สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 สำหรับการย่อยผนังเซลล์ของยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* และการสกัดสารแอสตาแซนทิน

นิติมา บุศย์สะสม

ปวริศา จันทร์ป้อง

QH
545
.B87
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83749
วัน,เดือน,ปี 15 ก.ย. 2551

b 11947743
i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lytic-enzyme production of *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 for yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* cell wall and astaxanthin extraction

Nitima Butsasom

Pawarisa Chanpong

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 Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 สำหรับการย่อยผนังเซลล์ของยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* และการสกัดสารแอสตาแซนทิน
นักศึกษา	นางสาวนิติมา บุศย์สะสม
	นางสาวปวริศา จันทร์ป้อง
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิดาภา ทิน้อย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	
กรรมการ	ดร. จิดาภา ทิน้อย	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 สำหรับการย่อยผนังเซลล์ของยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* และการสกัดสารแอสตาแซนทิน

นักศึกษา นางสาวนิติมา บุศย์สะสม

นางสาวปวริศา จันทร์ป้อง

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. จิดาภา ทิน้อย

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.45 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 24.53 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง และเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 ในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสเท่ากับ 4.5 $x10^{-5}$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ให้ได้มากที่สุดคือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายเซลล์ยีสต์เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาทีจะได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 59.04 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดด้วยวิธี DMSO พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 คิดเป็นร้อยละ 13 ของปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธีการสกัดด้วย DMSO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project name Lytic-enzyme production of *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 for yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* cell wall and astaxanthin extraction

Name Miss Nitima Butsasom

Miss Pawarisa Chanpong

Department Applied Biology

Program Industrial Microbiology

Academic year 2007

Special project adviser Dr. Jidapha Tinoi

Abstract

Production of astaxanthin from *Xanthohyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 were investigated at pH 7.0, 20 $^{\circ}$C and agitation rate of 200 rpm in YM medium. The highest cell dry weight content was 4.45 g/L at 72 h and the highest astaxanthin content was 0.28 mg/L or 24.53 mg/L at 84 h after incubation. To extract astaxanthin, *X. dendrorhous* cell wall disrupted using lytic enzyme from *Trichoderma harzianum* TISTR 3553. Glucanase activity was 4.5 x 10^{-5} U/mL. The optimal conditions for astaxanthin extraction using lytic enzyme from *T. harzianum* was the initial concentration of 10 mg/mL *X. dendrorhous* cell suspension, 5 mL lytic enzyme solution at 45 $^{\circ}$C and 45 min. The result was 59.04 µg astaxanthin per g dry cell weight. The efficiency of astaxanthin extraction using lytic enzyme from *T. harzianum* was 13% campared with extraction using DMSO.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. จิดาภา ทิน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษนี้ ซึ่งได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในการแก้ปัญหาและความอนุเคราะห์ต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล ประธานคณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้ดูแลและให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำ และได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษนี้นี้

ขอขอบพระคุณ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่ได้ให้ความกรุณาเอื้อเฟื้อและสอนวิธีการใช้เครื่องโฮโมจิไนเซอร์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอนและให้ความรู้ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ ในการทำโครงงานพิเศษ

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

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่ในการทำโครงงานพิเศษจนบรรลุไปได้ด้วยดี

นางสาวนิติมา บุศย์สะสม
นางสาวปวริศา จันทร์ป้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin)	5
2.1.1 การสังเคราะห์แอสตาแซนทิน (astaxanthin biosynthesis)	5
2.1.2 สมบัติทั่วไปของสารแอสตาแซนทิน	9
2.1.3 บทบาทและความสำคัญของสารแอสตาแซนทินในอุตสาหกรรมต่าง	9
2.1.4 แหล่งที่พบสารแอสตาแซนทิน	10
2.1.5 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous*	11
2.1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*	15
2.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*	18
2.2.1 เอนไซม์กลูคาเนส	19
2.2.2 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase)	27
2.2.3 เอนไซม์เซลลูเลส	39
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	46
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	46
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	46
3.2.1 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์	46
3.2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	46
3.3 สารเคมี	46
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์	47
3.5 วิธีการทดลอง	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทิน
จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 47

3.5.2 การผลิตเอนไซม์ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์
จากเชื้อ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 49

3.5.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์
ของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 50

3.5.4 การย่อยผนังเซลล์ยีสต์เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้ 52

บทที่ 4 ผลการทดลอง 54

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทิน
จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 54

4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 54

4.1.2 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 56

4.2 การผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เพื่อใช้ในการย่อย
ผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 57

4.3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์
X. Dendrorous TISTR 5730 ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum*
TISTR 3553 58

4.3.1 ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553
ที่เหมาะสม ในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์
X. dendrorhous TISTR 5730 58

4.3.2 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* TISTR 5730 เริ่มต้นที่มีผลต่อ
การสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจาก
เชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 60

4.3.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ
X. dendrorhous TISTR 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.4 ผลของเวลาในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 64

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 67

5.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินโดยเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 3553 67

5.2 การสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 68

เอกสารอ้างอิง 71

ภาคผนวก ก 74

ภาคผนวก ข 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene, เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มแซนโทฟิลล์บางชนิด	5
2	ขั้นตอนการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากกรดเมวาโลนิก	6
3	แสดงการสังเคราะห์แอสตาแซนทินแบบซิสและทรานส์	7
4	โคโลนีของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*	10
5	เซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous*	11
6	แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส	25
7	การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส	26
8	การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส	27
9	การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟอรีเลส	28
10	การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	29
11	การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง	29
12	ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อยเบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส ที่ต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อยเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป	36
13	รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป	37
14	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เซลลูเลส	39
15	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที	52
16	ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที	53
17	ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 แตกต่างกัน	55
18	แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR5730 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553	58
20	แสดงเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. Dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของไฮโดรเลส	17
2	ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus circulans* WL-12	19
3	การทำงานของเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase I ที่มีต่อสารตั้งต้นในกลุ่ม cellulosic	20
4	ความจำเพาะกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase บริสุทธิ์ที่ผลิตได้จาก *A.brsiliensis* โดยทำการทดลองกับสารตั้งต้นประเภท β – glucan หลายชนิด	21
5	เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสในกระบวนการหมัก	38
6	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่เวลาต่าง ๆ กัน	51
7	ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที	52
8	ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* TISTR 5730	55
9	แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้โดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างกัน	56
10	แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553	58
11	แสดงเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 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) สารแอสตา-แซนทินสามารถผลิตได้จากเชื้อยีสต์ เช่น *Xanthophyllomyces dendrorhous* ชื่อเดิมคือ *Phaffia rhoduzyma* จากการศึกษาพบว่า *X. dendrorhous* เป็นเชื้อยีสต์ที่มีสีแดงที่สามารถผลิตสารแอสตาแซน-ทินได้มากถึงร้อยละ 80-90 ของปริมาณสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่เชื้อผลิตได้ ในการผลิตสารแอสตา-แซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* พบว่ามีข้อจำกัดคือ ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ใน สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) สามารถผลิตได้ในปริมาณที่น้อยมาก 200-300 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์ (Johnson, 1995) และนอกจากนี้ผนังเซลล์ของเชื้อยังมีความหนาและเหนียวมาก เนื่องจากประกอบด้วยกลูแคน (glucan) ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ของกลูโคสซึ่งมีมวลโมเลกุลสูง ทำให้ยากต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ ทำให้ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีปริมาณต่ำ

