สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous*: ศึกษาความสามารถของเอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยสลายผนังเซลล์

นางสาวทันยธร เขตต์สุพรรณ

นางสาวศิริวรรณ แซ่เล้า

วท
ท351ค
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72588
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

.b 11769749
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Extractability of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous*: Effect of glucanase on cell wall disruption

Thanyathon Khaetsuphan

Siriwan Saelao

A Special Project Submitted in Partial of the Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technolofy Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง	ความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* :ศึกษาความสามารถของเอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยสลายผนังเซลล์
นักศึกษา	นางสาวทันยธร เขตต์สุพรรณ
	นางสาวศิริวรรณ แซ่เล้า
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิดาภา ทิน้อย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ	อาจารย์ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	
กรรมการ	ดร. จิดาภา ทิน้อย	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง ความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* : ศึกษาความสามารถของเอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยสลายผนังเซลล์

นักศึกษา นางสาวทันยธร เขตต์สุพรรณ

นางสาวศิริวรรณ แซ่เล้า

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. จิดาภา ทิน้อย

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* มีการเจริญเติบโตได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.2650 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง โดยปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 417.2 ไมโครกรัมกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง นอกจากนี้ได้ศึกษาความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ด้วยการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus circulans* ซึ่งมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสเท่ากับ 0.1306 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ได้มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนส 1 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จะได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 342.69 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดด้วยวิธี DMSO พบว่ามีค่าเท่ากับ 433.330 ไมโครกรัม จะได้ว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* คิดเป็น 79 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธี DMSO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project name Extractability of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* :Effect of glucanase on cell wall disruption

Name Miss Thanyathon Khaetsuphan

Miss Siriwan Saelao

Department Applied Biology

Program Industrial Microbiology

Academic year 2006

Special project adviser Dr. Jidapha Tinoi

Abstract

The growth and astaxanthin production of *Xanthohyllomyces dendrorhous* were investigated at 20 °C and agitation rate of 200 rpm in YM medium. The cell dry weight and astaxanthin content of 417.2 µg/L were highest at 72 h and 84 h of cultivation time, of 6.265 g/L respectively. The astaxanthin extraction of *X. dendrorhous* by cell wall disruption by glucanase activity was then carried out. Glucanase was produced by *Bacillus circulans* and glucanase activity was 0.1306 U/mL. The optimal condition for astaxanthin extraction by glucanase was *X. dendrorhous* concentration of 5 mg/mL glucanase 1 mL, temperature 40 °C and incubationtime 25 min.The optimal astaxanthin content was 342.69 µg/L dry cell weight. The efficiency of astaxanthin extraction from *X. dendrorhous* by glucanase activity was 79% when compared to DMSO extraction (433.33 µg/L dry cell weight).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. จิดาภา ทิน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษนี้ ซึ่งได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในการแก้ปัญหาและความอนุเคราะห์ต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานคณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้ดูแลและให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำ และได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษนี้นี้

ขอขอบพระคุณ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่ได้ให้ความกรุณาเอื้อเฟื้อและสอนวิธีการใช้เครื่องโฮโมจิไนเซอร์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอนและให้ความรู้ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณประสิทธิ์ แผ้วบาง คุณพงษ์ศักดิ์ ประสานศักดิ์ คุณอนิทัต ทองจันทร์ และคุณเอกภพ ภาเรือง ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ ในการทำโครงงานพิเศษ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่ในการทำโครงงานพิเศษจนบรรลุไปได้ด้วยดี

นางสาวทันยธร เขตต์สุพรรณ
นางสาวศิริวรรณ แซ่เล้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin)	3
2.1.1 การสังเคราะห์แอสตาแซนทิน (astaxanthin biosynthesis)	3
2.1.2 สมบัติทั่วไปของสารแอสตาแซนทิน	7
2.1.3 บทบาทและความสำคัญของสารแอสตาแซนทินในอุตสาหกรรมต่าง	7
2.1.4 แหล่งที่พบสารแอสตาแซนทิน	8
2.1.5 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous*	9
2.1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*	13
2.2 เอนไซม์กลูคาเนส (Glucanase)	16
2.2.1 ชนิดของเอนไซม์กลูคาเนส	16
2.2.2 การจำเพาะของเอนไซม์กลูคาเนสต่อสารตั้งต้น	16
2.2.3 แหล่งผลิตเอนไซม์กลูคาเนส	17
2.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ เอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยสลายผนังเซลล์	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	21
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	21
3.2.1 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์	21
3.2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	21
3.3 สารเคมี	21
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์	22
3.5 วิธีการทดลอง	22
3.5.1 การผลิตสารแอสตาแซนทิน	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* 24
3.5.3 การสกัดสารแอสตาแซนทินจากเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* 26
บทที่ 4 ผลการทดลอง 28
4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* 28
4.1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* 28
4.1.2 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* 28
4.1.3 ปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดจาก *X. dendrorhous* ด้วยวิธี DMSO extraction 30
4.2 การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B.circulans* 30
4.3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B.circulans* 30
4.3.1 ปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B.circulans* 30
4.3.2 ปริมาณของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* 32
4.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทิน จากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* 34
4.3.4 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทิน จากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* 36
4.3.5 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เมื่อใช้เอนไซม์กลูคาเนสเทียบกับการสกัดด้วยวิธี DMSO extraction 37
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 38
5.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยเชื้อ *X. dendrorhous* 38
5.2 การสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* 39
เอกสารอ้างอิง 41
ภาคผนวก ก 45
ภาคผนวก ข 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene, เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มแซนโทฟิลล์บางชนิด	4
2	ขั้นตอนการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากกรดเมวาโลนิก	5
3	การสังเคราะห์แอสตาแซนทินแบบ ซิสและทรานส์	6
4	โคโลนีของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*	9
5	เซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous*	10
6	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *X. dendrorhous* ที่เวลาต่าง ๆ กัน	29
7	ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*	29
8	แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.circulans*	32
9	ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* ที่แตกต่างกัน	33
10	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*	35
11	เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.circulans*	31
2	ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous*	33
3	อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*	35
4	เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

สารแอสตาแซนทิน (Astaxanthin) หรือเรียกว่า 3, 3'-dihydroxy - β, β - carotene-4, 4'- dione เป็นรงควัตถุที่มีสีส้ม แดง และชมพู สารแอสตาแซนทินจัดอยู่ในกลุ่มแซนโทรฟิลล์ ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของสารสีแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สารแอสตาแซนทินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และได้มีการประยุกต์ใช้สารแอสตาแซนทินอย่างกว้างขวาง ในทางการแพทย์เนื่องจากสารแอสตาแซนทินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีการประยุกต์ใช้ในการต้านโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ทางด้านเภสัชกรรมใช้เป็นส่วนผสมของยา วิตามิน ทางด้านอาหาร ได้มีการประยุกต์ไปใช้ในอาหารพวก เบเกอรี่ ลูกอม และเนยต่าง ๆ (Østerlie, 1999) และได้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอาหารสำหรับปลาแซลมอน ปลาเทราท์ กุ้งมังกร ไข่ไก่ เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารและเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ด้วย (Johnson และคณะ, 1980)

สำหรับการผลิตสารแอสตาแซนทิน พบว่าสารแอสตาแซนทินสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น สาหร่าย *Haematococcus pulvalis* (Johnson และคณะ, 1995),*Neochloris wimmrri* (Bubrik, 1991) เชื้อราที่สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ ได้แก่ *Peniophora* spp. (Goodwin ,1980) นอกจากนี้ยังมีการวิจัยว่าเชื้อ *E. coli* สามารถสร้างสารแอสตาแซนทินได้โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของยีนจากเชื้อ archaebacterium ที่มีชื่อว่า *Archaeoglobus fulgidus* (Wang และคณะ, 2006) สารแอสตาแซนทินสามารถผลิตได้จากเชื้อยีสต์ เช่น *Xanthophyllomyces dendrorhous* ชื่อเดิมคือ *Phaffia rhodozyma* จากการศึกษาพบว่า *X. dendrorhous* เป็นเชื้อยีสต์ที่มีสีแดงที่สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้มากถึงร้อยละ 80-90 ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่เชื้อผลิตได้ ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* พบว่ามีข้อจำกัดคือ ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ในสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) สามารถผลิตได้ในปริมาณที่น้อยมาก 200-300 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์ (Johnson, 1995) และนอกจากนี้ผนังเซลล์ของเชื้อยังมีความหนาและเหนียวมาก เนื่องจากประกอบด้วยกลูแคน (glucan) ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ของกลูโคสซึ่งมีมวลโมเลกุลสูง ทำให้ยากต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ ทำให้ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีปริมาณต่ำ จึงเป็นข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้เซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินในทางอุตสาหกรรม

ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่า สามารถเพิ่มการผลิตสารได้มากกว่าเดิม 2-5 เท่า และได้มีการศึกษาโดยการเติมสารเหนี่ยวนำ เช่น antimycin และ nitrosoguanidine derivative ให้กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin)

สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) หรือเรียกว่า 3, 3'-dihydroxy - β, β – carotene - 4, 4'- dione จัดอยู่ในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์จัดเป็น keto-carotenoid โดย สารแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุของสิ่งมีชีวิตที่พบในธรรมชาติแพร่หลายมากที่สุดทั้งในพืชและสัตว์ โดยสารแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลืองถึงแดง โมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอมประกอบด้วยหมู่ไอโซพรีน (isoprene group) 8 หมู่ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่ โดยโครงสร้างหลักประกอบด้วย acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene (รูปที่ 1) โดยสมบัติการดูดกลืนแสงของสารแคโรทีนอยด์ขึ้นอยู่กับสายของ conjugated double bond ที่ทำหน้าที่เสมือน โครโมฟอร์ (chromophore) สารกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ carotene ซึ่งเป็นโมเลกุลของ acylclic $C_{40}H_{56}$ carotene ที่ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน โดยคาร์บอนเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเดี่ยวสลับพันธะคู่ และที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างจะมีอะตอมของคาร์บอนเกาะกันเป็นวงเรียก วงแหวนไอโอโนน (ionone ring) ตัวอย่างเช่น เบต้าแคโรทีน (β-carotene) (รูปที่ 1) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โมเลกุลประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และมีการเพิ่มอนุพันธุ์ของออกซิเจนเป็นองค์ประกอบของแคโรทีนด้วย เช่น ไฮดรอกซี (-OH) คีโตน (-C=O) อัลดีไฮด์ (-CHO) คาร์บอกซี (-COOH) หรือ อีพอกไซด์ (epoxide group) ตัวอย่าง ได้แก่ เอคไคนีโนน (echinenone) แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) และสารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น

2.1.1 การสังเคราะห์สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin biosynthesis)

