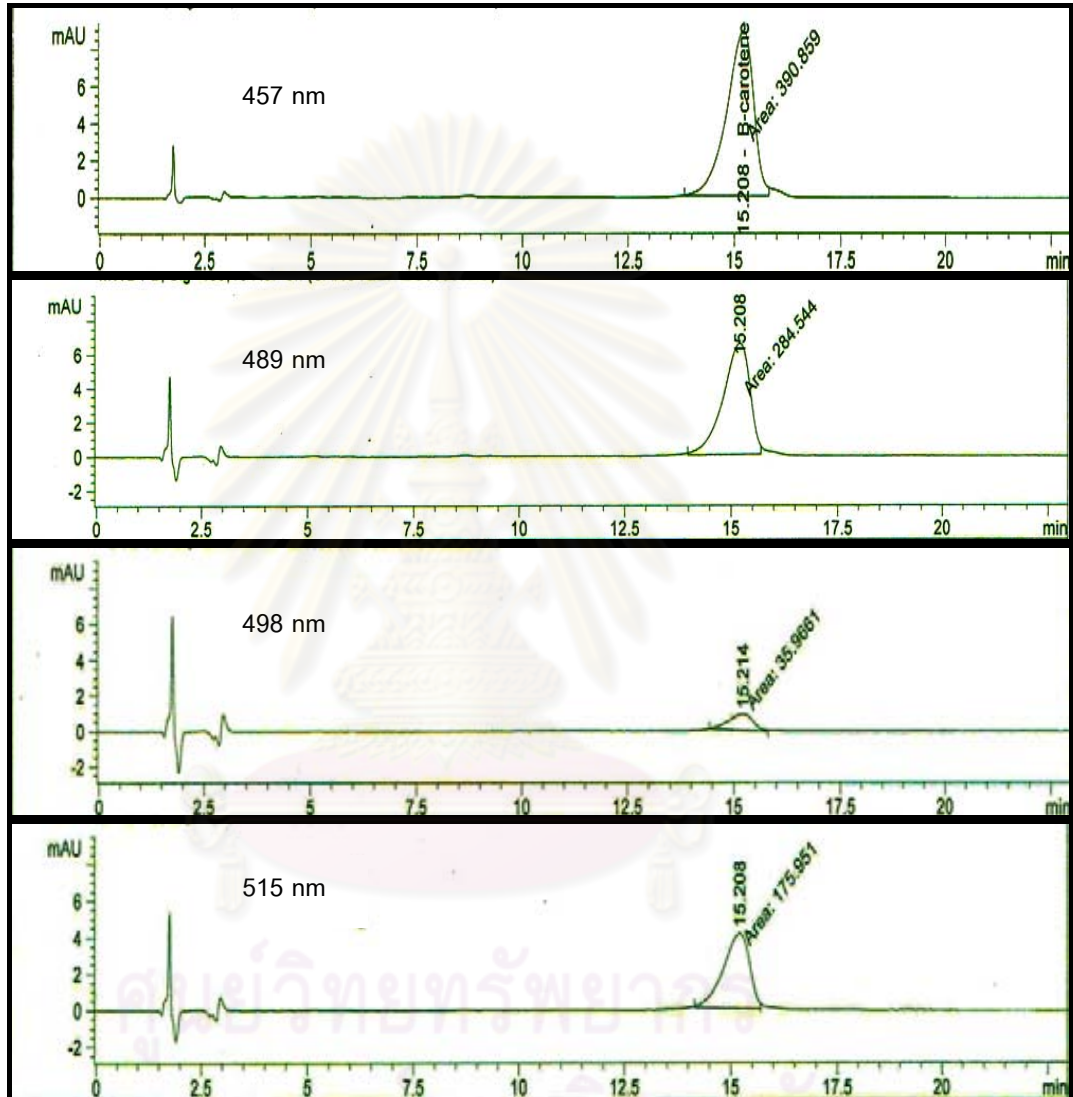
4.1.2 การวิเคราะห์คาร์โบทีนอยด์ด้วย Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

การวิเคราะห์คาร์โบทีนอยด์ด้วย RP-HPLC เป็นการวิเคราะห์คาร์โบทีนอยด์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ในงานวิจัยส่วนใหญ่จะวิเคราะห์คาร์โบทีนอยด์โดยใช้เทคนิค HPLC ซึ่งการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยได้ เป็นวิธีที่วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำสูง (Parajo และคณะ, 1997; Buzzini และ Martini, 1999; Bhosale, 2001; Dominguez-Bocanegra และ Torres-Munoz, 2004; Tinoi และคณะ, 2005) จากการศึกษาหาตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็น Mobile phase ในการทดลองพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดคือ Acetonitrile : Methanol : Hexane ที่อัตราส่วน 40 : 54 : 6 ที่สภาวะนี้สามารถแยกพีคของสารคาร์โบทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดคือ เบตาแคโรทีน โทรูลีน และ โทรูลาโรดิน ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และมีการรบกวนของพีคที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด โดยทั้ง 3 พีคสามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ภายในเวลาประมาณ 17 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ดังนั้นจึงใช้สภาวะนี้ในการวิเคราะห์คาร์โบทีนอยด์แต่ละชนิดต่อไป

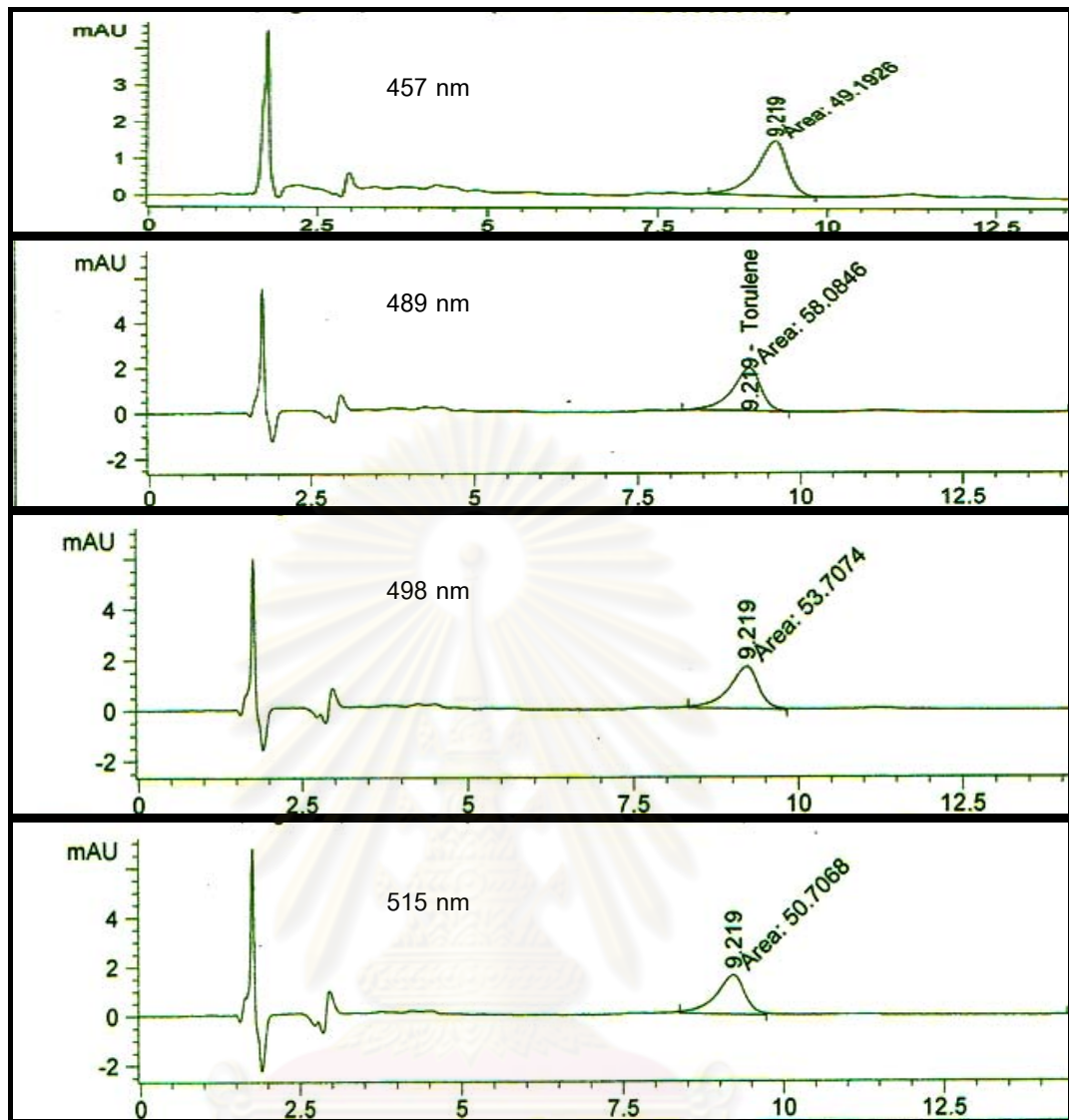


รูปที่ 4.1 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของคาร์โบทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth โดยใช้ Acetonitrile : Methanol : Hexane ที่อัตราส่วน 40 : 54 : 6 เป็น Mobile phase

และเมื่อศึกษาหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ ได้แก่ เบตาแคโรทีนมาตรฐาน โทรูลีน และโทรูลาโรดินจาก *R. mucilaginosa* สำหรับใช้อ้างอิง โดยใช้ค่าความยาวคลื่นที่ 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 4.3 4.4 และตารางที่ 4.3

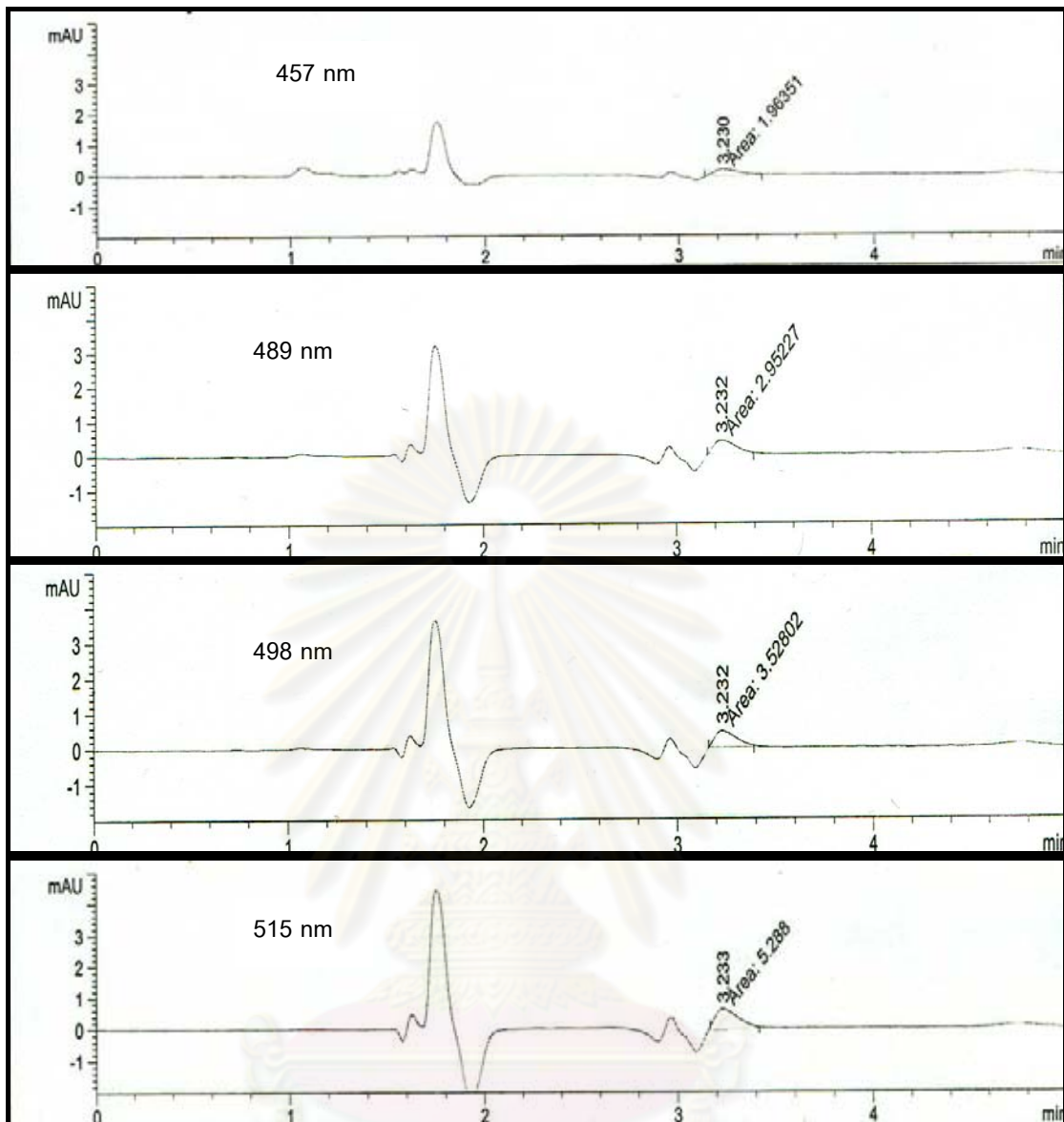


รูปที่ 4.2 พื้นที่ใต้กราฟของพีคของสารเบตาแคโรทีนมาตรฐานที่ความยาวคลื่นต่างๆ คือ 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร



รูปที่ 4.3 พื้นที่ใต้กราฟของพีคของสารโทรูลีนอ้างอิงที่ความยาวคลื่นต่างๆ คือ 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 พื้นที่ใต้กราฟของพีคของสารโทรลารอดินอ้างอิงที่ความยาวคลื่นต่างๆ คือ 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ค่าพื้นที่ใต้กราฟและ Retention time ของคาร์โบทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ค่าความยาวคลื่นต่างๆ

ชนิดของสารคาร์โบทีนอยด์	ค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	Retention time	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)
เบตาแคโรทีน	457	15.2080	388.82 ± 7.33
	489	15.2080	287.27 ± 3.86
	498	15.2080	175.45 ± 0.70
	515	15.2080	36.51 ± 0.77
โทรูลีน	457	9.2190	49.66 ± 0.66
	489	9.2190	59.16 ± 1.52
	498	9.2190	55.05 ± 1.90
	515	9.2190	50.41 ± 0.41
โทรูลาโรดิน	457	3.2320	2.18 ± 0.31
	489	3.2320	3.37 ± 0.59
	498	3.2320	3.50 ± 0.04
	515	3.2300	5.63 ± 0.48

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.3 เป็นการสรุปค่า Retention time และพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากรูปที่ 4.2-4.4 ค่าความยาวคลื่นที่ให้รูปร่างของพีคของสารเบตาแคโรทีนและโทรูลีนสมบูรณ์ที่มีลักษณะแคบและสมมาตร รวมถึงให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงสุดคือ 457 นาโนเมตร และ 489 นาโนเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรเป็นความยาวคลื่นที่ให้พื้นที่ใต้กราฟของสารโทรูลาโรดินสูงสุด แต่ทั้งนี้เมื่อนำสารสกัดคาร์โบทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้านม และน้ำกะทิเชื้อจางมาวิเคราะห์สัดส่วนของโทรูลาโรดินที่ความยาวคลื่นทั้ง 4 (ดังแสดงในภาคผนวก ข) พบว่าที่ความยาวคลื่น 489 นาโนเมตรเป็นความยาวคลื่นที่ทำให้ได้พื้นที่ใต้กราฟสูงสุด และมีพีคที่ไม่ต้องการรบกวนน้อยที่สุด ดังนั้นในการตรวจสอบค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้วิเคราะห์โทรูลาโรดินในสารสกัดคาร์โบทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งต่างๆ จึงต้องพิจารณาจากค่าความยาวคลื่นที่ให้พื้นที่ใต้กราฟสูงสุด และมีปริมาณสารรบกวนอื่นอยู่ในปริมาณน้อย ซึ่งความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้วิเคราะห์โทรูลาโรดินในสารสกัดตัวอย่างจากน้ำทิ้งคือความยาวคลื่นที่ 489 นาโนเมตร และเมื่อพิจารณาค่า Retention time พบว่าสาร

โทรูลาโรดินถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วที่สุด และสารเบตาแคโรทีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ช้าที่สุด เนื่องจากการวิเคราะห์ค่าโรทีนอยด์ในงานวิจัยนี้ใช้ Separation mode เป็น Reversed phase chromatography ดังนั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่นำมาใช้เป็น Mobile phase จึงต้องมีความเป็น polar สูง และเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารโทรูลาโรดินถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนดังนั้นจึงมีค่าความเป็น polar สูงกว่าตัวอื่นๆ จึงถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วที่สุด ซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างของโทรูลาโรดินในรูปที่ 2.5 ที่มีหมู่ COOH อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1' (อ้างอิงการระบุตำแหน่งคาร์บอนในโมเลกุลคาโรทีนอยด์ตามรูปที่ 2.3 หน้า 3) ในขณะที่เบตาแคโรทีนมีค่าความเป็น polar ต่ำ หรือเป็น non - polar สูงที่สุดเมื่อเทียบในสารทั้ง 3 ชนิด จึงถูกชะออกมาจากคอลัมน์ช้าที่สุดซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของเบตาแคโรทีนที่มีวงแหวนเบตา 2 วงภายในโมเลกุลโดยอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1-6 และ 1'-6' (หัวและท้ายของโมเลกุล) จึงทำให้มี polarity ต่ำกว่าโทรูลีนที่มีวงแหวนเบตาเพียงวงเดียวภายในโมเลกุล (อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1-6 ของโมเลกุล) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 เมื่อพิจารณาผลของค่าความยาวคลื่นต่างๆ ที่วิเคราะห์คาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดพบว่าไม่มีผลต่อ Retention time ที่เกิดขึ้นแต่มีผลต่อพื้นที่ใต้กราฟ ดังนั้นค่า Retention time สามารถใช้ในการยืนยันตำแหน่งสารคาโรทีนอยด์แต่ละชนิดจากยีสต์ *R. mucilaginosa* ในการทดลองนี้ได้

ดังนั้นจากการศึกษาสภาวะต่างๆของการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ด้วย RP-HPLC ที่จะใช้ตลอดในงานวิจัยสามารถสรุปได้ในตารางที่ 4.4 ดังนี้

ตารางที่ 4.4 ตารางสรุปสภาวะต่างๆของการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ด้วย RP-HPLC

สภาวะในการวิเคราะห์	ค่าสภาวะการวิเคราะห์
Column	Reversed phase C ₁₈ (Luna C18 (2) 100A. 150 × 4.6 mm, Phenomenex, USA
Column temperature	25 องศาเซลเซียส
Mobile phase	Acetonitrile : Methanol : Hexane 40 : 54 : 6 (Isocratic mode)
Injection volume	10 ไมโครลิตร
Flow rate	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
Detector	Mutiple UV-Visible
	ความยาวคลื่นที่ 457 นาโนเมตร ใช้วิเคราะห์เบตาแคโรทีน
	ความยาวคลื่นที่ 489 นาโนเมตร ใช้วิเคราะห์โทรูลีนและโทรูลาโรดิน

4.2 การตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยาของน้ำทิ้งจาก โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

จากผลการวิเคราะห์สมบัติของน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าในน้ำทิ้งชนิดนี้มีเกลือเป็นสารอาหารที่มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 9.50% รองลงมาคือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน เท่ากับ 0.80% 0.15% และ 0.09% ตามลำดับ และมีเถ้าสูงถึง 6.20% นอกจากนี้ยังพบกรดซึ่งคำนวณในรูปกรดแอสติกและกรดแลคติก 0.53% และ 0.79% ตามลำดับ ทำให้น้ำทิ้งชนิดนี้มีค่า BOD สูงถึง 14500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้บ่งชี้ว่าน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มนี้ น่าจะสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง *R. mucilaginosa* เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ได้ ถึงแม้ว่าน้ำทิ้งชนิดนี้มีเกลืออยู่สูงถึงประมาณ 10% ซึ่งถือว่าเข้มข้นเกินกว่าที่ยีสต์โดยทั่วไปจะสามารถเจริญได้ แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่นำน้ำทิ้งที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ น้ำทิ้งจากโรงงานกะหล่ำปลีดอง และน้ำทะเลเทียม ซึ่งมีเกลือ 2.25% และ 34% ตามลำดับ มาใช้เป็นแหล่งอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์กลุ่ม *Rhodotorula* เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ได้ (Bhosale และ Gadre, 2001b; Shih และ Hang, 1996) ประกอบกับมีรายงานว่ายีสต์ *R. mucilaginosa* เป็นยีสต์ท้องถิ่นในน้ำเค็ม และมีความสามารถในการใช้เกลือเป็นสารอาหารในการเจริญจึงช่วยเพิ่มผลผลิตได้คาโรทีนอยด์ได้ (Bhosale และ Gadre, 2001b) ดังนั้นน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มที่มีเกลืออยู่ประมาณ 10% ก็น่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ชนิดนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มมีวัตถุดิบเสียเจือปนอยู่ คือ โฟแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ เท่ากับ 416 ppm และ 98 ppm ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงพอที่จะยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ และมีรายงานระบุว่า *R. mucilaginosa* ไม่สามารถเจริญในแหล่งอาหารที่มีปริมาณโพแทสเซียมซอร์เบตเกิน 200 ppm (Dharmadhikari, 2007) ดังนั้นจึงหาแนวทางในการลดแอกติวิตีของวัตถุดิบเสียเหล่านี้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การปรับ pH ประมาณ 6 ซึ่งถือเป็นวิธีที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในการลดแอกติวิตีของวัตถุดิบเสียในน้ำทิ้งนี้เพื่อใช้ในการเลี้ยงยีสต์ ทั้งนี้ pH ดังกล่าวยังเป็นช่วง pH ที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ในกลุ่ม *Rhodotorula* อีกด้วย (Campos และคณะ, 2000; Aksu และ Eren, 2005; Tinoi และคณะ, 2005; Li และ Zhao, 2006; Dharmadhikari, 2007) จากผลการศึกษานี้จึงใช้น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มเป็นตัวแทนของน้ำทิ้งที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบหลักในการใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ให้ผลิตคาโรทีนอยด์เพื่อใช้ในการประเมินผลของเกลือต่อรูปแบบการสร้างคาโรทีนอยด์ของยีสต์ แต่ทั้งนี้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ยีสต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและปริมาณโปรตีนที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่าต่ำกว่าค่าความต้องการพื้นฐานของยีสต์ ดังนั้นจึงควรมีการปรับแหล่งคาร์บอนให้เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ด้วยน้ำตาลกลูโคส 1% (Govindaswamy และคณะ, 1999) และปรับแหล่ง

ไนโตรเจนด้วยแอมโมเนียมไนเตรต 0.2% ก่อนการนำน้ำทิ้งมาเพาะเลี้ยงยีสต์ในขั้นตอนต่อไป (Aksu และ Eren, 2005)

จากผลการวิเคราะห์สมบัติของน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานในตารางที่ 4.5 พบว่าในน้ำทิ้งชนิดนี้มีคาร์โบไฮเดรตรวมเป็นสารอาหารสูงสุดเท่ากับ 11.06% (โดยคาร์โบไฮเดรตหลักคือน้ำตาลซูโครส) รองลงมาคือ เกลือ โปรตีน และไขมัน เท่ากับ 4.33% 0.22% และ 0.09% ตามลำดับ รวมถึงมีเถ้าเท่ากับ 4.06% ทำให้น้ำทิ้งชนิดนี้มีค่า BOD สูงถึง 18850 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำทิ้งมีปริมาณกรดในน้ำทิ้งซึ่งคำนวณในรูปของกรดซิตริก 1.25% (เป็นกรดที่ใช้ในการปรับในระหว่างการดองมะม่วง) จากคุณสมบัติเหล่านี้ น้ำทิ้งชนิดนี้น่าจะสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ได้เช่นกัน แต่ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งชนิดนี้มีปริมาณสูงอาจมีผลทำให้น้ำทิ้งมีค่าออสโมลาริตีสูง (osmolarity) ซึ่งจะทำให้ยีสต์เกิดความเครียดในขณะเพาะเลี้ยงได้ มีงานวิจัยระบุว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ยีสต์สามารถเจริญได้คือ ช่วง 1-10 % (Govindaswamy และคณะ, 1999) โดยมีรายงานที่บ่งชี้ถึงค่าความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *R. mucilaginosa* ได้แก่ งานวิจัยของ Aksu และ Eren (2005) พบว่าการใช้โมลาสที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 2% สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* จะให้ผลผลิตคาโรทีนอยด์สูงสุด ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาปรับช่วงค่าความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ในการทดลองต่อไปได้ แต่ในการปรับลดค่าความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานนี้ให้มีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมจะส่งผลให้โปรตีนที่ยีสต์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนลดลงต่ำกว่าปริมาณแหล่งไนโตรเจนขั้นต่ำ (< 0.2%) ที่ยีสต์จะเจริญได้ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับแหล่งไนโตรเจนให้เพียงพอ ก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ต่อไป เมื่อวิเคราะห์มีวิตามินซีในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานพบว่ามีโพแทสเซียมซอร์เบตสูงถึง 578.42 และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์สูงถึง 289.52 ppm ดังนั้นจึงต้องหาแนวทางในการลดแอกติวิตีของวิตามินซีในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เช่นเดียวกับน้ำทิ้งมะม่วงคองเค็ม และในการศึกษานี้จะใช้น้ำทิ้งมะม่วงคองหวานเป็นตัวแทนของน้ำทิ้งที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์

