บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G.10 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc. U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (psychrotherm incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc. U.S.A.

ตู้แช่แข็ง (deep freezer) รุ่น Forma Bio-Freezer บริษัท Forma Scientific, Marietta, ohio U.S.A.

เครื่องวัดความเข้มแสง (lux meter) บริษัท Hioki Japan

หลอดไฟคูลไวท์ (24T12 high output F24T 12/CW/HO Cool White) U.S.A.

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น SP-5A digital pH meter บริษัท Suntex Taiwan

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-240 บริษัท Shimadzu Japan และ spectrophotometer 340 บรษท Sequoia-Turner Japan

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-3D บริษัท Hirayama MFG. Corp. Japan

เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) พร้อมอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Eyela-SB-35 บริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd. Japan

เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated cen-

trifuge) รุ่น J2-21 บริษัท Beckman U.S.A. และรุ่น KS-3000 p บริษัท Kubota Japan

เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น W385 บริษัท Heat Systems Ultrasonics Inc. U.S.A.

ชุดอุปกรณ์สำหรับโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography) ประกอบด้วย อ่างโครมาโตกราฟี (chromatography chamber) และแผ่นโครมาโตกราฟี (TLC plate) ที่เคลือบด้วย ซิลิกาเจล (silica gel) G 60 F 254 บริษัท E.Merck Darmstad Germany

กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 100 200 และ 500 มล. บริษัท Pyrex U.S.A.

โกร่งบด (mortar และ pestle)

ตู้อบ (hot air oven) รุ่น 130 ss บริษัท Modern Laboratory Equipment Co. Inc. U.S.A.

เครื่องชั่งละเอียด รุ่น S-2000 บริษัท Boeckel Germany

ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 และชุดควบคุมสภาวะ บริษัท L.E. Marubishi Japan

เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน รุ่น Buchi 315 Distillation Unit และ Buchi 425 Digester บริษัท Buchi Laboratory-Techniques Ltd. Switzerland

เครื่องไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) รุ่น UV Detecter SPD-1 บริษัท Shimadzu Japan

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate)	Sigma
โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium hydrogen phosphate anhydrous)	Merck
แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate heptahydrate)	Merck
กรดกลูตามิก (glutamic acid)	Sigma
กรดคาซามิโน (casamino acid)	Difco
ผงสกัดยีสต์ (yeast extract)	Difco
กลูโคส (D (+)-glucose monohydrate)	Difco
ซูโครส (sucrose)	Merck
อะซิโตน (acetone)	Carlo Erba
ปิโตรเลียม อีเธอร์ (petroleum ether 40^{o}-60^{o})	Merck
โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate anhydrous)	BDH
ผงอลูมินา (alumina powder)	Sigma
ยูเรีย (urea)	Sigma
แป้งมันสำปะหลัง	ซื้อจากตลาดทั่วไป
กากน้ำตาล (molasses)	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กากถั่วเหลือง (soybean meal)	บริษัทธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด
น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	บริษัทธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด
น้ำมันเมล็ดฝ้าย (cottonseed oil)	Sigma
นอร์มัล-พาราฟิน (n-paraffin)	May&Baker
ไทอามีน (thiamine hydrochroride)	Sigma
แมงกานีส (manganese (II) sulphate-tetrahydrate)	BDH

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
คอปเปอร์ซัลเฟต (copper (II) sulphate pentahydrate)	BDH
ซิงค์ซัลเฟต (zinc (II) sulphate heptahydrate)	BDH
เฟอรัสซัลเฟต (iron (II) sulphate heptahydrate)	BDH
triton X-100	Packard
เบตา-ไอโอโนน (β- ionone)	Sigma
กรดแอบซิสิค (abscisic acid)	Fluka
โซเดียมซัคซิเนท (Na-succinate)	Sigma
วิตามินเอ (retinol acetate)	Sigma
2,6-ditertiarybutyl-4-methylphenol	Fluka
คีโรซีน (kerosene)	Sigma

2.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยนี้มีทั้ง รา ยีสต์ และ แบคทีเรีย โดยจำแนกได้เป็นกลุ่มดังนี้

