



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การผลิตสารแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จาก เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เป็นของเหลือจาก โรงงานอุตสาหกรรม”

โดย รศ. ดร. นวลศรี รักอริยะธรรมและคณะ

กุมภาพันธ์ 2548

สัญญาเลขที่ BGJ/18/2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การผลิตสารแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จาก
เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เป็นของเหลือจาก
โรงงานอุตสาหกรรม”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-------------------------------|----------------------------|
| 1. รศ. ดร. นवलศรี รักษิระธรรม | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ |
| 2. นางสาว จิดาภา ทิน้อย | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ |
- มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

จากการนำวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด ได้แก่ กากมัสตาร์ด (Mustard meal, MM) น้ำทั้งมัสตาร์ด และกากโปรตีนถั่วเขียว (Mung bean meal, MB) หลังกระบวนการผลิตวันเส้น ซึ่งเป็นวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและวันเส้น มาประยุกต์ใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสทาแซนทีน (astaxanthin) โดยทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบในวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดพบว่าประกอบด้วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 25-44 เปอร์เซ็นต์และคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 21-34 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบดังกล่าว โดยมีวิธีการเตรียม 2 วิธี คือการสกัดด้วยน้ำร้อน และการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 N ได้อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิดคือ Mustard Meal Extract (MME), Mustard Meal Hydrolysate (MMH), Mustard Residue Isolate Extract (MRIE), Mustard Residue Isolate Hydrolysate (MRIH), Mustard Precipitated Isolate Extract (MPIE), Mustard Precipitated Isolate Hydrolysate (MPIH), Mung Bean Extract (MBE) และ Mung Bean Hydrolysate (MBH) พบว่าลักษณะอาหารที่เตรียมได้โดยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนมีลักษณะใสและมีสีเหลือง ส่วนอาหารที่เตรียมได้โดยวิธีการย่อยสลายด้วยกรดมีลักษณะใสและสีเหลืองออกน้ำตาลเข้ม ยกเว้นอาหารที่เตรียมจาก MPI ซึ่งมีลักษณะใสและมีสีเหลืองคล้ายกับอาหารสังเคราะห์ yeast extract/malt extract (YM)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4% (w/v) พบว่าอาหารแต่ละชนิดมีปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดแตกต่างกัน พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MPIH เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากกว่าอาหารชนิดอื่น และเมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารแต่ละชนิดที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อพบว่า อาหาร MME และ MMH ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 20% w/v อาหาร MRIE, MRIH, MPIE, MBE และ MBH ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 15% w/v และอาหาร MPIH ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10% w/v เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีน เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารของเชื้อในอาหารแต่ละชนิดพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ได้มีสภาวะที่ใกล้เคียงกันคือ ที่ค่าพีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิในการบ่ม 20 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมงสำหรับอาหาร MME, MMH, MRIE, MRIH, MBE และ MBH ส่วนอาหาร MPIE และ MPIH เลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง จากการศึกษพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากที่สุด ในอาหาร MPIH โดยพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณสารแอสทาแซนทีนที่ได้มีค่าเท่ากับ 19.65 กรัมต่อลิตร และ 25.79 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือประมาณ 1,312 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์สารสกัดจากเซลล์เชื้อ *X. dendrorhous* ที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดพบว่า เชื้อสามารถสารแอสทาแซนทีนได้ 90-92 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสาร carotenoids ทั้งหมด

Abstract

The mustard meal (MM), mustard waste water (MRI and MPI) and mung bean meal that obtained from the Allyl isothiocyanate (AIT) production and Glass noodle production were prepared as substrate for growth of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and astaxanthin production. The chemical composition of all materials showed the high contents of protein (25-44%) and carbohydrate (21-34%). The preparation of media from these materials used the 2 different methods such as extraction by hot water and hydrolysis with 0.2 N H₂SO₄. The Mustard meal extract (MME), Mustard meal hydrolysate (MMH), Mustard residue isolate extract (MRIE), Mustard residue isolate hydrolysate (MRIH), Mustard precipitated isolate extract (MPIE), Mustard precipitated isolate hydrolysate (MPIH), Mung bean extract (MBE) and Mung bean hydrolysate (MBH) were obtained. The clarified and brownish media were obtained from the hot water extraction and acid hydrolysis respectively, except clarified MPIH. The initial concentration of all of media was investigated and found that the 20% (w/v) of MME and MMH media, 15% (w/v) of MRIE, MRIH, MPIE, MBE and MBH media and 10% (w/v) of MPIH medium were the optimal initial concentrations for growth and astaxanthin production by *X. dendrorhous*. The optimal condition for growth and astaxanthin production of all media was initial pH 5.5, incubation temperature of 20°C with the agitation rate of 200 rpm and cultivation time of 120 h. for MME, MMH, MRIE, MRIH, MBE and MBH media and of 96 h. for MPIE and MPIH media. The highest cell dry weight (19.65 g/L) and astaxanthin content (25.79 mg/L or 1,312 µg/g cell dry) were obtained from the cultivation *X. dendrorhous* in the MPIH medium with optimal condition. The astaxanthin that extracted from *X. dendrorhous* in this experiment found to be 90-92 % of total carotenoids.

The executive summary

สารกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) เป็นสารรงควัตถุที่จัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า ออกซีแคโรทีนอยด์ (oxycarotenoids) สารกลุ่มนี้เป็นสารรงควัตถุที่มีสีแดง ส้ม และเหลือง จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารกลุ่มดังกล่าวมีบทบาทสำคัญหลายประการเช่น เป็นสารที่นำไปผสมในอาหารสัตว์ ทำให้หนังสัตว์และไข่มีสีเหลืองหรือแดงมากขึ้น สามารถจำหน่ายได้ในราคาที่สูงกว่าเดิม นอกจากนี้ยังมีบทบาทที่สำคัญคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดมะเร็งและเนื้องอก สามารถประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรมได้ และในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าสารกลุ่มนี้มีมูลค่าสูงมาก

สารกลุ่มแซนโทฟิลล์สามารถพบได้ทั้งในธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี แต่เนื่องจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีนั้น ผ่านกระบวนการที่ค่อนข้างยุ่งยากหลายขั้นตอน และมีราคาสูงมาก ปัจจุบันผู้บริโภคสนใจใช้สารแซนโทฟิลล์ที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยและมีราคาถูกกว่า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตสารแซนโทฟิลล์ ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ โดยคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ชื่อ แอสทาแซนทีน (astaxanthin) ได้ในปริมาณที่สูงถึง 70-90 เปอร์เซ็นต์ของสารสีที่ผลิตได้ และปัจจุบันสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นส่วนใหญ่ เพราะนอกจากสารแอสทาแซนทีนมีคุณสมบัติในการให้สีในอาหารแล้ว ยังมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นถึง 10 เท่า งานวิจัยนี้ให้ความสนใจในการประยุกต์เอาวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ โดยวัตถุดิบเหลือทิ้งที่สนใจนำมาประยุกต์ใช้ ได้แก่ กากมัสตาร์ด และน้ำทิ้งมัสตาร์ดจากโรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด และกากโปรตีนถั่วเขียวจากโรงงานผลิตวุ้นเส้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต เนื่องจากการผลิตสารแซนโทฟิลล์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านมาส่วนใหญ่ใช้อาหารสังเคราะห์สำเร็จรูปซึ่งมีราคาสูงมาก จึงเป็นเหตุให้ราคาของสารแซนโทฟิลล์มีราคาสูงด้วย และการนำวัตถุดิบเหลือทิ้งมาประยุกต์ใช้นี้เป็นการลดปัญหามลภาวะเนื่องจากของเหลือทิ้งมีปริมาณสูง ตลอดจนเป็นการเพิ่มมูลค่าการใช้ประโยชน์ของวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วย

ขั้นตอนการผลิตสารแซนโทฟิลล์จากเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบกากมัสตาร์ด (mustard meal, MM) น้ำทิ้งมัสตาร์ด (mustard waste water, MW) และกากโปรตีนถั่วเขียว (mung bean meal, MB) โดยน้ำทิ้งมัสตาร์ดได้ทำการสกัดแยกสารสำคัญด้วยวิธีการเหวี่ยงและตกตะกอนในสภาวะกรด ได้สารสำคัญ 2 ชนิดคือ mustard waste residue isolate (MRI) และ mustard waste precipitated isolate (MPI) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบดังกล่าว ทำได้โดยการสกัดด้วยน้ำร้อน (boiling extraction) และการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 N (acid hydrolysis) ซึ่งทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบดังกล่าว 8 ชนิดคือ Mustard Meal Extract (MME), Mustard Meal Hydrolysate (MMH), Mustard waste Residue Isolate Extract (MRIE), Mustard waste Residue Isolate Hydrolysate (MRIH), Mustard waste Precipitated Isolate Extract (MPIE), Mustard

waste Precipitated Isolate Hydrolysate (MPIH), Mung Bean meal Extract (MBE) และ Mung Bean meal Hydrolysate (MBH) จากนั้นนำอาหารดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารแซนโทฟิลล์ในอาหารที่เตรียมได้แต่ละชนิด ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิและเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารแซนโทฟิลล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกันส่วนใหญ่ มีแตกต่างกันบ้างที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารและเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยสภาวะที่คล้ายกันคือ ค่าพีเอชของอาหารที่เหมาะสมประมาณ 5.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 20 องศาเซลเซียสโดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เวลาในการเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่เป็นระยะเวลานาน 120 ชั่วโมง ยกเว้นอาหาร MPIE และ MPIH เพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง จากการวิจัยพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เตรียมได้และศึกษาการผลิตสารแซนโทฟิลล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* ในสภาวะที่เหมาะสม อาหารชนิด MPIH เป็นอาหารที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแซนโทฟิลล์ชนิด แอสทาแซนทีน ได้มากที่สุด โดยสามารถผลิตได้สูงถึง 25.79 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือเท่ากับ 1,312 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ผ่านมามีพบว่า ปริมาณสารแซนโทฟิลล์ที่ผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MPIH มีปริมาณสูงกว่าอาหารสังเคราะห์สำเร็จรูปถึง 16 เท่าและเมื่อเทียบกับอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอื่นๆ พบว่ามีปริมาณสูงกว่าถึง 5-10 เท่า งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการนำเอาวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาประยุกต์เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อถือเป็นทางเลือกอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตสารแซนโทฟิลล์ในระดับอุตสาหกรรม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
The executive Summary	ค
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 สารแคโรทีนอยด์	1
1.1.1 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	1
1.1.2 สมบัติของสารแคโรทีนอยด์	2
1.1.3 บทบาทและความสำคัญของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์	3
1.1.4 แหล่งที่พบสารแคโรทีนอยด์	4
1.1.5 สมบัติของจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งผลิตสารสี	5
1.2 เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารแคโรทีนอยด์ในงานวิจัย	7
1.3 วัตถุดิบจากกระบวนการผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ	8
1.3.1 วัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	8
1.3.2 กากโปรตีนถั่วเขียวหลังกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	10
1.4 เอกสารและงานที่เกี่ยวข้อง	11
1.5 วัตถุประสงค์	13
1.6 ระเบียบวิธีวิจัย	13
1.7 แผนการดำเนินการวิจัย	14
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	15
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	15
2.2 สารเคมี	15
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	16
2.4 จุลินทรีย์	17
2.5 วัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ	17
2.6 การหาค่าประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ	17

	หน้า
2.6.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด	17
2.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน	19
2.6.3 การวิเคราะห์หาความชื้น	19
2.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย	20
2.6.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า	21
2.6.6 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	21
2.6.7 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซิโนเลต	22
2.6.8 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอิรูซิก	22
2.6.9 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	23
2.6.10 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟเตท	23
2.7 วิธีการทดลอง	24
2.7.1 การเตรียม preculture ของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	24
2.7.1.1 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium	24
2.7.1.2 ขั้นตอนการเตรียม preculture	24
2.7.2 การเตรียมอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ	24
2.7.2.1 การเตรียมอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	24
ก. กากมัสตาร์ด	24
ก.1 การเตรียมสารสกัดจากกากมัสตาร์ดด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน	24
ก.2 การเตรียมสารสกัดจากกากมัสตาร์ดด้วยวิธีการย่อยสลายด้วย 0.2 N H ₂ SO ₄	25
ข. น้ำทิ้งมัสตาร์ดหลังจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	25
ข.1 การเตรียม mustard waste residue isolate (MRI)	25
ข.2 การเตรียม mustard waste precipitated isolate (MPI)	25
ข.3 การเตรียมสารสกัดจาก MRI และ MPI	25
ข.3.1 การเตรียมสารสกัดจาก MRI และ MPI ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน	25

	หน้า
ข.3.2 การเตรียมสารสกัดจาก MRI และ MPI	26
ด้วยการย่อยสลายด้วย 0.2 N H ₂ SO ₄	
2.7.2.2 การเตรียมสารสกัดจากกากโปรตีนถั่วเขียวหลัง	26
กระบวนการผลิตวุ้นเส้น	
ก. การเตรียมผงโปรตีนถั่วเขียวจากกากโปรตีนถั่วเขียว	26
จากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	
ข. การเตรียมสารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียว	26
ข.1 การเตรียมสารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียวด้วย	26
วิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน	
ข.2 การเตรียมสารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียวด้วย	27
วิธีการย่อยสลายด้วย 0.2 N H ₂ SO ₄	
2.7.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อและผลิตสาร	27
แอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	
2.7.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหาร	27
ที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีน	
ของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	
2.7.3.2 การศึกษาผลของพีเอชของอาหารต่อการเจริญ	27
เติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ	
<i>X. dendrorhous</i>	
2.7.3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและ	28
ผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	
2.7.3.4 การศึกษาผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตและ	28
ผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	
2.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แห้ง	28
2.7.5 ขั้นตอนการสกัดสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์	28
2.7.5.1 การสกัดและหาปริมาณของสารแอสทาแซนทีน	28
ที่ได้จากการผลิตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	
2.7.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนด้วยวิธี High	29
Performance Liquid Chromatography (HPLC)	
2.7.6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอสทาแซนทีน	29

	หน้า
2.7.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณของสารแอสทาแซนทีน ด้วยวิธี HPLC	29
บทที่ 3 ผลการทดลอง	30
3.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็น อาหารเลี้ยงเชื้อ	30
3.2 ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมัน หอมระเหยมีสตาร์ดและวันเส้น	32
3.2.1 ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในกระบวนการ ผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	32
3.2.2 ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบหลังจาก กระบวนการผลิตวันเส้น	32
3.3 ผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย มีสตาร์ดและวันเส้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารแอสทาแซนทีน	33
3.3.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิต น้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการ ผลิตสารแอสทาแซนทีน	33
3.3.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิต วันเส้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารแอสทาแซนทีน	34
3.4 ผลของปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโต และผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	35
3.4.1 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบใน กระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดที่มีต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	35
3.4.2 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบ หลังกระบวนการผลิตวันเส้นที่มีต่อการเจริญเติบโต และ การผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	38
3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีน ของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้	41
3.5.1 ผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตและการ ผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้	41

	หน้า
ก. ผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยและวันเส้น	41
ข. ผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยและวันเส้น	44
3.5.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้	46
ก. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและวันเส้น	46
ข. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและวันเส้น	48
3.5.3 ผลของเวลาที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้	51
ก. ผลของเวลาที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและวันเส้น	51
ข. ผลของเวลาที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและวันเส้น	54
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	57
4.1 คุณสมบัติของวัตถุดิบที่นำมาเตรียมเป็นอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อ	57
4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและวันเส้น	59
4.3 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและผลิตวันเส้น	60
4.4 ความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	61

	หน้า
4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซน- ทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบใน กระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและวุ้นเส้น	62
4.6 การผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เตรียม ได้จากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและวุ้นเส้น	63
เอกสารอ้างอิง	65
Output ที่ได้จากโครงการ	72
ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงาน	73
ภาคผนวก	75

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากมัสตาร์ด mustard waste residue isolate (MRI), mustard waste precipitated isolate (MPI) และผงโปรตีนถั่วเขียว	30
2. แสดงปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมด และลักษณะของอาหารชนิดต่าง ๆ	33
3. แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสทาแซนทีนเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4% (w/w)	35
4. แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	36
5. แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	37
6. แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	39
7. แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	40
8. แสดงผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	42
9. แสดงผลของพีเอชของอาหารต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	43
10. แสดงผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	44
11. แสดงผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	45
12. แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	47
13. แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	48
14. แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด	49
15. แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	50

	หน้า
16 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	52
17 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเส้น	53
18 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	55
19 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเส้น	56

สารบัญรูป

รูป	หน้า
1 แสดงโครงสร้างของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene, เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มแซนโทฟิลล์บางชนิด	2
2 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากกรดเมวาโลนิก	3
3 แสดงกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและการเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ	9
4 แสดงกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	11
5 แสดงเชื้อ <i>X. dendrorhous</i>	17
6 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	37
7 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	38
8 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	39
9 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	40
10 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	42
11 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhou</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	43
12 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	45
13 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น	46

	หน้า
14 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	47
15 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเส้น	48
16 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	50
17 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเส้น	51
18 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	53
19 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเส้น	54
20 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด	55
21 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเส้น	56

บทที่ 1

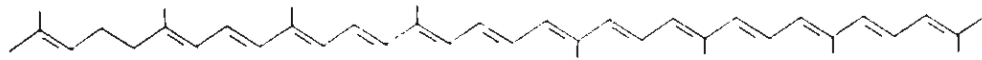
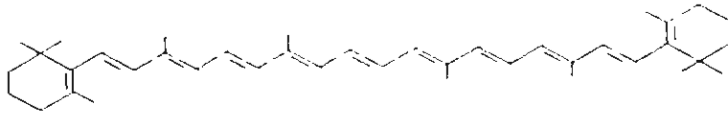
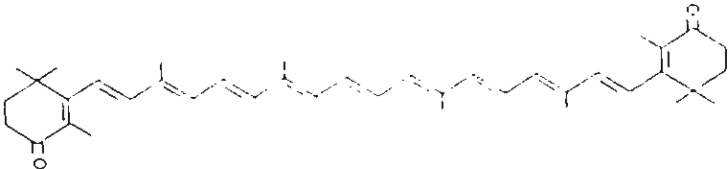
บทนำ

1.1 สารแคโรทีนอยด์

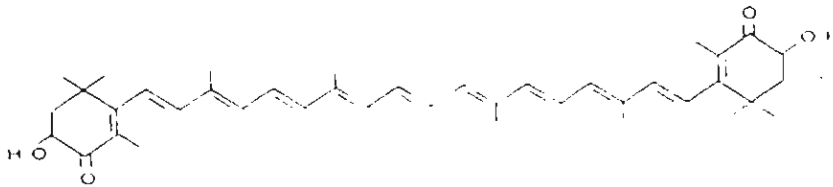
สารแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุของสิ่งมีชีวิตที่พบในธรรมชาติแพร่หลายมากที่สุดทั้งในพืชและสัตว์ โดยสารแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลืองถึงแดง โมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม ประกอบด้วยหมู่ไอโซพรีน (isoprene group) 8 หมู่ มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่ โดยโครงสร้างหลักประกอบด้วย acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene (รูปที่ 1) โดยสมบัติการดูดกลืนแสงของสารแคโรทีนอยด์ขึ้นอยู่กับสายของ conjugated double bond ที่ทำหน้าที่เหมือนโครโมฟอร์ (chromophore) สารกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ carotene ซึ่งเป็นโมเลกุลของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene ที่ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน โดยคาร์บอนเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเดี่ยวสลับพันธะคู่ และที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างจะมีอะตอมของคาร์บอนมาเกาะกันเป็นวงเรียก วงแหวนไอโอโนน (ionone ring) ตัวอย่างเช่น เบต้าแคโรทีน (β -carotene) (รูปที่ 1) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โมเลกุลประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และมีการเพิ่มอนุพันธ์ของออกซิเจนเป็นองค์ประกอบของแคโรทีนด้วยเช่น ไฮดรอกซี (-OH) คีโตน (-C=O) อัลดีไฮด์ (-CHO) คาร์บอกซี (-COOH) หรือ อีพอกไซด์ (epoxide group) ตัวอย่างได้แก่ เอกไคนีนोन (echinenone), แคนทาแซนทีน (canthaxanthin) และแอสทาแซนทีน (astaxanthin) เป็นต้น (1-3)

1.1.1 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เกิดในเซลล์หรือในเส้นใยเท่านั้น โดยแคโรทีนอยด์จะถูกสังเคราะห์มาจากกรดเมวาโลนิค (mevalonic acid, MVA) จากนั้นมีการรวมตัว (condensation) หัวท้ายของไอโซพรีนไอโซเมอร์ 2 ไอโซเมอร์ของไอโซเพนทีลไพโรฟอสเฟต (isopentenyl pyrophosphate, IPP) และไดเมทิลแอลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethyl allyl pyrophosphate, DMAPP) เพื่อเกิดเป็นเจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranyl pyrophosphate, GPP), ฟาร์เนซิลไพโรฟอสเฟต (farnesylpyrophosphate, FPP) และ C_{20} เทอร์ปีนอยด์ เจอรานิลเจอรานิลไพโรฟอสเฟต (C_{20} terpenoid geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) ตามลำดับ หลังจากนั้นมีการรวมตัวด้านท้ายของ 2 โมเลกุลของ GGPP เกิดเป็น prephytoene pyrophosphate, PPPP และเปลี่ยนเป็นไฟโทอิน (phytoene) หลังเกิดปฏิกิริยาการนำไฮโดรเจนออก (dehydrogenation) 4 ขั้นตอน (รูปที่ 2) จะได้สารไลโคปีน (lycopene) และต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น dehydrogenation, cyclization, oxidation และ hydroxylation เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันพบว่าสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่พบแล้วมีโมเลกุลที่แตกต่างกันมากกว่า 600 โมเลกุล

acyclic $C_{40}H_{56}$ structure (lycopene) β -carotene

canthaxanthin



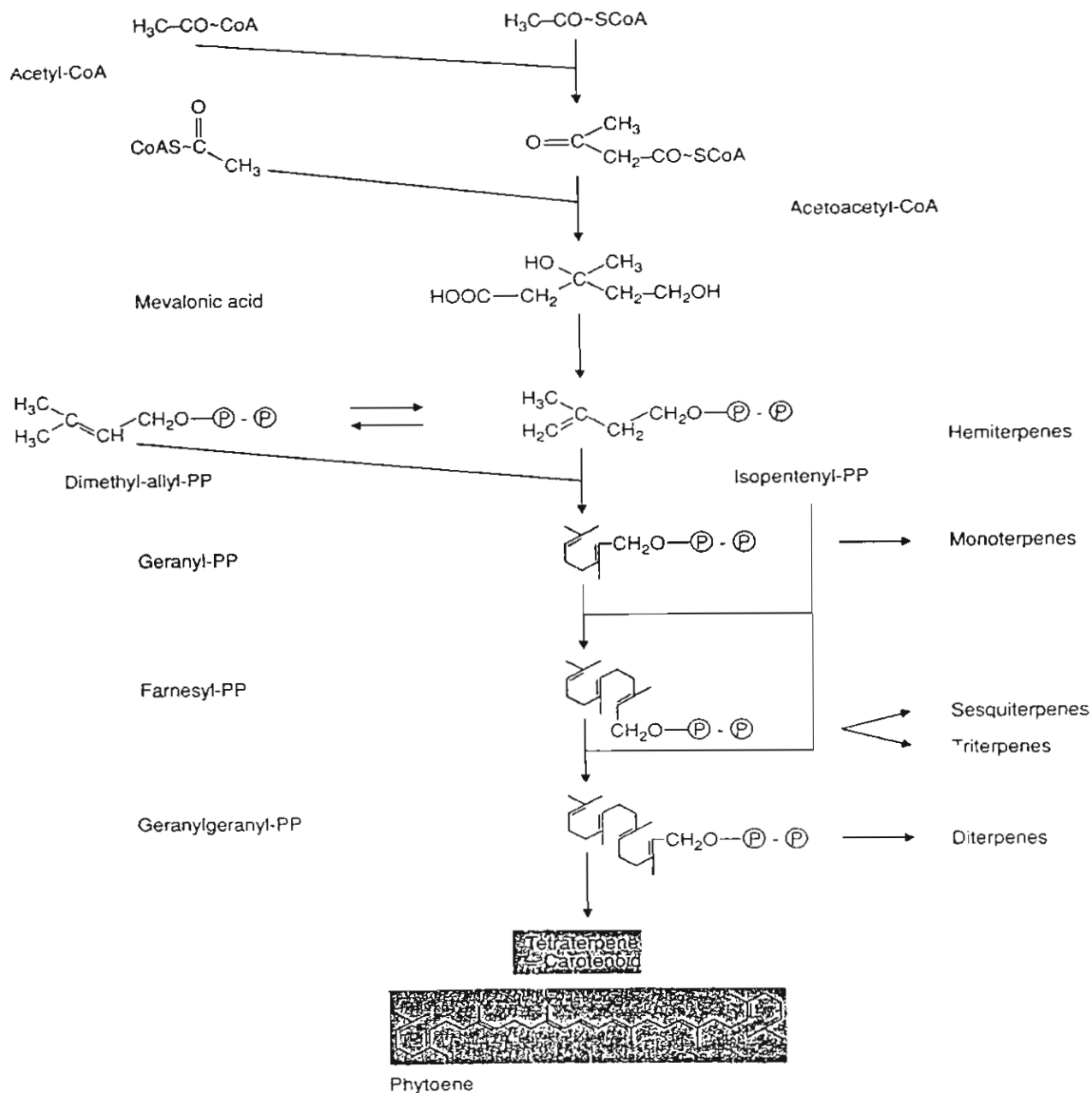
astaxanthin

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ acyclic $C_{40}H_{56}$, carotene, เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มแซนโทฟิลล์บางชนิด
(1)

1.1.2 สมบัติของสารแคโรทีนอยด์

สารแคโรทีนอยด์เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทไขมัน สามารถละลายได้ในไขมัน และตัวทำละลายไขมัน (lipids solvent) เช่น อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ (alcohol) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) และ คลอโรฟอร์ม (chloroform) นอกจากนี้ยังสามารถละลายได้ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane)

โครงสร้างของสารแคโรทีนอยด์มีโมเลกุลที่เป็นพันธะคู่ ทำให้สารแคโรทีนอยด์เกิดสารสีชนิดต่าง ๆ เช่น สีเหลือง ส้ม แดง และม่วงเข้ม ซึ่งมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องโดยเป็นรูปผลึกที่มีรูปร่างชนิดต่างๆ และโครงสร้างของโมเลกุลที่เป็นพันธะคู่ทำให้สารแคโรทีนอยด์ถูกย่อยสลายได้ง่ายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ในสภาพที่มีแสงและอากาศ โดยแสงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของซิสและทรานส์ของพันธะคู่ (cis-trans double bonds) ทำให้เปลี่ยนช่วงการดูดกลืนแสง และทำให้สีของสารแคโรทีนอยด์เปลี่ยน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาสารแคโรทีนอยด์ในตัวทำละลายบริสุทธิ์ บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท และสถานะแวดล้อมเป็นสุญญากาศหรือก๊าซเฉื่อย บริเวณที่ปราศจากแสงและอุณหภูมิต่ำหรือใช้สารต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อช่วยให้แคโรทีนอยด์มีความเสถียรสูงขึ้น



รูปที่ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากกรดเมวาโลนิก (4)

1.1.3 บทบาทและความสำคัญของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์

1. เป็นรงควัตถุที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง คือ เป็นสารดูดซับพลังงานแสง และมีหน้าที่ขนส่งพลังงาน (1, 5)
2. มีบทบาทต่อกระบวนการป้องกันแสงของแบคทีเรียและมนุษย์ในบางสภาวะแวดล้อม (6)
3. เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (provitamin A) (1, 7)
4. เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของจุลินทรีย์และเป็นสารที่ช่วยเพิ่มสีส้มของดอกไม้เพื่อดึงดูดความสนใจของแมลงที่ช่วยในการผสมเกสรในการขยายพันธุ์พืช (8, 9)
5. เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเช่น อุตสาหกรรมอาหาร การเลี้ยงสัตว์ การแพทย์และเภสัชกรรม รวมทั้งอุตสาหกรรมด้านความงาม (10, 11)

6.เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดมะเร็ง (12 , 13)

ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับมนุษย์คือ การนำมาใช้เป็นสารสีผสมอาหาร (food colorants) ซึ่งสารแคโรทีนอยด์ที่เป็นที่ต้องการของตลาดการค้าสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารคือ สีเหลือง และแดง โดยส่วนใหญ่ผสมในเครื่องดื่มประเภทต่างๆ ใช้แต่งสีขนม เค้ก และคุกกี้ รวมทั้งลูกอมและไอศกรีมเป็นต้น ส่วนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ จะใช้ผสมในอาหารสัตว์ เช่น อาหารปลา อาหารสุกร อาหารโค รวมทั้งอาหารสัตว์ปีก ซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้มีสีส้มเป็นที่น่าสนใจต่อการบริโภค การนำแคโรทีนอยด์มาใช้ในอุตสาหกรรมทางการแพทย์และเภสัชกรรม พบว่าแคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดเนื้องอก (7, 14) ใช้เป็นสารต้านมะเร็ง นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการเคลือบเมล็ดพืชให้มีสีต่าง ๆ (15) ในอุตสาหกรรมด้านความงามแคโรทีนอยด์ถูกนำมาใช้เป็นสีผสมในลิปสติกแทนสีสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี เช่น แคนทาแซนทีน และ โลโคป็น

1.1.4 แหล่งที่พบแคโรทีนอยด์

สารแคโรทีนอยด์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถสร้างขึ้นจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น พืช สาหร่าย รา ยีสต์ และแบคทีเรีย สำหรับพืชสามารถสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ได้เอง เช่น จากดอกดาวเรือง (*Tegetes erecta*) พบว่ามีปริมาณของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) ได้แก่ ลูเทอิน (lutein) มากถึงประมาณ 60% ของสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (16-18) ส่วนในมะเขือเทศ จะพบไลโคป็นจำนวนมาก (19) และข้าวโพดเหลือง พบสารเบต้า-คริปโทแซนทีน (β -cryptoxanthin) ในปริมาณที่สูง และมีแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์วิตามินเอด้วย (20)

สารแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเช่น *Dunaliella salina* สามารถผลิตเบต้าแคโรทีน ในปริมาณสูง สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyceae) พบในรูปของเบต้าแคโรทีน โทรูลีน (torulene) และ อีพอกซี แคโรทีนอยด์ (epoxy-carotenoids) โดยจะเห็นเป็นสีส้มและแดง (21) ส่วนในสาหร่ายกลุ่ม Rhodophyceae มีสารแคโรทีนอยด์ใกล้เคียงกับที่พบในกลุ่ม chlorophyceae แต่จะมีสารแซนโทฟิลล์อยู่ด้วย ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สร้างสารเบต้าแคโรทีน เอคโคไนโนน, ซีแซนทีน (zeaxanthin) และแคนทาแซนทีนเป็นต้น (4, 22)

เชื้อราที่สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้พบว่ามีจำนวนจำกัด แต่มีมากกว่ายีสต์ เช่น เชื้อรา *Neurospora crassa* สามารถผลิตเบต้าแคโรทีน, แกมมาแคโรทีน (γ -carotene), โทรูลีน และนิวโรสปอราแซนทีน (neurosporaxanthin) (1) เชื้อรา *Blakeslea trispora* สามารถผลิตเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่สูงในระดับอุตสาหกรรม และเชื้อราที่นิยมใช้ศึกษาการผลิตสารชนิดเบต้าแคโรทีนได้ในปริมาณมากคือ เชื้อรา *Phycomyces blakesleeanus* (1, 4, 23)

ส่วนสารแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ พบในเชื้อยีสต์กลุ่ม Rhodotorularceae สร้างสารโทรูลาโรดอิน (torularhodin), โทรูลีน (torulene) และเบต้าแคโรทีน (24) ในขณะที่ยีสต์ในคลาส

Basidiomycetes คือ *Phaffia rhodozyma* หรือ *Xanthophyllomyces dendrorhous* พบว่าสามารถสร้างสารแอสทาแซนทีน (astaxanthin, 3, 3'-dihydroxy-4,4'-diketo- β -carotene) ซึ่งเป็นสารแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแซนโทฟิลล์ (25) โดยสารสีชนิดนี้พบว่ามีบทบาทที่สำคัญมากในปัจจุบัน และได้รับความสนใจมาก ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นการผลิตสารสีแอสทาแซนทีน จากเชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* (ชื่อเดิม) หรือ *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ชื่อใหม่) เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตและประยุกต์ใช้ของเชื้อเพื่อเป็นอาหารในการเจริญเติบโตของเชื้อด้วย

1.1.5 สมบัติของจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งผลิตสารสี

1. สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ขยายพันธุ์ได้ดี
2. มีความสามารถผลิตสารสีได้สูง ได้ผลสม่ำเสมอ
3. ควรเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้วัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก และที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นได้ดี
4. มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี มีช่วงพีเอชและช่วงอุณหภูมิที่

เหมาะต่อการเจริญเติบโตกว้าง

5. เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย
6. ควรเป็นจุลินทรีย์ที่เลี้ยงง่าย คายซาก เก็บได้นาน
7. ต้องไม่เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคต่อคน และไม่สร้างสารพิษให้กับผลผลิตนั้น ๆ

ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารสีนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์ได้แก่

1. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนจำเป็นอย่างยิ่งในการสังเคราะห์เซลล์ และส่วนใหญ่คาร์บอนใช้เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอนมีหลายประเภท เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน แอลกอฮอล์ เป็นต้น ตัวอย่างกลุ่มเคมีบริสุทธิ์ (chemical refined carbon sources) เช่น น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้วัตถุดิบธรรมชาติที่ให้คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้งจากข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง ถั่วลิสง กากน้ำตาลจากอ้อย แป้งที่ถูกลูโซโครไลซ์ เป็นต้น

2. แหล่งไนโตรเจน

เซลล์ของจุลินทรีย์มีความต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูป สารอินทรีย์และอนินทรีย์ เพื่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้กันมากคือ แอมโมเนียหรือเกลือแอมโมเนียมและไนเตรต การเจริญเติบโตของเซลล์จะเร็วขึ้นหากใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นสารอินทรีย์เดี่ยว ๆ เช่น กรดอะมิโน สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาค่อนข้างสูง ส่วนแหล่งที่ราคาถูกจะเป็นถั่วเหลือง ถั่วลิสง ปลาป่น เนื้อป่น ข้าวมอลต์ สารสกัดยีสต์ หางนม เคซีน และโปรตีนที่ข่อยด้วยเอนไซม์ เป็นต้น

3. ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย

ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะว่าสาร 2 ชนิดนี้รวมอยู่ในกระบวนการถ่ายโอนพลังงาน นอกจากนี้เหล็ก โคบอลต์ ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุที่ขาดไม่ได้ มักได้มากับน้ำหรือติดมากับสารตัวอื่นๆ สารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น กรดอะมิโน หรือวิตามินอาจต้องเติมลงในอาหารเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าขาดเช่นกัน

4. ปัจจัยทางกายภาพ

4.1 ค่าพีเอชและความเป็นกรดเป็นด่าง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมความเป็นกรดเบสจะมีผลยับยั้งการผลิตสารแคโรทีนอยด์ ดังนั้นการผลิตแคโรทีนอยด์ต้องกระทำในสภาพอาหารที่ไม่มีบัฟเฟอร์ จากการศึกษาของ Goodwin และคณะ (1) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและแอสพาราจีนที่มีค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 6.0 เมื่อเชื้อเจริญจะมีผลให้ความเป็นกรดลดลง การลดค่าความเป็นกรดเบสอย่างรวดเร็วจะมีการผลิตแคโรทีนอยด์เกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน (27)

4.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแคโรทีนอยด์พบว่ามีผลอย่างมากเช่น เชื้อ *Phaffia rhodozyma* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-22 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาพบว่าเชื้อเจริญได้ดีและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาอุณหภูมิจะมีผลอย่างมากต่อการสร้างสารแคโรทีนอยด์ของเชื้อยีสต์ชนิดนี้ ดังนั้นในการศึกษาเพื่อผลิตสารสีชนิดนี้จึงต้องควบคุมให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื่อนี้ด้วย

4.3 แสง

สำหรับการผลิตสารแคโรทีนอยด์ ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Phycomyces blakesleeanus* ในที่ไม่มีแสง พบว่าผลผลิตมีปริมาณพอสมควร แต่ถ้าใช้แสงกระตุ้นผลผลิตจะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารสีแคโรทีนอยด์พบว่าแสงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง แต่การเลี้ยงเชื้อในที่ที่มีแสงนั้นควรจะต้องควบคุมความเข้มของแสงให้พอเหมาะ ถ้าความเข้มของแสงมากเกินไป แสงอาจจะมีผลต่อการสีที่ผลิตได้ โดยอาจทำให้เกิดการเสียดสภาพหรือสูญเสียของสารสีได้

การศึกษการผลิตสารแคโรทีนอยด์สำหรับงานวิจัยนี้ ให้ความสนใจปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารสีคือ อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีน โดยมีวัตถุประสงค์ในการนำเอาของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด โดยการนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารของเชื้อเพื่อผลิตสารแคโรทีนอยด์ ซึ่งสิ่งที่นำมาเป็นข้อพิจารณาเลือกวัตถุดิบเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ได้แก่

1. ราคา (cost) วัตถุดิบควรมีราคาถูก

2. มาตรฐาน (standard) และการควบคุมคุณภาพ (quality control) มาตรฐานของวัตถุดิบที่นำมาใช้ควรมีความสม่ำเสมอ เพราะวัตถุดิบมีความสำคัญมากในการให้ผลผลิตมีคุณภาพ และเนื่องจากต้องใช้ปริมาณมาก จึงจำเป็นต้องตรวจสอบให้ดี สิ่งที่เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพคือ การตรวจทางเคมี และชีวภาพ เช่น ปริมาณไนโตรเจน คาร์บอน เถ้า กลิ่น สี ความใส เป็นต้น

3. หาได้สม่ำเสมอตลอดปี (availability) และมีปริมาณมากเพื่อป้องกันปัญหาการขาดแคลน

4. ความสะดวกหรือความยุ่งยากในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งต้องระวังในเรื่องอุณหภูมิ แสง ความชื้นและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

ส่วนการเลือกวัตถุดิบเพื่อเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อและผลิตสารสเตโรตินอยด์นั้น ต้องทำการเลือกอาหารที่ต้องไม่มีสีในตัวเอง เพื่อไม่ให้มีปัญหาในการเก็บเกี่ยวสารสี หรือสกัดสารสีในภายหลัง ซึ่งประเทศไทยควรมีการวิจัยใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ โดยทำให้ได้มาตรฐานการผลิตและส่งออก

1.2 เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารแคโรทีนอยด์ในงานวิจัย

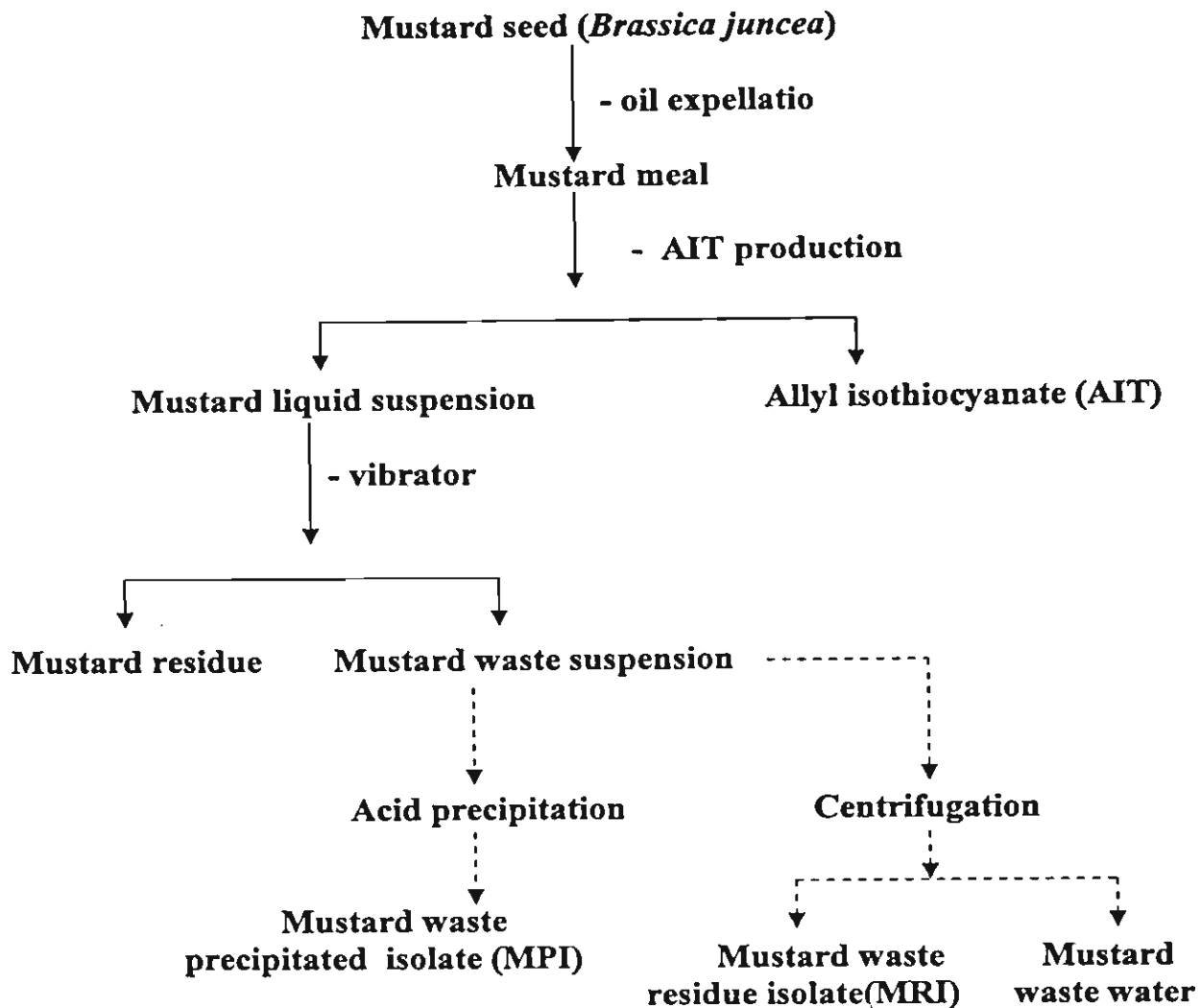
Xanthophyllomyces dendrorhous เดิมมีชื่อเรียกว่า *Phaffia rhodozyma* เป็นยีสต์ในตระกูล Basidiomycetous สามารถทำการหมักในกลูโคสและได้สารแคโรทีนอยด์ที่มีชื่อเรียกว่า แอสทาแซนทีน (28) ยีสต์ชนิดนี้พบว่าได้มีการศึกษาในการผลิตสารแอสทาแซนทีน เป็นระยะเวลานานมากถึง 30 ปี โดยค้นพบครั้งแรกในปี 1976 หลังจากนั้นได้รับความสนใจเรื่อยมา (29) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ถึง 70-90 เปอร์เซ็นต์ของสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ผลิตได้ นับว่าจัดเป็นแหล่งที่สำคัญของสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ และสารแอสทาแซนทีนปัจจุบันพบว่า เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหารด้วย โดยสาร แอสทาแซนทีนมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ๆ ถึง 10 เท่าและมากกว่าอัลฟา โทโคฟีลโรล (α -tocopherol) ถึง 100-500 เท่า (30) การผลิตสารแซนโทฟิลล์ในปัจจุบันนี้สามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยบริษัทที่ผลิตได้คือ Hoffman La Roche เพียงบริษัทเดียว ทำให้มีราคาสูงมาก (31) เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยากมาก โดยราคาขายในท้องตลาดของแอสทาแซนทีนพบว่ามีค่าสูงมากถึง \$25,000-30,000 ต่อกิโลกรัม โดยมีสารแอสทาแซนทีนเป็นองค์ประกอบ 8% (32) ดังนั้นการผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจมากขึ้น แต่การผลิตจากจุลินทรีย์ *X. dendrorhous* พบว่ามีปัญหาที่สำคัญ 2 อย่างคือ เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้น้อย ในเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้มีการปรับปรุงพันธุ์ และผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้มีความเหนียวมาก ทำให้ยากต่อการสกัดสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ (33) และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการศึกษาการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากเชื้อยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *Rhodotorula glutinis* พบว่า

เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารคาร์ทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีน โทรูลาโรดินและโทรูลินได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารแซนโทฟิลล์ชนิดแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่าสารแอสทาแซนทีนนี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหลายเท่า ดังนั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาการได้มุ่งเน้นศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการปรับสภาพของอาหารและสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อที่เชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารแอสทาแซนทีนในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.3 วัตถุดิบจากกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.1 วัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

มัสตาร์ด (*Brassica juncea* var Forge) เป็นพืชในตระกูล บราสสิก้า (Genus *Brassica*) วงศ์กรูซิเฟอริ (Family *Cruciferae*) เป็นพืชที่ปลูกเพื่อผลิตน้ำมันหรือเรียกว่าเมล็ดน้ำมัน (oilseeds) และเป็นเครื่องเทศที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก สามารถผลิตน้ำมันได้มากเป็นอันดับ 4 ของโลก รองลงมาจากน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดปาล์ม และน้ำมันเมล็ดฝ้าย เมล็ดมัสตาร์ดประกอบด้วยน้ำมัน 29-36% และโปรตีน 23-30% (41) ขณะนี้ในประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดส่งออกไปจำหน่ายในต่างประเทศ โดยโรงงานที่มีกำลังผลิตสูงอยู่ที่นิคมอุตสาหกรรมลำพูน โดยโรงงานได้ตั้งเมล็ดมัสตาร์ดจากประเทศแคนาดาและออสเตรเลียเข้ามาประมาณปีละมากกว่า 7000 ตัน ในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด ทำได้โดยนำเมล็ดมัสตาร์ดมาผ่านตะแกรงร่อนเพื่อแยกสิ่งปลอมปนออก จากนั้นนำไปบิบน้ำมันแบบใช้แรงอัด จะมีน้ำมันออกมาประมาณ 22-23% ในขั้นตอนนี้จะได้อากมัสตาร์ด (mustard meal) ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ อากมัสตาร์ดหลังการบิบน้ำมันมีมากถึง 5,600 ตันต่อปี ในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด จะนำอากมัสตาร์ดที่ได้ไปผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:4 สารกลูโคซิโนเลตในอากมัสตาร์ดจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไมโรซิเนส (myrosinase) ซึ่งอยู่ในอากมัสตาร์ด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้น้ำมันหอมระเหย (allyl isothiocyanate, AIT) ภายหลังการกลั่นแยกน้ำมันหอมระเหย ของเหลวจะเข้าสู่เครื่องสั่น (vibrator) จะได้ mustard residue และ mustard waste suspension (42) ขั้นตอนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดแสดงไว้ในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด (เส้นทึบ) และการเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (เส้นปะ)

ส่วนของวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดเหมาะที่จะนำไปประยุกต์เพื่อเตรียมเป็นอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยวัตถุดิบที่จะนำมาใช้แยกได้ดังนี้คือ

1. กากมัสตาร์ด (mustard meal)

เป็นส่วนของมัสตาร์ดหลังจากกระบวนการบีบน้ำมันออกแล้ว ในส่วนนี้สามารถนำไปใช้ในการผสมอาหารสัตว์ได้ กากมัสตาร์ดมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงมาก และยังมีปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณที่พอเหมาะด้วย ดังนั้นจึงถือได้ว่ากากมัสตาร์ดน่าจะสามารถนำมาประยุกต์เป็นอาหารของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารสีแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous* ได้ (43)

2. น้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด (mustard waste suspension)

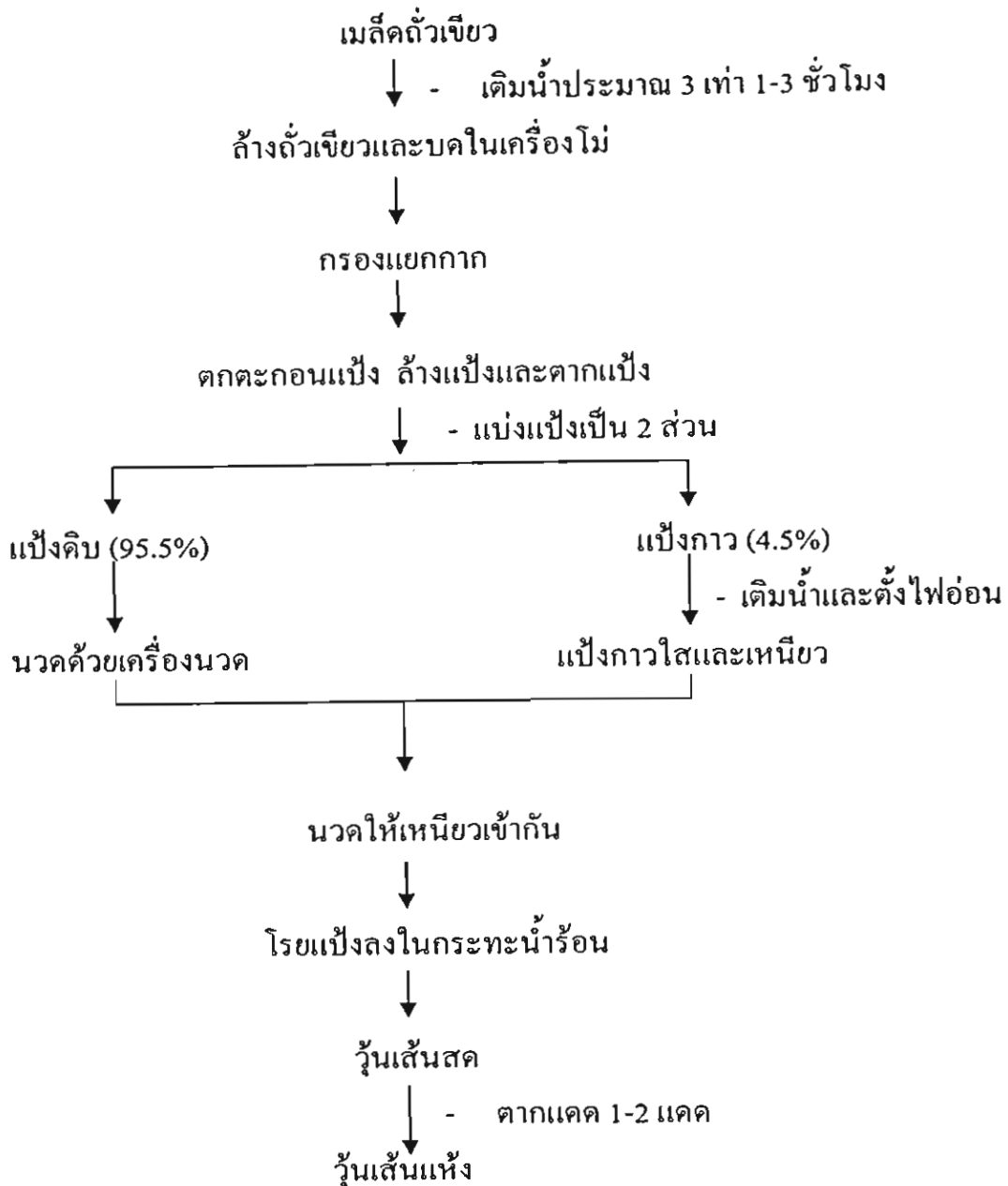
เป็นน้ำทิ้งหลังจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในน้ำทิ้งประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณที่สูง และยังมีปริมาณกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตจากการย่อยสลายกลูโค

ซิโนเลตด้วยเอนไซม์ไมโรซิเนสเพื่อผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด (allyl isothio- cyanate, AIT) โดย น้ำตาลกลูโคสถือว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ในการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและ ผลิตสารแอสทาแซนทินได้

1.3.2 กากโปรตีนถั่วเขียวจากโรงงานผลิตวุ้นเส้น (Mung bean meal)

ถั่วเขียวพบว่าการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกา ถั่วเขียวถือว่าเป็น แหล่งโปรตีนที่สำคัญ ประกอบด้วยโปรตีน 24-36% (44) สำหรับในประเทศไทยถั่วเขียว (*Vigna radiata*) มีการเพาะปลูกมากถึง 300,000 ตันต่อปี ได้มีการส่งออกไปขายต่างประเทศ และที่เหลือจะเข้าสู่โรงงานผลิตวุ้นเส้น กรรมวิธีในการผลิตวุ้นเส้น (รูปที่ 4) มีดังนี้ นำเมล็ดถั่วเขียวประมาณ 30 กิโลกรัม ไปแช่น้ำประมาณ 3 เท่า (30 กิโลกรัม) เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง พอให้เมล็ดถั่วเขียวนิ่มและเปลือกเปื่อย ง่าย นำถั่วเขียวที่ล้างแล้วไปคดในเครื่องโม่ และกรองแยกกาก โดยส่วนที่เป็นแป้งและน้ำโปรตีนจะ ไหลผ่านตะแกรงขนาด 200 เมช ลงในภาชนะเดียวกัน ขณะที่ส่วนของกากถั่วเขียวจะถูกอัดและส่งผ่าน ออกไปจากเครื่องกรองแยกกาก จากนั้นทำการดกตะกอนแป้งโดยการตั้งน้ำแป้งที่กรองแยกกาก หมดแล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จะได้น้ำทิ้งที่มีโปรตีนสูงซึ่งสามารถนำไปดกตะกอนได้ ใช้เป็น ส่วนผสมของอาหารสัตว์ หลังจากนั้นล้างแป้งให้สะอาด นำแป้งไปตากแดดให้แห้งความชื้นประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแป้งแห้งมาบด แล้วแบ่งเป็นออกเป็น 2 ส่วน คือแป้งดิบ 95.5% และแป้งกาว 4.5% แป้งกาวทำได้โดยการผสมน้ำตั้งบนเตาไฟอ่อน ๆ กาวให้น้ำแป้งใสและเหนียว จากนั้นนำแป้ง ดิบมาบดในเครื่องนวดแป้ง แล้วเทแป้งกาวลงไปนวดให้เข้ากัน เติมน้ำเย็นจนแป้งได้ความหนืด พอเหมาะ จากนั้นนำแป้งที่นวดได้ที่แล้วใส่ลงในกระป๋องสแตนเลสที่ใช้โรยเส้น นำไปวางบนที่ขัด เหนือกระทะน้ำร้อน ปาดแป้งเป็นจังหวะสม่ำเสมอให้แป้งไหลเป็นเส้นลงในน้ำเดือด เมื่อแป้งสุกจะ ลอยขึ้นมาสาวเส้นลงในน้ำเย็น จะได้วุ้นเส้นสดนำไปปรุงอาหารได้ จากนั้นนำวุ้นเส้นสดไปตากแดดให้ แห้งประมาณ 1-2 แดด จะได้วุ้นเส้นแห้งนำไปบรรจุในถุงพลาสติกต่อไป

ส่วนน้ำทิ้งหลังจากผลิตวุ้นเส้นแล้ว พบว่าจะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงมาก (30-40%) ส่วนใหญ่แล้วจะดกตะกอนโปรตีนนำไปทำแห้งผสมลงในอาหารสัตว์ ซึ่งมีมูลค่าไม่สูง ดังนั้นการประยุกต์เอาน้ำทิ้งหลังการผลิตวุ้นเส้นมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อ การเจริญเติบโตและผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ที่มีมูลค่าสูงได้ ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง



รูปที่ 4 แสดงกระบวนการผลิตวุ้นเส้น

1.4 เอกสารและงานที่เกี่ยวข้อง

นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง รวมทั้งได้ศึกษาแหล่งของอาหารต่าง ๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นอาหาร หรือสับสเตรทของเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต จากการทดลองของ Yamane และคณะ (45) ได้ศึกษาการผลิตสารแอสทาแซนทีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์จากเชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* หรือ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยศึกษาผลของออกซิเจนและปริมาณกลูโคสที่มีผลต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีน โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium (yeast extract/malt extract medium) ที่มีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 12.13 g/L และปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 1.13 g/L พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีน ได้เท่ากับ 16

mg/L และจากการทดลองของ Okagbue และ Lewis (46) ได้มีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการเลี้ยงในอาหารที่เป็น alfalfa residue juice ซึ่งมีปริมาณคาร์บอนรวม 25 g/L และปริมาณไนโตรเจน 1.45 g/L พบว่าสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้เท่ากับ 2 mg/L และ Haard (47) ได้ศึกษาโดยการนำเอา molasses มาใช้เป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* โดย molasses แบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดที่ 1 มีปริมาณคาร์บอนรวม 58.8 g/L และชนิดที่ 2 มีปริมาณคาร์บอนรวม 47 g/L และทั้งสองชนิดมีปริมาณไนโตรเจน 7.58 g/L และจากการทดลองพบว่าสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้เท่ากับ 15.3 และ 14.6 mg/L ตามลำดับ ต่อมา Fontana และคณะ (48) ได้ศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น sugarcane ซึ่งแบ่งเป็น stalk shell และ stalk pith ที่มีปริมาณคาร์บอน 32-44 mg/L เท่ากัน และ fresh sugarcane ที่มีปริมาณคาร์บอน 15 g/L พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้เท่ากับ 11.6 10.8 และ 14.05 mg/L ตามลำดับ และจากการทดลองของ Cruz และ Parajó (49) พบว่าสามารถเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น enzymatic wood hydrolysates ที่มีไซโรส (xylose), กลูโคส (glucose) และ เซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นองค์ประกอบ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้เท่ากับ 2.14 mg/L นอกจากการศึกษาการผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อจุลินทรีย์แล้ว Bazzini และ Martin (50) ได้ศึกษาการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* โดยใช้อาหารที่เป็นวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นอาหารเพื่อเชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้ เช่น concentrated grape must (ปริมาณคาร์บอน 820 g/L) grape must (ปริมาณคาร์บอน 183 g/L และไนโตรเจน 0.75 mg/L) glucose syrup (ปริมาณคาร์บอน 8.5 g/L และ ไนโตรเจน 4.65 g/L) beat molasses (ปริมาณคาร์บอน 710 mg/L) soybean flour extract (ปริมาณคาร์บอน 52 g/L) และ maize flour extract (ปริมาณคาร์บอน 64 g/L) พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 5.95, 3.77, 1.80, 3.09, 4.24 และ 3.82 g/L ตามลำดับ

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่าได้มีการประยุกต์ใช้วัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อกันอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ และ/หรือแคโรทีนอยด์และเป็นการลดภาวะสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ตลอดจนเป็นการเพิ่มคุณค่าการใช้ประโยชน์ของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอีกด้วย ดังนั้นในแผนการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการเพาะเลี้ยง และการผลิตสารแอสทาแซนทีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ วัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดจากโรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด รวมทั้งกากโปรตีนถั่วเขียว หลังกระบวนการผลิตวันเส้นจากโรงงานผลิตวันเส้น

1.5. วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์
2. ศึกษาการเพาะเลี้ยงและการผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เป็นวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและโรงงานผลิตวุ้นเส้น
3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว
4. วิเคราะห์ทางด้านคุณภาพและปริมาณของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ได้คัดเลือกแล้ว
5. หาวิธีการเพิ่มปริมาณผลผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์

1.6 ระเบียบวิธีวิจัย

1. ศึกษาและค้นหาแหล่งของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ที่พบได้จากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด โดยทำการค้นคว้าและค้นหาเชื้อที่สามารถผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ โดยการซื้อจากศูนย์เชื้อจุลินทรีย์และแยกจากธรรมชาติเอง
2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการเจริญเติบโตในอาหารที่เป็นน้ำทั้งมีสตาร์ดและกากโปรตีนถั่วเขียวจากการผลิตวุ้นเส้น โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้งสองชนิด และตรวจวัดหาชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์โดยวิธี spectrophotometry
3. ทำการเพาะเลี้ยงและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ขั้นตอนนี้เมื่อได้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์แล้ว จะศึกษาในด้านการเจริญเติบโตของเชื้อ สารอาหารที่เชื้อต้องการในการเจริญและการผลิตสาร ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสาร อุณหภูมิที่เหมาะสมและค่าพีเอชของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงในอาหารที่เป็นน้ำทั้งมีสตาร์ดและกากโปรตีนถั่วเขียวจากการผลิตวุ้นเส้น
4. สกัดและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด โดยอาศัยเทคนิคพื้นฐาน คือ โครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin-layer chromatography, UV-Visible spectrophotography และ High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเทียบค่าสารมาตรฐานแซนโทฟิลล์และแคโรทีนอยด์
5. ศึกษาและค้นหาวิธีในการเพิ่มการผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว

1.7 แผนการดำเนินการวิจัย

- ตุลาคม 2001 – เมษายน 2002
- คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ และศึกษาความเป็นได้ในการเจริญเติบโตในอาหารที่เป็นน้ำหึ่งมาตรฐานและโปรตีนถั่วเขียวหลังการผลิตวันสั้น
 - เพาะเลี้ยงและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เป็นน้ำหึ่งมาตรฐานและโปรตีนถั่วเขียวหลังการผลิตวันสั้น
- พฤษภาคม 2002 – ตุลาคม 2002
- วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว (ทำการศึกษาต่างประเทศ)
- พฤศจิกายน 2002 – พฤษภาคม 2003
- ศึกษาและค้นคว้าหาวิธีในการเพิ่มการผลิตสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์	Olympus
เครื่อง HPLC –1100	Hewlett-Packard
เครื่อง shaker/incubator	Heto
เครื่อง centrifuge	Beckman
เครื่อง U-2000 UV/Vis spectrophotometer	Perkin Elmer
Hot plate-stirrer	Heidolph
pH meter 25	Radiometer
Micropipette 200-1000 μ L	Gilson

2.2 สารเคมี

Acetone	Carlo-Erba
Acetonitrile	Fisher Chemical
Ammonium sulfate anhydrous	Carlo Erba
Ammonium thiocyanide	Merck
Boron trifluoride 14%	Fluka
Chloroform	Fluka
Copper (II) sulfate anhydrous	Merck
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	Lab-Scan
Ethanol 95%	Fluka
Ferric chloride	Fisher

Hexane	Merck
Hydrochloric acid	J.T. Baker
Isopropanol	Merck
Methanol	Lab-Scan
Methyl red	-
Nitric acid	Merck
Orthophosphoric acid	BDH
Petroleum ether	Lab-Scan
Phenolphthalein 1% (w/v)	-
Phosphomolibdic acid	Fluka
Potassium hydrogen phthalate	Carlo Erba
Pyrocatechol	BDH
Sodium hydroxide	Thasco
Sodium chloride	Carlo Erba
Sodium phytate	Sigma
Sulfuric acid	Lab-Scan

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract/Malt extract medium (YM medium) ประกอบด้วย

Glucose	-
Yeast extract	Difco
Malt extract	Difco
Peptone	HiMedia Laboratories

Agar

Difco

2.4 จุลินทรีย์

เชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเก็บไว้ในอาหารวุ้นแข็ง (YM slant) และทำการเชื้อเชื้อใหม่ทุก ๆ 1 เดือน



รูปที่ 5 เชื้อ *X. dendrorhous*

2.5 วัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5.1 วัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

1. กากมัสตาร์ดในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด
2. น้ำทิ้งมัสตาร์ดหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

2.5.2 น้ำทิ้งโปรตีนถั่วเขียวหลังกระบวนการผลิตวุ้นเส้นจากโรงงานผลิตวุ้นเส้น (mung bean waste)

2.6 การหาค่าประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.6.1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (51)

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ (organic nitrogen content) โดยโปรตีนและสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนแต่มีไนโตรเจน (non protein nitrogen) รวมอยู่ด้วย โดยตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้นที่มีโซเดียมหรือโพแทสเซียมซัลเฟต เพื่อเพิ่มจุดเดือดของการย่อย และมีคอปเปอร์ซัลเฟตออกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไนโตรเจนอินทรีย์ได้เป็นแอมโมเนียม

ซัลเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นที่มากเกินไปพอ จะได้ก๊าซแอมโมเนียออกมา แล้วไล่ก๊าซแอมโมเนียออกโดยการกลั่นโดยตรงหรือกลั่นไอน้ำ จับก๊าซแอมโมเนียด้วยสารละลายกรดบอริก แล้วไทเทรตหาปริมาณแอมโมเนียด้วยสารละลายกรดกำมะถันมาตรฐาน

ก. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น

1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์

เจือจางกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (MW. 36.46, 37%) ปริมาตร 8.26 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3. สารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1000 โมลาร์

ชั่งโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.0423 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% (w/v)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

5. กรดกำมะถันเข้มข้น (96-98%)

6. เมธิลเรด 1% (w/v)

7. ฟีนอล์ฟทาเลอิน 1%(w/v)

8. คอปเปอร์ซัลเฟต แอนไฮดรัส

ข. การทำมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก

เปิดสารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1000 โมลาร์ ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วทำการไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาเลอินเป็นอินดิเคเตอร์ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ใช้ค่าเฉลี่ยของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ณ จุดสมมูล คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเปลี่ยนสารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริก แล้วทำแบบเดิม และคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

ค. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ชั่งตัวอย่าง 0.20 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่ boiling chip 5-10 เม็ด เติมคอปเปอร์ซัลเฟตแอนไฮดรัส 0.5 กรัม และเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำการต่อชุดรีฟลักซ์แล้วให้ความร้อน โดยใช้ heating mantle จนได้สารละลายสีฟ้าใส หรือใช้เวลาประมาณ 3-4

ชั่วโมง โดยทำในตู้ควัน จากนั้นหยดให้ความร้อน แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นและทำการทดลองในชั้นต่อไป

รินสารละลายในขวดก้นกลมลงใบปิกเกอร์ที่มีน้ำประมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วรินคืนลงในขวด ล้างปิกเกอร์ และเทผ่านคอนเดนเซอร์โดยใช้น้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเปิด 0.1 โมลาร์ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมคอกยาว เดิมเมธิลเรด 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วทำการต่อชุดกลั่นโดยระหว่างข้อต่อต่างๆ ใส grease ด้วย จากนั้นเติมสารละลาย 40 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมโดยผ่านกรวย แล้วรีบปิดจุกทันที ทำการกลั่นจนกระทั่งกาซแอมโมเนียหมด ทดสอบโดยกระดาษลิตมัสซึ่งที่ปลายคอนเดนเซอร์

นำสารละลายในขวดก้นกลมคอกยาวที่มีสารละลายกรดไฮโดรคลอริกไปทำการไทเทรตกลับ (back titration) กับสารละลายมาตรฐาน 1.0 โซเดียมไฮดรอกไซด์ บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี แล้วนำไปคำนวณกลับเป็นปริมาณโปรตีนหรือไนโตรเจนทั้งหมด

2.6.2. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

ก. วิธีการวิเคราะห์ไขมัน

ทำการสกัดไขมันในชุด soxhlet extraction apparatus โดยชั่งตัวอย่าง 2-3 กรัม จดน้ำหนักที่แน่นอน ใสใน thimble ต่อชุดกลั่น และใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ทำการสกัดนาน 5-6 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งไขมันออกมาหมด แล้วนำเฮกเซนที่มีไขมันอยู่ไปทำการระเหยเฮกเซนออกมาจนหมดด้วยเครื่องระเหย แล้วชั่งน้ำหนักของไขมันที่เหลืออยู่

ข. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่เหลืออยู่ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

2.6.3. การวิเคราะห์หาความชื้น

ก. วิธีการอบแห้ง (drying method)

อบกระป๋องอบความชื้นพร้อมฝา ที่ตู้อบไอร้อนแบบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น นาน 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (2-3 g) ใสในกระป๋องอบความชื้นที่อบเรียบร้อยแล้ว แล้วนำไปอบในตู้อบไอร้อนแบบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 3 ชั่วโมงและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบซ้ำ 2-3 ครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ ค่าที่ได้ต้องไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม ชั่งหาน้ำหนักของของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณหาน้ำหนักที่หายไปและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้

ดังนี้

ข. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)} - \text{น้ำหนักที่เหลือ (กรัม)}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}$$

2.6.4. การวิเคราะห์หาเส้นใย

ก. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเส้นใย

1. สารละลายกรดกำมะถัน 1.25 % (w/v)

ปีเปตสารละลายกรดกำมะถัน 96% ปริมาตร 13.02 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25%

ซังโซเดียมไฮดรอกไซด์ 98% 12.75 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

ข. วิธีการวิเคราะห์เส้นใย

ซังตัวอย่างหนัก 2-3 กรัม จดน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดกำมะถัน 1.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที ขณะต้มควรเขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นกรองโดยใช้กระดาษกรอง No. 54 ต่อกับ buchner funnel ค่อยๆ เทน้ำเดือดใส่ลงในกรวยปล่อยทิ้งไว้ให้กรวยร้อนแล้วจึงเปิด suction เทสารที่ต้มไว้ลงในกรวย กรองกากทั้งหมดให้เสร็จสิ้นภายใน 10 นาที ล้างกากที่กรองด้วยน้ำอุ่นครั้งละประมาณ 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำกระดาษกรองที่มีตะกอนอยู่มาล้างในขวดรูปชมพู่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 มิลลิลิตร แล้วนำกระดาษกรองออก จากนั้นนำกากไปต้มให้เดือดนาน 30 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง No. 41 ที่อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วย 25 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดกำมะถัน 1.25 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำอุ่น 3 ครั้งๆ ละ 50 มิลลิลิตร และล้างครั้งสุดท้ายด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พับกระดาษกรองที่มีกากไว้ใน crucible ที่เผาที่ 600 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น นำทั้งหมดไปชั่งหาน้ำหนักกาก แล้วนำไปเผาต่อในเตาเผาให้เป็นเถ้าที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่อนอุณหภูมิลดต่ำลงเหลือประมาณ 120-150 องศาเซลเซียส เอา crucible ออกปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้าที่ได้ นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเส้นใย

ค. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เส้นใย} = \frac{(\text{น้ำหนักกาก (กรัม)} - \text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}$$

2.6.5. การวิเคราะห์หาเถ้า

ก. วิธีการวิเคราะห์หาเถ้า

เผาด้วยกระบือเพลิงเคลือบในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 600°C นาน 30 นาที ทำให้เย็นในเคชิตเตอร์ ชั่งน้ำหนัก และใส่ตัวอย่างทันทีในด้วยกระบือเพลิงเคลือบ ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2-3 g นำไปเผาด้วยไฟอ่อนบนเตาหรือตะเกียงเบนเซน โดยเพิ่มความร้อนขึ้นทีละน้อยจนตัวอย่างไหม้เกรียมให้หมดควันดำเสียก่อน แล้วนำไปเผาค่อยในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 600°C นาน 3 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาว ร่อนอุณหภูมิในเตาเผาลดเหลือประมาณ 120-130°C ทำให้เย็นใน เคชิตเตอร์ ชั่งน้ำหนักของเถ้าที่เหลืออยู่

ข. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักกรัมต้น (กรัม)}}$$

2.6.6. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ก. สารเคมี

1. DNS reagent

ชั่งสาร 3,5- dinitrosalicylic acid 2.5 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนช่วยให้สารละลายจนหมด แล้วละลาย sodium potassium tartrate 75 กรัม ในน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งสองและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

ชั่งกลูโคส 0.0360 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร

ข. การทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยใช้ปริมาตรตั้งแต่ 0.4-2.4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 3.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DNS reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร Blank ที่ใช้น้ำกลั่น 3.0 มิลลิลิตรแทนสารละลายกลูโคส นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. การหาปริมาณกลูโคส

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 3.0 มิลลิลิตร และเติม DNS reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ใน

น้ำเย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หลอดเปรียบเทียบกับใช้น้ำกลั่น 3.0 มิลลิลิตร ทนสารละลายตัวอย่าง แล้วนำค่าไปเทียบกับปริมาณกลูโคสจากกราฟ

2.6.7. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซิโนเลต

ก. วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายเอนไซม์ไมโรซิเนส จากนั้นเติมน้ำเดือด 2 มิลลิลิตรลงไป ปิดฝาหลอดให้แน่น และเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 5000g เป็นเวลานาน 15 นาที

เปิดส่วนน้ำใส 25 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง และเติม 25 ไมโครลิตรของสารละลายเอนไซม์ commercial myrosinase เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 0.1 มิลลิลิตร สารละลายที่จะใช้ตรวจกลูโคสลงไป และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานซินิกริน แล้วคำนวณหาปริมาณของกลูโคซิโนเลต

2.6.8. การหาปริมาณกรดอีรูจิก (erucic acid)

ก. การสกัดน้ำมันจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาสกัดแยกไขมันโดยใช้ soxhlet extraction apparatus หลังจากนั้นนำไประเหยเฮกเซนออก จะได้ไขมันจากตัวอย่าง

ข. การไฮโดรจิสน้ำมันจากตัวอย่าง

นำน้ำมันจากตัวอย่างที่สกัดได้ประมาณ 1.00 กรัม ไปทำการซาฟอนนิไฟด์โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเอทานอล 95% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยนำของผสมไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นทำให้เป็นกรด โดยการเติมกรดเกลือเข้มข้น 30 มิลลิลิตร พร้อมทั้งคนตลอดเวลาจนกระทั่งเกิดการแยกชั้นของกรดไขมันกับน้ำ แล้วแยกชั้นน้ำออกโดยใช้กรวยแยก ส่วนชั้นของกรดไขมันนำไปสกัดด้วยเฮกเซน และล้างด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว แล้วกำจัดน้ำโดยการเติมเกลือโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วระเหยเฮกเซนออก จะได้กรดไขมันที่ขุ่นแล้ว

ค. การเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

นำกรดไขมันที่เตรียมได้ประมาณ 0.20 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม 95% เมทานอลลงไป 10 มิลลิลิตร นำของผสมไปต้มในอ่างน้ำเดือด ประมาณ 15 นาที หลังจากไขมันละลายเติม BF_3 ในเมทานอลเข้มข้น 14% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วล้างสารละลายไขมัน 2 ครั้ง

ด้วยน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตร 50 มิลลิลิตร กำจัดน้ำโดยใช้เกลือโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโทกราฟี (gas chromatography)

ง. การวิเคราะห์อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

สารละลายเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในเฮกเซนถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโทกราฟี HP-520 flame ionization detector โดยใช้คอลัมน์ Carbowax capillary column 50 m อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (detector) เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ อินเจคเตอร์ (injector) เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 220 องศาเซลเซียส และฉีดสารที่ต้องการประมาณ 1 ไมโครลิตร

2.6.9. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ก. สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐาน pyrocatechol 0.01 โมลาร์

ชั่ง pyrocatechol 0.1101 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น 0.01 โมลาร์

2. สารละลาย folin-denis

ชั่ง $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 กรัม และ phosphomolibdic acid 10 กรัม ใส่ในขวดกันกลม ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 375 มิลลิลิตร orthophosphoric acid 25 มิลลิลิตร และ boiling chip นำไปรีฟลักซ์ 2 ชั่วโมง จนได้สารละลายสีเหลือง นำไปปรับให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ข. วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่จะตรวจสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วเติมสารทดสอบฟอลินเดนิส 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยหลอดเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานฟีนอล

2.6.10. การหาปริมาณฟิเตท

ก. วิธีการวิเคราะห์

ชั่งโซเดียมฟิเตท 1 กรัม ละลายน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปิเปตปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 มิลลิลิตรตามลำดับ ใส่ในหลอดทดลองแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นพร้อมทั้งเติมสาร 0.5 N HNO_3 4.75 มิลลิลิตร FeCl_3 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นต้มให้เดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 1% NH_4SCN จากนั้นนำสารละลายมาเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที นำสารละลายใสที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง

ค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารมาตรฐาน โซเดียมซัลเฟต

ข. การสกัดและวิเคราะห์ไฟเตทในตัวอย่าง

ซังสารตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกรดไนตริกเข้มข้น 0.5 N 50 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าแล้วเจือจางด้วยน้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 200 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงสารละลายที่สกัดได้ที่ 6000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง No. 5 บีบอัดสารละลายที่สกัดได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วหาปริมาณไฟเตทโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.7 วิธีการทดลอง

2.7.1 การเตรียม preculture ของเชื้อ *X. dendrorhous*

2.7.1.1. ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium

ซัง glucose 1 กรัม yeast extract 0.3 กรัม malt extract 0.3 กรัม และ peptone 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) แล้วปล่อยให้เย็น

2.7.1.2. ขั้นตอนการเตรียม preculture

ทำการเชยเชื้อ *X. dendrorhous* ลงบนวุ้นเอียง (slant) ที่เตรียมไว้ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเชยเชื้อลงในอาหารเหลว YM ที่เตรียมไว้ และบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 15 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้เซลล์เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัว จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วย counting chamber (haemocytometer) โดยให้เชื้อปริมาณตั้งต้นเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร เพื่อให้การถ่ายแต่ละครั้งมีปริมาณเท่ากัน

2.7.2 การเตรียมอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7.2.1. การเตรียมอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

ก. กากมัสตาร์ด (mustard meal)

ก.1. การเตรียมสารสกัดจากกากมัสตาร์ดโดยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน

ซังกากมัสตาร์ด 4 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรลงไป นำไปให้ความร้อนบน hot plate พร้อมทั้งคนตลอดเวลา 30 นาที แล้วเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนและสารสกัดออกจากกัน ปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นบีบอัดสารสกัดที่ได้ 30 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดันเป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น จะได้สารสกัดที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแอสทาแซนทีนและวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่อไป

ก.2. การเตรียมสารสกัดจากกากมัสตาร์ดโดยวิธีการย่อยสลายด้วย 0.2 N H₂SO₄

ชั่งกากมัสตาร์ด 4 กรัม ละลายในสารละลายกรด 0.2 N H₂SO₄ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยสลายในหม้ออัดความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็น แล้วกรองผ่านกระดาษกรองและเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปิดสารสกัดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรด 30 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ทำการปรับค่าพีเอชของสารสกัดที่ได้เป็น 5.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้ออัดความดันเป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น ส่วนสารสกัดที่เหลือ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบต่อไป

ข. น้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด (mustard waste suspension)

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด มีวิธีการแยกเอาสารอาหารที่สำคัญออกจากน้ำทิ้ง 2 วิธี คือ

ข.1. การเตรียม Mustard waste residue isolate (MRI)

นำน้ำทิ้งที่ได้ไปเข้าเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งโดยเข้าเครื่องเป่าลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปสกัดต่อไป

ข.2. การเตรียม Mustard waste precipitated isolate (MPI)

นำน้ำทิ้งที่ได้จากกระบวนการมาทำการตกตะกอนด้วยกรด citric acid และล้างตะกอนด้วยเฮกเซน (hexane) จากนั้นทำแห้งโดยการเข้าเครื่องเป่าลมร้อนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข.3. การเตรียมสารสกัดจาก mustard waste residue isolate (MRI) และ mustard waste precipitated isolate (MPI)

ข.3.1. การเตรียมสารสกัดจาก MRI และ MPI ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน

ชั่ง MRI หรือ MPI 4 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรลงไป นำไปให้ความร้อนบน hot plate พร้อมทั้งคนตลอดเวลา 30 นาที แล้วเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนและสารสกัดออกจากกัน จากนั้นเปิดสารสกัดที่ได้ 30 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อในหม้ออัดความดันเป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น จะได้สารสกัดที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแอสทาแซนที

ข.3.2. การเตรียมสารสกัดจาก MRI และ MPI ด้วยวิธีการสกัดด้วยการย่อยสลายด้วย กรดละลาย 0.2 N H₂SO₄

ชั่งกากมันสำปะหลัง 4 กรัม ละลายในสารละลายกรด 0.2 N H₂SO₄ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยสลายในหม้ออัดความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็น แล้วกรองผ่านกระดาษกรองและเข้าเครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปิดสารสกัดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรด 30 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ทำการปรับค่าพีเอชของสารสกัดที่ได้เป็น 5.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้ออัดความดันเป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น ส่วนสารสกัดที่เหลือ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบต่อไป

2.7.2.2. การเตรียมสารสกัดจากกากโปรตีนถั่วเขียวในกระบวนการผลิตวุ้นเส้น

ก. การเตรียมผงโปรตีนถั่วเขียวจากกากโปรตีนถั่วเขียวจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น (Mung bean meal powder, MB)

นำกากโปรตีนถั่วเขียวหลังกระบวนการผลิตวุ้นเส้นซึ่งผ่านกระบวนการทำให้เป็นกรดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เข้าเครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการแยกเอาส่วนกากตะกอนนำไปทำให้แห้งด้วยการอบด้วยเครื่องเป่าลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วทำการบดให้เป็นผงละเอียด จะได้ผงโปรตีนถั่วเขียว (mung bean meal powder) และเก็บไว้ในที่แห้ง

ข. การเตรียมสารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียว

ข.1. การเตรียมสารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียวโดยการสกัดด้วยน้ำร้อน

ชั่งผงโปรตีนถั่วเขียว 4 กรัม ซึ่งได้จากข้อ ก ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อน (hot plate) และคนตลอดเวลาเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนทิ้งไป วัดปริมาตรสารสกัดที่ได้ และปรับปริมาตรของสารสกัดให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียว (mung bean waste extract, MBE) จากนั้นเปิดสารสกัดที่ได้ 30 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้ออัดความดันเป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น ส่วนสารสกัดที่เหลือ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบต่อไป

ข.2. การเตรียมสารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียวโดยการย่อยสลายด้วยสารละลาย 0.2 N H₂SO₄

ชั่งผงโปรตีนถั่วเขียว 4 กรัม ซึ่งได้จากข้อ ก ละลายในสารละลายกรด 0.2 N H₂SO₄ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยสลายในหม้ออัดความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็น แล้วกรองผ่านกระดาษกรองและเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปรับปริมาตรของสารสกัดให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 5.0 จะได้สารสกัดจากผงโปรตีนถั่วเขียว (mung bean waste hydrolysate, MBH) จากนั้นเปิดสารสกัดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรด 30 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้ออัดความดันเป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น ส่วนสารสกัดที่เหลือ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบต่อไป

2.7.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ

X. dendrorhous ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7.3.1. การศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous*

ชั่งกากมันสำปะหลัง MRI, MPI และ ผงโปรตีนถั่วเขียว (MB) ที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยมันสำปะหลังและการผลิตวุ้นเส้นมา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 และ 30 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 3 ขวด จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนและการย่อยสลายด้วยสารละลาย 0.2 N H₂SO₄ จะได้สารสกัดเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นทำการปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้ออัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ลงในอาหาร แล้วทำการเลี้ยงเป็นเวลานาน 120 ชั่วโมงโดยบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บเซลล์แล้วสกัดสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้ โดยความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อนี้ จะนำไปใช้ในการศึกษาผลของตัวแปรอื่น ๆ ที่มีต่อการเจริญและการผลิตสารต่อไป

2.7.3.2 การศึกษาผลของพีเอชของอาหารต่อการเจริญเติบโตและผลิตสาร แอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous*

เตรียมสารสกัดเพื่อใช้เป็นอาหารของเชื้อเพื่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนจาก MM, MRI, MPI และ ผงโปรตีนถั่วเขียวที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารของเชื้อ และทำการปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 จากนั้นถ่ายเชื้อ preculture ของ *X. dendrorhous* ที่เตรียมไว้ ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 120 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ผลิตได้และทำการสกัดสารแอสทาแซนทีนต่อไป และค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการศึกษาของตัวแปรอื่น ๆ ที่มีต่อการเจริญและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อต่อไป

2.7.3.3. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ

X. dendrorhous

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบหลังจากกระบวนการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดและวุ้นเส้น และได้ทำการปรับพีเอชให้ได้พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนแล้ว จากนั้นถ่ายเชื้อ preculture ลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 18, 20, 22, 25, 26 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 120 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์และทำการสกัดสารแอสทาแซนทีน ออกจากเซลล์ต่อไป

2.7.3.4. การศึกษาผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X.*

dendrorhous

เตรียมอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนจากวัตถุดิบหลังจากกระบวนการผลิตที่ความเข้มข้นและพีเอชที่เหมาะสมต่อเชื้อในการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีน จากนั้นถ่ายเชื้อลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลานาน 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 และ 144 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเก็บเซลล์และสกัดสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์แล้วหาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้

2.7.4. การวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง (cell dry weight)

ปีเปตน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงและเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วเข้าเครื่องเหวี่ยง จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์เชื้อจุลินทรีย์เทลงในภาควสุญญากาศที่ได้ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว และนำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 102 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักต่อไป

2.7.5. ขั้นตอนการสกัดสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์

2.7.5.1 การสกัดและหาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์ที่ได้จากการผลิตของเชื้อ

X. dendrorhous

ปีเปตน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมา 2 มิลลิลิตร ทำการล้างเซลล์จุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นทำการสกัดสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์โดย

การทำให้เซลล์แตกวิธี freeze-thaw จำนวน 3 ครั้ง และ sonication นาน 3 นาที จำนวน 10 ครั้ง จากนั้นทำการสกัดสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์โดยการสกัดด้วย acetone ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำซ้ำเรื่อย ๆ จนสารละลายที่สกัดได้ในชั้นของอะซิโตน (acetone) ใส แล้วรวมสารละลายที่สกัดได้ที่ละลายในอะซิโตนเข้าด้วยกัน สกัดอีกครั้งด้วยเฮกเซน 30 มิลลิลิตร สารแอสทาแซนทีนจะอยู่ในชั้นของเฮกเซน ทำการสกัดด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนจนได้สารละลาย 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้านคุณภาพและปริมาณโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเทียบกับสารมาตรฐานแอสทาแซนทีน

2.7.6. การวิเคราะห์หาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.7.6.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอสทาแซนทีน

ชั่งสารมาตรฐานแอสทาแซนทีน 0.0050 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform) 50 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วย คลอโรฟอร์มจนครบ 100 มิลลิลิตร

2.7.6.2. การวิเคราะห์หาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนด้วยวิธี HPLC

นำสารสกัดจากเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารแอสทาแซนทีน ด้วยเครื่อง Hewlett-Packard 1100 โดยใช้คอลัมน์ชนิด Microsorb-MV C_{18} ขนาด 5 ไมโครเมตร 4.6×150 มิลลิลิตร อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่มีดังนี้ acetonitrile : methanol (90 : 10, v/v) โดยปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้เครื่องตรวจวัดเป็นแบบ Photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบและคำนวณหาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่สกัดได้กับสารละลายมาตรฐานแอสทาแซนทีน

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

วัตถุดิบที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้มาจากโรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด และโรงงานผลิตวุ้นเส้น ซึ่งได้แก่ กากมัสตาร์ด (mustard meal, MM) น้ำทิ้งมัสตาร์ด (mustard waste residue isolate, MRI และ mustard waste precipitated isolate, MPI) และกากโปรตีนถั่วเขียว ซึ่งเตรียมให้อยู่ในรูปผงโปรตีนถั่วเขียว (mung bean waste powder, MB) เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและในการนำไปใช้งาน และในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบด้วยคือ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ความชื้น เส้นใย เถ้า ดังแสดงในตารางที่ 1 เนื่องจากว่าองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ในการผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous*

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากมัสตาร์ด mustard waste residue isolate (MRI), mustard waste precipitated isolate (MPI) และผงโปรตีนถั่วเขียว

องค์ประกอบ (%)	กากมัสตาร์ด (MM)	น้ำทิ้งมัสตาร์ด		ผงโปรตีน ถั่วเขียว (MB)
		MRI	MPI	
โปรตีนทั้งหมด	33.64	28.84	43.60	25.40
คาร์โบไฮเดรต	21.30	25.25	33.86	21.56
ไขมัน	19.20	3.25	0.77	1.12
เส้นใย	15.20	11.95	8.53	1.73
ความชื้น	11.25	11.8	11.01	9.61
เถ้า	5.26	5.53	2.23	3.07
กลูโคซิโนเลต	15.10	1.70	ND	ND
ไฟเตท	4.05	3.10	1.70	0.90
กรดอีรูซิก	0.82	0.66	0.0082	ND
สารประกอบฟีนอลิก (มก.ต่อ100 กรัม)	309.19	309.19	198.20	ND

MM = กากมัสตาร์ด, MRI = mustard waste residue isolate, MPI = mustard waste precipitated isolate และ MB = ผงโปรตีนถั่วเขียว, ND = not detected

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่เตรียมได้จากวัตถุดิบเหลือทิ้งหลังจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยและวันเส้น พบว่า วัตถุดิบที่ได้หลังจากการบีบน้ำมันออกแล้ว ซึ่งเรียกว่า กากมัสตาร์ด (MM) มีปริมาณของโปรตีนเท่ากับ 33.64 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณของคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 21.30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบเส้นใยมีปริมาณ 15.20 เปอร์เซ็นต์ ในการหาปริมาณของไขมันในกากมัสตาร์ด พบว่ากระบวนการบีบน้ำมันออกจากเมล็ดน้ำมันมัสตาร์ดไม่สามารถทำการบีบน้ำมันออกจากเมล็ดจนหมด ทำให้ยังคงมีปริมาณของไขมันเหลืออยู่ในกากมัสตาร์ดถึง 19.20 เปอร์เซ็นต์ และในกากมัสตาร์ดมีความชื้น 11.25 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเถ้าเท่ากับ 5.26 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในกากมัสตาร์ดยังประกอบด้วยสารที่เป็น antinutrition ด้วยคือ กลูโคซิโนเลต 15.10 เปอร์เซ็นต์ ไฟเตท 4.05 เปอร์เซ็นต์ กรดอีรูซิก 0.82 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบฟีนอลิก 309.19 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยที่สารประกอบฟีนอลิกที่พบในกากมัสตาร์ดพบว่า มีผลทำให้สีของกากมัสตาร์ดที่ได้มีสีคล้ำกว่าปกติ และจากการศึกษาพบว่า ในน้ำทิ้งมัสตาร์ดที่ได้หลังจากการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดมัสตาร์ดแล้ว ได้มีการศึกษาวิธีการแยกสารสำคัญออกจากน้ำทิ้งมัสตาร์ด 2 วิธีคือ การใช้แรงเหวี่ยง (centrifugation) และการใช้วิธีการตกตะกอนด้วยสารละลายกรด (acid precipitation) ได้อาหารที่เป็นวัตถุดิบจากน้ำทิ้งมัสตาร์ด 2 แบบ คือ MRI และ MPI ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของ MRI และ MPI พบว่าการแยกสารสำคัญด้วยวิธีการเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 28.84 เปอร์เซ็นต์ ส่วน MPI พบว่ามีปริมาณของโปรตีนมากกว่า MRI ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ คือมีปริมาณเท่ากับ 43.60 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าปริมาณของคาร์โบไฮเดรตของ MPI มีปริมาณมากกว่า MRI โดยที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบใน MPI มีค่าเท่ากับ 33.86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่พบใน MRI มีค่าเท่ากับ 25.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณไขมันพบว่าปริมาณไขมันใน MPI มีปริมาณน้อยมาก คือ 0.77 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณไขมันที่ใน MRI มีค่าเท่ากับ 3.25 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาปริมาณของสาร antinutrition พบว่าอาหาร MPI มีปริมาณน้อยกว่าที่พบในอาหาร MRI เนื่องจากอาหาร MPI ได้ผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อกำจัดเอาสารพิษออกไป เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ

ในการทดลองได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผงโปรตีนถั่วเขียวที่ได้หลังจากกระบวนการผลิตวันเส้น พบว่ามีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เส้นใย ความชื้น และเถ้าเท่ากับ 25.40 21.56 2.52 1.01 9.61 และ 3.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้พบไฟเตทมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก มีค่าเท่ากับ 0.90 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีน พบว่าวัตถุดิบที่ได้คัดเลือกมานั้นมีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถนำมาใช้ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการเตรียมให้อยู่ในรูปของสารสกัดที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ต่อไป

3.2 ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์คและ รุ่นเด่น

3.2.1 ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ค

การนำวัตถุดิบจากการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์คมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตและผลผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X.dendrorhous* พบว่า อาหารที่มีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลสูงที่สุดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4 % (w/w) คือ อาหาร mustard waste precipitated isolate hydrolysate, MPIH ซึ่งเป็นอาหารที่ได้จากการตกตะกอนน้ำทิ้งมีสตาร์คด้วยกรดและผ่านการเตรียมด้วยการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 0.2 N และมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด) เท่ากับ 8.30 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 10.20 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2 และอาหารที่พบว่ามีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดรองลงมาคือ อาหาร mustard waste precipitated isolate extract (MPIE), mustard waste residue isolate hydrolysate, MRIH, mustard meal extract (MME) และ mustard meal hydrolysate (MMH)ตามลำดับ ส่วนสีและลักษณะอาหารที่เตรียมได้ พบว่าอาหารที่เตรียมได้มีสีเหลืองและใสจนถึงสีน้ำตาลเข้มและใส โดยจะเห็นว่าอาหาร MME, MPIE และ MPIH มีสีเหลืองและใส ซึ่งมีสีที่ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ส่วนอาหาร MMH, MRIE และ MRIH พบว่ามีสีเหลืองออกน้ำตาลเข้มและใส

3.2.2. ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตรุ่นเด่น

กากถั่วเขียวที่ได้หลังจากกระบวนการผลิตรุ่นเด่นได้นำมาเตรียมเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตและผลผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X.dendrorhous* เมื่อทำการเตรียมอาหารที่ความเข้มข้น 4 % (w/w) ของผงโปรตีนถั่วเขียวด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนและการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 0.2 N พบว่า อาหารที่ได้จากการเตรียมด้วยน้ำร้อน mung bean meal extract, MBE มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 5.53 กรัมต่อลิตรและมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 6.75 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่เตรียมได้จากกากถั่วเขียวด้วยวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดคือ mung bean meal hydrolysate, MBH มีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 7.79 และ 8.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาสีและอาหารเลี้ยงที่เตรียมได้ทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีสีเหลืองและใส ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมด และลักษณะของอาหารชนิดต่าง ๆ

อาหาร	% โปรตีนทั้งหมด	% น้ำตาลทั้งหมด	สีและลักษณะของอาหารเหลว
1.กากมัสตาร์ด			
- MME	7.01	7.45	สีเหลืองใส
- MMH	4.85	2.75	สีน้ำตาลเข้ม ใส
2. น้ำทิ้งมัสตาร์ด			
- MRIE	5.78	6.23	สีเหลืองน้ำตาล ใส
- MRIH	7.75	8.24	สีเหลืองน้ำตาลเข้ม ใส
- MPIE	6.56	8.75	สีเหลือง ใส
- MPIH	8.30	10.20	สีเหลือง ใส
3. กากถั่วเขียว			
- MBE	5.53	6.75	สีเหลือง ใส
- MBH	7.79	8.75	สีเหลือง ใส

MME: mustard meal extract, MMH: mustard meal hydrolysate, MPIE: mustard waste precipitated isolate extract, MRIH: mustard waste residue isolate hydrolysate, MPIE: mustard waste precipitated isolate extract and MPIH: mustard waste precipitated isolate hydrolysate

3.3 ผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและรุ่น เน้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารแอคทาแซนทิน

3.3.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย มัสตาร์ดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารแอคทาแซนทิน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดพบว่า วัตถุดิบที่ได้คัดเลือกมาใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ MM MRI และ MPI ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้ศึกษาการเตรียมอาหาร 2 วิธีคือ การสกัดด้วยน้ำร้อน และการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดเข้มข้น 0.2 N โดยในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4 % (w/w) มาเปรียบเทียบ คือวัตถุดิบที่ใช้ 4 กรัม สกัดด้วยน้ำร้อนหรือย่อยสลายด้วยสารละลายกรด 0.2 N 100 มิลลิลิตร ผลดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจาก MM ซึ่งทำการเตรียมโดยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน เชื้อ *X. dendrorhous* สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเตรียมอาหารด้วยวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายกรด 0.2 N และพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอคทาแซนทินที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร MME มีค่าเท่ากับ 1.29 กรัมต่อลิตร และ 0.99 มิลลิกรัมต่อลิตร (หรือ 0.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงใน

อาหาร MMH พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 0.27 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอสทาแซนทีนเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

ส่วนการศึกษการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากน้ำทิ้งมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดพบว่า เชื้อ *X. dendrorhous* สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ในปริมาณที่มากในอาหารที่เตรียมด้วยวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายกรด โดยเฉพาะอาหาร MPIH พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 4.21 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้เท่ากับ 6.41 กรัมต่อลิตร หรือ 1.52 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วนการเจริญเติบโตและการผลิตสารของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร MRIE และ MPIE พบว่า เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เช่นกัน และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสทาแซนทีนที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร MRI และ MPI มีปริมาณมากกว่าที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจาก MM จากการศึกษาวิจัยพบว่าการเตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อต้องศึกษาวิธีการเตรียมให้เหมาะสม และการเตรียมอาหารที่เป็นสารสกัดขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการเตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อด้วย เพื่อเป็นการนำเอาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของวัตถุดิบแต่ละชนิดมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด เมื่อพิจารณาการเตรียมอาหารต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MPIH พบว่า เชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้สูงที่สุด

3.3.2. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตวันเส้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารแอสทาแซนทีน

จากการวิจัยได้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากผงโปรตีนถั่วเขียวที่ได้จากโรงงานผลิตวันเส้นเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* โดยศึกษาที่ความเข้มข้นที่ 4 %(w/w) ของกากถั่วเขียว โดยอาหารที่เตรียมได้มี 2 ชนิดคือ MBE และ MBH เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้ง 2 ชนิดพบว่า เชื้อสามารถเจริญเติบโตในอาหาร MBH ได้ดีกว่าอาหาร MBE โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 1.41 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 1.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหาร MBH ส่วนเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MBE พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสทาแซนทีนที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตร และ 0.81 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 1.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 จากการศึกษาพบว่าอาหารที่เตรียมได้จากกากถั่วเขียว สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ โดยในขั้นตอนต่อไป จะศึกษาถึงปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อในการเจริญเติบโตและผลิตสาร แอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* รวมถึงศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ที่เตรียมได้

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักเซลดแห้ง และปริมาณแอตทาแซนทีนเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4% (w/w)

อาหาร	น้ำหนักเซลดแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอตทาแซนทีน	
		มิลลิกรัมต่อ ลิตร	มิลลิกรัมต่อกรัม เซลดแห้ง
1.กากมันต์คาร์ค			
- MME	1.29	0.99	0.77
- MMH	0.27	0.02	0.07
2.น้ำทิ้งมันต์คาร์ค			
- MRJE	2.28	3.34	1.46
- MRIH	2.42	3.71	1.53
- MPIE	3.37	5.00	1.48
- MPIH	4.21	6.41	1.52
3. กากฉั้วเขียว			
- MBE	0.73	0.81	1.11
- MBH	0.93	1.12	1.20

MME: mustard meal extract, MMH: mustard meal hydrolysate, MPIE: mustard waste precipitated isolate extract, MRIH: mustard waste residue isolate hydrolysate, MPIE: mustard waste precipitated isolate extract and MPIH: mustard waste precipitated isolate hydrolysate

3.4. ผลของปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous*

3.4.1 ผลของปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมันต์คาร์คที่มีต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ

X. dendrorhous

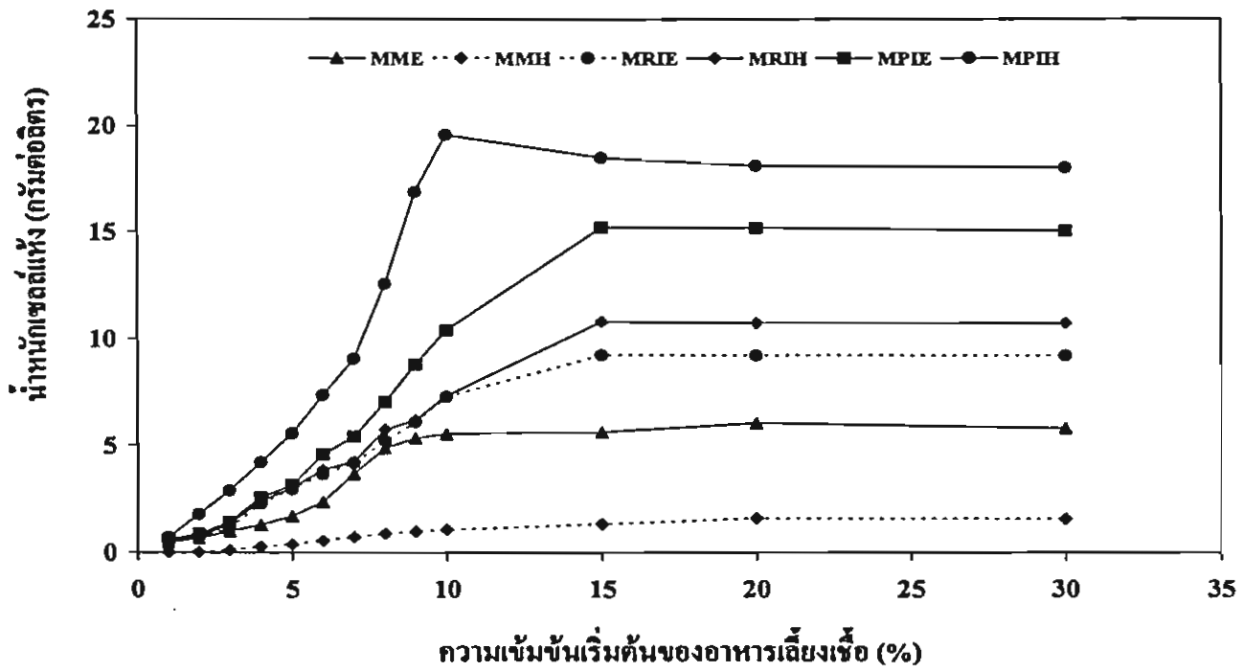
เมื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เตรียมได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 120 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเชื้อและสกัดสารออกจากเซลล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* และศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เป็นสารสกัดจากมันต์คาร์ค MM, MRI และ MPI ซึ่งเป็นวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมันต์คาร์ค พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อ

X. dendrorhous เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเพิ่มขึ้น จนถึงความเข้มข้นที่ 15% (w/w) และหลังจากนั้นที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 15% (w/w) การเจริญเติบโตของเชื้อลดลงจนเกือบคงที่ที่ความเข้มข้น 30%(w/w) จากการทดลองพบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MPIH รองลงมาคือ MPIE, MRIH, MRIE, MME และ MMH ตามลำดับ โดยการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่ต่างชนิดกัน พบว่าการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่างกัน โดยเชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 10 %(w/w) สำหรับอาหาร MPIH และเชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 15% (w/w) สำหรับอาหาร MPIE, MRIH และ MRIE ส่วนอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากมันสำปะหลัง พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20% (w/w) ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 6

สำหรับการผลิตสารแอสทาแซนทีนที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่าง ๆ ของอาหารแต่ละชนิด พบว่า เชื้อ *X. dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้และปริมาณของแอสทาแซนทีนจะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของอาหารเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่าอาหารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 15% (w/w) การผลิตสารแอสทาแซนทีนจะลดลงและคงที่ที่ความเข้มข้น 30% (w/w) และพบว่าสำหรับอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากมันสำปะหลัง MME และ MMH ความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมที่สุดคือ 20% (w/w) ส่วนอาหารที่เป็น MRIE, MRIH และ MPIE พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 15% (w/w) และอาหารที่เป็น MPIH เชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้สูงสุดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10% (w/w) และพบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่เป็น MPIH ได้มากที่สุด

ตารางที่ 4 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมันสำปะหลัง

ความเข้มข้นเริ่มต้น (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
1	0.45	0.0012	0.48	0.55	0.62	0.71
2	0.66	0.02	0.68	0.72	0.88	1.78
3	0.99	0.10	1.12	1.34	1.42	2.89
4	1.29	0.27	2.28	2.42	2.57	4.21
5	1.71	0.37	2.94	3.01	3.14	5.56
6	2.36	0.57	3.65	3.87	4.57	7.35
7	3.68	0.72	4.17	4.23	5.42	9.05
8	4.88	0.88	5.21	5.74	7.03	12.54
9	5.34	0.97	6.09	6.19	8.79	16.85
10	5.54	1.07	7.27	7.31	10.4	19.55
15	5.63	1.32	9.21	10.78	15.2	18.47
20	6.05	1.59	9.2	10.72	15.18	18.10
30	5.79	1.55	9.18	10.71	15.03	18.00



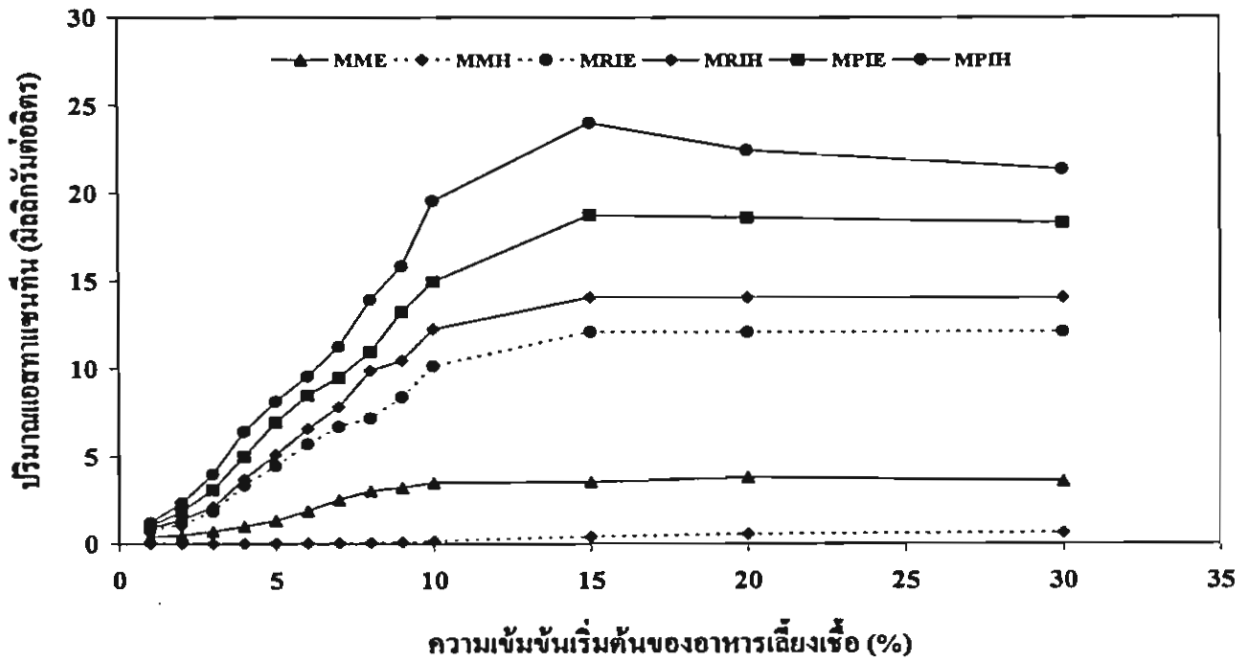
รูปที่ 6 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

X. dendrorhous เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย
มัสตาร์ด

ตารางที่ 5 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตสารแอซทาแซนทีนของเชื้อ

X. dendrorhous เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย
มัสตาร์ด

ความเข้มข้น เริ่มต้น (%)	ปริมาณแอซทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRiE	MRiH	MPiE	MPiH
1	0.38	0.00	0.76	0.88	1.03	1.20
2	0.49	0.00	1.10	1.39	1.83	2.31
3	0.7	0.01	1.84	2.11	3.10	3.97
4	0.99	0.02	3.34	3.71	5.00	6.41
5	1.35	0.03	4.46	5.08	6.94	8.12
6	1.89	0.04	5.71	6.58	8.48	9.56
7	2.54	0.06	6.70	7.82	9.51	11.26
8	3.04	0.07	7.18	9.88	10.95	13.91
9	3.23	0.11	8.37	10.46	13.21	15.81
10	3.49	0.16	10.13	12.24	14.93	24.02
15	3.55	0.39	12.10	14.05	18.76	22.45
20	3.78	0.54	12.08	14.04	18.61	21.35
30	3.57	0.61	12.09	14.04	18.31	21.35



รูปที่ 7 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ท

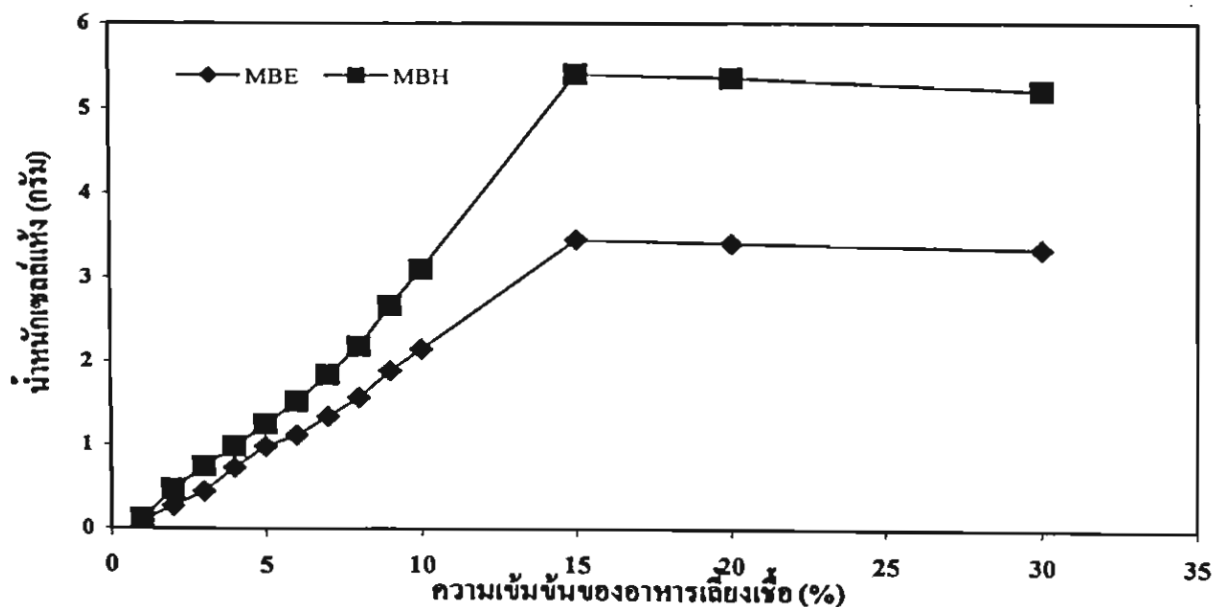
3.4.2 ผลของปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตวันเฝ้าที่มีต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous*

เมื่อเตรียมอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากถั่วเขียวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงไปแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อแล้วสกัดสารออกจากเซลล์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 8 พบว่าการศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากถั่วเขียวเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ จะได้ว่า การเจริญเติบโตของเชื้อจะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 และที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 15 % (w/w) ของอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากถั่วเขียว MBE และ MBH เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุด โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารทั้งสองมีค่าเท่ากับ 3.45 และ 5.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่มากกว่า 15% (w/w) พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตลดลง และคงที่จนถึงที่ความเข้มข้น 30% (w/w) ส่วนการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากถั่วเขียวพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 15 % (w/w) ของอาหารที่เป็น MBH เชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากที่สุดเท่ากับ 3.50 มิลลิกรัมต่อลิตร และการผลิตสารแอสทาแซนทีนจะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารมากขึ้นด้วย ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 9

แอสทาแซนทีนจะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารมากขึ้นด้วย ดังแสดงในตารางที่ 7 และ รูปที่ 9

ตารางที่ 6 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น

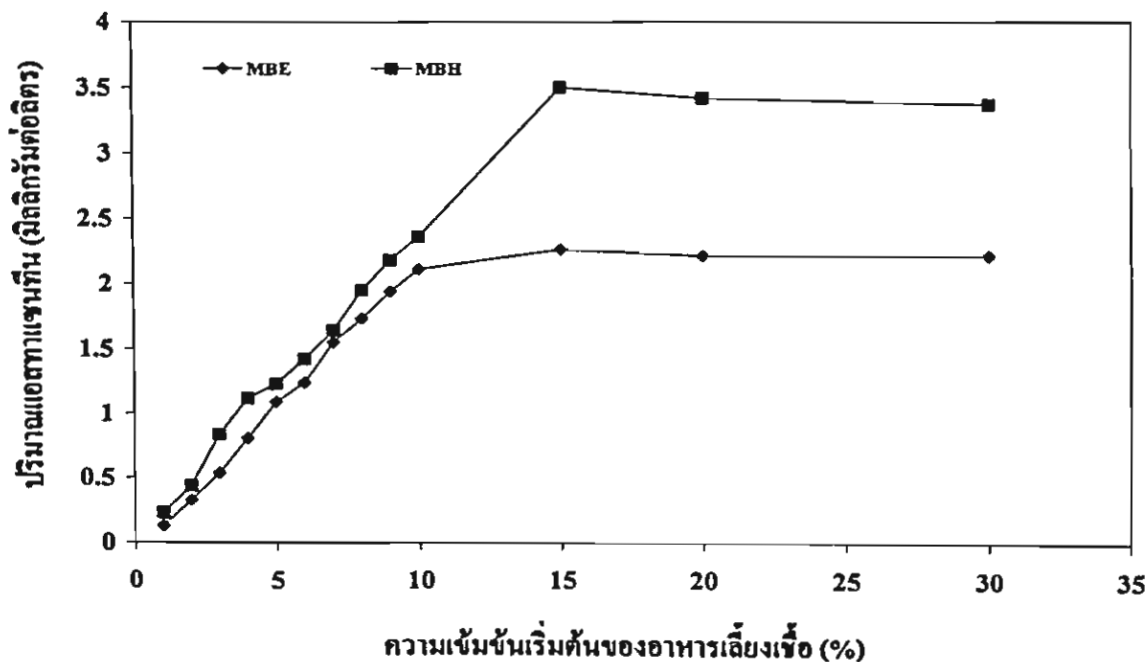
ความเข้มข้น เริ่มต้น (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
1	0.09	0.12
2	0.27	0.47
3	0.44	0.74
4	0.73	0.98
5	0.98	1.25
6	1.12	1.52
7	1.34	1.84
8	1.57	2.18
9	1.89	2.67
10	2.15	3.10
15	3.45	5.40
20	3.40	5.35
30	3.33	5.20



รูปที่ 8 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น

ตารางที่ 7 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น

ความเข้มข้น เริ่มต้น (%)	ปริมาณแอตทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
1	0.13	0.23
2	0.33	0.44
3	0.54	0.84
4	0.81	1.12
5	1.09	1.23
6	1.24	1.42
7	1.55	1.64
8	1.73	1.95
9	1.94	2.18
10	2.11	2.36
15	2.26	3.5
20	2.21	3.42
30	2.21	3.37



รูปที่ 9 แสดงผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสาร แอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น

3.5 การหาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอคทาแซนทีนของเชื้อ

X. dendrorhous ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้

3.5.1 ผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอคทาแซนทีนของเชื้อ

X. dendrorhous

ก. ผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยและวันเฝ้า

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบหลังจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและวันเฝ้า โดยการเตรียมอาหารให้มีพีเอชของอาหารเป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 และถ่ายเชื้อ *X. dendrorhous* ที่ความเข้มข้นเป็น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิเมตร แล้วนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นแยกเซลล์ เพื่อหาปริมาณน้ำหนักรวมของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ กัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 10

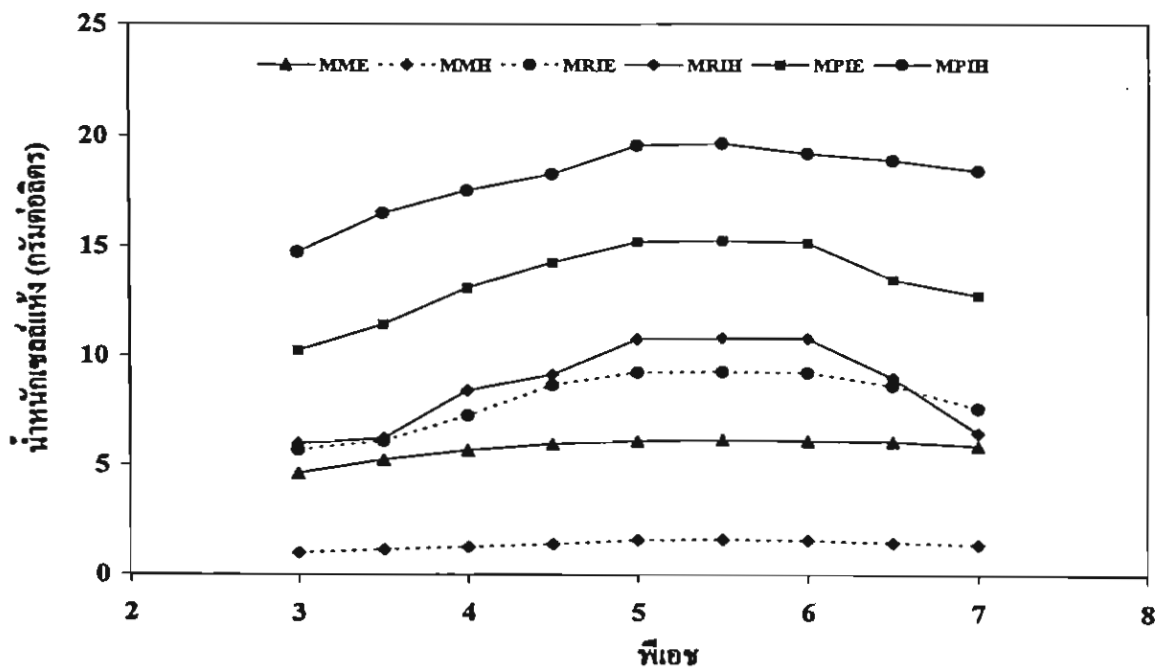
จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารแต่ละชนิดที่มีค่าพีเอชต่างกัน พบว่าค่าพีเอชของอาหารในช่วงที่ศึกษาไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เนื่องจากน้ำหนักรวมของเชื้อที่ได้มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยเฉพาะในอาหาร MME และ MMH ส่วนอาหาร MRIE, MRJH, MPIE และ MPIH พบว่าน้ำหนักรวมของเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อค่าพีเอชมากขึ้น และน้ำหนักรวมของเชื้อจะมีค่าสูงสุดและคงที่ที่ค่าพีเอชในช่วง 5.0-6.0 ยกเว้นในอาหาร MPIH ที่น้ำหนักรวมของเชื้อสูงสุดและคงที่ที่ค่าพีเอชในช่วง 5.0-5.5 และที่ค่าพีเอชที่มากกว่า 6.0 พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งสังเกตจากน้ำหนักรวมของเชื้อที่ได้มีค่าลดลง จากการทดลองพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

X. dendrorhous อยู่ในช่วง 5.0-6.0

ส่วนการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น MBE และ MBH ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 11 สังเกตได้ว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ต่างกัน เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แตกต่างกัน คือ เชื้อมีการเจริญเติบโตได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารมากขึ้น จนถึงค่าพีเอชที่ 5.0-6.5 ของอาหาร MBE และพีเอช 5.0-6.0 ของ MBH การเจริญเติบโตของเชื้อมีอัตราที่คงที่ ซึ่งปริมาณของน้ำหนักรวมของเชื้อที่ได้มีค่าเท่าเดิม และที่ค่าพีเอชมากขึ้นน้ำหนักรวมของเชื้อที่ได้มีค่าลดลงเล็กน้อย และน้ำหนักรวมของเชื้อที่ได้ที่ค่าพีเอชของอาหาร MBE และ MBH ที่ 5.5 พบว่ามีค่ามากที่สุดเท่ากับ 3.48 และ 5.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 8 แสดงผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

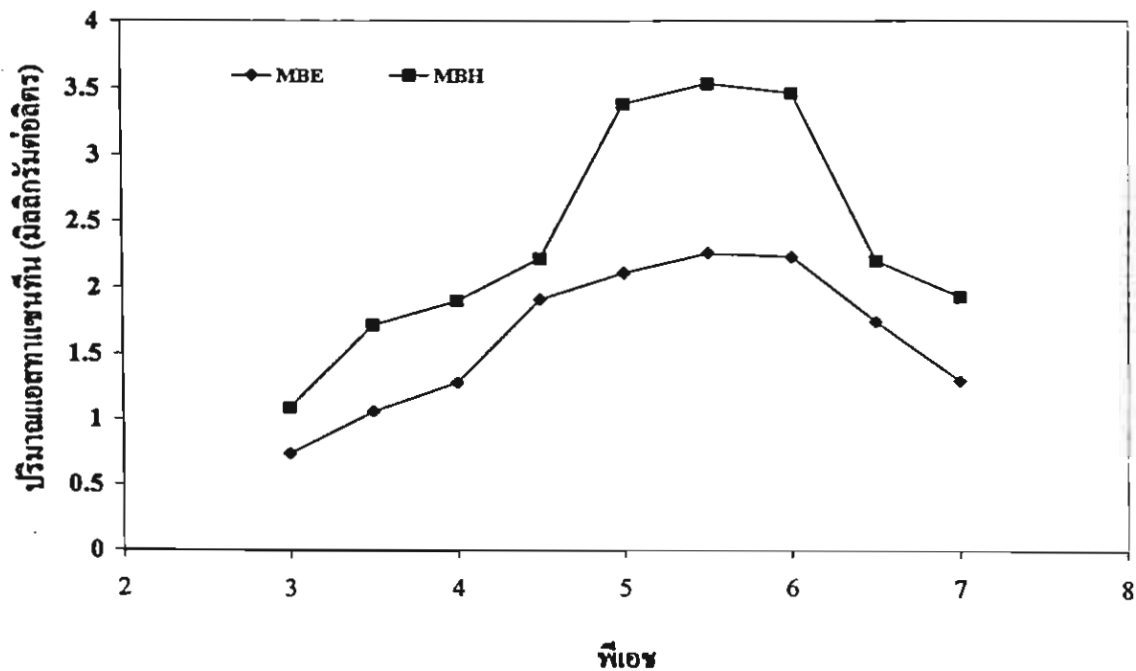
pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
3.0	4.64	1.02	5.71	6.01	10.25	14.75
3.5	5.28	1.17	6.12	6.24	11.46	16.53
4.0	5.68	1.27	7.26	8.41	13.12	17.54
4.5	5.97	1.39	8.65	9.12	14.26	18.28
5.0	6.09	1.58	9.23	10.75	15.2	19.56
5.5	6.15	1.60	9.25	10.80	15.25	19.65
6.0	6.10	1.57	9.20	10.77	15.15	19.20
6.5	6.07	1.46	8.61	8.97	13.46	18.89
7.0	5.88	1.37	7.58	6.45	12.75	18.42



รูปที่ 10 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

ตารางที่ 9 แสดงผลของพีเอชของอาหารต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเย็น

pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
3.0	1.01	1.26
3.5	1.31	2.75
4.0	1.58	3.42
4.5	2.14	4.27
5.0	3.45	5.4
5.5	3.48	5.45
6.0	3.42	5.42
6.5	3.4	3.16
7.0	2.38	2.24



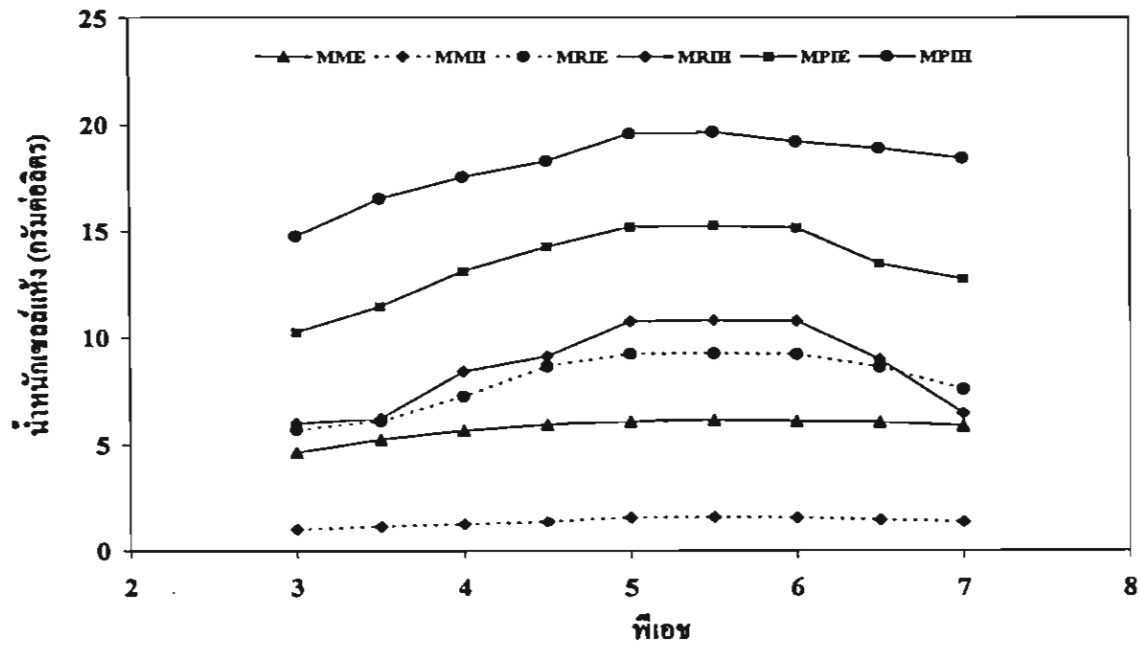
รูปที่ 11 แสดงผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเย็น

ข. ผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยและวันเฝ้า

เมื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกันในอาหารที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับอาหารแต่ละชนิด และถ่ายเชื้อลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการปั่นแยกเซลล์และสกัดสารออกจากเซลล์เพื่อหาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 รูปที่ 12 และในตารางที่ 11 รูปที่ 13 จากการทดลองพบว่าค่าพีเอชของอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบหลังจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีมาตรฐานและวันเฝ้าที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากที่สุดคือ พีเอช 5.5 โดยพบว่าปริมาณสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้ในอาหารที่เป็น MME, MMH, MRIE, MRIH, MPIE, MPIH, MBE และ MBH มีค่าเท่ากับ 3.88, 0.59, 11.97, 13.90, 19.00, 25.77, 2.26 และ 3.53 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารแต่ละชนิดที่มีค่าพีเอชแตกต่างกันพบว่าการผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารดังกล่าวมีการผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น และคงที่ในช่วงพีเอช 5.0-6.0 และที่ค่าพีเอชของอาหารที่มากกว่า 6.0 การผลิตสารจะลดลง

ตารางที่ 10 แสดงผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันมาตรฐาน

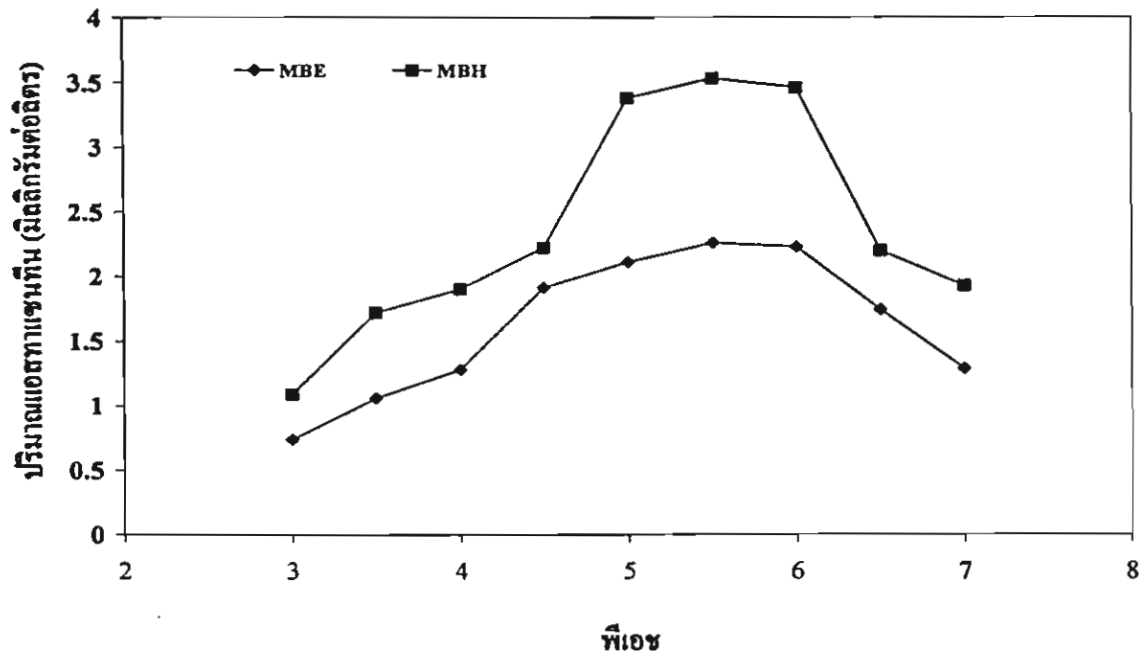
pH	ปริมาณแอสทาแซนทีน(มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
3.0	2.76	0.25	9.23	11.12	14.26	19.53
3.5	3.27	0.44	10.16	11.22	14.84	21.36
4.0	3.68	0.55	10.49	11.80	16.03	22.59
4.5	3.80	0.58	11.06	13.12	17.22	23.85
5.0	3.85	0.59	11.92	13.73	18.56	25.52
5.5	3.88	0.59	11.97	13.90	19.00	25.77
6.0	3.52	0.56	11.80	13.86	18.75	25.20
6.5	3.49	0.53	11.57	13.67	18.70	25.02
7.0	3.34	0.47	10.93	12.98	17.35	24.84



รูปที่ 12 แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอคทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด

ตารางที่ 11 แสดงผลของพีเอชของอาหารที่มีต่อการผลิตสารแอคทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่สกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเห็ด

pH	ปริมาณแอคทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
3.0	0.74	1.09
3.5	1.06	1.72
4.0	1.28	1.90
4.5	1.91	2.22
5.0	2.11	3.38
5.5	2.26	3.53
6.0	2.23	3.46
6.5	1.74	2.20
7.0	1.29	1.93



รูปที่ 13 แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอคตาเซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเห็ด

3.5.2. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอคตาเซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้

ก. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและวุ้นเห็ด

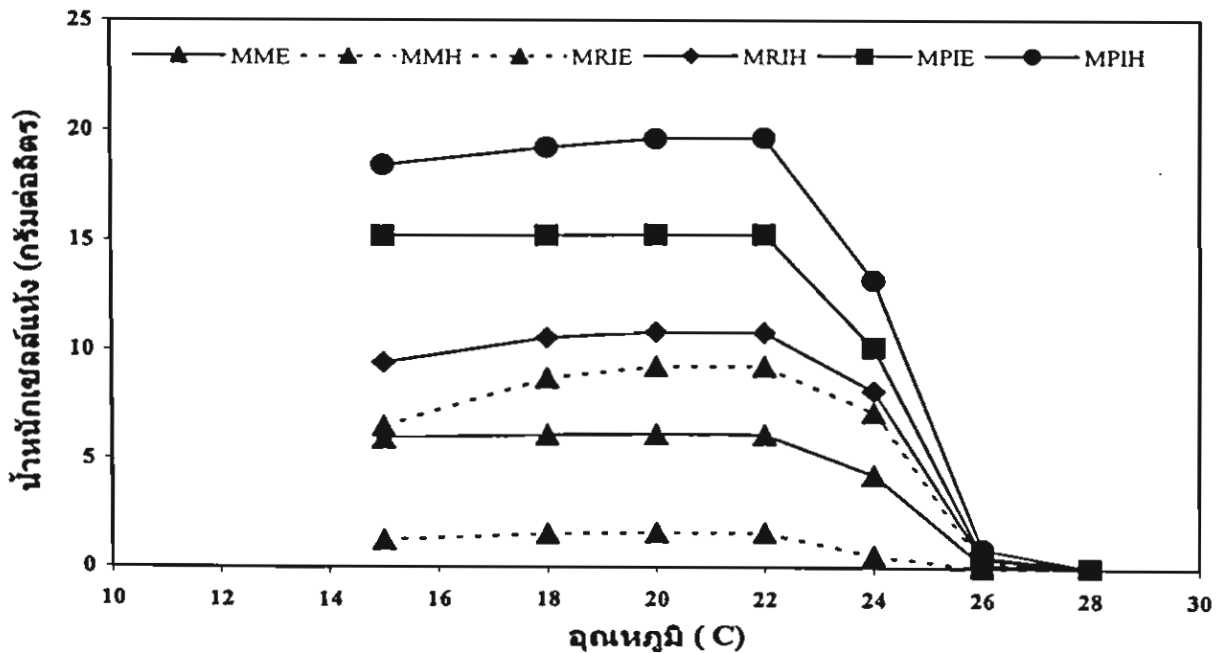
ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยเตรียมอาหารที่ความเข้มข้น 20% (w/w) MME, 20% (w/w) MMH, 15% (w/w) MRIE, 15% (w/w) MRIH, 15% (w/w) MPiE, 10% (w/w) MPIH, 15% (w/w) MBE และ 15% (w/w) MBH โดยได้เตรียมให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 แล้วถ่ายเชื้อลงไปในการอาหารที่เตรียมได้ จากนั้นนำไปเขย่าที่เครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 15, 18, 20, 22, 24, 26 และ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 120 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นแยกเซลล์และหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 รูปที่ 14 และตารางที่ 13 รูปที่ 15

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *X. dendrorhous* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15-22 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุดที่ 20-22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 22 องศาเซลเซียสพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้น้อยลงและที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะได้ว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยพิจารณาจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ และพบว่าน้ำหนัก

เซลล์แห้งสูงสุดของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร 10% (w/w) ของ MPIH และที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 12 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

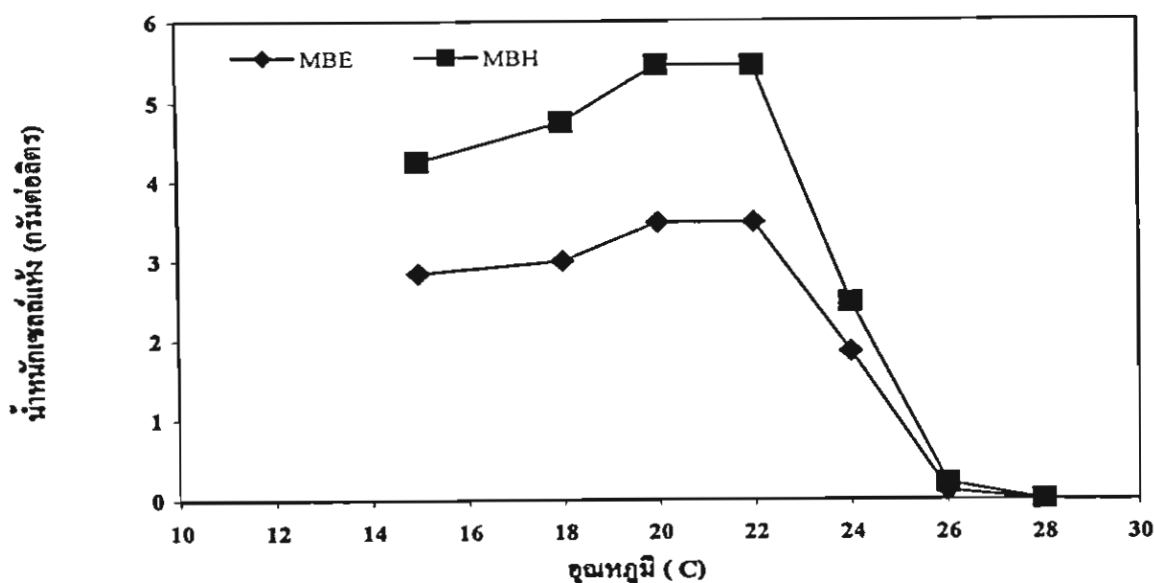
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
15	5.95	1.25	6.52	9.43	15.2	18.45
18	6.11	1.53	8.74	10.58	15.24	19.23
20	6.12	1.59	9.27	10.82	15.26	19.62
22	6.11	1.58	9.25	10.80	15.25	19.65
24	4.27	0.56	7.14	8.12	10.11	13.20
26	0.15	0.002	0.22	0.41	0.52	0.87
28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



รูปที่ 14 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด

ตารางที่ 13 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเฝ้า

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
15	2.85	4.25
18	3.00	4.75
20	3.48	5.46
22	3.48	5.45
24	1.85	2.47
26	0.11	0.21
28	0.00	0.00



รูปที่ 15 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเฝ้า

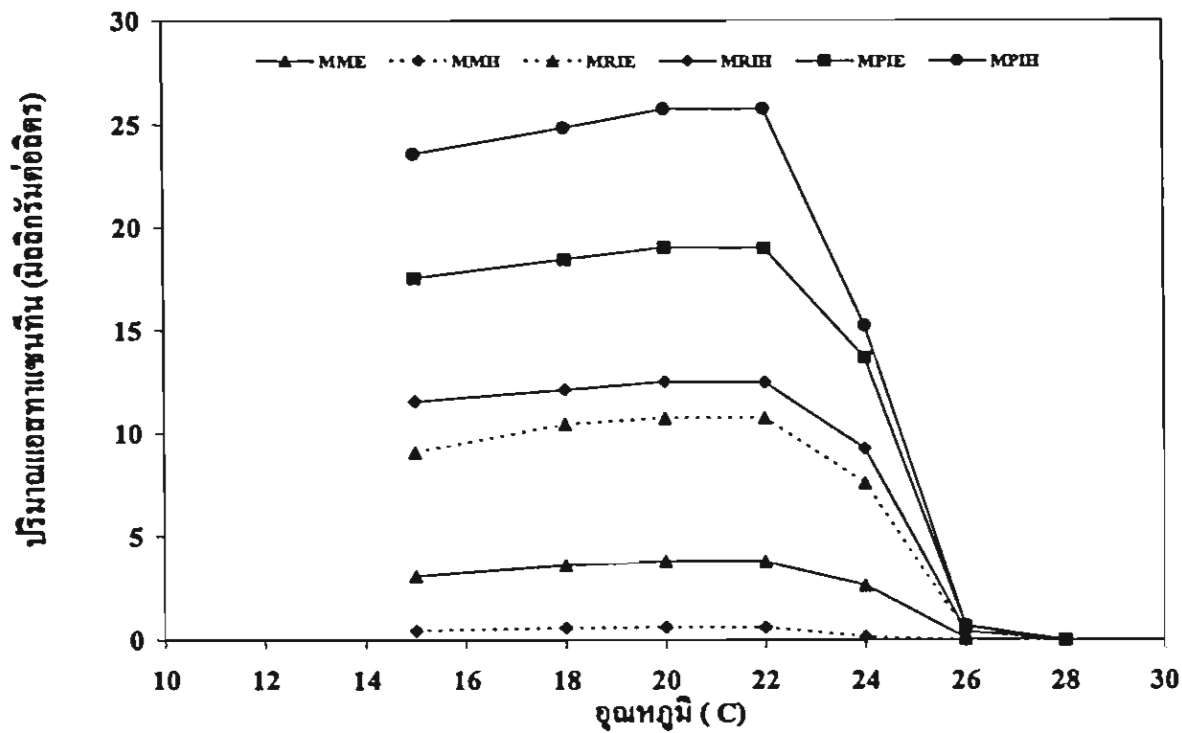
ข ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและวันเฝ้า

ในการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นและพีเอชที่เหมาะสมของอาหารที่เป็นสารสกัด จากนั้นถ่ายเชื้อลงไป แล้วนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตามที่กำหนด เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้ว

ทำการเก็บเซลล์และสกัดสารแอสทาแซนทีนออกจากเซลล์ และคำนวณหาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้ ผลดังแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 16 จากผลการทดลองพบว่า เชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 22 องศาเซลเซียส และผลิตได้สูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็น MPIH ได้เท่ากับ 25.78 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิสูงที่สุดที่เชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้คือที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า เชื้อสามารถได้ในอาหารต่าง ๆ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมดังนี้ อาหาร MME ได้เท่ากับ 3.81 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหาร MMH เท่ากับ 0.61 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหาร MRIE, MRIH, MPiE และ MPIH ได้เท่ากับ 10.76 12.51 19.01 และ 25.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากถั่วเขียว MBE และ MBH มีค่าเท่ากับ 2.19 และ 3.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 17

ตารางที่ 14 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐาน

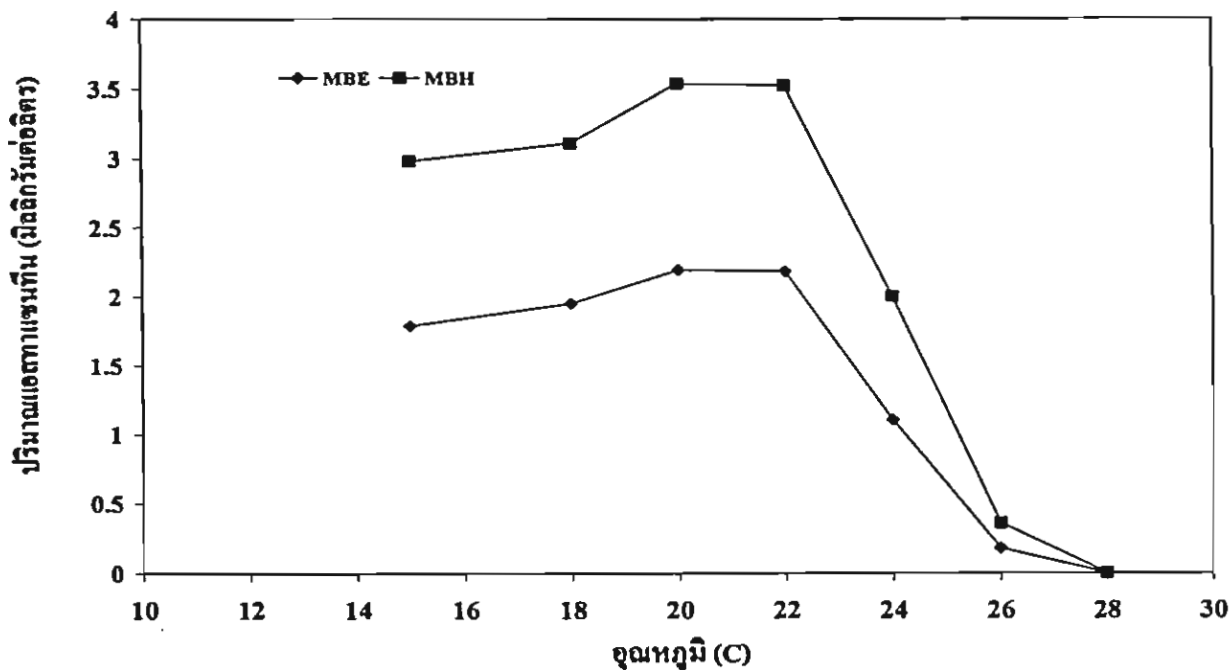
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ แอสทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRiE	MRiH	MPiE	MPiH
15	3.10	0.45	9.10	11.55	17.53	23.56
18	3.64	0.58	10.46	12.13	18.45	24.85
20	3.81	0.61	10.76	12.51	19.02	25.77
22	3.79	0.60	10.76	12.47	19.00	25.78
24	2.64	0.15	7.60	9.28	13.67	15.23
26	0.09	0.003	0.35	0.40	0.63	0.71
28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



รูปที่ 16 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสาร แอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ค

ตารางที่ 15 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันแด้น

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ แอตทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
15	1.79	2.98
18	1.95	3.11
20	2.19	3.54
22	2.18	3.52
24	1.10	2.00
26	0.18	0.36



รูปที่ 17 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอซทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตวันเฝ้า

3.5.3. ผลของเวลาที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอซทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้

ก. ผลของเวลาที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและวันเฝ้า

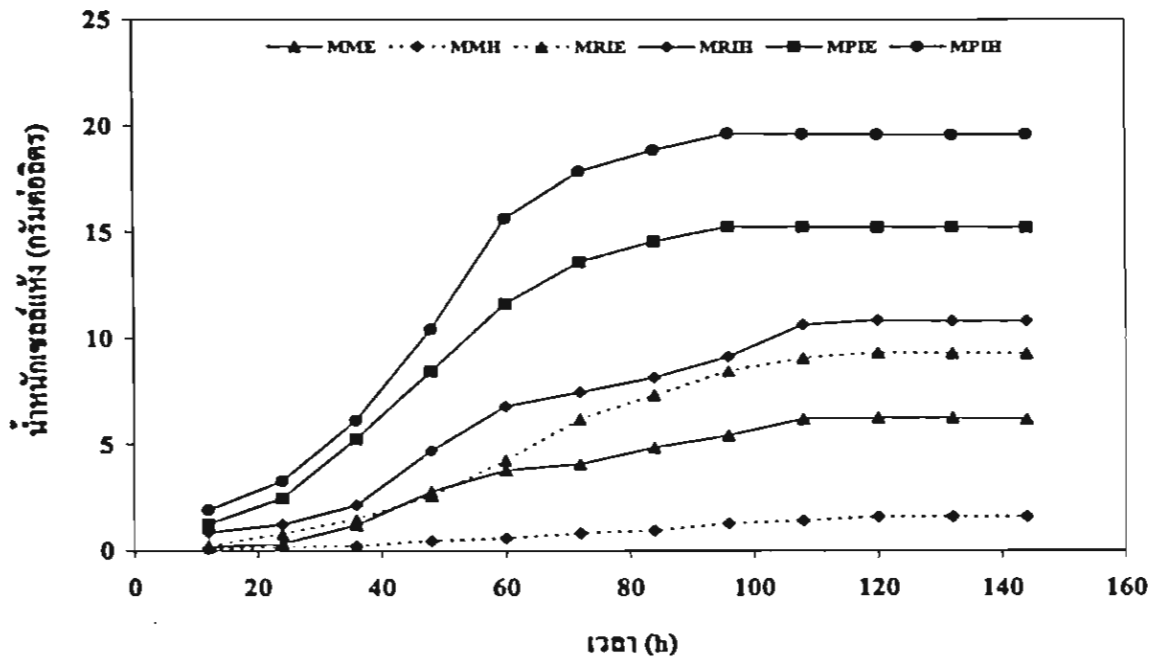
การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ แอซทาแซนทีนในอาหาร MME, MMH, MRIE, MRI, MPIE, MPIH, MBE และ MBH ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสม และปรับค่าพีเอชของอาหารที่ 5.5 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บเซลล์ทุก ๆ 12 ชั่วโมง ผลดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 18 จากการทดลองจะได้ว่าในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่าเชื้อมีการเจริญช้า ๆ จนถึงหลังชั่วโมงที่ 24 พบว่าเชื้อเริ่มมีการเจริญเติบโตมากขึ้นและรวดเร็วขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 108 พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้สูงที่สุด สำหรับอาหาร MME, MMH, MRIE และ MRIH ส่วนอาหาร MPIE และ MPIH พบว่าเจริญได้สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 96 และหลังจากที่เจริญได้สูงที่สุด ได้ทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 144 พบว่าเชื้อจะมีการเจริญเติบโตได้น้อยลงกว่าเดิมเล็กน้อย ซึ่งสังเกตได้จากการที่น้ำหนักเซลล์ที่ได้มีค่าลดลง เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหาร MPIH และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าสูงที่สุดคือ 19.62 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 96

สำหรับการเจริญเติบโตในอาหารที่เป็น MBE และ MBH พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* มีลักษณะเหมือนกับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจาก

น้ำมันหอมระเหยมาตรฐาน ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 19 และพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งคิดเป็น 3.48 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหาร MBE และคิดเป็น 5.45 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหาร MBH ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 19

ตารางที่ 16 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐาน

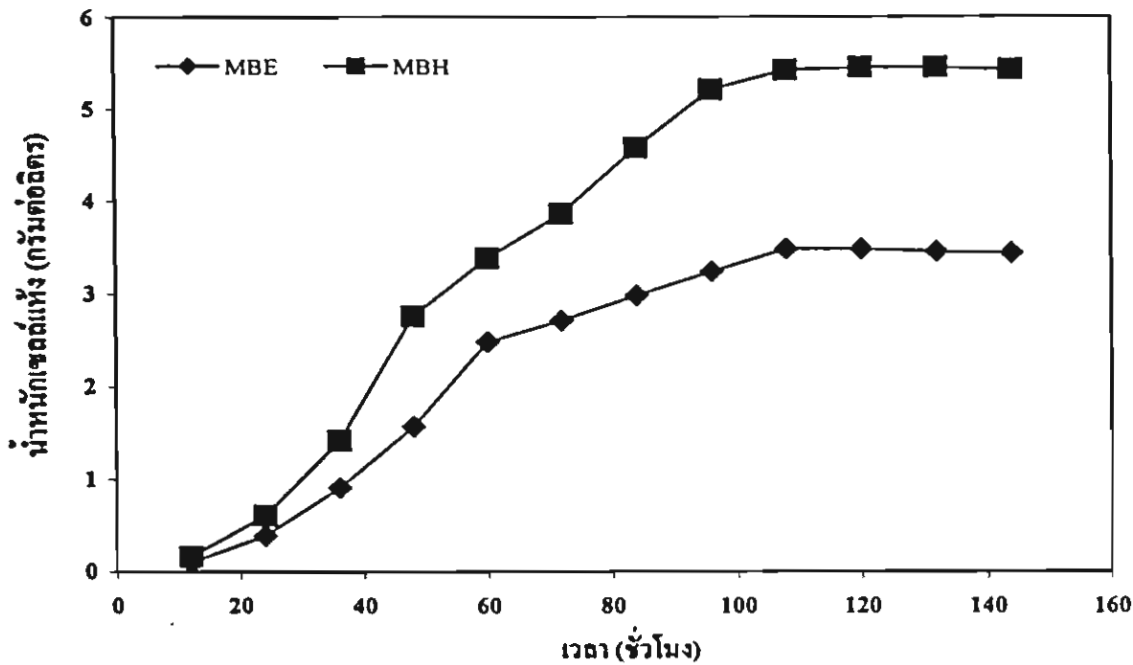
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
12	0.16	0.09	0.22	0.85	1.25	1.89
24	0.32	0.16	0.79	1.23	2.46	3.25
36	1.22	0.22	1.48	2.13	5.25	6.12
48	2.79	0.46	2.57	4.69	8.45	10.42
60	3.77	0.58	4.23	6.78	11.63	15.62
72	4.07	0.81	6.19	7.45	13.58	17.86
84	4.86	0.93	7.31	8.14	14.56	18.86
96	5.41	1.27	8.45	9.12	15.25	19.65
108	6.18	1.39	9.05	10.63	15.23	19.62
120	6.25	1.59	9.30	10.85	15.22	19.59
132	6.24	1.58	9.29	10.82	15.24	19.57
144	6.17	1.58	9.28	10.82	15.20	19.60



รูปที่ 18 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐาน

ตารางที่ 17 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเด่น

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
12	0.10	0.16
24	0.39	0.61
36	0.91	1.42
48	1.57	2.76
60	2.48	3.38
72	2.71	3.86
84	2.98	4.58
96	3.24	5.21
108	3.48	5.42
120	3.48	5.45
132	3.45	5.45
144	3.44	5.43



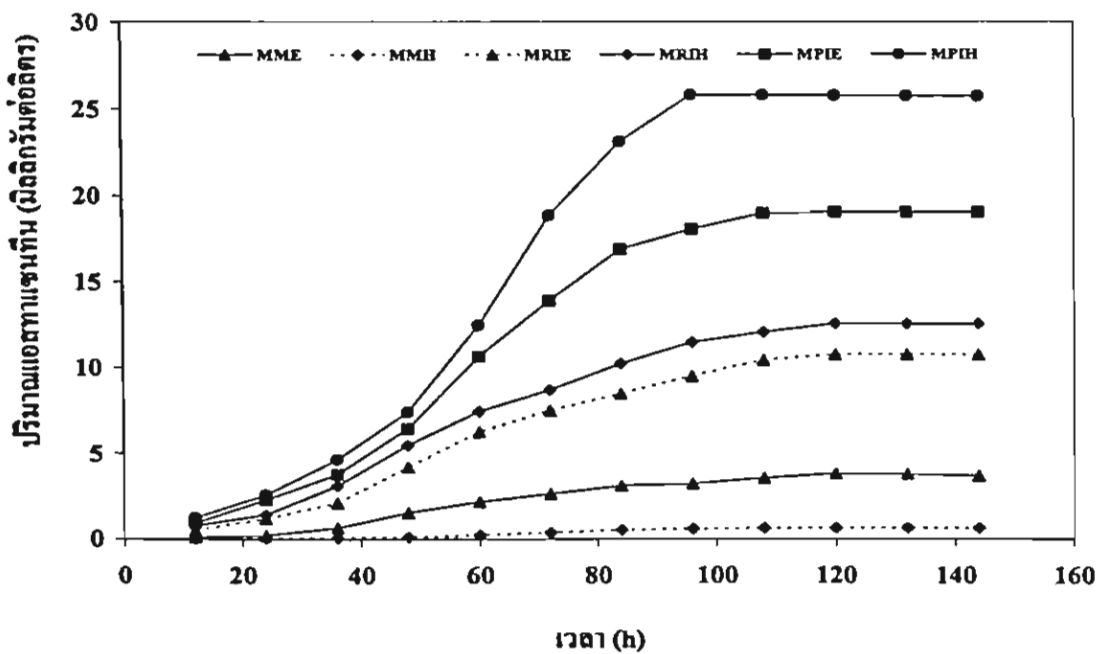
รูปที่ 19 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากระบวนการผลิตวันแฉ่น

ข. ผลของเวลาที่มีต่อการผลิตสาร แอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยและวันแฉ่น

จากการศึกษาการผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นและพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหาร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสแล้วทำการเก็บเซลล์ทุก ๆ 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดสารออกจากเซลล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อหาปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 20 พบว่าในอาหารทุกชนิดการผลิตสารแอสทาแซนทีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยได้มีการผลิตอย่างช้าและปริมาณเล็กน้อยที่เวลาเริ่มต้น และหลังจากนั้นมีการผลิตมากขึ้นเรื่อย ๆ และพบว่าสามารถผลิตได้สูงที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมง ยกเว้นเมื่อเลี้ยงในอาหาร MPIH ซึ่งสามารถผลิตได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 96 ชั่วโมง และหลังจากนั้นเชื้อมีการผลิตสารได้ในอัตราที่น้อยลง ปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่ได้พบว่ามีค่าน้อยลงด้วย ซึ่งลักษณะการผลิตสาร แอสทาแซนทีนของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากถั่วเขียวพบว่ามีลักษณะที่คล้ายกัน และเชื้อสามารถผลิตสารได้สูงที่สุดที่เวลา 120 ชั่วโมง และปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 2.27 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร MBE และมีค่าเท่ากับ 3.54 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร MBH ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 21

ตารางที่ 18 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐาน

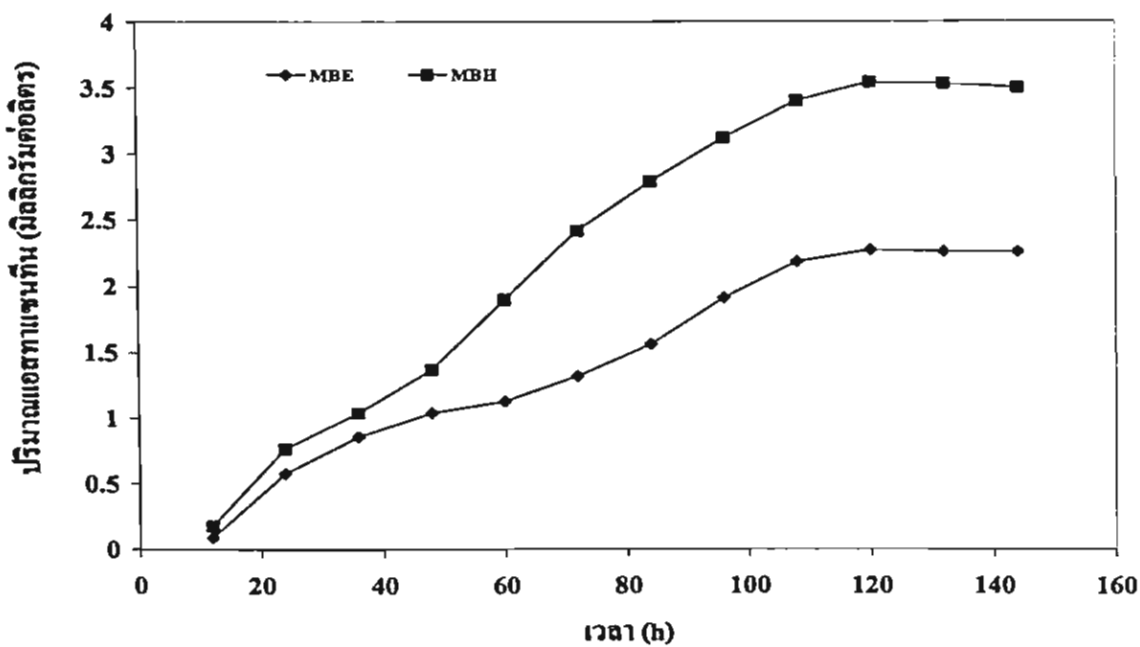
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ แอตทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
12	0.11	0.014	0.52	0.77	0.92	1.23
24	0.22	0.046	1.19	1.44	2.30	2.59
36	0.68	0.072	2.12	3.12	3.81	4.65
48	1.54	0.113	4.22	5.51	6.47	7.42
60	2.17	0.209	6.27	7.46	10.66	12.46
72	2.65	0.37	7.51	8.71	13.92	18.86
84	3.09	0.50	8.48	10.24	16.91	23.14
96	3.23	0.57	9.51	11.47	18.07	25.79
108	3.55	0.60	10.42	12.05	18.97	25.77
120	3.83	0.62	10.75	12.53	19.04	25.75
132	3.78	0.61	10.75	12.52	19.03	25.73
144	3.68	0.61	10.73	12.52	19.02	25.71



รูปที่ 20 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐาน

ตารางที่ 19 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบแห้งกระบวนการผลิตวันเดียว

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ แอตทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MBE	MBH
12	0.09	0.18
24	0.58	0.77
36	0.86	1.04
48	1.04	1.37
60	1.13	1.90
72	1.32	2.42
84	1.56	2.79
96	1.91	3.12
108	2.18	3.40
120	2.27	3.54
132	2.26	3.53
144	2.26	3.50



รูปที่ 21 แสดงผลของเวลาต่อการผลิตสารแอตทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบแห้งกระบวนการผลิตวันเดียว

บทที่ 4 รูปและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 คุณสมบัติของวัตถุดิบที่นำมาเตรียมเป็นอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาคุณสมบัติของกากมัสตาร์ด (MM) สารสกัดจากน้ำทิ้งมัสตาร์ด (MRI และ MPI) และ น้ำทิ้งโปรตีนถั่วเขียวซึ่งได้หลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและวุ้นเส้น พบว่า วัตถุดิบแต่ละชนิดมีองค์ประกอบต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) อยู่ในช่วง 25-44 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า MPI มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงที่สุดคือ 43.60 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องมาจากกว่าเป็นการดกตะกอนจากน้ำทิ้งมัสตาร์ดทั้งหมดในสถานะที่เป็นกรด โดยน้ำทิ้งที่เหลือจากการผลิตน้ำมันหอมระเหยแล้ว ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารที่เป็นโปรตีนในปริมาณสูง ดังนั้นเมื่อทำการดกตะกอนแล้วทำให้พบว่ามีปริมาณของโปรตีนทั้งหมดมากที่สุด จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหาร MRI พบว่า มีปริมาณของโปรตีนทั้งหมดประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของที่พบในอาหาร MPI เนื่องมาจากการใช้วิธีเหวี่ยงเพื่อเก็บสารสำคัญนั้น เป็นการเก็บเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนของแข็งเท่านั้น ไม่ได้มีการเอาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนที่เป็นน้ำออกมาด้วย ดังนั้นปริมาณของโปรตีนที่ได้จึงน้อยกว่าวิธีการดกตะกอน เมื่อพิจารณาวัตถุดิบที่ได้เลือกนำมาใช้ในการเตรียมเป็นอาหารเหลวเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่าคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารแต่ละชนิด สามารถนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ในส่วนของ MRI และ MPI พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldal พบว่าปริมาณของโปรตีนที่พบมีปริมาณสูง โดยที่กากมัสตาร์ด (MM) มีโปรตีนเท่ากับ 33.64% MRI เท่ากับ 28.84 % และ MPI เท่ากับ 43.60% นอกจากนี้ยังพบว่าวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 20-35 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไขมันที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณที่แตกต่างกัน กากมัสตาร์ด (MM) เป็นกากมัสตาร์ดที่มีการบีบน้ำมันออกไป แต่พบว่าไม่สามารถที่จะทำการบีบน้ำมันออกจากเมล็ดจนหมดได้ ดังนั้นในกากมัสตาร์ดจึงพบไขมันเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงถึง 19.20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในน้ำทิ้งมัสตาร์ดเป็นส่วนที่ได้จากการสกัดเอาน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ออกไปแล้ว จึงพบว่าปริมาณของไขมันที่พบมีปริมาณที่น้อยกว่ากากมัสตาร์ด พบว่า MRI มีปริมาณไขมัน 3.25 เปอร์เซ็นต์ และ MPI มีไขมันเท่ากับ 0.77 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในกากมัสตาร์ดและ MRI พบว่าประกอบด้วยกลูโคซิโนเลต ไฟเตท กรดอีรูซิก และสารประกอบฟีนอลิกด้วยซึ่งเป็นสารก่อให้เกิดพิษในอาหารเมื่อได้รับในปริมาณที่มากเกินไป จากการรายงานของ Xu และคณะ (43) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ yellow mustard (*Sinapis alba* L.) พบว่ามีปริมาณโปรตีน 43.2-50.7 เปอร์เซ็นต์ กลูโคซิโนเลต 15.1-202 ไมโครโมลต่อกรัม และไฟเตทเท่ากับ 2.16-4.05 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Pedroche และคณะ (52) ได้ศึกษาการเตรียม protein isolate จากกากมัสตาร์ด *Brassica carinata* และได้มีการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของมัสตาร์ดด้วย ซึ่ง

พบว่ามีโปรตีนเท่ากับ 38.9 เปอร์เซ็นต์ กลูโคซิโนเลต 5.1 เปอร์เซ็นต์ และ กรดไฟติก 3.1 เปอร์เซ็นต์ และในการทดลองนี้ยังพบว่าในน้ำทิ้งมัสตาร์ดมีปริมาณเส้นใยน้อยกว่าที่พบในกากมัสตาร์ดเล็กน้อย โดยที่เส้นใยที่เกิดขึ้นจากการป่นเปลือกของเปลือกหุ้มเมล็ดมัสตาร์ด ส่วนปริมาณเถ้าที่พบเป็นค่าที่บอกถึงปริมาณเกลือแร่ในวัตถุดิบมัสตาร์ด พบว่ามีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และสารประกอบฟีนอลิกที่พบในกากมัสตาร์ด (MM) MRI และ MPI เป็นสารที่ทำให้เกิดสีคล้ำขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีรสขม นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดอะมิโนจำเพาะเช่นไลซีน (lysine) หรือเมทไธโอนีน (methionine) เอนไซม์ และโปรตีนอื่น ๆ ทำให้คุณค่าทางอาหารลดลงอีกด้วย (53, 54) จากวัตถุดิบที่ได้จากการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดพบว่าสามารถนำมาใช้ในการเตรียมเป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีที่เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้

ในผงโปรตีนถั่วเขียวที่ได้จากการผลิตวันเส้นพบว่าประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในปริมาณสูงเช่นกัน โดยมีปริมาณเท่ากับ 25.40 เปอร์เซ็นต์ และ 21.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่พบว่ามีปริมาณของไขมันและเส้นใยน้อยกว่าที่พบในวัตถุดิบจากมัสตาร์ด และในการทดลองนี้ยังได้มีการวิเคราะห์ปริมาณไฟเตคด้วยพบว่าไฟเตคเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณกลูโคซิโนเลต กรดอีรูซิก และสารประกอบฟีนอลิก พบว่ามีปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถทำการตรวจวัดได้ จากการศึกษาของ Rahma และคณะ (44) ได้ศึกษาการสกัดโปรตีนออกจากแป้งถั่วเขียว พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 23.3 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์ปริมาณไฟเตคด้วยพบว่าไฟเตคเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 1.7 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Lee และคณะ (55) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในแป้งถั่วเขียวได้แก่ โปรตีน 24.3 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.67 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 3.6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในส่วนหนึ่งของผงโปรตีนถั่วเขียวที่ได้จากการผลิตวันเส้นคาดว่าสามารถนำมาเตรียมให้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แทนอาหารที่มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยอาหารสังเคราะห์พบว่ามีราคาสูงมาก เนื่องจากผ่านขั้นตอนในการสังเคราะห์ที่ยุ่งยากและซับซ้อน และในการศึกษาการผลิตสารแอสทาแซนทีนโดยเชื้อ *X. dendroehous* นั้นพบว่าได้มีการพัฒนาเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารดังกล่าวทั้งในอาหารที่สังเคราะห์ขึ้นและในวัตถุดิบที่เหลือทิ้งจากการเกษตรและจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ด้วย โดยวัตถุดิบที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ได้นำมาใช้เป็นอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendroehous* ได้แก่ กากน้ำตาล (47), peat hydrolysate (55-56), grape juice alfalfa (46) และ wood hydrolystes (49) เป็นต้น จากการเลี้ยงในอาหารดังกล่าวพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโต และผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นการนำเอาวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและวันเส้นมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีคุณค่าสูงจึงเป็นการลดต้นทุนในการผลิต ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการย่อยสลายของวัตถุดิบต่างๆ โดยเชื้อจุลินทรีย์จาก

ธรรมชาติซึ่งทำให้เกิดมลภาวะเป็นพิษและทำให้น้ำเสียด้วย และเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบที่เหลือทิ้งด้วย

4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและวุ้นเส้น

ในการเตรียมอาหารจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและวุ้นเส้น เพื่อใช้เป็นอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในการผลิตสารแอสทาแซนตินนั้น ได้มีวิธีการเตรียมอาหารจากวัตถุดิบทั้งสองชนิด 2 วิธีคือ การสกัดด้วยน้ำร้อนและการย่อยสลายด้วยสารละลายกรด พบว่าอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบจากมัสตาร์ดมีลักษณะที่แตกต่างกัน รวมทั้งมีปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดแตกต่างกัน โดยลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธีมีลักษณะแตกต่างกัน และอาหารที่เตรียมได้จาก MM, MRI และ MPI พบว่าลักษณะของอาหารและสีที่ได้แตกต่างกัน โดยอาหารที่เตรียมด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อน มีลักษณะใสและมีสีเหลืองลักษณะคล้ายกับอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ YM (Yeast extract/ malt extract medium) ที่ใช้ในการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ส่วนอาหาร MM และ MRI ที่เตรียมด้วยการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดนั้น มีลักษณะสีเหลืองออกน้ำตาลเข้ม และใส ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่วัตถุดิบ MM และ MRI มีสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่สูงกว่า MPI ดังนั้นสีของอาหารที่เตรียมได้จึงมีสีเข้มกว่า และนอกจากนี้อาหารดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของกรดอะมิโนอิสระกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ และอาหาร MPI ที่ได้จากการเตรียมอาหารทั้งสองวิธี พบว่าลักษณะอาหารมีสีเหลือง และใสเหมือนกัน และจากการพิจารณาปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จากอาหารที่เตรียมได้ทั้งหมด พบว่าอาหารที่เตรียมได้สามารถนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อสารแอสทาแซนตินได้ เนื่องจากมีสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนตินจากการศึกษาของ Johnson และ Lewis (25) พบว่าปริมาณโปรตีนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ส่วนในการผลิตสารแอสทาแซนตินจากเชื้อ *X. dendrorhous* นั้น พบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลและเซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นน้ำตาลที่เชื้อชนิดนี้สามารถนำไปใช้ในการผลิตสารแอสทาแซนตินได้ดีที่สุด ดังนั้นอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารแอสทาแซนตินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ได้

สำหรับอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบจากการผลิตวุ้นเส้นพบว่าสารสกัดมีลักษณะเหมือนกันเมื่อทำการเตรียมด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อนและการย่อยสลายด้วยสารละลายกรด คือมีลักษณะใส และมีสีเหลืองลักษณะคล้ายกับอาหารสังเคราะห์ YM ที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น และจากปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้พบว่ามีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนตินของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยจากการศึกษาของ Ko และคณะ (58) ได้นำโปรตีนจากถั่วเขียวในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตแป้งกลับมาใช้ใหม่โดยใช้เทคนิค ultrafiltration พบว่ามีโปรตีนสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบในน้ำทิ้ง และได้นำเอาโปรตีนที่ได้มาทำแห้ง

และใช้ประโยชน์ เป็นการลดปัญหามลภาวะเป็นพิษและเป็นการใช้ประโยชน์จากโปรตีนเหลือทิ้งให้มากที่สุด ดังนั้นในการเตรียมอาหารจากวัตถุดิบหลังจากการผลิตวันเส้นนั้น สามารถนำมาประโยชน์ในการเลี้ยงเชื้อและผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous* ได้

4.3 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบจากโรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและผลิตวันเส้น

ในการศึกษาเปรียบเทียบความเป็นไปได้และเหมาะสมของอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและวันเส้น เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* และผลิตสารแอสทาแซนทีนโดยอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบมัสตาร์ดมีทั้งหมด 6 ชนิดคือ MME, MMH, MRJE, MEIH, MPJE และ MPIH โดยอาหารแต่ละชนิดได้ศึกษาที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ และได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสทาแซนทีนที่เชื้อผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตในอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกัน และอาหารที่เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ MPIH ส่วนการผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกัน และพบว่าอาหารที่เชื้อสามารถสารแอสทาแซนทีนได้ดีที่สุดคือ MPIH จากผลที่ได้พบว่า อาหาร MPIH เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีน ทั้งนี้เนื่องมาจากอาหาร MPIH เป็นอาหารที่เตรียมได้จาก MPI ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ได้จากการตกตะกอนน้ำทิ้งมัสตาร์ดในสถานะที่เป็นกรดและเตรียมด้วยการย่อยสลายด้วยสารละลายกรด ซึ่งอาหาร MPIH ที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลทั้งหมดในปริมาณที่สูงกว่าอาหารชนิดอื่น และนอกจากนี้ MPI ได้มีการกำจัดสารพิษออกไปด้วย เช่น กรดอีรูซิก กลูโคซิโนเลต ไฟเตท และสารประกอบฟีนอลิก จึงทำให้อาหารที่เตรียมได้จาก MPI เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ได้ เพราะฉะนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อจึงไม่ถูกยับยั้ง และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่เป็น MME และ MMH ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหาร MME เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากกว่า MMH ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดและปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลของ MME มีปริมาณที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่า MMH และนอกจากนี้การย่อยสลายกากมัสตาร์ดด้วยสารละลายกรด 0.2 N นั้น อาจมีการย่อยสลายสารที่เป็นพิษเช่น กลูโคซิโนเลต กรดอีรูซิก และ ไฟเตท ออกมาทำให้เชื้อไม่สามารถนำเอาสารอาหารที่สำคัญมาใช้ได้ ดังนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อใน MMH จึงน้อยกว่าการเจริญเติบโตใน MME ถึงเกือบ 10 เท่า แต่สังเกตได้ว่าการเจริญเติบโตและการผลิตสารของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่สกัดจากน้ำทิ้งมัสตาร์ดหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดนั้น เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสารสกัดจากกากมัสตาร์ด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าอาหารที่ได้จากกากมัสตาร์ดได้มีปริมาณของกลูโคซิโนเลตในปริมาณที่สูง ซึ่งทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่า เพราะว่ในขั้นตอนของการผลิตน้ำมันหอม

ระเหยมีสตาร์ค allyl isothiocyanate (AIT) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีการย่อยสลายกลูโคซิโนเลตที่เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงที่พบในกากมีสตาร์คด้วยเอนไซม์ไมโรซิเนส (myrosinase) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ AIT สารประกอบไซยาไนด์ และน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นน้ำทิ้งมีสตาร์คที่ได้จึงมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงมาก ถือว่าเป็นสารอาหารที่สำคัญในการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous*

สำหรับอาหารที่เตรียมได้จากกากถั่วเขียวหลังการผลิตวุ้นเส้นพบว่าเมื่อเตรียมอาหาร MBE และ MBH ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์พบว่าอาหารดังกล่าวเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ ในประมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยที่น้ำหนักเซลล์และปริมาณสารแอสทาแซนทีนที่เลี้ยงในอาหาร MBH มีปริมาณมากกว่าเลี้ยงใน MBE ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเตรียมอาหารด้วยวิธีการย่อยสลายด้วยกรดนั้น เป็นวิธีที่สามารถสกัดเอาสารอาหารสำคัญออกมาได้และอยู่ในรูปโมเลกุลเล็ก ซึ่งเชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน และเนื่องจากว่าในกากถั่วเขียวมีปริมาณของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง และเมื่อทำการย่อยสลายด้วยกรดพบว่ากรดอะมิโนอิสระและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบในอาหารที่เตรียมได้มีปริมาณสูง ดังนั้นเชื้อจึงสามารถนำสารอาหารดังกล่าวไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ดี และจากการรายงานของ Buzzini และ Martini (50) พบว่าได้มีการศึกษาการนำเอาวัตถุดิบที่เหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและผลิตสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อ *Rhodotorula glutinis* พบว่าอาหารแต่ละชนิดให้ปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังได้มีการเตรียมอาหารด้วยการย่อยสลายด้วยกรดด้วย โดยพบว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นอาหารและเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ concentrated grape must ซึ่งมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตมากกว่าวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ

4.4. ความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสาร แอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous*

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์คและวุ้นเส้นที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างกันเพื่อหาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารแต่ละชนิดที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารได้ดี โดยพบว่าอาหารที่เตรียมจากกากมีสตาร์ค MM ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 20 % (w/w) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับอาหาร MRJE MRIH และ MPIE พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้น 15% (w/w) และสำหรับอาหาร MPIH พบว่าที่ 10% (w/w) พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากกว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นอื่น ๆ และมากกว่าอาหารชนิดอื่นด้วย ส่วนอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบหลังการผลิตวุ้นเส้นพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 15% (w/w) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยที่

ลักษณะของการเจริญเติบโตจะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นมากขึ้น จนถึงที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอาหารแต่ละชนิดพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้มากที่สุด สังเกตจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้และมีการผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากที่สุด และที่ความเข้มข้นที่มากกว่าพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตสารได้น้อยลงจนเกือบคงที่ ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณของสารอาหารที่สำคัญ เช่น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นปริมาณของกลูโคสจะมากขึ้นตามไปด้วย และจากการศึกษาของ Johnson และ Lewis (25) พบว่าปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 15-20 เปอร์เซ็นต์และที่ปริมาณของกลูโคสที่สูงมาก ๆ พบว่าเชื้อจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในอาหาร ทำให้เชื้อมีการผลิตสารแอสทาแซนทีนได้น้อยลงกว่าปกติ ดังนั้นการหาความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก เนื่องจากว่าที่ความเข้มข้นของอาหารที่เหมาะสม จะมีปริมาณของสารอาหารที่สำคัญที่เพียงพอต่อการที่เชื้อสามารถนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ในการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีน ทั้งนี้ถ้าใช้ความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแล้ว ทำให้ไม่สามารถบอกถึงศักยภาพของอาหารที่เตรียมได้ ในการนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีความสำคัญทางการค้าได้

4.5. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ

X. dendrorhous ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย มัสตาร์ดและวุ้นถั่ว

การศึกษากการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนมีความจำเป็นอย่างมาก เนื่องจากว่าเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ สภาวะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตและผลิตสารอาจมีการเปลี่ยนแปลงด้วย ดังนั้นในการศึกษากการผลิตสารในอาหารที่เตรียมได้ให้ได้ปริมาณมาก ๆ นั้น จึงต้องทำในสภาวะที่เหมาะสมของอาหารที่เตรียมได้ตามแต่ละชนิดของอาหารด้วย เพื่อว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ปริมาณมากที่สุดในงานวิจัยนี้ได้เตรียมอาหารจากวัตถุดิบในผลิตน้ำมันหอมระเหย มัสตาร์ดและวุ้นถั่วและศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมมีค่าใกล้เคียงกันคือที่พีเอชของอาหาร 5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ 20 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อนาน 120 ชั่วโมง ยกเว้นเมื่อเลี้ยงในอาหาร MPIE และ MPIH พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเป็น 96 ชั่วโมง โดยทำการบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ เชื้อมีการเจริญและผลิตได้เล็กน้อยเมื่อเวลาเริ่มต้น แต่เมื่อเวลามากขึ้นการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนจะเพิ่มขึ้น จนเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจนถึงเวลาที่เหมาะสม ซึ่งการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารมีปริมาณมากที่สุด และหลังจากนั้นพบว่า

การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีนลดลง เนื่องจากการลดลงจนหมดไปของปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสในอาหาร เพราะว่าเชื้อมีการนำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนซึ่งในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารต่าง ๆ และจากการงานวิจัย Johnson และ Lewis (25) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ YM พบว่าพีเอชที่เหมาะสมคือ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียสและเลี้ยงเป็นเวลา 128 ชั่วโมง โดยพบว่าการเจริญเติบโตจะมีการเจริญแบบช้า ๆ และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานมากกว่า 10 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตจะลดลงเมื่อปริมาณกลูโคสในอาหารหมดหลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลานาน 80 ชั่วโมง ส่วนการผลิตสาร แอสทาแซนทีนนั้น พบว่ายังคงมีการผลิตต่อไป และเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนมากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 128 ชั่วโมง นอกจากนี้ Kesava และคณะ (59) ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็น corn starch hydrolysate และ corn starch liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน ตามลำดับ ด้วยวิธี response surface method พบว่าได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารและปรับพีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง พบว่าพบเชื้อสามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้ประมาณ 52.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Fang และ Cheng (36) ได้ศึกษาการเพิ่มการผลิตสาร แอสทาแซนทีน โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงและผลิตสาร พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์ โดยได้มีการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตสาร แอสทาแซนทีน พบว่าน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุดตามลำดับ และสภาวะที่เหมาะสมคือที่พีเอชของอาหารเท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 20-22 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

4.6. การผลิตสารแอสทาแซนทีนโดยการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและวันเด่น

การศึกษการผลิตสารแอสทาแซนทีนโดยเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เตรียมได้ทั้งหมด 8 ชนิดที่ได้จากการสกัดจากวัตถุดิบ 4 ชนิดคือ MM MRI MPI และ MB พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ในปริมาณที่แตกต่างกันดังได้กล่าวมาแล้ว และการผลิตสารแอสทาแซนทีนพบว่า เชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนเป็นสารรงควัตถุหลัก โดยสามารถทำการผลิตได้สูงถึง 90-92 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ทั้งหมด ในขณะที่ Johnson และ Lewis (25) พบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ประมาณ 83-87 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ carotenoid ทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ YM และ Parajó และคณะ (60) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็น xylose จะได้ว่าเชื้อผลิตสาร แอสทาแซนทีน ได้

91 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และในการผลิตสารแอสทาแซนทีน อาหารชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมได้ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้มากที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่เป็น MPIH ในสภาวะที่เหมาะสม โดยปริมาณของสารแอสทาแซนทีนที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 25.79 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 1,312.47 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Johnson และ Lewis (25) พบว่าเชื้อสามารถผลิตสาร แอสทาแซนทีนได้ 406 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ YM ต่อมาได้มีการนำเชื้อ *X. dendrorhous* มาเลี้ยงในอาหารที่เป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพื่อศึกษาการผลิตสารแอสทาแซนทีน เช่น Haard (47) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นกากน้ำตาล (molasses) ที่มีการเติม peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารได้ 1,182 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง Meyer และ Du Preez (61) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ที่มีการปรับปรุงพันธุ์แล้วใน grape juice พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ 1,350 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วน Vázquez และ Martin (57) ได้ศึกษาการผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่เป็น peat hydrolysate พบว่าเชื้อผลิตสารได้ 430 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และต่อมา Ramirez และคณะ (62) ได้มีการเลี้ยงเชื้อเพื่อสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่เป็น date juice ที่ได้จาก *Yucca fillifera* พบว่าเชื้อผลิตได้ 6.17 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น จากผลงานวิจัยและการเปรียบเทียบ เห็นได้ว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ในปริมาณที่สูงมากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็น MPIH ซึ่งเป็นการแสดงถึงศักยภาพในการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้ และการนำเอาวัตถุดิบที่ได้หลังกระบวนการต่าง ๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมมาประยุกต์เป็นอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อนั้น เป็นการเพิ่มคุณค่าของของเหลือทิ้งและเป็นการลดต้นทุนการผลิตด้วย และท้ายสุดเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

1. Goodwin, T.W. (1980). The biochemistry of the carotenoids. Chapman and Hall, London and New York. pp. 1-76.
2. Plander, H. (1992). Carotenoid: an overview-methodology enzymology. 213: 3-13.
3. Jordi, O. and Palon, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in feeds. J. Chromato. A. 881: 543-555.2.
4. Margalith, P.S. (1992). Pigment microbiology; In the carotenoids pigments. Chapman and Hall, London. 32-76.
5. Frank, H. and Codgell, R.J. (1993). Photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis; In carotenoids in photosynthesis. Young, A. and Britton, G., eds. Chapman and Hall, London. pp. 30-52.
6. Bauernfeind, J.C. (1981). Carotenoids as colorants and vitamin a precursor. Academic Press, New York. pp. 938.
7. Olson, J.A. (1989). Biological actions of carotenoids. J. Nutr. 119: 94-95.
8. Mathis, P. and Schenck, C.C. (1982). The function of carotenoids in photosynthesis; In carotenoids chemistry and biochemistry. Britton, G. and Goodwin, T.W., eds. Oxford Pergamon Press. 339-351.
9. Zsila, F., Deli, J. and Simonyi, M., (2001). Color and chirality: carotenoids self-assemblies in flower petals. Planta. pp. 1-8.
10. Johnson, E.A., Conklin, D.E., Lewis, M.J. (1979). The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment sources for salmoids and creustaveans. J. Fish Res. Broad Can. 34: 2417-2421.

11. Nelis, M.J. and Du Leenheer, A.P. (1991). Microbial source of carotenoids pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bact.* 70: 181-191.
12. Martin, H-D., Jáger, C., Ruck, C. and Schmidt, M. (1999). Anti- and prooxidant properties of carotenoids. *J. Prakt. Chem.* 34: 302-308.
13. Schroeder, A.W. and Johnson, E.A. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 907-912.
14. Ziegler, R.G. (1989). A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.* 119: 116-122.
15. Stahl, W. and Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids molecular aspects of medicine. 24: 345-351.
16. Philip, T. and Berry, J.W. (1975). Nature of lutein acylation in marigold (*Tegetes erecta*) flower. *J. Food Sci.* 40: 1089-1090.
17. Hadden, W.L., Watkins, R.H., Levy, L.W., Regalado, E., Rivadeneira, D.M., Breemen, R.B. and Schwartz, S.J. (1999). Carotenoids composition of marigold (*Tegetes erecta*) flower extract used on nutritional supplement. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 4189-4194.
18. Navarrete-Bolaños, J.L., Jiménez-Islas, H., Botello-Alvarez, E., Rico-Martinez, R. and Paredes-López, Q. (2004). Improving xanthophylls extraction from marigold flower using cellulolytic enzyme. 52: 3394-3398.
19. Khachik, F., Beecher, G.R. and Whittaker, N.F. (1986). Separation, identification and quantification of the major carotenoids and chlorophyll constituents in extract of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34: 603-616.

20. Muller, H. (1997). Determination of the carotenoids content in selected vegetable and fruit by high performance liquid chromatography and photodiode array detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 204: 88-94.
21. Margalith, P.Z. (1999). Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 431-438.
22. Nelis, H.J., De Leenheer, A.P. (1989). Microbial production of carotenoids other than β -carotene. In *biochemistry of vitamins, pigments and growth factors*. Vandamme, E.J. ed. Elsevier Applied Science, London and New York. 43-80.
23. Margalith, P. (1993). Enhancement of carotenoid synthesis by fungus metabolites. *Appl. Microbiol. Biotech.* 38: 644-666.
24. Bhosale, P.B. and Gadre, R.V. (2001). Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 423-427.
25. Johnson, E.A. and Lewis, M.J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 173-183.
26. Shlomai, P., Ben-Amotz, A. and Margalith, P. (1991b). The effect of veratrole on carotenoid biosynthesis by *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 166-168.
27. Shlomai, P., Ben-Amotz, A. and Margalith, P. (1991a). Production of carotene stereoisomer by *Phycomyces blakesleeanus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 34: 458-462.
28. Fell, J.W. and Blatt, G.M. (1999). Separation of strains of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J. Indent. Microbiol. Biotechnol.* 23: 677-681.

29. Andrews, A.G., Phaff, G.M. and Starr, M.P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15: 1003-1007.
30. Naguib, Y. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agri. Chem.* 48: 1150-1154.
31. Latscha, T. (2002). Carotenoids-their nature and significance in animal feeds. Department of Animal Nutrition and Health. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland.
32. Johnson, E.A. and An, G-H. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11: 297-326.
33. Johnson, E.A. (2003). *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol.* 6: 169-174.
34. Misawa, N. and Shimada, H. (1997). Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J. Biotechnol.* 59: 169-181.
35. Mayer, P.S., Du Preez, J.C. and Kilian, S.G. (1993). Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 514-520.
36. Fang, T. J. and Cheng, V.S. (1993). Improvement of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* through matation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 6: 466-469.
37. Vázquez, M. and Martin, A.M. (1998). Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. 57: 314-320.
38. Ramírez, J., Gutierrez, H. and Gschaedler, A. (2001). Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. 8: 259-268.

39. Fang, T.J. and Wang, J.M. (2002). Extractibility of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoids over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Process Biochem.* 27: 1235-1245.
40. Echavarri-Erason, C. and Johnson, E.A. (2004). Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Research.* 4: 511-519.
41. Anil Kumar, G.K., Pauwar, V.S., Yadav, K.R. and Sihag, S. (2002). Mustard cake as a source of dietary protein for growing lambs. *Small Ruminant Research.* 44: 47-51.
42. Rakariyatham, N. (2000). The value added by-products from mustard essential oil plant sub-project. Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand.
43. Xu, L., Lui, F., Luo, H. and Diodady, L.L (2003). Production of protein isolates from yellow mustard meals by membrane process. *Food Research International.* 36: 846-856.
44. Rahma, E.H., Dudek, S., Mothes, R., Görmitz, E. and Schwenke, K.D. (2000). Physicochemical characterisation of mung bean (*Phaseolus aureus*) protein isolates. *J. Sci. Food Agric.* 80: 477-483.
45. Yamane, Y-I., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. and Nishio, N. (1997). Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4471-4478.
46. Okagbue, R.N. and Lewis, P. (1996). Use of alfalfa residue juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 33-39.

47. Haard, N.F. (1998). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett.* 10: 609-614.
48. Fontana, J.D., Czczuga, B., Bonfim, T.M.B., Chociai, M.B., Oliveira, B.H., Guimarães, M.E. and Baron, M. (1996). Bioproduction of carotenoids: the comparative use of new sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Bioresource Technol.* 76: 479-484.
49. Cruz, J.M. and Parajó, J.C. (1998). Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chem.* 70: 479-484.
50. Buzzini, P. and Martin, A. (1999). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technol.* 71: 41-44.
51. Cole, E.R. (1969). Alternative methods to the kjeldahl estimation of protein nitrogen. *Rev. Pure Appl. Chem.* 19: 109-130.
52. Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Girdn-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. and Millán, F. (2004). *Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chem.* 88: 337-346.
53. Shahidi, F. and Naczk, M. (1992). An overview of the canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. *JAOCs.* 69: 917-924.
54. Trakansirinont, W. and Rakariyatham, N. (2000). Phenolic compounds in protein fraction of processed mustard meal. *Chiang Mai J. Sci.* 27: 1-8.
55. Lee, C. and Lim, G. (1997). Varietal differences of major chemical compounds and fatty acid composition in mung bean. *Korean. J. Crop Sci.* 42: 1-6.

56. Martin, A.M., Acheamparg, E. and Patel, T.R. (1993). Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. J. Chem. Tech. Biotechnol. 58: 223-230.
57. Vázquez, M. and Martin, A.M. (1998). Mathematical model for *Phaffia rhodozyma* growth using peat hydrolysate substrate. J. Sci. Food. Agric. 76: 481-487.
58. Ko, S., Chen, J. and Lai, H. (1994). Recovery and functional properties of protein from the waste of mung bean starch processing by ultrafiltration. J. Japanese Soci. Food Sci. Tech. 41: 633-638.
59. Kesava, S.S, An, G-H., Kim, C-H., Rhee, S-K. and Chei, E-S. (1998). An industrial medium for improved production of carotenoids from a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. Bioprocess Eng. 19: 165-170.
60. Parajó, J.C., Santos, V. and Vázquez, M. (1998). Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. Process Biochem. 33: 181-187.
61. Meyer, P.S. and Du Preez, J.C. (1994). Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. World J. Microbiol. Biotech. 10: 178-183.
62. Ramirez, J., Nuñez, M.L., Valdivia, R. (2000). Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. J. Ind. Microbiol. Biotech. 24: 187-190.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมและมีศักยภาพในการเจริญเติบโต และผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมาตรฐานและอุ่นเส้นได้
2. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทราฟิลล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เตรียมได้
3. ทราบชนิดของสารกลุ่มแซนโทราฟิลล์ที่ผลิตจากเชื้อ *X. dendrorhous* และทราบปริมาณที่แน่นอนในการผลิตสารของเชื้อนี้ในอาหารที่คัดเลือกแล้ว
4. ทราบวิธีการเพิ่มผลผลิตของสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่กำหนดได้
5. เป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยการนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารสำหรับการผลิตสารแอสทาแซนทีน ซึ่งพบว่าสารนี้นำไปใช้ประโยชน์ในหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์น้ำ การแพทย์และเภสัชกรรม เป็นต้น
6. เป็นการลดต้นทุนในการผลิตสารกลุ่มแซนโทราฟิลล์จากเชื้อจุลินทรีย์ *X. dendrorhous* โดยการนำเอาวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้แทนอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาแพง
7. เป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากของเหลือทิ้งที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม และมีการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ทำให้เกิดมลภาวะน้ำและดินเสีย เนื่องจากของเหลือทิ้งมีปริมาณของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในปริมาณสูง

ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงาน

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ “การผลิตสารแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดลอกแล้วในอาหารที่เป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม” โดยสรุป(พอสังเขป)

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน
1. ศึกษาและค้นหาแหล่งของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ที่พบได้จากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด โดยทำการค้นคว้าและค้นหาเชื้อที่สามารถผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ โดยการซื้อจากศูนย์เชื้อเชื้อจุลินทรีย์และแยกจากธรรมชาติเอง	1. สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมและมีศักยภาพในการเจริญเติบโต และผลิตสารแอสทาแซนทีนในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์คและวันเส้นได้	1. ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ ได้ 2 ชนิด คือ <i>Rhodotorula glutinis</i> และ <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> โดยได้ซื้อจากศูนย์เชื้อจุลินทรีย์
2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการเจริญเติบโตในอาหารที่เป็นน้ำทิ้งมีสตาร์คและกากโปรตีนถั่วเขียวจากการผลิตวันเส้น โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้งสองชนิด และตรวจวัดหาชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์โดยวิธี spectrophotometry	2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้วสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแซนโทฟิลล์และ/หรือ แคโรทีนอยด์ได้ ในอาหารที่เตรียมจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์คและวันเส้น	2. จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์และแคโรทีนอยด์ได้ แต่ในงานวิจัยขั้นต่อไปได้เลือกใช้จุลินทรีย์ชนิด <i>X. dendrorhous</i> เพียงชนิดเดียว เนื่องจากว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้ปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งและสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ชนิดแอสทาแซนทีนเป็นจำนวนมากและพบเป็นปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับปริมาณของสารแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ทั้งหมด และสารแอสทาแซนทีนพบว่าเป็นสารที่มีมูลค่าสูงและมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นหลายเท่า
3. ทำการเพาะเลี้ยงและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์ของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ขั้นตอนนี้เมื่อได้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารกลุ่มแซนโทฟิลล์	3. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ของเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เตรียมได้	3. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารแซนโทฟิลล์ชนิดแอสทาแซนทีนในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย

แล้วจะศึกษาในด้านการเจริญเติบโตของเชื้อ สารอาหารที่เชื้อต้องการในการเจริญและการผลิตสาร ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสาร อุณหภูมิที่เหมาะสมและค่าพีเอชของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงในอาหารที่เป็นน้ำทั้งมัสตาร์ดและกากโปรตีนถั่วเขียวจากการผลิตวุ้นเส้น		มัสตาร์ดและวุ้นเส้น
4.สกัดและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด โดยอาศัยเทคนิคพื้นฐาน คือ โครมาโทกราฟีผิวน้ำบาง(Thin-layer chromatography, UV-Visible spectrophotography และ High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเทียบกับสารมาตรฐานแซนโทรฟิลล์และแคโรทีนอยด์	4.ทราบชนิดของสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์ที่ผลิตจากเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> และทราบปริมาณที่แน่นอนในการผลิตสารของเชื้อนี้ในอาหารที่คัดเลือกแล้ว	4.สารกลุ่มแซนโทรฟิลล์ที่เชื้อจุลินทรีย์ <i>X. dendrorhous</i> ผลิตได้ในอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดและวุ้นเส้น คือ สารแอสทาแซนทินเป็นส่วนใหญ่และพบว่า มีปริมาณสูงถึง 90-92 เปอร์เซ็นต์ของสารแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ทั้งหมด
5.ศึกษาและค้นหาวีธีในการเพิ่มการผลิตสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว	5. ทราบวิธีการเพิ่มผลผลิตของสารแอสทาแซนทินจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่กำหนดได้	5.การเลี้ยงเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> ในอาหารที่เตรียมได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทิน พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารได้ในปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดอื่น และพบว่าปริมาณเกือบเท่ากับปริมาณของสารที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้ว

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์

1. บทความหัวข้อ **“Use of Mustard Meal Media as a Substrate for Astaxanthin Production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*”** ตีพิมพ์ในวารสาร **Chiang Mai Journal of Science**. 2004; 31(3) : 293-302.
2. บทความหัวข้อ **“Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*”** ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร **“Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology”** (รอการตอบรับ)

Reprinted

Chiang Mai Journal of Science



Journal of the Science Faculty of Chiang Mai University

ISSN 0125-2526

<http://www.science.cmu.ac.th/journal-science/josci.html>



Use of Mustard Meal Media as a Substrate for Astaxanthin Production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Raviwan Tinol (a), Nuansri Rakarlyatham* (a) and Richard L. Deming (b)

(a) Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

(b) Department of Chemistry and Biochemistry, California State University Fullerton, Fullerton, California, 92834-6866, USA.

*Author for correspondence, e-mail: nuansri1@yahoo.com

Received : 6 January 2004

Accepted : 20 August 2004

ABSTRACT

Mustard meal after seed-oil expellation was used as a substrate for growth of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and production of astaxanthin. The mustard meal media that provided both sugar and nitrogen sources were prepared by boiling in water (un-hydrolyzed mustard meal media) and hydrolyzing in acid (hydrolyzed mustard meal media). The red yeast *X. dendrorhous* grew best in the un-hydrolyzed mustard meal media and produced commercially valuable carotenoid pigments, especially astaxanthin. The maximum yield of cell dry weight (6.25 g/L), total carotenoid (4.17 mg/L) and astaxanthin (3.83 mg/L) were obtained with optimal process parameters of 20% un-hydrolyzed mustard meal media, an initial pH of medium at 5.0, an incubation temperature of 20°C and a cultivation time of 120 h.

Keywords: astaxanthin, carotenoids, mustard meal, *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

1. INTRODUCTION

Astaxanthin (3, 3'-dihydroxy-4, 4'-diketo- β -carotene) is an orange-pink xanthophyll. It is one of the most interesting and economically valuable carotenoids and it is an important constituent of fish and poultry feeds [1]. Although astaxanthin can be synthesized by chemical methods, it is readily produced in significant quantities by some microorganisms. The red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*) is one of the best potential sources for the production of astaxanthin [2]. *X. dendrorhous* is a single species of a relatively new genus of red yeast that was described in 1976, and it has an intense dark orange color [3].

The ability of *X. dendrorhous* to use carbon and nitrogen sources was tested by Fang and

Cheng [4]. They found that glucose and yeast extract were the best carbon and nitrogen sources, respectively. Currently, a desirable goal is the use of low cost agricultural processing by-products as substrates for easily cultured microorganisms to produce high yields of the valuable astaxanthin pigment. A variety of such applications have emerged in recent years. Grape juice was employed as a medium for astaxanthin production by *X. dendrorhous* [5]. Martin *et al.* [6] and Vázquez and Martin [7] investigated the growth conditions and carotenoids production of *X. dendrorhous* using peat hydrolyzates as substrates. Okagbue and Lewis [8] reported that alfalfa residual juice supported good growth of the yeast *X. dendrorhous* but the formation of astaxanthin was inhibited. A sugarcane juice-based low cost

culture medium was studied for the production of astaxanthin in liquid culture by *X. dendrorhous* [9, 10]. Cruz and Parajó [11] improved astaxanthin production by growing *X. dendrorhous* on enzymatic hydrolyzates of wood containing glucose and cellobiose. The previous studies demonstrated that the production of carotenoid pigments by *X. dendrorhous* depends considerably on the culture conditions.

The present study was designed to determine the potential and effectiveness of mustard meal media as carbon and nitrogen sources for astaxanthin production using *X. dendrorhous*. The mustard seeds (*Brassica juncea* var. Forge) are squeezed to remove the majority of the oil components. The by-product remaining after seed-oil pressing is mustard meal. Mustard meal contains 33.64% protein, 28.6% carbohydrate, 19.2% fat and 15.2% fiber [12]. It is the cheapest protein source at \$90.60 per ton on the international market from India, lower than even peanut and soybean meals [13, 14].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganism and Raw Material

Xanthophyllomyces dendrorhous TISTR 5730 was obtained from the Thailand Institute of Science and Technological Research (TISTR). The mustard meal of mustard seeds (*Brassica juncea* var. Forge) was obtained from Lanna Products Co., Ltd., Lamphun, Thailand.

2.2 Preparation of Mustard Media

2.2.1 Preparation of Un-hydrolyzed Mustard Meal Media

Un-hydrolyzed mustard meal media were prepared by adding defatted mustard meal to 100 mL of distilled water, boiling and stirring at 750 rpm for 30 min. The suspensions were centrifuged and filtered through Whatman No.1 filter paper. The un-hydrolyzed mustard meal extracts containing 25.5 g/L total nitrogen (TN) and 21.4 g/L total sugar (TC), were used as the nitrogen and carbon sources in the media for growth of *X. dendrorhous* and carotenoids production.

2.2.2 Preparation of Hydrolyzed Mustard Meal Media

The defatted mustard meals were autoclaved at 121°C for 15 min in 100 ml of 0.2 N H₂SO₄. After cooling, the hydrolyzates were centrifuged at 9,820×g for 10 min and filtered. The hydrolyzed mustard meal medium containing 27.2 g/L TN, and 25.8 g/L TC, were used as the acid hydrolyzed media for fermentation.

2.3 Culture Condition

Quadruplicate samples of mustard media containing different percentages of mustard meal were used for the experiments. They were carried out in an orbital shaker with an agitation rate of 200 rpm for 120 h using 125 mL erlenmeyer flasks containing 25 ml culture medium. One mL of inoculum suspension (8.5×10^7 cell) was added to each flask of media.

2.4 Optimization of Growth of *X. dendrorhous* and Its Astaxanthin Production Condition

2.4.1 Optimization of Mustard Meal Concentration

Preliminary experiments were conducted to determine the optimal total nitrogen and sugar concentrations of both un-hydrolyzed and hydrolyzed mustard meal media. The percent weight to volume of mustard meal medium was varied first from 1-30% w/v using pH 5.0 for 120 h at temperature 20°C and an agitation rate of 200 rpm [5].

2.4.2 Optimization of the Other Growth Condition

The ranges of values of the other growth conditions were: pH 3.0 to 7.0 at 0.5 increments; cultivation time from 12 to 144 h at 12-hour increments; and temperature 15 to 28°C at 2-3°C increments. The high and low values used for these ranges were selected on the basis of the previous work [3, 5, 15]. The experimental value for the optimal concentration of mustard meal extract was used for subsequent variations in pH, temperature and

cultivation time, accordingly. Once a growth condition was optimized, it was used for the subsequent experiments.

2.5 Analytical Procedures

Cell dry weight was determined by using broth samples which were centrifuged for 10 min at 4,296×g and washed twice with distilled water. The washed cells were dried at 95°C for 48 h over aluminium pads, allowed to cool in a desiccator and weighed [16]. The total nitrogen content (TN) was determined by the Kjeldahl method with factor 6.25 [17]. The amino acid content was determined as formaldehyde nitrogen (FN) [18]. Total sugar was measured as glucose by the phenol-sulfuric acid method [19]. Total carotenoid were extracted from the cells by disruption with 2 vol of dimethyl sulphoxide (DMSO) and centrifugation [20]. The total carotenoid were calculated from the optical density at 474 nm, using a 1% absorption coefficient value of 2100 mg/L-cm [20] with a Hitachi U-2000 UV/VIS spectrophotometer. For the determination of major carotenoid, astaxanthin, the 1 mL of yeast cells was washed and re-suspended in water, and then subjected to the freeze-thaw treatment and sonication to extract the pigments from the cells. The homogenate was combined with 20 mL of acetone and centrifuged. The sonication step was repeated three or four times until the acetone extracts were colorless. The pigments in the pooled acetone extracts were combined with 30 mL of hexane and concentrated to 5 mL by blowing a stream of nitrogen gas across the surface of the liquid. The pigment extracts were kept at -20°C until analyzed.

The pigment was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a Hewlett-Packard series 1100 instrument equipped with a 150 mm × 4.6 mm, 5 µm Microsorb-MV C₁₈ column, using UV detection at 450 nm. The mobile phase was a solvent system consisting of acetonitrile/methanol (90:10 v/v) with a flow rate of 0.5 mL/min. A standard solution of astaxanthin (0.0500 g/L) was prepared in

chloroform.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of the Parameters on the Growth and Astaxanthin Production

3.1.1 Concentration of Mustard Meal Media

The effect of increasing the amounts of un-hydrolyzed mustard meal media on astaxanthin production at 20°C, pH 5.0 with an agitation rate of 200 rpm for 120 h are illustrated in Figure 1. It reached a plateau in total astaxanthin starting at about 10% w/v mustard meal and the highest yield of cell dry weight and astaxanthin content obtained at 20% w/v of mustard meal. Although the sugar content continued to increase, due to its high solubility, the protein nitrogen content increased slowly at about 5% w/v mustard meal content, probably because of a lower solubility. Cell dry weight increased between 4 and 8% w/v mustard meal and then showed to be nearly constant. A major sugar component in the medium is glucose and high levels are known to inhibit cell growth [21]. Total carotenoids and astaxanthin production, reached maximum at levels of 4.06 and 3.78 mg/L, respectively, paralleling cell growth. The percentage of total carotenoids as astaxanthin increased from about 60% to nearly 95% during this rapid growth phase. The results corresponded to the work of Johnson and Lewis [15], who studied a wide range of glucose concentrations and found that the total yield of yeast and astaxanthin production increased substantially with increasing glucose concentration, but cell growth was inhibited at a concentration > 20 g/L. Okagbue and Lewis [8] indicated that 10-20 g/L of glucose is critical for good yields of astaxanthin and yeast cell wall modification.

Astaxanthin was found by HPLC analysis to be the major carotenoid in all samples during cultivation. The trans-astaxanthin standard (Figure 2A) shows a peak at 6.96 min while Figure 2B shows the chromatogram of the carotenoid-containing hexane extracts from *X. dendrorhous* cultured in un-hydrolyzed

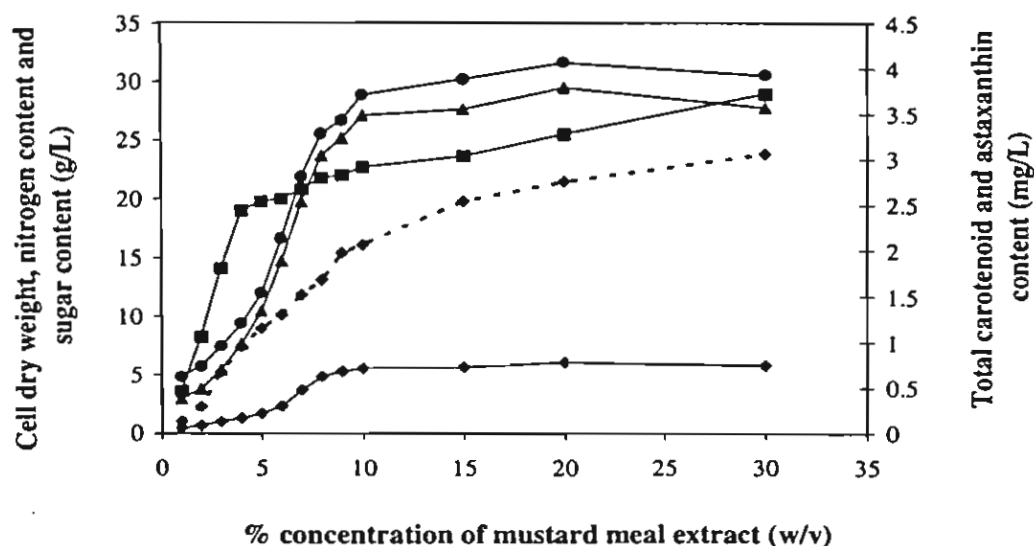


Figure 1. The effect of different concentrations of mustard meal in un-hydrolyzed mustard meal media on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out at 20°C, pH 5.0 with a shaking rate of 200 rpm for 120 h. Cell dry weight (♦), total carotenoid content (●), astaxanthin content (▲), nitrogen content (■), sugar content (◆, dashed line - - -).

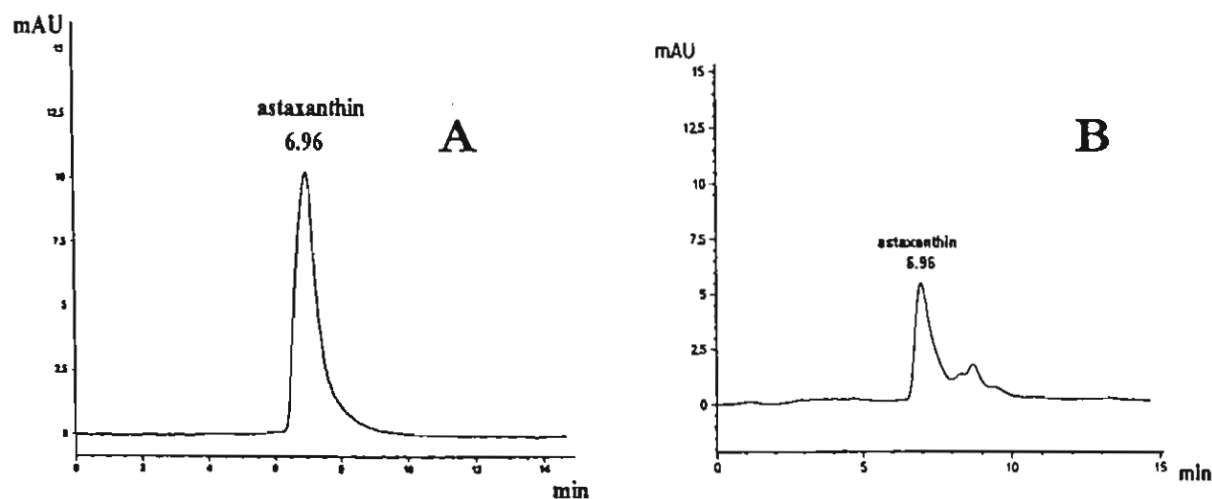


Figure 2. HPLC chromatograms of standard astaxanthin (A) and carotenoids from *X. dendrorhous* cultured in un-hydrolyzed mustard meal media (B). Condition: Microsorb-MV C₁₈ column; flow rate, 0.5 mL/min; acetonitrile/methanol (90:10 v/v); detection, 450 nm. Astaxanthin eluted at 6.96 min.

mustard meal media. The peak at 6.96 is assigned to astaxanthin.

3.1.2 pH

The effect of initial pH on growth of *X. dendrorhous* and astaxanthin production was

investigated. It was found that pH had a slight effect on growth and total carotenoid and astaxanthin production in un-hydrolyzed mustard meal media (Figure 3). The results show that the cell dry weight increased with increased pH until pH 5.0 and then was nearly

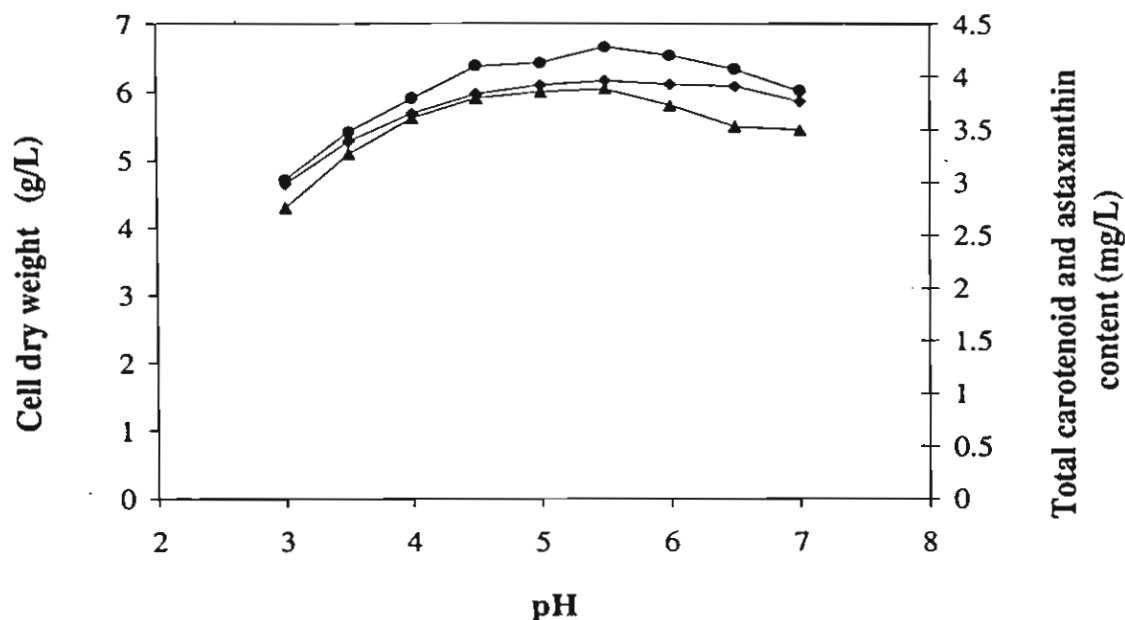


Figure 3. The effect of pH on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out in 20% w/v of un-hydrolyzed mustard meal media at 20°C with a shaking rate of 200 rpm for 120 h. Cell dry weight (◆), total carotenoid content (●), astaxanthin content (▲).

constant between 5.5-6.5. The pH range of 5.0-5.5 obtained the maximum cell dry weight (6.15 g/L), total carotenoid (4.27 mg/L) and astaxanthin (3.88 mg/L) content. Johnson and Lewis [15] and Lango *et al.* [5] reported that the maximum yield of biomass and astaxanthin production were obtained at pH 5.0. Johnson and Lewis [15] found that an optimum value of pH was 5.0 with no significant change in astaxanthin content at other pH values.

3.1.3 Temperature

The highest cell dry weight, total carotenoid and astaxanthin content were obtained at 20°C for 120 h of incubation time. The cell dry weight was relatively constant at growth temperatures of 18-22°C, and then decreased considerably at temperature above 22°C when cultured in un-hydrolyzed mustard meal media (Figure 4). The maximum growth temperature was observed at 26°C with no growth occurring at 28°C. However, the total carotenoid and astaxanthin contents remained constant between 20 and 22°C, but decreased

sharply above 22°C. These results are similar to the work of Mayer and Du Preez [22] who reported a maximum growth temperature of 26°C for *X. dendrorhous*. Johnson and Lewis [15] found that the maximum growth temperature at 27.5°C and the optimum temperature for astaxanthin production by *X. dendrorhous* was also 22°C.

3.1.4 Cultivation Time

The cultivation time periods of growth and astaxanthin production of *X. dendrorhous* in un-hydrolyzed mustard meal media were studied. Figure 5 shows that cell growth occurred as the nitrogen and sugar sources were consumed, and then declined when the sugar content was depleted. During cultivation, cell growth, total carotenoid and astaxanthin production increased steadily from 24-108 h and reached a maximum after 120 h, coinciding with the depletion of nitrogen and sugar contents. In these experiments, the cell dry weight yield reached a maximum of 6.25 g/L after 120 h. The total amount of carotenoids increased rapidly and

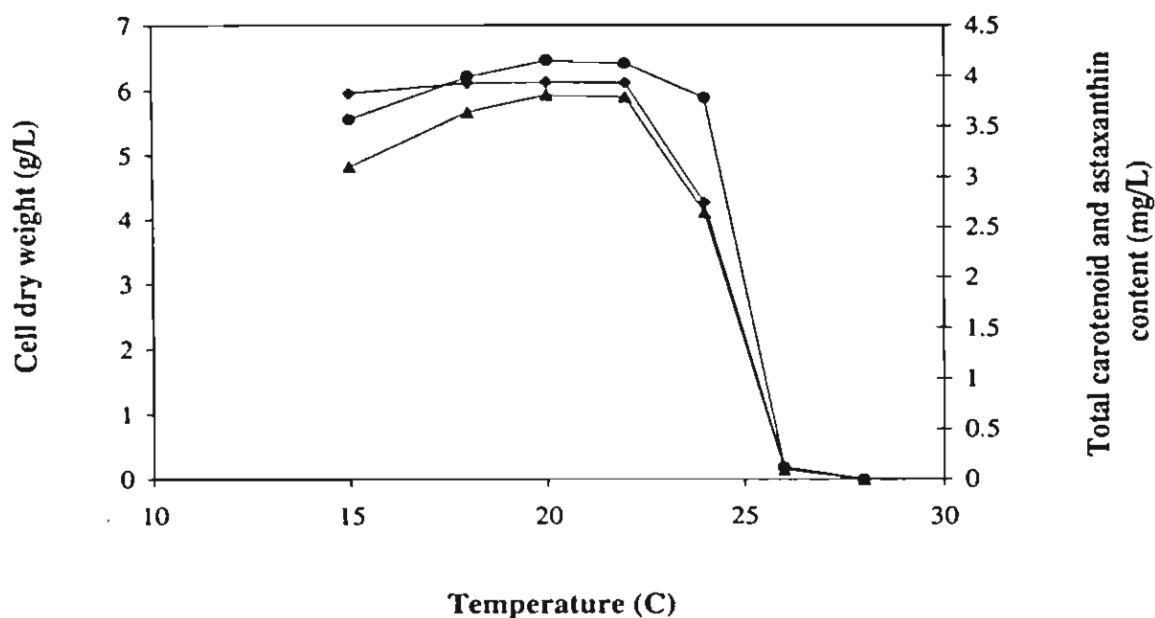


Figure 4. The effect of temperature on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out in 20% w/v un-hydrolyzed mustard meal media at pH 5.0 with a shaking rate of 200 rpm for 120 h. Cell dry weight (◆), total carotenoid content (●), astaxanthin content (▲).

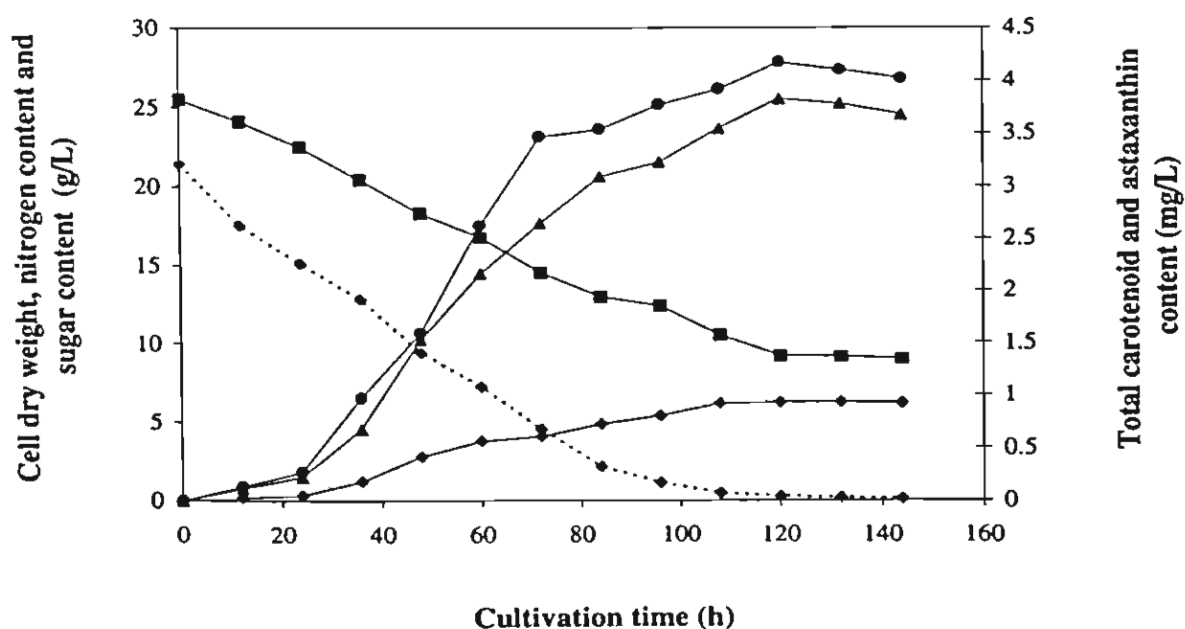


Figure 5. The effect of cultivation time on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out in 20% w/v mustard meal extract at 20°C, pH 5.0 with a shaking rate of 200 rpm. Cell dry weight (◆), total carotenoid content (●), astaxanthin content (▲), nitrogen content (■), sugar content (◆, dashed line - - -).

the accumulation reached a maximum of 4.17 mg/L medium, after approximately 120 h. Astaxanthin production was delayed initially at 0-24 h and then increased steadily until 120 h, reaching a maximum of 3.83 mg/L. Meyer and Du Preez [22] reported that astaxanthin production decreased after the depletion of sugar sources. Johnson and Lewis [15] found that the growth of *X. dendrorhous* began after 10 h of lag and a constant cell dry weight was reached after 80 h.

3.1.5 The Growth and Astaxanthin Production in Mustard Meal Media

The cultivation of *X. dendrorhous* and carotenoids production using un-hydrolyzed and hydrolyzed mustard meal media as substrates were summarized in Table 1. The maximum of cell dry weight (6.25 g/L), total carotenoid (4.17 mg/L) and astaxanthin (3.83 mg/L) contents were achieved by using 20% un-hydrolyzed mustard meal media as sugar and nitrogen sources under optimal condition

Table 1. The growth of *X. dendrorhous* and production of carotenoids in two different mustard meal media after 120 h under optimal conditions*.

Parameter	Un-hydrolyzed ^a mustard meal media	Hydrolyzed ^b mustard meal media
Cell dry weight (g/L culture)	6.25 ± 0.5	1.59 ± 0.02
Total carotenoid		
Cellular (mg/g cell dry weight)	0.62 ± 0.50	0.54 ± 0.12
Volumetric (mg/L culture)	4.17 ± 0.05	0.86 ± 0.10
Productivity (mg/ L day)	0.83 ± 0.10	0.17 ± 0.15
Astaxanthin		
Cellular (mg/g cell dry weight)	0.61 ± 0.10	0.39 ± 0.10
Volumetric (mg/L culture)	3.83 ± 0.10	0.62 ± 0.08
Productivity (mg/ L day)	0.77 ± 0.06	0.18 ± 0.11
Total Nitrogen		
Nitrogen content (g/L)	25.5 ± 0.20	27.2 ± 0.15
Residual nitrogen (g/L)	19.1 ± 1.0	22.1 ± 1.2
Nitrogen utilization rate (g/L day)	1.23 ± 1.0	0.42 ± 1.2
FN / TN (× 10 ⁻³)	5.16 ± 0.50	8.23 ± 0.20
Total sugar		
Sugar content (g/L)	21.4 ± 0.10	25.8 ± 0.20
Residual sugar (g/L)	5.20 ± 0.20	12.15 ± 0.10
Sugar utilization rate (g/L day)	3.24 ± 0.20	2.73 ± 0.15

* Value are means and standard deviation of quadruplicate determinations.

The optimal condition: 20% (w/v) of mustard meal (°) and 30% (w/v) of mustard meal (°) at 20°C, pH 5.0, 120 h and 200 rpm.

FN / TN is formaldehyde nitrogen/ total nitrogen ratio

of initial pH 5.0, incubation temperature of 20°C and cultivation time of 120 h. The highest yield of cell dry weight, total carotenoid and astaxanthin contents in hydrolyzed condition were found to be 1.59 g/L, 0.86 mg/L and 0.62 mg/L, respectively, when cultured in 30% hydrolyzed mustard meal media under optimal condition at 20°C, pH 5.0 for 120 h with agitation rate 200 rpm.

The un-hydrolyzed media showed higher average nitrogen and sugar utilization rates, and higher average astaxanthin production rate than the hydrolyzed mustard meal media. The sugar (21.4 g/L) and nitrogen (25.5 g/L) concentrations of un-hydrolyzed mustard meal media were suitable and sufficient for growth of *X. dendrorhous* and production of astaxanthin. These contents were higher than from the experimental data of Okagbue and Lewis [8]. They reported that *X. dendrorhous* can utilize disaccharides and monosaccharides and showed that the range of sugar (10-20 g/L) and nitrogen (6.6-15.4 g/L) concentrations appeared to be critical for good yields of astaxanthin production and yeast cell wall modification [15, 23]. The high concentration of sugar (glucose) in hydrolyzed mustard meal media (25.8 g/L medium) inhibited the cell growth and astaxanthin production of *X. dendrorhous*, similar to the results of Fang and Wang [21]. In the present work, it was found that the formaldehyde nitrogen/total nitrogen content ratio in hydrolyzed mustard meal media were higher than in un-hydrolyzed mustard meal media. This suggests that the hydrolyzed mustard meal media contained a high free amino acids content. This has led to a decrease in the efficiency of nitrogen utilization by cells according to the study of Palágyi *et al.* [24]. They reported that glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, methionine, asparagine, phenylalanine, tryptophan, serine, threonine, cysteine, lysine, arginine and histidine were not utilized by any strain of *X. dendrorhous*.

The un-hydrolyzed mustard meal media consisted of rich nitrogen (25.5 g/L) and

sugar (21.4 g/L) and *X. dendrorhous* can produced astaxanthin content (3.83 mg/L). From the previous studies [15, 25], *X. dendrorhous* has grown in the refined carbon and supplement nitrogen sources and the yield of astaxanthin ranged from 0.58 mg/L with xylose (10 g/l) to 2.27 mg/L with D- cellobiose (10 g/L). Although, the supplementation or use of highly refined material may increase the yield, it will usually also increase the cost significantly. Moreover, the astaxanthin content obtained from the un-hydrolyzed mustard meal media was higher than from sugarcane juice [9, 10], grape juice [5], alfalfa residue juice [8] and wood hydrolyzate [11].

For the comparison between astaxanthin and total carotenoid, the results demonstrate that the astaxanthin produced by *X. dendrorhous* in un-hydrolyzed mustard meal media was 93% of the total carotenoids (Table 1). Johnson and Lewis [15] showed that astaxanthin of *X. dendrorhous* cultured in YM medium was 83-87% of the total carotenoids. In addition, *X. dendrorhous* cultured in xylose can produce astaxanthin of 91% of total carotenoid [25].

4. CONCLUSION

The present work demonstrates the efficacy of using a low-cost substrate, un-hydrolyzed mustard meal extract media, for astaxanthin production by *X. dendrorhous*. This is readily available material that can be used as a source of both carbon and nitrogen, without hydrolysis and supplementation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund, Royal Golden Jubilee Scholarship Program, and funds from the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand, and the Department of Chemistry and Biochemistry, California State University Fullerton, Fullerton, CA, USA. The authors thank the Lanna Product Co., Ltd., Lamphun, Thailand, for the raw mustard materials.

REFERENCES

- [1] Emodi A., Carotenoids properties and applications, *Food Technol.*, 1978; 32: 38-40.
- [2] Miller M.W., Yoneyama M. and Soneda M., *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (Blastomycetes), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1976; 26: 286-291.
- [3] Andrewes A.G., Phaff H.J. and Starr M.P., Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast, *Phytochemistry*, 1976; 15: 1003-1007.
- [4] Fang T.J. and Cheng Y.S., Improvement of astaxanthin by Production *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions, *J. Ferment. Bioeng.*, 1993; 6: 466-469.
- [5] Longo E., Siero C., Velazquez J.B., Calo P.M., Cansado J. and Villa T.G., Astaxanthin production from *Phaffia rhodozyma*, *Biotech. Forum Europe*, 1992; 9: 565-567.
- [6] Martin A.M., Acheampong E. and Patel T.R., Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1993; 58: 223-230.
- [7] Vázquez M. and Martin A.M., Mathematical model for *Phaffia rhodozyma* growth using peat hydrolysates as substrate, *J. Sci. Food Agric.*, 1998; 76: 481-487.
- [8] Okagbue N.R. and Lewis J.M., Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1984; 20: 33-39.
- [9] Fontana J.D., Chocial M.B., Baron M., Guimaraes M.F., Maraschin M., Ulhoa C., Florencio J.A. and Bonfim T.M.B., Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* : optimization of low-cost culture media and yeast cell-wall lysis, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1997; 63/65: 305-314.
- [10] Florêncio J.A., Soccol C.R., Furlanetto L.F., Bonfim T.M.B., Krieger N., Baron M. and Fontana J.D., A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium : increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*, *Bioprocess Eng.*, 1998; 19: 161-164.
- [11] Cruz J.M. and Parajó J.C., Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose, *Food Chem.*, 1998; 76: 479-484.
- [12] Rakariyatham N., The value added by-products from mustard essential oil, Final Report to Thailand Research Fund, Thailand, 2000.
- [13] Anil Kumar G.K., Panwar V.S., Yadav K.R. and Sihag S., Mustard cake as source of dietary protein for growing lambs, *Small Ruminant Res.*, 2002; 44: 47-51.
- [14] Ayodhya P., Evaluation of mustard oil cake available in India. I. Proximate analysis, total lysine and methionine contents, *Indian J. Nutr. Diet.*, 1978; 15: 159.
- [15] Johnson E.A. and Lewis M.J., Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*, *J. Gen. Microbiol.*, 1979; 115: 173-183.
- [16] Flores-Cotera L.B., Martin R. and Sanchez S., Citrate, a possible precursor of astaxanthin *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium, *Appl. Micro. Biotech.*, 2000; 5: 1-10.
- [17] Cole E.R., Alternative methods to the kjeldahl estimation of protein nitrogen, *Rev. Pure Appl. Chem.*, 1969; 19: 109-130.
- [18] Kohler G.O. and Palter R., Studies on methods for amino acid analysis of wheat products, *Cereal Chem.*, 1967; 44: 512-520.
- [19] Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Ribers P.A. and Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substrates, *Anal. Chem.*, 1956; 28: 350-356.
- [20] Sedmark J.J., Weerasinghe D.K. and Jolly S.O., Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*, *Biotechnol. Tech.*, 1990; 4: 107-112.

- [21] Fang T.J. and Wang J.-M., Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation, *Process Biochem.*, 2002; 37: 1235-1245.
- [22] Mayer P.S. and Du Preez J.C., Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994; 40: 780-785.
- [23] Kesava S.S., An G.-H., Kim C.-H., Rhee S.-K. and Choi E.-S., An industrial medium for improved production of carotenoids from a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*, *Bioprocess Eng.*, 1998; 19: 165-170.
- [24] Palágyi Z.S., Ferenczy L. and Vágvölgyi C.S., Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*, *World J. Microbiol. Biotech.*, 2001; 17: 95-97.
- [25] Parajó J.C., Santos V. and Vázquez M., Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose, *Process Biochem.*, 1998; 33: 181-187.

Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by
Xanthophyllomyces dendrorhous

J Tinoi^a, N Rakariyatham^{a*} and RL Deming^b

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

^b Department of Chemistry and Biochemistry, California State University, Fullerton, California, 92834-6866, USA.

*Corresponding author, E-mail address: nuansri1@yahoo.com , Fax. (66) 53 892277

Abstract

Astaxanthin production in the wild strain *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 was investigated using different mustard waste isolate media, including mustard waste residue isolate extract (MRIE), mustard waste residue isolate hydrolysate (MRIH), mustard waste precipitated isolate extract (MPIE), and mustard waste precipitated isolate hydrolysate (MPIH). The growth of *X. dendrorhous* and the production of astaxanthin were dependent on the type and initial concentration of mustard waste isolate media. The MPIH medium was the best substrate resulting in yields of biomass and astaxanthin of 19.62 g/L and 25.77 mg/L, respectively, under optimal conditions. MPIH medium improved astaxanthin production 16-fold compared to the commonly used commercial yeast malt medium, and 5-10-fold compared to other mustard waste media.

Keywords Astaxanthin · *Xanthophyllomyces dendrorhous* · Mustard waste ·

Introduction

Astaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione) is an important and valuable keto-carotenoid pigment. It has been widely used as a food colorant and in cosmetic and medical applications due to its high antioxidant activity (14). Studies report that it has a nearly 10-fold higher antioxidant activity than other carotenoids and has a 100-500-fold higher activity than α -tocopherol (19, 29, 21). Astaxanthin has been produced commercially by chemical synthesis (13) but the product contains only 8% astaxanthin and costs \$25,000 – 30,000 kg⁻¹. When substances are used as food additives, consumers prefer materials made using biological and/or biotechnological processes rather than chemical synthesis. Among the microorganisms that contain

astaxanthin that might be utilized for commercial bio-production are *Brevibacterium*, *Mycobacterium lacticola* (22), *Agrobacterium auratium* (33), *Haematococcus pluvialis* (6) and the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*) (1). However, to date, no commercially viable processes have been developed to produce significant quantities.

Among these microorganisms, the yeast *X. dendrorhous* may be suitable for commercial production because astaxanthin accounts for 80-90% of the total carotenoid compounds. Drawbacks include the low astaxanthin level in wild-type strains (200-300 µg/g yeast) and the rigid cell wall that makes it difficult to extract intracellular products (12). Strategies employed to increase product yields from microorganisms include (i) the use of overproducing strains, (ii) addition of bacterial and fungal enzymes that disrupt the yeast cell wall, and (iii) the development of low-cost culture media that diminish production costs (5, 7- 9,18, 20).

Previous studies using low-cost byproducts and residues of agro-industrial origin have shown the possibility of astaxanthin production from several materials such as molasses (10), grape juice (17), hemicelullosis hydrolysates of eucalyptus (23), peat hydrolysates (32) and hydrolysates from *Yucca fillifera* (26). Use of these low-cost culture media showed significantly increased growth and astaxanthin synthesis (1.1 – 3.8-fold) compared to yeast extract/malt extract (YM) medium. The current study focuses on the possibility of using mustard waste isolates as low-cost alternative substrates for astaxanthin production by *X. dendrorhous*. The mustard waste is abundantly produced during the production of allyl isothiocyanate (AIT) from mustard seed (*Brassica juncea* var, Forge) (25). Ten tons of mustard seed produces 70 tons of mustard waste suspension (in water) that is usually discarded. The process generates about 2,400 metric tons of waste per year so finding another

value-added use for this material through further processing would provide economic benefits as well as reduce its environmental impact.

Materials and Methods

Microorganism

Xanthophyllomyces dendrorhous TISTR 5730 (formerly *Phaffia rhodozyma*) was obtained from the Thailand Institute of Science and Technological Research (TISTR). The yeast strain was maintained on the YM agar (Difco, USA) slant at 4°C and subcultured monthly.

Initial mustard residue and precipitate preparation

The mustard waste suspension resulting from the production of allyl isothiocyanate (AIT) was collected from Lanna Product Co., Ltd., Lamphun, Thailand. Mustard waste residue isolate (MRI) powder was prepared directly from the waste suspension by centrifugation and drying in a hot air oven at 50 °C. The mustard waste precipitate isolate (MPI) powder was prepared from the waste suspension by precipitation with 0.2% citric acid at pH 5, followed by washing with hexane and drying in the hot air oven (25).

Mustard waste isolate media preparation

The un-hydrolyzed mustard waste isolate media extracts (E) were prepared by adding a specific amount of either MRI or MPI powder to distilled water in an Erlenmeyer flask, followed by boiling and stirring for 30 min. The amount of MRI or MPI and distilled water used defined the percent composition (as % (w/v)) of the medium for later experiments (0 to 30%). The mixture was centrifuged and filtrated

(31). The liquid supernatant was designated as either mustard waste residue isolate extract (MRIE) or mustard waste precipitate isolate extract (MPIE).

Acid hydrolysates (H) from the MRI or MPI powders were obtained by mixing a specified amount of either MRI or MPI powder with 0.2 N H₂SO₄, followed by autoclaving at 121°C for 15 min. The amount of MRI or MPI and sulfuric acid used defined the percent composition (as % (w/v)) of the medium for later experiments (0 to 30%). Centrifugation and adjustment of the supernatant to pH 6.0 with 2 M NaOH (2) yielded the mustard waste residue isolate hydrolysate (MRIH) or mustard waste precipitate hydrolysate (MPIH).

Culture condition

The preculture was prepared in YM broth. *X. dendrohous* cells were incubated at 20°C for 28 h on a rotary shaker (200 rpm). The yeast cells were harvested by centrifugation and washed twice in sterile distilled water. One mL of the preculture suspension ($\times 10^7$ cells) was incubated in a 125 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL of a specific mustard waste isolate medium. All media were incubated at 20°C on a rotary shaker (200 rpm) for 120 h. Experiments were performed in quadruplicate.

Analytical methods

The total nitrogen content was determined by the Kjeldahl method (3). Total sugar was measured with the phenol-sulfuric method (4). For cell dry weight determinations, 5 mL broth samples were centrifuged for 10 min. at 3500×g and washed twice with distilled water. The washed cells were dried in predried aluminium pans for 48 h at 95 °C, allowed to cool in a desiccator and weighed. Carotenoids were extracted from cells by disruption with DMSO and centrifugation. The total

carotenoids were determined from the optical density at 474 nm, using an absorption coefficient value of 2100 mg/L-cm (27) with a Hitachi U-2000 UV/Vis spectrophotometer. To prepare pigment extracts, *X. dendrorhous* cells were disrupted by the freeze-thaw treatment and sonication at 3-minute intervals ten times. Multiple extractions (3-4) with sonication were carried out until the extract was nearly colorless (31). The pooled acetone extracts were re-extracted with hexane and then concentrated to 5 mL by blowing with nitrogen gas. The pigment extracts were kept at -20°C until analyzed.

Astaxanthin was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a Hewlett-Packard series 1100 instrument equipped with a 150 mm × 4.6 mm, 5 µm Microsorb-MV C₁₈ reversed-phase column, using UV detection at 450 nm. The isocratic eluent consisted of acetonitrile : methanol (9:1 v/v) with a flow rate of 0.5 mL/min. A 0.0500 g/L standard solution of astaxanthin (Sigma, USA) was prepared in chloroform and used as the external standard. Samples and standard were stored at -20 °C.

Results

The utilization of various mustard waste isolate media as substrates for growth and astaxanthin production by *X. dendrorhous* was investigated. Comparisons of cell growth and astaxanthin production were made using four different mustard waste isolate media as sole carbon and nitrogen sources: mustard waste residue isolate extract (MRIE), mustard waste residue isolate hydrolysate (MRIH), mustard waste precipitated isolate extract (MPIE) and mustard waste precipitated isolate hydrolysate (MPIH).

Higher concentrations of the media yielded higher biomass (Figure 1) and higher astaxanthin levels (Figure 2), with a rapid plateauing above 15%. For MPIH the highest production of astaxanthin was at 10%, with a slight decrease at 15% and plateauing until 30%. MPIH was the most effective medium for both growth and astaxanthin production at all concentrations investigated.

The carbon and nitrogen contents at 10% concentration for all four media (Figure 3) show that the supernatant above both the MRI and MPI powders after extraction (MRIE and MPiE) have lower C and N contents compared to the hydrolyzed media (MRIH and MPIH). C and N in MRiE (or MPiE) are expected to be lower than those in the MRIH (or MPIH) since hydrolysis of the suspended materials would make more C and N available to the yeast.

At optimal concentrations of media (15% for MRiE, MRIH, MPiE and 10% of MPIH) the maximum yields of astaxanthin were 12.10 mg/L, 14.05 mg/L, 19.04 mg/L, and 25.77 mg/L, respectively. Astaxanthin levels for 10% MPIH were 1.3-2.1 times higher than for other media.

Using the optimum conditions of 10% MPIH, the time course of growth and astaxanthin production were monitored in parallel with the cell growth and the depletion of nutrients (nitrogen and carbon sources). Figure 4 shows that both biomass and astaxanthin production increased over time as total nitrogen and carbon in the mustard waste isolate media decreased. The maximum levels of biomass (19.62 g/L) and astaxanthin (25.77 mg/L) were reached at 96 h, when the carbon source had been depleted, reaching a constant level from 96-144 h. Similar time course relationships were found for other media and other concentrations.

Discussion

The present work examined the use of waste agro-industrial material from mustard processing as a potential medium for astaxanthin production from *X. dendrorhous*. Boiling water extraction and acid hydrolysis of mustard waste produce useful culture media, but the precipitated and hydrolyzed medium MPIH was the most effective, yielding a biomass of 19.62 g/L and astaxanthin at 25.77 mg/L with a medium concentration of 10% w/v. Nutrient availability, as carbon and nitrogen sources, limit growth and astaxanthin production, and hydrolysis clearly increases these components. However, at high levels (above 15%) there is no additional enhancement, consistent with previous work (8) suggesting that high carbon and nitrogen levels can inhibit growth. The time course of the culture development shows the characteristic exponential and stationary phases (15-16, 32), reaching a maximum level after about 100 h under the present conditions.

Another explanation for decreased growth and astaxanthin production in MRIE and MRIH compared to MPiE and MPIH is the presence of high levels of erucic acid, phenolic acid compounds and glucosinolate, considered to be antinutritional factors (25, 28, 30). Acid precipitation during the preparation of the MPI powder (25) can reduce the amounts of these toxic substances.

Table 1 provides comparisons among a number of potential culture media for astaxanthin production and demonstrates that MPIH, without supplementation, gives the highest yield on a mg/L basis, and yields comparable to peptone-supplemented molasses or peptone-supplemented peat hydrolysates on a µg/g basis. Astaxanthin production under optimal conditions was more than ten times that obtained from supplemented hydrolysates of eucalyptus and un-supplemented corn wet-milling (11), 5 times that from supplemented peat hydrolysates, and nearly double that of the

supplemented molasses medium. Comparison to mustard meal extract (31), the higher astaxanthin yield was nearly 7 times. Production of astaxanthin was 16 times higher than glucose, peptone, yeast extract and malt extract (YM) medium and 5 times than xylose supplemented with peptone, glucose and yeast extract (24). MPIH could be an effective medium for commercial production of astaxanthin at low cost because supplementation is not necessary and the waste material is widely available during AIT production.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand and the Department of Chemistry and Biochemistry, California State University, Fullerton, CA, USA. This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund, Royal Golden Jubilee Scholarship Program. The authors thank the Lanna Product Co., Ltd., Lamphun, Thailand, for the raw mustard materials.

References

1. Andrews AG, Phaff HJ, Starr MP (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003-1007.
2. Buzzini P, Martin A (1999) Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technol* 71: 41-44.
3. Cole ER (1969) Alternative methods to the kjeldahl estimation of protein nitrogen. *Rev Pure Appl Chem* 19: 109-130.

4. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Ribers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substrates. *Anal Chem* 28: 350-356.
5. Echavarri-Erasun C, Johnson EA (2004) Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Research* 4: 511-219.
6. Fan L, Vonshak A, Gabbay R, Cohen Z, Boussiba S (1995) The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant Cell Physiology* 36: 1519-1524.
7. Fang TJ, Cheng Y-S (1993) Improvement of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J Ferment Bioeng* 6: 466-469.
8. Fang TJ, Wang J-M (2002). Extractibility of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Process Biochem* 27: 1235-1245.
9. Gu W-L, An G-H, Johnson EA (1997) Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19: 114-117.
10. Haard NF (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol Lett* 10: 609-614.
11. Hayman GT, Mannarelli BM, Leathers TD (1995) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. *J Ind Microbiol* 14: 389-395.
12. Johnson EA (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol* 6: 169-174.

13. Johnson EA, An G-H (1991) Astaxanthin from microbial sources. Crit Rev Biotechnol 11: 297-326.
14. Johnson EA, Conklin DE, Lewis MJ (1979) The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment sources for salmonids and crustaceans. J Fish Res Board Can 34: 2417-2421.
15. Johnson EA, Lewis MJ (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. J Gen Microbiol 115: 173-183.
16. Kusdiyantini E, Gaudin P, Goma G, Blanc PJ (1998) Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. Biotechnol Lett 20: 929-934.
17. Meyer PS, Du Preez JC (1994) Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. World J Microbiol Biotech 10: 178-183.
18. Meyer PS, Du Preez JC, Kilian SG (1993) Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. World J Microbiol Biotechnol 9: 514-520.
19. Miki W (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl Chem 63: 141-146.
20. Misawa N, Shimada H (1997) Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. J Biotechnol 59: 169-181.
21. Naguib Y (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. J Agr Chem 48: 1150-1154.

22. Nelis HJ, De Leenheer AP (1989) Microbial production of carotenoids other than β -carotene. In: Vandamme, EJ (ed.) Biochemistry of vitamins, pigments and growth factor. Elsevier Applied Science, London, New York, pp 43-80.
23. Parajó JC, Santos V, Vázquez M (1998a) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of Eucalyptus globules wood. Biotechnol Bioeng 59: 501-506.
24. Parajó JC, Santos V, Vázquez M (1998b) Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. Process Biochem 33: 181-187.
25. Rakariyatham N (2000) The value added by-products from mustard essential oil plant sub-project. Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand.
26. Ramirez J, Nuñez ML, Valdivia R (2000) Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. J Ind Microbiol Biotechnol 24: 187-190.29.
27. Sedmark JJ, Weerasinghe DK, Jolly SO (1990) Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol Tech 4: 107-112.
28. Shahidi F, Naczk M (1992) An overview of the phenolics of canola and rapeseed: Chemical, sensory and nutritional significance. JAOCS 69: 917-924.
29. Shinidzu N, Goto M, Miki W (1996) Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. Fish Sci 61:134-137.
30. Sosulski FW (1979) Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products. JAOCS 56: 711-714.

31. Tinoi R, Pakariyatham N, Deming RL (2004) Use of mustard meal media as a substrate for astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Chiang Mai J Sci 31: 293-302.
32. Vázquez M, Martín AM (1998) Mathematical model for *Phaffia rhodozyma* growth using peat hydrolysates as substrate. J Sci Food Agric 76: 481-487.
33. Yokoyama A, Miki W (1995) Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium auratium*. FEMS Microbiol Lett 128: 139-144.

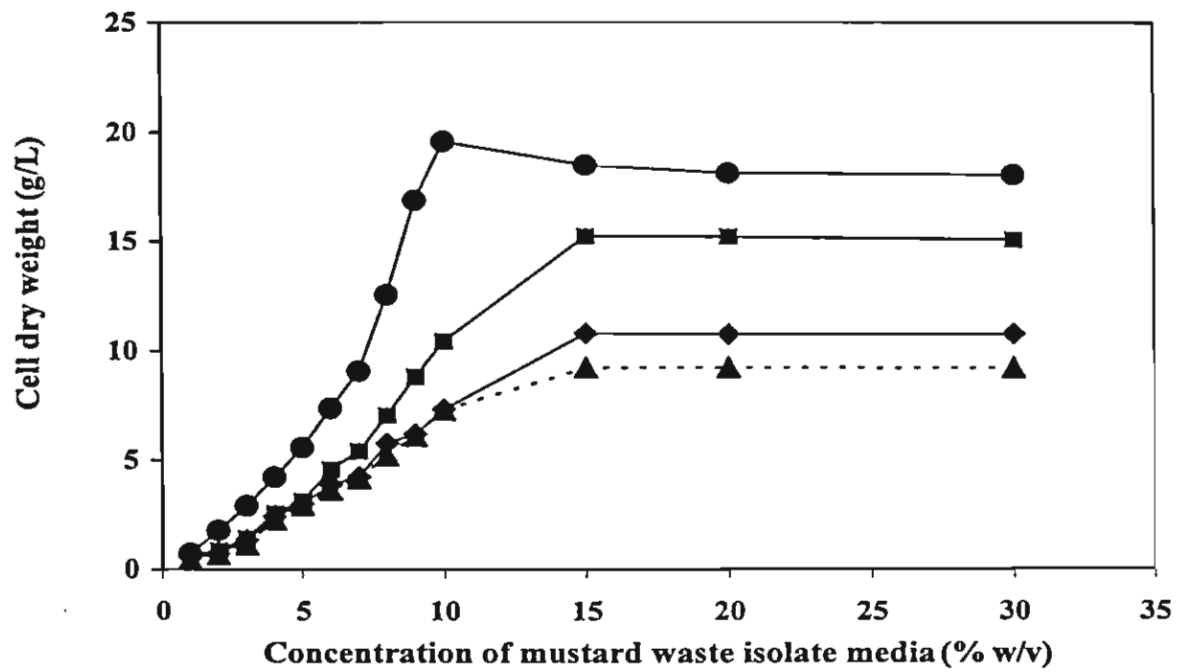


Figure 1 Cell dry weight (g/L) of *X. dendrorhous* TISTR 5730 cultured in mustard waste isolate media at different concentrations under optimal conditions: 20°C, pH 5.5, 200 rpm for 120 h. (▲ = MRIE, ♦ = MRIH, ■ = MPIE and ● = MPIH)

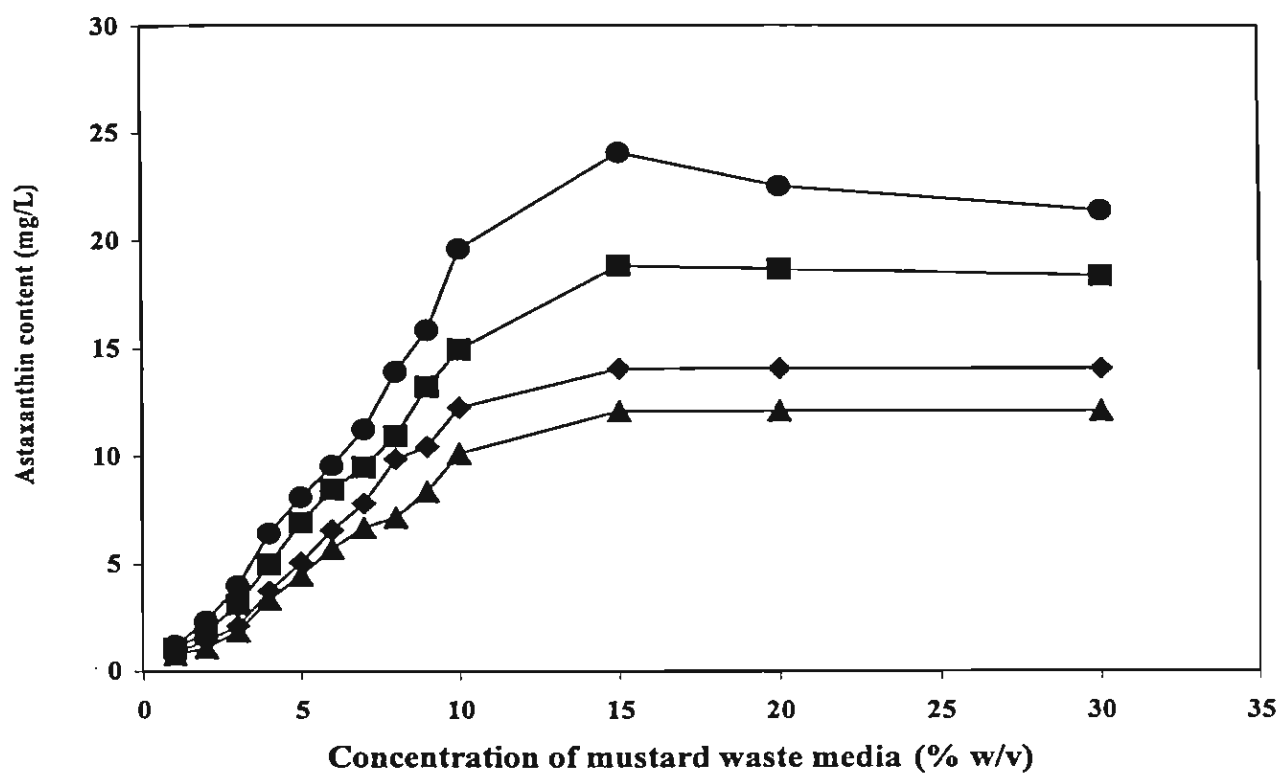


Figure 2 Astaxanthin content (mg/L) by *X.dendrorhous* TISTR 5730 cultured in mustard waste isolate media at different concentrations under optimal conditions: 20°C, pH 5.5, 200 rpm for 120 h. (▲ = MRIE, ♦ = MRIH, ■ = MPIE and ● = MPIH)

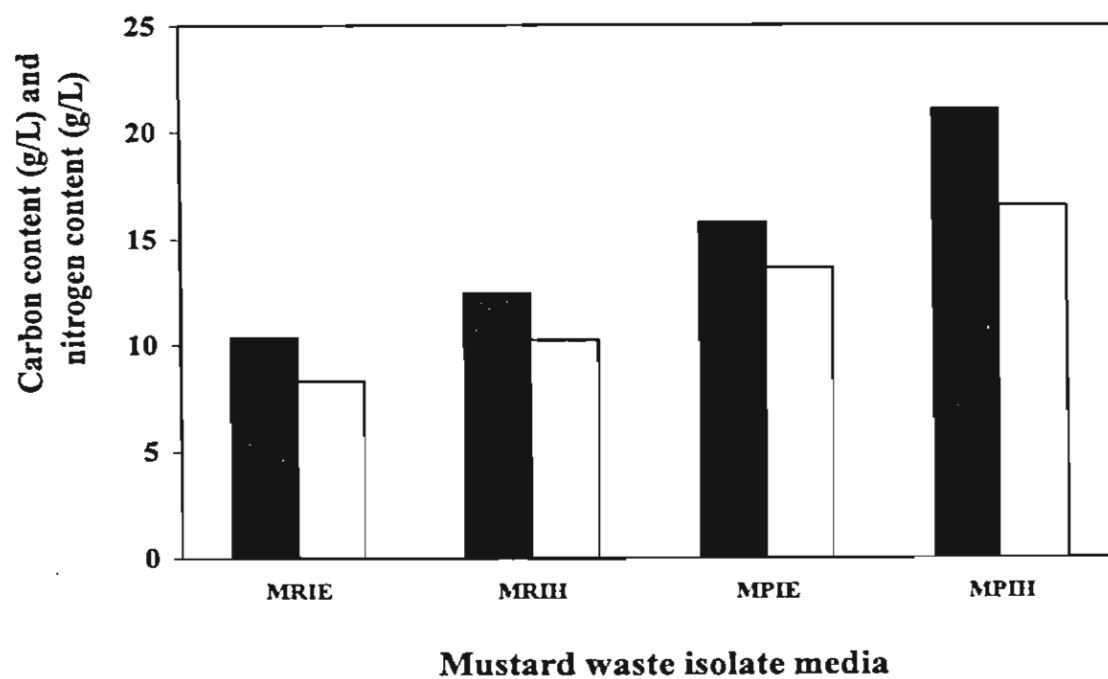


Figure 3 Carbon and nitrogen contents at 10% w/v of mustard waste isolate media. (■ = carbon content and □ = nitrogen content)

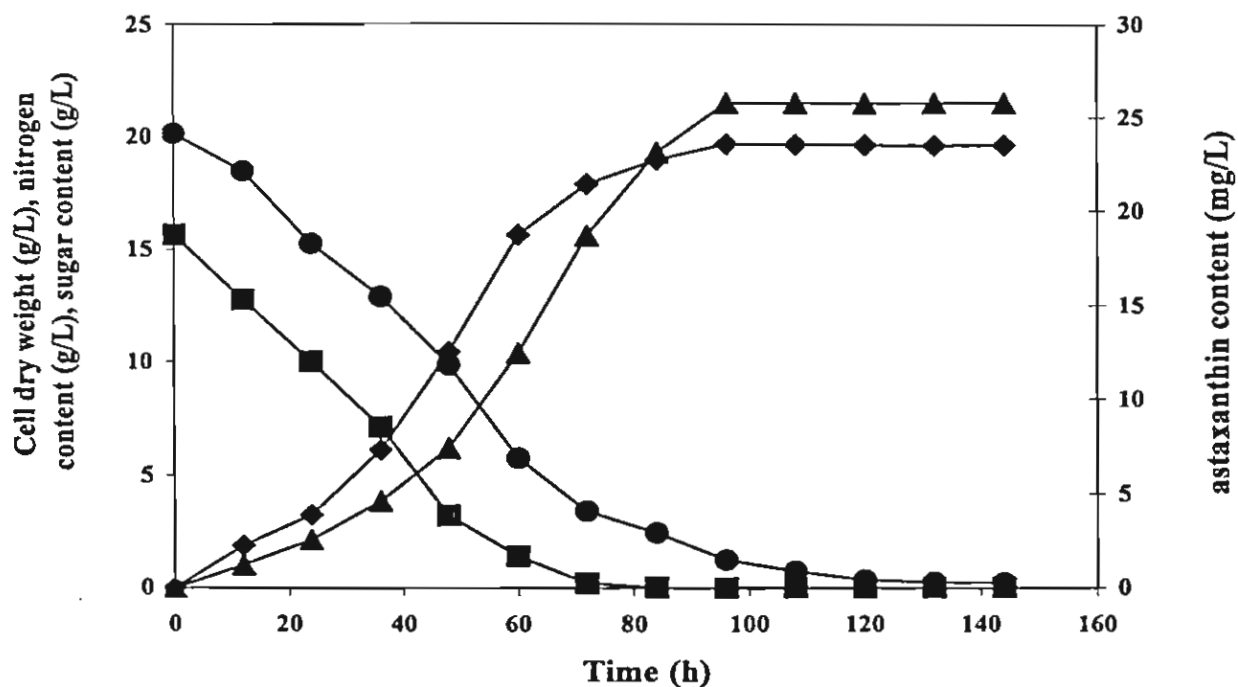


Figure 3 Time-course of the growth and production of astaxanthin by *X. dendrorhous* in 10% (w/v) of MPIH media. Experiments were carried out at 20°C and initial pH 5.5. (♦ = Cell dry weight; ▲ = astaxanthin content; ● = sugar content and ■ = nitrogen content)

Table 1 Comparison of astaxanthin production obtained in flasks culture using different media.

Media	Additional supplement	Astaxanthin production (mg/L)	Astaxanthin production (µg/g)	Reference
Glucose	Peptone and YE	1.62	406	[15]
Xylose	Peptone, YE and malt extract	5.20	571	[24]
Molasses	Peptone	15.00	1,182	[10]
Hydrolysates peat	Peptone	5.520	1,567	[32]
Hydrolysates eucalyptus	Peptone	2.140	448	[23]
Corn wet-milling	None	0.1-2.6	400	[11]
20% Mustard meal extract	None	3.830	667	[31]
10% Hydrolyzed mustard waste isolate	None	25.77	1,312	This work