ผลการวิเคราะห์สมบัติของน้ำกะทิเข้มข้นในตารางที่ 4.5 พบว่ามีไขมันเป็นสารอาหารมากที่สุดเท่ากับ 15.61% รองลงมาคือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และเกลือ เท่ากับ 1.95% 1.11% และ 0.74% ตามลำดับ และมีเถ้าเท่ากับ 0.32% ส่วนปริมาณกรดที่วิเคราะห์มีค่าน้อยมาก แต่ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์ในการประเมินน้ำทิ้งที่มีองค์ประกอบหลักคือไขมันสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ เพื่อประเมินผลของไขมันต่อรูปแบบการสร้างคาโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* จึงต้องมีเจือจางน้ำกะทิเข้มข้นดังกล่าวให้อยู่ในช่วง 1-25% เพื่อให้

เจือจางความเข้มข้นลงพร้อมกับปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้มีปริมาณขั้นต่ำเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa*

ส่วนผลการวิเคราะห์สมบัติของน้ำทิ้งนํ้ามในตารางที่ 4.5 พบว่าในน้ำทิ้งชนิดนี้มีคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดเท่ากับ 1.58% รองลงมาคือ โปรตีน เท่ากับ 0.77% เกลือและไขมัน มีปริมาณเท่ากันคือ 0.07% และมีเถ้าเท่ากับ 0.26% มีปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ซึ่งคำนวณในรูปกรดแลคติกอยู่ 0.06% และน้ำนี้มีค่า BOD เท่ากับ 29800 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในน้ำทิ้งนํ้ามจึงจัดได้ว่าเป็นน้ำทิ้งที่มีสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอยู่ในปริมาณสูงกว่าขั้นต่ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์โดยทั่วไปได้ ดังนั้นจึงไม่ต้องปรับแหล่งอาหารทั้งสองชนิดก่อนนำไปเพาะเลี้ยง *R. mucilaginosa* (Govindaswamy และคณะ, 1999; Aksu และ Eren, 2005) และเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำทิ้งนํ้ามกับน้ำทิ้งทั้ง 3 ชนิดข้างต้น พบว่าน้ำทิ้งนํ้ามมีโปรตีนสูงกว่าน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม 5 เท่า น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน 4 เท่า และน้ำกะทิ 3 เท่า ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้น้ำทิ้งนํ้ามเป็นตัวแทนของน้ำทิ้งที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างจากน้ำทิ้งชนิดอื่นทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณสำหรับใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* เพื่อสร้างคาโรทีนอยด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยาของน้ำทิ้ง
ทั้ง 4 ชนิด

	น้ำทิ้งมะม่วง	น้ำทิ้งมะม่วง	น้ำทิ้งน้ำนม	น้ำกะทิ
สมบัติทางกายภาพ	ดองเค็ม	ดองหวาน		
1. pH	3.35	3.42	6.21	6.49
2. ปริมาณของแข็ง ละลายน้ำทั้งหมด	7 °Brix	9 °Brix	2 °Brix	1 °Brix
สมบัติทางเคมี				
3. BOD (mg/l)	14500	18850	29800	NA
4. คาร์โบไฮเดรต (%)	0.80 ± 0.03	11.06 ± 0.35	1.58 ± 0.13	1.95 ± 0.13
5. โปรตีน (%)	0.15 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.77 ± 0.08	1.11 ± 0.04
6. ไขมัน (%)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	15.61 ± 0.38
7. เถ้า (%)	6.20 ± 0.04	4.06 ± 0.04	0.26 ± 0.01	0.32 ± 0.03
8. กรดทั้งหมด (%)	Acetic acid 0.53 ± 0.00 Lactic acid 0.79 ± 0.01	Citric acid 1.25 ± 0.01	ND	ND
9. เกลือ (%)	9.50 ± 0.53	4.33 ± 0.00	ND	ND
10. Potassium - sorbate (ppm)	416 ± 20.83	578 ± 26.03	NA	NA
11. Sodium - metabisulphite (ppm)	98 ± 2.24	290 ± 3.37	NA	NA
สมบัติทางจุลินทรีย์				
12. Total Plate Count (log cfu/ml)	2.01 ± 0.15	1.77 ± 0.10	4.09 ± 0.12	NA
13. Yeast and Mold Count (log cfu/ml)	0.50 ± 0.71	0.00 ± 0.00	1.80 ± 0.14	NA

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
NA หมายถึง ไม่ตรวจวิเคราะห์ และ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจสอบได้

4.3 การคัดเลือกน้ำทิ้งเพื่อคัดเลือกสูตร สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตสารกลุ่มคาโรทีนอยด์

จากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดคือน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน น้ำทิ้งนํ้านม และน้ำกะทิเข้มข้น มีสารอาหารพื้นฐานที่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ แต่ทั้งนี้ ควรมีการปรับสภาพของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดเพื่อให้มีความเหมาะสมโดยทดลองทำเชื้อจางน้ำทิ้งด้วยการเติมนํ้ากลั่นในสัดส่วนต่างๆ เพื่อให้สามารถใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดดังต่อไปนี้

1.) น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มแปรสูตรทั้งหมด 5 สูตร โดยแปรสัดส่วนของน้ำดองเค็ม : น้ำกลั่นดังนี้คือ 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 และ 1 : 0
2.) น้ำทิ้งมะม่วงดองหวานแปรสูตรทั้งหมด 5 สูตร โดยแปรสัดส่วนของน้ำดองหวาน : น้ำกลั่นดังนี้คือ 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 และ 1 : 0
3.) น้ำทิ้งนํ้านมแปรสูตรทั้งหมด 5 สูตร โดยแปรสัดส่วนของนํ้านม : นํ้ากลั่น ดังนี้คือ 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 และ 1 : 0
4.) น้ำกะทิเข้มข้นแปรสูตรทั้งหมด 6 สูตร โดยแปรสัดส่วนของน้ำกะทิเข้มข้น : นํ้ากลั่น ดังนี้คือ 1 % (1 : 99), 5 % (1 : 19), 10 % (1 : 9), 15 % (1 : 5.7), 20 % (1 : 4) และ 25 % (1 : 3)

นำน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดที่มีการแปรสัดส่วนของน้ำทิ้งต่างๆกับน้ำกลั่นมาปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้มีปริมาณขั้นต่ำเหมาะสมเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์คือ น้ำตาลกลูโคส 1% และแอมโมเนียมไนเตรต 0.2% (Aksu และ Eren,2005) ดังนี้

1. น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม เป็นน้ำทิ้งที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีปริมาณสูงถึง 9.50% แต่เมื่อพิจารณาที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในน้ำทิ้งชนิดนี้พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 0.80% และ 0.15% ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าขั้นต่ำพื้นฐาน ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนให้เหมาะสมเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa*
2. น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน มีน้ำตาลเป็นสารอาหารหลักเท่ากับ 11.06% และมีโปรตีนเท่ากับ 0.22% ซึ่งมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ได้ ดังนั้นในน้ำทิ้งนี้สูตรครบส่วนจึงไม่ต้องปรับสารอาหารใดๆ แต่ในสูตรเชื้อจางพบว่ามีแหล่งไนโตรเจนน้อยกว่าปริมาณขั้นต่ำที่ยีสต์จะเจริญได้ ดังนั้นจึงต้องปรับแหล่งไนโตรเจนให้เพียงพอก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ต่อไป
3. น้ำทิ้งนํ้านม ถือได้ว่าเป็นตัวแทนของน้ำทิ้งที่มีโปรตีนอยู่สูงและมีความหลากหลาย ซึ่งมีโปรตีนอยู่ 0.77% และมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ทั้งหมด 1.58% ในการแปรสัดส่วนสูตรน้ำทิ้งพบว่า

ทั้งน้ำมันสูตรครบส่วนมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ จึงไม่ต้องมีการปรับสารอาหารพื้นฐานใดๆ แต่พบว่าในสูตรอื่นๆที่มีการแปรสัดส่วนน้ำทิ้งด้วยการเจือจางต่างๆมีแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับแหล่งคาร์บอนให้เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa*

4. น้ำกะทิ เป็นแหล่งอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงถึง 15.61% แต่ในการนำไปใช้เพาะเลี้ยงจะต้องเจือจางน้ำกะทิให้มีความใกล้เคียงกับน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำกะทิ จึงเป็นผลให้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีปริมาณน้อยกว่าขั้นต่ำสำหรับการเจริญของยีสต์ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงยีสต์จึงต้องปรับสารอาหารทั้งสองชนิด

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงต้องควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆให้มีความเหมาะสม และเป็นรูปแบบเดียวกัน คือมีการปรับค่า pH เป็น 6.0 ± 0.2 (Tinoi และคณะ, 2005) และควบคุมสภาวะต่างๆตามวิธีการทดลองที่แสดงในข้อ 3.3

ปริมาณสารอาหารหลักคือคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดหลักการปรับสูตรแล้วแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารอาหารหลักในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดหลักการปรับสูตร

ชนิดน้ำทิ้ง	สูตรน้ำทิ้ง	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	ปริมาณไขมัน (%)
น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม	ครบส่วน	1.00	0.20	0.08
	เจือจาง 1: 1	1.00	0.20	0.04
	เจือจาง 1: 2	1.00	0.20	0.03
	เจือจาง 1: 3	1.00	0.20	0.02
	เจือจาง 1: 4	1.00	0.20	0.02
	น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน	ครบส่วน	11.05	0.22
เจือจาง 1: 1		5.53	0.20	0.04
เจือจาง 1: 2		3.68	0.20	0.03
เจือจาง 1: 3		2.76	0.20	0.02
เจือจาง 1: 4		2.21	0.20	0.02

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารอาหารหลักในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดหลักการปรับสูตร (ต่อ)

ชนิดน้ำทิ้ง	สูตรน้ำทิ้ง	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	ปริมาณไขมัน (%)
น้ำทิ้งน้ำนม	ครบส่วน	1.58	0.76	0.06
	เจือจาง 1: 1	1.00	0.38	0.03
	เจือจาง 1: 2	1.00	0.25	0.02
	เจือจาง 1: 3	1.00	0.19	0.02
	เจือจาง 1: 4	1.00	0.15	0.01
	น้ำกะทิเข้มข้น	เจือจาง 1: 3 (น้ำกะทิ 1%)	1.00	0.20
เจือจาง 1: 4 (น้ำกะทิ 5%)		1.00	0.20	3.12
เจือจาง 1: 5.7 (น้ำกะทิ 10%)		1.00	0.20	2.34
เจือจาง 1: 9 (น้ำกะทิ 15%)		1.00	0.20	1.56
เจือจาง 1: 19 (น้ำกะทิ 20%)		1.00	0.20	0.78
เจือจาง 1: 99 (น้ำกะทิ 25%)		1.00	0.20	0.16

นำน้ำทิ้งที่ปรับสูตรแล้วมาใช้ในการเพาะเลี้ยง *R. mucilaginosa* และผลตรวจสอบการเพาะเลี้ยงยีสต์แสดงในตารางที่ 4.7 - 4.10

จากการตรวจสอบผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มสูตรต่างๆในตารางที่ 4.7 พบว่าการเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งสูตรครบส่วนเป็นสูตรที่ได้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) คือ 9.25 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ น้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:1 ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 7.60 กรัมต่อลิตร น้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:2 1:3 และ 1:4 ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) คือ 6.55 6.55 และ 5.75 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองถึงแม้ว่าให้ปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนขั้นต่ำเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์เท่ากัน แต่ผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นว่าน้ำทิ้งสูตรครบส่วนเป็นสูตรที่ได้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำทิ้งสูตรครบส่วนมีปริมาณสารอาหารอื่นๆ คือ เกลือ และกรด ในปริมาณที่สูงกว่าสูตรอื่นๆ ประกอบกับยีสต์ในกลุ่ม *Rhodotorula* จัดเป็นยีสต์ที่ทนในแหล่งน้ำเค็ม จึงทำให้ยีสต์ชนิดนี้จึงใช้เกลือเป็นสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตได้ดี จึงมีผลในการส่งเสริมการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* ได้ดี ซึ่งมีรายงานว่าเกลือเป็นตัวกระตุ้นการเจริญของยีสต์ชนิดนี้ได้ดี โดยเฉพาะเกลือที่มีไอออนประจุบวกสอง (divalent cation) เช่น ฟอสเฟต ซึ่งเป็นตัวควบคุมการนำเข้าไอออนที่มีประจุบวกสองที่ส่งผลต่อการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ยีสต์ นอกจากนี้เกลียวยังมีอิทธิพลต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์โปรตีนและเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และเกลือที่มีไอออนประจุบวกหนึ่งหรือบวกสองยังมีผลร่วมในการทำงานของเอนไซม์ที่สังเคราะห์คาร์โบตีนอยด์ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งส่งเสริมการเจริญของยีสต์ให้เพิ่มสูงขึ้น (สวติศรี ลิ้มทอง, 2549; Komemushi และคณะ, 1994; Bhosale และ Gadre 2001b; Frengova และคณะ, 2008) จึงอาจส่งผลให้ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรครบส่วนสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่าสูตรอื่นๆ

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบตีนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้ง (คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีน) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม พบว่าจะมีความสอดคล้องกับผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งคือ ในน้ำทิ้งสูตรครบส่วนยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่สุดและให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) มีผลให้ปริมาณคาร์โบตีนอยด์รวมสะสมอยู่ในเซลล์ยีสต์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกันคือ 69 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง รองลงมาคือน้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ซึ่งมีปริมาณคาร์โบตีนอยด์รวมเท่ากับ 49 31 26 และ 16 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ ปริมาณคาร์โบตีนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งที่ผลิตได้จากยีสต์ซึ่งเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มจะแปรผันตรงกับผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อยีสต์มีการเจริญเติบโตได้ดีทำให้สามารถสะสมคาร์โบตีนอยด์ไว้ในเซลล์ได้สูงเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.7 ผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม

สูตรน้ำทิ้ง	น้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)
ครบส่วน	9.25 ± 0.21 ^a	69 ± 3.18 ^a
เจือจาง 1:1	7.60 ± 0.42 ^b	49 ± 3.35 ^b
เจือจาง 1:2	6.55 ± 0.35 ^c	31 ± 1.78 ^c
เจือจาง 1:3	6.55 ± 0.50 ^c	26 ± 0.04 ^c
เจือจาง 1:4	5.75 ± 0.21 ^c	16 ± 3.10 ^d

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a b c และ d ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการตรวจสอบปริมาณผลผลิตน้ำหนักรเซลล์ยีสต์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานจากตารางที่ 4.8 พบว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีการแปรสัดส่วนของน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน : น้ำกลั่น เจือจาง 1:1 เป็นสูตรที่ให้ผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดคือ 9.00 กรัมต่อลิตร แต่ไม่สูงกว่าสูตรเจือจาง 1:2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) รองลงมาคือ น้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:3 และ 1:4 ลดลงตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และในน้ำทิ้งสูตรครบส่วนยีสต์จะมีอัตราการเจริญเมื่อตรวจสอบในรูปผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้งน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากน้ำทิ้งสูตรครบส่วนมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 11.05% ซึ่งทำให้น้ำทิ้งสูตรนี้มีความเข้มข้นในระดับที่ทำให้น้ำทิ้งมีค่าออสโมลาริตีสูงเกินกว่าช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญได้คือ 1-10% (Govindaswamy และคณะ, 1999) ส่วนน้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:1 เป็นสูตรที่ให้ผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดเนื่องจากน้ำทิ้งได้ถูกปรับให้มีค่าออสโมลาริตีที่เหมาะสมแต่ยังมีแหล่งคาร์บอนอยู่ในปริมาณสูง รวมถึงสารอื่นๆ ได้แก่ โปรตีน เกลือ และกรด ยังคงมีอยู่ในปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ ดังนั้นจึงมีผลให้ยีสต์สามารถเจริญในน้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:1 ได้ดี แต่เมื่อเจือจางทำให้สารอาหารต่างๆ น้อยลงจะมีผลทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงตามลำดับ

ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมต่อกรัมเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานจะเป็นไปในรูปแบบเดียวกับผลผลิตน้ำหนักรเซลล์ยีสต์แห้งที่ได้เช่นเดียวกับน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:1 จะให้ผลผลิตน้ำหนักรเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุด และสร้างคาร์โบไฮเดรตรวมสะสมภายในเซลล์ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เท่ากับ 66 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และสร้างคาร์บอนอยด์รวมลดลงตามการเจือจางคือ สูตร น้ำทิ้งเจือจาง 1:2 1:3 1:4 และ 1:1 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาร์บอนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน

สูตรน้ำทิ้ง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณคาร์บอนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)
ครบส่วน	2.45 ± 0.07 ^d	27 ± 0.18 ^e
เจือจาง 1:1	9.00 ± 0.14 ^a	66 ± 1.03 ^a
เจือจาง 1:2	8.45 ± 0.64 ^a	60 ± 1.72 ^b
เจือจาง 1:3	7.55 ± 0.35 ^b	47 ± 1.05 ^c
เจือจาง 1:4	5.40 ± 0.42 ^c	32 ± 1.59 ^d

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a b c และ d ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งน้ำนมสูตรต่างๆแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าน้ำทิ้งน้ำนมสูตรครบส่วนเป็นสูตรที่ให้ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงสุดคือ 5.65 กรัมต่อลิตร และสูงกว่าจากสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือน้ำทิ้งสูตรเจือจาง 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำทิ้งสูตรครบส่วนมีสารอาหารมากที่สุด และสภาพของน้ำทิ้งนี้ไม่มีปัจจัยใดๆที่ไปรบกวนการเจริญของยีสต์ เช่น ค่าออสโมลาริตีของน้ำทิ้งที่เกิดจากน้ำตาล เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์ยีสต์แห้งในน้ำทิ้งน้ำนมสูตรที่ดีที่สุดกับน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มและดองหวาน พบว่ายีสต์เจริญในน้ำทิ้งน้ำนมได้น้อยกว่าในน้ำทิ้งทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงน้ำทิ้งทั้ง 3 ชนิดที่ให้ผลผลิตเซลล์แห้งสูงสุดพบว่าในน้ำทิ้งน้ำนมสูตรครบส่วนไม่ได้มีการปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แต่เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งนี้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแลคโตส ซึ่งยีสต์ *R. mucilaginosa* ไม่สามารถใช้น้ำตาลดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ (Barnett และคณะ, 2000; Simova และคณะ, 2004; Aksu และ Eren, 2005) จึงมีผลทำให้ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงสุคน้อยกว่าในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มและดองหวาน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่อกรัมเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำที่ใช้น้ำนม พบว่าในน้ำที่เลี้ยงสูตรครบส่วนนั้นยีสต์สามารถเจริญและผลิตคาร์โบไฮเดรตรวมสะสมในเซลล์ได้มากที่สุดเท่ากับ 23 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ซึ่งมีปริมาณมากกว่าคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการเลี้ยงในสูตรน้ำที่เจือจาง 1:1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนน้ำที่เลี้ยงสูตรเจือจาง 1:2 1:3 และ 1:4 ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้ เนื่องจากปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อการนำมาสกัดเพื่อวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต จะเห็นได้ว่าน้ำที่ใช้น้ำนมที่ทำเจือจางสูตรต่างๆ ถึงแม้จะมีการปรับแหล่งคาร์บอนให้มีเพียงพอต่อการเจริญขึ้นตัวของยีสต์คือ 1% แล้ว แต่ทั้งนี้การปรับดังกล่าวเป็นการปรับจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่มีอยู่เดิมให้เพิ่มขึ้นเป็น 1% ดังนั้นจึงทำให้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการปรับมีไม่ถึง 1% ในขณะที่คาร์โบไฮเดรตหลักในน้ำนมคือน้ำตาลแลคโตส ซึ่ง *R. mucilaginosa* ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เมื่อพิจารณาจากกลูโคสที่ปรับเติมลงไป ในน้ำที่ใช้น้ำนมสูตรเจือจางต่างๆ จะมีปริมาณที่มากขึ้นตามระดับการเจือจาง แต่การเจริญของยีสต์ก็ไม่เพิ่มขึ้นตามปริมาณกลูโคสที่เติมลงไป แต่กลับลดลงตามปริมาณการเจือจางแสดงให้เห็นว่าสารอาหารหลักที่ยีสต์ใช้ในการเจริญเพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรตน่าจะเป็นแหล่งไนโตรเจนในน้ำที่ใช้น้ำนมชนิดนี้

ตารางที่ 4.9 ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่ใช้น้ำนม

สูตรน้ำที่	น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)
ครบส่วน	5.65 ± 0.07 ^a	23 ± 1.46 ^a
เจือจาง 1:1	5.05 ± 0.07 ^b	17 ± 1.34 ^b
เจือจาง 1:2	1.60 ± 0.14 ^c	ND
เจือจาง 1:3	1.45 ± 0.07 ^{cd}	ND
เจือจาง 1:4	1.30 ± 0.14 ^d	ND

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจสอบได้

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

จากตารางที่ 4.10 ในน้ำกะทิเข้มข้นสูตรน้ำกะทิ : น้ำกลั่น เจือจาง 1:5.7 (น้ำกะทิ 15%) เป็นสูตรที่ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 10.70 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือน้ำกะทิสูตรเจือจาง 1:4 1:3 1:9 1:19 และ 1:99 จะเห็นได้ว่าผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิสูตรเจือจาง 1:5.7 ถึง 1:99 จะมีปริมาณลดลงตามลำดับ แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาสูตรน้ำกะทิที่มีความเข้มข้นสูงกว่าสูตร 1:5.7 ได้แก่ สูตร 1:4 และ 1:3 จะมีผลให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำกะทิในสูตร 1:4 และ 1:3 มีปริมาณกะทิมากเกินไปจึงทำให้มีความข้นหนืดทำให้การส่งผ่านออกซิเจนไปสู่เซลล์ยีสต์ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศแบบ orbital shaking ลดลง ทำให้ยีสต์สามารถเจริญได้น้อยลง จึงพบว่าน้ำกะทิสูตรเจือจาง 1:3 ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าสูตรเจือจาง 1:4 และ 1:5.7 ตามลำดับ

ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในน้ำกะทิเจือจางจะมีความแปรผันตรงกับผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งที่ได้คือน้ำกะทิสูตรเจือจาง 1:5.7 ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่สุดและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวมเท่ากับ 95 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และสูงกว่าสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนน้ำกะทิสูตรเจือจาง 1:4 1:3 1:9 1:19 และ 1:99 จะมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งรองลงมาตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง

สูตรน้ำกะทิ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัม)
เจือจาง 1:3 (น้ำกะทิ 25%)	9.30 ± 0.42 ^b	82 ± 1.65 ^b
เจือจาง 1:4 (น้ำกะทิ 20%)	9.55 ± 0.21 ^b	84 ± 6.26 ^b
เจือจาง 1:5.7 (น้ำกะทิ 15%)	10.70 ± 0.14 ^a	95 ± 6.31 ^a
เจือจาง 1:9 (น้ำกะทิ 10%)	7.55 ± 0.21 ^c	65 ± 2.64 ^c
เจือจาง 1:19 (น้ำกะทิ 5%)	6.40 ± 0.28 ^d	24 ± 1.72 ^d
เจือจาง 1:99 (น้ำกะทิ 1%)	2.65 ± 0.07 ^e	21 ± 0.59 ^d

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a b c d และ e ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุดจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุด ส่วนยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน น้ำกะทิเจือจาง และน้ำทิ้งนํ้านมมีผลผลิตเซลล์ยีสต์แห้งต่ำกว่าตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณคาร์บอนอยด์ที่ยีสต์ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งต่างๆ พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มสามารถสร้างคาร์บอนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งได้สูงสุด ส่วนยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน น้ำกะทิ และน้ำทิ้งนํ้านมสามารถสร้างคาร์บอนอยด์ที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนได้ต่ำกว่าตามลำดับ

