การคัดเลือกยีสต์กลุ่มแคโรทีโนจีนิคจากแหล่งดินธรรมชาติในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา

Screening of Carotenogenic Yeasts from Natural Soil at the University of Phayao

สุภาพร ภัสสร* นิตยา สุขวรรณา และ พนิตนาฏ อู่พุฒินันท์

Supaporn Passorn*, Nittaya Sookwanna and Panitnart Auputinan

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

Division of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resource, University of Phayao

Received : 6 June 2016

Accepted : 31 August 2016

Published online : 9 September 2016

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้คัดแยกยีสต์กลุ่มแคโรทีโนจีนิค จากแหล่งดินธรรมชาติในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา โดยคัดเลือกเฉพาะยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีที่เป็นสีส้มหรือชมพูขณะเจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ได้จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ UP11 UP12 และ UPF2 เมื่อนำยีสต์ดังกล่าวมาจำแนกโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal transcribed spacer (ITS) ของ rDNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank สามารถจำแนกยีสต์ไอโซเลท UP12 และ UPF2 ได้เป็น *Rhodotorula mucilaginosa* ส่วนการจัดจำแนกไอโซเลท UP11 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากแสดงค่าความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในเกณฑ์ต่ำ ซึ่งสมควรเลือกยีนเครื่องหมายชนิดใหม่มาใช้ในการจำแนก การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ไอโซเลท UP11 และ UP12 ในอาหารเหลว Yeast Malt extract (YM) พบว่ายีสต์ทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 28.59±1.69 และ 14.59±0.55 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

คำสำคัญ : แคโรทีนอยด์ แคโรทีโนจีนิคยีสต์ มหาวิทยาลัยพะเยา

Abstract

This study aimed to isolate carotenogenic yeasts from natural soil at the University of Phayao. Three isolates of yeasts displayed orange or pink colonies were obtained after screening on Potato dextrose agar (PDA) plates, which were named as UP11 UP12 and UPF2. Internal transcribed spacer (ITS)-based identification and similarity search upon GenBank database highly specified UP12 and UPF2 as *Rhodotorula mucilaginosa*. In contrast, the taxonomic position of UP11 was obscured since there was no reasonable matching sequence in the database. This observation suggested that alternative molecular chronometer should be taken into consideration. The optimum temperature for carotenoid production for both UP11 and UP12 was 30 ^{o}C, which were announced as 28.59±1.69 and 14.59±0.55 $\mu g.g^{-1}$ cell dry weight, respectively.

Keywords : carotenoid, carotenogenic yeast, University of Phayao

***Corresponding author. E-mail** : ppapon@hotmail.com

บทนำ

แคโรทีนอยด์เป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มของ isoprenoid พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แคโรทีนอยด์ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การนำมาใช้เป็นสารสีผสมอาหาร (food colorants) นิยมมาผสมในขนมและเครื่องดื่มประเภทต่างๆ และมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ โดยนำแคโรทีนอยด์ผสมกับอาหารสัตว์ เช่น อาหารปลา อาหารสุกร อาหารโค รวมทั้งอาหารสัตว์ปีกซึ่งมีผลทำให้เนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้มีสีสันที่ดีเป็นที่น่าสนใจต่อการบริโภค รวมทั้งในอุตสาหกรรมการแพทย์และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง (Guedes, 2011; Yurkov, 2008) การผลิตสารแคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบมากกว่าการผลิตแคโรทีนอยด์จากพืชและสัตว์ ในแง่ของการใช้พื้นเพาะเลี้ยงน้อยกว่าและสามารถเพิ่มหรือลดขนาดการผลิตทำได้ง่าย การสร้างแคโรทีนอย์ของจุลินทรีย์เกิดได้รวดเร็วและสามารถควบคุมสภาวะการเลี้ยงให้ได้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุดง่ายกว่าในพืชและสัตว์ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ โดยเรียกยีสต์กลุ่มนี้ว่า แคโรทีโนจีนิคยีสต์ (Carotenogenic yeast) พบในหลายจีนัส เช่น *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporium* และ *Crytococus* โดยพบว่ายีสต์ *Rhodotorula* sp. สามารถผลิต เบต้า-แคโรทีนได้สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (Marova *et al*., 2011) ในการศึกษาเพื่อค้นหายีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ ตัวอย่างเช่น El-Banna *et al*. (2012) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์ *Rhodotorula glutinis* จากแหล่งธรรมชาติในประเทศอียิปต์ ค้นพบยีสต์จำนวน 6 ไอโซเลท จากจำนวนทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท เป็นยีสต์กลุ่มที่สร้างเม็ดสี โดยพบยีสต์ *Rhodotorula glutinis var glutinisa* มีความสามารถในการสร้างแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ 266 ไมโครกรัม/กรัมเซลล์แห้ง และรายงานจากประเทศบราซิล Maldonade *et al*. (2007) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์จากดิน ใบไม้ ผลไม้ และดอกไม้ พบว่า สามารถแยกยีสต์ *Rhodotorula graminis*-125 และ *Rhodotorula mucilaginosa* ซึ่งจะถูกนำไปศึกษาต่อในเรื่องการผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยวิธีการหมักต่อไป แสดงให้เห็นว่ายีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการใช้เป็นแหล่งผลิตแคโรทีนอยด์ระดับอุตสาหกรรม อีกทั้งในปัจจุบันการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์ของจุลินทรีย์หรือการควบคุมให้มีการพัฒนาผลผลิตที่สูงขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีการผลิตในถังหมัก (Fermentation technology) เป็นสิ่งที่สามารถทำได้ง่ายในจุลินทรีย์

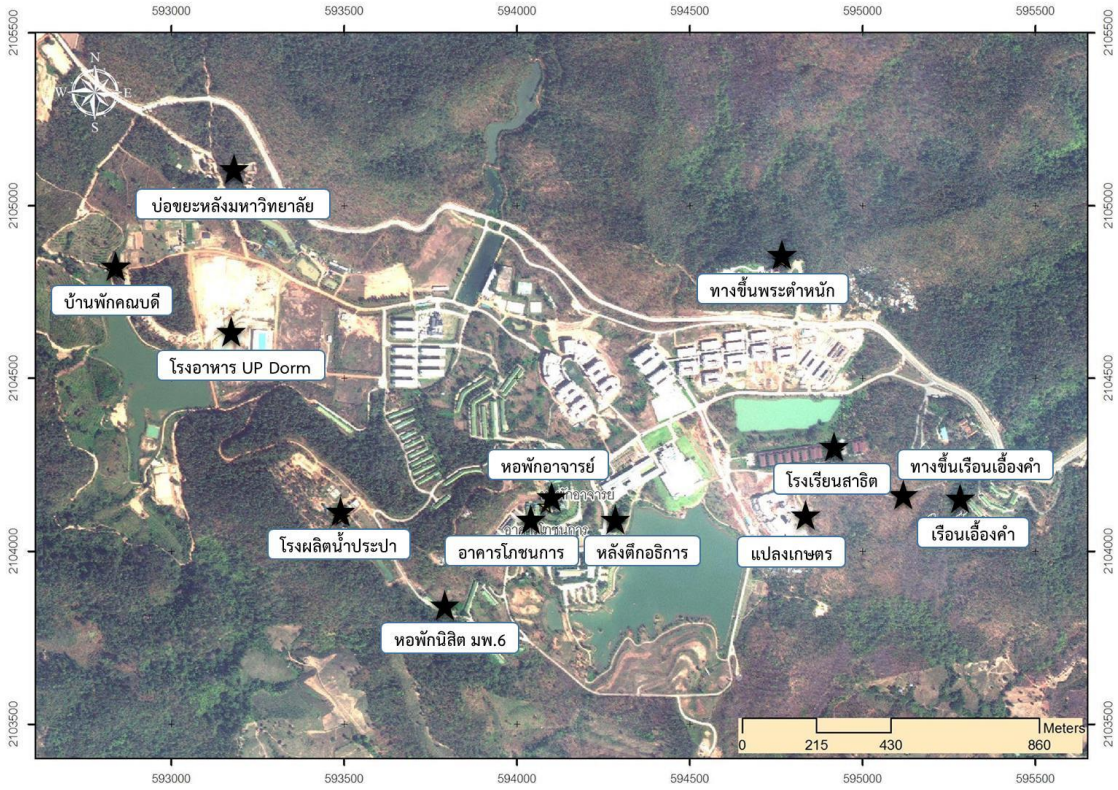
ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง รวมไปถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม จึงเป็นที่มาของการวิจัยในครั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสายพันธุ์กลุ่มแคโรทีโนจีนิคยีสต์ ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตแคโรทีนอยด์ ในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งของแหล่งผลิตแคโรทีนอยด์โดยสามารถนำยีสต์ที่ได้ไปศึกษาวิจัยและพัฒนาต่อสำหรับใช้ในการผลิตแคโรทีนอยด์ระดับทางอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>คัดแยกยีสต์ที่มีการสร้างแคโรทีนอยด์ (Carotenogenic yeast) จากแหล่งดินธรรมชาติ ในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา</u>

เก็บตัวอย่างดินโดยใช้วิธีเก็บแบบผสมรวม (Composite Sampling) ในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา 13 บริเวณ ดังภาพที่ 1 คัดแยกยีสต์โดยนำตัวอย่างดินมาเจือจางสิบเท่าตามลำดับ (10-fold serial dilution) จากนั้นนำตัวอย่างจากแต่ละระดับการเจือจางมาเกลี่ย (spread) บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกระทั่ง

สังเกตเห็นโคโลนีของยีสต์ คัดเลือกยีสต์จากลักษณะสีของโคโลนีที่สร้างรงควัตถุสีส้มหรือชมพู เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินในบริเวณมหาวิทยาลัยพะเยา จำนวน 13 บริเวณ

2. <u>การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแคโรทีนอยด์ของยีสต์แคโรทีโนจีนิค (Tansin, 2010)</u>

นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์สีส้มหรือชมพูที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหาร Yeast Malt extract (YM) broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่วเพื่อให้เซลล์กระจายตัวได้ดี และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน นำยีสต์ที่เลี้ยงได้มา มาขยายลงในอาหาร YM broth ที่มีปริมาตรมากขึ้น โดยกำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.12-0.15 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนเซลล์เริ่มต้น อยู่ในช่วง 2.15×10^{6} - 2.70×10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้งและปริมาณแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ (Cell dry weight) ทำโดยนำเซลล์ยีสต์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยง (4,000 รอบต่อนาที, 5 นาที) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักที่คงที่ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทำโดยนำเซลล์ยีสต์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดแคโรทีนอยด์ โดยแขวนลอยเซลล์ในสารละลาย DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งมี glass beads ขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เพื่อช่วยทำให้เซลล์แตกได้ดีขึ้น ใส่ประมาณ 3 เม็ด จากนั้นเติมสารละลาย petroleum ether: sodium chloride: acetone (1:1:1) ผสมโดยการ vortex ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารสีส้มใสซึ่งอยู่ชั้นบน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร โดยมีค่า 1% extinction coefficient (E 1%/ 1 cm) เท่ากับ 2,100 (ค่า extinction coefficient ของ astaxanthin ที่ความเข้มข้น 1% น้ำหนัก/ปริมาตร ในสารละลาย petroleum ether) คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์โดยใช้สูตรดังนี้

แคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัมยีสต์ น้ำหนักแห้ง) = (Volume of Petroleum ether)(A474)(10,000) / (2,100)(Cell dry weight)

โดยค่า A474 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร และ Cell dry weight คือ น้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไอโซเลทที่ตรวจพบการผลิตแคโรทีนอยด์ไปจัดจำแนกชนิดยีสต์