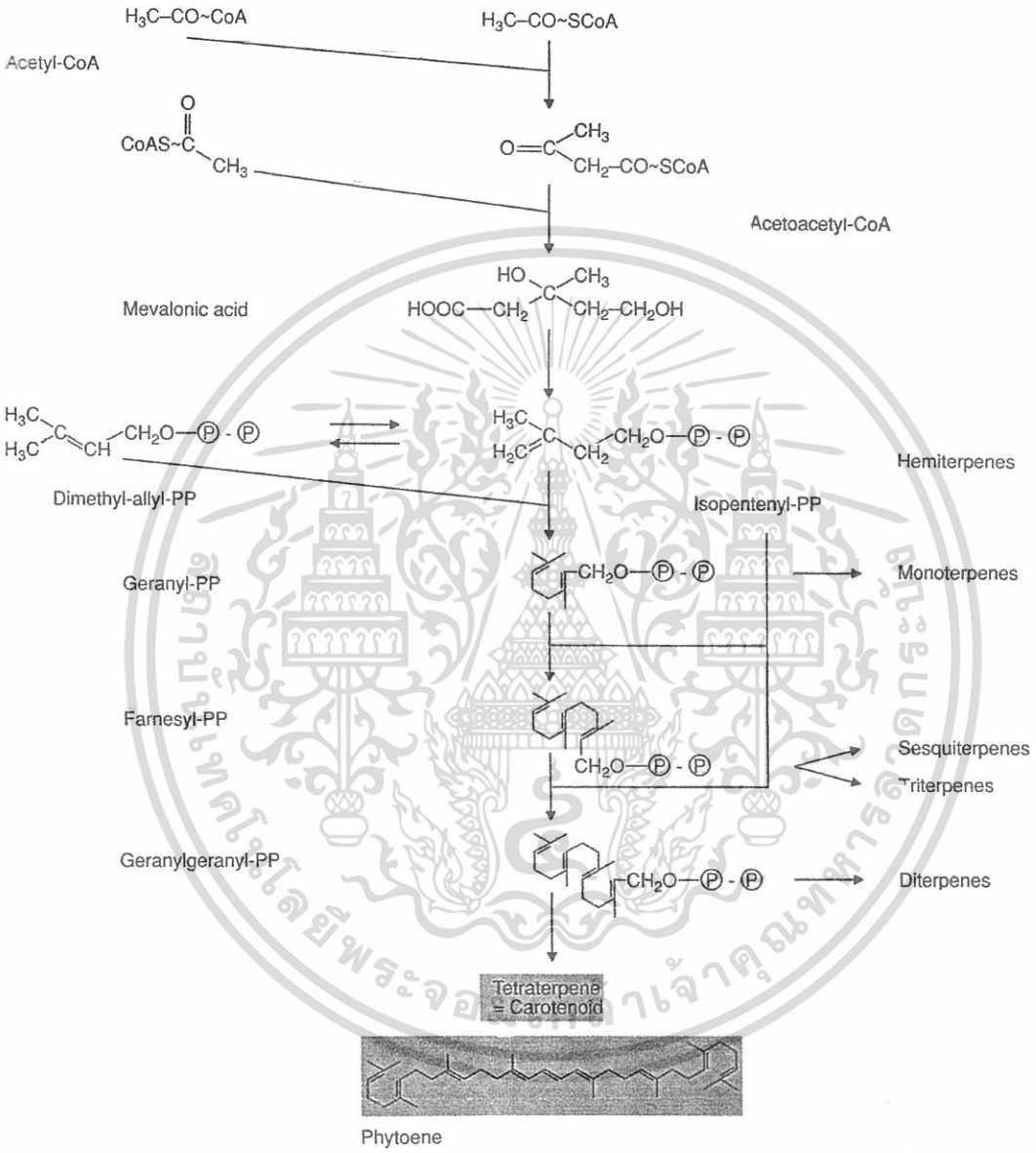
การสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินเกิดขึ้นผ่านการสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์โดยทั่วไป สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid, MVA) จากนั้นมีการรวมตัว (condensation) หัวท้ายของไอโซปรีนไอโซเมอร์ 2 ไอโซเมอร์ของไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต (isopentenyl pyrophosphate, IPP) และไดเมธิลแอลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethyl allyl pyrophosphate, DMAPP) เพื่อเกิดเป็นเจอรานีลไพโรฟอสเฟต (geranyl pyrophosphate, GPP) ฟาร์เนซิลไพโรฟอสเฟต (farnesylpyrophosphate, FPP) และ C_{20} เทอร์ปีนอยด์ เจอรานีลเจอรานีลไพโรฟอสเฟต (C_{20} terpenoid geranylgeranyl pyrophoaphate, GGPP) ตามลำดับ หลังจากนั้นมีการรวมตัวด้านท้ายของ 2 โมเลกุลของ GGPP เกิดเป็น prephytoene pyrophosphate, PPPP และเปลี่ยนเป็นไฟโทอีน (phytoene) หลังเกิดปฏิกิริยาการนำไฮโดรเจนออก (dehydrogenation) 4 ขั้นตอนจะได้สารไลโคปีน (lycopene) และต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dehydrogenation, cyclization, oxidation และ hydroxylation เป็นต้น (รูปที่ 2) จนสุดท้ายได้สารแอสตาแซนทินที่มีโครงสร้างแบบ trans-astaxanthin และ cis-astaxanthin ดังแสดงในรูปที่ 3

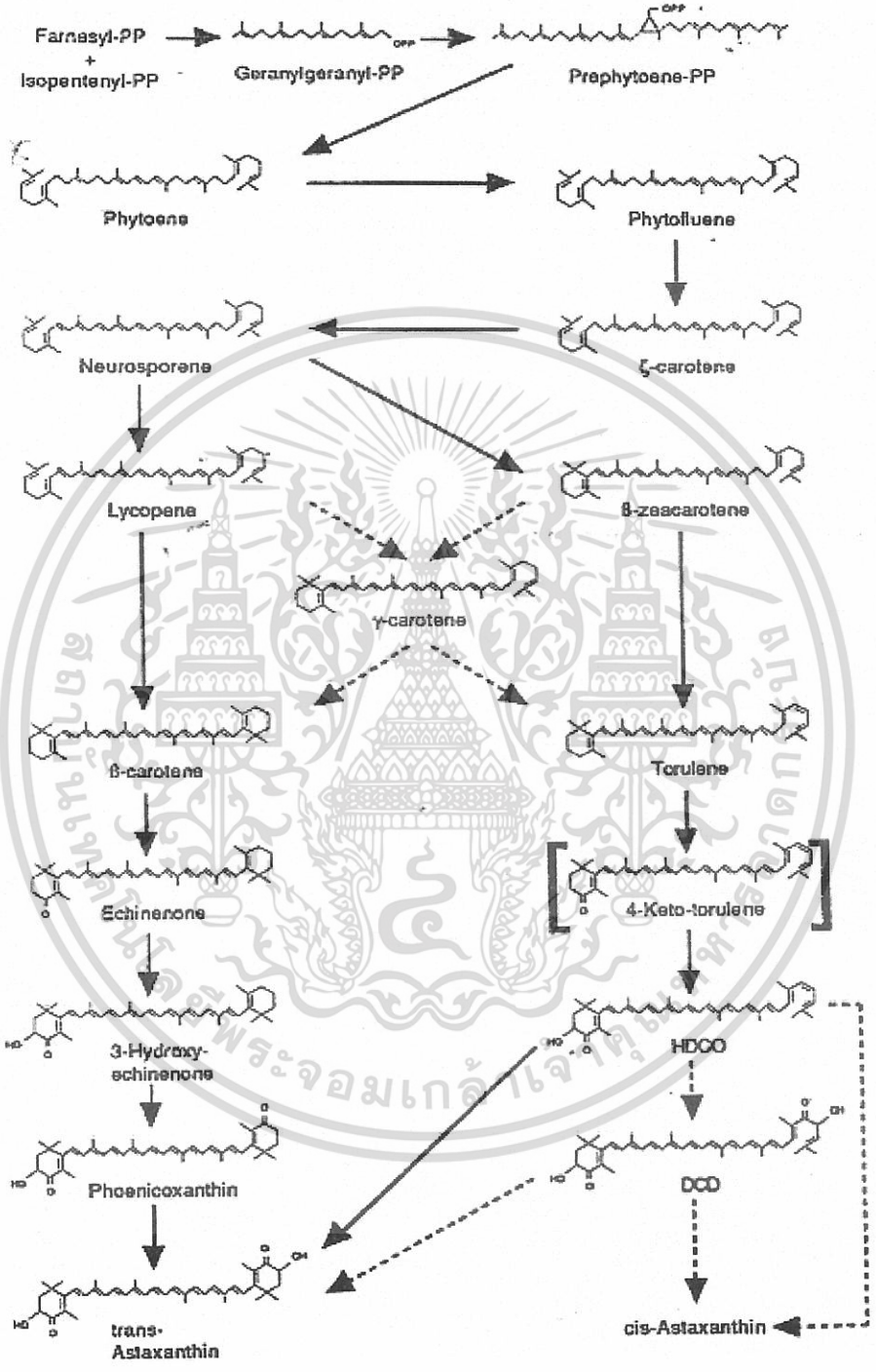
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene, เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มแซนโทฟิลล์บางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากกรดเมวาโลนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงการสังเคราะห์แอสตาแซนทินแบบซิสและทรานส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 สมบัติทั่วไปของสารแอสตาแซนทิน

คุณสมบัติของสารแอสตาแซนทินและสารแคโรทีนอยด์โดยทั่วไป เนื่องจากสารแอสตาแซนทินจัดเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทไขมันสามารถละลายได้ในไขมันและตัวทำละลายไขมัน (lipids solvent) เช่น อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ (alcohol) ไดเอธิลอีเทอร์ (diethylether) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) นอกจากนี้ยังสามารถละลายได้ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane)

จากโครงสร้างของสารแอสตาแซนทินทั่วไปมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล ทำให้สารแอสตาแซนทินเกิดสารสีชนิดต่าง ๆ เช่น สีเหลือง ส้ม และแดง ซึ่งมีสภาวะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องโดยเป็นรูปผลึกที่มีรูปร่างชนิดต่าง ๆ และโครงสร้างของโมเลกุลที่เป็นพันธะคู่ทำให้สารแอสตาแซนทินถูกทำให้เสียสภาพและมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ในสภาพที่มีแสงและอากาศ โดยแสงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของซิสและทรานส์ของพันธะคู่ (cis-trans double bonds) ทำให้เปลี่ยนช่วงการดูดกลืนแสงและทำให้สีของสารแคโรทีนอยด์เปลี่ยน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาสารแคโรทีนอยด์ในตัวทำละลายบริสุทธิ์ บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท และสภาวะแวดล้อมเป็นสุญญากาศหรือก๊าซเฉื่อย บริเวณที่ปราศจากแสงและอุณหภูมิต่ำหรือใช้สารต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อช่วยให้แคโรทีนอยด์มีความเสถียรสูงขึ้น

2.1.3 บทบาทและความสำคัญของสารแอสตาแซนทินในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

สารแอสตาแซนทินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยยับยั้งการเกิดเนื้องอกในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง สารแอสตาแซนทินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพใช้ในการรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ ต่อต้านการอักเสบ และช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงได้มีการนำสารแอสตาแซนทินไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรมรวมถึงการผลิตเครื่องสำอางค์นอกจากนี้สารแอสตาแซนทินยังช่วยในการป้องกันปฏิกริยาออกซิเดชันของไขมันด้วย

เนื่องจากสารแอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุที่มีสีแดง ส้ม และ ชมพู ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับมนุษย์ คือ การนำมาใช้เป็นสารสีผสมอาหาร (food colorants) ซึ่งสารแอสตาแซนทินที่เป็นที่ต้องการของตลาดการค้าสำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร คือ สีส้ม และสีแดง โดยส่วนใหญ่ผสมในเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ใช้แต่งสีขนมเค้ก และคุกกี้ รวมทั้งลูกอมและไอศกรีม เป็นต้น(Østerlie,1999) ส่วนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ จะใช้ผสมในอาหารสัตว์ เช่น อาหารปลา อาหารสุกร อาหารโค รวมทั้งอาหารสัตว์ปีก ซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้มีสีสันเป็นที่น่าสนใจต่อการบริโภค สารแอสตาแซนทินเป็นสารที่ให้ผลดีต่อสัตว์ เช่น ไก่ที่เลี้ยงเป็นการค้าจะมีการเติมสารแอสตาแซนทินลงไปเพื่อเพิ่มสีในไข่แดง เพิ่มการสร้างไข่ของไก่ เพิ่มการเจริญของลูกไก่และลดการตายเนื่องจากการติดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในถุงไข่แดง (yolk sac) ช่วยให้สีของไข่แดงและเนื้อของสัตว์ปีกมีสีเหลืองทอง เป็นต้น นอกจากนี้ได้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอาหารสำหรับปลาแซลมอน (salmon) ปลาเทราท์ (trout) กุ้งมังกร เพื่อให้มีสีชมพู (Johnson และคณะ, 1980) เมื่อเติมเซลล์ของ *Phaffia rhodozyma* ที่ทำให้แตกลงในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาเทราท์ ปลาแซลมอน สารแอสตาแซนทินจะถูกดูดซับที่บริเวณลำไส้ ทำให้ปลาแซลมอนนั้นมีสีชมพูสด เพิ่มความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อของแซลมอน

2.1.4 แหล่งที่พบสารแอสตาแซนทิน

เนื่องจากสารแอสตาแซนทินสามารถผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี ตามความต้องการของตลาดเมื่อช่วงต้นทศวรรษที่ 19 มีมูลค่าเท่ากับ 60-100 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี และได้ประเมินว่าในปี ค.ศ. 2000 ตลาดมีความต้องการสารแอสตาแซนทินและแคนทาแซนทินสูงถึง 455 ล้านเหรียญสหรัฐ แต่อย่างไรก็ตามสารแอสตาแซนทินที่สังเคราะห์ทางเคมีไม่เหมือนกับที่ผลิตได้จากธรรมชาติคือมีความคงตัว กิจกรรม และการดูดซับที่ต่ำกว่าที่พบในธรรมชาติ สำหรับสารแอสตาแซนทินในธรรมชาติแยกได้ครั้งแรกจากกุ้งลอบสเตอร์ (Lobster) ต่อมาพบว่าสารต่าง ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีมีการผลิตลดน้อยลง เนื่องจากผู้บริโภคได้ให้การยอมรับและสนใจสารที่ผลิตได้จากทางธรรมชาติ เนื่องจากมีความปลอด ภัยมากกว่า มีรายงานว่าสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น จากเดิม 8 เปอร์เซ็นต์ในปี 1992 เป็น 16 เปอร์เซนต์ในปี 1996 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากธรรมชาติโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์พบว่า สามารถผลิตสารในปริมาณสูงได้ โดยสามารถขยายปริมาณการผลิตให้ใหญ่ขึ้น

จากการศึกษาพบว่า สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มีสารแอสตาแซนทินอยู่ในรูปของเอสเทอร์ ซึ่งจะมีความคงตัวมากกว่าแอสตาแซนทินอิสระ สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้เป็นปริมาณมากแต่มีข้อจำกัดในเรื่องการเจริญคือมีการเจริญเติบโตช้า สารแอสตาแซนทินสะสมอยู่ในสาหร่ายชนิดนี้ในระดับสูง สามารถเพาะเลี้ยงแบบ heterotroph สารอินทรีย์คาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส และวิตามิน ส่วนใหญ่จะนิยมใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ไทอามีนเป็น growth factorนอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตสารแอสตาแซนทิน ด้วยเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* หรือชื่อเดิม *Phaffia rhodozyma* พบว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ประมาณ 80-92 เปอร์เซนต์ของสารแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ทั้งหมด ถึงแม้ว่า *X. dendrorhous* จะเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจสำหรับการผลิตสารแอสตาแซนทินเพื่อเป็นการค้า แต่สายพันธุ์ทั่วไปมักมีปริมาณสารแอสตาแซนทินต่ำ จึงมีความพยายามที่จะเพิ่มผลผลิตสารแอสตาแซนทิน ทั้งโดยวิธีปรับปรุงพันธุ์ของยีสต์ชนิดนี้และมีการปรับปรุงสารตั้งต้นที่เหมาะสมและมีราคาถูกเพื่อใช้สำหรับการผลิต ตลอดจนการเลือกกระบวนการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อชนิดนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous*