จากการศึกษาผลผลิตของน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และปริมาณคาร์บอนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้ง (ไมโครกรัมต่อกรัม) แสดงผลในตารางที่ 4.11 จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกสูตรได้ดังนี้

น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มสูตรที่เลือกคือ น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มสูตรครบส่วน เนื่องจากสูตรดังกล่าวให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและปริมาณคาร์บอนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งที่ได้เท่ากับ 9.25 กรัมต่อลิตร และไม่น้อยกว่าผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งจากงานวิจัยการใช้ น้ำกะทิหว่าปลีดองเลี้ยงยีสต์ของ Shih และ Hang (1996) และยังถือได้ว่าการใช้น้ำทิ้งสูตรครบส่วนดังกล่าวนี้เป็นการใช้ประโยชน์ของน้ำทิ้งได้อย่างเต็มรูปแบบโดยไม่ต้องมีการเจือจาง

น้ำทิ้งมะม่วงดองหวานสูตรที่เลือกคือ น้ำทิ้งมะม่วงดองหวานสูตรเจือจางน้ำทิ้ง : น้ำ 1 : 1 น้ำทิ้งสูตรนี้ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งรวมถึงปริมาณคาร์บอนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งที่ได้จะมีค่ามากกว่าผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งงานวิจัยการใช้โมลาสเลี้ยงยีสต์ของ Aksu และ Eren (2005) ซึ่งได้เท่ากับ 9.00 กรัมต่อลิตร

น้ำทิ้งนํ้านมสูตรที่เลือกคือ น้ำทิ้งนํ้านมสูตรครบส่วน ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เท่ากับ 5.65 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณไม่น้อยกว่าผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งงานวิจัยการใช้หางนมเลี้ยงยีสต์ของ Aksu และ Eren (2005) รวมถึงปริมาณคาร์บอนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งที่ได้สูงสุดเช่นเดียวกัน

น้ำกะทิเจือจางสูตรที่เลือกคือ น้ำกะทิเข้มข้นสูตรเจือจางน้ำกะทิ : น้ำ 1 : 19 (น้ำกะทิเข้มข้น 5%) ถึงแม้ว่าน้ำกะทิสูตรดังกล่าวจะไม่ได้ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและปริมาณคาร์บอนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งสูงสุด แต่น้ำทิ้งสูตรนี้ถือได้ว่าเป็นน้ำกะทิสูตรเจือจางมากที่สุดที่ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งเท่ากับ 6.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยอ้างอิงของ Dominguez - Bocanegra และ Torres - Munoz (2004) ที่ใช้น้ำกะทิเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.11 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลอง และจากงานวิจัยอ้างอิงที่ใช้ น้ำทิ้ง ชนิดใกล้เคียงกันกับงานวิจัย

ชนิดน้ำทิ้ง ที่ใช้ในการทดลอง	ปริมาณน้ำหนัก เซลล์ยีสต์แห้งที่ได้ (กรัมต่อลิตร)	งานวิจัยอ้างอิง	ปริมาณน้ำหนัก เซลล์ยีสต์แห้ง อ้างอิง (กรัมต่อลิตร)
น้ำทิ้งมะม่วง ดองเค็มสูตรครบส่วน	9.25	Shih และ Hang (1996) (น้ำทิ้งกะหล่ำปลีดอง)	8
น้ำทิ้งมะม่วง ดองหวาน สูตรเจือจาง 1:1	9.00	Aksu และ Eren (2005) (โมลาส)	4
น้ำทิ้งนํ้านม สูตรครบส่วน	5.65	Aksu และ Eren (2005) (หางนม)	2
น้ำกะทิ สูตรเจือจาง 1:19 (น้ำกะทิ 5%)	6.40	Dominguez - Bocanegra และ Torres - Munoz (2004) (น้ำกะทิ)	6

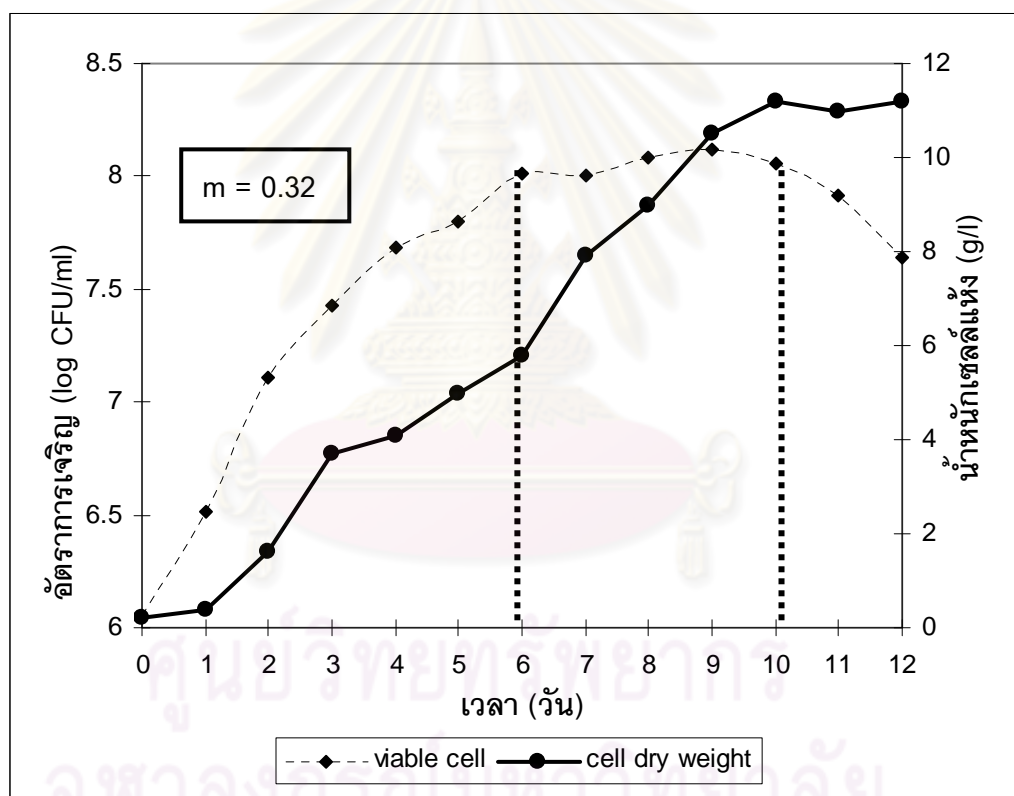
4.4 การศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตคาร์บอนอยด์ของยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งสูตร คัดเลือกชนิดต่างๆ

ในขั้นตอนนี้เป็นการนำน้ำทิ้งสูตรที่เลือกจากข้อ 4.3 มาศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์ และการผลิตคาร์บอนอยด์ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือกชนิดต่างๆ

ประเมินผลโดยตรวจสอบผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วิเคราะห์คาร์บอนอยด์รวมด้วย UV-Vis Spectrophotometry และรูปแบบของคาร์บอนอยด์ด้วย RP-HPLC

4.4.1 น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม

จากผลการตรวจสอบอัตราการเจริญของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่ายีสต์มีการเจริญในระยะ log phase เป็นเวลา 7 วัน (วันที่ 0-6) และมีอัตราการเจริญเมื่อวิเคราะห์ในรูปแบบความชันของกราฟ (m) เท่ากับ 0.32 และเจริญในระยะ stationary phase เป็นเวลา 5 วัน (วันที่ 6-10) ในขณะที่ยีสต์เข้าสู่ระยะ death phase ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง (วันที่ 10-12) ทั้งนี้ผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้งจะมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของยีสต์โดยที่น้ำหนักรเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นตลอดช่วงการเจริญของยีสต์ โดยในวันสุดท้ายของระยะ stationary phase จะให้ผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 11.2 กรัมต่อลิตร และคงที่ไปจนถึงวันที่ 2 ของระยะ death phase หรือวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.5 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และผลผลิตน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.12 พบว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม จะผลิตคาร์โบไฮเดรตที่มีรูปแบบที่ประกอบด้วยโกลูโคสในปริมาณสูงสุด โกลูโคสโรดิโน และ เบตาแคโรทีน รองลงมาตามลำดับ แต่แนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารคาร์โบไฮเดรตทั้ง

3 ชนิดตลอดช่วงการเพาะเลี้ยงยีสต์ไม่ชัดเจน ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมคำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนที่วิเคราะห์ได้ด้วย UV-Vis Spectrophotometry มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ตลอดช่วงการเจริญในระยะ stationary phase โดยที่แนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของคาโรทีนอยด์รวมตลอดการเจริญในเชิงปริมาณก็มีความไม่ชัดเจนเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนขององค์ประกอบของคาโรทีนอยด์ที่วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC เช่นเดียวกัน ดังนั้นปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนเพียงอย่างเดียวดังแสดงในตารางดังกล่าวจึงไม่สามารถบ่งชี้ถึงการผลิตคาโรทีนอยด์รวมทั้งหมดในช่วงระยะ stationary phase ได้ ทั้งนี้ไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาเกี่ยวกับรูปแบบของคาโรทีนอยด์ที่เปลี่ยนแปลงตลอดช่วงการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงไม่มีข้อมูลที่จะใช้ในการอธิบายหรือบ่งชี้ถึงสาเหตุที่เกิดขึ้นได้

ตารางที่ 4.12 ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม

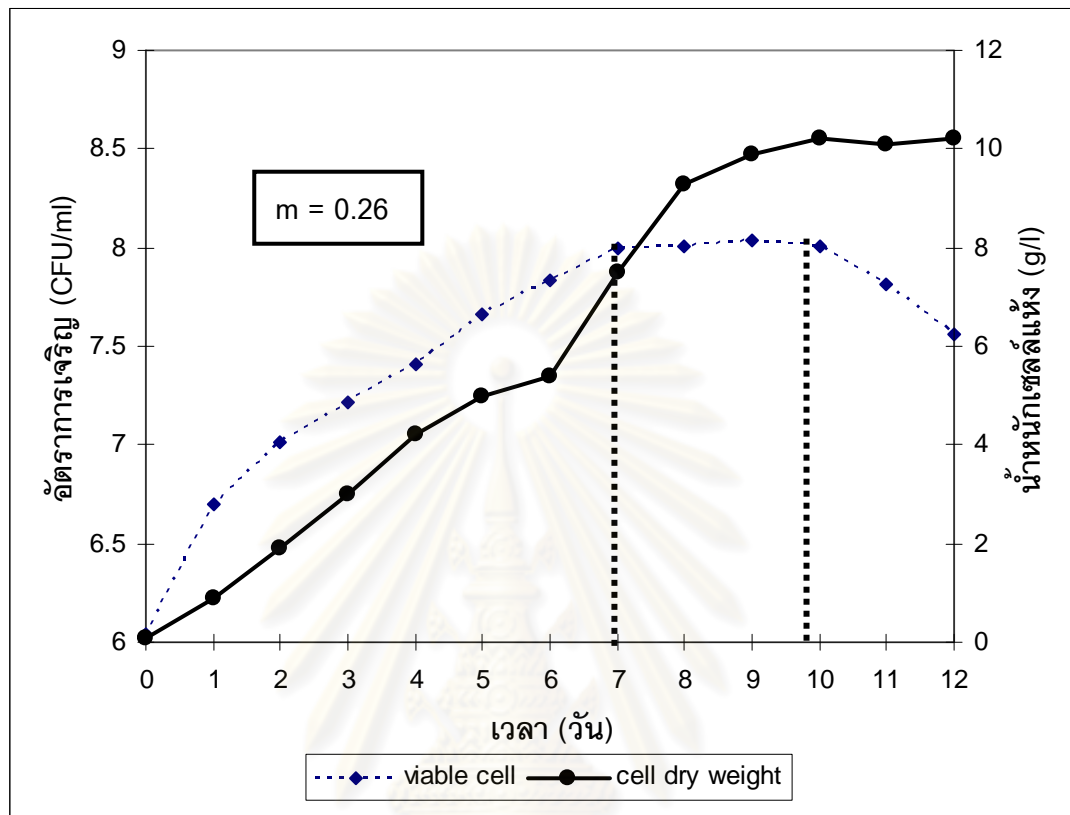
น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม		
วันที่	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมวิเคราะห์ด้วย UV - vis Spectrophotometry (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)	อัตราส่วน (เปอร์เซ็นต์) ของรูปแบบคาโรทีนอยด์ วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC Torulene : Torularhodin : Beta-carotene
6	65 ± 5.53^a	63 : 31 : 6
8	76 ± 2.79^a	53 : 43 : 4
10	76 ± 3.20^a	42 : 36 : 22
12	68 ± 7.29^a	63 : 31 : 6

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
a ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.4.2 น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน

ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานจะมีการเจริญในช่วงระยะ log phase เป็นเวลา 8 วัน (วันที่ 0-7) มีความชันเท่ากับ 0.26 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และมีระยะการเจริญ

ในช่วง stationary phase 4 วัน (วันที่ 7-10) และเข้าสู่ระยะ death phase ในวันที่ 11 ผลผลิตน้ำหนักรวมของยีสต์สูงสุดในช่วงต้นระยะ death phase เท่ากับ 10.2 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.6 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และผลผลิตน้ำหนักรวม (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน

ผลการวิเคราะห์รูปแบบของคาร์บอนอยด์ที่แสดงในตารางที่ 4.13 พบว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานสามารถสร้างคาร์บอนอยด์สะสมไว้ภายในเซลล์ยีสต์ที่มีรูปแบบคล้ายกับเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มคือประกอบด้วยโทรูลินในปริมาณสูงสุดรองลงมาคือ โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของคาร์บอนอยด์แต่ละชนิดพบว่า ตลอดระยะเวลาการเจริญในช่วง stationary phase ไม่พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารโทรูลิน และโทรูลาโรดิน ในขณะที่แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารเบตาแคโรทีนพบว่าการลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงการเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และตรวจไม่พบสารเบตาแคโรทีนเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์จนถึงวันที่ 12 ส่วนปริมาณคาร์บอนอยด์รวมนั้นมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตลอดช่วงการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของเบตาแคโรทีนเมื่อวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC

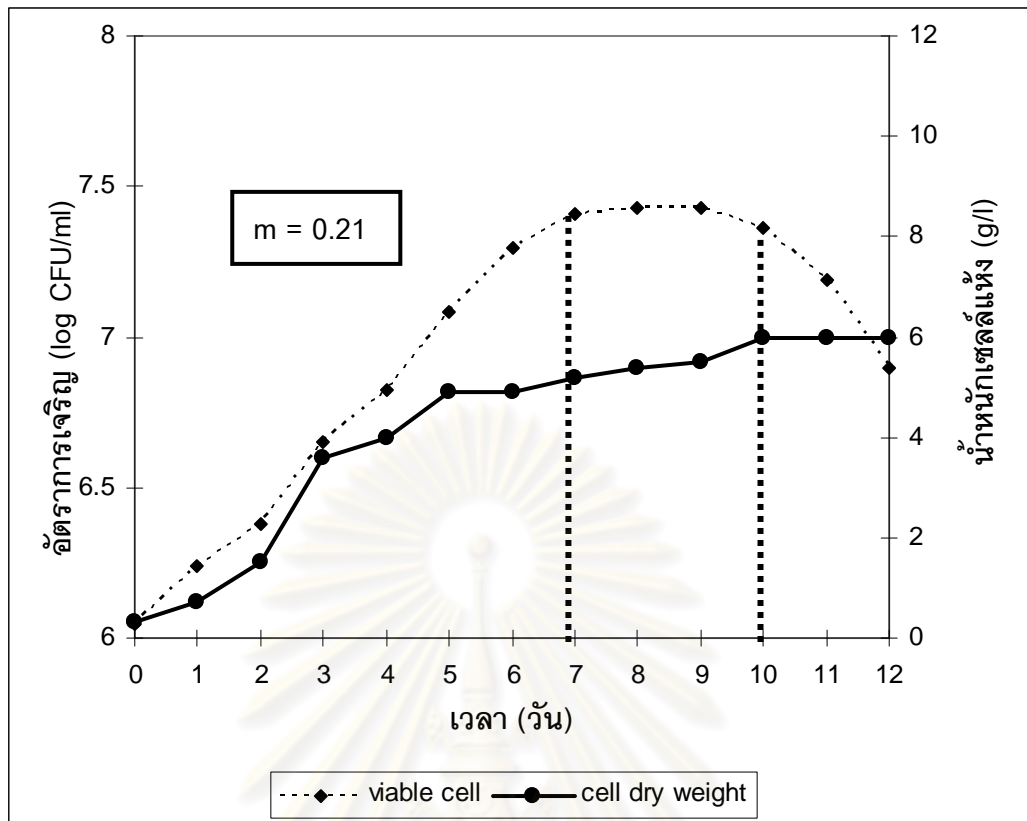
ตารางที่ 4.13 ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวาน

น้ำทิ้งมะม่วงคองหวาน		
วันที่	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมวิเคราะห์ด้วย UV - vis Spectrophotometry (ไมโครกรัมต่อกรัม)	อัตราส่วน (เปอร์เซ็นต์) ขององค์ประกอบคาโรทีนอยด์ วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC Torulene : Torularhodin : Beta-carotene
6	77 ± 6.26 ^a	56 : 22 : 22
8	64 ± 3.38 ^{ab}	71 : 10 : 19
10	59 ± 7.11 ^{bc}	66 : 29 : 5
12	46 ± 6.02 ^c	53 : 47 : 0

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a b และ c เป็นค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.4.3 น้ำกะทิเจือจาง

ระยะเวลาการเจริญของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจางดังแสดงในรูปที่ 4.7 จะมีความคล้ายคลึงกับยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวาน คือมีการเจริญในระยะ log phase นาน 8 วัน แต่อัตราการเจริญต่ำกว่าโดยมีค่าความชันเท่ากับ 0.21 และยีสต์เจริญในระยะ stationary phase เป็นเวลา 4 วัน และเข้าสู่ระยะ death phase ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวันที่ได้ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.7 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง

จากการวิเคราะห์รูปแบบของคาร์บอนอยด์จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง ดังแสดงในตารางที่ 4.14 พบว่ามีรูปแบบคล้ายกับคาร์บอนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้ง มะม่วงดองเค็ม และดองหวาน โดยพบว่าตลอดช่วงการเพาะเลี้ยงในระยะ stationary phase สาร ทั้ง 3 ชนิดไม่มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ คาร์บอนอยด์รวมก็ไม่พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างชัดเจน แต่เมื่อพิจารณาความ สอดคล้องของปริมาณคาร์บอนอยด์รวม พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ เบตาแคโรทีนที่วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC กล่าวคือ ปริมาณคาร์บอนอยด์รวมมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงและลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในวันที่ 12 ซึ่งเป็นไปใน ทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นและลดลงของเบตาแคโรทีนที่วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC ในวันดังกล่าว

ตารางที่ 4.14 ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง

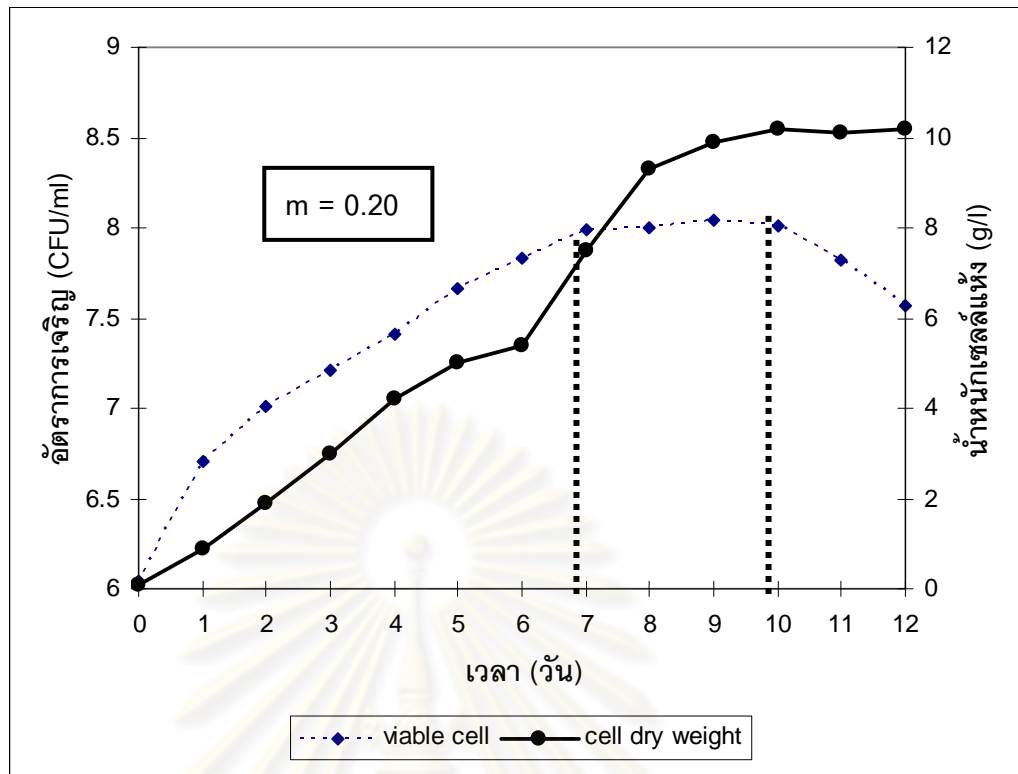
น้ำกะทิเจือจาง		
วันที่	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมวิเคราะห์ด้วย UV - vis Spectrophotometry (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)	อัตราส่วน (เปอร์เซ็นต์) ขององค์ประกอบคาโรทีนอยด์ วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC Torulene : Torularhodin : Beta-carotene
6	27 ± 2.05 ^c	56 : 38 : 6
8	46 ± 2.04 ^b	54 : 40 : 6
10	66 ± 6.52 ^a	47 : 41 : 12
12	61 ± 9.38 ^{ab}	55 : 40 : 5

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a b และ c เป็นค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.4.4 น้ำทิ้งนํ้านม

จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งนํ้านมในรูปแบบที่ 4.8 พบว่ายีสต์มีการเจริญในระยะ log phase เป็นเวลา 8 วัน (วันที่ 0-7) มีอัตราการเจริญต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำทิ้งชนิดอื่นๆ (ความชันเท่ากับ 0.20) และยีสต์มีการเจริญในช่วงระยะ stationary phase มีระยะเวลา 4 วัน โดยได้ผลผลิตน้ำหนักรวมเซลล์ยีสต์แห้งสูงสุดในวันสุดท้ายของระยะ stationary phase คือวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.6 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ระยะ death phase ในวันที่ 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 อัตราการเจริญ (log CFU/ml) และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งกรัมต่อลิตรของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่ใช้น้ำนม

รูปแบบของคาร์บอนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำที่ใช้น้ำนมนี้แสดงในตารางที่ 4.15 จะมีรูปแบบที่แตกต่างจากน้ำที่ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น โดยพบว่าคาร์บอนอยด์ที่ได้จะประกอบด้วย โทรูลาโรดินสูงสุด รองลงมาคือ โทรูลิน และเบตาแคโรทีน ตามลำดับ และไม่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารโทรูลาโรดินและโทรูลินที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างชัดเจน แต่พบว่าสารเบตาแคโรทีนจะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงยีสต์ เมื่อพิจารณาปริมาณของสารคาร์บอนอยด์รวมพบว่า มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงถึงวันที่ 8 และเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในวันที่ 10 และ 12 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 4.15 ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไม่โครโรทินต่อกรัมเซลล์แห้ง) และรูปแบบของคาโรทีนอยด์ในรูปเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งนํานม

น้ำทิ้งนํานม		
วันที่	ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมวิเคราะห์ด้วย UV - vis Spectrophotometry (ไม่โครโรทินต่อกรัมเซลล์แห้ง)	อัตราส่วน (เปอร์เซ็นต์) ขององค์ประกอบคาโรทีนอยด์ วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC Torulene : Torularhodin : Beta-carotene
6	32 ± 3.99 ^b	0 : 91 : 9
8	63 ± 4.41 ^a	14 : 77 : 9
10	70 ± 3.64 ^a	12 : 79 : 9
12	72 ± 1.47 ^a	9 : 77 : 14