สำหรับการศึกษาในด้านการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* โดยการหาวิธีการต่างๆ ที่จะสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ให้ได้มากที่สุด ได้แก่ การใช้สารเคมี เช่น กรดไฮโดรคลอริก เมทานอล เอทานอล อะซีโตน เป็นต้น พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถสกัดสารออกมาได้เพียงเล็กน้อยและมีปัญหาทางด้านการนำไปใช้งาน สำหรับการใช้กรดและด่างในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ พบว่าวิธีนี้สามารถทำให้เซลล์แตกได้แต่ว่ากรดและด่างจะยังคงหลงเหลืออยู่และมีผลทำให้สารแอสตาแซนทินเกิดการเปลี่ยนรูปและสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากสารแอสตาแซนทินถูกออกซิไดซ์ไป และการใช้สารเคมีต่างๆในการแยกสารแอสตาแซนทินออกมานั้นจะมีผลทำให้เกิดการตกค้าง เนื่องจากการสารแอสตาแซนทินในเชิงอุตสาหกรรมนั้น ส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารและอาหารสัตว์และนำไปเติมเป็น food additive ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ให้ได้มากที่สุดและมีความปลอดภัยเหมาะกับการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมทางอาหารได้ ดังนั้นการย่อยผนังเซลล์โดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินได้

ในการประยุกต์ใช้เอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์ยีสต์ เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ พบว่าได้มีการศึกษามีการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ด้วย lytic enzyme ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสาร β – 1,3-glucan และ β – 1,6- glucan ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ Actenomycete *Streptomyces rochei* สายพันธุ์ PHA -34 พบว่าสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์และสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ได้ (Yoshida และคณะ, 1997) ต่อมาได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียด้วย โดยFrank และคณะ (1975) ได้ใช้ β –(1⟶3)-glucanase ซึ่งเป็น lytic enzyme ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus circulans* WL-12 โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus circulans* ในอาหาร mineral medium ร่วมกับ ผนังเซลล์ของยีสต์หรือสารประกอบกลูแคนของยีสต์ที่เป็นแหล่งของคาร์บอน เป็นผลให้มีการสร้าง β – glucanase 5 ชนิด โดยมีเอนไซม์กลูคาเนสที่สำคัญคือ β –(1⟶3)-glucanase I และ II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะย่อยผนังเซลล์ยีสต์

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

นอกจากนี้พบว่าการเหนี่ยวนำการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *B. circulans* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของผนังเซลล์ของเชื้อ *X. dendrorhous* หากมีการเติมผนังเซลล์ 2.5 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการชักนำการย่อยสลายของเอนไซม์ได้สูงที่สุด โดยระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนแรกจะมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินมากกว่าการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 2 โดยในขั้นแรกสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ในปริมาณมากที่สุดเมื่อใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* 96 ชั่วโมง และพบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารยีสต์ไนโตรเจนเบส (yeast nitrogen base) จำนวน 45 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ได้สูงที่สุด ซึ่งการผลิตสารแอสตาแซนทินได้ปริมาณ 9010ไมโครกรัมต่อลิตรและเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่มากกว่าหากใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงขั้นแรก และพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารแอสตา-แซนทินในการเลี้ยงแบบผสมคือ 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 34-30 องศาเซลเซียส (Fang และ Wang, 2002)

ในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา พบว่าได้มีการผลิตเอนไซม์ glucanase จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อประยุกต์ใช้ในการย่อยสลาย β – glucan และผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น *Trichoderma harzianum* Rifai และเชื้อ *Botryosphaeria rhodina* พบว่าได้ผลิดเอนไซม์ glucanase เพื่อใช้ในการย่อยผนังเซลล์เชื้อรา และได้ศึกษาการย่อยสารประเภท botryophaeran และ laminarin ซึ่งเป็นประเภทคาร์โบไฮเดรตที่โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส พบว่าเอนไซม์ glucanase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Trichoderma harzianum* Rifai สามารถย่อยสลาย laminarin ได้ 50% เมื่อย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถย่อยได้ 100 % เมื่อทำการย่อยสลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์ β –1,3-glucanase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Botryosphaeria rhodina* พบว่าสามารถย่อย botryophaeran ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันในการย่อยสลายสารทั้งสองชนิดนี้ด้วย (Giese และคณะ, 2006) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการผลิต lytic enzyme จากเชื้อรา *Aspergillus japonicus* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ endo-β – 1,4-glucanase ที่สามารถย่อยสลาย β – glucan และ lichenan ที่เป็นองค์ประกอบของ Barley ได้ (Grishutin และคณะ, 2006)

ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงให้สนใจในการผลิต เอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เพื่อใช้ในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* และสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ให้มากที่สุด โดยจะศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้ในการย่อยผนังเซลล์ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย เพื่อที่จะสามารถสกัดสารออกมาได้มากที่สุด ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการสกัดสารแอสตาแซนทินเพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เป็นการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *T. harzianum* มาใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* และหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์ เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ให้ได้มากที่สุด เป็นการเพิ่มปริมาณการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin)

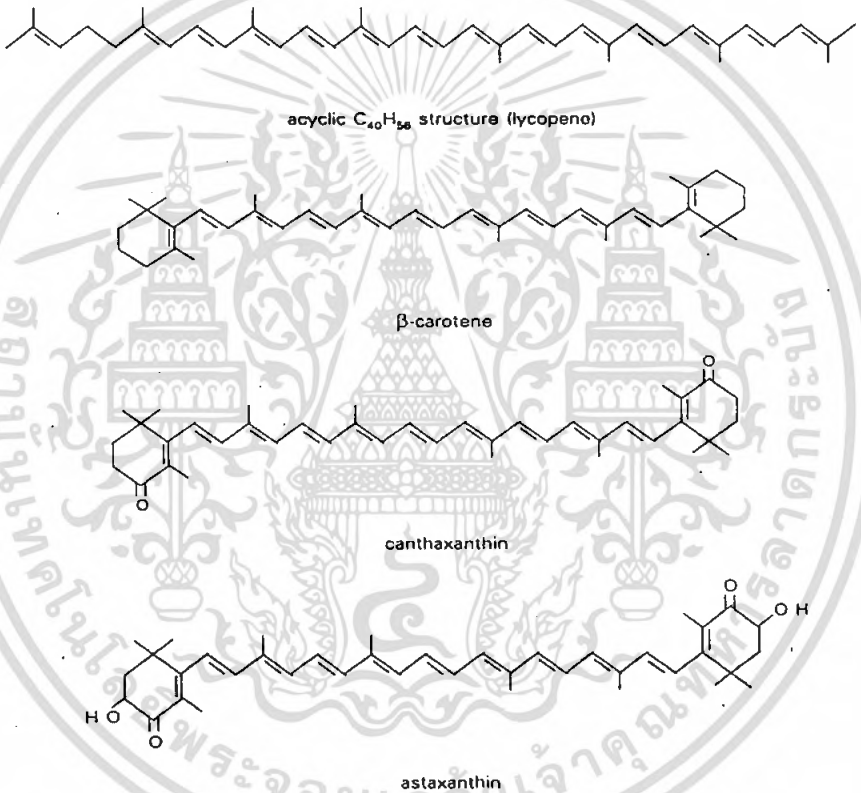
สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) หรือเรียกว่า 3, 3'-dihydroxy - β, β – carotene - 4, 4'-dione จัดอยู่ในกลุ่มสารแคโรทีนอยด์จัดเป็น keto-carotenoid โดย สารแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุของสิ่งมีชีวิตที่พบในธรรมชาติแพร่หลายมากที่สุดทั้งในพืชและสัตว์ โดยสารแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลืองถึงแดง โมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน 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)

การสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินเกิดขึ้นผ่านการสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ โดยทั่วไปสังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid, MVA) จากนั้นมีการรวมตัว (condensation) หัวท้ายของไอโซปรีนไอโซเมอร์ 2 ไอโซเมอร์ของไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต (isopentenyl pyrophosphate, IPP) และไดเมธิลแอลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethyl allyl pyr+ophosphate, 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)

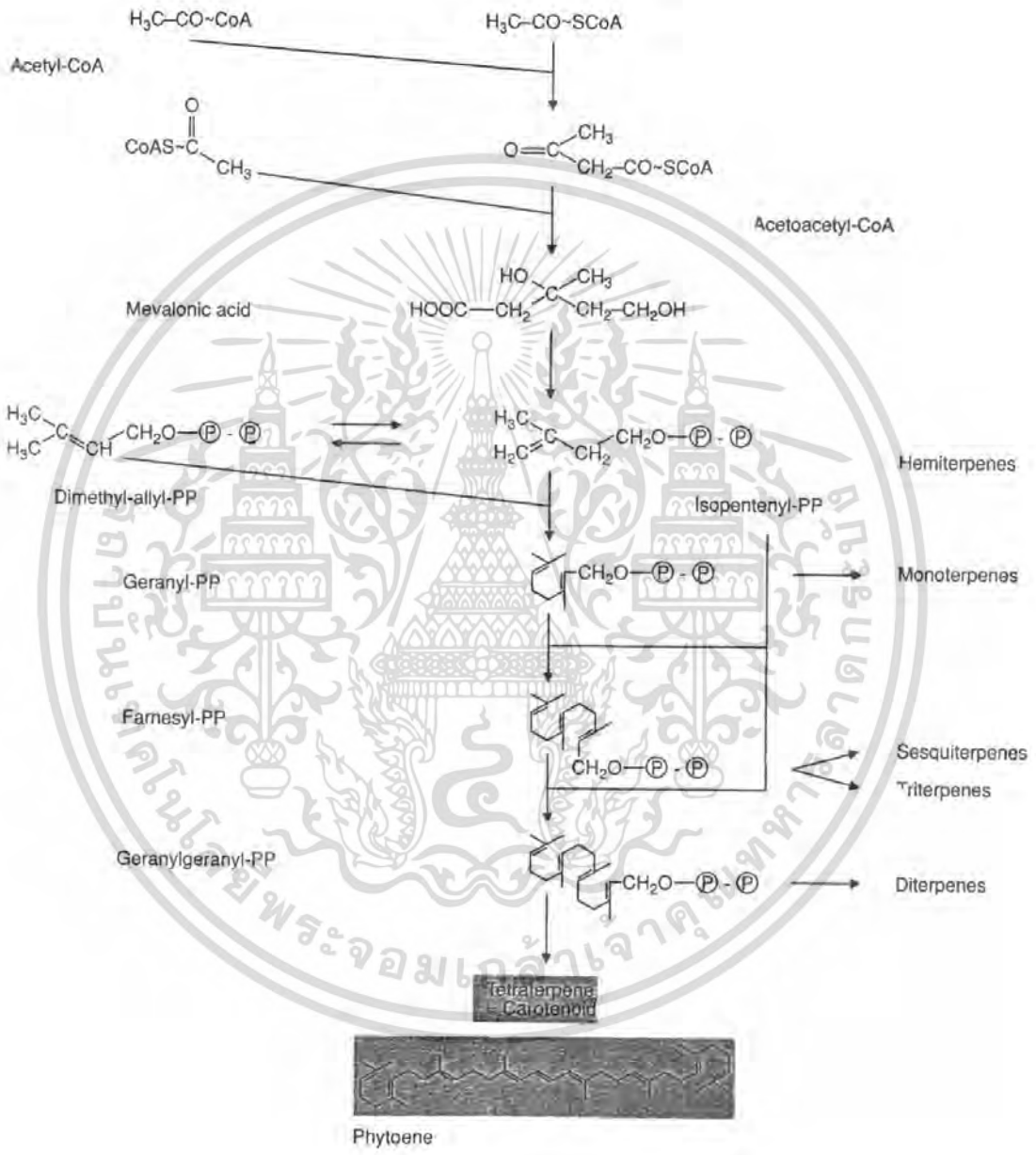
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 ขั้นตอนจะได้สารไลโคปีน (lycopene) และต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น dehydrogenation, cyclization, oxidation และ hydroxylation เป็นต้น (รูปที่ 2) จนสุดท้ายได้สารแอสตาแซนทินที่มีโครงสร้างแบบ trans-astaxanthin และ cis-astaxanthin ดังแสดงในรูปที่ 3



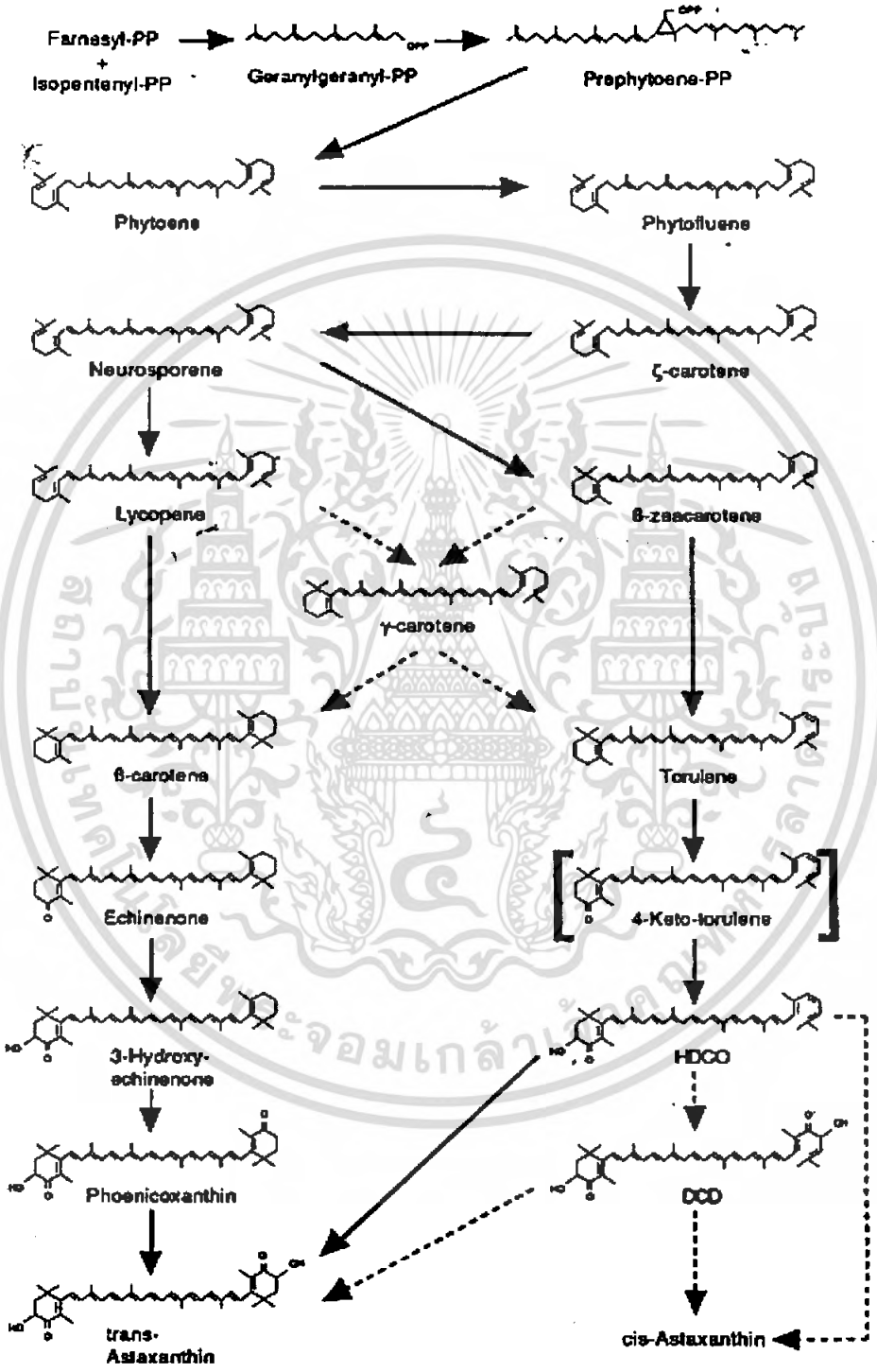
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene, เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มแซนโทฟิลล์บางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากกรดเมวาโลนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงการสังเคราะห์แอสตาแซนทินแบบซิสและทรานส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทและสภาวะแวดล้อมเป็นสุญญากาศหรือก๊าซเฉื่อย 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 รวมทั้งลูกอมและไอศกรีมเป็นต้น(Østerlie,1999) ส่วนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ จะใช้ผสมในอาหารสัตว์ เช่น อาหารปลา อาหารสุกร อาหารโค รวมทั้งอาหารสัตว์ปีก ซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้มีสีสันเป็นที่น่าสนใจต่อการบริโภค สารแอสตาแซนทินเป็นสารที่ให้ผลดีต่อสัตว์ เช่น ไก่ที่เลี้ยงเป็นการค้าจะมีการเติมสารแอสตาแซนทินลงไปเพื่อเพิ่มสีในไข่แดง เพิ่มการสร้างไข่ของไก่ เพิ่มการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของลูกไก่และลดการตายเนื่องจากการติดเชื้อในถุงไข่แดง (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 เปอร์เซ็นต์ ในปี 1992 เป็น 16 เปอร์เซนต์ในปี 1996 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากธรรมชาติโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ พบว่า 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 ตลอดจนการ

