จีรนันท์ ศรีพุทธา: การเพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodotorula paludigena* CM33 โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นสารตั้งต้นและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารของ *Litopenaeus vannamei* (ENHANCING CAROTENOIDS PRODUCTION OF *Rhodotorula paludigena* CM33 USING CRUDE GLYCEROL AS THE SUBSTRATE AND ITS APPLICATION IN DIETARY SUPPLEMENT OF *Litopenaeus vannamei*) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน, 112 หน้า.

คำสำคัญ: แคโรทีนอยด์/*Rhodotorula paludigena* CM33/กลีเซอรอลดิบ/*Litopenaeus vannamei*/โปรไบโอติก

Rhodotorula paludigena CM33 เป็น oleaginous yeast ที่มีการสะสมไขมันและแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่หนึ่งเพื่อการปรับปรุงการใช้ประโยชน์ของกลีเซอรอลดิบเป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง *R. paludigena* CM33 โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology: RSM) ออกแบบการทดลองเพื่อปรับปรุงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเพื่อเพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ชนิดนี้ จากการทดลองพบว่า วิธีการพื้นผิวตอบสนองการใช้กลีเซอรอลดิบเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ 0.72 กรัมต่อลิตร, และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.43 กรัมต่อลิตร มีค่าแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 328 ไมโครกรัมต่อกรัม และหลังจากผ่านการหมักแบบกึ่งกะในถังหมักขนาด 500 ลิตร มีผลน้ำหนักแห้งของเซลล์ และแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 45.38±1.05 กรัมต่อลิตร และ 15.39±0.03 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยง *R. paludigena* CM33 ด้วยกลีเซอรอลดิบร่วมกับการหมักแบบกึ่งกะในถังหมักขนาด 500 ลิตรส่งผลต่อความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ที่สองปรับปรุงกระบวนการเก็บเกี่ยว สกัด และแยกแคโรทีนอยด์จากเซลล์ของ *R. paludigena* CM33 โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยกระบวนการกรองขนาดเล็ก (Microfiltration) และทำการทำลายผนังเซลล์และสกัดแคโรทีนอดย์ด้วยเครื่องลดขนาดอนุภาค (high-pressure homogenizer : HPH) โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองออกแบบการทดลอง และทำการแยกแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสำหรับวิเคราะห์เตรียมสารสำคัญ (preparative high-performance liquid chromatography : prep HPLC) และสุดท้ายวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC, LC-MS, และ NMR ผลการวิจัยพบว่าส่วนต้านทานของของแข็งที่ค้างบนแผ่นกรอง (Cake) มีค่าเท่ากับร้อยละ 85.38 และสำหรับส่วนต้านทานจากการดูดซับมีค่าเท่ากับร้อยละ 12.62 ในส่วนของผลการทำลายผนังเซลล์และสกัดแคโรทีนอยด์ด้วย HPH โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองในการออกแบบการทดลอง พบว่าการใช้ความดัน 30,000 psi, การทำการผ่าน 4 ครั้ง,

และการใช้เซลล์ยีสต์ร้อยละ 5 นำไปสู่การทำลายเซลล์ที่เพิ่มขึ้น และหลังจากผ่าน prep HPLC ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC, LC-MS, และ NMR ยืนยันการตรวจพบแคโรทีนอยด์หลักคือเบต้า-แคโรทีน แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของกระบวนการกรองขนาดเล็ก ทำลายผนังเซลล์และสกัดแคโรทีนอดย์ด้วยเครื่องลดขนาดอนุภาค และเครื่องโครมาโทกราฟีสำหรับวิเคราะห์เตรียมสารสำคัญ มีการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการเก็บเกี่ยว สกัดและแยกแคโรทีนอยด์ในเซลล์ *R. paludigena* CM33

นอกจากนี้วัตถุประสงค์ที่สามคือการศึกษาศักยภาพของ *R. paludigena* CM33 สำหรับเป็นโปรไบโอติกสำหรับกุ้งขาว โดยการศึกษานี้ได้ประเมินผลของระดับต่างๆ ของ *R. paludigena* CM33 (RD) ที่ผสมกับอาหารกุ้งต่อการเติบโตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ต่อการเจริญเติบโต การแสดงของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน สุขภาพลำไส้ ความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}) และส่วนประกอบของเนื้อกุ้ง ผลการวิจัยพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ร้อยละ 1, 2 และ 5 มีอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนัก และอัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุม และการให้อาหารผสมยีสต์ร้อยละ 5 ส่งผลทำให้มีการลดการตายสะสมเมื่อถูกทดสอบกับ VP_{AHPND} อีกทั้งยังมีการแสดงของ immune-responsive genes เช่น โปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase-2: PO2) และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (superoxide dismutase: SOD, glutathione peroxidase: GPX, และ catalase: CAT), JAK/STAT pathway (signal transducer และ activator of transcription: STAT, gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase: GILT), IMD pathway (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta และ epsilon: IKKb and IKKe) และ Toll pathway (Lysozyme) เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ร้อยละ 5 และนอกจากนี้การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในลำไส้กุ้ง แสดงให้เห็นถึงผลของระดับของสายพันธุ์ *Vibrio* ลดลงในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ร้อยละ 5 ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มีประโยชน์อย่างสายพันธุ์ *Bifidobacterium* ในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ร้อยละ 5 เช่นเดียวกัน ในส่วนของการวิเคราะห์ส่วนประกอบของเนื้อกุ้ง แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของโปรตีนและไขมัน ซึ่งส่วนประกอบดังกล่าวเป็นสารอาหารที่สำคัญ ดังนั้น ผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงความสามารถของ *R. paludigena* CM33 ในการเป็นโปรไบโอติกในอาหารกุ้งที่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต ความต้านทานต่อโรค VP_{AHPND} และเพิ่มคุณภาพเนื้อกุ้งโดยการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและไขมันในกุ้งได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

CHEERANAN SRIPHUTTHA: ENHANCING CAROTENOIDS PRODUCTION OF *Rhodotorula paludigena* CM33 USING CRUDE GLYCEROL AS THE SUBSTRATE AND ITS APPLICATION IN DIETARY SUPPLEMENT OF *Litopenaeus vannamei*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. APICHAT BOONTAWAN, Ph.D., 112 PP.

Keyword: Carotenoids/*Rhodotorula paludigena* CM3/Crude glycerol/*Litopenaeus vannamei*/Probiotic

Rhodotorula paludigena CM33 is an oleaginous yeast that accumulates lipids and carotenoids intracellularly. The first objective of this study was to improve the utilization of crude glycerol, as a substrate for cultivating *R. paludigena* CM33 and to use the Response Surface Methodology (RSM) to optimize factors influencing its growth and enhance carotenoid production. The results of this study revealed that the optimal conditions for carotenoid production were achieved by using 40 g/L of crude glycerol, 0.72 g/L of yeast extract, and 0.43 g/L of $(NH_4)_2SO_4$, resulting in a carotenoid yield of 382 µg/g. The maximum dry cell weight and carotenoid concentration obtained were 45.38±1.05 g/L and 15.39±0.03 mg/g, respectively, in 500-L fed-batch fermentation. The findings demonstrate that culturing *R. paludigena* CM33 with crude glycerol, combined with fed-batch fermentation in a 500-liter fermenter, efficiently enhances the carotenoid concentration.

The second objective was to improve the harvesting, extraction, and separation of carotenoids from the cells of *R. paludigena* CM33. This was achieved by harvesting the cells through a microfiltration process, then disrupting the cell walls and extracting carotenoids using a high-pressure homogenizer (HPH) in experiment design with the RSM. The carotenoids were subsequently separated using preparative high-performance liquid chromatography (prep HPLC), and their types were analyzed using HPLC, LC-MS, and NMR techniques. The results revealed that the cake accounted for 85.38% of the overall resistance, while the adsorption resistance accounted for 12.62%. The use of HPH for cell disruption and carotenoid extraction, along with RSM, revealed that a pressure of 30,000 psi, 4 passes, and a 5% feed led to increased cell disruption. After passing through prep HPLC, the analysis using HPLC, LC-MS, and NMR techniques confirmed the identification of the main carotenoid as β-carotene. These results

demonstrated the potential of microfiltration, cell disruption, and carotenoid extraction using a high-pressure homogenizer, as well as preparative HPLC for efficient carotenoid extraction and separation in *R. paludigena* CM33 cells.

The third objective was to assess the effects of incorporating different levels of *R. paludigena* CM33 (RD) in the dietary composition on the growth, immune-related gene expression, intestinal health, resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}) infection, and meat composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The results demonstrated significant improvements in the specific growth rate, weight gain, and survival of shrimp fed with 1% RD, 2% RD, and 5% RD. Administration of 5% RD led to a reduction in cumulative mortality following the VP_{AHPND} challenge. Furthermore, the expression levels of immune-responsive genes, such as the proPO system (prophenoloxidase-2: PO2), antioxidant enzymes (superoxide dismutase: SOD, glutathione peroxidase: GPX, and catalase: CAT), JAK/STAT pathway (signal transducer and activator of transcription: STAT, gamma interferon-inducible lysosomal thiol reductase: GILT), IMD pathway (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta and epsilon: IKKb and IKKe), and Toll pathway (Lysozyme) genes, were up-regulated in the 5% RD group. Microbiome analysis revealed that the genus level, *Vibrio* was found to be reduced in the 5% RD group, whereas the abundance of potentially beneficial bacteria, such as *Bifidobacterium*, increased. The 5% RD group exhibited a significant increase in crude protein and crude lipid levels, which are essential nutrients. These results indicate that *R. paludigena* CM33 has the potential to serve as a probiotic supplement in shrimp feed, improving growth, disease resistance against VP_{AHPND}, and meat quality by increasing protein and lipid content in shrimp.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2022

Student's Signature ____
Advisor's Signature ____
Co-Advisor's Signature ____
Co-Advisor's Signature ____