3. <u>จัดจำแนกยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS</u>

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากยีสต์ที่คัดแยกได้โดยน้ำยาสกัด DNAzol เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ตามวิธีการของ White *et al*. (1990) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส ดังนี้ ITS 1 – 5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’ และ ITS 4 – 5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’ โดย ITS ดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง 18S rDNA และ 26S rDNA ในกรณีนี้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะรวมส่วนของ 5.8 S rDNA ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดไว้จากการใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 คือ ประมาณ 600 คู่เบส นำ PCR Product ที่ได้ส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท SolGent (SolGent Co., Ltd., South korea) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่ได้ไปวิเคราะห์ความเหมือนเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และระบุ แทกซอนของยีสต์โดยใช้เกณฑ์ระดับความเหมือนไม่น้อยกว่า 97**%** (**%** similarity cut-off**)** ในการระบุจีนัสและสปีชีส์ (Blaalid, 2013)

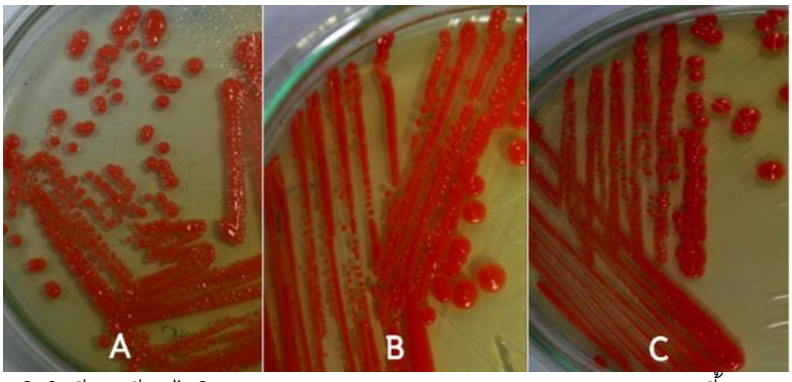
4. <u>การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ที่คัดเลือก</u>

เตรียมกล้าเชื้อโดยนำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ปริมาณยีสต์เริ่มต้น อยู่ในช่วง 2.15×10^6 - 2.70×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้ดังกล่าวมาใส่ในอาหาร YM broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ต่างกันดังนี้ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเป็นเวลา 5 วัน ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ (ตามวิธีข้อ 2)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. <u>การคัดแยกยีสต์แคโรทีโนจีนิค</u>

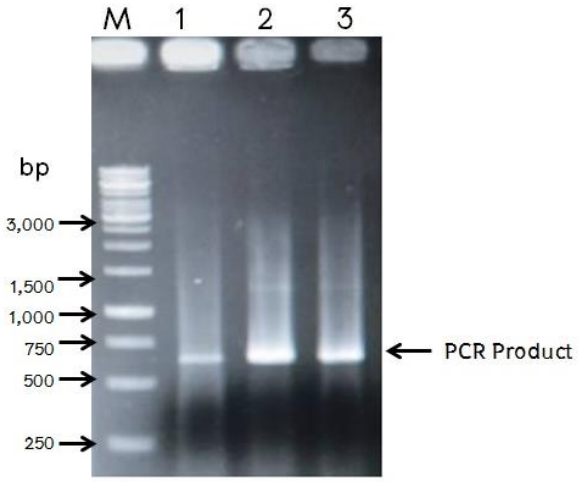
จากการนำตัวอย่างดินในเขตมหาวิทยาลัยมาคัดแยกยีสต์แคโรทีโนจีนิคบนอาหาร PDA สามารถคัดแยกยีสต์ที่สร้างรงควัตถุสีชมพูอมส้มได้จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีของแต่ละไอโซเลทคล้ายคลึงกัน คือ โคโลนีกลม ผิวมันวาว ขอบเรียบ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์มีรูปร่างแบบรูปไข่ กำหนดรหัสของยีสต์ไอโซเลทดังกล่าวเป็น UP11 UP12 และ UPF2 ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะสีและโคโลนีของยีสต์ไอโซเลท UP11 (A), UP12 (B) และ UPF2 (C) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. <u>การจัดจำแนกยีสต์</u>