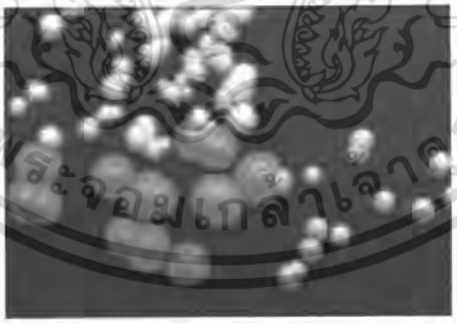
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกกระบวนการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อชนิดนี้

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 และชั้นนอกค่อนข้างกระจาย และมีผนังกั้นเส้นใยเป็นรูปแบบธรรมดาที่มีผนังเซลล์ยื่นเข้าไปตรงกลางรู

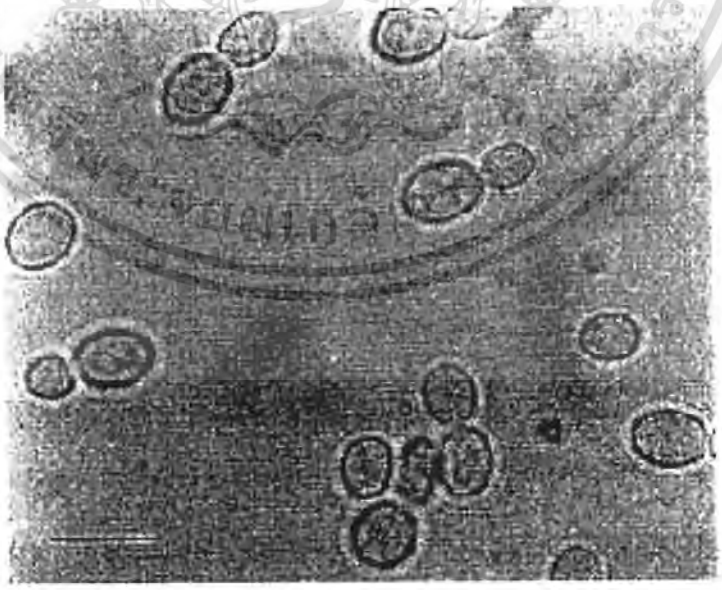


รูปที่ 4 โคโลนีของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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) นอกจากนี้พบส่วนประกอบที่เป็นแมนแนน (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*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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 มีความต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์และ อนินทรีย์ เพื่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้กันมาก คือ แอมโมเนียหรือเกลือแอมโมเนียมและไนเตรต การเจริญเติบโตของเซลล์จะเร็วขึ้นหากใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นสารอินทรีย์เดี่ยว ๆ เช่น กรดอะมิโน สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาค่อนข้างสูง ส่วนแหล่งที่ราคาถูกจะเป็นถั่วเหลือง ถั่วลิสง ปลาป่น เนื้อป่น ข้าวมอลล์ สารสกัดยีสต์ หางนม เคซีน และโปรตีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย

ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะสาร2 ชนิดนี้รวมอยู่ในกระบวนการถ่ายโอนพลังงาน นอกจากนี้เหล็ก โคบอลต์ ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุที่ขาดไม่ได้ มักได้มากับน้ำหรือติดมากับสารตัวอื่น ๆ สารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น กรดอะมิโน หรือวิตามินอาจต้องเติมลงในอาหารเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าขาดเช่นกัน

4. ปัจจัยทางกายภาพ

4.1 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมความเป็นกรดเบส จะมีผลยับยั้งการผลิตสารแอสตาแซนทินดังนั้นการผลิตสารแอสตาแซนทินต้องกระทำในสภาพอาหารที่ไม่มีบัฟเฟอร์ (Goodwin ,1980) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและแอสพาราจีนที่มีค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 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 โดยอาจทำให้เกิดการเสียสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือสูญสลายของสารสีได้ การเจริญและการสร้างรงควัตถุของ *X. dendrorhous* ถูกยับยั้งโดยแสงที่มีความเข้มสูงๆ การสร้างแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *X. dendrorhous* จะถูกชักนำเมื่อมีความเข้มแสงต่ำๆ แสงสีน้ำเงินจะชักนำให้เกิดการสร้างสารสีมากกว่าแสงสีแดง เหลือง หรือแสงสีเขียว เมื่อยีสต์นั้นเจริญบนอาหาร YM agar ที่อุณหภูมิ 7.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

4.4 การเจริญเติบโตและการสร้างรงควัตถุ

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

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 และปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 1.13 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yamane และคณะ, 1997) และการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการเลี้ยงในอาหารที่เป็น alfalfa residue juice ซึ่งมีปริมาณคาร์บอนรวม 25 กรัมต่อลิตรและปริมาณไนโตรเจน 1.45 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Okagbue และ Lewis, 1996) และได้มีการศึกษาโดยการนำเอา molasses มาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* โดย molasses แบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดที่ 1 มีปริมาณคาร์บอนรวม 58.8 กรัมต่อลิตรและชนิดที่ 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 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน และ fresh sugarcane ที่มีปริมาณคาร์บอน 15 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แซนทินได้เท่ากับ 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 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหาร 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 และยังเป็นการเพิ่มความสามารถในการผลิตสารแอสดาแซนทินด้วย ได้มีการนำกากน้ำตาล (Haard, 1998) ไฮโดรไลเสต ของพีช(Martin และคณะ, 1993) น้ำองุ่น (Meyer และคณะ, 1993) ไฮโดรไลเสตของเฮมิเซลลูโลสจาก ยูคาลิปตัส (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) และต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้น้ำอ้อยในการผลิตสารแอสตา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

แซนทิน 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 6170ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อมีปริมาณน้ำตาลในอาหารซึ่งได้จากน้ำผลอินทผลัม 22.4 กรัมต่อลิตร การใช้อาหารที่มีน้ำผลอินทผลัมสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงขึ้น 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 ซึ่งสูงกว่าการผลิตโดยใช้สภาวะเดิมเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินวิธีหนึ่ง

จากการศึกษาพบว่า ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* อย่างกว้างขวางทั้งนี้เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตให้สูงขึ้น โดยการนำการพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตรวมถึงการนำของเหลือทิ้งจากโรงงาน อุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญเติบโตและให้มีการกระตุ้นการผลิตสาร แอสตาแซนทินให้สูงขึ้นดังได้กล่าวมาข้างต้น