ยีสต์จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่

1. *Rhodotorula* sp. M0001
2. *Rhodotorula* sp. C0001
3. *Rhodotorula* sp. K0001
4. *Rhodotorula* sp. Y1585
5. *Rhodotorula* sp. Y1621
6. *Rhodotorula* sp. T5159
7. *Rhodotorula* sp. C0002
8. *Rhodotorula* sp. C0003
9. *Rhodotorula* sp. Y1592

ราจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่

1. *Blakeslea* sp. C0004

2. *Blakeslea* sp. C0005

แบคทีเรียจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่

1. แบคทีเรีย สายพันธุ์ C0006

2. แบคทีเรีย สายพันธุ์ C0007

2.3 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (อาหารแข็ง)ใช้อาหาร YM (ภาคผนวกที่ 1) สูตรอาหารสำหรับหัวเชื้อ (อาหารเหลว) และสูตรอาหารสำหรับการสร้างรงควัตถุ (อาหารเหลว) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วยซูโครส 20 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 3.7 กรัม โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอตเฟต 5.5 กรัม โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.7 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม ผงสกัดยีสต์ 1 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 6 สำหรับอาหารเหลวไม่ใส่วุ้น ส่วนอาหารแข็งเติมวุ้นปริมาณ 20 กรัม อาหารทุกชนิดอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3.2 การเก็บรักษาเชื้อ และการเลี้ยงเชื้อ

ก. การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นเวลา 4 วัน เมื่อเชื้อเติบโตดีแล้ว จึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70° ซ

ข. การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อโดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่มีอาหารแข็งลาดเอียงลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ควบคุมปริมาณเซลล์ให้เท่ากันทุกการทดลอง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 นาโนเมตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 17 ชม.

ค. การเลี้ยงเชื้อเพื่อสังเคราะห์รงควัตถุ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ เป็นเวลา 17 ชม.แล้วถ่ายเชื้อจากอาหารเตรียมหัวเชื้อ ปริมาณร้อยละ 5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารสำหรับการสังเคราะห์รงควัตถุ ซึ่งบรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 72 ชม. แล้วตรวจหาการเติบโต และปริมาณรงควัตถุ

2.4 วิธีการสกัดและการแยกรงควัตถุจากเซลล์

วิธีการสกัด และการแยกรงควัตถุจากเซลล์ ดัดแปลงจากวิธีของ Peterson (38) โดยนำเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture broth) ปริมาตร 50 มล.มาปั่นด้วยความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเซลล์ออก แล้วนำเซลล์มาผสมกับผงอลูมินา บดในโกร่งบด นาน 10 นาที แล้วเติมอะซิโตนปริมาตร 10 มล.จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนอะซิโตนใส่ในกรวยแยก เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ปริมาตร 15 มล. แล้วเขย่า เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มล. รงควัตถุแคโรทีนจะอยู่ในชั้นของปิโตรเลียมอีเธอร์

2.5 วิธีการวิเคราะห์

2.5.1 วิธีวัดการเติบโตของจุลินทรีย์

ก. โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำเซลล์ที่เติบโตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1 มล. มาปั่นที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นต่ออีก 5 นาที ผสมเซลล์กับน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร

ข. โดยวิธีหามวลเซลล์แห้ง

นำเชื้อที่เติบโตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มล.มาปั่นที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นต่ออีก 5 นาที อบเซลล์ที่ได้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 80° ซ. เป็นเวลา 10 ชม. จนน้ำหนักคงที่แล้ว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่งน้ำหนัก

2.5.2 วิธีการวิเคราะห์รงควัตถุ

ก. วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

ใช้วิธีของ Peterson (38) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุที่ละลายอยู่ในปิโตรเลียมอีเธอร์ ที่ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 ถึง 520 นาโนเมตร รงควัตถุเบตา-แคโรทีน จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 448 นาโนเมตร (2) และใช้วิธีนี้ สำหรับการตรวจหาปริมาณรงควัตถุตลอดการทดลอง

ข. วิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

ใช้วิธีของ Singh (39) โดยหยดสารละลายที่มีรงควัตถุละลายอยู่ในปิโตรเลียมอีเธอร์ ลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีที่เคลือบผิวด้วยซิลิกาเจล ทำให้แห้งแล้ววางแผ่นโครมาโตกราฟี ลงในอ่างโครมาโตกราฟีที่บรรจุปิโตรเลียมอีเธอร์ ผสมกับอะซีโตนร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ตรวจสอบสี และค่า Rf ของสารที่แยกได้จากตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสี และค่า Rf ของสารมาตรฐาน เบตา-แคโรทีน

ค. วิธีไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี

การตรวจชนิดของรงควัตถุโดยวิธี ไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี ดัดแปลงจากวิธีของ Nelis และ Deleenheer (40) กล่าวคือเตรียมสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ โดยนำสารที่สกัดได้ ซึ่งละลายอยู่ในตัวทำละลายปิโตรเลียม-อีเธอร์ 1 มล. มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50° ซ. หลังจากนั้นเติมตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมของ อะซิโตไนไตรล์ ไดคลอโรมีเธน เมธานอล ในอัตราส่วน 70:20:10 (โดยปริมาตร)ใช้สารตัวอย่างนี้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟ สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

สารตัวพา (mobile phase) : อะซิโตไนไตรล์ ไดคลอโรมีเธน เมธานอล ในอัตราส่วน 70:20:10 (โดยปริมาตร)

อัตราการไหล (flow rate) : 20 มล./นาที

เครื่องตรวจวัด (detecter) : spectrophotometer วัดที่ความยาวคลื่น 448 นาโนเมตร

คอลัมน์ (column) : ขนาด 0.46 ซม.X 25 ซม. บรรจุด้วย

ซอร์แบคโอดีเอส (Zorbax ODS) ขนาด 7 ไมโครเมตร

2.5.3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

ดัดแปลงจากวิธีของ Bernfeld (41) โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มล. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (ภาคผนวกที่ 4) ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็น (ประมาณ 10 นาที) เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 5 มล. เขย่าอย่างแรง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวกที่ 7)

2.5.4 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

โดยวิธี Kjeldahl Gunning method ดังมีวิธีการดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การย่อย

นำสารตัวอย่าง 0.5 กรัม หรือปริมาตร 10 มล. ใส่ลงในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมสารคะตะไลส์ (ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม กับโปตัสเซียมซัลเฟต 95 กรัม) 7 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 15 มล. นำไปย่อยบนเครื่องย่อย (digester) ซึ่งอยู่ในตู้ควัน จนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนด้วยเครื่องกลั่น

นำสารตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วจากขั้นตอนที่ 1 มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 37 (น้ำหนัก / ปริมาตร) ปริมาตร 20 มล. ทำการกลั่นจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ผสม (เมทธิลเรด และ เมทธิลีนบลู 0.1 กรัม ในเอทธานอล เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 150 มล.) อยู่ 3 หยด กลั่นตัวอย่างจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 250 มล. นำสารละลายที่ได้มาติเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน หาปริมาณไนโตรเจนได้จาก

ร้อยละของไนโตรเจน = (ปริมาตรติเตรทของตัวอย่าง X ความเข้มข้นของกรดกำมะถัน X 1.4)/ ปริมาตรของสารตัวอย่าง

2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน โดย *Rhodotorula* sp. Y1621 ในระดับขวดเขย่า (shake flask)

2.6.1 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

2.6.1.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ กากน้ำตาล กลูโคส ซูโครส สารละลายแป้งไฮโดรไลส์ และนอร์มัล-พาราฟิน โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 4 ชนิดแรก ให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 1 3 และ 5 (น้ำหนัก/ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) และแปรผันความเข้มข้นของนอร์มัล-พาราฟิน เท่ากับร้อยละ 3 5 และ 7 (ปริมาตร/ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld (41) ตามที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5.3

2.6.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.6.1.1 และใช้แหล่งไนโตรเจน ชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดกลูตามิก (glutamic acid) กรดคาซามิโน (casamino acid) แอมโนเนียมซัลเฟต กากถั่วเหลืองไฮโดรไลส์ และยูเรีย โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ให้มีไนโตรเจนทั้งหมดความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.025 0.05 0.10 0.30 และ 0.50 (น้ำหนัก/ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl ตามที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5.4

2.6.2 สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

2.6.2.1 อุณหภูมิ

ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.6.1.1 และ 2.6.1.2 เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. Y1621 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวด

ทดลองขนาด 250 มล. และเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 28 30 และ 35° ซ.

2.6.2.2 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. Y1621 ในอาหารซึ่งมีองค์ประกอบเช่นเดียวกันกับข้อ 2.6.2.1 โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่างๆกัน คือ 2.5 3 4 5 6 7 8 และ 9 เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งได้จากผลการศึกษาในข้อ 2.6.2.1

2.6.2.3 ความเร็วรอบของการเขย่า

เลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. Y1621 ในอาหารสูตรเดียวกันกับข้อ 2.6.2.1 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 2.6.2.1 และความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 2.6.2.2 โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 200 250 และ 300 รอบ/นาที

2.6.3 องค์ประกอบอื่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.6.3.1 ผงสกัดยีสต์

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.6.2.1 อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.6.2 แปรผันความเข้มข้นของผงสกัดยีสต์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.025 0.050 0.075 0.10 0.30 และ 0.50 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

2.6.3.2 ไทอามีน

ใช้สูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.6.3.1 แปรผันความเข้มข้นของไทอามีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.0125 0.0250 0.0500 0.0750 และ 0.1000 มิลลิกรัม/ลิตร

2.6.3.3 อิออนของโลหะบางชนิด

ใช้สูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับข้อ 2.6.3.1 ศึกษาผลของการเติมอิออนของโลหะบางชนิดได้แก่ Fe^{2+} Cu^{2+} Zn^{2+} และ Mn^{2+} โดยแปรผันปริมาณตั้งแต่ 0.05-0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ในรูปของเกลือ

$FeSO_4.7H_2O$ $CuSO_4.5H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$ และ $MnSO_4.4H_2O$ ตามลำดับ

2.7 การศึกษาผลของปัจจัยบางชนิดที่มีต่อการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน โดย *Rhodotorula* sp. Y1621 ในระดับขวดเขย่า

2.7.1 การย้ายเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อลงในสารละลายบางชนิด

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp.Y1621 ในสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 2.6 จนเชื้อเติบโตได้สูงสุด ที่เวลา 48 ชม. หลังการเลี้ยงเชื้อ ย้ายเซลล์โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (น้ำหนัก/ปริมาตร) (normal saline) แล้วนำเซลล์ที่ได้ปริมาณ 1 กรัมต่อ 1 ขวดทดลอง ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 3 4 5 6 7 8 และ 9 แล้วเขย่าต่อไปเป็นเวลานาน 24 ชม. เปรียบเทียบปริมาณเบตา-แคโรทีนที่สังเคราะห์โดยเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม (ที่เลี้ยงจนครบ 72 ชม. โดยไม่ได้ย้ายเซลล์ลงสู่สารละลายชนิดอื่น) กับปริมาณเบตา-แคโรทีน ที่สังเคราะห์โดยเซลล์ที่อยู่ในสารละลายดังกล่าว

2.7.2 การเติมสารบางชนิด (supplement)

ใช้สูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 2.6 สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. Y1621 แล้วศึกษาผลของการเติมสารบางชนิด ได้แก่

: น้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้นร้อยละ 1 2 3 และ 4 (ปริมาตร/ปริมาตร)

: น้ำมันเมล็ดฝ้าย ความเข้มข้นร้อยละ 1 2 3 และ 4 (ปริมาตร/ปริมาตร)

: น้ำมันถั่วเหลืองผสมกับน้ำมันเมล็ดฝ้าย ความเข้มข้นร้อยละ 1 2 3 และ 4 (ปริมาตร/ปริมาตร)

: ดีเทอร์เจนต์ เลือกใช้ triton x-100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.03 0.06 0.09 และ 0.12 (ปริมาตร/ปริมาตร)

: เบตา-ไอโอโนน ความเข้มข้นร้อยละ 0.0025 0.0050 และ 0.0100 (ปริมาตร/ปริมาตร)

: กรดแอบซิสิค ความเข้มข้น 2 6 10 13 และ $17X10^{-4}$ มิลลิโมล

: โซเดียมซัคซิเนท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.3 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

: วิตามินเอ ความเข้มข้น 0.06 0.18 0.30 และ 0.42 มิลลิโมล

: แอนติออกซิแดนท์ เลือกใช้ 2,6-ditertiarybutyl-4-methylphenol ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัม/ลิตร

: คีโรซีน ความเข้มข้น 2.5 5.0 10.0 15.0 และ 20.0 มิลลิลิตร/ลิตร

2.7.3 การให้แสง

เลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. Y1621 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ที่ได้จากข้อ 2.6 แล้วศึกษาผลของการให้แสงในขณะเลี้ยงเชื้อดังนี้

ก. ความเข้มของแสงโดยให้มีความเข้มแสงต่างๆกัน ตั้งแต่ 0 ลักซ์ (lux) จนถึงความเข้มสูงสุดเท่ากับ 3000 ลักซ์

ข. ระยะเวลาให้แสง โดยให้ความเข้มของแสงที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ ก. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลานาน 72 ชม. ภายใต้สภาวะการให้แสงต่างๆกัน 5 สภาวะ ดังนี้

1. ไม่ให้แสงตลอดเวลาการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
2. ให้แสงตลอดเวลาการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
3. ให้แสง 12 ชม. ตามด้วยการไม่ให้แสง 12 ชม. สลับกัน
4. ให้แสง 48 ชม. ตามด้วยการไม่ให้แสง 24 ชม.
5. ไม่ให้แสง 48 ชม. ตามด้วยการให้แสง 24 ชม.

2.8 การผลิตรงควัตถุเบตา-แคโรทีน โดย *Rhodotorula* sp. Y1621 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

นำปัจจัยที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 2.6 และปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณรงควัตถุที่ได้จากการศึกษาตามข้อ 2.7.2 และ 2.7.3 มาศึกษาสภาวะการเติบโต และการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มผลผลิต และลดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ จากข้อมูลเบื้องต้น พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโต และการสังเคราะห์รงควัตถุโดย *Rhodotorula* sp. Y1621 เท่ากับ 28°ซ. ดังนั้น ในการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก จะควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 28°ซ. ศึกษารูปแบบการผลิตรงควัตถุใน

สภาวะต่างๆดังนี้

2.8.1 ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

จากผลวิจัยเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย (42) และจากผลการวิจัยในระดับขวดเขย่าได้พบว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Rhodotorula* sp. Y1621 มีค่าเท่ากับ 6 และจากรายงานของ Goodwin 1959 (24) ซึ่งได้รายงานว่า การสังเคราะห์รงควัตถุเบตา-แคโรทีน จะเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงเป็นกรด ประมาณ 2.3-3.0 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. Y1621 ในถังหมัก และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 6.0 แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ลดลงตามลำดับจนมีค่าเท่ากับ 2.5 ในชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อจนถึงระยะเวลาสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 60 ชม.

2.8.2 ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และแปรผันปริมาณของอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แปรผันอัตราการให้อากาศตั้งแต่ 0.5-1.5 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที และอัตราการกวนตั้งแต่ 300-600 รอบ/นาที โดยควบคุมความเป็นกรดด่างให้ลดลงตามลำดับ จาก 6.0 เป็น 2.5 เปรียบเทียบการเติบโต และการสังเคราะห์รงควัตถุเบตา-แคโรทีน และศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอน (ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์) รวมทั้งปริมาณแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด ที่เปลี่ยนแปลงไปทุก 6 ชม. ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

2.8.3 ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้อากาศในปริมาณที่เหมาะสม และเติมสารบางชนิดที่มีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุ พร้อมทั้งให้แสงในความเข้มแสงที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. Y1621 ในอาหารสูตรปรับปรุงเติมสารบางชนิดที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณรงควัตถุเบตา-แคโรทีน จากข้อ 2.7.2 และให้แสงในความเข้มแสงที่เหมาะสมจากข้อ 2.7.3 ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้ลดลงตามลำดับจาก 6.0 เป็น 2.5 ที่อุณหภูมิ 28° ซ. ให้อัตราการให้อากาศ และอัตราเร็วใน

การกวนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.8.2 ตรวจวัดการเติบโต การสังเคราะห์รงควัตถุ เบตา-แคโรทีน และศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอน (ในรูปของน้ำตาลรีดิวส์) รวมทั้งปริมาณแหล่งไนโตรเจนทั้งหมดที่เปลี่ยนแปลงไปทุก 6 ชม. ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