2.1.5.1 ลักษณะของเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Phaffia rhodozyma หรือ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่ม basidiomycetous เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติของผนังเซลล์ รูปแบบของการแตกหน่อ การสร้างสารสี และคุณสมบัติทางด้านเมทาบอลิก *X. dendrorhous* มีลักษณะการสร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) แบบโฮโลเบสิเดียม (holobasidium) จากเส้นใยที่มีสองนิวเคลียสโดยตรง และไม่สร้างเทลิสปอร์ (telispore) และมีการแตกหน่อเป็นแบบเอนเทอโรบลาสติก (enteroblastic) คือ การแตกหน่อจะเกิดจากการมีรอยแยกบนผนังเซลล์ของเซลล์แม่ โดยที่ชั้นในของผนังเซลล์แม่ยื่นเจริญออกไปเพื่อสร้างชั้นนอกสุดของผนังของหน่อ และขาดออกจากเซลล์แม่หลังจากที่มีหน่อจำนวนมากเกิดที่บริเวณเดียวกันตำแหน่งที่สร้างหน่อบนเซลล์แม่จะล้อมรอบด้วยคอลลา (colla) ราจำพวก basidiomycetous จะมีผนังเซลล์บาง ๆ แต่มีหลายชั้น ชั้นในมีหลายชั้นทั้งที่บางโปร่งและทึบแสง และชั้นนอกค่อนข้างกระจายและมีผนังกั้นเส้นใยเป็นรูปแบบธรรมดาที่มีผนังเซลล์ยื่นเข้าไปตรงกลางรู

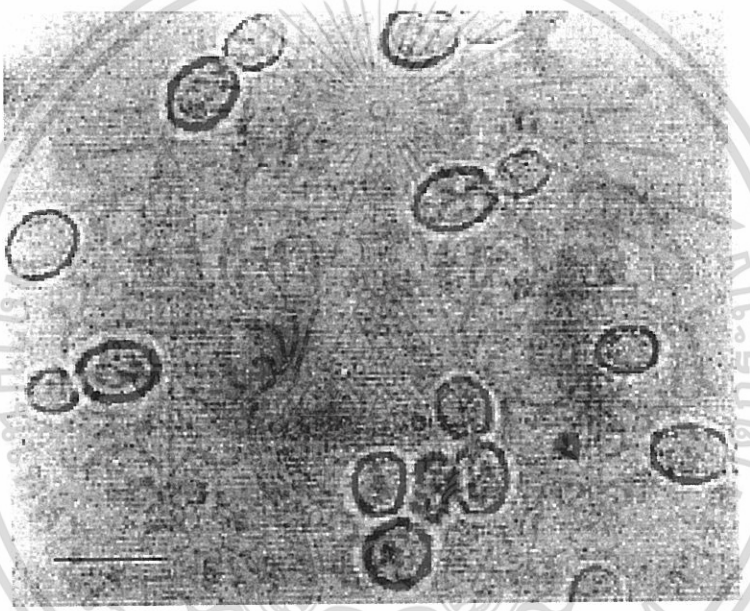
รูปที่ 4 โคโลนีของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*

2.1.5.2 รูปร่างและโครงสร้างภายในเซลล์ยีสต์

X. dendrorhous เป็นยีสต์ที่ส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ คือ กลม รี รูปไข่ สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายมะนาวฝรั่ง ผนังเซลล์ของยีสต์เป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรงเช่นเดียวกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ค่อนข้างหนาโดยมีความหนาประมาณ 100-200 นาโนเมตร และมีน้ำหนัก 10-25 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ประกอบด้วย โพลิแซคคาไรด์ประมาณ 80-90 เปอร์เซนต์ของผนังเซลล์ โดยมีกลูแคนซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสอยู่ด้านในผนังเซลล์ เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เกี่ยวกับการกำหนดรูปร่างและทำให้เซลล์คงรูปร่าง กลูแคนที่พบในผนังเซลล์ยีสต์มีสองชนิด คือ พอลิเมอร์ของ β-(1,3) และพอลิเมอร์ของ β-(1,6) นอกจากนี้พบส่วนประกอบที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแมนแนน (mannan) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นส่วนใหญ่อยู่ที่ด้านนอกของผนังเซลล์ แมนแนนทำหน้าที่ยึดเกาะส่วนประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์ให้คงอยู่ด้วยกัน ปกติจะเกาะอยู่กับโปรตีนโดยพันธะโควาเลนต์ (covalent) เรียกว่า แมนโนโปรตีน (mannoprotein) ขณะเดียวกันส่วนของผนังเซลล์ของยีสต์ยังพบไคติน (chitin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ เอ็น-แอซีทิลกลูโคซามีน (n-acetyl glucosamine) ที่ต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) มีปริมาณน้อย พบมากที่ผนังกั้นแยกหน่อออกจากเซลล์แม่และที่บริเวณรอยแผลจากการแตกหน่อและกระจายในผนังเซลล์ส่วนอื่น ๆ เล็กน้อย นอกจากโพลิแซคคาไรด์แล้วองค์ประกอบส่วนน้อยที่พบในผนังเซลล์ยีสต์ คือ โปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์ฟอสเฟต



รูปที่ 5 เซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous*

เนื่องจากสารแอสตาแซนทินเป็นสารที่ถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ *X. dendrorhous* ดังนั้นจะพบการสะสมของสารแอสตาแซนทินและสารแคโรทีนอยด์อื่น ๆ ภายในเซลล์ของยีสต์ โดยปริมาณสารที่มีการสะสมจะพบว่ามีการสะสมบริเวณไขมันโมเลกุลเล็ก ๆ (lipid globules) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) โดยมีการสังเคราะห์ที่บริเวณไมโตคอนเดรีย (mitochondria) แล้วนำไปสะสมที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยปริมาณการสะสมของสารแอสตาแซนทินจะแตกต่างกัน ในเซลล์ที่มีอายุน้อยจะมีการสะสมน้อยกว่าเซลล์ที่อายุมาก เนื่องจากเซลล์อายุน้อยจะมีปริมาณของโมเลกุลไขมันน้อยกว่าเซลล์ที่มีอายุมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารสีนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์

1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนจำเป็นอย่างยิ่งในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนใหญ่คาร์บอนใช้เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอนมีหลายประเภท เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน แอลกอฮอล์ เป็นต้น ตัวอย่างกลุ่มเคมีบริสุทธิ์ (chemical refined carbon sources) เช่น น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้วัตถุดิบธรรมชาติที่ให้คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้งจากข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง ถั่วลิสง กากน้ำตาลจากอ้อย แป้งที่ถูกไฮโดรไลซ์ เป็นต้น พบว่าการควบคุมการใช้คาร์บอนของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* จะมีผลต่อการสร้างสารแอสตาแซนทินในกระบวนการหมัก ส่วนมากการเติมน้ำตาลกลูโคสเข้าไปอย่างช้า ๆ นั้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากการหมักที่มีขีดจำกัดของยีสต์

2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์ของจุลินทรีย์นั้น มีความต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เพื่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้กันมาก คือ แอมโมเนีย หรือเกลือแอมโมเนียมและไนเตรต การเจริญเติบโตของเซลล์จะเร็วขึ้นหากใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นสารอินทรีย์เดี่ยว ๆ เช่น กรดอะมิโน สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาค่อนข้างสูง ส่วนแหล่งที่ราคาถูกจะเป็นถั่วเหลือง ถั่วลิสง ปลาป่น เนื้อป่น ข้าวมอลล์ สารสกัดยีสต์ หางนม เคซีน และโปรตีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นต้น

3 ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย

ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะสาร 2 ชนิดนี้รวมอยู่ในกระบวนการถ่ายโอนพลังงาน นอกจากนี้เหล็ก โคบอลต์ ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุที่ขาดไม่ได้ มักได้มากับน้ำหรือติดมากับสารตัวอื่น ๆ สารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น กรดอะมิโน หรือวิตามินอาจต้องเติมลงในอาหารเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าขาดเช่นกัน

4 ปัจจัยทางกายภาพ

4.1 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมความเป็นกรดเบส จะมีผลยับยั้งการผลิตสารแอสตาแซนทินดังนั้นการผลิตสารแอสตาแซนทินต้องกระทำในสภาพอาหารที่ไม่มีบัฟเฟอร์ (Goodwin ,1980) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและแอสพาราจีนที่มีค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.0เมื่อเชื้อเจริญจะมีผลให้ความเป็นกรดลดลง การลดค่าความเป็นกรดเบสอย่างรวดเร็วจะมีการผลิตแคโรทีนอยด์เกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน (Shlomai และคณะ, 1999)

4.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินพบว่ามีผลอย่างมาก เชื้อ *X. dendrorhous* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 22.5 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้ดีและผลิตสารแอสตาแซนทินได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส พบว่า ผลผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 22.5 องศาเซลเซียส ปริมาณสารแอสตาแซนทินของยีสต์จะคงที่อย่างเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิ 14 ถึง 26 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการศึกษาเพื่อผลิตสารสีชนิดนี้จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อนี้

4.3 แสง

แสงมีความสำคัญในการสร้างสารแอสตาแซนทินในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ในราหลายชนิด พบว่าแสงและปริมาณออกซิเจนมีบทบาทในการเป็นตัวชักนำในการสร้างสารแอสตาแซนทิน สำหรับการผลิตสารแอสตาแซนทินได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Phycomyces blakesleeanus* ในที่ไม่มีแสง พบว่าผลผลิตมีปริมาณพอสมควร แต่ถ้าใช้แสงกระตุ้นผลผลิตจะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารสีสารแอสตาแซนทินพบว่าแสงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง แต่การเลี้ยงเชื้อในที่ที่มีแสงนั้น ควรจะต้องควบคุมความเข้มของแสงให้พอเหมาะ ถ้าความเข้มของแสงมากเกินไป แสงอาจจะมีผลต่อสารสีที่ผลิตได้ โดยอาจทำให้เกิดการเสียสภาพหรือสูญสลายของสารสีได้ การเจริญและการสร้างรงควัตถุของ *X. dendrorhous* ถูกยับยั้งโดยแสงที่มีความเข้มสูงๆ การสร้างแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *X. dendrorhous* จะถูกชักนำเมื่อมีความเข้มแสงต่ำ ๆ แสงสีน้ำเงินจะชักนำให้เกิดการสร้างสารสีมากกว่าแสงสีแดง เหลือง หรือแสงสีเขียว เมื่อยีสต์นั้นเจริญบนอาหาร YM agar ที่อุณหภูมิ 7.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

4.4 การเจริญเติบโตและการสร้างรงควัตถุ

ในเชื้อ *X. dendrorhous* จะมีการสร้างสารแอสตาแซนทินระหว่างการเจริญแต่จะสร้างอย่างต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ถึงแม้ว่าจะหยุดเจริญแล้ว ในช่วงระยะการเจริญเติบโตเต็มที่เชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างสารแอสตาแซนทิน แต่กรณีที่อาหารมีปริมาณคาร์บอนอยู่เชื้อจะทำการย่อยสลายคาร์บอนให้เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรการเจริญ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอะซิติก ซึ่งจะไปกระตุ้นการสร้างแคโรทีนอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* อย่างกว้างขวาง รวมทั้งได้ศึกษาแหล่งของอาหารต่าง ๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นอาหารหรือสับสเตรท ของเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งได้มีการศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์จากเชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* หรือ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยศึกษาผลของออกซิเจนและปริมาณกลูโคสที่มีผลต่อการผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium (yeast extract/malt extract medium) ที่มีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 12.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 1.13 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yamane และคณะ, 1997) และการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการเลี้ยงในอาหารที่เป็น alfalfa residue juice ซึ่งมีปริมาณคาร์บอนรวม 25 กรัมต่อลิตรและปริมาณไนโตรเจน 1.45 กรัมต่อลิตรพบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Okagbue และ Lewis, 1996) และได้มีการศึกษาโดยการนำเอา molasses มาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* โดย molasses แบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดที่ 1 มีปริมาณคาร์บอนรวม 58.8 กรัมต่อลิตร และชนิดที่ 2 มีปริมาณคาร์บอนรวม 47 กรัมต่อลิตร และทั้งสองชนิดมีปริมาณไนโตรเจน 7.58 กรัมต่อลิตรและจากการทดลองพบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 15.3 และ 14.6 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ (Haard, 1998) ต่อมาได้ศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น sugarcane ซึ่งแบ่งเป็น stalk shell และ stalk pith ที่มีปริมาณคาร์บอน 44-32 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน และ fresh sugarcane ที่มีปริมาณคาร์บอน 15 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 11.6, 10.8 และ 14.05 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ (Fontana และคณะ, 1996) ในการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น enzymatic wood hydrolysates ที่มีไซโรส (xylose) กลูโคส (glucose) และเซลโลไบโอส(cellobiose) เป็นองค์ประกอบ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 2.14 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cruz และ Parajó, 1998)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* สายพันธุ์เดิม TISTR 5730 โดยเลี้ยงในอาหารที่เตรียมได้จากของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต AIT (Allyl isothiocyanate) พบว่าการผลิตสารแอสตาแซนทินจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เตรียมได้จากกากมัสตาร์ดจะได้ว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากการเติมกากมัสตาร์ดเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดในการให้ปริมาณของมวลเซลล์และแอสตาแซนทินเท่ากับ 19.6 กรัมต่อลิตร และ 25.8 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งเป็นการปรับปรุงการผลิตแอสตาแซนทินให้เพิ่มขึ้นเป็น 11 เท่าเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหาร YM และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ได้จากกากมัสตาร์ดประเภทอื่น ๆ จะพบว่าเพิ่มการผลิตแอสตาแซนทินได้ 2.1-1.3 เท่า (Tinoi และคณะ, 2006)

ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ได้มีการศึกษาการเพิ่มความสามารถในการผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยเติมสารอาหารหรือสารเคมีบางชนิดลงไปเพื่อกระตุ้นให้เชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้มากขึ้น สารที่เติมลงไป ได้แก่ วาลีน ยีสต์เอกซ์แทรกต์ กรดแอซีติก กรดมีวาโลนิกและเอทานอล พบว่าเมื่อเติมเอทานอล 0.2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง X. *dendrorhous* พบว่า การผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อเพิ่มขึ้น โดยการเติมเอทานอลลงไปจะเติมในระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ

นอกจากนี้ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถนำวัตถุดิบที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต โดยใช้ทดแทนสารตั้งต้นสังเคราะห์สำเร็จรูปที่มีราคาแพง และยังเป็นการเพิ่มความสามารถในการผลิตสารแอสตาแซนทินด้วย ได้มีการนำกากน้ำตาล (Haard, 1998) ไฮโดรไลเสตของพีช(Martin และคณะ, 1993) น้ำองุ่น (Meyer และคณะ, 1993) ไฮโดรไลเสตของเฮมิเซลลูโลสจากยูคาลิปตัส (Parajo และคณะ, 1998) และน้ำจากผลอินทผลัม (Ramirez และคณะ, 2001) มาใช้ในการผลิตแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ATCC 24228 นอกจากนี้ได้นำไฮโดรไลเสตของไม้ยูคาลิปตัสที่มีการสกัดลิกนินออกมาใช้เป็นสารตั้งต้น โดยจากการผลิตพบว่าการเตรียมอาหารด้วยไฮโดรไลเสตของไม้ยูคาลิปตัสได้สารที่ประกอบด้วย กลูโคสและเซลลูไบโอส และพบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 2.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 74 ชั่วโมง (Fleorecio และคณะ, 1998) และต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้น้ำอ้อยในการผลิตสารแอสตาแซนทิน พบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 1300 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือ 6500 ไมโครกรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาได้มีการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะของการหมัก โดยใช้ factorial design เป็น 2 ขั้นตอน โดยในขั้นแรกศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินในระดับความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ กันและปฏิสัมพันธ์ของสารอาหารพบว่าการผลิตเพิ่มขึ้น 23 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณรงควัตถุในเซลล์ลดลง 16 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นที่สองได้ทำการผันแปรค่ากรดด่างและระดับการกวนที่มีผลต่ออัตราการถ่ายโอนออกซิเจน พบว่าเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณรงควัตถุ (418 ไมโครกรัมแอสตาแซนทินต่อกรัมของยีสต์) และการผลิตรงควัตถุ (1987 ไมโครกรัมต่อลิตร) (Ramirez และคณะ, 2001) ได้ศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินจากน้ำผลอินทผลัมโดยสายพันธุ์กลายของ *X. dendrorhous* ที่มีการปรับปรุงสารพันธุกรรมให้มีการผลิตสูงขึ้น พบว่าเมื่อใช้อาหารที่ประกอบด้วยน้ำผลอินทผลัมเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงสุด 6170 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อมีปริมาณน้ำตาลในอาหารซึ่งได้จากน้ำผลอินทผลัม 22.4 กรัมต่อลิตร การใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่มีน้ำผลอินทผลัมสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้อาหาร Yeast extract-Malt extract (Ramirez และคณะ ,2001) นอกจากนี้การออกแบบการทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของสายพันธุ์สำหรับการผลิตสารแอสตาแซนทินจากการเลี้ยงแบบฟาสก์เขย่า (shaker flask) พบว่าสภาวะที่เหมาะที่สุดในการผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงสุด คือ ที่อุณหภูมิ 19.7 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 11.25 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์และความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.5 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะเหล่านี้พบว่าสายพันธุ์ 2-25 ของ *X. dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 8100 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการผลิตโดยใช้สภาวะเดิม เป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินวิธีหนึ่ง

จากการศึกษาพบว่า ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* อย่างกว้างขวางทั้งนี้เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตให้สูงขึ้น โดยการนำการพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตรวมถึงการนำของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญเติบโตและให้มีการกระตุ้นการผลิตสารแอสตาแซนทินให้สูงขึ้นดังได้กล่าวมาข้างต้น

นอกจากนี้ข้อจำกัดในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ไม่กว้างขวางในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์มีความหนาและเหนียวมากทำให้ไม่สามารถสกัดหรือสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจากเซลล์ได้น้อย ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาให้ได้มากที่สุด จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะทำให้ได้ปริมาณของสารแอสตาแซนทินสูงสุด โดยการศึกษาการใช้ supercritical fluid extraction สำหรับการสกัดสารแอสตาแซนทินจาก *X. dendrorhous* ซึ่งผ่านการทำให้เซลล์แตกโดยการบดด้วยลูกแก้ว (glass bead) และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง spray drier พบว่าผลผลิตคาโรทีนอยด์และสารแอสตาแซนทินสูงสุดเมื่อใช้คาร์บอนไดออก- ไซด์ปริมาณเท่ากับ 84 และ 90 เปอร์เซนต์ตามลำดับ โดยการดำเนินการแบบ two step pressure gradient ที่เปลี่ยนความดันจาก 300 เป็น 500 บาร์ ความเข้มข้นของสารแอสตาแซนทินในส่วนที่สองที่ 500 บาร์เพิ่ม 4 และ 10 เท่าที่ 40 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ และผลผลิตเพิ่มประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ (Lim และคณะ, 2002) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการใช้สารเคมีต่างๆ มาใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* ด้วย เช่น เอทานอล เมทานอล ซึ่งพบว่าเมทานอลสามารถทำการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาได้ แต่เนื่องจากเมทานอลมีความเป็นพิษทำให้การประยุกต์ใช้สารแอสตาแซนทินไม่ได้รับการยอมรับ ต่อมาได้มีการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์โดยการใช้กรดในการสกัด พบว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง พบว่า สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ แต่การใช้กรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นสูง จะทำให้สารแอสตาแซนทินเกิดการสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอื่น ทำให้คุณสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแอสตาแซนทินลดลง ดังนั้นการสกัดสารแอสตาแซนทินเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูงและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารแอสตาแซนทินน้อย จึงเป็นวิธีที่ดีที่นำมาประยุกต์ใช้ ในปัจจุบันได้ให้ความสนใจในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในการสกัดสารแอสตาแซนทินโดยการเติมเอนไซม์ลงไปเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์ จึงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อหาชนิดของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาให้ได้ปริมาณที่สูงที่สุด

2.2 เอนไซม์กลูคาเนส (Glucanase)

2.2.1 ชนิดของเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนส (glucanase) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) โดยส่วนใหญ่เอนไซม์กลูคาเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่พบในสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตประเภทกลูแคน (glucan) ซึ่งโครงสร้างของกลูแคนจะมีลักษณะเป็นโมโนแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคสจัดเรียงตัวต่อกันเป็นเส้นตรงไม่มีกิ่งก้านเชื่อมต่อด้วยพันธะ 1,3 และ 1,4-β-glycosidic เอนไซม์กลูคาเนสนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ endo-glucanase จะย่อยบริเวณพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic) ภายในโมเลกุลของสารตั้งต้นเป็นแบบสุ่มและ exo-glucanase จะย่อยบริเวณพันธะกลูโคซิดิกภายในโมเลกุลของสารตั้งต้นอย่างเป็นระเบียบโดยเริ่มจากปลายสายพอลิเมอร์ของสารตั้งต้น โดยสามารถจำแนกเป็นชนิด ได้แก่ endo-1,3-β-glucanase (E.C.3.2.1.39) จะย่อยเฉพาะพันธะ 1,3-β-glucosidic ซึ่งเป็นพันธะที่พบในสารตั้งต้น (substrate) ประเภทกลูแคน exo-1,4-β-glucanase (E.C.3.2.1.74) จะย่อยเฉพาะพันธะ 1,4-β-glucosidic สำหรับ endo-1,3-1,4-β-glucanase (E.C.3.2.1.73) สามารถย่อยทั้งพันธะ 1,3 และ 1,4-β-glucosidic ส่วน endo-1,6-β-glucanase (E.C.3.2.1.75) จัดเป็นเอนไซม์กลูคาเนสที่ย่อยพันธะ 1,6-β-glucosidic ใน pustulan ซึ่งเป็นกลูแคนชนิดหนึ่งที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของไลเคน *Umbilicaria pustulata* นอกจากนี้เอนไซม์ endo-1,2-β-glucanase (E.C.3.2.1.71) สามารถย่อยบริเวณพันธะ 1,2-β-glucosidic ซึ่งเป็นพันธะของสารตั้งต้นที่จัดอยู่ในกลุ่มของกลูแคนและ endo-1,4-β-glucanase (E.C.3.2.1.4) จะย่อยบริเวณพันธะ 1,4-β-glucosidic ใน cellulose

2.2.2 การจำเพาะของเอนไซม์กลูคาเนสต่อสารตั้งต้น

ในการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสพบว่า จะมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ β-1,3-glucanase จะย่อยเฉพาะสารตั้งต้นที่โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3-glucosidic ซึ่งได้แก่ laminarin, bakers' yeast glucan, bakers' yeast cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

wall, periodate oxidized laminarin, pachyman และ oat glucan และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้น เช่น สารตั้งต้นที่เป็นลามินารินจะถูกเอนไซม์ย่อยไปเป็น laminarihexose ซึ่งเป็น oligosaccharide จากนั้นเอนไซม์จะย่อยต่อไปได้เป็น laminaritriose, laminaribiose, glucose และ gentiobiose แต่หากสารตั้งต้นเป็นกลูแคนหรือผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ (baker's yeast) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์กลูคาเนส คือ laminaritriose, glucose และ laminaribiose แต่จะไม่เกิด gentiobiose ขึ้นเลย (Rombouts และคณะ, 1976)

2.2.3 แหล่งผลิตเอนไซม์กลูคาเนส

พืชชั้นสูง

เอนไซม์กลูคาเนส มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารอาหารสำรองภายในเซลล์ของพืช และเมื่อพืชถูกรุกรานจากการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยจะผลิตเอนไซม์กลูคาเนสออกมาเพื่อป้องกันตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ตัวอย่างพืชชั้นสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น Citrus fruit (Sanchez-Ballesta และคณะ ,2005) Tobacco (Benhamou, 2002)

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้นั้นมีหลายชนิด ได้แก่

1.เห็ดรา (fungi)

เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *Trichoderma longibrachiatum* จะผลิตเอนไซม์ endo-1,3- β-D-glucanase หรือ laminarinase โดยผลิตในอาหาร basal medium ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์และเกลือในการผลิตนั้นจะใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีดังนี้คือ ควบคุมอุณหภูมิที่ 28องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราของใบกวน 200 รอบต่อนาทีและทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4วัน การทดลองนี้ทำเพื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาศึกษาถึงวิธีการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ (Tongarone และคณะ, 1989)

นอกจากนี้ยังมีเชื้อราชนิดอื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *Penicillium janthinellum* เชื้อชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์ β 1, 4- glucanase หรือ Avicelase ซึ่งในการผลิตต้องมีการเติมสารซักนำจำพวก Avicel ลงไปด้วยและทำการเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

นอกจากเชื้อราแล้ว ในปัจจุบันได้มีผู้เริ่มศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเห็ดเพิ่มมากขึ้น โดยเห็ดชนิดหนึ่งที่มีผู้สนใจกันมากคือ เห็ด *Agaricus brasiliensis* เห็ดชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์กลูคาเนสชนิด endo-β 1, 3 -glucanase โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเห็ดชนิดนี้เป็น extracellular enzyme

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72588

ดังนั้นในการผลิตจึงมักใช้อาหารเหลวแล้วนำไปเลี้ยงในถังหมักแบบ air-lift ขนาด 2 ลิตร ด้วยอัตราการให้อากาศ 0.2 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 25 วัน

2. ยีสต์

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถผลิตได้จากยีสต์หลายชนิดด้วยกันโดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ยีสต์ส่วนใหญ่ผลิตกออกมานี้มีทั้งชนิด exo-glucanase ซึ่งจะย่อยบริเวณพันธะกลูโคซิดิกที่ nonreducing end ของสายพอลิเมอร์และชนิด endo-glucanase ที่ย่อยบริเวณพันธะจากกลางสายของพอลิเมอร์ ยีสต์ที่เคยมีผู้นำมาศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสที่มีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* เชื้อชนิดนี้ผลิตเอนไซม์ exo -β-3 ,1-glucanase ในการผลิตจะใช้อาหารเหลว YED medium และเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 28องศาเซียส การทดลองจะศึกษาเรื่อง *Saccharomyces* 2 สายพันธุ์ คือ 5288C และ A138 แล้วนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ มาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces* 5288C นั้นมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นจำพวกลามินารินมากกว่าสารตั้งต้นพวก pustulan แต่เชื้อ *Saccharomyces* A138 นั้นจำเพาะกับสารตั้งต้นจำพวกลามินารินเพียงชนิดเดียวโดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่เป็นพวกแรก

3. แบคทีเรีย

การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสในระดับอุตสาหกรรมมักนิยมทำการผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้รวดเร็ว การแยกเอาตัวเซลล์ออกจากเอนไซม์สามารถทำได้ง่าย และแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกตัวเซลล์ได้ ทำให้สามารถทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่าย แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ กลูคาเนสได้นี้อยู่หลายชนิดด้วยกัน เช่น *E.Coli*

ได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติและความจำเพาะกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ endo -β 1,4 -glucanase หรือ Avicelase จากเชื้อ *B. circulans* F-2 โดยทำการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ คือ 4.5 และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงถ้าพีเอชมีค่าสูงกว่า 4.5 แต่เอนไซม์ยังคงทำงานได้อยู่ในช่วงพีเอช 4.0-10.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ คือ 50 องศาเซลเซียสและสารตั้งต้นที่ถูกนำมาศึกษานั้นได้แก่ เซลโลเด็กซ์ทรินและไซแลน (Kim, 1995)

การศึกษาการผลิตและคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ β-3 ,1-glucanase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* IAM 1165 ในอาหารเหลวที่มีการเติมสารชักนำ คือ Pachyman เอนไซม์ β -1,3 -glucanase ที่ได้นี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 87 กิโลดอลตัน ซึ่งเอนไซม์ β -1,3-glucanase นี้ได้ (Aono และคณะ,1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์จะเติมเอนไซม์กลูคาเนสลงไปเพื่อช่วยในการสกัดมอลท์ และเติมเอนไซม์กลูคาเนสลงไปในอาหารของสัตว์ปีกจำพวกเป็ดและไก่ เนื่องจากสัตว์ประเภทนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสออกมาย่อยผนังเซลล์ของพืชที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบได้ จึงจำเป็นต้องเติมเอนไซม์นี้ลงไปเพื่อช่วยในการย่อยธัญพืชที่เป็นองค์ประกอบหลักในอาหารสัตว์ (McCarthy และคณะ ,2005) เอนไซม์กลูคาเนสนี้ยังถูกนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช (Mitchell, 1963) เนื่องจากสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคได้ นอกจากนี้เอนไซม์กลูคาเนสยังนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโครงสร้างผนังเซลล์ของเห็ดราและโครงสร้างของ β-glucan (Manners และคณะ ,1973)ใช้ในการตรวจสอบ taxonomic และความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการเกี่ยวกับยีสต์ (Lachance และคณะ, 1973) และยังถูกนำมาใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ด้วย (Sietsma และคณะ ,1968)

สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ถือเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเพราะการผลิตในสภาวะเหมาะสมที่แท้จริง ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ในปริมาณที่สูงที่สุด ดังนั้นวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งในการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส

2.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง กับการใช้ เอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยสลายผนังเซลล์

จากการศึกษาพบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus circulans* ในอาหาร minimal medium ร่วมกับ ผนังเซลล์ของยีสต์หรือสารประกอบกลูแคนของยีสต์ที่เป็นแหล่งของคาร์บอน เป็นผลให้มีการสร้าง β – glucanase 5 ชนิด โดยมีเอนไซม์กลูคาเนสที่สำคัญคือ β –(1⟶3)-glucanase I และ II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะย่อยผนังเซลล์ยีสต์ เอนไซม์นี้ถูกแยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยกระบวนการ batch adsorption บนกลูแคนของยีสต์ และถูกทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทรกราฟีบน hydroxylapatite

Bacillus circulans WL-12 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ของยีสต์ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นพวกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ β – glucanase เมื่อเจริญบนผนังเซลล์ของ baker yeast (Aida และคณะ, 1995) หรือ เลี้ยงร่วมกับ glucan ของ baker yeast ที่ไม่ละลายในสารที่เป็นด่าง การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติในการย่อยของเอนไซม์ β –(1⟶3)-glucanase ชนิด A และ B จากเชื้อ *Bacillus circulans* WL-12 การย่อย β –(1⟶3)- glucan โดยเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* WL-12 ที่ถูกชักนำด้วย pachyman การเปรียบเทียบคุณสมบัติในการย่อยระหว่างกลูคาเนส 2ชนิด คือ Glc A1 และ Glc B พบว่า Glc A1 นั้นจะให้น้ำตาลลามินารินโอลิโกแซคคาไรด์ (larminarin oligosaccharide) และส่วน Glc B จะให้น้ำตาลลามินาริโอลิโกแซคคาไรด์ที่สั้นกว่า (Aida และคณะ, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้มีการใช้เอนไซม์ β–(1→3)-glucanase จากเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* และ *Trichoderma harzianum* ในการย่อย botryosphaeran ที่มีส่วนประกอบเป็น (1⟶3:1⟶6) β –D-glucan และ larminarin ได้เป็นกลูโคสและเจนทิโอไบโอส (gentiobiose) แต่มีน้อยกว่าลามินาริไบโอส)larminaribiose) และจากการย่อย botryosphaeran พบว่า มีกลูโคสและเจนทิโอไบโอสเป็นผลผลิตหลักที่ได้ และมีไตรแซคคาไรด์บางชนิดเกิดขึ้น แต่ไม่มีน้ำตาลลามินาริไบโอส

จากโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ได้ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนหลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ endo-β - (1⟶3) - glucanase ที่ผลิตโดย *B. circulan* พบว่า endo-β - (1⟶3) - glucanase นั้นสามารถย่อยส่วนประกอบของผนังเซลล์ *Schiz. pombe* ได้เป็น β - (1⟶3)-linked glucan และ α - (1⟶3)- linked glucan

ต่อมาได้มีการศึกษาการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อ *Bacillus circulans* ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบแบทช์ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* และขั้นตอนที่สองคือการเลี้ยงเชื้อผสม mixculture ระหว่างเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* และ *B. circulans* พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ได้มีปริมาณสูงขึ้น เนื่องจากมีการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

จากการศึกษาพบว่าการเหนี่ยวนำกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ของเชื้อ *B. circulans* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของผนังเซลล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* หากมีการเติมผนังเซลล์ 2.5 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการชักนำกิจกรรมของการย่อยสลายของเอนไซม์ได้สูงที่สุด โดยระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนแรกจะมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินมากกว่าการหมักขั้นที่ 2 โดยในขั้นแรกสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ในปริมาณมากที่สุดเมื่อใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* 96 ชั่วโมง และพบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารยีสต์ไนโตรเจนเบส (yeast nitrogen base) จำนวน 45 กรัมต่อลิตร จะช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตและการสร้างแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ได้สูงที่สุด ซึ่งการผลิตสารแอสตาแซนทินได้ปริมาณ 9010 ไมโครกรัมต่อลิตรและเชื้อ *X. dendrorhous* จะสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่มากกว่าหากใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงขั้นแรก จะได้ว่ายีสต์ไนโตรเจนเบสจะสนับสนุนความสามารถในการสกัดของสารแอสตาแซนทินได้สูงที่สุด และการสนับสนุนกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดในช่วงการหมักขั้นที่ 2และพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารแอสตาแซนทินในการเลี้ยงแบบผสมคือ 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 34-30 องศาเซลเซียส (Fang และ Wang, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR No. 5730 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง (YM slant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อใหม่ทุก ๆ 1 เดือน

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* JMC 2504 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเชื้อ *B. circulans* ถูกเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 3 สัปดาห์

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

	บริษัท
3.2.1อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์	
Yeast extract	Scharlar Chemic S.A.
Malt extract	Scharlar Chemic S.A.
Peptone	HiMedia Laboratory
Glucose	Fluka Biochemical
Agar	-
3.2.2อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	
Baker's yeast	เอส.เอ.เลซาฟ
Nutrient agar	Scharlau
Nutrient broth	Scharlau
Yeast nitrogen base	Difco Laboratories

3.3 สารเคมี

	บริษัท
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	Merck Schuchardt OHG
เฮกเซน (hexane)	Asia Pacific Specialty Chemicals
โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส	-
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต)($CuSO_4.5H_2O$)	J.T Baker

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมซัลเฟต)(Na_2SO_3)	Carlu erba reagenti
โปแตสเซียมทาร์เทรต	Carlu erba reagenti
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	VWR Internation. Ltd
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	Carlu erba reagenti
ฟีนอล (phenol)	Carlu erba reagenti
ลามินาริน (laminarin)	Fluka

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

	บริษัท
เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดทศนิยม 4ตำแหน่ง	Mettler-Todedo, Thailand
หม้อนึ่งอัดความดัน	Tomy-seiko
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply
เครื่องเขย่าผสม	Scientific industries, Inc.
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Scientific Promotion
เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น	Hermle Labortech
เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง	
ตู้อบลมร้อน	Sheldon Manufacturing, Inc
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง	United Instrument
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Shimadzu
เครื่องแก้ว	Pyrex

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

3.5.1.1 การเตรียมหัวเชื้อของเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous*

1 การเตรียมอาหารสำหรับหัวเชื้อ

ชั่ง glucose 1 กรัม yeast extract 0.3 กรัม malt extract 0.3 กรัม peptone 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ขวดละ 30 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 การเตรียมหัวเชื้อ (preculture)

ทำการเขี่ยเชื้อ *X. dendrorhous* ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียงลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ขวดละ 1 ลูปเต็ม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเขย่า ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 28 ชั่วโมง (Tinoi และคณะ, 2006)

3.5.1.2 การเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทิน

1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหาร YM โดยชั่งกลูโคส 1 กรัม yeast extract 3 กรัม malt extract 3 กรัม เปปโตน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ตวงใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

2 สภาวะที่ใช้ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 5.1.1.2 ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ ขวดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด

3.5.1.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous*

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแอสตาแซนทิน และปิเปตหัวเชื้อ(3.5.1.2) ลงไป 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องสาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง และนำไปหาปริมาณน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและนำไปสกัดหาปริมาณสารแอสตาแซนทิน

3.5.1.4 การหาปริมาณเซลล์ยีสต์แห้ง (cell dry weight)

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และเขย่าให้เชื้อกระจายแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักเซลล์คงที่

3.5.1.5 การหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* โดยใช้วิธีสกัดด้วยสารละลาย DMSO (Dimethylsulfoxide extraction)

ปิเปตน้ำหมัก 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer แล้วชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้ จากนั้นนำผงแห้งของเซลล์ยีสต์ไปสกัดสารแอสตาแซนทินด้วย DMSO 10มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายเฮกเซน (hexane) ลงไป 40 มิลลิลิตรเพื่อทำการแยกสารแอสตาแซนทินออกจาก DMSO และเทลงในกรวยแยก และเขย่า จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จะเกิดการแยกชั้น จะได้สารแอสตาแซนทินอยู่ในชั้นของเฮกเซน ทำการสกัดซ้ำด้วย DMSO และเฮกเซนจนกว่าสารสกัดแอสตาแซนทินไม่มีสี จากนั้นนำส่วนของเฮกเซนมาใส่รวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยภายใต้สุญญากาศ (evaporator) จนเหลือสารละลายประมาณ 3มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณของสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ ดังสูตร

$$\text{ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)} = \frac{\text{ปริมาตรของตัวทำละลาย (มล.) x ค่าการดูดกลืนแสงที่ 474นาโนเมตร x100}}{\text{21 x น้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (กรัม)}}$$

หมายเหตุ 21 คือ ค่าการดูดกลืนแสงมาตรฐานของสารละลายแอสตาแซนทิน 1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในตัวทำละลาย เมื่อใช้แสงที่มีความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร

3.5.2 การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans*

3.5.2.1 การเตรียมหัวเชื้อของเชื้อ *B. circulans*

1 การเตรียมอาหารสำหรับหัวเชื้อ

อาหารสำหรับหัวเชื้อสามารถเตรียมได้โดยชั่ง Nutrient broth สำเร็จรูป 1.3 กรัม และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลายให้เข้ากัน และตวงใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด แล้วนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2 การเตรียมหัวเชื้อ (pre-culture)

ทำการเขี่ยเชื้อ *B. circulans* ที่ได้ในอาหารวุ้นเอียง 1 ลูปเต็ม (1 loop full) ลงอาหาร Nutrient broth แล้วจึงนำมาบ่ม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.2 การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans*

1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans*

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์กลูคาเนส เตรียมได้โดยชั่ง Yeast nitrogen base 0.7 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และมีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 จากนั้นเติมผนังเซลล์ของเบเกอร์ยีสต์ที่เตรียมไว้ (Baker's yeast cell wall) 0.5 กรัม ละลายให้เข้ากัน จากนั้นใส่อาหารลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด แล้วนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2 สภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans*

ปิเปตหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Yeast nitrogen base ที่เตรียมไว้สำหรับเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ความเร็วรอบ 210 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 ชั่วโมง นำไปวัดปริมาณเซลล์แห้ง และหาปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้

3.5.2.3 การวัดปริมาณและการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (Miller(1959 ,

สารละลายลามินาริน ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

ละลายลามินาริน 10 กรัม ในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 5.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0

การเตรียม Stock solutions

A: สารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เตรียมโดยปิเปตสารละลายกรดซิตริกเข้มข้นปริมาตร 60 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

B: สารละลายโซเดียมอะซิเตรทเข้มข้น 0.1โมลต่อลิตร เตรียมได้โดยการชั่งโซเดียมอะซิเตรท 29.41กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน

ตวง stock solution A ปริมาตร 20.5 มิลลิลิตรด้วยกระบอกตวงใส่ลงในบีกเกอร์ที่เตรียมไว้จากนั้นตวง stock solution B ปริมาตร 29.5 มิลลิลิตรใส่ลงไปในบีกเกอร์ที่มี stock solution A อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5 dinitrosalicylic acid)

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง ไม่เกิน 1,500 มิลลิลิตร (ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆ เติมโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต 200 กรัม เติมสารละลายฟีนอล 0.2 กรัม และโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_3) 0.5 กรัม (Miller,1959) โดยค่อยๆ ละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงค่อยเติมสารเคมีตัวต่อไปตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร

2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี 0.45 มิลลิลิตร ของสารละลายลามินาริน (laminalin) 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0 จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นปิเปตสารละลาย 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที และปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเขย่าให้กัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วไปหาค่าน้ำตาลกลูโคสเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยวัดเป็นอัตราการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์นี้ ซึ่งวิธีการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ คือ วิธี dinitrosalicylic (DNS) (Miller,1959)

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ มีหน่วยเป็น ยูนิต โดยที่

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส} \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ (มล)}}$$

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาของการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1ไมโครโมล ในเวลา 1นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

3.5.3 การสกัดสารแอสตาแซนทีนจากเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans*

3.5.3.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* เพื่อสกัดด้วยเอนไซม์

ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินและเก็บเซลล์ยีสต์ไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยและนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (homogenizer) เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์สำหรับใช้ในการสกัด จากนั้นนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dry) แล้วนำไปสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์กลูคาเนสต่อไป

3.5.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

1 การศึกษาปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้

2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.5.3.2 (2) ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ลงไป 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาที หาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเชื้อ *X. dendrorhous*

3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาที จากนั้นหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้

4 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ลงไป แล้วเขย่าให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 5, 10, 12, 20, 25, 30 และ 45 นาที จากนั้นหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

ในการศึกษาความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ *X. dendrorhous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* จึงต้องทำการศึกษาเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (Yeast malt medium) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200รอบต่อนาที จากนั้นทำการเก็บเชื้อ และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight (กรัมต่อลิตร)) และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous*

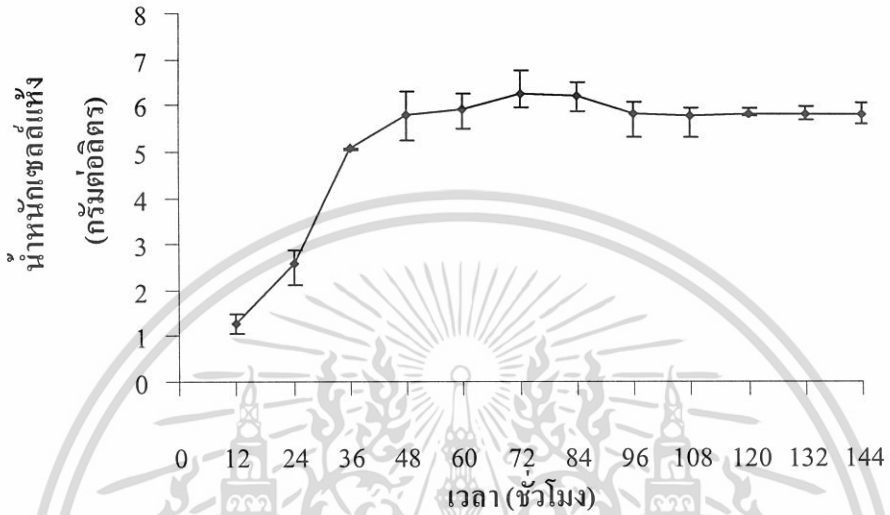
จากการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต โดยทำการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และทำการเก็บเชื้อทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) จะได้ว่า ในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 12 พบว่า เชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างต่ำ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้น แสดงว่าเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น และพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 76 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.265 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไป หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 76 ชั่วโมง คือเวลา 84 - 144 ชั่วโมง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่อนข้างค่าคงที่และมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย แสดงว่า เชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* มีการหยุดการเจริญเติบโตทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 6

4.1.2 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

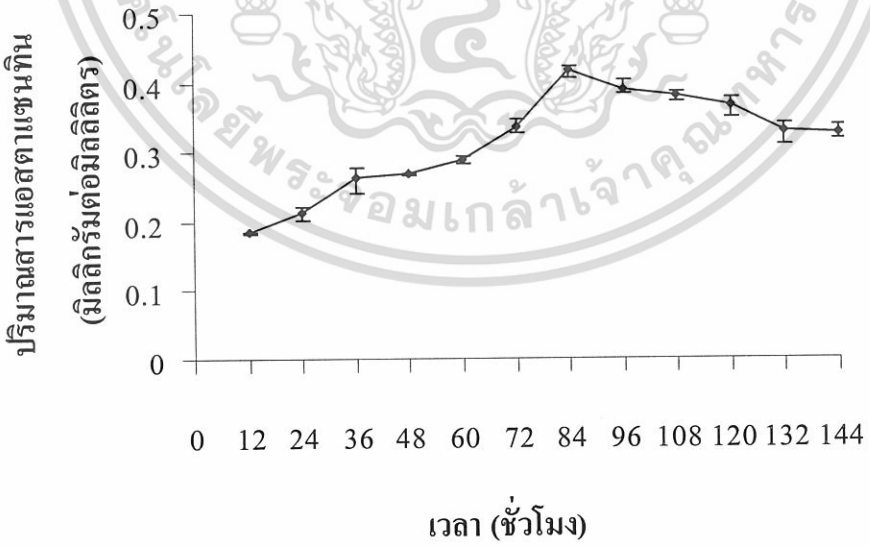
ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยทำการเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีปริมาณสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง และมีค่าเท่ากับ 0.4172 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตแต่มีการผลิตสารแอสตาแซนทินในปริมาณที่น้อยมากเพราะเซลล์อยู่ในช่วงเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์จึงมีการผลิตสารแอสตาแซนทินน้อย ดังแสดงในรูปที่ 7 และพบว่าที่เวลา 24-72 ชั่วโมงมีการสร้างสารแอสตาแซนทินเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ และปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินที่ผลิตจากเชื้อจาก *X. dendrorhous* ที่ผลิตได้มากที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 84 ชั่วโมง ซึ่งเป็นโดยมีการสร้างสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 0.4172 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปพบว่าการผลิตสารแอสตาแซนทินมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 6 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *X. dendrorhous* ที่เวลาต่าง ๆ กัน



รูปที่ 7 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดจาก *X. dendrorhous* ด้วยวิธี DMSO extraction

การหาปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่ผลิตจากเชื้อ *X. dendrorhous* ทำได้โดยการนำมาเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดสารแอสตาแซนทินโดยใช้ DMSO (Dimethylsulfoxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถทำการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ให้ได้สารแอสตาแซนทินออกมาจากเซลล์ได้ทั้งหมด จากนั้นทำการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจาก DMSO โดยการใช้ตัวทำละลายเฮกเซนสกัดอีกครั้งแล้วนำไปหาปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมด (Total astaxanthin) พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 433.33 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง

4.2 การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B.circulans*

การผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. circulans* เพื่อใช้ในการย่อยเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YNB (Yeast Nitrogen Base) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 210 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดหาค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูคาเนส (glucanase activity) โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ทดสอบ โดยทดสอบการทำงานของเอนไซม์ด้วยการย่อยลามินาริน (Laminarin) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นประเภทกลูแคน พบว่าสารละลายเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จาก *B. circulans* มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.1306 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B.circulans*

4.3.1 ปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B.circulans*

จากการทดลองได้เตรียมสารละลายของเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมในสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้สภาวะในการสกัดคือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์และหาค่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ ได้ผลดังดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 10

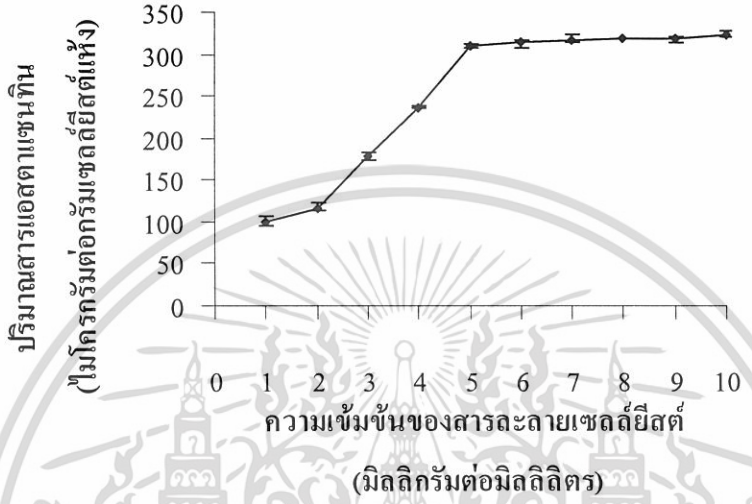
ตารางที่ 1 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.circulans*

ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
1	100.14
2	116.20
3	178.09
4	236.77
5	311.00
6	314.81
7	317.82
8	319.87
9	320.03
10	324.98

จากรูปที่ 8 เมื่อทำการสกัดสารแอสตาแซนทินโดยการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ*B. circulans* โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ที่แตกต่างกันพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีค่าสูงที่สุดเมื่อใช้สารละลายเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และพบว่าที่ความเข้มข้นของ *X. dendrorhous* 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์กลูคาเนสสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง และจากกราฟพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ที่น้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์กลูคาเนสทำการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ได้สารแอสตาแซนทินในปริมาณน้อย เนื่องจากมีปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* น้อย และจากนั้นปริมาณสารแอสตาแซนทินจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ จนกระทั่งถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินมีการเปลี่ยนแปลงคือเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากการทดลองจะได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์กลูคาเนสคือ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีปริมาณสารแอสตาแซนทินเท่ากับ 311 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง



รูปที่ 8 แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B .circulans*

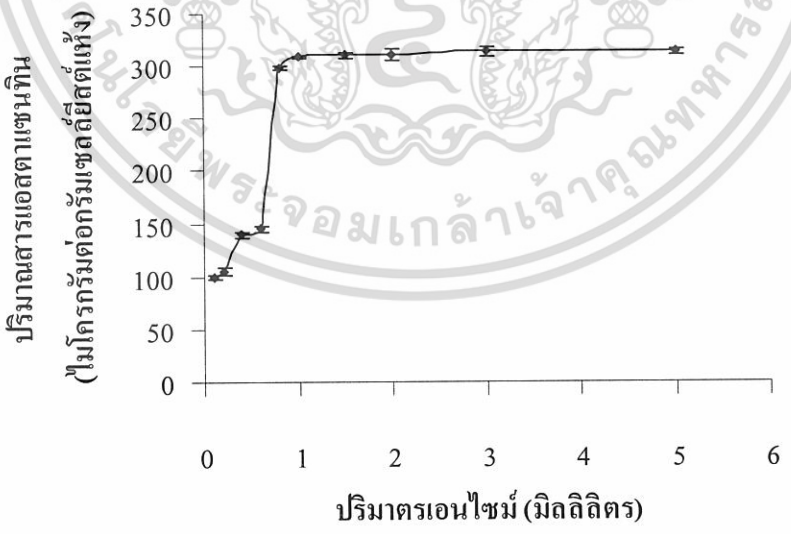
4.3.2 ปริมาณของเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous*

จากการทดลองสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร และนำมาทำการย่อยผนังเซลล์โดยใช้ปริมาณของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จาก *B. circulans* ที่แตกต่างกันคือ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิลิตร โดยสภาวะที่ใช้ในการสกัดคืออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จาก *B. circulans* ที่ปริมาณต่างๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous*

ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
0.1	99.04
0.2	105.03
0.4	140.14
0.6	145.03
0.8	298.00
1.0	309.6 7
1.5	310.85
2.0	312.02
3.0	313.27
5.0	314.90



รูปที่ 9 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสที่แตกต่างกันพบว่า เมื่อใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ปริมาตร 1 มิลลิลิตรย่อยสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* จะสามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้แอสตาแซนทินในปริมาณที่มากที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากรูปที่ 9 พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ กลูคาเนสในปริมาณน้อย มีผลทำให้ความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. .dendrorous* เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาได้น้อยและเมื่อใช้เอนไซม์กลูคาเนสในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสเพื่อทำการสกัดสารแอสตาแซนทินที่ 1.5-5 มิลลิลิตรพบว่า ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* มีปริมาณที่จำกัดทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำการย่อยเพื่อให้ได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจะได้ว่าที่ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* 1 มิลลิลิตร เป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการสกัดออกจากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ในปริมาณ 309 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง

4.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทิน จากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans*

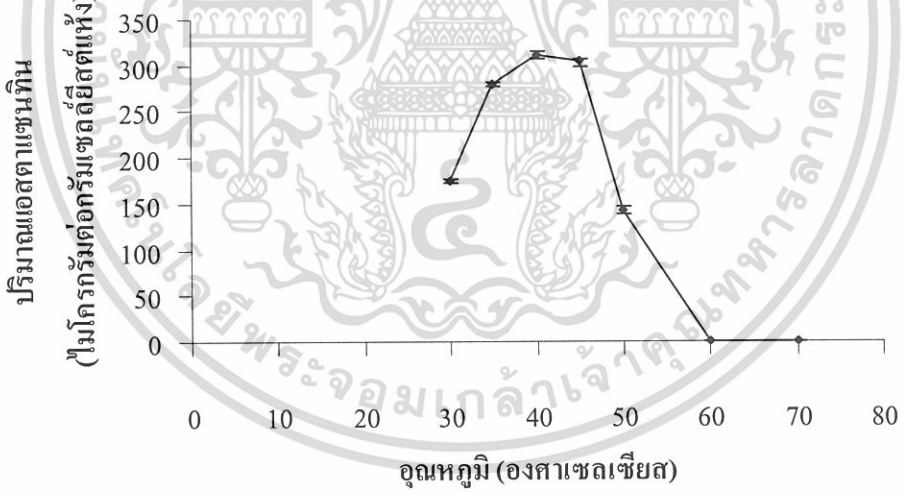
จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แห้ง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและทำการย่อยด้วยเอนไซม์กลูคาเนสปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และคำนวณหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และรูปที่ 10

จากรูปที่ 10 และตารางที่ 3 จะได้ว่าเมื่อย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 30 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีปริมาณน้อยกว่าที่อุณหภูมิอื่น ๆ เนื่องจากอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีปริมาณมากขึ้น และมีปริมาณมากที่สุดเมื่อทำการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผิตได้จากเชื้อ *B. circulans* สามารถย่อยเซลล์ยีสต์ให้ได้สารแอสตาแซนทินออกมาในปริมาณสูงในช่วงอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเท่ากับ 312 และ 305 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน จากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นมากกว่า 45 องศาเซลเซียส พบว่าความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์กลูคาเนสลดลง และที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไม่สามารถทำการย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์เพื่อให้ได้สารแอสตาแซนทินออกมาได้ เนื่องจากเอนไซม์กลูคาเนสเสียสภาพในการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
30	174.88
35	280.10
40	314.27
45	303.06
50	144.19
60	0.00
70	0.00



รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทิน จากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*

จากการศึกษาได้ทำการย่อยสารละลายเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และย่อยผนังเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาต่างๆกัน คือ 5, 10 , 15, 20, 25, 30 และ 45 นาที และคำนวณหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 11

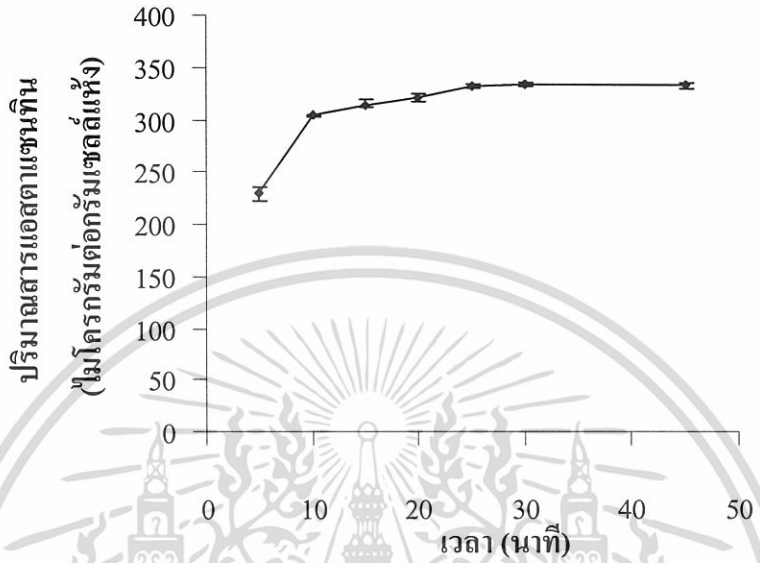
ตารางที่ 4 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*

เวลา (นาที)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
5	230.54
10	305.04
15	314.84
20	317.67
25	332.64
30	334.01
45	335.04

จากตารางที่ 4 และ รูปที่ 11 พบว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์*X. dendrorhous* น้อยประมาณ 5 นาที พบว่าสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาได้ในปริมาณน้อย เนื่องจากเวลาไม่มากพอที่จะทำให้เอนไซม์กลูคาเนสทำการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ออกมาได้หมด และพบว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์มากขึ้นปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จะมีปริมาณมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์มีเวลาในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้และเอนไซม์กลูคาเนสสามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* และได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินออกมาได้ปริมาณมากที่สุด คือ 332.64 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง เมื่อย่อยเป็นเวลา 25 นาที จากนั้นเมื่อให้เวลาในการย่อยมากขึ้นพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นที่เวลา 25 นาที จึงเป็นเวลาที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนส 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 11 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*

4.3.5 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เมื่อใช้เอนไซม์กลูคาเนสเทียบกับการสกัดด้วยวิธี DMSO extraction

จากการศึกษาการสกัดสารแอสตาแซนทินจากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* พบว่าเมื่อทำการสกัดสารแอสตาแซนทินจากสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการย่อยด้วยเอนไซม์กลูคาเนสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 342.62 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง และได้ทำการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธี DMSO extraction เนื่องจากการสกัดด้วยวิธีนี้สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ได้ทั้งหมด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 433.33 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง จากการทดลองจะได้ว่าสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสคิดเป็น 79.07 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินโดยเชื้อ *X. dendrorhous*

จากการทดลองได้ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (Yeast malt medium) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งมีค่าสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 76 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 6.265 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* มีปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง และมีค่าเท่ากับ 0.4172 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* มีค่าแตกต่างจากการศึกษาของ Vázquez (2001) ซึ่งได้ศึกษาการเจริญเติบโตของ *X. dendrorhous* สายพันธุ์ที่มีสายพันธุ์ต่างกัน ได้แก่ *X. dendrorhous* ATCC 24202, ATCC 24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24261 และ NRRLY-10921 โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM ที่มีการเติมน้ำตาลไซโลส (xylose) 10 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์แห้งมีค่าเท่ากับ 8.2, 7.8, 9.3, 7.0, 5.7 และ 5.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณสารแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 1.7, 1.75, 2.13, 0.7, 1.17 และ 1.38 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Tinoi และคณะ (2006) ซึ่งได้ทำการเลี้ยง *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM และ อาหารที่เป็นสารสกัดจากกากมัสตาร์ด (mustard waste media) โดยการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ามีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดที่เลี่ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากมัสตาร์ดมีค่าเท่ากับ 19.6 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้เท่ากับ 25.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM พบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินสูงสุด 2.34 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยง *X. dendrorhous* ในสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงต่างกัน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณสารแอสตาแซนทินมีค่าแตกต่างกัน

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงผลของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยที่ An และคณะ (1989) ได้ทำการเลี้ยง *X. dendrorhous* 67 -385 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันได้แก่ กลูโคส (glucose) เซลโลไบโอส (cellobiose) เอทานอล (ethanol) และซักซิเนต (succinate) พบว่าเซลล์ยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงสุด 3.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอนและ *X. dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสตาแซนทิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่าเท่ากับ 540 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีตส์แห้ง และจากการศึกษาของ Parajo และคณะ (1998) ได้นำไฮโดรไลเสตของไม้ยูคาลิปตัส (hemicellulose hydrolysate of *Eucalyptus globules* wood) ที่มีการสกัดลิกนินออกมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารแอสตาแซนทิน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นไฮโดรไลเสตของไม้ยูคาลิปตัสประกอบด้วยกลูโคสและเซลลูไบโอส (cellobiose) และสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 2.14 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* เป็นเวลา 74 ชั่วโมง และได้มีการศึกษาผลของไนโตรเจนและปริมาณกลูโคสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 12.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 1.13 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yamane และคณะ, 1997) และ Okagbue และ Lewis (1996) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น alfalfa residue juice ที่มีปริมาณคาร์บอน 25 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน 1.45 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าอาหารที่ต่างชนิดกันมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* และในการศึกษาเพื่อเพิ่มการผลิตสารแอสตาแซนทิน พบว่าได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินโดยการเลี้ยงเชื้อ *X .dendrorhous* ร่วมกันกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เพื่อกระตุ้นให้มีการผลิตสารแอสตาแซนทินให้มากขึ้น โดย Wang (2006) ได้ทำการเลี้ยง *X. dendrorhous* AS 2.1557 ร่วมกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างกัน พบว่า *X. dendrorhous* มีปริมาณเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Mucor mucedo* AS 3.2531 โดยมีปริมาณเซลล์ยีสต์เท่ากับ 9.1 กรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Rhodotorula glutinis* AS 2.703 สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงสุด 2.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 การสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504

ในการศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจากเซลล์ยีสตออกมาให้ได้ปริมาณมากที่สุด พบว่าเอนไซม์กลูคาเนสสามารถทำการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต้องใช้เอนไซม์กลูคาเนสปริมาณ 1 มิลลิลิตร (0.1306 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที พบว่าสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* ได้ในปริมาณ 342.62 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง และจากการทดลองได้เปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสกับการสกัดสารด้วยวิธี DMSO (Dimethyl sulfoxide extraction) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถสกัดสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอสตาแซนทินได้ทั้งหมด พบว่าประสิทธิภาพการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์กลูคาเนสคิดเป็น 79 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดด้วย DMSO และจากการทดลองได้ศึกษาความสามารถและการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์กลูคเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 สามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียสและเวลา 25 นาที นอกจากนี้ในการศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 ได้มีการศึกษาและหาวิธีการในการสกัดสารให้ได้มากที่สุด ซึ่งในการศึกษาของ Johnson และคณะ (1978) ได้ศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* สายพันธุ์ UCD-FST 67-210 โดยเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ร่วมกับ *B. circulans* WL -12 ที่มีปริมาณเซลล์ 3.7×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* WL -12 สามารถย่อยเซลล์ยีสต์ 257 กรัม ได้อย่างสมบรูณ์เมื่อเวลาผ่านไป 22 ชั่วโมง โดยจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการประยุกต์ใช้เอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* JMC 2504 สามารถทำการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมากจากเซลล์ยีสตีได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อยีสต์กับการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมี จะได้ว่า An และ Choi (2003) ได้การปรับปรุงการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยการใช้กรดไฮโรคลอริกทำลายผนังเซลล์ยีสต์ โดยพบว่าที่ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลต่อลิตร อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถที่จะสกัดสารแอสแอสตาแซนทินออกมาได้มากที่สุด และจะได้ว่าปัจจัยที่มีผลในการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก แต่การใช้กรดไฮโดรคลอริกพบว่ามีผลทำให้สารแอสตาแซนทินเกิดการเสื่อมสภาพ (decomposed) ไปและการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางด้านอาหาร และในการศึกษาทางด้านการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical method) พบว่า J. Tinoi และคณะ ได้ศึกษาการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ด้วยการใช้วิธี Freeze-thaw ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (soniation) พบว่าสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารที่สกัดได้ทั้งหมดด้วยวิธี DMSO แต่การสกัดด้วยวิธีนี้พบว่าขั้นตอนในการสกัดค่อนข้างยุ่งยาก และต้องใช้เวลานานในการสกัดสารแอสแซนทินออกมาจากเซลล์ยีสต์ได้ จากการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* jmc 2504 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีทางชีวภาพที่ใช้สภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรง ดังนั้นจึงเป็นอีกวิธีที่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาอย่างรวดเร็วและลดการเสื่อมสภาพของสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Aida K., Okada T., KasaHara N., Nikaidou N., Tanaka H. and Watanabe T. 1995. Comparatibe studies of β-1,3-glucanase A1 and B of *Bacillus circulans* WL-12: purifications and enzymatic properties. J. Ferment. Bioeng. 80(3): 283-286.

An G-H and Choi E-S. 2003. Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin. Biotechnol. 25: 767-771.

An G-H, Schuman D.B. and Johnson E.A. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. J. Appl. Environ. Microbiol. 55(1): 116-124.

Aono R., Sato M., Yamamoto M. and Horikoshi K. 1992. Isolation and partial characterization of an 87-kilodalton β-1,3-glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165. Appl. Environ. Microbiol. 58: 520-524.

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.

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.

Fang T. J. and Wang J. M. 2002. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacilllus circulans* in two-stage batch fermentation. Biochem. 37: 1235-1245.

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.

Fontana J.D., Czeczuga 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.

Flores-Cotera L.B., Martin R. and Sanchez S. Citrate. 2001 A possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. Biotechnol. Biomed. Mexico.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Giese E. C., Covizzi L. G. Dekker R. F. H., Monteiro N. K., Silva M. and Barbosa A.M. 2006. Enzymatic hydrolysis pf botryosphaeran and laminarin by β-1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. Process Biochem. 41: 1265-1271.

Goodwin T. W. 1980. The biochemistry of the Carotenoids, 2nd ed., Chapman and Hall, London.

Guo-ging H.E., Xing-Jun T., Ali M. A. A. and Qi-he C. 2003 Optinization of cultural conditions for therstable β-1,3-1,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5. J. Zhehiang Sci. 4: 719-726.

Haard N.F. 1998. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. Biotechnol. Lett. 10: 609-614.

Jayus, McDougall B. M. and Seviour R. J. 2002. Factors affecting the symthesis of)1→3) and)1→4) - β-glucanase by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 grown in batch culture. J. Enz. Microbial. Technol. 31: 289-299.

Johnson E.A. and An G-H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Crit. Rev. Biotechnol. 11: 297-326.

Johnson E.A. and Lewis M. J. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 115: 173-183.

Johnson E.A. and Schroeder W. A. 1995. Adv. Biochem. Eng. 53: 119-178.

Johnson E.A. and VillaT. G. And Lewis M. J. 1980. Aquaculture. 20: 123-134.

Kim C. H. 1995. Characterization and substrate specificity of an endo-β-1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 959-965.

Lewis M.J., Ragot N., Berlant M.C. and Miranda M. 1990. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β-Ionone. Appl. Environ. Microbiol. 56(9): 2944-2945.

Lim G. B., Lee S. Y., Lee E. K., Haam S. J. and Kim W. S. 2002. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbondioxide extraction. J. Biochem. Eng.

McCarthy T., Hanniffy O., McCarthy T., Hanniffy O., Lalor E., Savage A.V. and Tuoh M.G. 2005. Evaluation of three thermostable fungal endo-β-glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications. Process Biochem. 40: 1741-1748.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Meyer P.S. and Preez J.C. 1993. Effect of cetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. Biotecnol Letters. 15(9): 919-924.

Matin A. M., Acheampong E. and Patel T. R. 1993. Production of astaxathin by Phaffia rhodozyma using peat hydrolysates as substrate. J. Chem. Technol. Biotechnol. 53: 223-230.

Nielsen K. M., Lewis D. H. and Morgan E. R. 2003. Characterizaton of carotenoid pigments and their biosynthesis in two yellow flowered lines of *Sandersonia aurantiaca* (Hook). Euphytica. 130: 25-34.

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.

Østerlie M. B., Bjerkeng and Liaaen-Jensen S.. 1999. On bioavailability and deposition of bent Z-isomers of astaxanthin. Food Technol. Seville. 157-161.

Ramírez J., Gutierrez H. and Gschardler A. 2001. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* though factorial design and response surface methodology. J. Biotechnol. 88: 259-268.

Rombouts F.M. and Phaff H.J. 1975. Lytic β-(1→3)-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. Eur. J. Biochem. 63: 121-130.

Sanchez-Ballesta M. T., Gosalbes M. J., Rodrigo M. J., Granell A., Zacarias L. and Lafuente M. T. 2006. Characterization of a β-1, 3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. Pos. Bio. Technol. 40: 133–140.

Santos T., Rey F.D., Conde J., Villanueva J. R. and Npmela C. 1979. *Saccharomyces cerevisiae* mutant defeftive in exo -1,3-β-glucanase production. J. Bacteriology. 139: 333-338.

Shlomai P., Ben-Amotz A. and Margalith P. 1991. Production of carotene stereoisomer by *Phycomyces blakesleeanus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 458-462.

Shu C.H., Xu C.J. and Lin E.S. 2006. Production, purification and partial characterization of a nobel endo-β-1,3-glucanase fron *Agaricus brasiliensis*. J. Process Biochem. 41: 1229-1233.

Tangarone B., Royer R.C. and Nakas J.P. 1989. Purification and characterization of an endo- (1, 3) - β-D-glucanases from *Trichoderma longibrachiatum*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 177-184.

Tinoi J., Rakariyatham N. and Deming R. L. 2004. Use of mustard meal media as a substrate for astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Chiang Mai J. Sci. 31: 293-302.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tinoi J., Rakariyatham N. and Deming R. L. 2006. Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33: 309-314.

Vázquez M. 2001. Effect of the light on carotenoid profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly Phaffia rhodozyma). Food Technol. Biotechnol. 39: 123-128.

Wang W., Yu L. and Zhou P. 2006. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Bioreserch Technol. 97: 26-31.

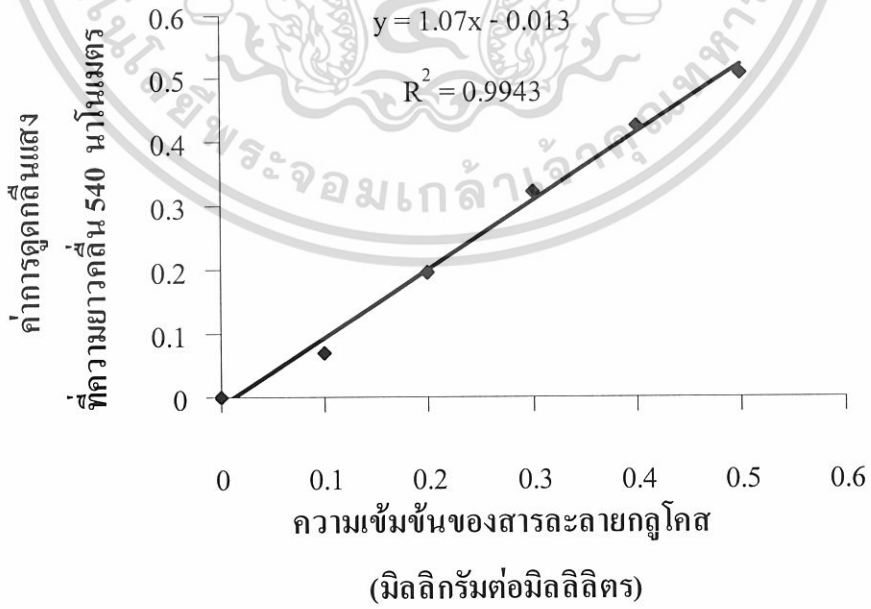
Yamane Y-I., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizona T. and Nishio N. 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. Microbiol. 63: 4471-4478.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

กราฟกลูโคสมาตรฐานสามารถทำได้โดยนำน้ำตาลกลูโคสไปอบให้แห้งจากนั้นเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ได้ผลดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0.0	0.000
0.1	0.071
0.2	0.197
0.3	0.322
0.4	0.426
0.5	0.511



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. ปริมาณน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและปริมาณสารแอสตาแซนทินที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดการทดลอง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)	ปริมาณสารแอสตาแซนทินเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)
12	1	1.315	1.278	0.1834	0.1842
	2	1.055		0.1849	
	3	1.465		0.1843	
24	1	2.100	2.582	0.2231	0.2120
	2	2.885		0.2023	
	3	2.760		0.2129	
36	1	5.100	5.067	0.2774	0.2654
	2	5.065		0.2412	
	3	5.035		0.2778	
48	1	6.305	5.802	0.2698	0.2686
	2	5.865		0.267	
	3	5.235		0.2702	
60	1	5.510	5.932	0.2942	0.2896
	2	6.015		0.2899	
	3	6.270		0.2849	
72	1	6.785	6.265	0.3329	0.3368
	2	5.950		0.3474	
	3	6.060		0.3299	
84	1	6.531	6.204	0.4087	0.4172
	2	6.219		0.4231	
	3	5.863		0.4194	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96	1	6.110	5.835	0.4032	0.3904
	2	5.350		0.3849	
	3	6.046		0.3842	
108	1	5.649	5.785	0.3871	0.3821
	2	5.980		0.3879	
	3	5.326		0.3734	
120	1	5.972	5.858	0.3782	0.3680
	2	5.804		0.3498	
	3	5.798		0.377	
132	1	5.735	5.855	0.3423	0.3321
	2	5.835		0.3411	
	3	5.995		0.3131	
144	1	6.102	5.858	0.3398	0.3298
	2	5.630		0.3197	
	3	5.842		0.3299	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.circulans*

ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ชุดการทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสง 474 นาโนเมตร	ปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)	ปริมาณสารแอสตาแซนทินเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
1	1	0.020	4.5	95.23	100.14
	2	0.021	4.4	97.78	
	3	0.029	3.5	107.41	
2	1	0.059	3.9	121.75	116.20
	2	0.052	4.1	112.80	
	3	0.049	4.4	114.07	
3	1	0.121	4.2	179.26	178.09
	2	0.129	4.0	182.01	
	3	0.109	4.5	173.02	
4	1	0.202	4.4	235.47	236.77
	2	0.219	4.1	238.62	
	3	0.235	3.8	236.24	
5	1	0.329	4.5	313.33	311.00
	2	0.359	4.1	312.38	
	3	0.330	4.4	307.30	
6	1	0.416	4.2	308.15	314.81
	2	0.420	4.3	318.52	
	3	0.429	4.2	317.77	
7	1	0.462	4.5	314.29	317.82
	2	0.548	3.8	314.80	
	3	0.499	4.3	324.37	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8	1	0.622	3.9	320.87	319.87
	2	0.588	4.1	318.88	
	3	0.591	4.1	320. 51	
9	1	0.672	4.0	316.05	320.03
	2	0.652	4.2	321.98	
	3	0.637	4.3	322.06	
10	1	0.805	3.8	323.70	324.98
	2	0.742	4.1	321.92	
	3	0.741	4.2	329.33	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* ที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous*

ปริมาณเอนไซม์กลูคาเนส (มิลลิลิตร)	ชุดการทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสง 474 นาโนเมตร	ปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)	ปริมาณสารแอสตาแซนทินเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
0.1	1	0.110	4.2	97.78	99.04
	2	0.114	4.1	98.92	
	3	0.113	4.2	100.44	
0.2	1	0.119	4.2	105.78	105.03
	2	0.119	4.3	108.29	
	3	0.111	4.3	101.02	
0.4	1	0.161	4.0	136.30	140.14
	2	0.160	4.2	142.23	
	3	0.149	4.5	141.90	
0.6	1	0.172	4.0	145.61	145.03
	2	0.177	3.8	142.35	
	3	0.158	4.4	147.13	
0.8	1	0.319	4.4	297.06	298.00
	2	0.327	4.3	297.58	
	3	0.345	4.1	299.37	
1.0	1	0.376	3.9	310.35	309.67
	2	0.365	4.0	308.99	
	3	0.346	4.2	307.56	
1.5	1	0.360	4.1	312.38	310.85
	2	0.343	4.3	312.15	
	3	0.355	4.1	308.04	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.0	1	0.361	4.1	313.24	312.02
	2	0.340	4.4	316.61	
	3	0.371	3.9	306.22	
3.0	1	0.326	4.6	317.38	313.27
	2	0.350	4.3	318. 52	
	3	0.332	4.4	309.16	
5.0	1	0.351	4.2	312.00	314.90
	2	0.355	4.2	315.56	
	3	0.333	4.5	317.14	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*

อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ (องศาเซลเซียส)	ชุดการทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสง 474 นาโนเมตร	ปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)	ปริมาณสารแอสตาแซนทินเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
30	1	0.174	4.7	173.08	174.88
	2	0.216	3.8	173.71	
	3	0.191	4.4	177.86	
35	1	0.321	4.1	278.54	280.10
	2	0.317	4.2	281.78	
	3	0.294	4.5	280.00	
40	1	0.323	4.5	307.6 2	314.27
	2	0.361	4.1	313.25	
	3	0.382	3.9	315.30	
45	1	0.399	4.3	308.51	303.06
	2	0.317	4.6	305.69	
	3	0.338	4.2	300.44	
50	1	0.174	3.8	139.94	144.19
	2	0.162	4.1	140.57	
	3	0.167	4.2	148.44	
60	1	0.000	4.2	0.00	0.00
	2	0.000	4.4	0.00	
	3	0.000	3.9	0.00	
70	1	0.000	4.5	0.00	0.00
	2	0.000	3.8	0.00	
	3	0.000	4.1	0.00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* โดยใช้เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans*

เวลาที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ (นาที)	ชุดการทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสง474 นาโนเมตร	ปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)	ปริมาณสารแอสตาแซนทินเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
5	1	0.244	4.3	222.05	230.54
	2	0.249	4.4	231.87	
	3	0.242	4.6	235.59	
10	1	0.380	3.8	305.61	305.04
	2	0.345	4.2	306.67	
	3	0.318	4.5	302.85	
15	1	0.350	4. 2	311. 11	314.84
	2	0.360	4.1	312.38	
	3	0.350	4.3	318.52	
20	1	0.346	4.4	322. 20	317.67
	2	0.339	4.5	322. 86	
	3	0.395	3.8	317.67	
25	1	0.388	3.9	329.25	332.64
	2	0.346	4.4	332.20	
	3	0.355	4.3	333.07	
30	1	0.393	4.0	332.69	334.01
	2	0.350	4.5	333.33	
	3	0.378	4.2	336.00	
45	1	0.388	4.1	336.68	335.04
	2	0.399	4.0	337.78	
	3	0.372	4.2	330.66	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้