นอกจากนี้ข้อจำกัดในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ไม่กว้างขวางในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์มีความหนาและเหนียวมากทำให้ไม่สามารถสกัดหรือสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจากเซลล์ได้น้อย ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาให้ได้มากที่สุด จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะทำให้ได้ปริมาณของสาร แอสตาแซนทินสูงสุด โดยการศึกษาการใช้ supercritical fluid extraction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83749

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 ต่อมาได้มีการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ โดยการใช้กรดในการสกัด พบว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง พบว่า สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ แต่การใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นสูง จะทำให้สารแอสตาแซนทินเกิดการสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอื่น ทำให้คุณสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารแอสตาแซนทินลดลง ดังนั้นการสกัดสารแอสตาแซนทินเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูงและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารแอสตาแซนทินน้อย จึงเป็นวิธีที่ดีที่นำมาประยุกต์ใช้ ในปัจจุบันได้ให้ความสนใจในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในการสกัดสารแอสตาแซนทินโดยการเติมเอนไซม์ลงไปเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์ จึงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อหาชนิดของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาให้ได้ปริมาณที่สูงที่สุด

2.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous*

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* คือเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) โดยปฏิกิริยาของไฮโดรเลสจะมีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้องในการสลายพันธะ และพบว่า OH ของน้ำเท่านั้นที่มีส่วนในการสลายพันธะของสับสเตรต ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีทั้งสิ้น 641 ชนิด แบ่งเป็นหลายชนิดตามลักษณะพันธะของสับสเตรตที่ถูกย่อยสลาย ตามตารางที่ 1 ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ชนิดของไฮโดรเลส

EC No.	ลักษณะของปฏิกิริยา (ชนิดเอนไซม์)	จำนวนเอนไซม์
EC 3.1	Acting on ester bonds (Esterase) ได้แก่ ไลเปส เพกทินเอสเทอเรส ซึ่งสลายพันธะเอสเทอร์ในลิปิด	195
EC 3.2	Acting on glycosyl bonds (Glycosidases)	118
EC 3.3	Acting on ether bonds	8
EC 3.4	Acting on peptide bonds (Protease)	156
EC 3.5	Acting on C-N bonds other than peptide bonds เช่น ยูริเอสสลายยูเรีย	109
EC 3.6	Acting on acid anhydride bonds	40
EC 3.7	Acting on C-C bonds	6
EC 3.8	Acting on halide bonds	5
EC 3.9	Acting on P-N bonds	1
EC 3.10	Acting on S-N bonds	2
EC 3.11	Acting on C-P bonds	1

ที่มา : ปราณี อ่านเปรื่อง , 2547

2.2.1 เอนไซม์กลูคาเนส

2.2.1.1ชนิดของเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนส (glucanase)จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) โดยส่วนใหญ่เอนไซม์กลูคาเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่พบในสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตประเภทกลูแคน (glucan) ซึ่งโครงสร้างของกลูแคนจะมีลักษณะเป็นโมโนแซ็คคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคส จัดเรียงตัวต่อกันเป็นเส้นตรงไม่มีกิ่งก้านเชื่อมต่อด้วยพันธะ1,3 และ 1,4- β–glycosidicเอนไซม์กลูคาเนสที่พบในปัจจุบันสามารถแยกได้หลายชนิด ได้แก่endo-1,3- β-glucanase (E.C.3.2.1.39) จะย่อยเฉพาะพันธะ 1,3- β -glycosidic ซึ่งเป็นพันธะที่พบในสารตั้งต้นประเภทกลูแคน exo-1,4- β-glucanase (E.C.3.2.1.74)) จะย่อยเฉพาะพันธะ 1,4- β -glycosidic สำหรับ endo-1,3-1,4- β-glucanase (E.C.3.2.1.73) สามารถย่อยทั้งพันธะ 1,3 และ 1,4- β -glycosidic ส่วน endo-1,6- β-glucanase(E.C.3.2.1.75) จัดเป็นเอนไซม์กลูคาเนสที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยพันธะ 1,6-β -glycosidic ใน pustulan ซึ่งเป็นกลูแคนชนิดหนึ่งที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของไลเคน Umbilicaria pustulata นอกจากนี้เอนไซม์ endo-1,2- β-glucanase (E.C.3.2.1.71) สามารถย่อยบริเวณพันธะของสารตั้งต้นที่จัดอยู่ในกลุ่มของกลูแคนและ endo-1,4-β-glucanase (E.C.3.2.1.4) จะย่อยบริเวณพันธะ 1,4- β -glycosidic ใน cellulose

2.2.1.2 การจำเพาะของเอนไซม์กลูคาเนสต่อสารตั้งต้น

ในการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสพบว่าจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีสารตั้งต้นนั้นจะใช้สารตั้งต้นหลายชนิดที่โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่แตกต่างกันไป

ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ β -1,3-glycosidic จะย่อยเฉพาะสารตั้งต้นที่โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,3-glycosidic ได้แก่ laminarin, bakers' yeast glucan, baker's yeast cell wall, periodate oxidized laminarin, pachyman และ oat glucan และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเอนไซม์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้น เช่น สารตั้งต้นที่เป็นสารสามินารินจะถูกเอนไซม์ย่อยไปเป็นlaminarihexose ซึ่งเป็น oligosaccharide จากนั้นเอนไซม์จะย่อยต่อไปได้เป็น laminaritriose , laminaribiose , glucose และ gentiobiose ตามลำดับแต่หากสารตั้งต้นเป็นกลูแคนหรือผนังเซลล์ของ เบเกอร์ยีสต์(baker's yeast) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์กลูคาเนสคือ laminaritriose , glucose และ laminaribiose แต่จะไม่เกิด gentiobiose ขึ้นเลย (Rombouts และคณะ, 1976)

ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่าเอนไซม์ β-1,3-glucanase นั้นยังมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นอีกหลายชนิด ซึ่งสารตั้งต้นชนิดใหม่ที่ได้มีการศึกษาแล้วว่ามีความจำเพาะกับเอนไซม์ β-1,3-glucanase คือ botryosphaeran ซึ่งเป็น exopolysaccharide ชนิด β-1,3-1,6-D-glucanase ผลิตได้จากเชื้อ *Botryosphaesria rhodina* และ *Trichoderma harzianum* Rifai แต่ botryosphaeran ที่ผลิตได้จาก *T. harzianum* นั้นจะถูกเอนไซม์ย่อยได้ดีกว่าที่ผลิตได้จาก *B. rhodina* เล็กน้อย (Giese และคณะ, 2005)

แต่หากเป็นเอนไซม์กลูคาเนสชนิดβ-1,4-glucanase นั้นพบว่าจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกับ เอนไซม์ β-1,3-glucanase โดยสารตั้งต้นที่นำมาใช้การวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์ที่มีต่อสารตั้งต้นนั้นเป็นสารตั้งต้นที่อยู่ในกลุ่มของ cellulosic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus circulans* WL-12

Substrate	Main linkage type	Hydrolysis
Laminarin	β-1,3	+
Laminaritriose	β-1,3	+
laminaribiose	β-1,3	-
Glucan (*S. cerevisiae*)	B-1,3 : β-1,6	+
Cell walls (*S. cerevisiae*)	B-1,3 : β-1,6	+
Periodate oxidized laminarin	β-1,3	+
Pachyman	β-1,3	+
Oat glucan		+
Cellulose dextrins	β-1,4	-
Pseudonigeran	α-1,3	-
Dextran	α-1,6	-
Amylose	α-1,4	-
Yeast mannan	α-1,6 : α-1,3 : α-1,2(mannose)	-
Phosphomamnan (*H. holstii*)	α-1,3 : α-1,2(mannose)	-
Sucrose	-	-
Methyl-β-D-glucoside	-	-
Phenyl-β-D-glucoside	-	-
p-Nitrophenyl-β-D-glucoside	-	-
p-Nitrophenyl-α-D-glucoside	-	-
p-Nitrophenylphosphate	-	-
Azocoll	-	-

ที่มา : Rombouts และคณะ, 1976

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การทำงานของเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase I ที่มีต่อสารตั้งต้นในกลุ่ม cellulosic

Substrate	Enzyme activity (U mg^{-1} protein)
Hydroxyethylcellulose	68.2
CMC (DS = 0.65 , DP = 500)	70.5
Filter paper (Whatman No. 1)	3.2
Avicel SF	6.9
MN300	6.7
Xylan	92.7
Insoluble cello-oligosaccharide (DP = 20)	3.2
Cellohexaose (DP = 6)	12.2
Cellopentaose (DP = 5)	36.2
Cellotetraose (DP = 4)	40.2
Cellotriose (DP = 3)	<0.001 (ND)
Cellobiose (DP = 2)	<0.001 (ND)
Salicin	<0.001 (ND)
pNPC	0.17
$MeUmb(Glc)_2$	0.12
pNPX	(ND)
pNPG	(ND)

ที่มา : Kim, 1995

จากการศึกษาเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase I ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* พบว่าจะทำงานได้ดีเมื่อทำการย่อยสลายคาบอกซิเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose, CMC) , กระดาษกรอง (Whatman No. 1) , Avicel , MN300 , xylan และ Insoluble cellooligosaccharide โดยการทำงานของเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase I จะทำงานย่อยสลายต่อไซ-แลน (xylan) ของต้นเบิร์ช (birch) มากกว่าไซแลนที่ได้จากข้าวโอ๊ต (oat) (Kim, 1995)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *A.brsiliensis* โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ความจำเพาะกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ β-1,3-glucanase บริสุทธิ์ที่ผลิตได้จาก *A.brsiliensis* โดยทำการทดลองกับสารตั้งต้นประเภท β – glucan หลายชนิด

Substrate	Main linkage	Relative activity of β-1,3-glucanase (%)
Laminarin	β -1,3	100 ± 0.3
ABPSG	β -1,3 and β -1,6	24.5 ± 1.7
Oat glucan	β -1,3 and β -1,4	15 ± 1.5
Barley glucan	β -1,3 and β -1,4	8 ± 1.1
Lichenan	β -1,3 and β -1,4	0 ± 0.0
Pustulan	β -1,3 and β -1,6	4 ± 1.3
Chitosan	β -1,4	0
Carboxymethykcellulose	β -1,4	0
Amylose	α -1,4	0
p-Nitrophenyl- β-D-glucapyranoside		0

ที่มา : Shu และคณะ, 2006

2.2.1.3 แหล่งที่พบเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น จากพืช สัตว์ หรือ จุลินทรีย์ ดังนี้

พืช

เอนไซม์กลูคาเนสมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารอาหารสำรองภายในเซลล์ของพืชและเมื่อถูกรุกรานจากการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค พืชจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นภายในเซลล์โดยจะผลิตเอนไซม์กลูคาเนสออกมาเพื่อใช้ป้องกันตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ตัวอย่างพืชที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้เช่น ยาสูบ (Benhamou, 2002) , พืชตระกูลส้ม (Sanchez-ballesta และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัตว์

สัตว์ไม่มีกระดูสันหลังบางชนิดจะใช้เอนไซม์กลูคาเนสในการย่อยสลายสารอาหาร สัตว์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น mollusks (Shallenberger และคณะ, 1974)

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูคาเนสได้มีหลายชนิดได้แก่เห็ดรา (fungi) ยีสต์และแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าเห็ดราจะสร้างเอนไซม์กลูคาเนสในระยะที่มีการแบ่งเซลล์หรือระยะแตกหน่อ โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารอาหารสำรองภายในเซลล์ของเห็ดรา เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้เช่น *Penicillium janthinellum* (Rapp และคณะ, 1981) , *Trichoderma longibrachiatum* (Tangarone และคณะ, 1989) และ *Acremonium* sp. (Jayus และคณะ, 2002) นอกจากเชื้อราแล้วยังมีเห็ดบางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้เช่น *Agaricus brasiliensis* (Shu และคณะ, 2006)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้โดยเอนไซม์ กลูคาเนสที่ยีสต์ส่วนใหญ่ผลิตออกมานั้นมีทั้ง exoglucanase และ endoglucanase ตัวอย่างยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *Saccharomyces cerecisiae* (Santos และคณะ, 1979) และ *Schizosaccharomyces japonicas* var. *versatilis* (Kopecka และคณะ, 1995)

แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสในระดับอุตสาหกรรมนั้นนิยมทำการผลิตจากเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้รวดเร็วการแยกตัวเซลล์อกจากเอนไซม์ทำได้ง่ายและแบคทีเรียบางชนิดผลิตเอนไซม์แล้วสามารถปล่อยออกมานอกเซลล์ได้จัดเป็น Extracellular enzyme ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์เพื่อนำมาใช้งานได้ง่าย แบคทีเรียที่สามาถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้มีหลายชนิดเช่น *Escherichia coli* (Beshay และคณะ, 2003) , *Bacillus subtilis* (Leelasuphakul และคณะ, 2006) เป็นต้น

2.2.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

1. ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง คือประมาณ 40 องศาเซลเซียสขึ้นไป (Tangarone และคณะ, 1989 ; Aono และคณะ, 1992 ; Leelasuphakul และคณะ, 2006) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต ซึ่งพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเห็ด *Agaricus brasiliensis* นั้นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Shu และคณะ, 2006) แต่ถ้าเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อราคุณสมบัติของเอนไซม์จะแตกต่างจากเห็ด เช่น เอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 55 องศา-เซลเซียส ถ้าเป็นเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียโดยจากเชื้อ *B. circulans* นั้น พบว่าทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงคือประมาณ 50-70 องศาเซลเซียส (Rombouts และคณะ, 1976 ; Aono และคณะ, 1996) ส่วนเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานนั้นจะมีค่าเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (Leelasuphakul และคณะ, 2005)

2. ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนสจะทำงานได้ดีที่ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน หรือ ด่างอ่อน โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4.0-8.0 (Tangarone และคณะ, 1989 ; Aono และคณะ, 1992) ซึ่งลักษณะการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์กลูคาเนสและจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิต ส่วนเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเห็ดรา เช่นเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจาก *A. brasiliensis* จะมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 4.5 (Shu และคณะ, 2006) และเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *T. longibrachiatum* มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันคือ 4.8 (Tangarone และคณะ, 1989) แต่สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* จะมีค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมที่เท่ากับ 6.5 (Aono และคณะ , 1992) ส่วนเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. subtilis* พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 (Leelasuphakul และคณะ, 2006)

3. ผลของสารกระตุ้นและสารยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

ในการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสนั้นจะถูกกระตุ้นและถูกยับยั้งได้จากสารเคมีโลหะไอออนบางชนิด จากการศึกษาพบว่าสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสได้ดีที่สุดคือ $HgCl_2$ และ Hg^+ โดยสารประกอบ $HgCl_2$ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสดีกว่าอยู่ในรูปของไอออน Hg^+ เล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีสารเคมีและไอออนอีกหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนสได้ ตัวอย่างเช่น Fe^{2+} , Cu^{2+} (Shu และคณะ, 2006) , $MnCl_2$, $KMnO_4$ และ *N*-Bromosucinimide (Tangarone และคณะ, 1989) แต่ยังมีสารเคมีและไอออนบางตัวที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นได้ เช่น Ca^+ , Zn^{2+} และ K^+ (Shu และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์กลูคาเนส