เมื่อนำยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท มาจัดจำแนกโดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 3) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของยีสต์ไอโซเลท UP12 และ UPF2 แสดงความเหมือนสูงสุด 100% และ 99% ตามลำดับ กับ *Rhodotorula mucilaginosa* strain PMM08-3684L (Accession no. KP132584) ดังแสดงในตารางที่ 1 จึงได้จำแนกยีสต์ทั้งสองไอโซเลทดังกล่าวเป็น แสดงค่าเป็น *Rhodotorula mucilaginosa* สายพันธุ์ UP12 และ *Rhodotorula mucilaginosa* สายพันธุ์ UPF2 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ของยีสต์ไอโซเลท UP11 แสดงความเหมือนสูงสุด 90% ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 50-157 รวมความยาวทั้งสิ้น 106 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ *Rhodotorula glutinis* isolate 111YF14a (ตารางที่ 1) ดังนั้นไอโซเลท UP11 จึงคาดว่าจะเป็นยีสต์ *Rhodotorula* sp. แต่เนื่องจากความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่แสดงความเหมือนของไอโซเลทนี้ ยังไม่เพียงพอที่จะทำให้ระบุชนิดได้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปโดยเลือกยีนเครื่องหมายชนิดใหม่ เช่น D1/D2 domain ของ 26s rDNA



ภาพที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS): เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม, เลน 1-3 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR จากยีสต์ไอโซเลท UP11, UP12 และ UPF2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของยีสต์ไอโซเลท UP11, UP12 และ UPF2 กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn

Isolate	Max identity	Coverage	**แทกซอนที่แสดงค่าความเหมือนสูงสุด**
UP11	90%	95%	*Rhodotorula glutinis* isolate 111YF14a (Accession no. KP714328)
UP12	100%	100%	*Rhodotorula mucilaginosa* strain PMM08-3684L (Accession no. KP132584)
UPF2	99%	99%	*Rhodotorula mucilaginosa* strain PMM08-3684L (Accession no. KP132584)

3. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยเลือกศึกษาจากยีสต์ไอโซเลท UP12 เป็นตัวแทนของยีสต์ที่ระบุชนิดได้เป็น *R. mucilaginosa* strain PMM08-3684L และไอโซเลท UP11 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 5 วัน ในเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่ควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่ายีสต์ทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเท่ากับ 28.59±1.69 และ 14.59±0.55 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของยีสต์ไอโซเลท UP11 และ UP12 เลี้ยงในอาหาร YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

ไอโซเลท	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	37 องศาเซลเซียส
UP11	21.21±0.90	28.59±1.69	15.61±0.68
UP12 *(R. mucilaginosa)*	11.61±0.44	14.59±0.55	10.54±0.48

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากผลการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ทั้งสองไอโซเลทมีความสอดคล้องกับ Perrier *et al*. (1995) รายงานการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Rhodotorula* sp. อยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัม/กรัมเซลล์ การผลิตแคโรทีนอยด์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท UP11 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าไอโซเลท UP12 ประมาณ 2 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณการผลิต

แคโรทีนอยด์ในไอโซเลท UP11 จะลดลงมากกว่าไอโซเลท UP12 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงมีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ใน ไอโซเลท UP11 มากกว่าไอโซเลท UP12 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Prakash (2001) รายงานว่าที่อุณหภูมิต่ำจะเหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* mutant 32 และที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะขัดขวางกระบวนการทำงานของเมแทบอลิซึมในยีสต์ทำให้การผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง Maldonade *et al.* (2007) เพาะเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* -137 ในอาหาร YM broth เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบแคโรทีนอยด์ปริมาณ 64.4 ไมโครกรัม/กรัมเซลล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลท UP11 และ UP12 เพาะเลี้ยงอุณหภูมิเดียวกัน พบการสร้างแคโรทีนอยด์ต่ำกว่าประมาณ 3 เท่า อาจเนื่องจากการเขย่าที่ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ซึ่ง *R. mucilaginosa* ต้องการออกซิเจนในการเจริญหากเพิ่มความเร็วในการเขย่าทำให้มีปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ยีสต์เจริญได้ดีและสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ปริมาณมาก นอกจากนี้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ Naghavi *et al.* (2014) ศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหาร yeast extract peptone glucose medium (YPG) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด เท่ากับ 3.39 กรัมต่อลิตร หรือในรายงานของ Aksu & Eren (2005) ได้เลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 2.59 กรัม/ลิตร yeast extract 2 กรัม/ลิตร malt extract 1 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัม/ลิตร KH_2PO_4 1 กรัม/ลิตร และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.25 กรัม/ลิตร เขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าผลิตแคโรทีนอยด์ได้เท่ากับ 13.7 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นการศึกษาต่อไปของการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ไอโซเลท UP11 และ UP12 สามารถปรับปรุงได้โดยการหาสูตรอาหารราคาถูก และสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาการผลิตแคโรทีนอยด์ในอนาคต อีกทั้งศึกษาวิธีการสกัดแคโรทีนอยด์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บผลผลิตแคโรทีนอยด์ต่อไป เช่น การศึกษาของ Pewlong & Bangwirunruk (2009) รายงานสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีนอยด์ คือ การทำให้เซลล์ยีสต์แตกด้วย sonicator ที่ amplitude 42% โดยใช้เวลา 10 นาที และสกัดสารด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่งผลให้เก็บเกี่ยวแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้คัดแยกยีสต์กลุ่มแคโรทีโนจีนิคจากแหล่งดินธรรมชาติในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา ได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท คือ UP11, UP12 และ UPF2 เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยวิธีวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS สามารถจำแนกไอโซเลท UP12 และ UPF2 ได้เป็น *R. mucilaginosa* ส่วนยีสต์ไอโซเลท UP11 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ถึงระดับสปีชีส์ ถึงแม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 90% กับ *R. glutinis* isolate 111YF14a แต่ความยาวของนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่แสดงความเหมือนของไอโซเลทนี้ยังไม่เพียงพอต่อการระบุชนิด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อระบุชนิดของยีสต์ไอโซเลทนี้ จากการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ไอโซเลท UP11 และ UP12 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเท่ากับ 28.59±1.69 และ 14.59±0.55 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการทำวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 จากมหาวิทยาลัยพะเยา

เอกสารอ้างอิง

Aksu, Z. & Eren, A. T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, *40,* 2985-2991.

Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirks, P. M., & Kahserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*. *13*, 218–224.

El-Banna, A. A., El-Razek, A. M. A., & El-Mahdy, A. R. (2012). Isolation, identification and screening of carotenoid-production strains of *Rhodotorula glutinis*. *Food and Nutrition Sciences*, *3*, 627-633.

Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Maleata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, *9*, 625 – 644.

Maldonade. I. R., Scamparini, A. R. P., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, *Brazil. Brazillian Journal of Microbiology*, *38*, 65-70.

Marova, I., Certik, M., & Breierova, E. (2011). Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts-Application of whole cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compound. In D. Matovic. (Ed.), *Biomass - Detection, Production and Usage*, (pp. 345-384). Shanghai: In Tech China.

Naghavi, F. S., Hanachi, P., & Saboora, A. (2014). Effect of temperature, pH and salinity on carotenoid production in *Rodotorula mucilaginosa*. *Research in Biotechnology*, *5*(4), 01-04.

Peerier, V., Dubreucq, E., & Gayzy, P. (1995). Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Archives of Microbiology*, *164*, 173-179

Pewlong, W. & Bangwirunruk, J. (2009). Increasing the carotenoid content of *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a neutron-ultraviolet combination treatment. In *Proceeding Conference on Nuclear Science and Technology*. (pp. 1-10). Bangkok: Thailand. (in Thai)

Prakash, B. B. (2001). Studies on yeast Rhodotorula, its carotenoids and their applications. Thesis, Doctor of Philosophy. University of Pune. India.

Tansin, K. (2010). Enhancement of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* and its stability. Thesis, Master of Science, Silpakorn University, Thailand. (in Thai)

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand. J.J. Sninsky and T.J. White. (Eds.), *PCR protocols-A guide to methods and applications*. (pp. 315-322). New York: Academic Press, Inc.

Yurkov, A. M., Vustin, M. M., Tyaglov, B. V., Maksimova, I. A., & Sinekoiy S. P. (2008). Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and ubiquinone Q10. *Microbiology*, *77*(1), 1–6.