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a และ b ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าชนิดของน้ำทิ้งมีผลต่ออัตราการเจริญ การสะสมคาโรทีนอยด์ภายในเซลล์ รวมถึงรูปแบบหลักของคาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ *R. mucilaginosa* สร้างขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด พบว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มจะมีอัตราการเจริญในช่วงระยะ log phase สูงสุด รองลงมาคือ น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน น้ำกะทิเจือจาง และน้ำทิ้งนํานมตามลำดับ ระยะเวลาการเจริญของยีสต์ในช่วงระยะ stationary phase ในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มมีระยะนานที่สุดคือ 5 วัน ส่วนน้ำทิ้งอื่นๆจะมีระยะเวลา 4 วัน ซึ่งอัตราการเจริญที่คำนวณในรูปความชันของกราฟในระยะ log phase และระยะเวลาในการเจริญของยีสต์ระยะ stationary phase อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่บ่งชี้ถึงความเหมาะสมของแหล่งอาหารต่อการสร้างคาโรทีนอยด์จากยีสต์ ซึ่งถ้าค่าความชันที่แสดงถึงอัตราการเจริญของยีสต์มีค่าสูงและระยะเวลาการเจริญของยีสต์ในช่วงระยะ stationary phase ยาว แสดงถึงความสมบูรณ์ของแหล่งอาหารที่มีผลทำให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดี อาจมีผลทำให้ยีสต์สามารถสร้างคาโรทีนอยด์สะสมไว้ในเซลล์ได้ปริมาณสูง โดยยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานสามารถสร้างคาโรทีนอยด์รวมที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนสะสมไว้ในเซลล์ได้สูงที่สุดในวันที่ 1 ของระยะ stationary phase (วันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง) เท่ากับ 77 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ในขณะที่การเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม น้ำทิ้งนํานม และน้ำกะทิเจือจางสามารถสร้างคาโรทีนอยด์รวมสะสมไว้ในเซลล์

ได้สูงที่สุดเท่ากับ 76 72 และ 66 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ โดยที่การเปลี่ยนแปลงคาโรทีนอยด์รวมในระหว่างการเลี้ยงระยะ stationary phase ของยีสต์ในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และน้ำกะทิเจือจางไม่มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารที่แน่ชัด ส่วนคาโรทีนอยด์รวมที่ยีสต์ผลิตได้ในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานมีแนวโน้มที่ลดลงตลอดระยะเวลาการเจริญ ในขณะที่ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนมจะผลิตคาโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเจริญช่วง stationary phase ทั้งนี้ไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณของคาโรทีนอยด์ตลอดช่วงการเพาะเลี้ยง จึงไม่มีข้อมูลที่จะนำมาอธิบายหรือบ่งชี้ถึงสาเหตุดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่วิเคราะห์ได้เป็นการคำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีน ซึ่งเป็นการแสดงถึงสัดส่วนของเบตาแคโรทีนที่ยีสต์ผลิตขึ้นในแต่ละช่วงระยะเวลาการเจริญเท่านั้น ดังนั้นปริมาณคาโรทีนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งที่ใช้ปริมาณของเบตาแคโรทีนเป็นตัวแทนจึงไม่สามารถใช้ในการบ่งชี้ถึงปริมาณคาโรทีนอยด์รวมทั้งหมดที่แท้จริงได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของปริมาณคาโรทีนอยด์รวมกับการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเบตาแคโรทีนซึ่งเป็นสาร 1 ใน 3 ขององค์ประกอบหลักของคาโรทีนอยด์ที่สร้างจากยีสต์ *R. mucilaginosa* เมื่อวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC จะพบว่ามีความสัมพันธ์กัน

การวิเคราะห์คาโรทีนอยด์เชิงคุณภาพด้วย RP-HPLC พบว่ารูปแบบหลักของคาโรทีนอยด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงระยะเวลาการเจริญคือ ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน และน้ำกะทิเจือจาง จะผลิตคาโรทีนอยด์ที่มีโพลีลินในปริมาณสูงสุด รองลงมาคือโทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งน้ำนมจะให้รูปแบบของคาโรทีนอยด์ที่แตกต่างจากน้ำทิ้งทั้ง 3 ชนิดคือยีสต์จะผลิตโทรูลาโรดินในปริมาณสูงสุด โพลีลิน และเบตาแคโรทีน รองลงมาตามลำดับ โดยที่อัตราส่วนของสารทั้ง 3 ชนิดมีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงการเพาะเลี้ยง ซึ่งยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และน้ำกะทิเจือจางจะผลิตคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ไม่มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารเหล่านี้ที่ชัดเจน ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานและน้ำนมไม่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารโพลีลินและโทรูลาโรดินที่ชัดเจนแต่ในส่วนของค่าเบตาแคโรทีนที่ได้มีแนวโน้มการลดลงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน และจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงการเจริญเมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งน้ำนม ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าสัดส่วนของเบตาแคโรทีนที่วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนด้วย UV-Vis Spectrophotometry

4.5. อิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งต่อคุณสมบัติของเซลล์ยีสต์ และการผลิตคาร์บอนอยด์ที่แข็งคุณภาพและปริมาณ

4.5.1 อิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งต่อองค์ประกอบทางเคมี ขนาดรูปร่างของเซลล์ยีสต์ และการใช้สารอาหารของยีสต์

ในขั้นตอนนี้เป็นกรนำน้ำทิ้งสุตรคัดเลือกทั้ง 4 ชนิดจากข้อ 4.3 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* และเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ในวันที่ 10 ซึ่งถือเป็นช่วงเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดโดยนำมาใช้ศึกษาต่อในขั้นนี้ โดยพิจารณาเลือกเวลาในช่วงปลายของระยะ stationary phase ของการเจริญของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทุกชนิด คือวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยที่ช่วงปลายของระยะการเจริญดังกล่าวถือว่าเป็นช่วงที่ยีสต์สามารถสะสมคาร์บอนอยด์รวมไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด (Libkind และ Broock, 2006) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth แสดงในตารางที่ 4.16

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ในตารางที่ 4.16 เซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มเมื่อเปรียบเทียบกับ YM broth พบว่าองค์ประกอบหลักของเซลล์ ได้แก่ โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และรูปร่างของเซลล์ยีสต์มีลักษณะเป็นทรงกลมเช่นเดียวกัน ตลอดจนขนาดของเซลล์ก็ไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังในรูปที่ 4.9 4.10 และตารางที่ 4.17 ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ของเซลล์ยีสต์บ่งชี้ให้เห็นว่าน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับใน YM broth โดยเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารหลักใน ตารางที่ 4.20 แสดงให้เห็นว่ายีสต์สามารถนำคาร์โบไฮเดรตไปใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ ได้มากกว่า 60% และนำแหล่งไนโตรเจนไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์และกิจกรรมทางพันธุกรรมได้มากกว่า 50% ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนได้สูงกว่า 50% บ่งชี้ได้ว่ายีสต์สามารถเจริญเติบโตในอาหารชนิดนั้นหรือในสิ่งแวดล้อมนั้นได้ดี (Phaf และคณะ, 1978) รวมทั้งมีการใช้สารอาหารอื่นๆ เช่น เกลือซึ่งถูกใช้ไปประมาณ 40% และเกลือเป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของยีสต์ (สมใจ ศิริโชค, 2547; Greasham และ Herber, 1997)

ส่วนยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานจะมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกับในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มคือมีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตไม่แตกต่างจากใน YM broth อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) รวมถึงรูปร่างของเซลล์ยีสต์มีรูปร่างกลมเช่นเดียวกับในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มและ YM broth คือ ดังรูปที่ 4.11 และพื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์ไม่มีความแตกต่างกับในน้ำทิ้ง

มะม่วงดองเค็ม และ YM broth อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดนี้สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสารอาหารหลักในน้ำทิ้งนี้ไปได้มากกว่า 80% และโปรตีนประมาณ 60% จึงกล่าวได้ว่าน้ำทิ้งดองหวานเป็นน้ำทิ้งนี้สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ได้ดีเช่นเดียวกันน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง พบว่าไขมันภายในเซลล์ยีสต์จะมีปริมาณสูงสุด ซึ่งสูงกว่าไขมันของยีสต์ที่เลี้ยงใน YM broth ถึง 9 เท่า รวมถึงรูปทรงของเซลล์ยีสต์ในรูปที่ 4.12 มีแนวโน้มเป็นทรงกลมและมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อประกอบกับการนำแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในน้ำทิ้งไปใช้บ่งชี้ได้ว่าการเจริญของยีสต์ในน้ำทิ้งชนิดนี้อยู่ภายใต้ภาวะที่แตกต่างจากภาวะปกติ กล่าวคือเป็นภาวะที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเพื่อแบ่งเซลล์ของยีสต์ แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ น้ำกะทิเจือจางจะมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอยู่ในปริมาณเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ แต่ปริมาณของสารอาหารอื่นๆ ที่เป็นโคแฟกเตอร์และโกรทแฟกเตอร์ ได้แก่ กลีเซออล กรดอะมิโน หรือวิตามิน อาจไม่เพียงพอต่อกระตุ้นเจริญของยีสต์ได้ จึงมีผลทำให้ยีสต์มีขนาดเล็ก และเมื่อพิจารณาถึงการใช้สารอาหารของยีสต์ พบว่ายีสต์จะใช้ไขมันในน้ำกะทิเจือจางมากที่สุดถึง 76% ซึ่งไขมันยีสต์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและเพื่อการเจริญเติบโตได้อีกแหล่งหนึ่ง (Greasham และ Herber, 1997) แต่จะเห็นได้ว่ายีสต์ไม่ได้นำสารอาหารดังกล่าวนี้ไปใช้ในการเจริญได้อย่างเต็มที่ แต่กลับนำเข้าสู่เซลล์เพื่อสะสมไว้มากกว่า ซึ่งบ่งชี้ได้จากการมีปริมาณไขมันภายในเซลล์สูงกว่าในน้ำทิ้งชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำมัน พบว่ามีความแตกต่างจากในน้ำทิ้งชนิดอื่นๆ คือเซลล์มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ยีสต์น้อยที่สุด และมีโปรตีนในสัดส่วนสูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับปริมาณโปรตีนของเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงใน YM broth อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) พื้นที่ผิวของยีสต์ในน้ำทิ้งนี้ไม่มีความแตกต่างกับน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน และ YM broth อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่รูปร่างของเซลล์ยีสต์มีความแตกต่างจากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดอื่นๆอย่างเห็นได้ชัดคือ ยีสต์มีรูปร่างเป็นวงรี (oval) ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ซึ่งบ่งชี้ถึงการเจริญของยีสต์ที่แตกต่างจากปกติ มีรายงานว่าหากยีสต์เจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ยีสต์จะมีการแบ่งเซลล์ในลักษณะที่ไม่สมมาตรทำให้เซลล์ยีสต์มีรูปทรงแตกต่างจากยีสต์ในแหล่งอาหารอื่นๆ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549; Spencer และ Spencer, 1997) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากสารอาหารที่ยีสต์ใช้ในระหว่างการเจริญ พบว่ายีสต์นำคาร์โบไฮเดรตต่างๆในน้ำทิ้งไปใช้ได้น้อยที่สุดคือ 22% เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในน้ำทิ้งน้ำมันคือน้ำตาล แลคโตสซึ่งยีสต์ *R. mucilaginosa* ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Fregova และคณะ, 1997; Barnett และคณะ, 2000; Simova และคณะ, 2004; Aksu และ Eren, 2005) จึงมีผลทำให้แหล่ง

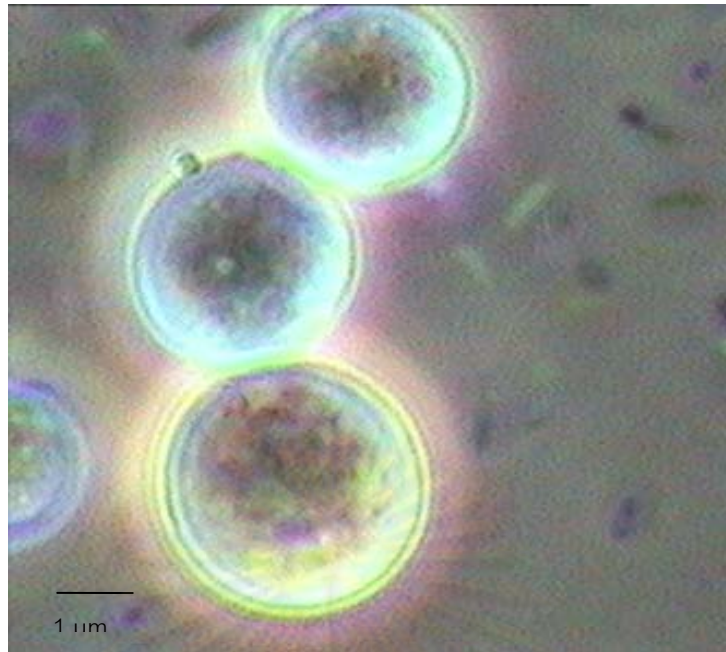
คาร์บอนที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้เพื่อการเจริญ ดังนั้นยีสต์จึงต้องใช้สารอาหารอื่นๆ ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งน้ำนมแทน ได้แก่ โปรตีน และไขมัน จึงพบว่ายีสต์จึงใช้โปรตีนได้สูงถึง 84% ซึ่งสูงกว่าน้ำทิ้งชนิดอื่นอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจนำไปใช้ทั้งในการสร้างโครงสร้างของเซลล์ และกิจกรรมทางพันธุกรรมของยีสต์ การที่ยีสต์ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเพื่อสร้างพลังงานหรือแบ่งเซลล์ได้เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนม แต่การที่ยีสต์สามารถนำโปรตีนไปใช้ในการสร้างโครงสร้างของเซลล์ จึงอาจมีผลทำให้พื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนมยังคงมีขนาดไม่แตกต่างจากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และดองหวาน

ตารางที่ 4.16 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth

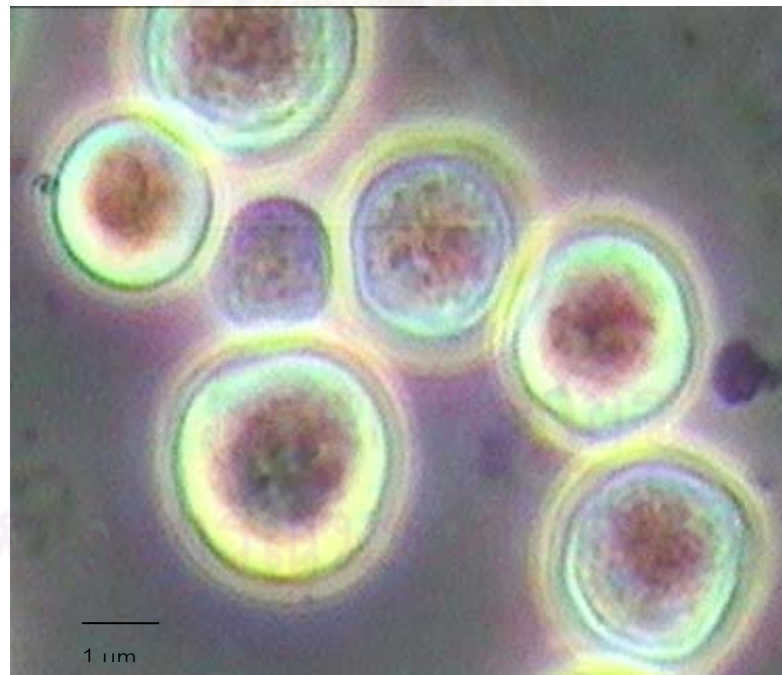
องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์	อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง				
	YM broth	น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม	น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน	น้ำกะทิเจือจาง	น้ำทิ้งน้ำนม
ความชื้น	78.19 ^b ± 0.06	74.15 ^c ± 0.13	75.91 ^d ± 0.11	77.34 ^c ± 0.17	83.97 ^a ± 0.22
คาร์โบไฮเดรต	52.48 ^{ab} ± 0.00	54.21 ^{ab} ± 0.73	52.86 ^{ab} ± 5.84	57.83 ^a ± 0.50	43.71 ^b ± 1.77
โปรตีน	42.61 ^a ± 0.24	40.39 ^a ± 1.20	38.53 ^{ab} ± 6.31	31.32 ^b ± 0.86	43.35 ^a ± 1.22
ไขมัน	1.02 ^d ± 0.41	3.91 ^c ± 0.38	4.64 ^c ± 0.49	9.50 ^a ± 0.34	7.94 ^b ± 0.79
เถ้า	3.89 ^b ± 0.16	1.49 ^c ± 0.09	3.97 ^b ± 0.01	1.35 ^c ± 0.02	5.00 ^a ± 0.24

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a b c และ d ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่สถิติ ($p \leq 0.05$)

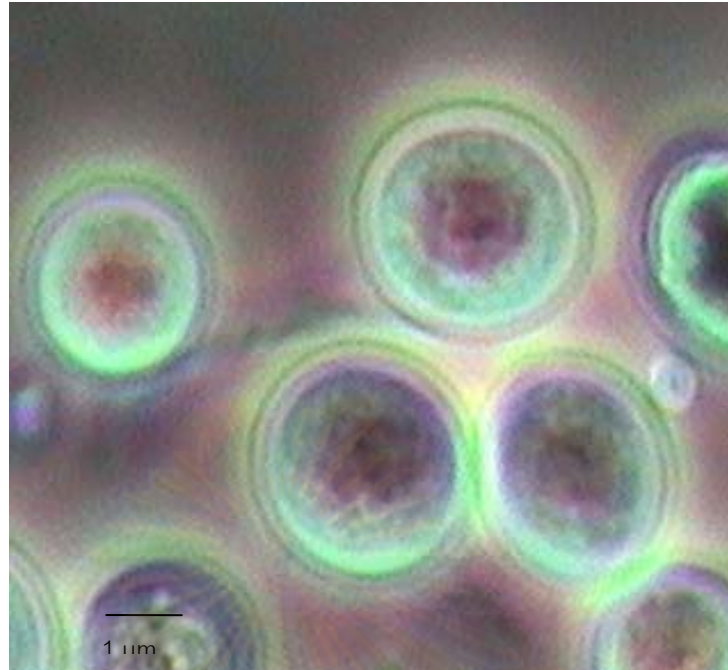
ส่วนการผลวิเคราะห์ขนาดและรูปร่างของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด แสดงรูปที่ 4.9 -4.13 และขนาดของเซลล์ยีสต์แสดงในค่าพื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์ ดังตารางที่ 4.18



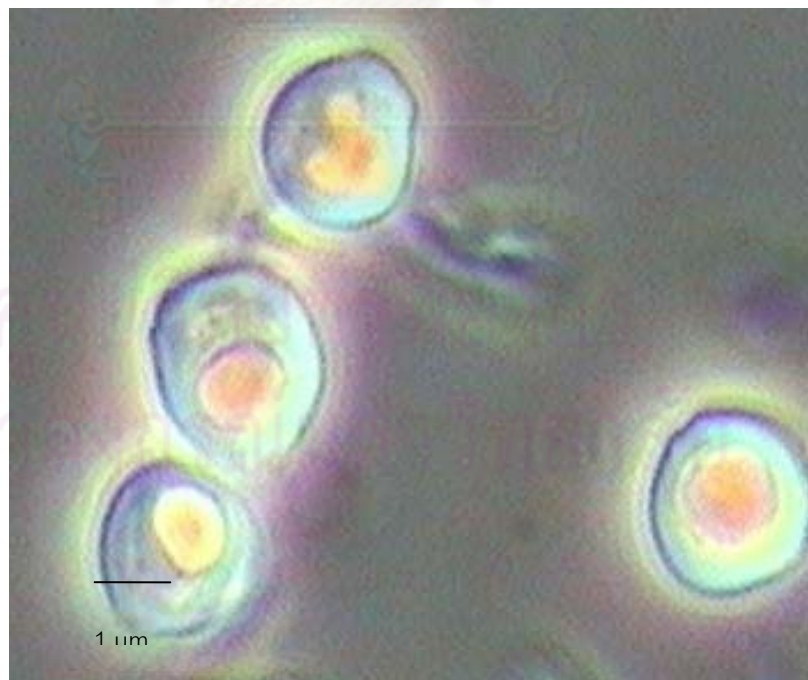
รูปที่ 4.9 รูปร่างเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth



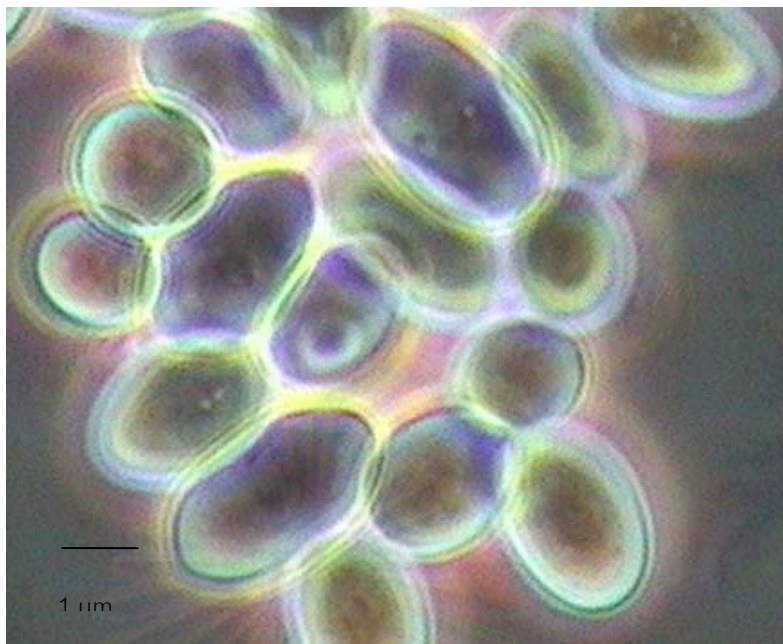
รูปที่ 4.10 รูปร่างเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม



รูปที่ 4.11 รูปร่างเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน



รูปที่ 4.12 รูปร่างเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจี๊ยะจาง



รูปที่ 4.13 รูปร่างเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน่านม

ตารางที่ 4.17 พื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์แสดงในค่าพื้นที่ผิวของยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth

แหล่งอาหาร	พื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์ <i>R. mucilaginosa</i> (ตารางเมตร $\times 10^{-12}$)
YM broth	8.08 ± 0.85^a
น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม	7.63 ± 0.50^a
น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน	7.56 ± 0.36^a
น้ำทิ้งน่านม	7.59 ± 0.40^a
น้ำกะทิเจือจาง	6.01 ± 0.46^b

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 10^3 ซ้ำ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
a และ b ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ส่วนการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี ของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* นำน้ำทิ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงยีสต์มาตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และทางเคมี แสดงดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงยีสต์

สมบัติทางกายภาพ	น้ำทิ้งมะม่วง ดองเค็ม	น้ำทิ้งมะม่วง ดองหวาน	น้ำกะทิ เจือจาง	น้ำทิ้งน้ำมัน
1. pH	6.27	4.58	6.30	6.53
2. ปริมาณของแข็ง ละลายน้ำทั้งหมด	4.2 °Brix	5 °Brix	0 °Brix	2 °Brix
สมบัติทางเคมี	น้ำทิ้งมะม่วง ดองเค็ม	น้ำทิ้งมะม่วง ดองหวาน	น้ำกะทิ เจือจาง	น้ำทิ้งน้ำมัน
3. คาร์โบไฮเดรต (%)	0.36 ± 0.03	0.86 ± 0.04	0.46 ± 0.03	1.23 ± 0.04
4. โปรตีน (%)	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.01
5. ไขมัน (%)	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.41	0.19 ± 0.02	0.04 ± 0.30
6. เถ้า (%)	4.91 ± 0.17	1.61 ± 0.08	0.02 ± 0.02	0.21 ± 0.02
7. เกลือ (%)	5.54 ± 0.07	1.97 ± 0.04	ND	ND

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจสอบได้

ทั้งนี้ได้นำสารอาหารที่ถูกใช้มาคำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงสารอาหารหลัก ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเกลือ โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์สารอาหารที่ลดลงภายหลังจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ใน น้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด แสดงผลดังตารางที่ 4.19 ดังนี้

ตารางที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอาหารหลักภายหลังจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิด

ชนิดของสารอาหาร	อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง			
	น้ำทิ้งมะม่วง ดองเค็ม	น้ำทิ้งมะม่วง ดองหวาน	น้ำกะทิ เจือจาง	น้ำทิ้งน้ำมัน
คาร์โบไฮเดรต (%)	- 64.37%	- 84.40%	- 54.41%	- 22.35%
โปรตีน (%)	- 50.40%	- 59.15%	- 30.00%	- 84.68%
ไขมัน (%)	- 29.99%	- 41.18%	- 76.16%	- 43.28%
เกลือ (%)	- 41.72%	- 9.01%	ND	ND

หมายเหตุ : - หมายถึง การลดลงของสารอาหาร
ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจสอบได้

4.5.2 อิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งต่อการผลิตคาร์โบไฮเดรตเชิงคุณภาพและปริมาณ
ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษารูปแบบของคาร์โบไฮเดรตที่ยีสต์สร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้ง
ทั้ง 4 ชนิด และอาหารมาตรฐาน YM broth ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ซึ่งการศึกษา
คาร์โบไฮเดรตในเชิงปริมาณวิเคราะห์ผลในรูปของคาร์โบไฮเดรตรวมต่อกรัมเซลล์แห้งดังแสดงใน
ตารางที่ 4.20

ในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมจากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ ดังใน
แสดงในตารางที่ 4.20 พบว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งแต่ละชนิดจะผลิตคาร์โบไฮเดรตรวมต่อกรัม
เซลล์แห้งได้ในปริมาณสูงตามลำดับคือ น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth
น้ำกะทิเจือจาง น้ำทิ้งน้ำมัน และน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานโดยผลิตได้เท่ากับ 86 79 69 63 และ 24
ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ แต่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมที่วิเคราะห์ได้เป็นเพียง
คาร์โบไฮเดรตที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีน และเนื่องจากยีสต์ *R. mucilaginosa* สามารถผลิต
คาร์โบไฮเดรตที่มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ 3 ชนิดคือ โทรูลิน โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน
ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ดังนั้นปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมดังกล่าวจึงบ่งชี้เฉพาะปริมาณของ
เบตาแคโรทีน ซึ่งเมื่อพิจารณาที่สัดส่วนของเบตาแคโรทีนเปรียบเทียบกับสารอีก 2 ชนิดที่สร้าง
จากเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่าเบตาแคโรทีนจากยีสต์เมื่อ
เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มคิดเป็นร้อยละ 22 ของสารคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด รองลงคือน้ำกะทิเจือ
จาง อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth น้ำทิ้งน้ำมัน และน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานจะผลิต
เบตาแคโรทีนคิดเป็นร้อยละ 14 11 10 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสัดส่วนของ

เบตาแคโรทีนมีความสอดคล้องกับปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่วิเคราะห์ได้ด้วย UV-Visible Spectrophotometry บ่งชี้ได้ว่าปริมาณคาโรทีนอยด์รวมที่ใช้ในการประเมินขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเบตาแคโรทีนที่มีอยู่ในสารคาโรทีนอยด์ทั้งหมด

เมื่อวิเคราะห์ถึงรูปแบบคาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดในช่วงปลายระยะ stationary phase คือวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าคาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน และน้ำกะทิเจือจางจะประกอบด้วยโทรูลินในสัดส่วนที่สูงสุด โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน รองลงมาตามลำดับ (โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ที่สกัดจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ เป็นเวลา 10 วันแสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งรูปแบบของคาโรทีนอยด์นี้เป็นรูปแบบปกติที่สร้างได้จากยีสต์ *R. mucilaginosa* และเป็นลักษณะทางพันธุกรรมอย่างหนึ่งของยีสต์ชนิดนี้ (Peterson และคณะ, 1957; Simpson และคณะ, 1964; Perrier และคณะ, 1995; Sperstad และคณะ, 2006) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Sguina และคณะ (2002) ที่ใช้ sugar cane juice ซึ่งเทียบได้กับการเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับใช้ในการเลี้ยงยีสต์ พบว่าคาโรทีนอยด์ที่ได้มีรูปแบบเป็นแบบปกติ แต่ยังไม่มียางผลของการใช้น้ำทิ้งที่เป็นตัวแทนของอาหารที่มีเกลือและไขมันเป็นองค์ประกอบหลักในการเลี้ยงยีสต์ต่อรูปแบบของคาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตขึ้น นอกจากนี้พบว่าสัดส่วนของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดจะแปรผันตามอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยพบว่าสารโทรูลินที่ผลิตได้จากยีสต์ที่เลี้ยงใน YM broth สูงกว่าโทรูลินในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน น้ำกะทิเจือจาง น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และน้ำทิ้งน้ำมัน 1.1 1.4 1.6 และ 4.9 เท่า ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของโทรูลินกับคาโรทีนอยด์อีก 2 ชนิดที่ผลิตได้จากยีสต์ที่เลี้ยงใน YM broth พบว่าโทรูลินสูงกว่าคาโรทีนอยด์ 2 ชนิดอย่างน้อย 3 เท่า ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน ดองเค็ม และน้ำกะทิเจือจางจะมีโทรูลินสูงกว่าคาโรทีนอยด์อีก 2 ชนิดอย่างน้อย 1.2 เท่า ในขณะที่ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำมันจะมีรูปแบบที่แตกต่างจากน้ำทิ้งชนิดอื่นๆ คือมีโทรูลาโรดินในปริมาณสูงสุด รองลงมาคือ โทรูลิน และเบตาแคโรทีน ตามลำดับ ซึ่งโทรูลาโรดินที่ยีสต์ผลิตได้มีสัดส่วนที่สูงกว่าคาโรทีนอยด์อีก 2 ชนิดอย่างน้อย 5 เท่า ซึ่งผลจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งน้ำมันนี้จะมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Frengova และคณะ (1997) ที่ศึกษาการใช้เวย์ (whey) ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. glutinis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *R. mucilaginosa* ซึ่งปกติจะผลิตคาโรทีนอยด์ที่มีโทรูลินในสัดส่วนที่สูงสุด รองลงมาคือ โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน ตามลำดับเช่นเดียวกัน แต่เมื่อเลี้ยงยีสต์ชนิดนี้ในเวย์พบว่ายีสต์ผลิตโทรูลาโรดินในสัดส่วนที่สูงกว่าคาโรทีนอยด์อีก 2 ชนิดถึง 5 เท่าเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งน้ำมัน และเมื่อพิจารณาที่สัดส่วนของเบตาแคโรทีนจากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มพบว่าปริมาณสูงสุด

รองลงมาคือ อาหารมาตรฐาน YM broth น้ำกะทิเจือจาง น้ำทิ้งนํ้านม และน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน รองลงมาตามลำดับ

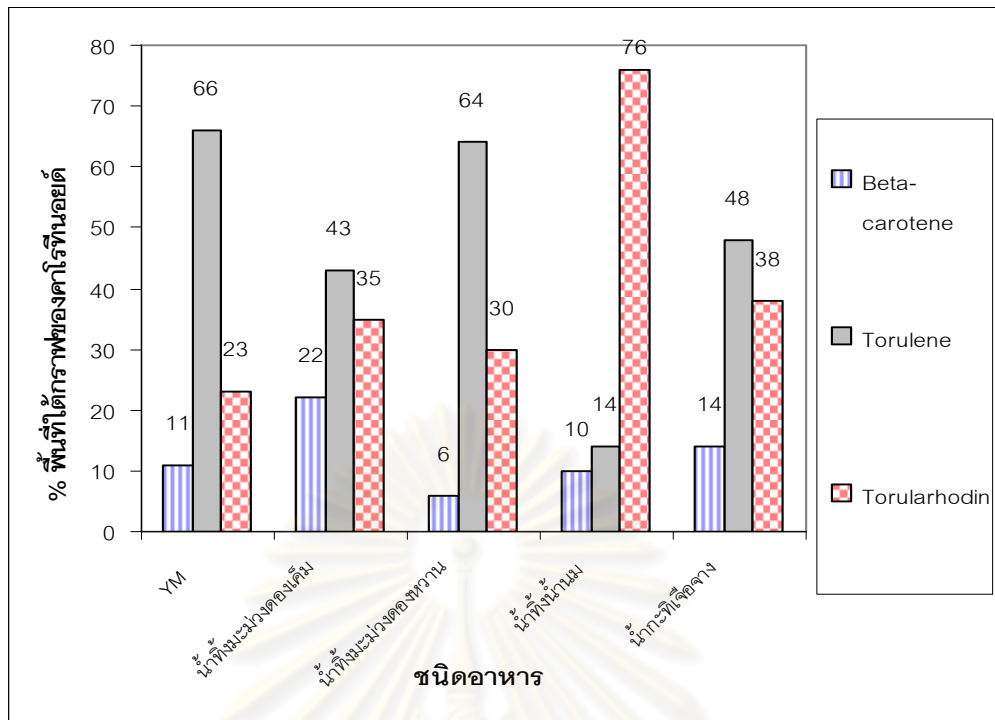
ตารางที่ 4.20 ปริมาณคาร์บอนอยด์รวมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดและอาหารมาตรฐาน YM broth

ชนิดน้ำทิ้งที่ใช้เพาะเลี้ยง	ปริมาณคาร์บอนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)
YM broth	79 ± 9.37 ^{ab}
น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม	86 ± 0.18 ^a
น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน	24 ± 1.09 ^d
น้ำกะทิเจือจาง	69 ± 0.43 ^{bc}
น้ำทิ้งนํ้านม	63 ± 0.91 ^c

หมายเหตุ : ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน a b และ c ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ส่วนการวิเคราะห์รูปแบบของคาร์บอนอยด์จะวิเคราะห์ผลในรูปแบบเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟของพีคของคาร์บอนอยด์แต่ละชนิดคือ เบตาแคโรทีน โทรูลีน และโทรูลาโรดิน แสดงในรูปแบบที่ 4.14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.14 รูปแบบของคาโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดและอาหารมาตรฐาน YM broth

จากผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ว่าองค์ประกอบหลักของน้ำทิ้งมีอิทธิพลต่อการเจริญขององค์ประกอบทางเคมี ขนาดและรูปร่างของเซลล์ยีสต์ ตลอดจนส่งผลไปถึงการผลิตคาโรทีนอยด์ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพในเรื่องรูปแบบของคาโรทีนอยด์ โดยพบว่าในน้ำทิ้งที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน รวมถึงสารอาหารอื่นๆ ที่เป็นโคแฟคเตอร์และโกรทแฟคเตอร์ที่มีผลต่อการกระตุ้นและช่วยเสริมการเจริญของยีสต์ เช่น เกลือ วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และดองหวาน เมื่อนำมาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ยีสต์จะสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีได้อย่างเหมาะสม โดยนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเป็นโครงสร้างของเซลล์ยีสต์ ส่งผลให้ยีสต์เจริญแบบมีรูปทรงกลมและสามารถแบ่งเซลล์ได้ดี ตลอดจนกระตุ้นให้เซลล์ยีสต์สังเคราะห์สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิเช่น คาโรทีนอยด์ ได้ในปริมาณสูง (สมใจ ศิริโภค, 2547; Greasham และ Herber, 1997) และสร้างคาโรทีนอยด์ที่มีรูปแบบปกติ กล่าวคือคาโรทีนอยด์ที่ผลิตได้มีคุณภาพใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหาร YM broth

ส่วนยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจี๊ยะจางจะมีอัตราการเจริญต่ำ ทั้งนี้เกิดจากการที่น้ำกะทิเจี๊ยะจางเป็นแหล่งอาหารที่อาจจะขาดโคแฟคเตอร์และโกรทแฟคเตอร์สำหรับการเจริญของยีสต์ จึงเป็นผลให้ยีสต์ผลิตคาโรทีนอยด์ได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำทิ้งชนิดอื่นๆ แต่เนื่องจากยีสต์มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการเจริญ จึงทำให้ยีสต์ยังคงมีรูปทรงกลมคล้ายกับเมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน และ YM broth แต่มีขนาดเล็กกว่า แต่อย่างไร

ก็ตามจากภาวะการขาดโคแฟคเตอร์และโกรทแฟคเตอร์ในน้ำทิ้งน้ำนมนี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบคาโรทีนอยด์ของยีสต์ซึ่งยีสต์ยังสามารถผลิตคาโรทีนอยด์ในรูปแบบปกติคือโทรูลินในปริมาณสูงสุด โทรูลาโรดิน และเบตาแคโรทีน รองลงมาตามลำดับ

ในขณะที่ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนมจะมีองค์ประกอบทางเคมี ขนาดและรูปร่างของเซลล์ยีสต์ ตลอดจนคาโรทีนอยด์ที่ยีสต์ผลิตได้มีรูปแบบที่แตกต่างจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งชนิดอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าในน้ำทิ้งนี้มีน้ำตาลแลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ ซึ่งยีสต์ *R. mucilaginosa* ไม่สามารถนำน้ำตาลดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์ยีสต์ได้ ทำให้เซลล์ยีสต์มีรูปทรงเป็นวงรี ถึงแม้ว่าน้ำทิ้งน้ำนมนี้จะขาดแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของยีสต์ แต่ยีสต์ยังมีความสามารถในการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ได้ในระดับที่สูงกว่าในน้ำที่เจาะจง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ากรดอะมิโนซึ่งเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งนี้อาจมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคาโรทีนอยด์ไปพร้อมกับการเจริญของยีสต์ จากภาวะการขาดแหล่งคาร์บอนดังกล่าวอาจมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ทำให้ยีสต์ผลิตคาโรทีนอยด์ที่มีรูปแบบแตกต่างจากปกติ ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับภาวะที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการสร้างโทรูลาโรดินจากยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยกล่าวว่าภาวะที่ก่อให้เกิด oxidative stress ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ได้แก่ การเพาะเลี้ยงยีสต์ที่ให้อากาศสูงกว่าปกติ การฉายแสงขาวในระหว่างเพาะเลี้ยงยีสต์ เป็นต้น ซึ่งภาวะ oxidative stress ดังกล่าวจะส่งผลให้เกิด reactive oxygen species (ROS) เช่น singlet oxygen (1O_2) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ชักนำให้ยีสต์ในกลุ่ม *Rhodotorula* ผลิตสารคาโรทีนอยด์ชนิดโทรูลาโรดินในสัดส่วนที่มากขึ้นกว่าปกติ เพื่อกำจัด singlet oxygen ดังกล่าว เนื่องจากโทรูลาโรดินไม่มีวงแหวน β -ionone แต่มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่ในโมเลกุล รวมทั้งมีสาย polyene ที่ยาวกว่าสายของเบตาแคโรทีนและโทรูลิน ซึ่งจากการที่สาย polyene มีความยาวมากกว่าจึงมีผลทำให้โทรูลาโรดินจับ singlet oxygen ได้ดีกว่าคาโรทีนอยด์ชนิดอื่น (Sakaki และคณะ, 2000; Sakaki และคณะ, 2001; Sperstad และคณะ, 2006; Herz และคณะ, 2007) ซึ่งมีงานวิจัยระบุว่าเมื่อยีสต์เจริญอยู่ในภาวะที่มีความเครียดจะมีผลทำให้ยีสต์เร่งสร้างเอนไซม์บางชนิดเพื่อเปลี่ยนสารโทรูลินให้อยู่ในรูปสารโทรูลาโรดิน โดยมีสารตัวกลางเพื่อเปลี่ยนเป็นโทรูลาโรดินคือ 16' - hydroxytorulene และ torularhodinaldehyde แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาถึงชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ดังกล่าว (Sakaki และคณะ, 2000; Sakaki และคณะ, 2001; Sperstad และคณะ, 2006; Herz และคณะ, 2007) ถึงแม้ว่ารูปแบบของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งน้ำนมในการศึกษานี้จะคล้ายกับคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ภายใต้สภาวะ oxidative stress แต่ภาวะในการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งน้ำนมนี้ไม่มีปัจจัยที่จะนำไปสู่ภาวะ oxidative stress จึงอาจกล่าวได้ว่าปริมาณโทรูลาโรดินที่ยีสต์ผลิตขึ้นน่าจะมาจากสาเหตุอื่น เนื่องจากมี

งานวิจัยที่มีการนำเวย์มาใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ *R. glutinis* เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ โดยนำเวย์มาเลี้ยงแบคทีเรีย *L. helveticus* ให้สร้างเอนไซม์ β -galactosidase เพื่อย่อยน้ำตาลแลคโตสในเวย์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส จากนั้นจึงนำเวย์ที่ผ่านการย่อยน้ำตาลดังกล่าวมาใช้ในการเลี้ยงยีสต์ แต่จากผลการทดลองพบว่ายีสต์ยังคงผลิตคาโรทีนอยด์ที่มีรูปแบบของโทรูลาโรดินในสัดส่วนที่สูงสุด (Frengova และคณะ, 1997) ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าการสร้างคาโรทีนอยด์ที่มีรูปแบบของโทรูลาโรดินในสัดส่วนที่สูงที่สุดของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในเวย์ไม่น่าจะเกิดจากการความเครียดที่เกิดจากการขาดสารอาหารโดยเฉพาะคาร์บอน แต่น่าจะเกิดจากอิทธิพลของกรดอะมิโนต่างๆที่มีอยู่ในเวย์ ซึ่งสอดคล้องผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในน้ำทังน้ำนม โดยที่เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของน้ำทังน้ำนม พบว่าการขาดแหล่งคาร์บอนจะส่งผลต่ออัตราการเจริญตลอดจนขนาดและรูปร่างของเซลล์ยีสต์ แต่ภาวะดังกล่าวอาจทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการใช้โปรตีนในการเจริญเติบโตมากกว่าในน้ำทังชนิดอื่นๆ ซึ่งในน้ำทังน้ำนมถือได้ว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโนที่นอกจากจะนำไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบต่างๆของเซลล์แล้ว กรดอะมิโนเหล่านี้ก็ยังถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมภายในเซลล์ยีสต์เพื่อสร้างเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องับกระบวนการสังเคราะห์สารปฐมภูมิ และสารทุติยภูมิ จากภาวะดังกล่าวนี้อาจมีผลในการเร่งการผลิตเอนไซม์บางชนิดที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสร้างโทรูลาโรดินในสัดส่วนที่มากกว่าปกติ ดังนั้นหากต้องการพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวควรต้องมีการศึกษาถึงชนิดของเอนไซม์และกรดอะมิโนต่างๆที่มีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่มีผลในการเร่งผลิตสารโทรูลาโรดินต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. ในการคัดเลือกสูตรน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดสำหรับใช้เลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยพิจารณาจากผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ พบว่าน้ำทิ้งปรับสูตรที่ดีที่สุดของน้ำทิ้งแต่ละประเภทได้แก่ น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มสูตรครบถ้วน และน้ำกะทิสูตรเจือจางด้วยน้ำ 1 : 19 (น้ำกะทิเข้มข้น 5%) และปรับปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็น 1% และ 0.2% ตามลำดับ ส่วนน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานสูตรเจือจาง 1 : 1 ปรับปริมาณไนโตรเจน 0.2% และน้ำทิ้งน้ำมันครบถ้วนที่ไม่ต้องปรับสารอาหาร ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งปรับสูตรของมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำกะทิ และน้ำมันเท่ากับ 9.25 9.00 6.40 และ 5.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลผลิตคาร์บอนไดออกไซด์รวมที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนเท่ากับ 69 66 23 และ 24 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ
2. ในการศึกษาอัตราการเจริญและผลผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ของยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งสูตรคัดเลือกชนิดต่างๆ พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มมีอัตราการเจริญสูงสุด และเจริญในระยะ stationary phase นานที่สุดคือ 5 วัน รองลงมาคือ น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน น้ำกะทิเจือจาง และน้ำทิ้งนม ตามลำดับ แต่ระยะเวลาในการเจริญของยีสต์ในระยะ stationary phase ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 3 ชนิดนานเท่ากันคือ 4 วัน โดยยีสต์ที่เลี้ยงด้วยน้ำทิ้งมะม่วงดองหวานสามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์รวมที่คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีนสะสมไว้ในเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 77 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ในขณะที่ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม น้ำมัน และน้ำกะทิเจือจางจะผลิตคาร์บอนไดออกไซด์รวมสูงสุดเท่ากับ 76 72 และ 66 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวมที่ใช้ในการประเมินขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเบตาแคโรทีนที่มีอยู่ในสารคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งหมด คุณภาพโดยรวมในแง่ของรูปแบบหลักของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งทุกชนิดไม่แปรผันตามระยะเวลาในการเลี้ยง
3. ในการศึกษาอิทธิพลของชนิดน้ำทิ้งต่อคุณสมบัติของเซลล์ยีสต์และการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ในเชิงคุณภาพ พบว่าองค์ประกอบทางเคมี และขนาดเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และดองหวาน จะมีความใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหารมาตรฐานคือ YM broth และเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีรูปร่างเป็นทรงกลมลักษณะสมมาตร และองค์ประกอบของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตได้จะมีรูปแบบคล้ายกันคือมีโพลีลินในปริมาณสูงสุด โทรูลาโรดินและเบตาแคโรทีนรองลงมาตามลำดับ ส่วนยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำกะทิเจือจางจะมีไขมันเป็นองค์ประกอบ

ทางเคมีของเซลล์สูงสุด โดยที่ยีสต์มีรูปร่างกลมขนาดเล็กและมีพื้นที่ผิวของเซลล์น้อยกว่าเซลล์จากน้ำทิ้งชนิดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากน้ำทิ้งน้ำนมมีองค์ประกอบของโปรตีนในสัดส่วนสูงสุดและเซลล์มีรูปร่างเป็นวงรี แต่พื้นที่ผิวไม่แตกต่างจากน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และดองหวาน ในขณะที่คาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนมจะมีคุณภาพที่แตกต่างจากน้ำทิ้งชนิดอื่น โดยพบว่าผลผลิตคาโรทีนอยด์ที่ได้มีองค์ประกอบหลักคือมีโทรูลาโรดินสูงสุด และมีโทรูลินและเบตาแคโรทีนในปริมาณรองลงมาตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

จากการงานวิจัยนี้ชี้บ่งว่าชนิดของน้ำทิ้งมีอิทธิพลต่อการเจริญ องค์ประกอบทางเคมีขนาดและรูปร่างของเซลล์ยีสต์ และส่งผลไปถึงการผลิตคาโรทีนอยด์ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการพิจารณาเลือกชนิดน้ำทิ้งเพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ที่มีคุณภาพตามต้องการได้ เช่น การเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในน้ำทิ้งน้ำนมจะได้ผลผลิตคาโรทีนอยด์ที่มีโทรูลาโรดินในปริมาณสูงจึงสามารถใช้เป็นทางเลือกในการพัฒนาการผลิตโทรูลาโรดินทางชีวภาพได้ทางหนึ่ง ในขณะที่เดียวกันถ้าต้องการคาโรทีนอยด์ที่มีองค์ประกอบของโทรูลินเป็นหลักก็สามารถใช้น้ำทิ้งที่มีแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสเป็นหลัก เช่น น้ำทิ้งที่เหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตผักและผลไม้ดอง เป็นต้น ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำทิ้งแล้ว ยังเป็นลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- นฤมล ไบพัด. 2546. การผลิต astaxanthin จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- นิตยา ไชยเนตร. 2538. การเสริมแอสตาแซนทีน วิตามินซี และน้ำมันปลาในอาหารเพื่อเพิ่มความต้านทานโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำวัยรุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุษบา ยงสมิทธิ. 2540. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มูทิตา ธรรมสังคม. 2545. ผลของคาร์ทีนอยด์จากสไปรูลินา *Spirulina platensis* ต่อการรอดและการเติบโตของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* วัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วีระศักดิ์ สามี. 2548. Carotenoids: Structures and potential mechanisms in biological functions. Journal Pharmacy Sciences 1:58-66.
- สมใจ ศิริโชค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

- Aksu, Z. and Eren, T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochemistry 40: 2985–2991.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18thed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. 2000. Yeasts characteristics and identification United Kingdom: Cambridge University press.

- Bhosale, P.B. 2001. Studies on yeast *Rhodotorula*, its carotenoids and their applications
Doctor of Philosophy thesis, Department of Microbiology, Chemical engineering, University of pune.
- Bhosale, P.B. and Gadre, R.V. 2001(a). Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. Applied Microbiology Biotechnology 55: 423-427.
- Bhosale, P.B. and Gadre, R.V. 2001(b). Production of β -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. Bioresource Technology 76:53-55.
- Bhosale, P. 2004. Environment and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Applied Microbiology Biotechnology 63:351-361.
- Braeunlich, K. 1978. The chemistry and action of pigment in poultry diets. World Poultry Congr. 15: 236-240.
- Buzzini, P. and Martini, A. 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* culture in raw materials of agro-industrial origin. Bioresource Technology. 71:41-44.
- Buzzini P., Martni A., Gaetani M.,Turchetti., Pagnoni, U.M. and Davoli, P. 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. Enzyme and microbial technology 36: 687-692.
- Cantrell, A., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., Rancan, F. and Bohm, F. 2003. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. Archives of Biochemistry and Biophysics 412: 47-54.
- Campos, C.A., Alzamora, S.T. and Gerschenson, L.N. 2000. Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. International Journal of Food Microbiology 54: 117-122.
- Dawson, M.I. 2000. The importance of vitamin A in nutrition. Current Pharmaceutical Design. 6: 311-325.
- Dharmadhikari, M. Antimicrobial agents. (online). Available from: <http://www.extension.iastate.edu/Wine/Resources/antimicrobialagents.htm> (2007, July 9)

- Dominguez-Bocanegra, A.R. and Torres-Munoz, J.A. 2004. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. Applied Microbiology Biotechnology 66: 249–252.
- Ershov, Y.U., Dmitrovsky, A. A., Poloyokh, O. V., Podoprigora, O. I. and Bykhovsky, V.Y. 1992. Enzymic conversion of torulene and torularhodin to retinal. Priklim. Biokhim. Mikrobiology 28: 680-684.
- Eugenia, M., Polinschi, T., Jurcoane, S., Ghiocel, R., Marculescu, E. and Zaharia, D. 1996. Studies concerning the obtaining of a fodder concentrate with the red yeast *Rhodotorula rubra* 120 r, containing carotenoid pigments-provitamin A, in submerged conditions in batch and fed-batch cultivation. Roum. Biotechnol. Lett 12: 25-232.
- Frank, R., Holm-Hansen, J. and Michelsen, B. 2000. Carotenoid compositions comprising a mixture of β -carotene, lycopene and lutein. Europe Patent Apply EP 981969 A1.
- Frengova, G., Simova, E., Pavlova, K., Beshkova, D. and Grigorova, D. 1994. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. Biotechnology Bioengineering 44: 888-894.
- Frengova, G., Simova, E. and Beshkova, D. 1997. Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology 18: 272-275.
- Frengova, G.I. and Beshkova, D.M. 2008. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia* yeasts of biotechnological importance. Journal Industrial Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s 10295-008-0492-9.
- Goodwin, T.W. 1980. Carotenoid in fungi. The biochemistry of the carotenoids. Volume I, Plants. Chapman and Hall, London: 260-265.
- Govindaswamy, V., Vasudevan, V. and Divakar, S. 1999. Optimisation of growth parameters for the production of carotenoids by *Rhodotorula gracilis*. Lebensmittel-Unters Forsch 208: 121-124.

