สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

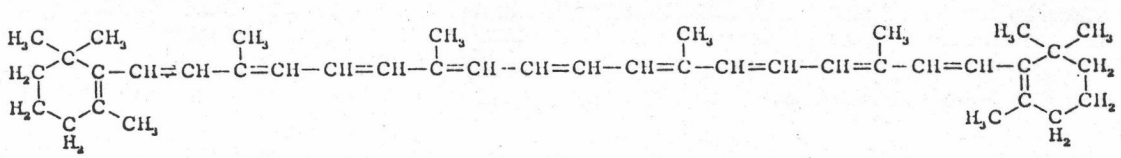
บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา ความสำคัญและเหตุจูงใจในการทำวิจัย

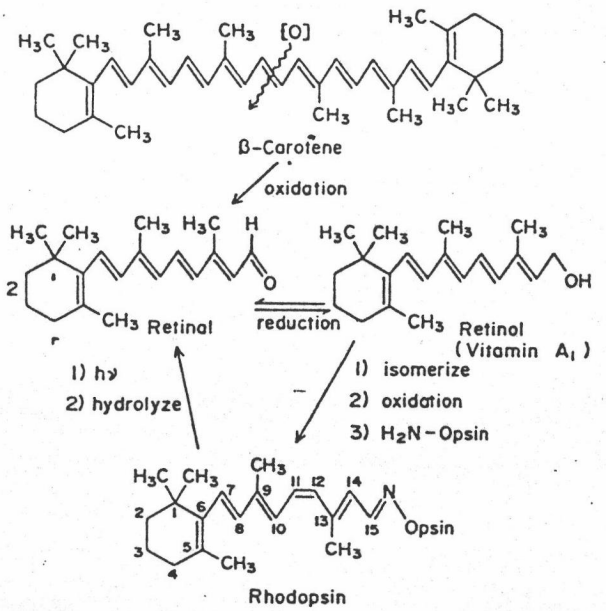
แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นสารประเภทโพลีอีน (polyenes) แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

1. แคโรทีน (carotene-hydrocarbon) เช่น แกมมาแคโรทีน (ɣ-carotene) เบตา-แคโรทีน (β-carotene) และ แอลฟาแคโรทีน (∝-carotene)
2. แซนโทฟิล (xanthophylls-oxygenated hydrocarbons) เช่น คริปโตแซนธิน (cryptoxanthin) และลูทีอิน (lutein) เป็นต้น

เบตา-แคโรทีน (β-carotene) เป็นรงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์กลุ่มแคโรทีน มีโครงสร้างพื้นฐาน (basic structure) ประกอบด้วยไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid $CH_2=\overset{CH_2}{\overset{|}{C}}-CH=CH_2$) 8 หน่วย มาต่อกันเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีจำนวนคาร์บอน 40 อะตอม โดยมีปลายทั้งสองข้างเป็นวงแหวนเบตา-ไอโอโนน (β-ionone ring) ดังรูปที่ 1 ซึ่งวงแหวนเบตา-ไอโอโนน เป็นโครงสร้างสำคัญของเบตา-แคโรทีน ที่ทำให้เบตา-แคโรทีน มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับวิตามินเอ (รูปที่ 2) (1 2 3 4)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของเบตา-แคโรทีน



รูปที่ 2 การสังเคราะห์วิตามินเอจากเบตา-แคโรทีน

เบตา-แคโรทีน เป็นสารที่สิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์ (biosynthesis) ขึ้นได้ (5) จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์เบตา-แคโรทีนได้ ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่าย ดังแสดงในตารางที่ 1 (3) ในต่างประเทศมีการผลิตสารดังกล่าวในเชิงพาณิชย์ เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร สีเคลือบเม็ดยา สีผสมในยาน้ำบางอย่าง เพื่อให้คงรูป เป็นสารแทนนิ่งเอเจนต์ (tanning agent) ในเครื่องสำอางค์ ใช้เป็นสารที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับวิตามินเอ ใช้เป็นอาหารเสริมในอาหารสัตว์ (feed additives) และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีผลในการต่อต้านเซลล์เนื้องอกในคน และเซลล์มะเร็งของหนูทดลอง (6 7 8 9 10)

ในปัจจุบันการใช้สีผสมอาหาร และยา รวมทั้งวิตามินเอ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก การใช้สารชนิดที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคย่อมมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงถึง โดยทั่วไปสีชนิดที่ปลอดภัยไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค ควรเป็นสารที่ไม่ได้ผลิตโดยอาศัยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) แต่ควรได้มาจากสิ่งที่มีชีวิตซึ่งมีขบวนการสังเคราะห์รงควัตถุนั้นตามธรรมชาติ (biosynthesis) จนถึงปัจจุบันในประเทศไทย

ยังไม่มีการผลิตรงควัตถุดังกล่าวในเชิงพาณิชย์ ผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหมายที่จะศึกษาถึงการผลิตเบตา-แคโรทีน ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดที่มีประโยชน์ และมีที่ใช้มาก ซึ่งสามารถผลิตขึ้นได้ โดยการสังเคราะห์จากธรรมชาติ การวิจัยนี้มุ่งจะใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งของรงควัตถุ เนื่องจากสามารถควบคุมการเพาะเลี้ยง และการเติบโตของจุลินทรีย์ได้ การผลิตรงควัตถุในปริมาณมาก โดยการเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์นั้นทำได้ไม่ยาก รวมทั้งการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการที่จะเพิ่มผลผลิตก็มีความเป็นไปได้สูง การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทำได้ง่าย และสะดวกกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช หรือเนื้อเยื่อพืชเป็นอันมาก (11) จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ที่มีผู้ศึกษาไว้ เช่น ยีสต์ ได้แก่ *Rhodotorula* sp. (12) และ *Phaffia rhodozyma* (13) รา ได้แก่ *Blakeslea trispora* (14) และ *Ustilago scabiosae* (15) แบคทีเรีย ได้แก่ *Mycobacterium marinum* และ *Sarcina lutea* (16) เป็นต้น

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์เบต้า-แคโรทีน

วงศ์ (Family)	เอกสารอ้างอิง
<u>แบคทีเรีย</u>	
Micrococcaceae	Zopf (1891)
Corynebacteriaceae	Saperstein et al. (1954)
Mycobacteriaceae	Goodwin (1954)
Hyphomicrobiaceae	Ryvarden and Jenzen (1964)
Bacillaceae	Chargaff and Lederer (1935)
Thiorhodaceae	Conti and Benediet (1962)
<u>รา</u>	
Phycomycetes	Karrer and Kraus-Voith (1947)
Ascomycetes	Haxo (1949)
Basidiomycetes	Heim (1946)
Fungi Imperfecti	Villoutreise (1961)
<u>สาหร่าย</u>	
Bacillariophyta	Strain et al. (1939)
Chloraphyta	Carter et al. (1939)
Chrysophta	Dales (1960)
Cyanophyta	Heilbron (1946)
Euglenophyta	Strain (1951)
Pyrrophyta	Strain (1951)
Phaeophyta	Strain et al. (1939)
Rhodophyta	Carter et al. (1939)
Xanthophyta	Strain (1951)

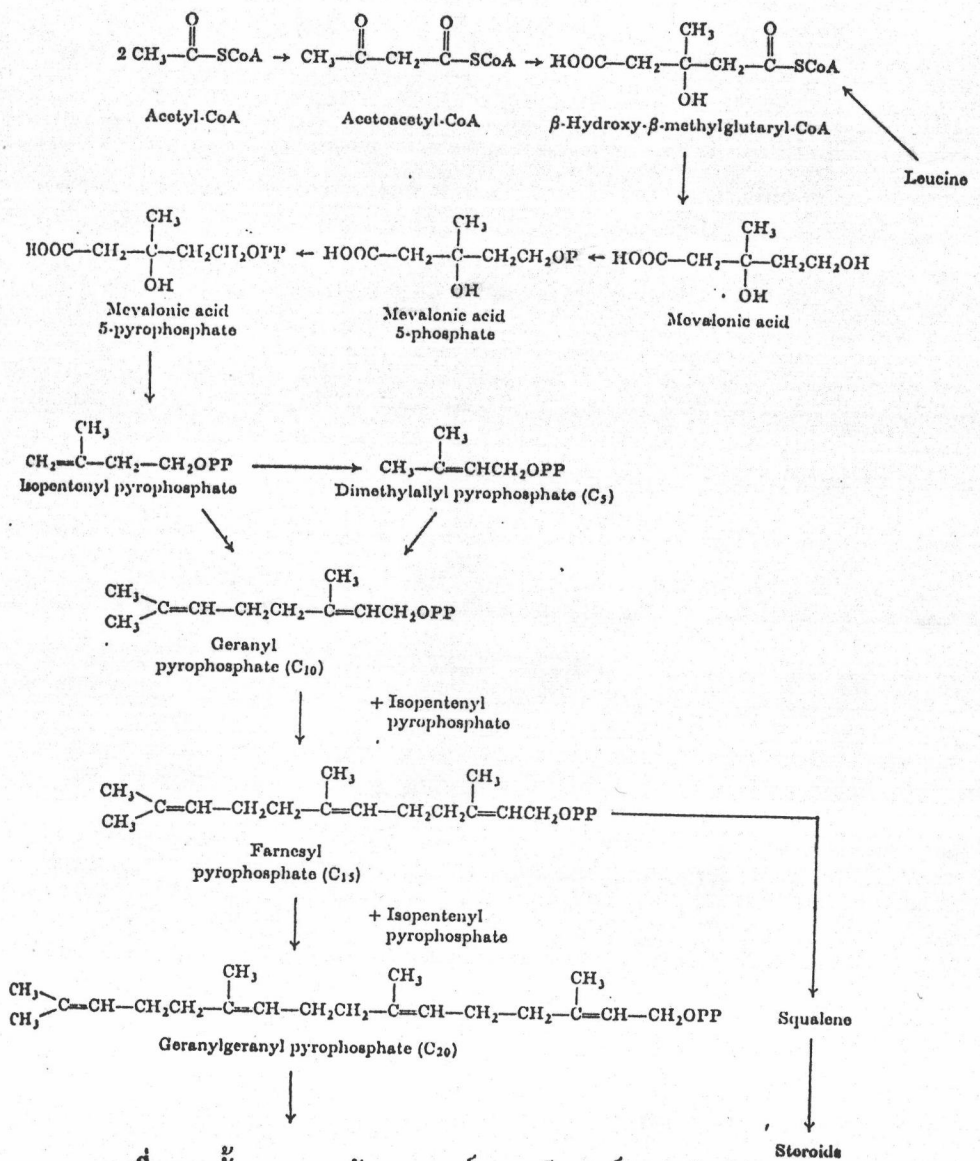
2. การสังเคราะห์ทางชีวภาพ

การสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ทางชีวภาพ มี 3 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 3 (1) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1. สร้างสารตั้งต้นเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ที่มีคาร์บอนจำนวน 5 อะตอม ได้แก่ Dimethylallyl pyrophosphate (C_5)

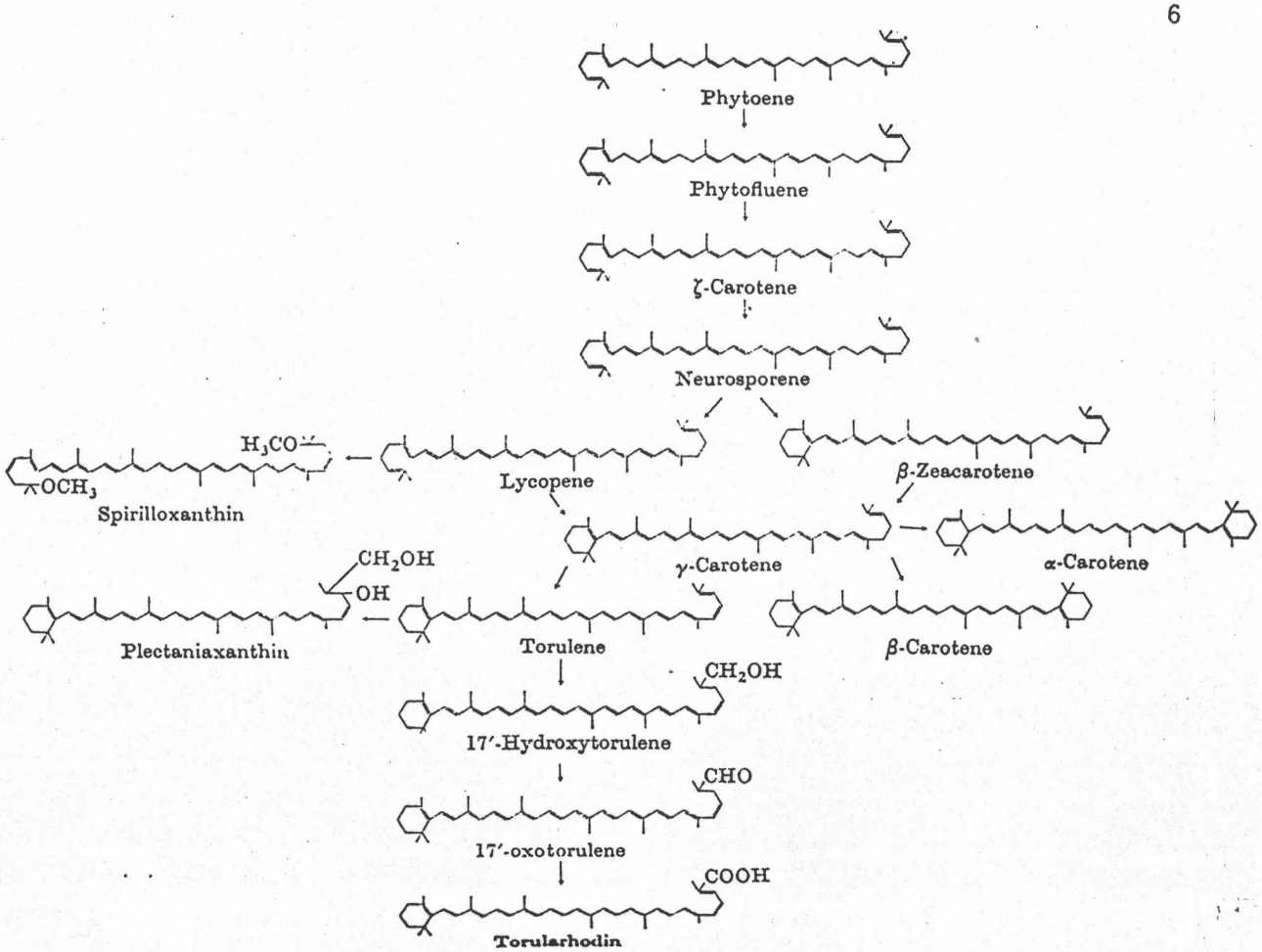
2. เพิ่มจำนวนคาร์บอนในโมเลกุล จนได้สารประกอบที่มีคาร์บอน 40 อะตอม คือ Phytoene (C_{40})

3. มีการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างของโมเลกุลที่ประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม ได้เป็นแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ



รูปที่ 3 ขั้นตอนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ทางชีวภาพ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 (ต่อ) ขั้นตอนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ทางชีวภาพ

3. สมบัติทางเคมี

เบตา-แคโรทีน (β-carotene $C_{40}H_{56}$) มีน้ำหนักโมเลกุล 536.85 มีคาร์บอนร้อยละ 89.94 และไฮโดรเจนร้อยละ 10.51 มีผลึกสีแดงเข้มเป็นรูป hexagonal prisms จุดหลอมเหลว 183° ซ เมื่อนำมาเจือจางในตัวทำละลายจะมีสีเหลือง (17) เบตา-แคโรทีน สามารถละลายได้ในตัวทำละลายไขมัน (fat soluble solvent) เช่น เบนซีน ปิโตรเลียมอีเธอร์ คลอโรฟอร์ม คาร์บอนไดซัลไฟด์ และละลายได้เล็กน้อยในเอธานอล (2)เบตา-แคโรทีนมีความไว (sensitive) ต่อแสง ความร้อน ออกซิเจน แต่จะเสถียร (stable) ต่อความร้อนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอยู่ด้วย เบตา-แคโรทีนจะถูกทำลายได้โดย กรด ด่าง เอนไซม์ไลพอซีจีเนส (lipocygenases) และแสง โดย

เฉพาะอย่างยิ่งการถูกทำลายจะมีมากขึ้นถ้ามีออกซิเจน หรือโลหะหนักบางชนิดอยู่ด้วย ในขั้นตอนการถูกทำลายนี้จะมีผลต่อการสร้างรูปของ ซิส-ทรานไอโซเมอร์ (formation of cis-trans isomers) และสายของโครงสร้างเบตา-แคโรทีน จะถูกทำลาย มีผลทำให้สีจางลง หรือไม่มีสี และสูญเสียแอคติวิตีของวิตามินเอ ระหว่างที่ทำการสกัดเบตา-แคโรทีนออกจากเซลล์จุลินทรีย์ หรือขั้นตอนการวิเคราะห์สาร จะต้องระวังไม่ให้สารเบตา-แคโรทีนถูกแสง (sunlight mercury lamps และ fluorescent lights) ออกซิเจน ความร้อน กรด ด่าง และเอนไซม์พวกที่ย่อยไขมัน (lipoxy type enzymes) การเก็บรักษาจะต้องแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20° ซ. ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน หลีกเลี่ยงการเก็บสารในตัวทำละลายอะซิโตน หรือคลอโรฟอร์ม ควรเก็บในปิโตรเลียมอีเธอร์ หรือเบนซีน และควรใช้สารแอนติออกซิแดนท์และซัลไฟด์ เพื่อป้องกันการถูกออกซิไดซ์ (2)

สารแคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสง ต่างๆ กัน โดยที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorption) ขึ้นอยู่กับชนิดของแคโรทีนอยด์ และตัวทำละลายที่ใช้ละลาย ดังตารางที่ 2 (18)

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ในตัวทำละลายแต่ละชนิด

Carotenoid	Hexane			Ethanol			Acetone			Chloroform			Benzene			Petroleum Ether		
Astaxanthin		468			478			480			485			478			468	
Cathaxanthin		467			474			482			480			463				
α-Carotene	420	422	472	423	444	473	424	448	476	433	457	484				422	444	473
β-Carotene	(425)	450	477	(429)	452	478	(429)	452	478	435	461	485	(435)	462	487	(425)	448	475
β Carotene 5,6-epoxide	423	444	473								459	492		460	492		447	478
β-Carotene 5,6,5',6'-epoxide	417	440	468	418	442	471				424	448	477	426	451	481		443	471
γ-Carotene	437	462	492	(440)	460	489	(439)	461	491	446	475	509	447	477	510	437	462	494
ξ-Carotene	380	400	425				384	405	430							378	462	494
β-Cryptoxanthin	(425)	446	475	(428)	449	473				(435)	459	485				425	449	476
Echinenone	(423)	459	(483)		461			460			471			470	(490)		456	(482)
Lutein	420	445	475	422	455	474				435	458	485	433	458	487	421	445	474
Lycopene	448	473	504	446	472	503	448	474	505	485	484	581	455	487	522	446	472	505
Neurosporene	416	440	470	416	441	470				424	451	480				414	439	467
Phytoene	276	286	197	277	287	298				280	291	303				276	296	298
Phytofiene	331	347	366							337	354	374				331	347	367
β Zeaxanthin	407	427	454	(405)	428	455				(414)	439	465				406	428	454
Zeaxanthin	(426)	450	480	(428)	450	478		452	479	(434)	459	488	(440)	463	491	424	449	476

4. การเพิ่มผลผลิตโดยวิธีทางชีวภาพ

เนื่องจากการสร้างและการสะสมเบตา-แคโรทีน โดยจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความสามารถของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม (genetic control) (15) อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมต่างๆ และสภาวะในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น จึงได้มีผู้ศึกษาวิจัยองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ และงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งที่จะเลือกใช้วัตถุดิบที่หาได้ง่าย และมีราคาถูกเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน

Costa (1987) รายงานว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เหมาะสมต่อการเติบโต และการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน โดย *Rhodotorula* sp. (12) การศึกษาต่อมาโดย Matelli และคณะ (1990) ได้ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้ซูโครสบริสุทธิ์เลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula* sp. (สายพันธุ์เดียวกันกับของ Costa) พบว่ามีผลทำให้การเติบโตและการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีนสูงขึ้น (19) Chu และคณะ (1960) พบว่าน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส และกาแลคโตส) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน และได้พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อรา *Choanephora cucurbitarum* (20) Lampila และคณะ (1985) รายงานว่าการใช้น้ำตาลจากหางนม (whey) ซึ่งเป็นของเหลือใช้แทนการใช้น้ำตาลแลคโตสบริสุทธิ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Blakeslea* sp. ได้ทำให้การเติบโตและการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีนโดย *Blakeslea* sp. เพิ่มขึ้น (21) Haard (1988) ศึกษาการผลิตแอสตาแซนธิน (astaxanthin) จากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* โดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน (22)

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ที่มีผู้ได้ศึกษาวิจัยได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับการเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula* sp. (12) กรดกลูตามิกเหมาะสำหรับเชื้อรา *Choanephora cucurbitarum* (20) และ *Rhodotorula gracilis* (1) ยูเรียเหมาะสำหรับ *Mycobacterium phlei* (9) กากถั่วเหลืองไฮโดรไลส์ เหมาะสำหรับเชื้อรา *Blakeslea trispora* NRRL 2456 (23) เป็นต้น

สภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเติบโตและการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน

ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ (ออกซิเจน) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ อุณหภูมิขณะเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเติบโตและปริมาณเบตา-แคโรทีน อุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Blakeslea trispora* เท่ากับ 28° ซ. (23) ส่วน *Rhodotorula* sp. เท่ากับ 27° ซ.(12) และสำหรับ *Mycobacterium marinum* เท่ากับ 30° ซ. (16) จุลินทรีย์บางชนิดมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกว้าง โดยที่ปริมาณเบตา-แคโรทีนไม่เปลี่ยนแปลง เมื่ออุณหภูมิต่ำลง (โดยปกติเมื่ออุณหภูมิต่ำลงจะมีผลไปลดการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน) เช่น *Rhodotorula samniei* (14° - 25° ซ.) *Rhodotorula rubra* และ *Rhodotorula penaus* (5° - 25° ซ.) และ *Phycomyces blakesleeanus* (5° - 25° ซ.) (24)

โดยปกติออกซิเจนมีความจำเป็นต่อการเติบโต และการสังเคราะห์รงควัตถุเบตา-แคโรทีนของเชื้อที่ต้องการออกซิเจน (aerobic type) โดยที่ความต้องการปริมาณออกซิเจนจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ สำหรับแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ไม่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต และในการสร้างเบตา-แคโรทีน ถ้ามีออกซิเจนจะมีผลให้ปริมาณเบตา-แคโรทีนลดลง (24) Eric และคณะ (1979) ศึกษาผลของการให้อากาศแก่ *Phaffia rhodozyma* พบว่าสภาวะที่ให้อากาศปริมาณน้อย (microaerophillic condition) มีผลให้แอสตาแซนธินลดลง แต่เบตา-แคโรทีนเพิ่มขึ้น (13) Mathews (1963) รายงานว่า *Mycobacterium marinum* จะสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เมื่อมีออกซิเจนเท่านั้น (16)

เนื่องจากการเติบโตของจุลินทรีย์ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ซึ่งมีเอนไซม์เป็นสิ่งสำคัญ และการทำงานของเอนไซม์จะเกิดได้เมื่อความเป็นกรดด่างเหมาะสม ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม ต่อการเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป สำหรับยีสต์ และเชื้อรา ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะอยู่ช่วง 4.5-5.5 ความเป็นกรดด่างที่ต่ำที่สุด และสูงที่สุด ที่ยีสต์และเชื้อรายังสามารถเติบโตได้ อยู่ช่วง 2-3 และ 7-8 ตามลำดับ (25) ตัวอย่างเช่น ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม สำหรับ *Rhodotorula* sp. อยู่ช่วง 5.5-6.5 (12) สำหรับ *Rhodotorula rubra* TISTR 5127 เท่ากับ 4.5 (27) และ *Blakeslea trispora* เท่ากับ

6.2 (27) ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโต และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีนในบางสายพันธุ์จะแตกต่างกันเช่น การเติบโตของ *Phycomyces blakesleeanus* จะเกิดได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.2 แต่การสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน จะเกิดได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5-3.0 และสำหรับการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน โดย *Choanephora cucurbitarum* จะเกิดได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 (24)

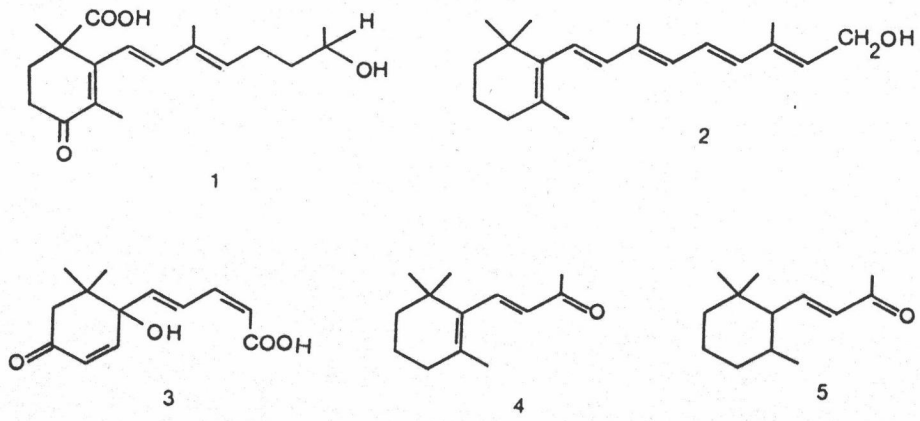
นอกจากแหล่งอาหารคาร์บอน และแหล่งอาหารไนโตรเจน และสภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเติบโต และการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน อีก ได้แก่ การให้แสงขณะเลี้ยงเชื้อ วิตามิน แร่ธาตุบางชนิด สภาวะการขาดสารอาหาร การเติมสารบางชนิด เช่น น้ำมันพืช ดีเทอร์เจนต์ (detergent) เบตา-ไอโอโนน (β-ionone) กรดแอบซิสิค (abscisic acid) โซเดียมซัคซิเนท (Na-succinate) วิตามินเอ สารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) และคีโรซีน (kerosene) ซึ่งได้มีผู้วิจัยผลของปัจจัยดังกล่าวต่อการเติบโต และการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ได้รายงานไว้ดังนี้ Kawakami และคณะ (1956) รายงานว่าไทอามีน (thiamine) เป็นสารที่จำเป็นต่อการเติบโต และการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในเชื้อรา *Blakeslea trispora* (28) และช่วยเพิ่มแอคติวิตีของการหมัก (29)ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไทอามีนต่ำมีผลไปลดการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์โดย *Phycomyces blakesleeanus* (24) การทำงานของเอนไซม์บางชนิดภายในเซลล์ ต้องการอิออนของโลหะเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เพื่อทำหน้าที่เป็นโค-แฟคเตอร์ (co-factor) เช่น Zn^{2+}เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ carboxy peptidase carbonic anhydrase และ alcohol dehydrogenase Fe^{2+}เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ catalase ferredoxin และ cytochroms peroxidase Cu^{2+}เป็นโคเอนไซม์ของ tyrosinase และ cytochrome oxidase เป็นต้น (5) ดังนั้นอิออนของโลหะบางชนิดจึงมีความจำเป็นต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ และต้องการปริมาณเพียงเล็กน้อย Grimn และ Allen (1954) พบว่า *Ustilago sphaerogena* จะสร้างและสะสมแคโรทีนอยด์เมื่อเชื้อเติบโตในอาหารที่มี Zn^{2+} 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเท่านั้น (30) Will และคณะ (1982) พบว่าเซลล์ของ *Ustilago violacea* จะเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีชมพูเมื่อ

เติบโตในอาหารที่มี Zn^{2+} 1 กรัม/ลิตร (31)

Costa และคณะ (1987) ได้พบว่าเมื่อย้ายเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula* sp. จากอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะที่มีการเติบโตสูงสุดไปไว้ในน้ำกลั่น (ซึ่งเป็นสภาวะที่ขาดแคลนสารอาหาร) ปริมาณเบตา-แคโรทีน เพิ่มขึ้นจาก 130 เป็น 630 ไมโครกรัม/กรัมเซลล์ การเพิ่มปริมาณของเบตา-แคโรทีน อาจเนื่องมาจากการย้ายเซลล์มาไว้ในน้ำกลั่นซึ่งไม่มีสารอาหาร ทำให้ขบวนการไฮโดรจีเนชั่น (hydrogenation) ของแกมมา-แคโรทีนไปเป็นโทลูลีน (torulene) ถูกขัดขวาง แต่การเกิดการไซโคลเซชั่น (cyclization) ของแกมมา-แคโรทีนไปเป็นเบตา-แคโรทีน เกิดขึ้นตามปกติ (12)

ในการเพิ่มการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ โดยเชื้อราในกลุ่ม Mucorales Lampila และคณะ (1985) รายงานว่าในปี ค.ศ. 1956 Barnett และคณะพบว่าเมื่อนำสายพันธุ์บวก (+) และลบ (-) ของ *Chonephora cucurbitarum* มาเลี้ยงด้วยกันแล้ว เชื้อนี้จะผลิตเบตา-แคโรทีน เพิ่มมากกว่าเดิม 15-25 เท่า (14) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ทั้งสองรวมกัน เชื้อจะสร้างกรดไตรสปอริค (trisporic acid) ซึ่งอาจจะมีหน้าที่เป็นดีรีเพรสเซอ (derepressor) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน (conversion) 5-phosphomevalonate ไปเป็น dimethylallyl pyrophosphate ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของการสร้างหน่วยไอโซพรีน (หน่วยย่อยของการสังเคราะห์สารพวกแคโรทีนอยด์ และสเตอรอล (sterols))(32) การวิจัยต่อมาได้นำสารชนิดอื่นที่มีโครงสร้างบางส่วนคล้ายกับ กรดไตรสปอริค มาศึกษาผลการกระตุ้นการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ Satya และ คณะ (1980) ได้ศึกษาผลของกรดไตรสปอริคในการกระตุ้นการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน โดย *Blakeslea trispora* NRRL 2896 และยังได้ศึกษาผลของสารอื่นบางชนิดด้วย ได้แก่ กรดแอบซิสิค เบตา-ไอโอโนน แอลฟา-ไอโอโนน และวิตามินเอ ซึ่งสารเหล่านี้ต่างมีโครงสร้างคล้ายกับ กรดไตรสปอริค ดังแสดงในรูปที่ 4 และได้พบว่าเมื่อมีการเติมกรดแอบซิสิค ($9.5X10^{-4}$ มิลลิโมล) วิตามินเอ (0.18 มิลลิโมล) และเบตา-ไอโอโนน (0.57 มิลลิโมล) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลกระตุ้นให้ *Blakeslea trispora* มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นร้อยละ 100 ร้อยละ 82 และร้อยละ 148 ตามลำดับ (33)

ผลของการเติมเบตา-ไอโอโนนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ 1. กรดไตรสปอริค 2. วิตามินเอ
3. กรดแอบซิสิค 4. เบตา-ไอโอโนน 5. แอลฟา-ไอโอโนน

เบตา-แคโรทีน ให้สูงขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ปริมาณที่เติม เวลาที่เติม และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (20) ในการทดลองของ Anderson และคณะ (1958) พบว่าเมื่อเติมเบตา-ไอโอโนน เพียงอย่างเดียว การสร้างเบตา-แคโรทีนลดลง แต่เมื่อมีการเติมน้ำมันพืชร่วมกับเบตา-ไอโอโนน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยการกระตุ้นการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ให้เพิ่มขึ้นกว่าการเติมน้ำมันพืช หรือเบตา-ไอโอโนนเพียงอย่างเดียว(27) Chu และคณะ (1960) พบว่าการเติมเบตา-ไอโอโนน ปริมาณ 5 ไมโครลิตร/ 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชม. มีผลให้เชื้อ *Choanephora cucurbitarum* สังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ได้สูงขึ้นกว่าการเติมเบตา-ไอโอโนน ก่อนหรือหลัง 48 ชม. (20)

Ciegler และคณะ (1959) พบว่าการเติมน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันเมล็ดฝ้าย (cottonseed oil) และน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งมีกรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) อยู่มาก จะมีผลต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ใน *Blakeslea trispora* ให้สูงขึ้น (23)

Anderson และคณะ (1958)ได้ศึกษาผลของดีเทอร์เจนท์ประเภทที่เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีอิออน (nonionic surface-active agent) บางชนิด เช่น triton x-100 ในเชื้อที่มีการผสมพันธุ์ระหว่างต่างสายพันธุ์ (mate cultures) ของ *Blakeslea*

trispora มีผลทำให้เพิ่มการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน สูงขึ้น เนื่องจากสารนี้จะไปทำให้สายใยของ *Blakeslea trispora* กระจายได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน ทำให้สายใยได้รับออกซิเจน และอาหารเพียงพอ (27)

Somnuke และคณะ (1989) ศึกษาผลของการเติมโซเดียมซัคซิเนท ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Rhodotorula rubra* TISTR 5127 พบว่าปริมาณเบตา-แคโรทีนเพิ่มสูงขึ้น (26)

Ciegler และคณะ (1962) พบว่าการเติมคีโรซีน (kerosene) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้การสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน ใน *Blakeslea trispora* เพิ่มขึ้น 2 เท่า แต่ไม่ทราบหน้าที่ของสารนี้ว่าไปกระตุ้นการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน อย่างไร สันนิษฐานว่าอาจจะไปชักนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ หรืออาจจะไปเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผนังเซลล์ ทำให้มีการปลดปล่อยแคโรทีนอยด์ ออกมา เป็นการป้องกันการยับยั้งการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์แบบ end-product inhibition (34)

เนื่องจากความเสถียร (stability) ของเบตา-แคโรทีน ภายในเซลล์ต่ำ ดังนั้นจึงมีการเติมแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเพื่อป้องกันไม่ให้เบตา-แคโรทีน ถูกออกซิไดซ์ (9) Zajic (1960) ได้ทดลองเติมสารแอนติออกซิแดนท์แต่ละชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Blakeslea trispora* พบว่าสารแอนติออกซิแดนท์ 2,6-ditertiarybutyl-4-methylphenol เป็นแอนติออกซิแดนท์ที่ดีที่สุด ซึ่งช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุแคโรทีนให้เพิ่มสูงขึ้น (35)

จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการใช้แสงในการเติบโต (nonphotosynthetic microorganisms) อาจจะสร้างแคโรทีนอยด์ขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากแสง (photosensitization) โดยที่แคโรทีนอยด์จะไปลดสภาวะถูกกระตุ้น (excited state) ของออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (singlet oxygen) ทำให้ยับยั้งการเกิด ไลปิด เพอออกไซด์ (lipid peroxides) และ ฟรี แรดิคอล (free radicals) ผลทำให้ผนังเซลล์ไม่ถูกทำลาย (36 37) จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้จนกว่าเมื่อได้รับแสง จึงมีการสังเคราะห์รงควัตถุขึ้น Mathews (1963) พบว่า *Mycobacterium marinum* และ *Sarcina lutea* จะสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เมื่อได้รับแสงเท่านั้น (16) การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของจุลินทรีย์บางชนิด จะถูกกระตุ้นด้วยแสง Lampila(1985)

รายงานว่าการให้แสงขณะเลี้ยงเชื้อ *Blakeslea trispora* จะเพิ่มการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีนได้ (21)

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะผลิตเบตา-แคโรทีน เพื่อให้ได้ปริมาณมาก โดยให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ จึงได้พยายามศึกษาค้นคว้า แหล่งสารอาหารที่มีราคาถูก สภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโต และศึกษาปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเบตา-แคโรทีนในระดับขวดเขย่า แล้วขยายสู่ระดับขยายส่วน เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเบตา-แคโรทีนโดย *Rhodotorula* sp. Y1621

วัตถุประสงค์ของการทำวิจัยครั้งนี้

1. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีน
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีนโดย *Rhodotorula* sp. Y1621 ในระดับขวดเขย่า
3. ศึกษาผลของปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเบตา-แคโรทีนโดย *Rhodotorula* sp. Y1621 ในระดับขวดเขย่า
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการสังเคราะห์เบตา-แคโรทีนโดย *Rhodotorula* sp. Y1621 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร