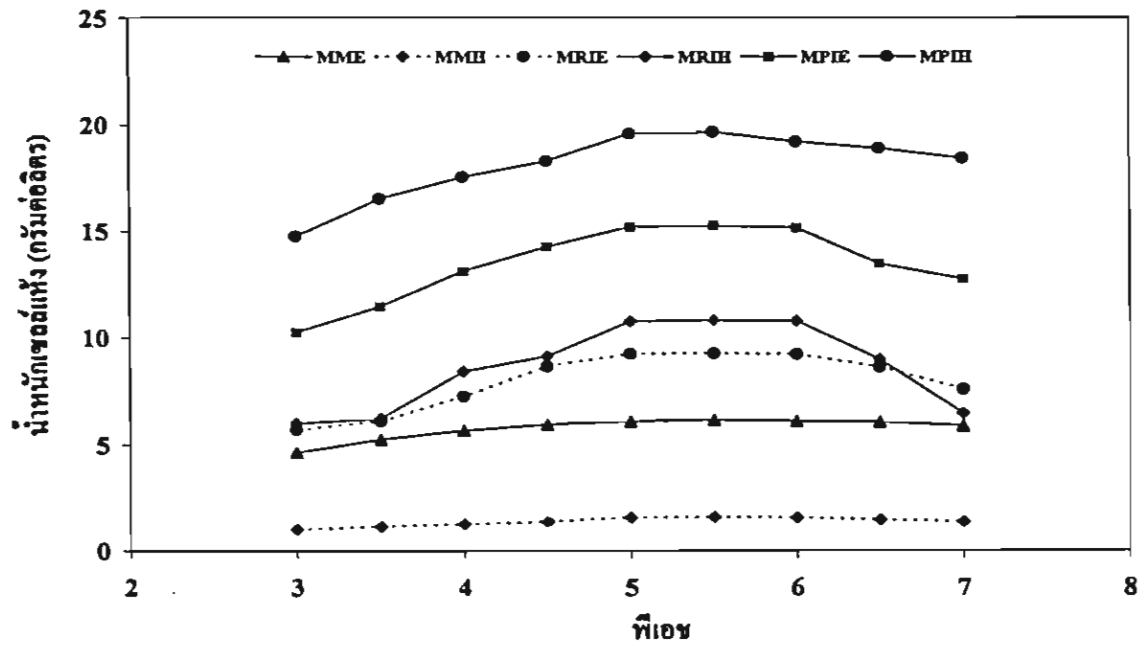
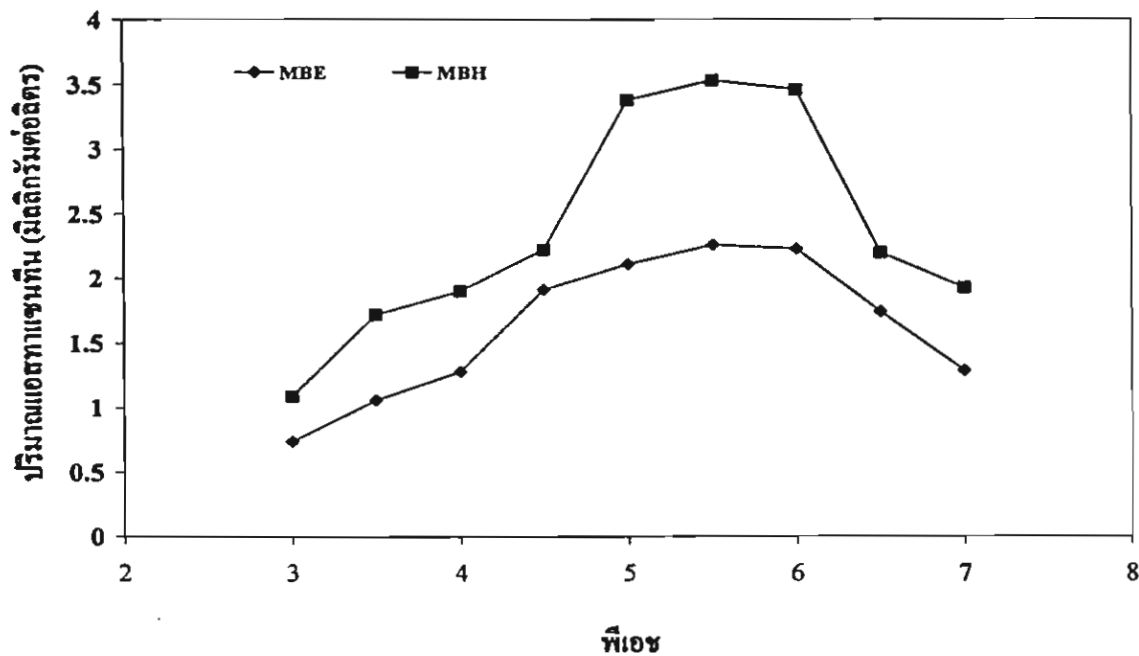




รูปที่ 12 แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอคทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ด

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 แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแอสตาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวุ้นเห็ด

3.5.2. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสตาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้

ก. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัธยาร์ดและวุ้นเห็ด

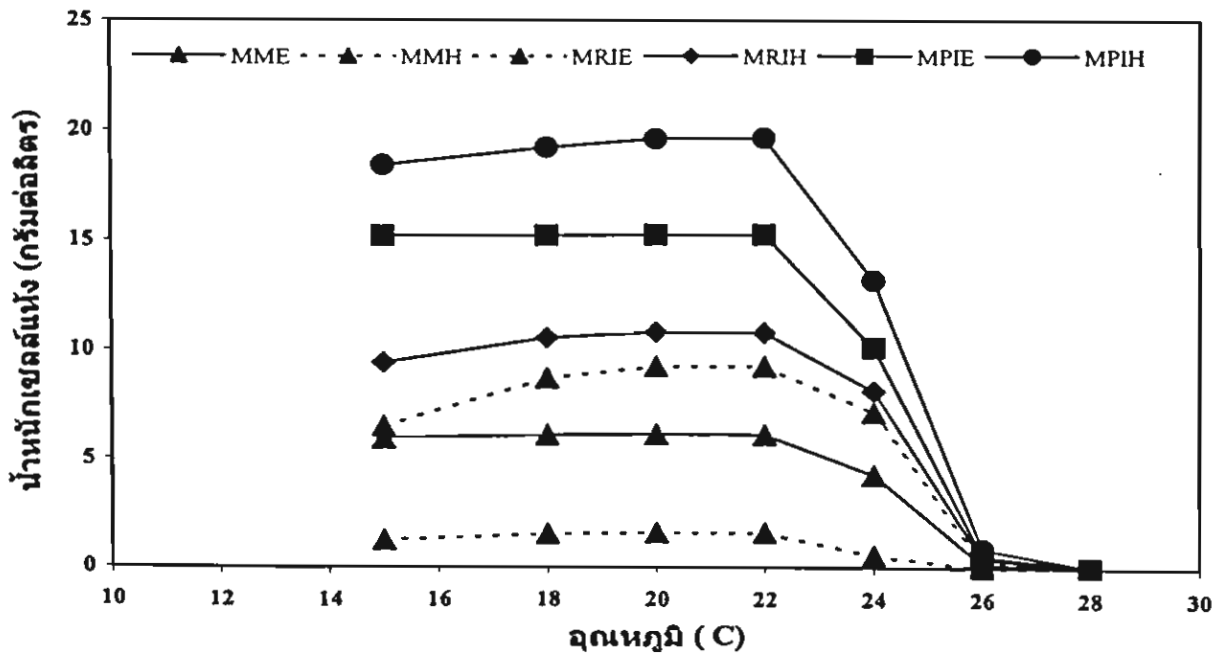
ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยเตรียมอาหารที่ความเข้มข้น 20% (w/w) MME, 20% (w/w) MMH, 15% (w/w) MRIE, 15% (w/w) MRIH, 15% (w/w) MPIE, 10% (w/w) MPIH, 15% (w/w) MBE และ 15% (w/w) MBH โดยได้เตรียมให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 แล้วถ่ายเชื้อลงไปในการอาหารที่เตรียมได้ จากนั้นนำไปเขย่าที่เครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบเท่ากับ 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 โดยอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ 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

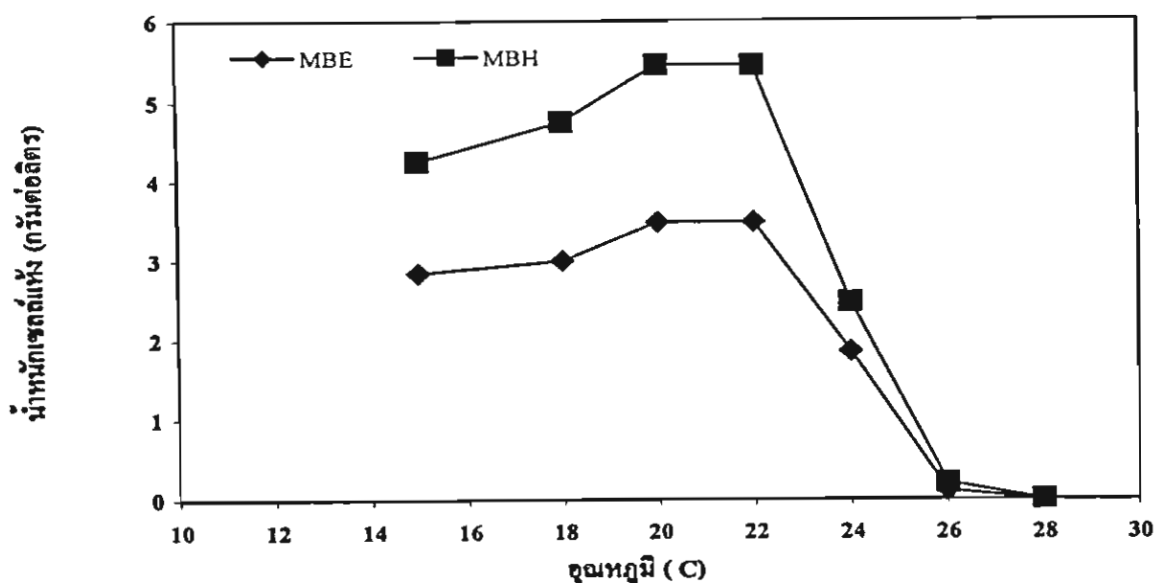
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
15	5.95	1.25	6.52	9.43	15.2	18.45
18	6.11	1.53	8.74	10.58	15.24	19.23
20	6.12	1.59	9.27	10.82	15.26	19.62
22	6.11	1.58	9.25	10.80	15.25	19.65
24	4.27	0.56	7.14	8.12	10.11	13.20
26	0.15	0.002	0.22	0.41	0.52	0.87
28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

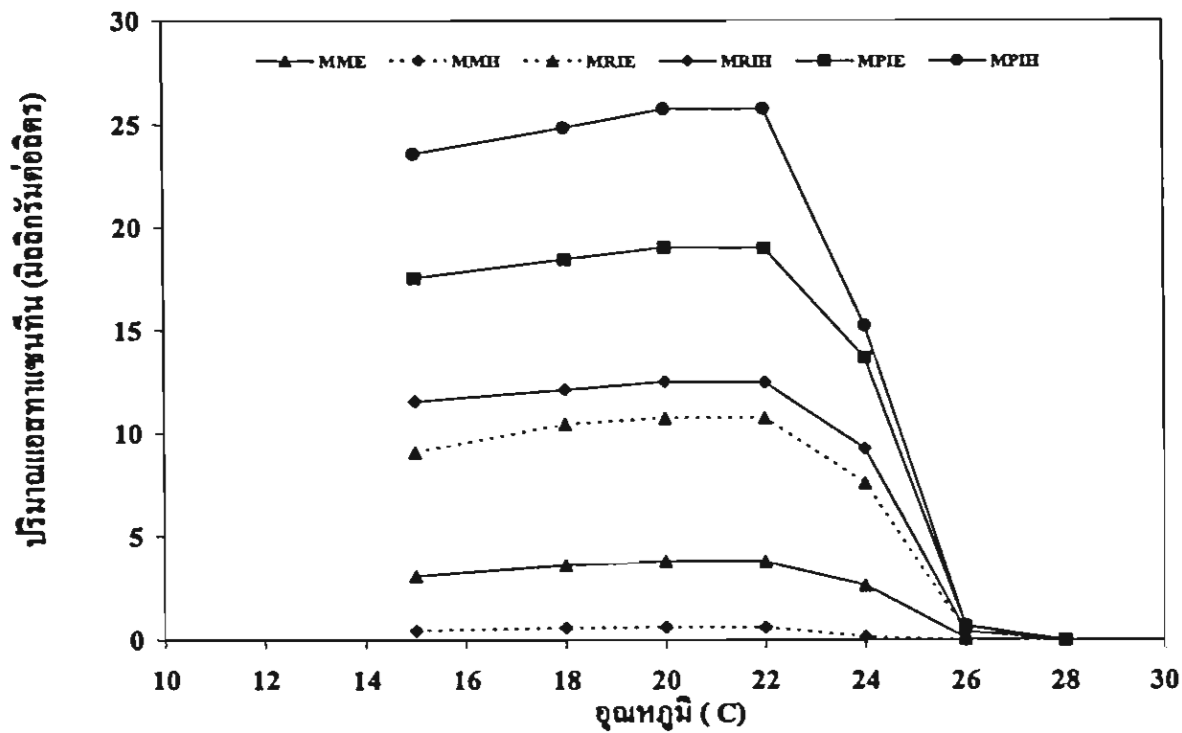
ข ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ดและวันเฝ้า

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

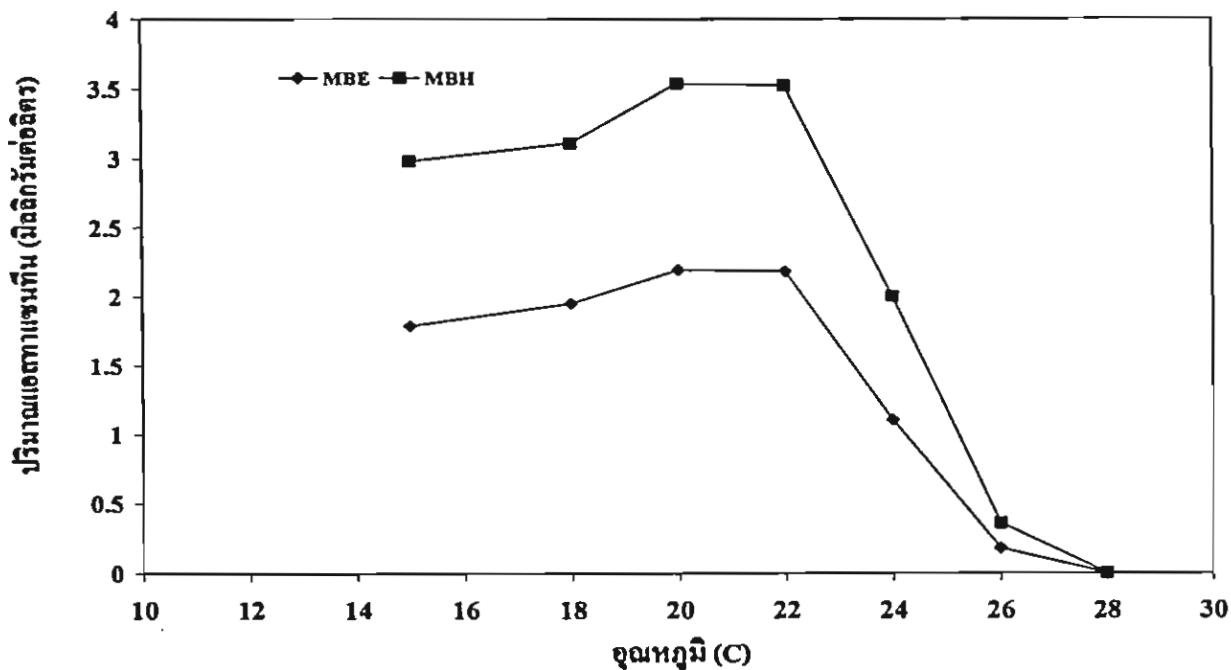
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ แอสทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRiE	MRiH	MPiE	MPiH
15	3.10	0.45	9.10	11.55	17.53	23.56
18	3.64	0.58	10.46	12.13	18.45	24.85
20	3.81	0.61	10.76	12.51	19.02	25.77
22	3.79	0.60	10.76	12.47	19.00	25.78
24	2.64	0.15	7.60	9.28	13.67	15.23
26	0.09	0.003	0.35	0.40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



รูปที่ 16 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสาร แอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์ค

ตารางที่ 15 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันแด้น

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ แอสทาแซนทีน (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 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารแอลกอฮอล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบหลังกระบวนการผลิตวันเฝ้า

3.5.3. ผลของเวลาที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอลกอฮอล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้

ก. ผลของเวลาที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์คและวันเฝ้า

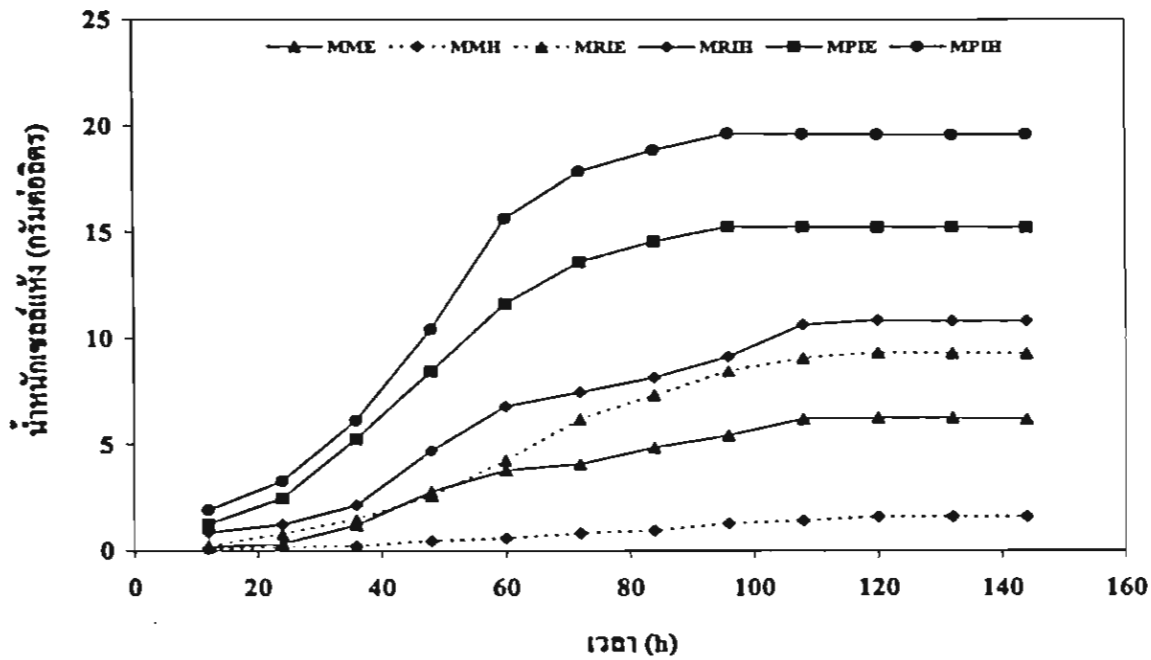
การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ แอลกอฮอล์ในอาหาร MME, MMH, MRIE, MRI, MPIE, MPIH, MBE และ MBH ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสม และปรับค่าพีเอชของอาหารที่ 5.5 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บเซลล์ทุก ๆ 12 ชั่วโมง ผลดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 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