เอนไซม์กลูคาเนสสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดโดยเชื้อแต่ละชนิดนั้นจะผลิตเอนไซม์กลูคาเนสต่างชนิดกันรวมทั้งใช้สภาวะในการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ เช่น *T. longibrachiatum* จะผลิตเอนไซม์ endo-1,3-β-D-glucanase หรือ Laminarinase โดยผลิตในอาหารเหลว basal medium ที่ประกอบด้วยกลูโคสร้อยละ 2 และเกลือ ในการผลิตนั้นจะใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้สภาวะต่างๆดังนี้คือ ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศา-เซลเซียส อัตราเร็วของใบกวน 200 รอบต่อนาที และทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน (Tangarone และคณะ, 1989) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราชนิดอื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้เช่น *P. janthinellum* เชื้อชนิดนี้จะผลิตเอนไซม์ β-1,4-glucanase หรือ Avicelase ซึ่งในการผลิตต้องมีการเติมสารชักนำ (inducer) จำพวก Avicelase ลงไปด้วยและทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว basal medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน (Rapp และคณะ, 1981) เชื้อรา *Acremonium* sp. จัดเป็นเชื้อราอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ได้มีผู้นำมาศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ กลูคาเนส โดยสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Acremonium* sp IMI 383068 เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 2 ชนิด คือ β-1,3-glucanase และ β-1,6-glucanase การผลิตเอนไซม์จะใช้อาหารเหลวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน (Jayus และคณะ, 2002)

จุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้คือยีสต์ โดยมียีสต์หลายชนิดที่ได้มีผู้นำมาศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสเช่น *S. cerecisiae* สามารถผลิตเอนไซม์ exo-β-1,3-glucanase ในการผลิตจะใช้อาหารเหลว YED medium และเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยในการทดลองจะศึกษาเชื้อ *S. cerecisiae* 2 สายพันธุ์ คือ S288C และ A158 แล้วนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มาศึกษาอุณสมบัติต่างๆ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จากเชื้อ *S. cerecisiae* S288C นั้นมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นพวกลามินาริน (Laminarin) มากกว่าสารตั้งต้นพวกพูสทูแลน (pustulan) แต่เชื้อ *S. cerecisiae* A158 นั้นจำเพาะกับสารตั้งต้นจำพวกลามินารินเพียงชนิดเดียวโดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารต้งต้นที่เป็นพูสทูแลน (Santos และคณะ, 1979) นอกจากนี้ S. japonicus var. versatilis สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้โดยผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ 2 ชนิดคือ exo-β-1,3-glucanase และ endo-β-1,3-glucanase (Fleet และคณะ, 1975)

ขณะเดียวกันได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อแบคทีเรียด้วยซึ่งพบว่าได้มีการศึกษาเป็นจำนวนมากโดยแบคทีเรียที่นำมาศึกษาได้แก่ *E. coli* ที่มีการตัดต่อยีนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. พบว่าสามารผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้ โดยการเลี้ยงในอาหาร TBG (Terrific broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (Beshay และคณะ, 2003) เชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสได้คือ *B. subtilis* ได้มีการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นจำนวนมาก โดย Leelasuphakul และคณะ (2006) ได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสและการทำให้บริสุทธิ์ รวมถึงด้านคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ β-1,3-glucanase ร่วมกับการสกัดต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 ในการผลิตใช้อาหารเหลว nutrient broth โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5วัน จากนั้นนำเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้มาศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวต่างๆพบว่าค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีค่าอยู่ที่ 7.5 และ 40 องศาเซลเซียส

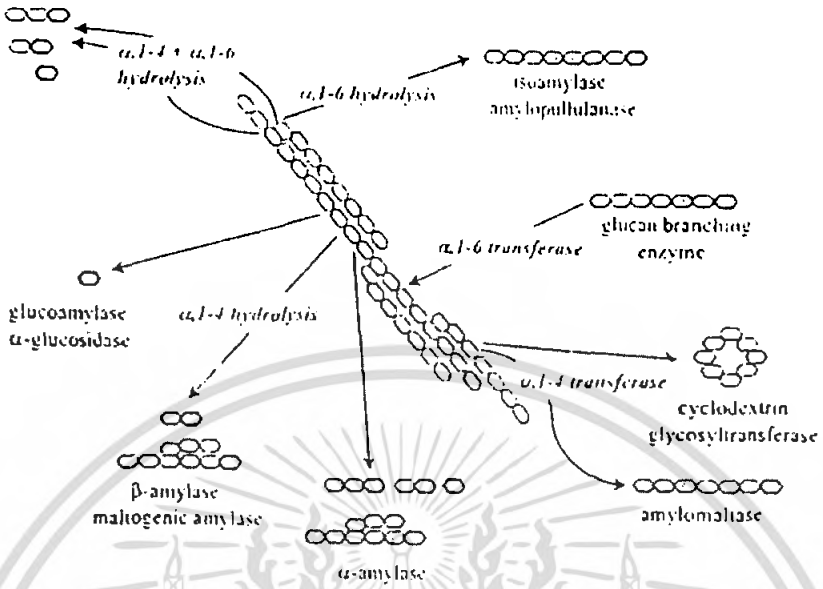
Rombouts และคณะ (1975) ได้ศึกษาถึงการนำเอนไซม์ β-1,3-glucanase ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* WL-12 มาประยุกต์ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์โดยในการผลิตเอนไซม์นั้นจะใช้อาหารเหลว mineral medium ที่มีการเติม alkali-insoluble baker's yeast glucan ลงไปเพื่อชักนำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น

2.2.2 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase)

2.2.2.1 ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์อะไมเลส

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสับสเตรทจำพวกแป้ง ไกลโคเจน ให้ได้เด็กซ์ตริน (dextrin) โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นเอนไซม์ประเภทปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แสดงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส

ที่มา : Van der Marrel (2002)

2.2.2.2 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ในการย่อยสลายแป้งแบ่งออกตามลักษณะการทำงานของเอนไซม์ได้เป็น 3 ประเภท คือ

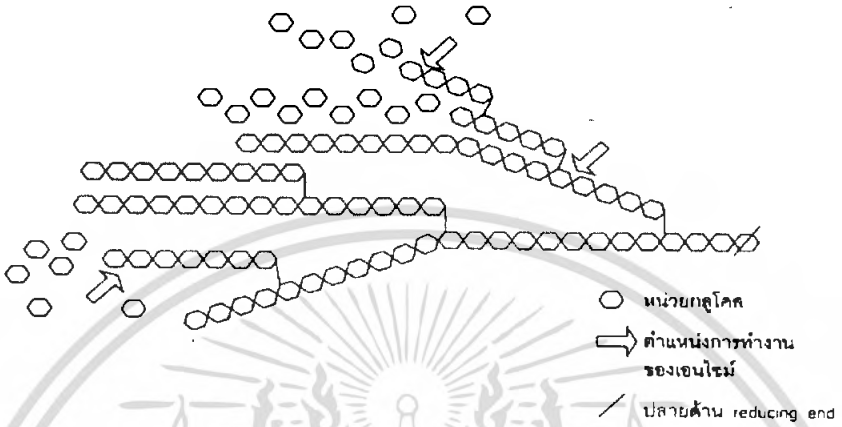
1. เอนไซม์ย่อยภายนอก (exo-enzyme)

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตัดหน่วยของกลูโคสที่เหลืออยู่บริเวณภายนอกของสายพอลิเมอร์ของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น กลูโคส หรือมอลโตส และเด็กซ์ตรินที่มีความยาวจำกัด

