

BA02: การเพิ่มความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยนิวตรอนร่วมกับอัลตราไวโอเลต

¹วชิราภรณ์ ผิวล่อง¹ และจิตติมา บ้างวิรุฬห์รักษ์²

¹กลุ่มวิจัยและพัฒนานิวเคลียร์ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)

16 ถ.วิภาวดีรังสิต แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

โทรศัพท์ 0 2596 7600 ต่อ 2120 โทรสาร 0 2562 0121 E-Mail: wachiraporn03@yahoo.com

²สำนักกำกับดูแลความปลอดภัยจากพลังงานปรมาณู สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ

16 ถ.วิภาวดีรังสิต แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

โทรศัพท์ 0 2596 7600 ต่อ 2121 โทรสาร 0 2562 0116 E-Mail: JITTI_SAMA@yahoo.com

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาการชักนำ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 ให้กลายพันธุ์ด้วยการอาบนิวตรอนร่วมกับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ โดยนำ *X. dendrorhous* มาอาบนิวตรอนที่นิวตรอนฟลักซ์ 10^{10} นิวตรอนต่อตารางเซนติเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาเลี้ยงบน yeast malt extract agar ที่ 22°C. เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตความเข้ม 470 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ระยะห่าง 10 นิ้ว เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบลักษณะการเจริญและคัดเลือกเชื้อบน yeast malt extract agar ที่ผสมด้วย β -ionone พบว่าสามารถเก็บเชื้อได้ 941 ไอโซเลทบนอาหารคัดเลือก และเมื่อนำไปหาค่าความเสถียรของเชื้อใน 5 รุ่น สามารถคัดเลือกเชื้อได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท คือ NU-195 NU-252 NU-525 NU-534 และ NU-742 เมื่อนำเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบคุณสมบัติในการผลิตสารแคโรทีนอยด์โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว yeast malt extract ที่อุณหภูมิ 22°C. เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาสกัดด้วยอะซิโตนและปิโตรเลียมอีเทอร์เพื่อหาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 474 นาโนเมตร พบว่า NU-252 เป็นสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดเท่ากับ 106.49 ไมโครกรัมต่อยีสต์ 1 กรัม ซึ่งสามารถผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.65 เท่า

คำสำคัญ: กลายพันธุ์ แคโรทีนอยด์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* นิวตรอน-อัลตราไวโอเลต

Increasing the Carotenoid Content of *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a Neutron-Ultraviolet Combination Treatment

*Wachiraporn Pewlong¹ and Jittima Bangwirunruk²

¹Research and Development Division, Thailand Institute of Nuclear Technology

(Public Organization) 16 Vibhavadi Rungsit Road, Chatuchak, Bangkok 10900.

Phone: 0 22596 7600 ext 2120, Fax: 0 2562 0121, E-Mail: wachiraporn03@yahoo.com

²Bureau of Technical Support for Safety Regulation, Office of Atoms for Peace

16 Vibhavadi Rungsit Road, Chatuchak, Bangkok 10900.

Phone: 0 22596 7600 ext 2121, Fax : 0 2562 0116, E-Mail : JITTI_SAMA@yahoo.com

Abstract

Improvement of carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 by induced mutation with neutron rays combining with ultraviolet light was studied. *Xanthophyllomyces dendrorhous* was treated with neutron rays (10^{10} neutrons/cm²/sec) for 1 minute and incubated on yeast malt extract agar at 22°C for 3 days. The colonies were re-treated with ultraviolet radiation (470 μw/cm²) at the distance of 10 inches, for 3 minutes. 941 isolates were obtained following growth on selective medium supplemented with β-ionone, and their stability was tested for 5 generations. There were only 5 highly-producing mutants, namely NU-195, NU-52, NU-525, NU-534 and NU-742. These mutants were tested for carotenoids production in yeast malt extract broth at 22°C for 5 days. The cultures were extracted with acetone and petroleum ether. Total carotenoid contents in the petroleum ether extracts were determined by absorbance measurement at 474 nm. Analyses of five generations indicated that NU-252 produced the highest amount of total carotenoid, 106.49 μg/g of yeast, which was 1.65 times that of the wild type.

Keywords: mutation, carotenoid, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, neutron, ultraviolet

1.บทนำ

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีการนำไปใช้ประโยชน์หลาย ๆ ด้าน ทั้งในรูปสารสี วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระ โดยนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น อุตสาหกรรมสำคัญที่ต้องใช้แคโรทีนอยด์มากที่สุด คือ อุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารปรุงแต่งสีอาหารเพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการจูงใจผู้บริโภคในการซื้ออาหารนั้น ๆ¹ สำหรับในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ประเภทสัตว์ปีก

และสัตว์น้ำ เช่น ไก่ เป็ด กุ้ง ปลา กุ้งน้ำแคโรทีนอยด์มาผสมกับอาหารเพื่อเพิ่มสีของไข่แดง และสีของเนื้อสัตว์² ในปัจจุบันแคโรทีนอยด์ที่ใช้กันอยู่มีทั้งผลิตจากธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* หรือสาหร่าย *Haematococcus* spp. และจากการสังเคราะห์ ขึ้นทางเคมี ซึ่งแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีมีความคงตัวต่ำและราคาแพง³ ดังนั้น ความต้องการใช้แคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากธรรมชาติจึงมีเพิ่มมากขึ้นแต่การผลิตยังไม่เพียงพอต่อ ความต้องการ

การกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตสามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติ หรือจากการชักนำให้เกิดขึ้น โดยการใส่สารเคมีหรือรังสี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจีโนม⁴ ซึ่งได้ลักษณะใหม่ที่ดีขึ้น หรือเลวลงก็ได้ การกลายพันธุ์โดยธรรมชาติมีโอกาสดังกล่าวได้น้อยมาก ดังนั้นจึงต้องมีการชัก นำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและเป็นการเพิ่มความถี่ของการกลายพันธุ์ การชักนำให้กลายพันธุ์นั้นถ้าต้องการให้ประสบความสำเร็จยิ่งขึ้นและได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มี ประสิทธิภาพสูงขึ้นนั้นมักจะใช้วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มากกว่า 1 วิธี หรือเรียกว่า การชักนำให้เกิดการกลายซ้ำ (repeated mutation)⁴

งานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งที่จะทำการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการอาบนิวตรอนร่วมกับการฉายรังสี อัลตราไวโอเล็ต ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มความสามารถในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ให้ สูงยิ่งขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์

- 2.1 เครื่องปฏิกรณ์ปรมาณูวิจัย ปปว-1/1 สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)
- 2.2 แหล่งกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเล็ต หลอดอัลตราไวโอเล็ตความเข้มแสง 470 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร
- 2.3 เชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730
- 2.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV – VIS Spectrophotometer)
- 2.5 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Incubator)
- 2.6 สารเคมี อะซิโตน (Merck), เบต้าไอโอโนน (Sigma), ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Labscan)

3. วิธีการ

3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยนิวตรอน

3.1.1 เพาะเลี้ยง *Xanthophylomyces dendrorhous* บน yeast extract malt extract agar (YM agar) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เชื้อเชื้อลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer หลังจากนั้นปรับให้ได้ปริมาณของเชื้อประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.1.2 นำสารละลายยีสต์ไปอบนิวตรอนด้วยเครื่องปฏิกรณ์ปรมาณูวิจัย ที่นิวตรอนฟลักซ์เท่ากับ 10^{10} นิวตรอนต่อตารางเซนติเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที

3.1.3 บ่มเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบนิวตรอนบนอาหารคัดเลือก YM agar ที่เติม β -ionone ตามกรรมวิธีของ Lewis⁴

3.1.4 คัดเลือกเชื้อซึ่งมีโคโลนีสีส้มแดงบนอาหารคัดเลือก เพื่อนำมาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต โดยเชื้อดั้งเดิมมีโคโลนีสีส้มจางบนอาหารคัดเลือก

3.2 การหาปริมาณของรังสีที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

3.2.1 นำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการอบนิวตรอนจากข้อ 3.1.4 เพาะเลี้ยงบน YM agar บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เชื้อเชื้อลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer หลังจากนั้นปรับให้ได้ปริมาณของเชื้อประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 นำสารละลายยีสต์มาทำให้เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ได้ปริมาณของเชื้อประมาณ 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (serial dilution) เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar นำไปทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตจากหลอดอัลตราไวโอเลตที่ความเข้มแสง 470 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร โดยวางตัวอย่างห่าง 10 นิ้ว และใช้เวลาในการฉายรังสี 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที

3.2.3 บ่มเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีและไม่ผ่านการฉายรังสีที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสถานะที่ไม่โดนแสง

3.2.4 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และนำมาคำนวณหาปริมาณรังสีที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและทดสอบความคงตัวของเชื้อที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์กลาย

3.3.1 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2 เก็บโคโลนีหลังจากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.2 นำโคโลนีจากข้อ 3.3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก YM agar ที่เติม β -ionone และคัดเลือกเก็บโคโลนีซึ่งมีสีส้มแดง เป็นเชื้อรุ่นที่ 1

3.3.3 จากเชื้อรุ่นที่ 1 นำมาทดสอบความคงตัวของเชื้อ โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกอีกครั้งถือเป็นรุ่นที่ 2 และทำการถ่ายเชื้อเช่นเดียวกันต่อไปจนถึงรุ่นที่ 5 คัดเลือกเชื้อเฉพาะที่ให้โคโลนีสีส้มแดงในทุกรุ่น และเก็บเชื้อไอโซเลทที่ได้ในทุกรุ่นไปทดสอบคุณภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อไป

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์ คัดแปลงจากวิธีการของ An⁶ โดยดูผลของเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator และเวลาที่ใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์ด้วยสารปิโตรเลียมอีเทอร์

3.4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้นบน YM slant บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.4.2 เชี่ยเชื้อยีสต์จาก YM slant จำนวน 4-5 ลูบ ลงใน Yeast malt extract broth (YMB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

3.4.3 ดูดสารละลายเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงใน YMB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 22 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

3.4.4 ทำการล้างเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำกลั่น โดยทำการล้างเซลล์ทั้งหมด 3 ครั้ง

3.4.5 ดูดสารละลายเชื้อยีสต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ซึ่งมีน้ำหนักแห้งประมาณ 5-6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator โดยใช้เวลา 5, 10 และ 15 นาที ที่ amplitude เท่ากับ 42 %

3.4.6 เติมอะซิโตน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4.7 นำส่วนใสที่ได้ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.4.8 นำส่วนใสที่ได้ไปสกัดสารแคโรทีนอยด์ด้วยกรวยแยกสารที่เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 2.5 มิลลิลิตร

3.4.9 ทำการสกัดที่เวลา 3, 6, 18 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารสกัดในชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง

474 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณสารสีแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยใช้สูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$\text{ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด } (\mu\text{g/g of yeast}) = \frac{(V) \times (Abs_{474}) \times 100}{21 \times \text{น้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ (กรัม)}}$$

เมื่อ V = ปริมาตรของปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ใช้ในการสกัด (มิลลิลิตร) ในการทดลองครั้งนี้ คือ 10 มิลลิลิตร

Abs_{474} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร

1% extinction coefficient = 2100

3.5 การทดสอบคุณสมบัติในการผลิตแคโรทีนอยด์

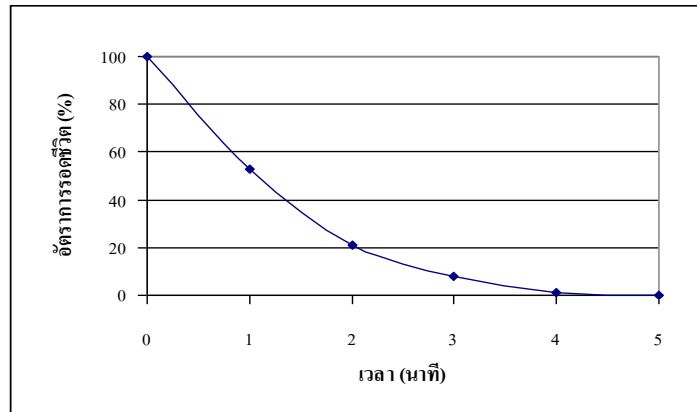
3.5.1 นำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองข้อ 3.3 ทั้ง 5 ไอโซเลทมาเพาะเลี้ยงบน YM slant บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.5.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 – 3.4.9 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์ จากผลการศึกษาทดลองในข้อ 3.4

4. ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ปริมาณของรังสีที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

จากการทดลองนำเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 ที่ผ่านการอาบนิวตรอน แล้วทำการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต โดยฉายรังสีอัลตราไวโอเลตด้วยหลอดอัลตราไวโอเลตที่ความเข้มแสง 470 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร ระยะห่าง 10 นิ้ว เวลาที่ใช้ในการฉายรังสี คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ภายหลังการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต คือ 53, 21, 8, 1 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 ซึ่งเห็นได้ว่าที่เวลา 3 นาที เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากในช่วงที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 0.1 – 10 เปอร์เซ็นต์ ก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่มากพอสำหรับโอกาสที่จะคัดเลือกได้สายพันธุ์ใหม่ ๆ ซึ่งอาจจะดีขึ้นหรือเลวลงก็ได้



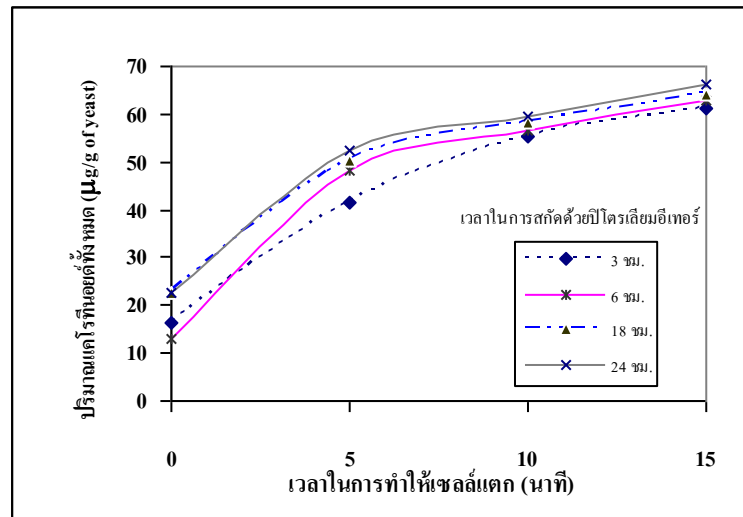
รูปที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที

4.2 การทดสอบความคงตัวของเชื้อที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์กลาย

จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ได้เชื้อยีสต์ที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์ทั้งหมด 941 ไอโซเลต เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก YM agar + B-ionone โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายจะให้โคโลนีสีส้มแดงในขณะที่เชื้อที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (control) จะให้โคโลนีสีส้มจางบนอาหารคัดเลือก พบว่าจากการเลี้ยงเชื้อในรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 5 บนอาหารคัดเลือกได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถให้โคโลนีสีส้มแดงในทุกรุ่น ทั้งหมด 5 ไอโซเลต คือ NU-195, NU-252, NU-525, NU-534 และ NU-742

4.3 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารแคโรทีนอยด์

จากการนำเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 สายพันธุ์ตั้งต้นไปทดสอบเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์ โดยนำไปทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator ที่เวลา 5, 10 และ 15 นาที และทำการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นเวลา 3, 6, 18 และ 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดมีแนวโน้มสูงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำให้เซลล์แตกและระยะเวลาในการสกัด โดยเมื่อใช้เวลาในการทำให้เซลล์แตก 10 และ 15 นาที ปริมาณของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อทำการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นเวลา 3, 6, 18 และ 24 ชั่วโมง ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ก็มีค่าไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 2 ดังนั้นสถานะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์คือ การทำให้เซลล์ยีสต์แตกด้วย sonicator ที่ amplitude 42% ใช้เวลา 10 นาที และสกัดสารแคโรทีนอยด์ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ผลิตจาก *Xanthophyllomyces dendrorhous* สายพันธุ์ตั้งต้น ในการทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator ที่เวลา 5, 10, 15 นาที และสกัดสารแคโรทีนอยด์ ปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ 3, 6, 18 และ 24 ชั่วโมง

4.4 การทดสอบคุณสมบัติในการผลิตสารแคโรทีนอยด์

จากการนำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกของรุ่นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 รวม 5 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะเลี้ยงใน YMB และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตได้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ดังตารางที่ 1 เชื้อสายพันธุ์ตั้งต้นผลิตแคโรทีนอยด์เฉลี่ยเท่ากับ 64.41 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ ส่วนสายพันธุ์กลาย NU-195, NU-252, NU-525, NU-534 และ NU-742 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์เฉลี่ย 85.73, 106.49, 90.58, 102.98 และ 102.62 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ และผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.33, 1.65, 1.40, 1.60 และ 1.59 เท่า ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์กลาย NU-252 เป็นไอโซเลทที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดคือ 106.49 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ และจะเก็บรักษาไว้เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแคโรทีนอยด์รวมทั้งลดต้นทุนในการผลิตสารแคโรทีนอยด์โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารที่มีข้อเสียดราคาต่ำ เช่น โมลาส

ตารางที่ 1 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ผลิตได้จาก *Xanthophyllomyces dendrorhous* สายพันธุ์
ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย เมื่อเพาะเลี้ยงใน YMB

	ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{g/g}$ of yeast)						ปริมาณที่ผลิตได้ สูงกว่าสายพันธุ์ ดั้งเดิม (เท่า)
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	รุ่นที่ 5	เฉลี่ย	
สายพันธุ์ดั้งเดิม	66.26	59.99	70.99	64.34	60.49	64.41 $\pm$ 5	-
NU-195	91.25	84.32	80.97	90.46	81.68	85.73 $\pm$ 5	1.33
NU-252	108.13	109.79	101.55	110.48	102.50	106.49 $\pm$ 4	1.65
NU-525	86.38	88.36	97.00	95.58	85.59	90.58 $\pm$ 5	1.40
NU-534	102.64	101.68	104.85	99.98	105.75	102.98 $\pm$ 2	1.60
NU-742	100.23	98.72	108.31	104.63	101.22	102.62 $\pm$ 4	1.59

5. สรุป

จากการนำเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 ที่ผ่านการอาบนิวตรอน มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต คือฉายรังสีด้วยหลอด อัลตราไวโอเลตความเข้มแสง 470 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ระยะห่าง 10 นิ้ว เวลา 3 นาที ซึ่งทำให้มีอัตราการรอดชีวิต 8 เปอร์เซ็นต์ และคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายได้ 5 ไอโซ เลท ที่แสดงลักษณะโคโลนีเป็นสีส้มแดงบนอาหารคัดเลือก YM agar ที่เติม β -ionone และผลิต สารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์ คือ การทำให้เซลล์ยีสต์แตกด้วย sonicator ที่ amplitude 42% โดยใช้เวลา 10 นาที และสกัดสาร ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากเชื้อที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์กลายทั้งหมด 941 ไอโซ เลท โดยเชื้อสายพันธุ์กลายรหัส NU-252 ผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้สูงที่สุดเท่ากับ 106.49 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ ซึ่งผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 1.65 เท่า ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมผลิต ได้เท่ากับ 64.41 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ ซึ่งสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้นั้นจะทำการเก็บรักษาเชื้อ ไว้เพื่อนำไปใช้ในการผลิตสารแคโรทีนอยด์เพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กริมทาหน้า กริม ทารอบดวงตา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

6. เอกสารอ้างอิง

1. บุญบา ยงสมิทธิ, 2540. จุลชีววิทยาการหมัก วิตามินและสารสี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 5-15.
2. Andrews AG., Phaf, HJ., Starr, MP., 1976. Carotenoid of *Phaffia rhodozyma* a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15, 1003-1007.
3. สวัสดิ์ โล่ห์ทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 570- 578.
4. Aiba, S., Humphrey, EA., Millis, FN., 1973. *Biochemical Engineering*. 2nd ed. Academic Press, NewYork, p.39-44.
5. Lewis, MJ., Ragot, N., Berlant, MC., Miranda, M., 1990. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. *Appl. Envir. Micro*. 56, 2944-2945.
6. An, G,H., Schman, D,B., Johnson, E,A. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Envir. Micro*. 55, 116-124.
7. Fantini,AA.,1975. Strain Development. John,HH. Ed. *Method in Enzymology* vol 43. Antibiotic. Academic Press, NewYork, p.24-41.
8. Sun, N., Lee,S., Song,KB., 2004. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *Int. J.Food. Micro*. 94, 263-267.
9. Park, PK., Kim, EY., Chu, KH., 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Sep. Pur. Tech*. 53,148-152.
10. Martin, JF., Gudina, E.,Barredo, JL., 2008. Conversion of carotene into astaxanthin:two separate enzymes or bifunctional hydroxylase-ketolase protein. *Micro. Cell. Fac*. 7, 1-10.