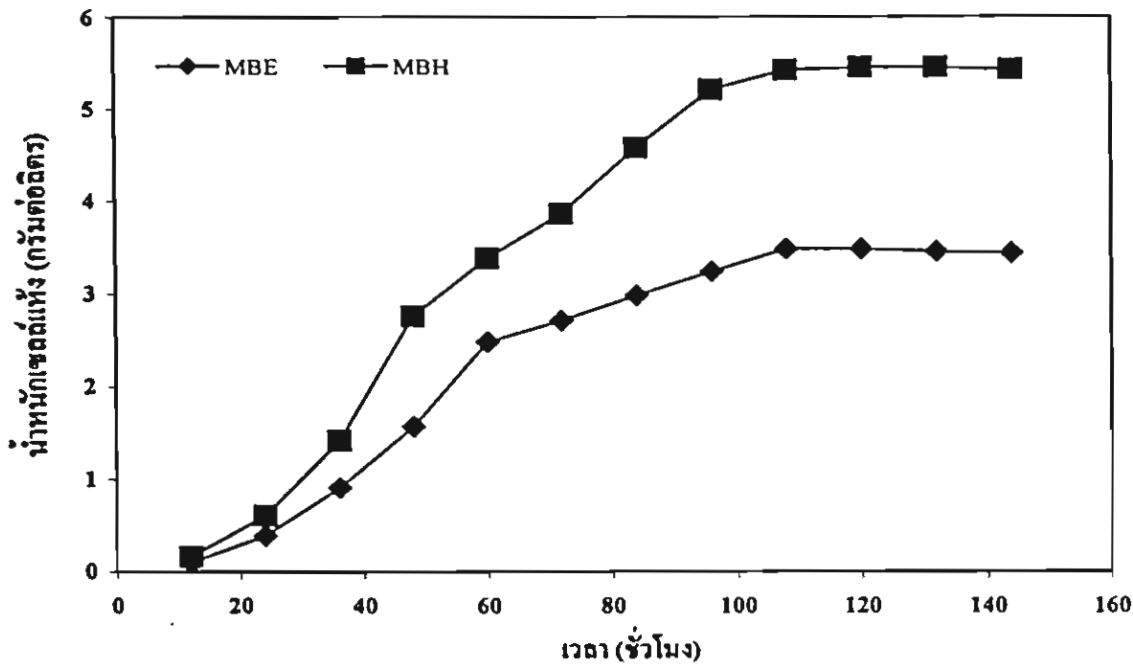
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
12	0.16	0.09	0.22	0.85	1.25	1.89
24	0.32	0.16	0.79	1.23	2.46	3.25
36	1.22	0.22	1.48	2.13	5.25	6.12
48	2.79	0.46	2.57	4.69	8.45	10.42
60	3.77	0.58	4.23	6.78	11.63	15.62
72	4.07	0.81	6.19	7.45	13.58	17.86
84	4.86	0.93	7.31	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



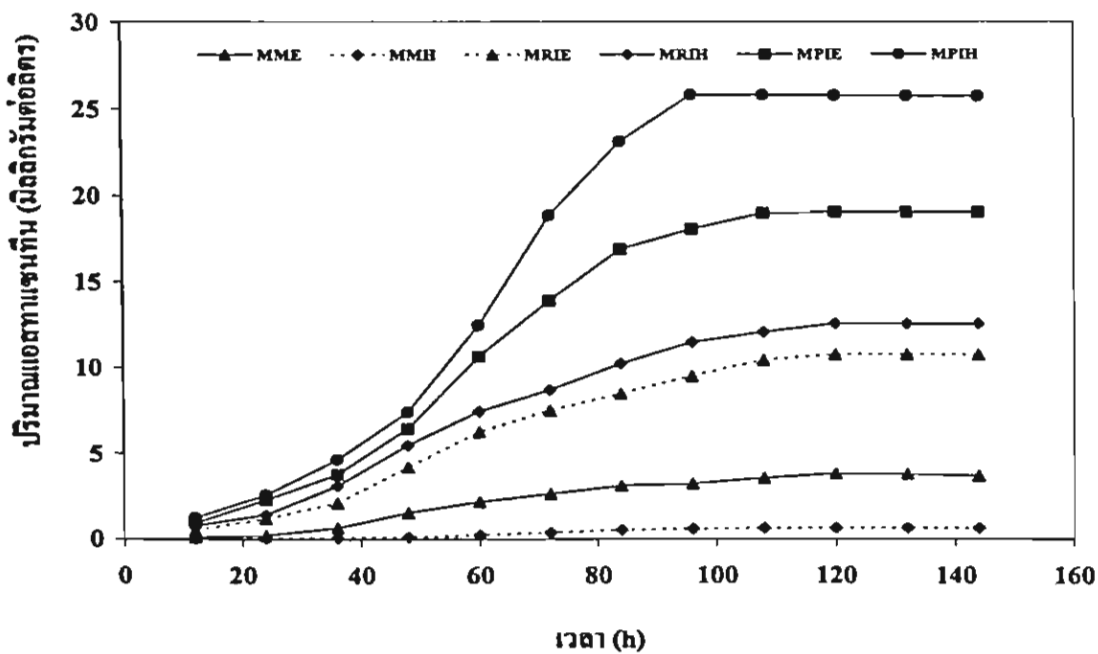
รูปที่ 19 แสดงผลของเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเลี้ยงในอาหารจากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตวันเด่น

ข. ผลของเวลาที่มีต่อการผลิตสาร แอสทาแซนทีนของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยและวันเด่น

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

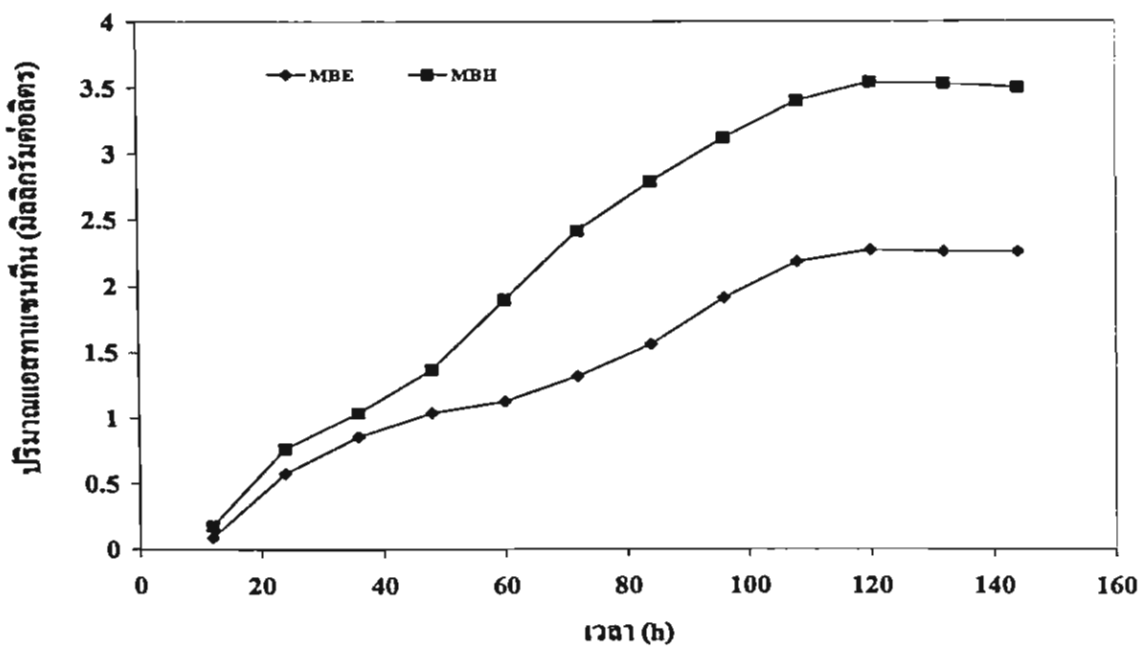
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ แอตทาแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
	MME	MMH	MRIE	MRIH	MPIE	MPIH
12	0.11	0.014	0.52	0.77	0.92	1.23
24	0.22	0.046	1.19	1.44	2.30	2.59
36	0.68	0.072	2.12	3.12	3.81	4.65
48	1.54	0.113	4.22	5.51	6.47	7.42
60	2.17	0.209	6.27	7.46	10.66	12.46
72	2.65	0.37	7.51	8.71	13.92	18.86
84	3.09	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 และในการทดลองนี้ยังได้มีการวิเคราะห์ปริมาณไฟเตคด้วยพบว่ามีไฟเตคเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 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 สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงเชื้อและผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *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 มัสตาร์ดและวุ้นเส้น

การศึกษากการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนมีความจำเป็นอย่างมาก เนื่องจากว่าเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ สภาวะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตและผลิตสารอาจมีการเปลี่ยนแปลงด้วย ดังนั้นในการศึกษากการผลิตสารในอาหารที่เตรียมได้ให้ได้ปริมาณมาก ๆ นั้น จึงต้องทำในสภาวะที่เหมาะสมของอาหารที่เตรียมได้ตามแต่ละชนิดของอาหารด้วย เพื่อว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารแอสทาแซนทีนได้ปริมาณมากที่สุดในงานวิจัยนี้ได้เตรียมอาหารจากวัตถุดิบในผลิตน้ำมันหอมระเหย มัสตาร์ดและวุ้นเส้นและศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต 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., Jäger, 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 โดยเลี้ยงในอาหารที่เป็นน้ำทั้งมีสตาร์คและกากโปรตีนถั่วเขียวจากการผลิตวุ้นเส้น		มีสตาร์คและวุ้นเส้น
4.สกัดและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแซนโทราฟิลล์และ/หรือแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด โดยอาศัยเทคนิคพื้นฐาน คือ โครมาโทกราฟีผิวน้ำบาง(Thin-layer chromatography, UV-Visible spectrophotography และ High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเทียบกับสารมาตรฐานแซนโทราฟิลล์และแคโรทีนอยด์	4.ทราบชนิดของสารกลุ่มแซนโทราฟิลล์ที่ผลิตจากเชื้อ <i>X. dendrorhous</i> และทราบปริมาณที่แน่นอนในการผลิตสารของเชื้อนี้ในอาหารที่คัดเลือกแล้ว	4.สารกลุ่มแซนโทราฟิลล์ที่เชื้อจุลินทรีย์ <i>X. dendrorhous</i> ผลิตได้ในอาหารที่เตรียมได้จากวัตถุดิบจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมีสตาร์คและวุ้นเส้น คือ สารแอสทาแซนทินเป็นส่วนใหญ่และพบว่า มีปริมาณสูงถึง 90-92 เปอร์เซ็นต์ของสารแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ทั้งหมด
5.ศึกษาและค้นหาวีธีในการเพิ่มการผลิตสารกลุ่มแซนโทราฟิลล์และ/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 Martín [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

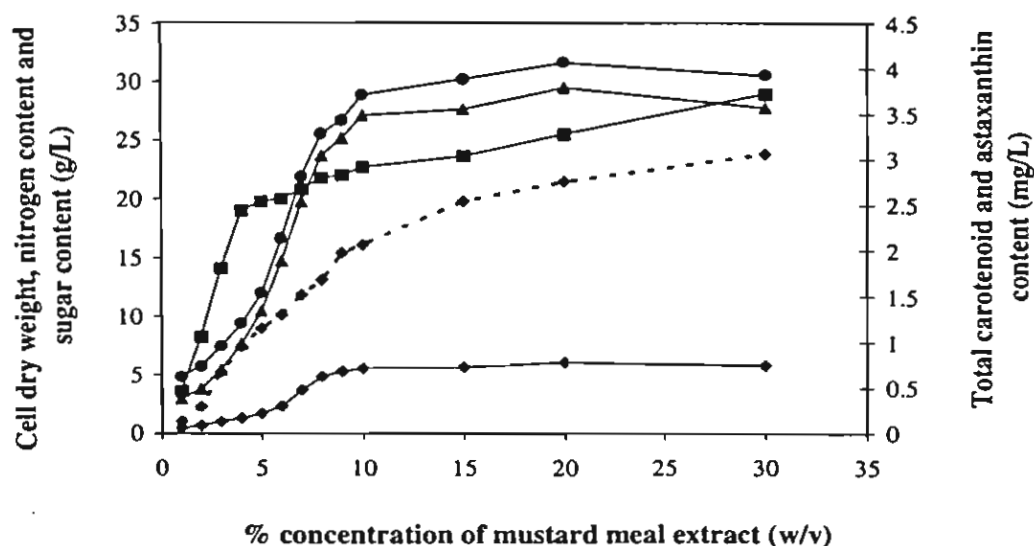


Figure 1. The effect of different concentrations of mustard meal in un-hydrolyzed mustard meal media on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out at 20°C, pH 5.0 with a shaking rate of 200 rpm for 120 h. Cell dry weight (♦), total carotenoid content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

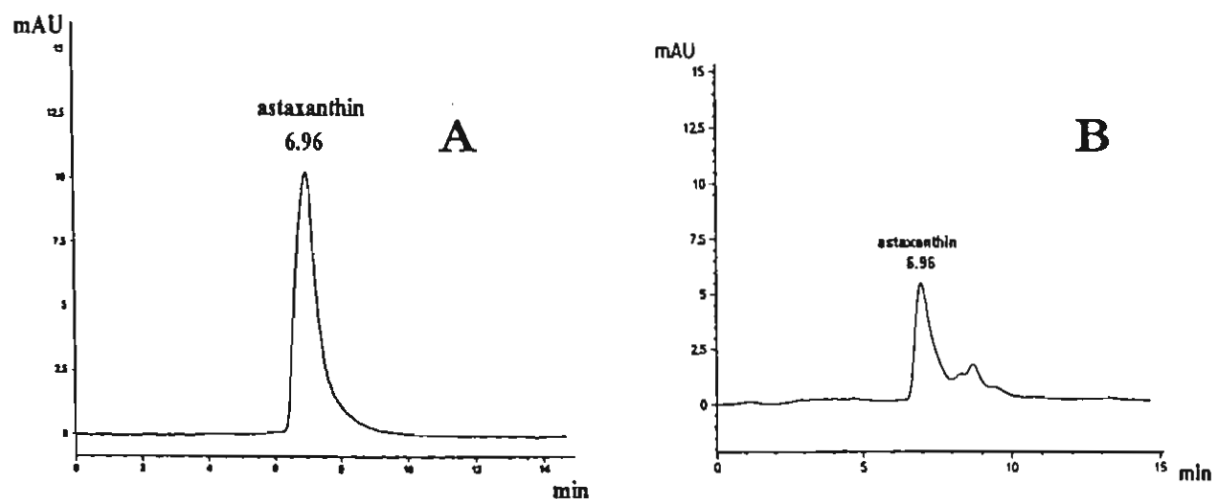


Figure 2. HPLC chromatograms of standard astaxanthin (A) and carotenoids from *X. dendrorhous* cultured in un-hydrolyzed mustard meal media (B). Condition: Microsorb-MV C₁₈ column; flow rate, 0.5 mL/min; acetonitrile/methanol (90:10 v/v); detection, 450 nm. Astaxanthin eluted at 6.96 min.

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

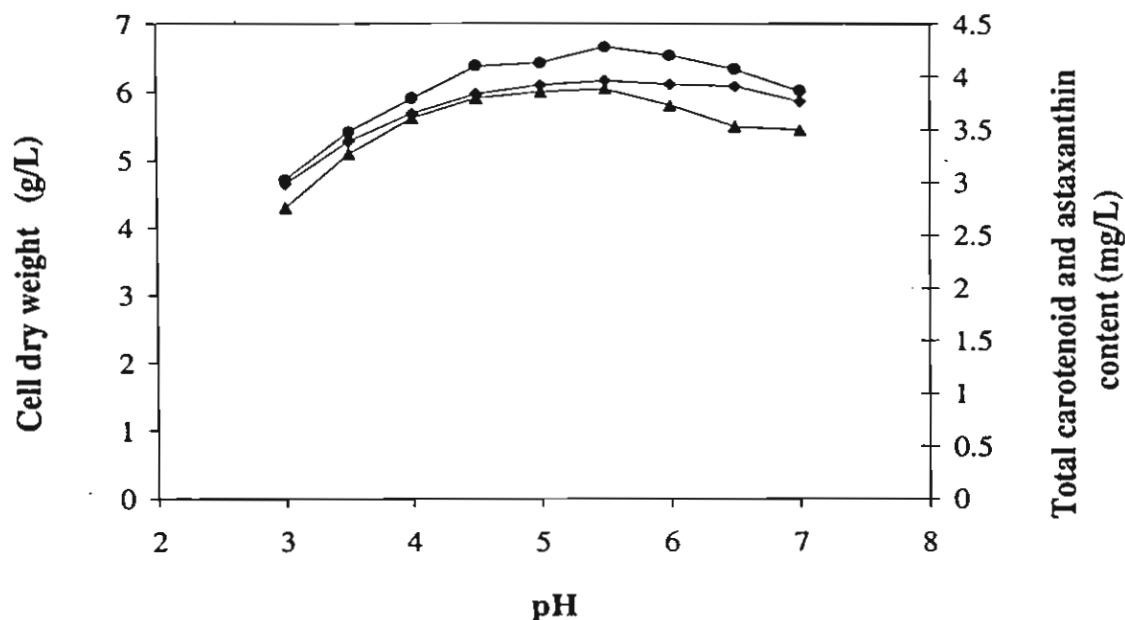


Figure 3. The effect of pH on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out in 20% w/v of un-hydrolyzed mustard meal media at 20°C with a shaking rate of 200 rpm for 120 h. Cell dry weight (♦), total carotenoid content (●), astaxanthin content (▲).

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

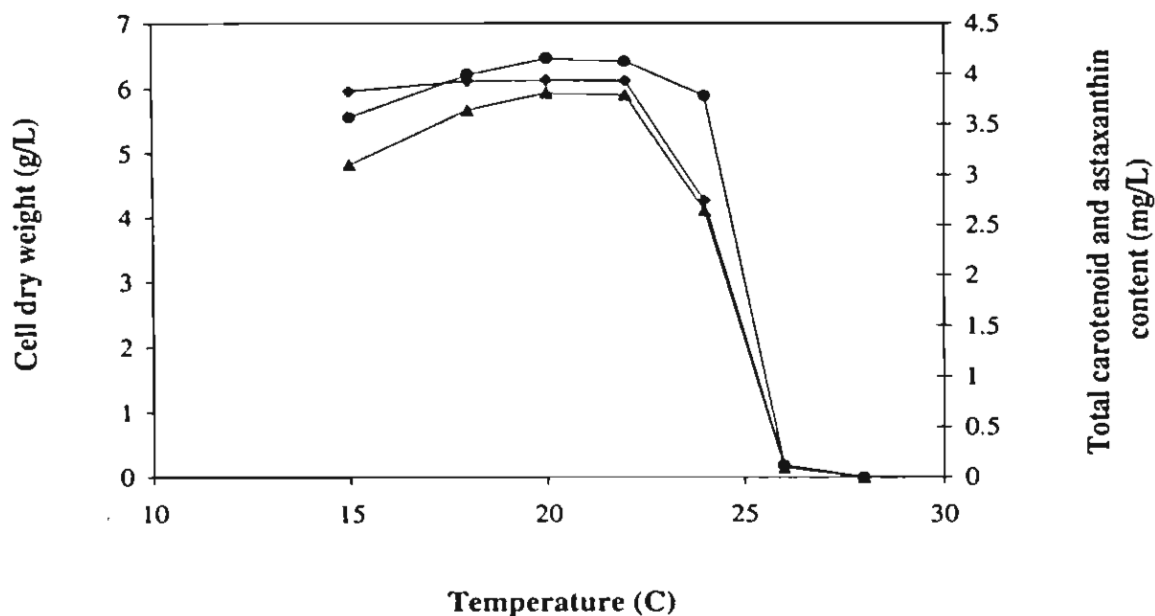


Figure 4. The effect of temperature on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out in 20% w/v un-hydrolyzed mustard meal media at pH 5.0 with a shaking rate of 200 rpm for 120 h. Cell dry weight (◆), total carotenoid content (●), astaxanthin content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

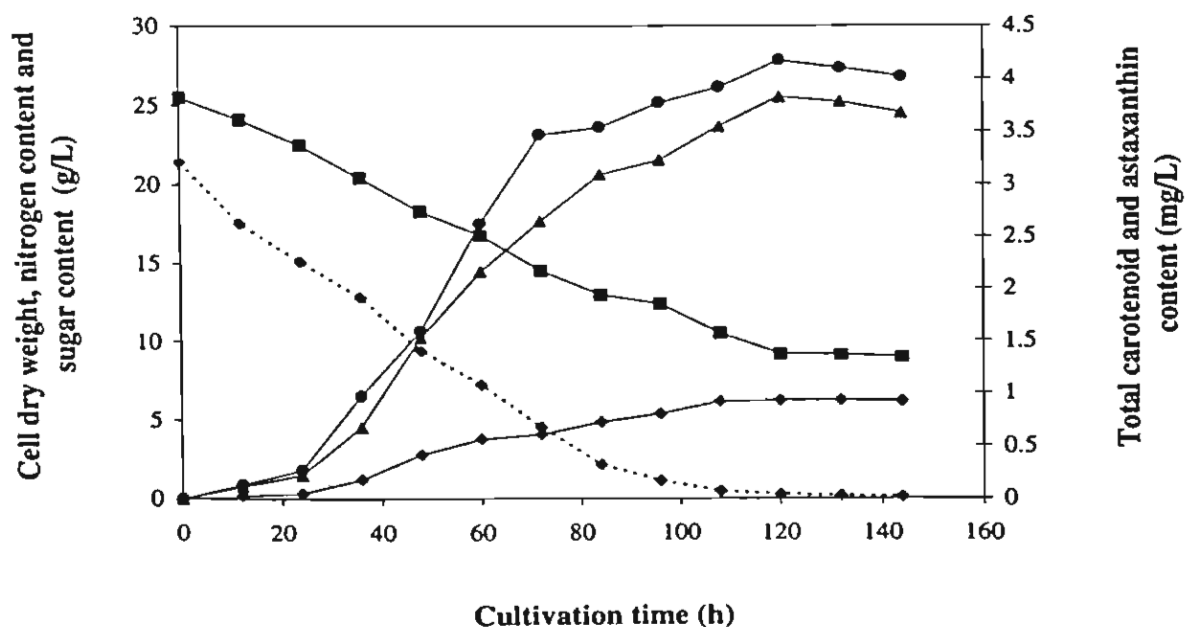


Figure 5. The effect of cultivation time on the growth of *X. dendrorhous* and its production of carotenoids. Experiments were carried out in 20% w/v mustard meal extract at 20°C, pH 5.0 with a shaking rate of 200 rpm. Cell dry weight (◆), total carotenoid content (●), astaxanthin content (▲), nitrogen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

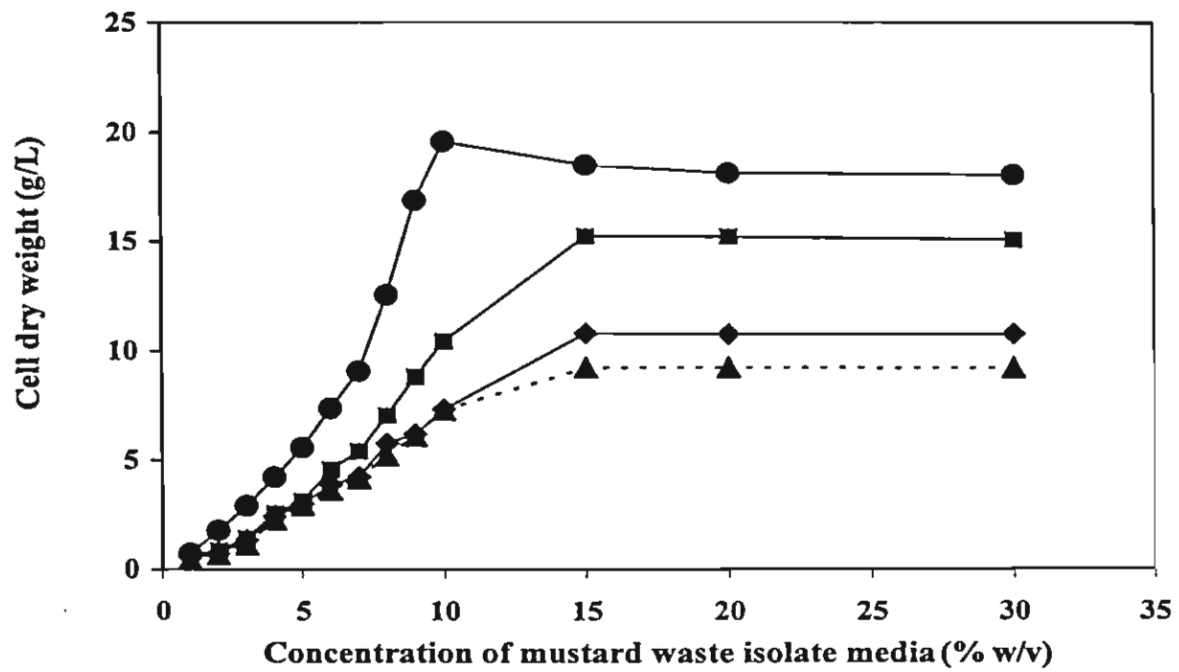


Figure 1 Cell dry weight (g/L) of *X. dendrorhous* TISTR 5730 cultured in mustard waste isolate media at different concentrations under optimal conditions: 20°C, pH 5.5, 200 rpm for 120 h. (▲ = MRIE, ♦ = MRIH, ■ = MPIE and ● = MPIH)

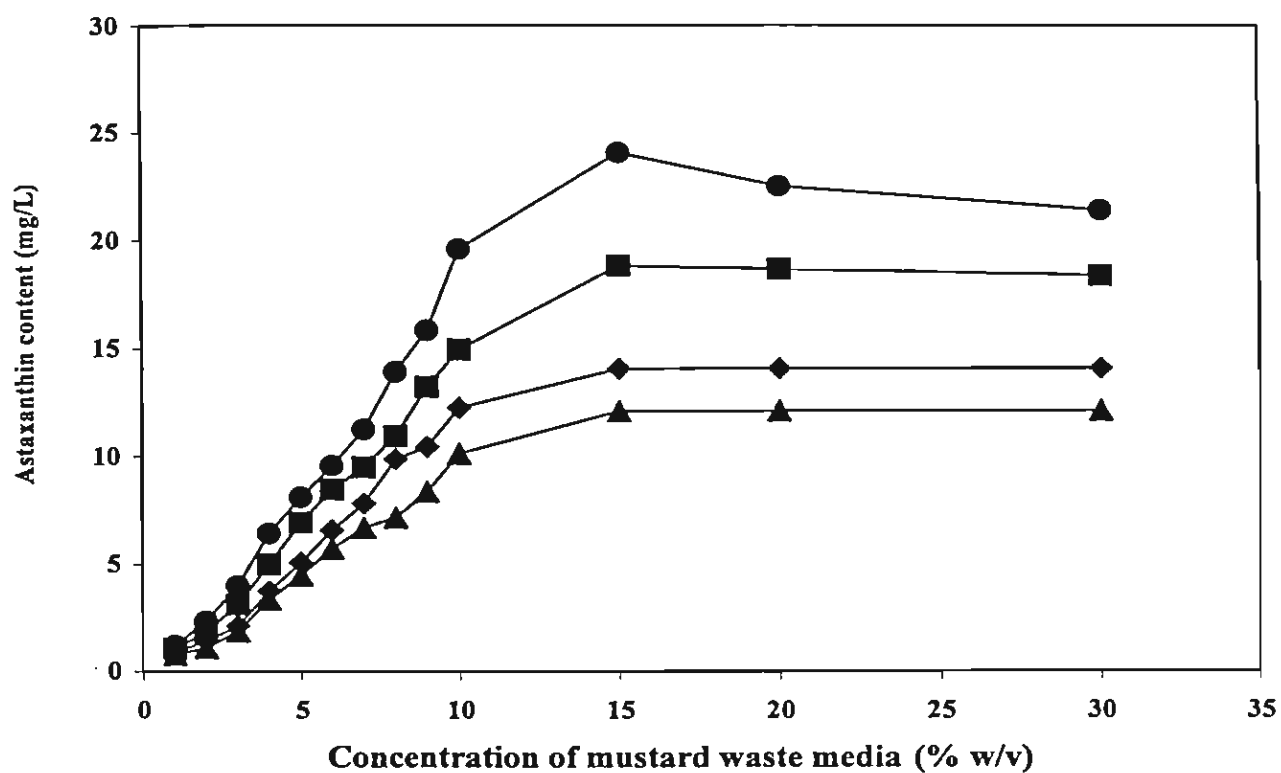


Figure 2 Astaxanthin content (mg/L) by *X.dendrorhous* TISTR 5730 cultured in mustard waste isolate media at different concentrations under optimal conditions: 20°C, pH 5.5, 200 rpm for 120 h. (▲ = MRIE, ♦ = MRIH, ■ = MPIE and ● = MPIH)

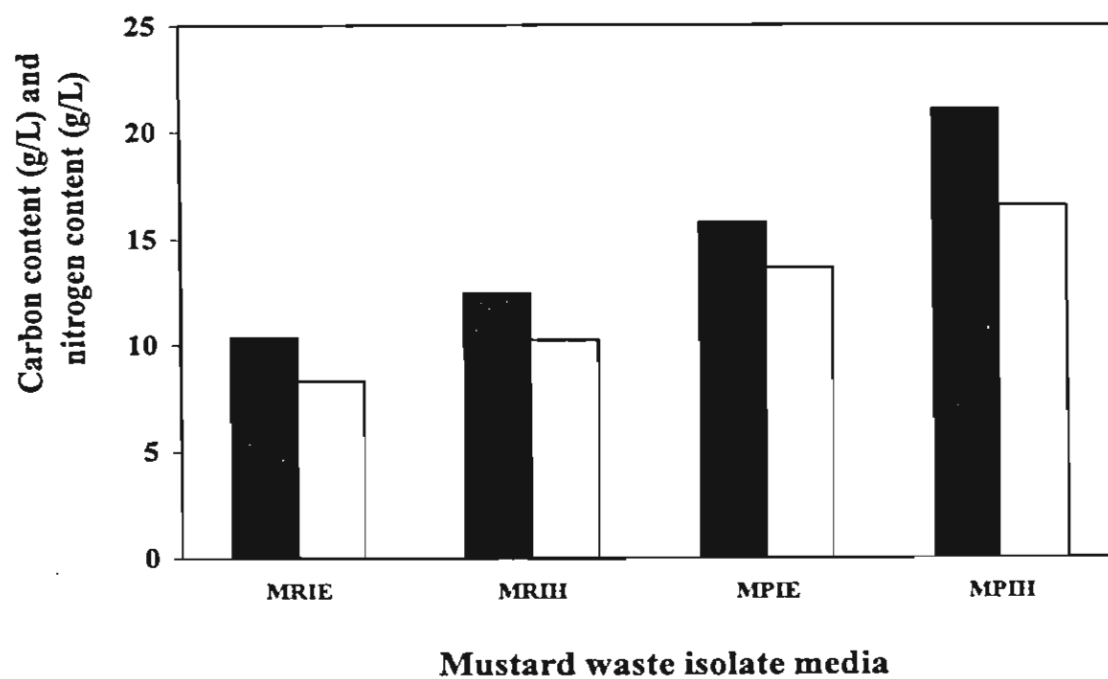


Figure 3 Carbon and nitrogen contents at 10% w/v of mustard waste isolate media. (■ = carbon content and □ = nitrogen content)

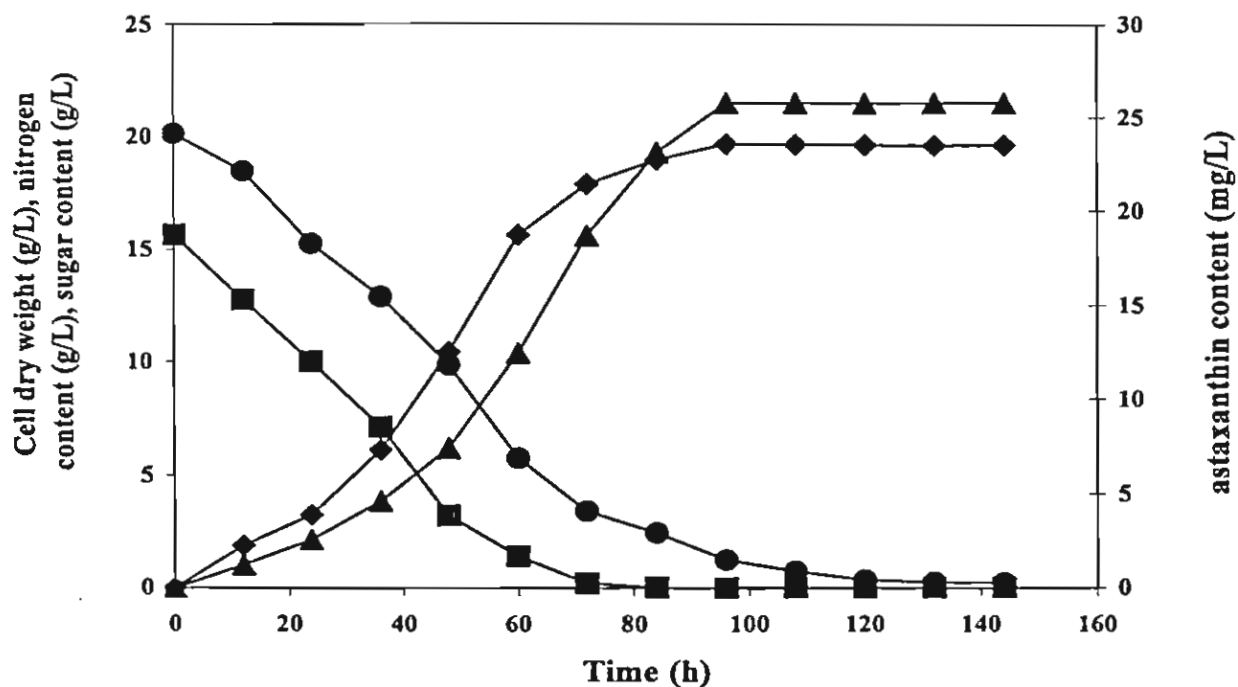


Figure 3 Time-course of the growth and production of astaxanthin by *X. dendrorhous* in 10% (w/v) of MPIH media. Experiments were carried out at 20°C and initial pH 5.5. (♦ = Cell dry weight; ▲ = astaxanthin content; ● = sugar content and ■ = nitrogen content)

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