- Greasham, R.L. and Herber, W. 1997. Design and optimization of growth media. In P. M. Rhodes, and Peter F. Stanbury Applied Microbial Physiology: A Practical Approach, pp. 53-59. Newcastle: Oxford University press.
- Haard, N.F. 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. Biotechnology Letters 10: 609-614.
- Harasawa, I., Suzuki, Y., Yokomizo, Y. and Igami, M. 1984. Torulene and carotenoids in feed improve the color of eggs and meats. Japanese Kokai Tokkyo Koho JP 60203147 A2.
- Hari, R.P.K., Patel, T. and Martin, A. 1992. A new strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. Journal of Industrial Microbiology 11: 43-51.
- Herz, S., Weber, R.W.S., Anke, H. and Davoli, P. 2007. Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). Photochemistry 68: 2503-2511.
- Hinds, T.S., William, R.D., West, L. and Knight E.M. 1997. Carotenoids and Retinoids: A review of research, Clinical, and Public Health Applications. Journal Clinical Pharmacology 37: 551-558.
- Hong, L. and Jihong, W. 1999. Preparation of anti-sunburn cosmetic. Guangzhou Huagong 27: 23-26.
- Johnson, E. and Schroeder, W.A. 1995. Microbial Carotenoids. In Advance in Biochemical Engineering Biotechnology, pp. 119-178. Berom Heidclberg: Springer-Verlag.
- Komemushi, S., Sakaki, H., Yokoyama, H. and Fujita, T. 1994. Effect of barium and other metals on the growth of a D-actic acid assimilating yeast *Rhodotorula glutinis* No.21 Journal Antibacteriol Antifungi Agents 22: 583-587.
- Li, Y. and Zhao, M. 2006. Simple methods for rapid determination of sulfite in food products. Food Control 17: 975-980.
- Libkind, D. and Broock, M.V. 2006. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. World Journal of Micrology and Biotehnology 22: 687-692.

- Nobuhiko, S., Yamashita, R. and Aman, Y. 2000. Skin cell aging inhibiting compositions containing endogenous antioxidants for cosmetics. Japanese Kokai Tokkyo Koho JP 2000143485.
- Parajo, J.C., Santos, V. and Vfizquez, M. 1998. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. Process Biochemistry 33: 181-187.
- Packer, L. 1992. Methods in enzymology volume 213 carotenoids part A chemistry, separation, quantitation and antioxidation USA: Academic press INC.
- Park, P.K., Kim, E.Y. and Chu, K.H. 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. Separation and Purification Technology 53: 148-152.
- Perrier, V., Dubreucq, E. and Galzy, P. 1995. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. Archives of Microbiology 164: 173-179.
- Peterson, W.J., Evans, W.R., Lecce, E., Bell, T.A. and Etchells, J.L. 1957. Quantitative determination of the carotenoid in yeasts of the genus *Rhodotorula*. Journal of Bacteriology 75: 586-591.
- Pfander, H., Traber, B. and Lanz, M. 1997. Carotenoid synthesis: A progress report. Pure & Applied Chemistry. 69: 2047-2060.
- Phaf, H.J., Miller, W. and Mrak, E.M. 1978. The life of yeasts 2^{sd} ed. United Kingdom: Harvard University press.
- Rose, H.D. and Kurup, V.P. 1977. Colonization of hospitalized patients with yeast-like organisms. Sabouraudia 15: 251-256.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Satonaka, K., Miki, W., Fujita, T. and Komemushi, S. 2000. Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. Journal of Bioscience and Bioengineering 89: 203-205.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Tada, A., Miki, W. And Komemushi, S. 2001. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. Journal of Bioscience and Bioengineering 92: 294-297.
- Setso, Y. and Sakaki, H. 1996. Antioxidants containing torularhodin. Japan Kokai Tokkyo Koho JP 08333248 A2.

- 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 Biotechnology 16: 227–235. doi: 10.1081/FBT-120016776.
- Shih, C.T. and Hang, Y.D. 1996. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine. Lebensmittel-Wissenschaft- und-Technologie 29: 570–572.
- Simova, E.D., Fregova, G.I. and Beshkova, D.M. 2004. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. Journal Industrial Microbiology Biotechnology 31: 115-121.
- Simpson, K.L., Nakayama, T.O.M. and Chichester, C.O. 1964. Biosynthesis of yeast carotenoids. Journal of Bacteriology 88: 1688-1694.
- Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. 1997. Yeasts in natural and artificial habitats Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sperstad, S., Lutnaes, B.F., Stormo, S.K., Liaaen-Jensen, S. and Landiald, B. 2006. Torularhodin and torulene and the major contributors to the carotenoids pool of marine *Rhodospiridium babjevae* (Golubev). Journal Industrial Microbiology Biotechnology 33: 269-273.
- Stafford, A.E. 1976. Rapid analysis of potassium sorbate in dried prunes by ultraviolet or colorimetric procedures. Journal of Agricultural and Food Chemistry 24: 894-895.
- 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 Biochemistry 40: 2551-2557.
- Wang, X.D., Tang, G.W. and Fox J.G. 1991. Enzymatic conversion of β -carotene into β -apocarotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissues. Archives of Biochemistry and Biophysics 285: 8-16.
- Wertz, K., Seifert, N. and Hunziker, P.B. 2004. Beta-carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen dependent mechanism. Free Radical Biology Medicine 37: 654-670.

- Williams, A.W., Boileau, T.M., Zhou, J.R., Clinton, S.K. and Erdman, J.W. 2000. β -Carotene modulates human prostate cancer cell growth and may undergo intracellular metabolism to retinol. Journal of Nutrition 130: 728-732.
- Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresource Technology 99: 5923-5927.
- Yasuhiro, K., Miura, Y. and Yagasaki, K. 2000. Inhibitory effects of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture. Cancer Letters 151: 111-115.
- Youping, H., Root, M.M., Parker, R.S. and Campbell, T.C. 1997. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver in vivo and in vitro antioxidant status. Nutrition Cancer 27:238-244.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีอบแห้ง ตามวิธี A.O.A.C (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Mettler, USA)
2. ถ้วยอะลูมิเนียม
3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 310, Germany)
4. โถดูดความชื้น (desiccator)

วิธีวิเคราะห์

1. นำถ้วยอะลูมิเนียมอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมเปล่าไว้
2. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 2-3 กรัมลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่อบไว้แล้ว และนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักหรืออบต่อไปจนกว่าน้ำหนักจะคงที่
3. คำนวณปริมาณความชื้นโดยใช้สูตร

ปริมาณความชื้น (%)

$$= \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}} \times 100$$

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl ตามวิธีของ A.O.A.C. (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดวิเคราะห์โปรตีน (ประกอบด้วย digestion unit รุ่น BUCHI, K-424 และ B-324, Switzerland)
2. ชุดเครื่องย่อยสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Digestion unit) (BUCHI, K-424, Switzerland)

3. ชุดเครื่องกลั่นสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Distillation unit) (BUCHI, B-324, Switzerland)
4. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 310, Germany)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (A.R.grade)
2. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก (A.R.grade) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
3. สารละลายบอริก (A.R.grade) ความเข้มข้น 4 %
4. selenium reagent mixture (A.R.grade)
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35 %
6. สารละลายอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยผสมสารละลาย methyl blue 0.2 % ในแอลกอฮอล์ แล้วกรอง 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย methyl red 0.2 % ในแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม (ตัวอย่างน้ำทิ้งประมาณ 5 มิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
2. เติม selenium reagent mixture ซึ่งใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ประมาณ 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 8 (ก่อนนำตัวอย่างเข้าย่อยควรเปิดเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 10 ก่อนประมาณ 15 นาที) และปิดฝาด้านที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดไอน้ำ (scrubber) ย่อยตัวอย่างจนส่วนผสมในหลอดย่อยกลายเป็นสีเขียว และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. นำมาเข้าเครื่องกลั่นโดยปรับให้เครื่องเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35 % 30 มิลลิลิตร และสารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยดสารละลายเมทิลเรด-โบโรโมครีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ในระหว่างการกลั่นจะเกิดแอมโมเนียขึ้น และจะถูกจับไว้ด้วยสารละลาย 4 % boric acid จะได้สารละลายสีเขียว ใช้เวลาในการกลั่นทั้งหมด 4 นาที
5. ล้างส่วนปลายของ condenser ด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในฟลาสก์ที่รองรับสิ่งที่กลั่นได้
6. นำสารละลายที่กลั่นได้ในฟลาสก์ทั้งหมดมาไทเทรตด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ (end point) เป็นสีม่วงแดง
7. ทำตัวอย่างควบคุม (control) โดยใช้ น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร (เมื่อวิเคราะห์โปรตีนในน้ำทิ้งมะม่วงต้องเค็มและหวาน) หรือกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 (เมื่อวิเคราะห์โปรตีนในเซลล์ยีสต์) ทำการทดลองเหมือนตัวอย่างในข้อ 2-6

8. คำนวณหาปริมาณโปรตีนดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \frac{(\text{Va}-\text{Vb}) \times \text{N} \times 1.4 \times \text{CF}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ Va คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต มีหน่วยเป็นนอร์มอล

CF คือ Conversion factor สำหรับเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นหน่วยโปรตีน (ในการทดลองใช้ 6.25)

ก. 3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี Soxhlet ตามวิธี A.O.A.C. (2005)

ในการทดลองเป็นการหาไขมันในเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำที่ม้าม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำกะทิ และน้ำมัน

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus)
2. ทิมเบิล (thimble)
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Mettler, USA)
4. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 310, Germany)
5. โถดูดความชื้น (desicator)
6. ขวดกั้นกลม

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) b.p. 40-60° C (A.R. grade)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 2-3 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และนำไปใส่ทิมเบิลใน extraction tube ของเครื่องวิเคราะห์ไขมัน
2. เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในขวดกั้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไป reflux บน heating mantle สกัดไขมันเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นก่อนนำขวดกั้นกลมออก

4. ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากส่วนไขมันที่สกัดได้ แล้วอบขวดสกัดที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่
5. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักไขมันที่สกัดได้ แล้วคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ก. 4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าโดยวิธี dry ashing ตามวิธี A.O.A.C. (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace) (Carbolite, CWF 1200, England)
2. ถ้วยครุชชีเบล (crucible)
3. เครื่องให้ความร้อน (hot plate)
4. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 310, Germany)
5. โถดูดความชื้น (desiccator)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอน 3-5 กรัม (ตัวอย่างน้ำทิ้ง 5 มิลลิลิตร) ใส่ในถ้วยครุชชีเบลที่เผาและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำตัวอย่างไปเผาโดยใช้เครื่องให้ความร้อนในตู้ดูดควัน จนกระทั่งตัวอย่างหมดควัน
3. นำตัวอย่างไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว
4. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ชั่งน้ำหนักเถ้าที่ได้และคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ก. 5 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี Mojonnier ตามวิธี A.O.A.C. (2005)

ในการทดลองเป็นการหาไขมันในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำกะทิเข้มข้น และน้ำทิ้งน้ำมัน

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Memmert, USA)
2. หลอด Mojonnier (Mojonnier tube)
3. เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) (Eyela, SB 651, Japan)
4. ขวดก้นกลม

สารเคมี

1. สารละลายแอมโมเนีย 26 % w/v
2. เอทานอล 95 % v/v
3. ไดเอทิลอีเธอร์ (Diethyl ether) b.p. 34-35 องศาเซลเซียส
4. ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether) b.p. 40-60 องศาเซลเซียส

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้ง 10 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด Mojonnier และชั่งน้ำหนักตัวอย่าง
2. เติมสารละลายแอมโมเนีย 26 % w/v 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันอีกครั้ง
3. เติมเอทานอล 95 % v/v 10 มิลลิลิตรเขย่าผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไดเอทิลอีเธอร์ 25 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเป็นเวลานาน 1 นาที
4. เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ 25 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเป็นเวลานาน 30 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
5. รินชั้นอีเธอร์ใส่ขวดก้นกลมที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว
6. สกัดตัวอย่างซ้ำอีก 2 ครั้งตามข้อ 3-5 แต่ใช้ เอทานอล 95 % v/v จาก 10 มิลลิลิตรเหลือ 5 มิลลิลิตร
7. ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส
8. นำขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่า น้ำหนักจะคงที่จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 นาที และนำขวดก้นกลมมาชั่งน้ำหนัก

$$\% \text{ Fat (sample)} = \frac{W_2 - W_3}{W_1} \times 100$$

เมื่อ	W_1	คือ	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
	W_2	คือ	น้ำหนักขูดก้นกลม+ ไขมันที่สกัดได้ (กรัม)
	W_3	คือ	น้ำหนักขูดก้นกลม (กรัม)

ก. 6 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric acid ตามวิธี A.O.A.C (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA)
2. เครื่อง Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)
3. อ่างให้ความร้อน (Water bath) (Mettler, USA)

สารเคมี

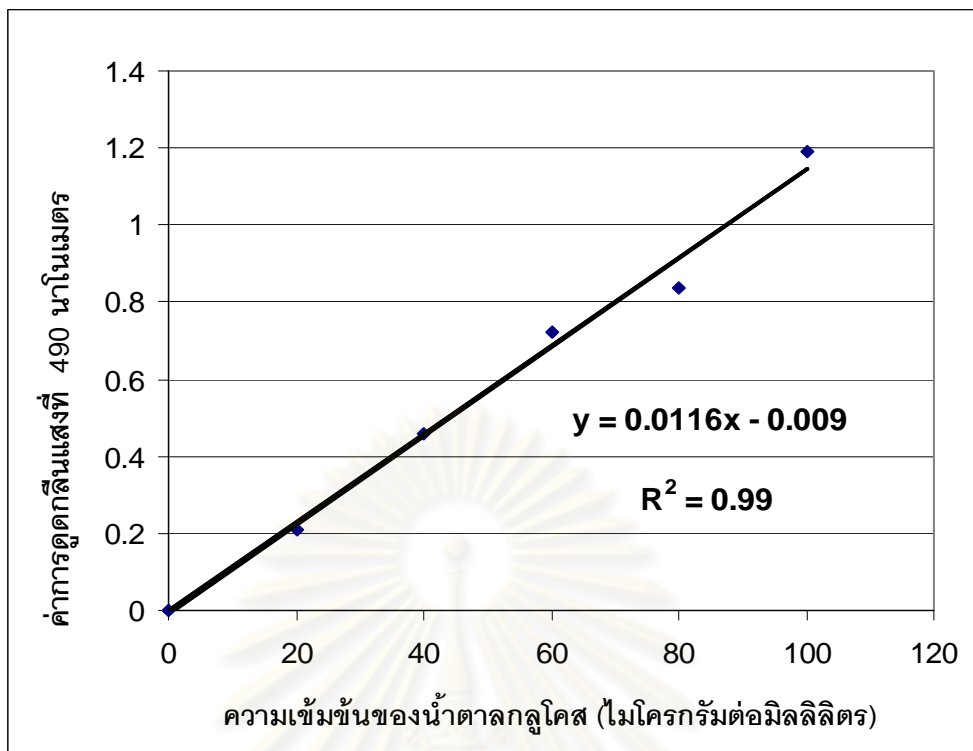
1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 95.5 % (A.R.grade)
2. สารละลายฟีนอล 5 %
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (D-glucose) (A.R.grade)

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำทิ้งประมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 นาที
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที
3. เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ค่าแปลงค่าน้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ชั่งกลูโคสที่มีน้ำหนักแน่นอน 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตรใน volumetric flask (จะได้สารละลายน้ำตาลกลูโคส 10^{-3} กรัมต่อมิลลิลิตร)
2. ปรับความเข้มข้นเป็น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ทำตามวิธีในข้อ 1-4 แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารละลายกลูโคส

ก. 7 การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ (NaCl) โดยวิธีของ Mohr ตามวิธี A.O.A.C. (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยครุซีเบล (crucible)
2. ชุดเครื่องแก้วสำหรับการไทเทรต

สารเคมี

1. สารละลายโพแทสเซียมโครเมต 5 %
2. สารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรต 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยละลายซิลเวอร์ไนเตรต 16.987 กรัม ในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างน้ำทิ้งประมาณ 25 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมโครเมต 5 % ลงในฟลาสก์ผสมให้เข้ากัน
3. นำมาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรต 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ (end point) เป็นสีน้ำตาลแดง

4. บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรตที่ใช้ไป และนำไปคำนวณปริมาณเกลือคลอไรด์ตามสูตร

$$\text{NaCl} (\%) = \frac{\text{ปริมาตรของ AgNO}_3 \text{ (มิลลิลิตร)} \times 0.00584 \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ก. 8 การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity) ตามวิธี A.O.A.C. (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ชุดเครื่องแก้วสำหรับไทเทรต

สารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
- สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 0.1 % ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 %

วิธีวิเคราะห์

- นำตัวอย่างน้ำทิ้งประมาณ 10 มิลลิลิตร ถ้าตัวอย่างมีสีเข้มมากให้เติมน้ำกลั่นลงไป
- หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด
- ไทเทรตตัวอย่างกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติของสารละลายที่มีสีชมพูนาน 30 วินาที บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
- คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยบอกเป็นกรัมของกรดต่อตัวอย่าง 100 กรัม หรือ 100 มิลลิลิตร

$$W = V \times N \times \text{แฟคเตอร์ของกรด}$$

เมื่อ	W	คือ	น้ำหนักของกรดที่มีอยู่ในตัวอย่าง (กรัม)
	N	คือ	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
	V	คือ	ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน NaOH (นอร์มอล)

Factor :	Malic acid	=	0.067
	Oxalic acid	=	0.045
	Citric acid monohydrate	=	0.070
	Tartaric acid	=	0.075

Sulfuric acid	=	0.049
Acetic acid	=	0.060
Lactic acid	=	0.090

ก.9 การวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมซอร์เบต โดยวิธี Colorimetric (Stafford, 1976)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กรวยแยก
2. เครื่อง spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA)
3. อ่างให้ความร้อน (water bath) (Mettler, USA)
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Mettler Toledo, 204)
5. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)

สารเคมี

1. คลอโรฟอร์ม (chloroform) (A.R.grade)
2. กรด 2-ไทโอบาบิทูริก (2-thiobarbituric acid) (TBA)
3. โพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) (A.R.grade)
4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (sulfuric acid) (A.R.grade)
5. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate) (A.R.grade)
6. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 6.0 นอร์มอล (A.R.grade)
7. โพแทสเซียมซอร์เบต potassium sorbate
8. โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) (A.R.grade)

การเตรียมสารเคมี

TBA (เตรียมก่อนใช้)

1. ชั่ง TBA ให้มีน้ำหนักแน่นอน 0.25 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 40 มิลลิลิตร
2. นำไปต้มในอ่างให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และนำมาทำให้เย็น
3. จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตร ให้มีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

$K_2Cr_2O_7 / H_2SO_4$

1. ชั่งโพแทสเซียมไดโครเมตให้มีน้ำหนักแน่นอน 0.25 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 250 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้มีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร

0.5 N NaHCO₃

ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่มีน้ำหนักแน่นอน 8.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร

วิธีการ

1. นำน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานและคองเค็มมาเจือจางตามระดับการเจือจางที่เหมาะสม
2. นำน้ำทิ้งที่ทำให้เจือจางแล้วในข้อที่ 1 มา 10 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตร และนำไปใส่ในกรวยแยก
3. เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ทิ้งให้คลอโรฟอร์มแยกชั้น ประมาณ 1 นาที
4. แยกชั้นคลอโรฟอร์มออกมา 70 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตรที่มีโซเดียมซัลเฟตอยู่ 5 กรัม จะได้สารสกัดคลอโรฟอร์ม
5. นำสารสกัดคลอโรฟอร์ม 50 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 นอร์มอลปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในกรวยแยก รอประมาณ 1 นาทีให้สารละลายแยกชั้น
6. แยกชั้นคลอโรฟอร์มทิ้ง นำชั้นโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตปรับให้เป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มอล (ให้มี pH ประมาณ 2-3) จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
7. จากนั้นนำสารละลายที่ได้มา 2 มิลลิลิตร เติมลงหลอดทดลองที่มี K₂Cr₂O₇ / H₂SO₄ อยู่ 2 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที
8. จากนั้นเติม TBA 2 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที
9. นำมาทำให้เย็น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

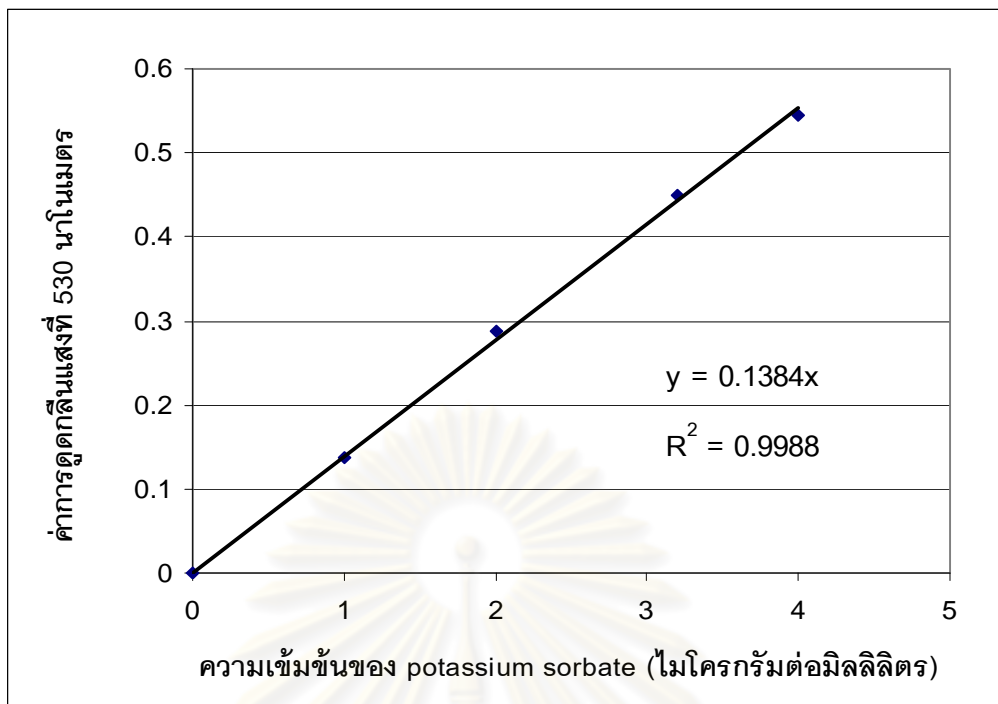
การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ชั่งโพแทสเซียมซอร์เบตที่มีน้ำหนักแน่นอน 0.4 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร (จะได้โพแทสเซียมซอร์เบต 4×10^{-2} กรัมต่อมิลลิลิตร)
2. ปรับความเข้มข้นเป็น 1, 2, 3.2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ทำตามวิธีในข้อ 7-9 แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน

การคำนวณ

ความเข้มข้นของโพแทสเซียมซอร์เบต (ppm)

$$= 50 \times \text{ระดับการเจือจาง} \times \text{ค่าความเข้มข้นที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน}$$



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์โพแทสเซียมซอร์เบต

ก.10 การวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์โดยวิธี DNTB method (Li และ Zhao, 2006)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA)
2. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)
3. กระดาษกรอง whatman filter เบอร์ 4

สารเคมี

1. 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (A.R.grade)
2. TRIS buffer (pH ~ 7-8)
3. โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite)

การเตรียมสารเคมี

1. ชั่ง DNTB ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 0.06 กรัม ละลายในสารละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วย TRIS buffer 0.1 โมลาร์

วิธีการ

1. นำน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม และดองหวานมาเจือจางตามระดับการเจือจางที่เหมาะสม

- นำมารองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 และนำส่วนตะกอนทิ้ง
- นำส่วนใสมา 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปประมาณ 8 มิลลิลิตร และ DNTB ที่เตรียมไว้ลงไป 1 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร และทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 412 นาโนเมตร

การสร้างกราฟมาตรฐาน

- ชั่งโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 0.1 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร (จะได้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้น 1000 ppm)
- ปรับความเข้มข้นเป็น 100 70 50 25 12.5 ppm
- ทำตามวิธีในข้อ 3-4 แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน

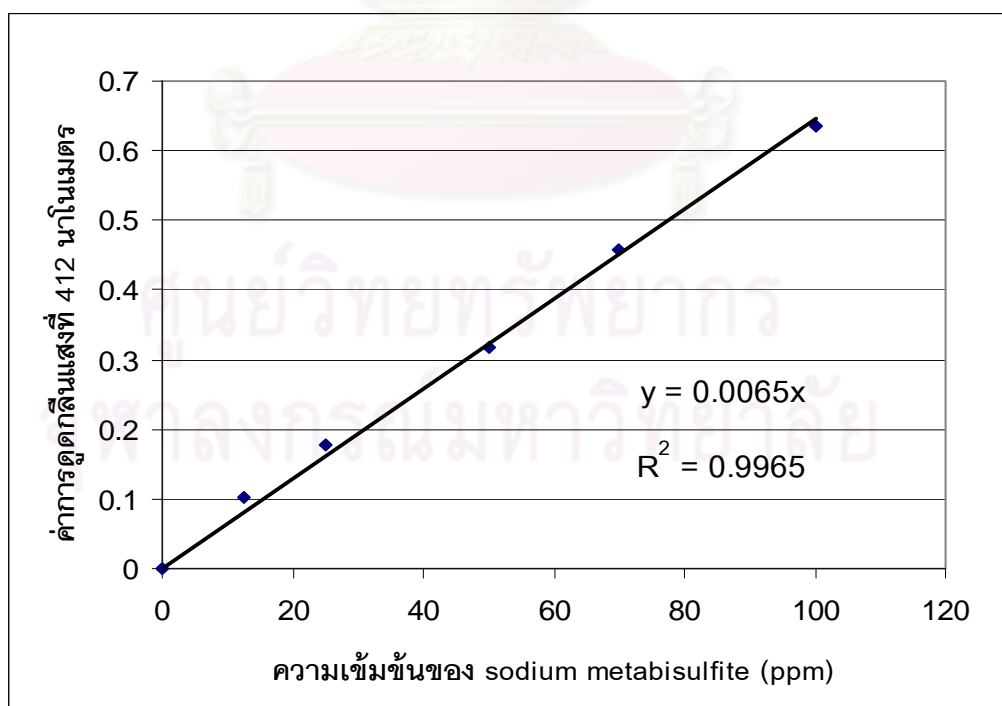
การคำนวณ

ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (ppm) (น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม)

$$= 5 \times \text{ค่าความเข้มข้นที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน}$$

ความเข้มข้นของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (ppm) (น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน)

$$= 10 \times \text{ค่าความเข้มข้นที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน}$$



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์

ข.1 การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธี A.O.A.C (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลอง
3. เครื่อง Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)
4. ไมโครปิเปต (Micropipette) P 200 และ P 1000 (Gilson, France)
5. ตูบมเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (NA) (Himedia, India)
2. Peptone from casine 0.1% (Merck, Germany)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำทิ้งมาทำให้เจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำเจือจางตามลำดับ
2. ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้งที่ระดับการเจือจางต่างๆ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหาร NA (อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส) ลงไป และกระจายอาหารให้ทั่วจานเพาะเลี้ยง ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว
3. กลับจานเพาะเชื้อ และนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับโคโลนีในจานเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี

ข.2 การตรวจหาอีสต์และรา ตามวิธี A.O.A.C (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลอง
3. แท่งแก้วรูปตัวแอลสำหรับเขี่ยเชื้อ (Spreader rod)
4. เครื่อง Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)

5. ไมโครปิเปต (Micropipette) P 200 และ P 1000 (Gilson, France)
6. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate dextrose agar (PDA) (Merck, Germany)
2. Peptone from casine 0.1% (Merck, Germany)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำทิ้งมาทำให้เจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำเจือจางตามลำดับ (ชุดเดียวกับที่ตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด)
2. ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้งที่ระดับการเจือจางต่างๆ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA อยู่
3. ใช้ Spreader จุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ เกลี่ยบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วๆ
4. นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีของยีสต์และราดังกล่าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ขั้นตอนการสกัดคาโรทีนอยด์ และการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์เชิงปริมาณและคุณภาพ

ค.1 การสกัดคาโรทีนอยด์จากเซลล์ยีสต์

ดัดแปลงจากวิธีของ Tinoi และคณะ (2005); Park และคณะ (2007)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Hettich, ROTANTA 460R, Germany)
2. กรวยแยก

สารเคมี

1. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) (DMSO) (AR grade)
2. ไดเอทิลอีเธอร์ (Diethylether) (AR grade)

วิธีการ

1. นำคัลเจอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำทิ้งชนิดต่างๆ มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็วรอบ 10000xg 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง
2. เติมสาร DMSO 20 มิลลิลิตร ต่อยีสต์ 1 กรัม เพื่อให้เซลล์ยีสต์แตก
3. สกัดคาโรทีนอยด์ออกจากสารในข้อ 2 ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ไดเอทิลอีเธอร์ด้วยอัตราส่วน (1:1 v/v) ในกรวยแยกตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้นอย่างสมบูรณ์
4. ดูดสารละลายสีส้มส่วนบนแยกออกมาทั้งหมดเพื่อนำไปวิเคราะห์หาคาโรทีนอยด์ต่อไป

หมายเหตุ

1. ในระหว่างขั้นตอนการสกัดทุกขั้นตอนต้องปฏิบัติในที่มืด และกรวยแยกจะต้องหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสงระหว่างสกัด
2. ในการทดลองเพื่อป้องกันการคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ทุกขั้นตอน จะใช้ตัวอย่างและสารสกัดเป็น 2 เท่าเสมอ และนำสารสกัดคาโรทีนอยด์ที่แยกได้มาวิเคราะห์เพียงหนึ่งส่วน

ค.2 การแยกสารโทรูลินและโทรูลาโรดินจากยีสต์สำหรับใช้เป็นสารอ้างอิง

ดัดแปลงจากวิธีของ Perrier และคณะ (1995); Bhosale (2001); Buzzini และคณะ (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. TLC Chamber และแผ่น TLC 20 × 20 cm aluminium silica gel plate (Merck, Germany)

สารเคมี

1. อะซิโตน (Acetone) (AR grade)
2. ปีโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether) (AR grade)

วิธีการ

1. เตรียมสารสกัดคาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน Ym broth ดังวิธีในข้อ ค.1
2. เตรียม TLC Chamber ให้ฉีกด้วยสารละลายผสม ปีโตรเลียมอีเธอร์ : อะซิโตน (75 : 15 v/v) ชีดเส้นบน TLC plate chromatography ให้สูงจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร เพื่อเป็นระดับที่ใช้ในการหยดสาร และขีดเส้นใต้จากขอบบน 2 เซนติเมตร เพื่อเป็นระดับบอกการเคลื่อนที่สิ้นสุดของตัวทำละลาย
3. หยดสารสกัดคาโรทีนอยด์ตัวอย่างบน TLC plate ที่ระดับขีดกลางรอให้แห้งแล้วหยดซ้ำที่เดิมประมาณ 2-3 ครั้ง
4. นำไป develop ใน TLC Chamber จนกระทั่งถึงขีดของตัวทำละลายที่ขีดบอกระดับไว้
5. develop ครั้งที่ 2 ใน TLC Chamber ที่ฉีกด้วยสารละลายปีโตรเลียมอีเธอร์ 100 % เมื่อขีดของตัวทำละลายถึงระดับ TLC plate
6. นำ TLC plate ออกจากแชมเบอร์ แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของตัวละลาย พร้อมทั้งระยะทางที่แถบสีต่างๆ ปรากฏขึ้น
7. คำนวณค่า R_f โดยเทียบกับค่า R_f อ้างอิงของ Bhosale (2001) เพื่อเทียบหาสารโทรูลิน และโทรูลาโรดิน
8. ชูดแถบสารโทรูลิน และโทรูลาโรดิงกล่าว (ปฏิบัติงานในห้องมืด) และนำไปละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ไดเอทิลอีเธอร์
9. นำไปปั่นแยกส่วนใสด้านบนซึ่งเป็นส่วนของสารออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 5000xg 5 นาที

10. นำส่วนใสเก็บใส่ภาชนะที่มีดซิดและสามารถป้องกันแสงได้ดี เก็บสารโทรูลินและโทรูลาโรดินอ้างอิง ดังกล่าวในตู้ควบคุมความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์

การคำนวณค่า R_f สามารถคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$

ค.3 การวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีน)

ดัดแปลงจากวิธีของ Peterson และคณะ (1957) และ Tinoi และคณะ (2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA)

สารเคมี

1. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) (DMSO) (AR grade)
2. ไดเอทิลอีเธอร์ (Diethylether) (AR grade)

วิธีการ

1. นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งต่างๆ มาสกัดคาโรทีนอยด์ดังวิธีในข้อ ค.1 จากนั้นนำสารสกัดคาโรทีนอยด์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 452 นาโนเมตร
2. นำไปคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์รวมต่อกรัมเซลล์แห้งตามกฎของเบียร์ (Beer's law)

คำนวณปริมาณคาโรทีนอยด์ตามกฎของเบียร์ (คำนวณเทียบเท่าเบตาแคโรทีน)

$$A = E_{1\text{cm}}^{1\%} bc$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (100 มิลลิลิตรต่อกรัม เซนติเมตร)

b = 1 cm (ความหนาของคิวเวตต์)

c = ค่าความเข้มข้นของสาร (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

โดยที่ค่า $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ของสารเบตาแคโรทีนคือ 2659 (100 มิลลิลิตรต่อกรัมเซนติเมตร)

ค. 4 การวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ด้วย Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

ดัดแปลงจากวิธีของ Simpson และคณะ (1964); Frengova และคณะ (1994); Bhosale (2001)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. High performance liquid chromatography (Agilent รุ่น 1100, Agilent technologies, USA; Detector คือ Multiple UV-Visible, Software ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ HP Chemstation software, Hewlett-Packard, Germany)
2. HPLC column (Reversed phase C₁₈, Luna C18 (2) 100A. 150 × 4.6 mm, Phenomenex, USA)
3. Security guard semi-prep guard cartridge system 10mm ID รุ่น KJO-4282 สำหรับ HPLC column (Phenomenex, USA)
4. 0.45 µm filter membrane (Nylon) (Kanto Chemical, Japan)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกคาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งต่างๆ ได้แก่

Dimethylsulfoxide (DMSO) (AR grade)

Diethylether (AR grade)

2. สารเคมีที่ใช้เป็น mobile phase ได้แก่

2.1 Acetonitrile (HPLC grade)

2.2 Methanol (HPLC grade)

2.3 Hexane (HPLC grade)

Mobile phase คือ Acetonitrile : Methanol : Hexane อัตราส่วน 40 : 54 : 6 (Isocratic mode)

3. สารเคมี standard β-carotene (Sigma, USA)

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

Flow rate ของ mobile phase 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

Injection volume 10 ไมโครลิตร

Column temperature คือ 25 องศาเซลเซียส

Detector คือ Multiple UV-Visible ที่ความยาวคลื่น 457 489 498 และ 515 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาค่า Retention time (นาที่) และความยาวคลื่น (λ) ที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์
วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย β -carotene stock solution ซึ่งสารเบตาแคโรทีนมาตรฐาน 0.1 กรัม และปรับปริมาตรด้วยไดเอทิลอีเธอร์ในขวดวัดปริมาตร ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของเบตาแคโรทีนเท่ากับ 400 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายโทลูอีนและโทลูลาโรดินสำหรับใช้เป็นสารอ้างอิงดังในวิธีข้อ ค.2
3. นำสารคาโรทีนอยด์มาตรฐานทั้ง 3 ชนิดมากรองผ่านแผ่นกรองชนิดไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนใส่ในขวดสีชาขนาด 2 มิลลิลิตร
4. นำสารมาตรฐานดังกล่าวไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reversed phase HPLC ที่สภาวะดังที่กล่าวมาข้างต้น
5. วิเคราะห์ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้กับค่า Retention time ที่แสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบกันในแต่ละความยาวคลื่นที่เลือกมาวิเคราะห์ เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เบตาแคโรทีน โทลูอีน และโทลูลาโรดิน

ค่า Retention time ที่ได้จากสารคาโรทีนอยด์อ้างอิงจะใช้ในการบ่งชี้ตำแหน่งของสารคาโรทีนอยด์แต่ละชนิดที่แยกจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งต่างๆ

การวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์จากยีสต์แต่ละชนิด
วิธีการ

1. นำสารสกัดคาโรทีนอยด์จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งต่างๆ ด้วยวิธีในข้อ ค.1 มากรองผ่านแผ่นกรองชนิดไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนใส่ในขวดสีชาขนาด 2 มิลลิลิตร
2. นำสารสกัดดังกล่าวไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง RP-HPLC
3. ที่สภาวะดังที่กล่าวมาข้างต้น
4. วิเคราะห์ค่าพื้นที่ใต้กราฟโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟของคาโรทีนอยด์แต่ละชนิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ขนาดพื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์

ง.1 การวิเคราะห์ค่าพื้นที่ผิวของยีสต์

ดัดแปลงวิธีจาก Hari และคณะ (1992)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ (Trinocular phase contrast microscope) (Olympus BX 51, USA)

วิธีการ

1. นำเซลล์ยีสต์มาหยดบนแผ่นสไลด์ ปรับกำลังขยายของเลนส์ตา 10X และกำลังขยายเลนส์วัตถุ 100X
2. ถ่ายภาพของยีสต์ที่ปรากฏผ่านกล้องจุลทรรศน์
3. นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าพื้นที่ของยีสต์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

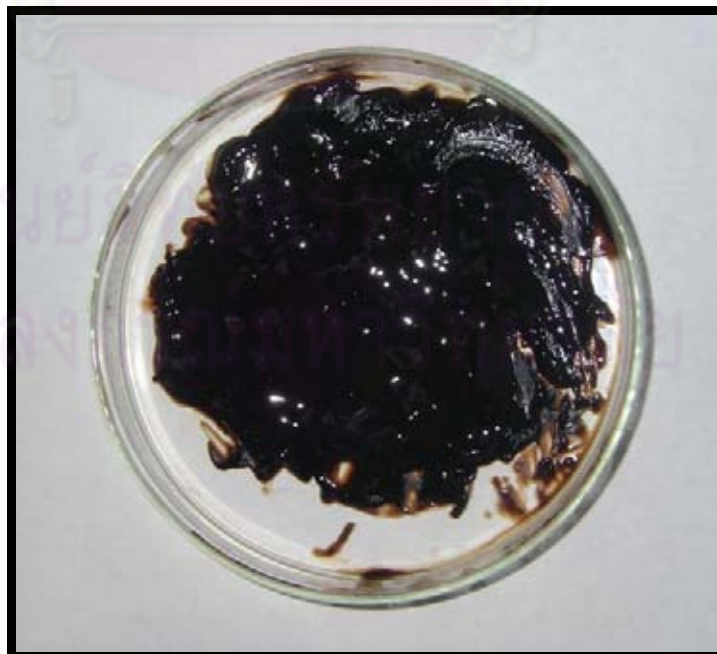
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ภาพเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในแหล่งอาหารชนิดต่างๆ



รูปที่ จ.1 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ จ.2 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำที่งมม่วงดองเค็มเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ ๑.3 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวานเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ ๑.4 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำนมเป็นเวลา 10 วัน

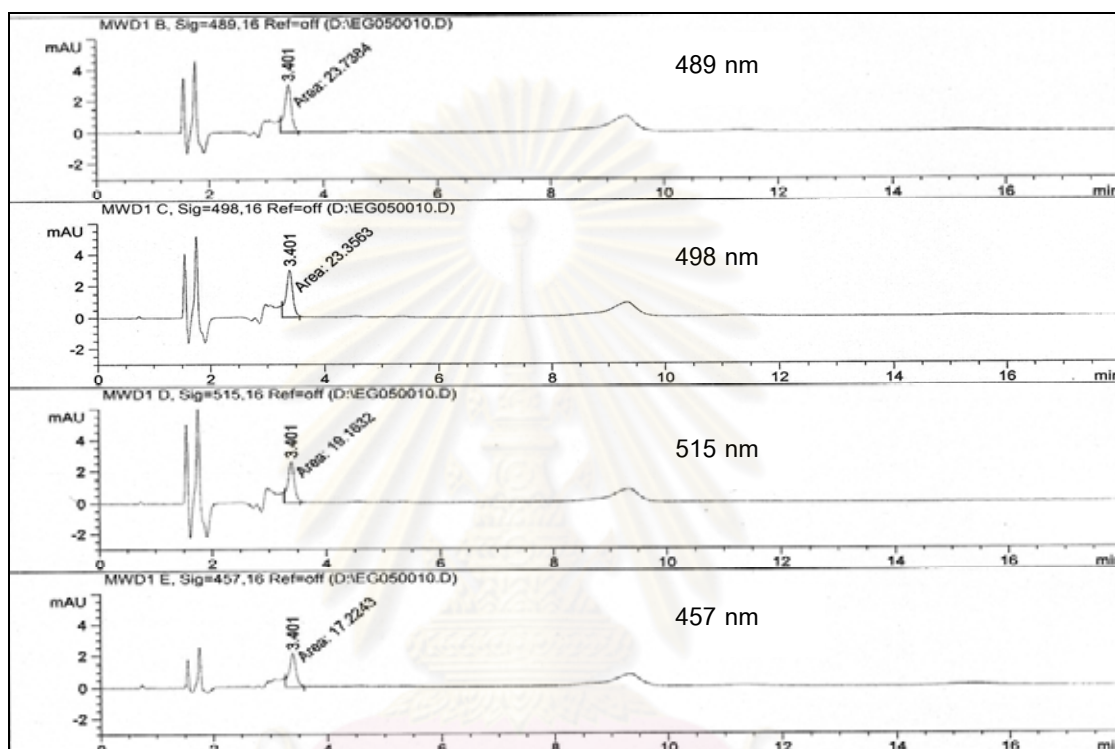


รูปที่ ๑.5 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจางเป็นเวลา 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

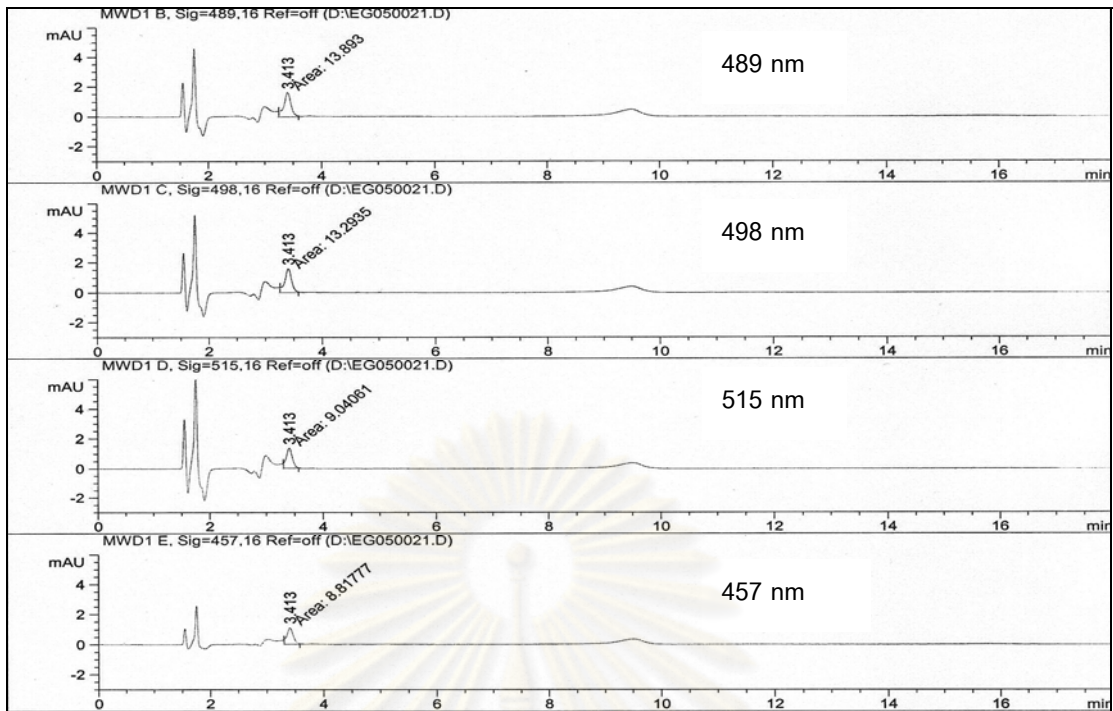
ภาคผนวก จ

โครมาโทแกรมของสารคาโรทีนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ที่สกัดจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยง
ในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ

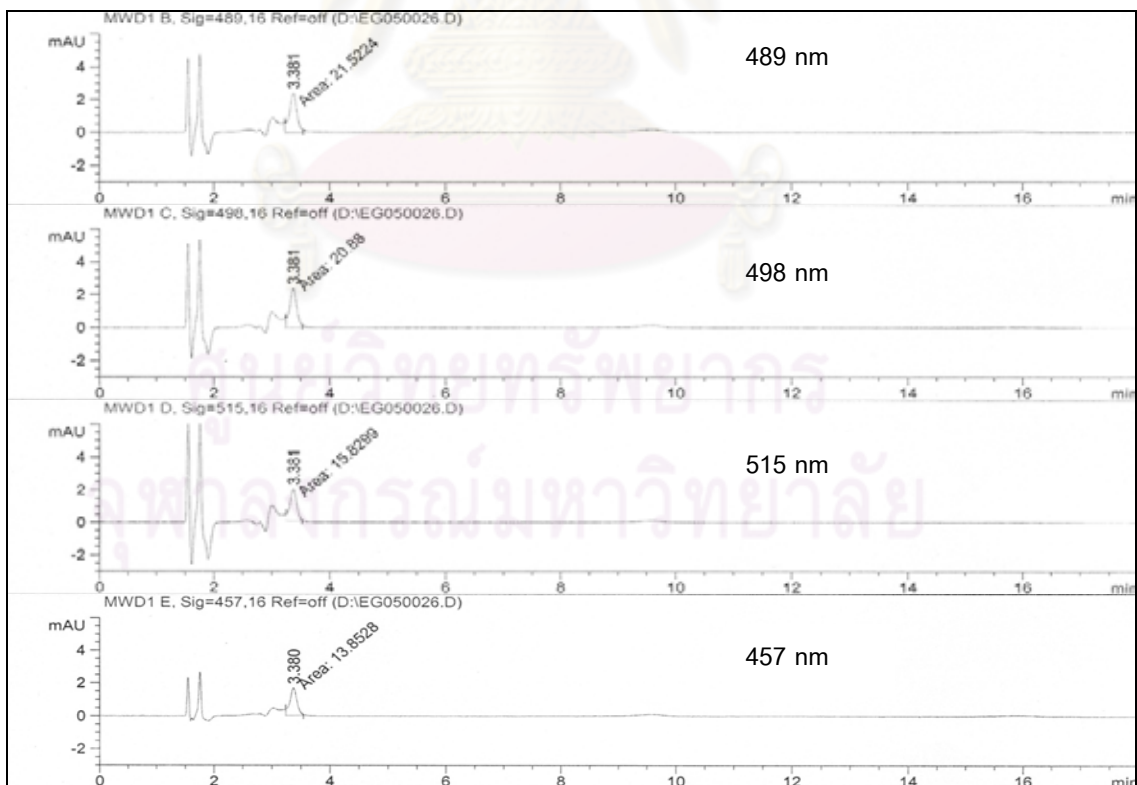


รูปที่ จ.1 โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้ง
มะม่วงดองเค็ม วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ

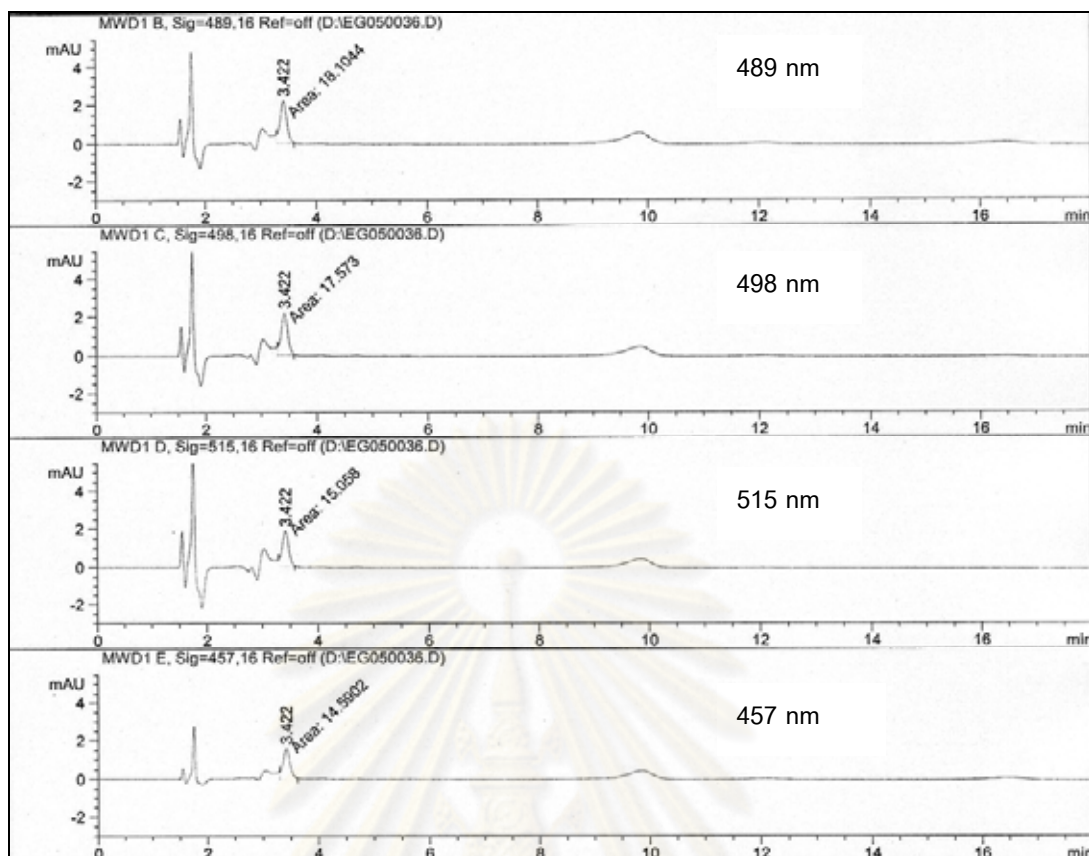
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ๑.2 โคโรนาโทแกรมของคาร์โบทีนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงคองหวาน วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ



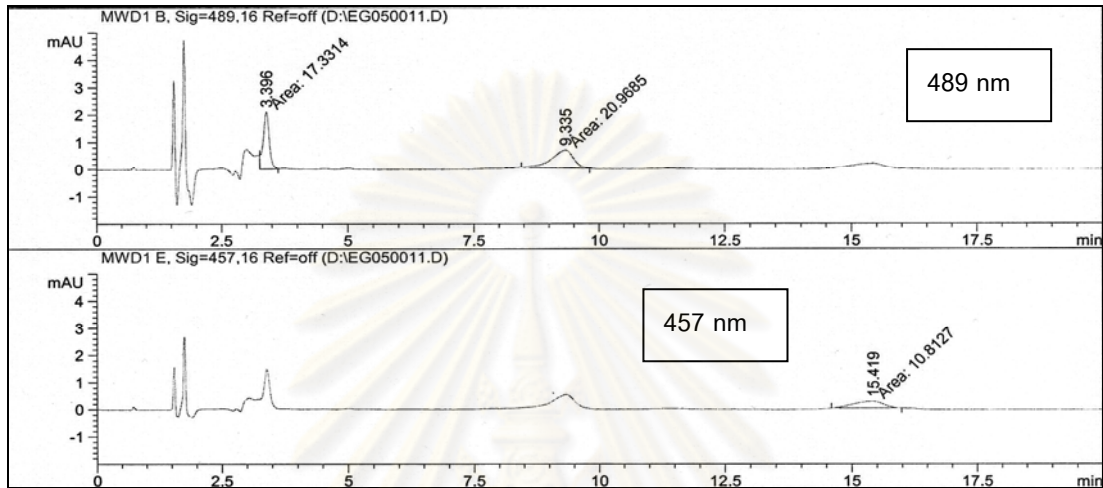
รูปที่ ๑.3 โคโรนาโทแกรมของคาร์โบทีนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งน้ำมัน วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ



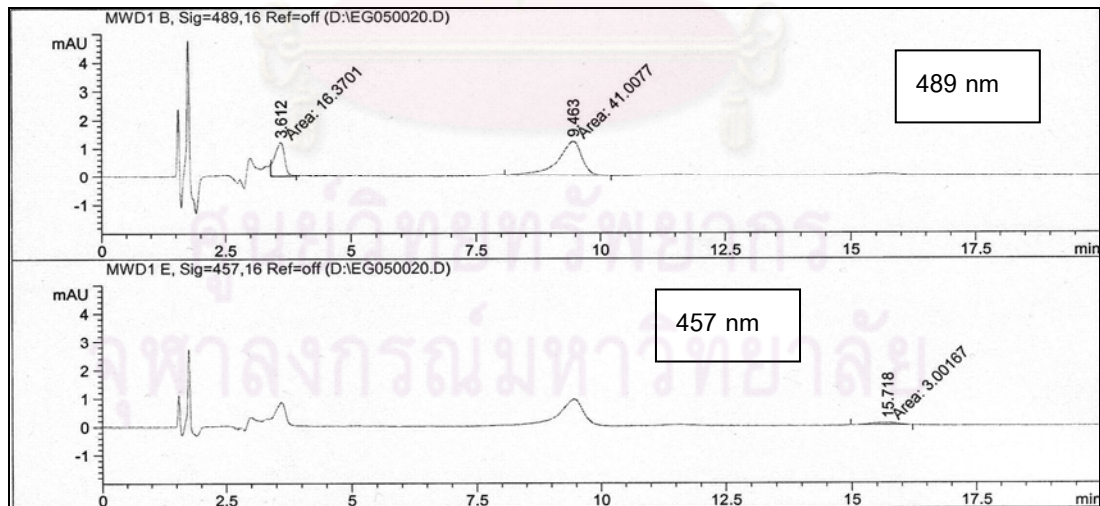
รูปที่ ๑.4 โครมาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ (โทรูลาโรดิน) ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิ เจือจาง วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ

ภาคผนวก ข

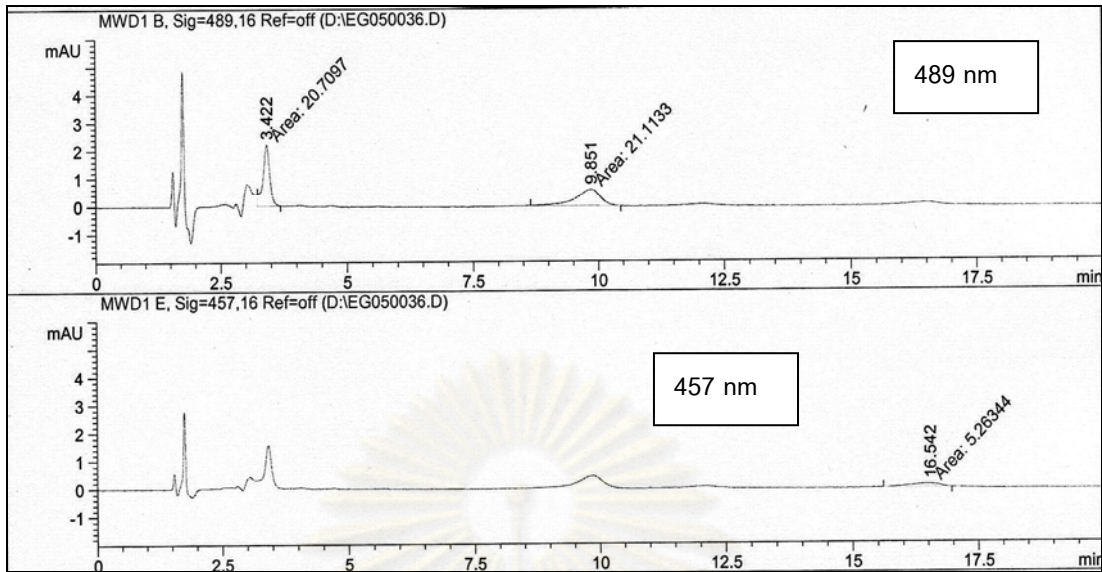
โครมาโทแกรมของคาร์ทีนอยด์ที่สกัดจากยีสต์ที่เพาะเลี้ยง
ในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน



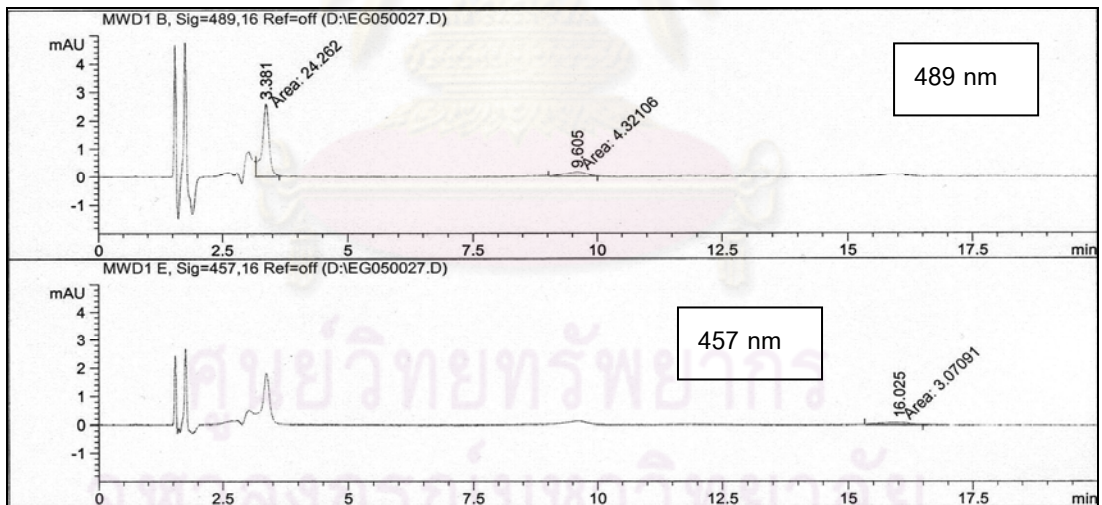
รูปที่ ข.1 โครมาโทแกรมของคาร์ทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม



รูปที่ ข.2 โครมาโทแกรมของคาร์ทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน



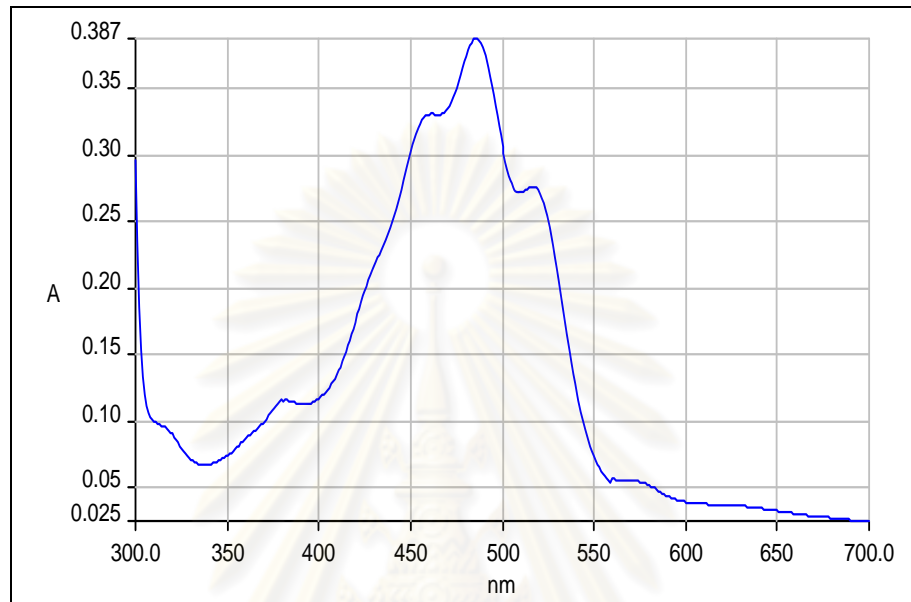
รูปที่ ๓.3 โคโรนาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกะทิเจือจาง



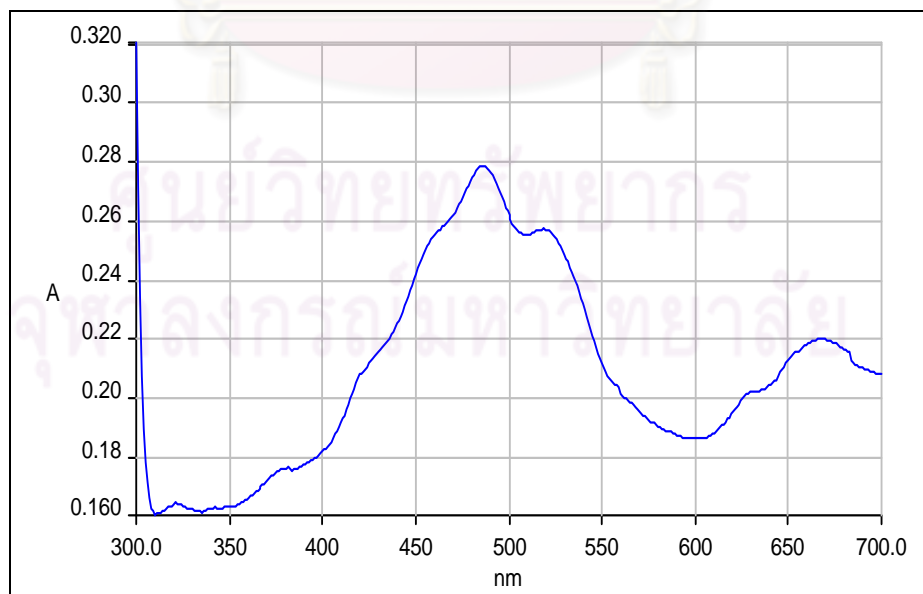
รูปที่ ๓.4 โคโรนาโทแกรมของคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิงน้ำนม

ภาคผนวก ซ

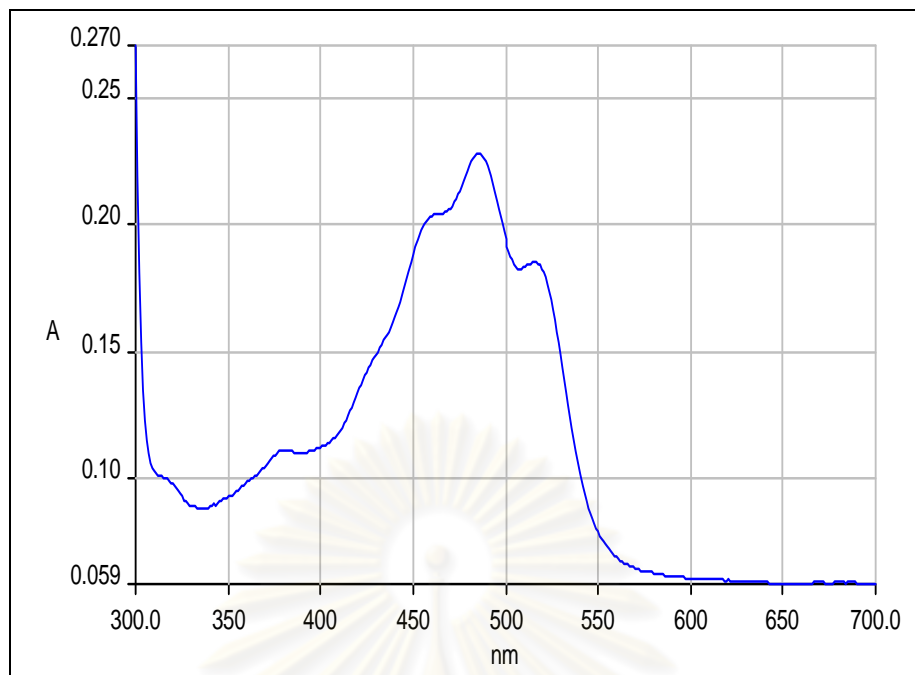
Absorption spectrum ของสารคาโรทีนอยด์ที่ได้จากเพาะเลี้ยง
ในน้ำทิ้งชนิดต่างๆ



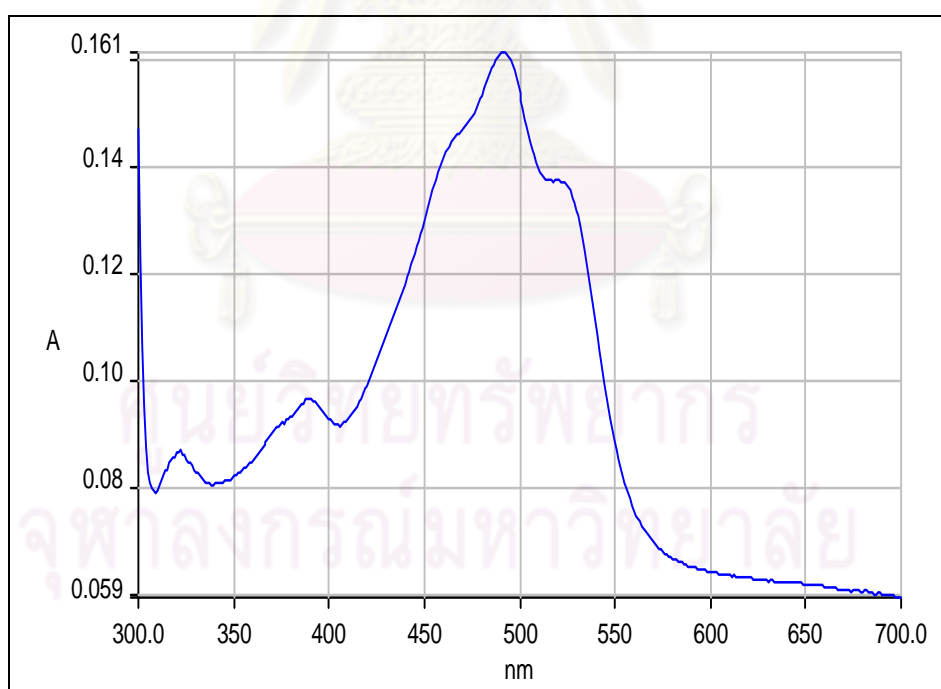
รูปที่ ซ.1 กราฟ absorption spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยง
เชื้อมาตรฐาน YM broth



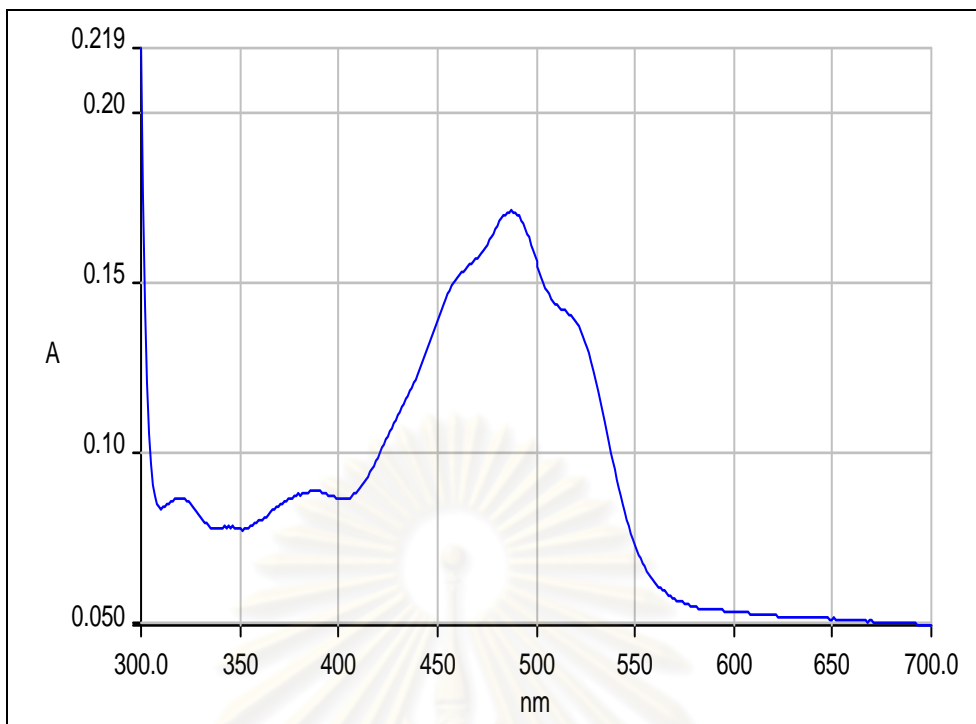
รูปที่ ซ.2 กราฟ absorption spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้ง
มะม่วงดองเค็ม



รูปที่ ๓.3 กราฟ absorbtion spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำที่มะม่วงดอกหวาน



รูปที่ ๓.4 กราฟ absorbtion spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำที่น้ำนม



รูปที่ ๗.5 กราฟ absorption spectrum ของคาโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำกะทิ
เจือจาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฅ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ฅ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของผลผลิตน้ำหนักรวมของเมล็ดพืชแห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำที่ม้าม่วงดองเค็ม ดองหวาน และน้ำนมที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร

แหล่งความแปรปรวน	df	น้ำที่ม้าม่วง	น้ำที่ม้าม่วง	น้ำที่น้ำนม
		ดองเค็ม	ดองหวาน	
น้ำหนักรวมของเมล็ดพืชแห้ง (กรัมต่อลิตร)	4	3.716*	14.279*	9.239*
error	5	0.135	0.102	0.011

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฅ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของผลผลิตน้ำหนักรวมของเมล็ดพืชแห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำที่น้ำกะทิที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร

แหล่งความแปรปรวน	df	น้ำกะทิเข้มข้น
น้ำหนักรวมของเมล็ดพืชแห้ง (กรัมต่อลิตร)	5	16.879*
error	6	0.062

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฅ.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัม ต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็มและดองหวาน ที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร

แหล่งความแปรปรวน	df	น้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม	น้ำทิ้งมะม่วงดองหวาน
ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)	4	894.789*	562.600*
error	5	6.835	1.535

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฅ.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัม ต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำกะทิที่ระดับการเจือจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร

แหล่งความแปรปรวน	df	น้ำกะทิเจือจาง
ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)	5	2037.200*
error	6	15.347

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฅ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณคาร์บอเนตรวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำนม และน้ำกะทิเชื้อจางสูตรคัดเลือกในวันที่ 6-12 ของการเพาะเลี้ยงที่ระดับการเชื้อจางต่างๆ ในช่วงคัดเลือกสูตร

แหล่งความแปรปรวน	df	น้ำทิ้งมะม่วง	น้ำทิ้งมะม่วง	น้ำทิ้งน้ำนม	น้ำกะทิเชื้อ
		ดองเค็ม	ดองหวาน		จาง
ปริมาณคาร์บอเนตรวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)	3	62.092*	330.439*	656.711*	597.572*
error	4	25.462	34.324	12.697	34.718

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฅ.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำนม น้ำกะทิเชื้อจาง และอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth

แหล่งความแปรปรวน	df	ความชื้น	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	โปรตีน	เถ้า
องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ (%)	4	27.631*	53.701*	22.630*	46.394*	5.315*
Error	5	0.021	14.601	0.222	8.712	0.013

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฅ.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของขนาดของเซลล์ยีสต์แสดงในค่าพื้นที่ผิวของยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งมะม่วงดองเค็ม ดองหวาน น้ำนม น้ำกะทิเจือจาง และอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth

แหล่งความแปรปรวน	df	น้ำทิ้ง
พื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์ (ตารางเมตร $\times 10^{-12}$)	4	6.250*
error	45	0.2940

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ฅ.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในน้ำทิ้งทั้ง 4 ชนิดและอาหารมาตรฐาน YM broth

แหล่งความแปรปรวน	df	น้ำทิ้ง
ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)	4	1166.661*
error	5	18.003

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิจิตรา สานพภา เกิดวันที่ 2 มกราคม 2527 ที่จังหวัดนครนายก สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตจากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย