

การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Central Composite Design (CCD) เพื่อการผลิต
แคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพดแบบการหมักแห้ง
Optimization Using Central Composite Design (CCD) for the Carotenoid Production from
Rhodotorula rubra MJU18 on Corn Dust by Solid State Fermentation

นัฐพร จันทร์ฉาย^{1*} อภิรติ เสี่ยงสืบชาติ¹ และศันสนีย์ บุญเกิด¹
Nuttaporn Chanchay^{1*} Apiradee Siangsuepchart¹ and Sunsanee Boonkerd¹

บทคัดย่อ

การศึกษากการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพดแบบการหมักแห้ง ในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพดเพื่อที่จะนำไปเป็นแหล่ง แคโรทีนอยด์ในอาหารสัตว์โดยที่อาหารสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตสัตว์เพื่อให้ได้การเจริญเติบโตที่ดี และผลผลิต ที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังเป็นการลดปริมาณของเสียจากทางเกษตร และลดปัญหามลพิษทางอากาศจากการ เผาไหม้ฝุ่น ข้าวโพดของเกษตรกรอีกด้วย โดยสภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก คือ ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 7 กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 0.1 กรัม (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ 0.01 กรัม (ปริมาตรต่อปริมาตร) และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโต ที่ 0.01 กรัม (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 18.79 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 22.60 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำ หนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยการ ออกแบบการทดสอบแบบ Central Composite Design (CCD) พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 15 กรัมต่อกิโลกรัม มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ ปริมาณ 2 กรัมต่อกิโลกรัม มีสารสกัดจากยีสต์เป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 2 กรัมต่อกิโลกรัม และ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเติบโตเท่ากับ 58.32 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 61.12 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง ดังนั้น จึงสามารถนำฝุ่นข้าวโพดที่หมักร่วมกับเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 ไปใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องศึกษาในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเป็นการลด ปัญหามอกคควัน และสามารถเพิ่มมูลค่าของเสียทางการเกษตรได้อีกด้วย

คำสำคัญ: แคโรทีนอยด์ *Rhodotorula rubra* MJU18 ฝุ่นข้าวโพด Central Composite Design (CCD)

Abstract

The study on the production of carotenoid from *Rhodotorula rubra* MJU18 yeast in dry fermented corn dust was aimed to produce carotenoid from *R. rubra* MJU18 yeast in corn dust. Carotenoids in animal feed is not only an important factor in the production of animals to get good growth and increased productivity, it also reduces the amount of agricultural waste air pollution from burn corn dust of farmers. The initial conditions used for fermentation were 50 percent humidity, 30 °C, pH 7, glucose as a carbon source at 0.1 grams (volume/volume) using ammonium sulphate as a nitrogen source at 0.01g. (volume/volume) and yeast extract was used as a growth promoter at 0.01 g. (volume/volume). The maximum carotenoid content in 96 hours of fermentation was 18.79 g/g corn dust. And the carotenoids content was

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อ.ร้องกวาง จ.แพร่ 54140

*Corresponding author, Email: nuttapornchanchay@gmail.com

22.60 $\mu\text{g/g}$ dry weight corn dust. From study of the optimal conditions for growth and carotene production by Central Composite Design (CCD), it was found that the optimum pH value was 5.5., glucose was the carbon source at 15 g/kg., ammonium sulphate was a nitrogen source at 2 g/kg., Yeast extract was a growth promoter at 2 g/kg. And temperature at 30 °C with a growth of 58.32 g/g corn dust. The amount of carotenoid was 61.12 $\mu\text{g/g}$ dry weight corn dust, so it can be used to ferment corn dust with *R. rubra* MJU18 yeast. However, it is necessary to study at the industrial level, to reduce the haze and to increase the value of agricultural waste.

Keywords: carotenoid, *Rhodotorula rubra* MJU18, corn dust, Central Composite Design (CCD)

คำนำ

ในปัจจุบันมีการเพาะปลูกข้าวโพดอาหารสัตว์เพิ่มขึ้นมากทุก ๆ ปี อันเนื่องมาจากการความต้องการของตลาดทางด้านอาหารสัตว์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทำให้มีปริมาณของฟางข้าวโพดที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำฟางข้าวโพดมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่าง ๆ แต่ส่วนใหญ่ถูกนำไปให้เป็นอาหารสัตว์ (มนัสนันท์ โรจนกมลสันต์ และคณะ, 2548)

อาหารสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตสัตว์เพื่อให้ได้การเจริญเติบโตที่ดี และผลผลิตที่เพิ่มขึ้น โดยเป็นแหล่งโภชนะที่สัตว์จะนำไปใช้ ซึ่งอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ในปัจจุบันได้มีการผสมแคโรทีนอยด์ในอาหาร เช่น อาหารไก่ และอาหารปลา เป็นต้น เพื่อเป็นการเพิ่มสีของเนื้อหรือไข่แดงให้สัตว์ที่เพิ่มขึ้น และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค แต่ปัญหาการใช้แคโรทีนอยด์ในปัจจุบัน คือ ใช้แคโรทีนอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์จากทางเคมี ซึ่งมีราคาแพง เนื่องจากนำเข้าจากต่างประเทศทำให้แคโรทีนอยด์จากธรรมชาติมีความสำคัญ และได้รับความต้องการในปริมาณที่สูง การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแคโรทีนอยด์ได้นั้นคือ เชื้อยีสต์ *Rhodotorula rubra* ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารสีแคโรทีนอยด์โดยสามารถนำไปใช้ทดแทนสารสังเคราะห์จากทางเคมีได้ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

ดังนั้น การใช้ฟางข้าวโพดผสมแคโรทีนอยด์ที่ได้จากยีสต์ *R. rubra* MJU18 ไปเป็นอาหารสัตว์โดยตรงสามารถลดปัญหาของค่าใช้จ่ายในด้านอาหารที่สูงได้ สามารถเพิ่มคุณค่าโภชนาการของฟางข้าวโพด และลดปัญหาหมอกพิษทางอากาศจากการเผาไหม้ฟางข้าวโพดของเกษตรกรอีกด้วย เป็นอีกหนึ่งทางเลือกของการเพาะเลี้ยงสัตว์ที่เกษตรกรควรหันมาใส่ใจมากขึ้น และยังเป็นการนำเอาของเสียทางการเกษตรมาใช้ให้เป็นประโยชน์ แต่การผลิต แคโรทีนอยด์นั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยจำนวนมาก จึงได้ทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธี central composite design ; CCD ซึ่งเป็นการออกแบบที่สามารถระบุปัจจัยที่ใช้ในการทดลองได้หลายปัจจัย และยังเป็นการออกแบบที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถืออีกด้วย (Vazquez, 2001)

การศึกษานี้มุ่งเน้นการใช้ฟางข้าวโพดให้เกิดประโยชน์โดยใช้เป็นสารอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MJU18 เพื่อเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ ด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD และเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18

เตรียมเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 จากห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ โดยทำการเลี้ยงลงในสูตรอาหารมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 10 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 กรัม KH_2PO_4 2 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม Yeast extract 1 กรัม ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.5 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และนำมาเลี้ยงเชื้อ *R. rubra* MJU18 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การศึกษาระยะเวลาการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU18

ศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด ทำการหมักเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด โดยเปิดเชื้อ 10^6 เซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และใส่ในอาหารผืนข้าวโพด 10 กรัม คลุกให้เข้ากัน (ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์; ผืนข้าวโพด 10 กรัม ในน้ำ 30 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 110 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 0, 24, 48, 72, 96 และ 110 ชั่วโมง จากนั้น วิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักของผืนข้าวโพดทั้งก่อนหมัก และหลังจากการหมัก เพื่อหาน้ำหนักของเซลล์ที่ยีสต์เติบโต และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้นโดยทำตามวิธี Foss *et al.* (1984) ทดลอง 3 ซ้ำ และเลือกระยะเวลาที่ดีที่สุดทำการศึกษาต่อในเรื่องเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

การศึกษาความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด โดยให้ความชื้นของผืนข้าวโพดเริ่มต้นเท่ากับ 40, 45, 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากข้อ 2. เก็บตัวอย่างเพื่อไปวิเคราะห์การเจริญเติบโต โดยการชั่งน้ำหนักของผืนข้าวโพดทั้งก่อนหมัก และหลังจากการหมัก เพื่อหาน้ำหนักของเซลล์ที่ยีสต์เติบโต และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้นโดยทำตามวิธี Foss *et al.* (1984) ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเลือกความชื้นที่ดีที่สุดเพื่อทำการศึกษาต่อในเรื่องปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. rubra* MJU18

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลูโคส และ ซูโครส ที่ปริมาณ 0.1 กรัม เลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากข้อ 2. และเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เหมาะสมจากข้อ 3. เก็บตัวอย่างเพื่อไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักของผืนข้าวโพดทั้งก่อนหมัก และหลังจากการหมัก เพื่อหาน้ำหนักของเซลล์ที่ยีสต์เติบโต และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้นโดยทำตามวิธี Foss *et al.* (1984) ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเลือกแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเพื่อทำการศึกษาต่อในเรื่องปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. rubra* MJU18

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด โดยเปรียบเทียบระหว่าง แอมโมเนียมซัลเฟต และ แอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ปริมาณ 0.01 กรัม เลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากข้อ 2. เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เหมาะสมจากข้อ 3. และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4. เก็บตัวอย่างเพื่อไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักของผืนข้าวโพดทั้งก่อนหมัก และหลังจากการหมัก เพื่อหาน้ำหนักของเซลล์ที่ยีสต์เติบโต และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้นโดยทำตามวิธี Foss *et al.* (1984) ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดเพื่อทำการศึกษาต่อในเรื่องแหล่งปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. rubra* MJU18

การศึกษาแหล่งปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด

การศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนผืนข้าวโพด โดยเปรียบเทียบระหว่าง สารสกัดจากยีสต์ และ เปปโตน ที่ปริมาณ 0.01 กรัม เลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากข้อ 2. เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เหมาะสมจากข้อ 3. แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4. และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 5. เก็บตัวอย่างเพื่อไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักของผืนข้าวโพดทั้งก่อนหมัก และหลังจากการหมัก เพื่อหาน้ำหนักของเซลล์ที่ยีสต์เติบโต และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้นโดยทำตามวิธี Foss *et al.* (1984) ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ experimental design เวอร์ชัน 6.0.2 ในการออกแบบการทดลองแบบ central composite design (CCD) และนำเสนอผลการทดลองด้วยวิธี response surface methodology (RSM) โดยมีค่าตอบสนอง (response : Y) ได้แก่ น้ำหนักเซลล์ (การเจริญเติบโต) ; Y1 และปริมาณแคโรทีนอยด์ ; Y2 ปัจจัยตัวแปรอิสระ (Factor of independent variable : A, B, C, D and E) ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโต (growth factor) และอุณหภูมิ (Temperature) โดยศึกษาปัจจัยตัวแปรอิสระ 5 ระดับ ได้แก่ ปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโต ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ (Table 1) ได้ออกแบบการทดลองทั้งหมด 47 ชุด การทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) เพื่อหาน้ำหนักของเซลล์ที่เจริญเติบโต และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เริ่มต้น โดยทำตามวิธี Foss *et al.* (1984) และนำไปทดสอบการยืนยันผลทางสถิติ

Table 1 Factors of food sources, pH and temperature.

	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
C-source (g/l) ; C	3.1	10	15	20	26.9
N-source (g/l) ; N	0.81	1.5	2	2.5	3.19
Growth factor (g/l) ; GF	0.81	1.5	2	2.5	3.19
pH	4.31	5.0	5.5	6.0	6.69
Temperature ; T	22.86	27	30	33	37.14

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด

จากการศึกษาโดยทำการหมัก *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด เป็นเวลา 110 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง ทุก ๆ 0, 24, 48, 72, 96 และ 110 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์

Table 2 Study on growth and carotenoid content of *R. rubra* MJU18 yeast on corn dust.

Time (h)	Cell dry weight (g/g corn dust)	Carotenoid ($\mu\text{g/g}$ dry weight corn dust)
0	0.00 $\pm$ 0.00f	2.46 $\pm$ 0.20f
24	0.57 $\pm$ 0.01e	3.21 $\pm$ 0.01e
48	1.23 $\pm$ 0.02c	5.52 $\pm$ 0.01c
72	2.52 $\pm$ 0.01b	5.84 $\pm$ 0.00b
96	3.02 $\pm$ 0.01a	7.01 $\pm$ 0.00a
110	1.10 $\pm$ 0.01d	4.54 $\pm$ 0.00d

Means in the same vertical column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

จากการศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด (Table 2) พบว่าที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ยีสต์มีความสามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 3.02 กรัม/กรัม ฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 7.01 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง รองลงมา คือ ชั่วโมง 72 และ 48 มีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 2.52 และ 1.23 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด ตามลำดับ และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 5.84 และ 5.52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ณัฐพร จันทรฉาย และชาณณรงค์ สุขชา(2554) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ *R. rubra* พบว่า ระยะเวลาที่เชื้อยีสต์เจริญเติบโต ได้ดี คือ 96 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 95.586 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และต่างจากการศึกษาของ ณัฐพร จันทรฉาย และคันศนีย์ บุญเกิด (2559) พบว่าการเลี้ยงยีสต์ในฝุ่นข้าวโพดที่ 48 ชั่วโมงมีอัตราการเจริญและสามารถผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดอาจเนื่องมาจากใช้ยีสต์คนละไอโซเลตกัน

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด

จากการศึกษาได้ให้ความชื้นในฝุ่นข้าวโพดร้อยละ 40, 45, 50, 55 และ 60 โดยทำการเลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากข้อ 1. แล้วทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์

Table 3 Effect of moisture content and carotenoid content of *R. rubra* MJU18 yeast on corn dust.

Moisture (%)	Cell dry weight (g/g corn dust)	Carotenoid (µg/g dry weight corn dust)
40	0.71±0.01e	3.55±0.00e
45	0.93±0.00d	3.97±0.00d
50	2.84±0.00a	6.57±0.00a
55	2.31±0.01b	5.67±0.00b
60	1.97±0.00c	4.52±0.01c

Means in the same vertical column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

จากการศึกษาร้อยละความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด (Table 3) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ร้อยละ 50 ยีสต์มีความสามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 2.84 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 6.57 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง รองลงมา คือ ความชื้นที่ร้อยละ 55 และ ร้อยละ 60 มีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 2.31 และ 1.97 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด ตามลำดับ และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 5.67 และ 4.52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ มนัสนันท์ วัฒนกุลสันต์และคณะ (2548) ที่ทำการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *R. glutinis* DM28 บนรำข้าวแบบการหมักแห้งเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์โดยทำการหมักที่สภาวะความชื้นเริ่มต้น 49.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์มีปริมาณสูงสุดโดยมีปริมาณเซลล์ 54.0 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว และแคโรทีนอยด์ปริมาณ 1.65 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด

จากการศึกษาได้เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนระหว่างกลูโคส และ ซูโครส ที่ปริมาณ 0.1 กรัมต่ออาหาร

ฝุ่นข้าวโพด 1 กรัม โดยทำการเลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 1. และร้อยละความชื้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2. แล้วทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์

Table 4 Effect of suitable carbon sources and carotenoid content of *R. rubra* MJU18 yeast on corn dust.

Carbon source (0.1 g/g corn dust)	Cell dry weight (g/g corn dust)	Carotenoid (µg/g dry weight corn dust)
Glucose	8.96±0.018a	13.00±0.013a
Sucrose	5.43±0.003b	9.19±0.005b

Means in the same vertical column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด (Table 4) พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์มีความสามารถเจริญเติบโตได้สูง โดยมีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 8.96 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 13 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง โดยที่ชูโครสมีน้ำหนักเซลล์เพียง 5.43 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 9.19 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุมาลี สุขเกียรติ (2552) ได้ทำการศึกษาศักยภาพการเจริญของยีสต์ *R. rubra* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน คือ ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 0.0685 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด

จากการศึกษาได้เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ปริมาณ 0.01 กรัมต่ออาหารฝุ่นข้าวโพด 1 กรัม โดยทำการเลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 1. ร้อยละความชื้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2. และแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3. แล้วทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์

Table 5 Effect of suitable nitrogen sources and carotenoid content of *R. rubra* MJU18 yeast on corn dust.

Nitrogen source (0.01 g/g corn dust)	Cell dry weight (g/g corn dust)	Carotenoid (µg/g dry weight corn dust)
Ammonium sulphate	13.75±0.002a	17.40±0.077a
Ammonium chloride	10.76±0.004b	14.44±0.003b

Means in the same vertical column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด (Table 5) พบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์มีความสามารถเจริญเติบโตได้สูง โดยมีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 13.75 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 17.40 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง โดยที่แอมโมเนียมคลอไรด์มีน้ำหนักเซลล์เพียง 10.76 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 14.44 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanchay (2013) ทำการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมในการเจริญของ *R. rubra* โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็น

แหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากถึง 30.39 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การศึกษาปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด

จากการศึกษาได้เปรียบเทียบปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตระหว่าง สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตเน ที่ปริมาณ 0.01 กรัมต่ออาหารฝุ่นข้าวโพด 1 กรัม โดยทำการเลี้ยงในชั่วโมงที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 1. ร้อยละความชื้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2. แหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้อ 3. และแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดลองข้อ 4. แล้วทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์

Table 6 Effect of appropriate growth promoters and carotenoid content of *R. rubra* MJU18 on corn dust.

Growth promoters source	Cell dry weight (g/g corn dust)	Carotenoid (µg/g dry weight corn dust)
Yeast extract	18.79±0.016a	22.60±0.005a
Peptone	16.24±0.043b	20.09±0.004b

Means in the same vertical column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

จากการศึกษาปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด (Table 6) พบว่า เมื่อใช้แหล่งปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตเป็นสารสกัดจากยีสต์ *R. rubra* MJU18 มีความสามารถเจริญเติบโตได้สูง โดยมีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 18.79 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 22.60 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง โดยที่เปปโตเนมีน้ำหนักเซลล์เพียง 16.24 กรัม/กรัมฝุ่นข้าวโพด และปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 20.09 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฝุ่นข้าวโพดแห้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanchay (2013) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *R. rubra* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตทำให้เชื้อสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณมากถึง 30.39 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฝุ่นข้าวโพด โดยการออกแบบการทดลองแบบ central composite design (CCD) วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์ (การเจริญเติบโต) และปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยมีปัจจัย 5 ปัจจัย ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโต (growth factor) และอุณหภูมิ (temperature) ได้ผลดัง Table 7

Table 7 The optimal condition for carotenoid production and dry weight by *R. rubra* MJU18 using CCD.

Treat.	pH (A)	Carbon source (B)	Nitrogen source (C)	Growth promoter source (D)	Temp. (E)	Carotenoid ($\mu\text{g/g}$ dry weight corn dust) (Y1)	Cell dry weight (g/g corn dust) (Y1)
1	5	10	1.5	1.5	27	48.84	43.24
2	6	10	1.5	1.5	27	57.83	53.16
3	5	20	1.5	1.5	27	41.76	37.32
4	6	20	1.5	1.5	27	31.77	28.76
5	5	10	2.5	1.5	27	18.28	15.13
6	6	10	2.5	1.5	27	30.03	26.45
7	5	20	2.5	1.5	27	29.03	25.68
8	6	20	2.5	1.5	27	22.40	19.36
9	5	10	1.5	2.5	27	41.54	38.25
10	6	10	1.5	2.5	27	32.29	30.51
11	5	20	1.5	2.5	27	51.43	57.23
12	6	20	1.5	2.5	27	40.28	36.72
13	5	10	2.5	2.5	27	48.07	44.16
14	6	10	2.5	2.5	27	29.15	26.48
15	5	20	2.5	2.5	27	43.73	40.08
16	6	20	2.5	2.5	27	32.91	29.30
17	5	10	1.5	1.5	33	24.90	22.18
18	6	10	1.5	1.5	33	22.83	18.90
19	5	20	1.5	1.5	33	26.43	23.55
20	6	20	1.5	1.5	33	18.03	14.02
21	5	10	2.5	1.5	33	30.13	26.87
22	6	10	2.5	1.5	33	29.99	26.68
23	5	20	2.5	1.5	33	25.15	22.10
24	6	20	2.5	1.5	33	34.72	31.89
25	5	10	1.5	2.5	33	30.51	27.66
26	6	10	1.5	2.5	33	23.29	20.44
27	5	20	1.5	2.5	33	51.38	47.16
28	6	20	1.5	2.5	33	28.14	25.57
29	5	10	2.5	2.5	33	31.09	26.42
30	6	10	2.5	2.5	33	29.43	25.19
31	5	20	2.5	2.5	33	32.42	28.11
32	6	20	2.5	2.5	33	32.16	29.50
33	4.3	15	2	2	30	46.55	42.34
34	6.69	15	2	2	30	19.31	15.82
35	5.5	3.1	2	2	30	14.75	11.40
36	5.5	26.9	2	2	30	14.17	11.79
37	5.5	15	0.81	2	30	14.56	12.12
38	5.5	15	0.81	2	30	16.51	13.79
39	5.5	15	2	0.81	30	21.31	17.06
40	5.5	15	2	0.81	30	28.83	25.23
41	5.5	15	2	2	22.86	23.52	20.38
42	5.5	15	2	2	37.14	49.19	46.29
43	5.5	15	2	2	30	59.59	56.88
44	5.5	15	2	2	30	60.15	56.37
45	5.5	15	2	2	30	62.53	59.22
46	5.5	15	2	2	30	59.47	57.09
47	5.5	15	2	2	30	59.21	57.42

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (A), แหล่งคาร์บอน (B) แหล่งไนโตรเจน (C) ปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโต (D) และอุณหภูมิ (E) แสดงดังในสมการ Y1

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (A), แหล่งคาร์บอน (B) แหล่งไนโตรเจน (C) ปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโต (D) และอุณหภูมิ (E) แสดงดังในสมการ Y2

Final Equation in Terms of Coded Factors :

$$Y1 = 62.12 - 3.33A + 0.28B - 1.57C + 2.39D - 1.56E - 4.36A^2 - 7.63B^2 - 7.44C^2 - 5.75D^2 - 3.75E^2 - 1.33AB + 1.41AC - 2.68AD + 0.39AE - 0.026BC + 2.52BD + 1.22BE + 1.02CD + 3.49CE + 0.21DE ; R^2 = 0.7689$$

$$Y2 = 58.32 - 3.33A + 0.59B - 1.78C + 2.70D - 1.71E - 4.55A^2 - 7.64B^2 - 7.40C^2 - 5.95D^2 - 3.79E^2 - 1.56AB + 1.71AC - 2.77AD + 0.58AE - 0.23BC + 2.64BD + 0.95BE + 0.40CD + 3.62CE - 0.31DE ; R^2 = 0.7780$$

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฟืนข้าวโพดแบบการหมักแห้ง โดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฟืนข้าวโพด พบว่ามีการเจริญเติบโตสูงที่สุดที่ช่วงโมที่ 96 มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 7.01 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักฟืนข้าวโพดแห้ง และปริมาณน้ำหนักเซลล์ 3.02 กรัม/กรัมฟืนข้าวโพด

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฟืนข้าวโพด พบว่า ที่ระดับความชื้นที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 0.1 กรัม ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 0.01 กรัม และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 0.01 กรัมต่ออาหารฟืนข้าวโพด 1 กรัม ทำให้เชื่อมีการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 22.60 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักฟืนข้าวโพดแห้ง และปริมาณเซลล์เท่ากับ 18.79 กรัม/กรัมฟืนข้าวโพด

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฟืนข้าวโพด โดยการออกแบบการทดสอบแบบ central composite design (CCD) พบว่า เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 15 กรัมต่อกิโลกรัม แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 2 กรัมต่อกิโลกรัม สารสกัดจากยีสต์ที่ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิกับ 30 องศาเซลเซียส เชื่อสามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุด มีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 61.12 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักฟืนข้าวโพดแห้ง และปริมาณเซลล์เท่ากับ 58.32 กรัม/กรัมฟืนข้าวโพด

จากการทดสอบแบบ central composite design (CCD) จะได้สมการที่แสดงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ (Y1) มีผลต่อการเจริญเติบโต (Y2)

$$Y1 = 62.12 - 3.33A + 0.28B - 1.57C + 2.39D - 1.56E - 4.36A^2 - 7.63B^2 - 7.44C^2 - 5.75D^2 - 3.75E^2 - 1.33AB + 1.41AC - 2.68AD + 0.39AE - 0.026BC + 2.52BD + 1.22BE + 1.02CD + 3.49CE + 0.21DE ; R^2 = 0.7689$$

$$Y2 = 58.32 - 3.33A + 0.59B - 1.78C + 2.70D - 1.71E - 4.55A^2 - 7.64B^2 - 7.40C^2 - 5.95D^2 - 3.79E^2 - 1.56AB + 1.71AC - 2.77AD + 0.58AE - 0.23BC + 2.64BD + 0.95BE + 0.40CD + 3.62CE - 0.31DE ; R^2 = 0.7780$$

จากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถผลิตแคโรทีนอยด์จากการหมักเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 บนฟืนข้าวโพดแบบการหมักแห้งได้ ซึ่งเป็นการพัฒนาระบบการผลิตอาหารสัตว์จากของเสียทางการเกษตรกับเชื้อจุลินทรีย์ และนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *R. rubra* MJU18 เพื่อสร้างสารสีแคโรทีนอยด์เพื่อนำ ฟืนข้าวโพดที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้เลย อีกทั้งยังเป็นการพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- มนัสนันท์ วิจารณ์กลสันต์ ชาลี มะลิซ้อน และวรพจน์ สุนทรสุข. 2548. การผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula glutinis* DM28 บนรำข้าวแบบการหมักแห้ง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ส่วติรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลาย และเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณัฐพร จันทรฉาย และชาญณรงค์ สุขชา. 2554. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ (*Rhodotorula rubra*). ใน การประชุมวิชาการแม่โจ้วัยครั้งที่ 1.
- ณัฐพร จันทรฉาย และคันศนี บุญเกิด. 2559. การผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU11 บนฟ่อนข้าวโพดแบบการหมักแห้ง. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 34(2): 122-132.
- สุมาลี สุขเกียรติ. 2552. สภาวะที่เหมาะสมบางประการสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula rubra*. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ.
- Chanchay, N. 2013. Optimal condition for growth of *Rhodotorula rubra* and antioxidation characteristics of its carotenoid. Biotechnology. PhD. Thesis. : Chiang Mai University.
- Foss, P. Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen, J., Austreg, E. and Steriff, K. 1984. Carotenoids in diets for salmonids I : pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture* 41 : 213-226.
- Vazquez, M. 2001. Effect of the Light on Carotenoid Profiles of *Xanthophyllom* *aces dendrorhous* Strains (Formerly *Phaffia rhodozyma*). *Food technol. Biotechnol* 39 : 123-128.