- แกรมมาอะไมเลส(γ- amylase) หรือกลูโคอะไมเลส (glucoamylase ; EC 3.2.1.3 ; α(1,4) – glucan glucohydrolase หรือเรียกว่า อะไมโลกลูโคสิเดส (amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะที่จับกันของน้ำตาลกลูโคส ทั้งพันธะแอลฟา-1,4 และพันธะกิ่งแอลฟา-1,6 โดยที่ตัดพันธะกิ่งจะช้ากว่าการตัดพันธะแอลฟา-1,4 (กล้านรงค์, 2546) การตัดสายพอลิเมอร์จะทำการตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่รูปร่างต่างไปจากเดิม คือได้ เบต้าดอนฟิกูเรชัน หรือ เบต้าดีกลูโคส และส่วนของกลูแคนและลิมิตเด็กซ์ตริน ในการย่อยแป้งให้ได้กลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำกิจกรรม เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-100 กิโลดาลตัน มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเสถียรที่พีเอช 3.5-5 และที่อุณหภูมิ ± 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์กลูโคอะไมเลสพบในจุลินทรีย์เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus orysae* และ *Rhizopus* spp. (ปราณี, 2543)

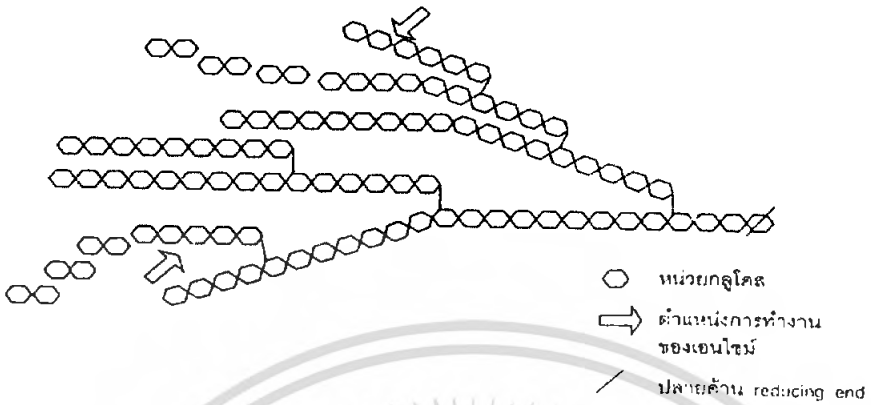


รูปที่ 7 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

- เบต้าอะไมเลส (β – amylase ; EC 3.2.1.2 ; α – (1,4)-glucan maltohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกโมเลกุลของแป้ง แล้วค่อยตัดจากภายนอกเข้ามาใน โดยเริ่มจากปลายสายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน (ปลายด้าน non-reducing end) เอนไซม์จะตัดพันธะแอลฟา-1,4 ของโมเลกุลกลูโคสเป็นคู่ๆไป (กล้าณรงค์, 2546) ผลที่ได้จะเป็นกลูแคน ลิมิตเด็กซ์ตริน และส่วนใหญ่เป็นมอลโตสที่รูปร่างต่างไปจากเดิม คือได้ เบต้าคอนฟีกูเรชัน หรือเบต้ามอลโตส แต่เมื่อปฏิกิริยาเข้าใกล้จุดที่เป็นกิ่งก้านหรือพันธะแอลฟา-1,6 ของอะไมโลเพคติน เอนไซม์จะหยุดกิจกรรม ทำให้เหลือโมเลกุลใหญ่ๆไว้มาก เบต้าอะไมเลสต้องการ Ca^{++} ในการทำกิจกรรม เบต้า-อะไมเลสพบได้ในพืชชั้นสูง เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และพบได้ในถั่ว หรือมันฝรั่งหวาน นอกจากนี้ยังสามารถสกัดเอนไซม์เบต้าอะไมเลสได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas* เอนไซม์จากพืชมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 125-150 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโล-ดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 4-9 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (ปราณี, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



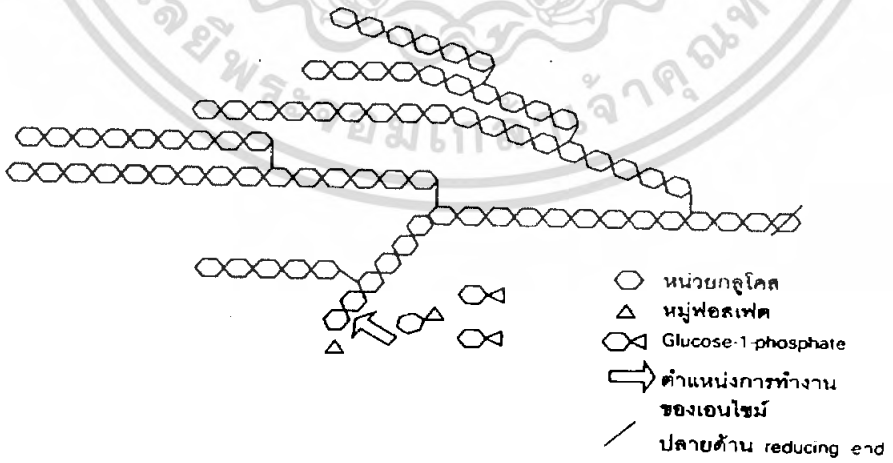
รูปที่ 8 การทำงานของเอนไซม์เบต้าอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

- ฟอสฟอรีเลส (phosphorylase ; EC 2.4.1.1 ; α (1,4) – glucan : orthophosphate glucosyltransferase) เป็นทั้งเอนไซม์สังเคราะห์และย่อยสลาย พบในพืชและสัตว์ ในสภาวะที่มีอินิ-ทรีย์ฟอสเฟต ใช้เอนไซม์ตัวนี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

แป้ง + ฟอสเฟต ⟷ กลูโคส-1-ฟอสเฟต

เอนไซม์ตัวนี้จะทำหน้าที่ในการตัดหน่วยกลูโคสออกจากสาย โดยเริ่มตัดจากด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ซิง ไม่สามารถย่อยพันธะกิ่งได้ (กล้าณรงค์, 2546)



รูปที่ 9 การทำงานของเอนไซม์ฟอสฟอรีเลส

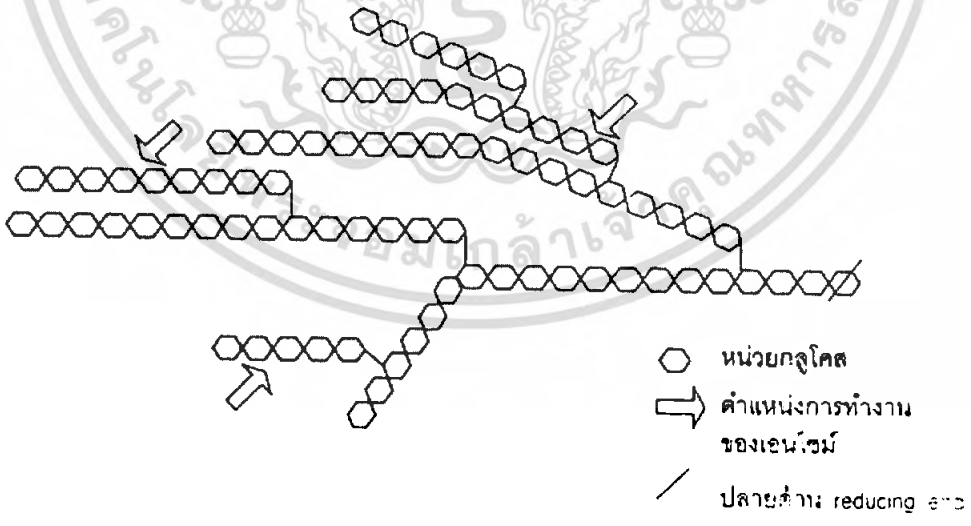
ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เอนไซม์ย่อยภายใน (endo-enzyme)

เอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะกลูโคสิดิกที่ตำแหน่ง α -1,4 ภายในสายพอลิเมอร์ของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ได้แก่

- แอลฟาอะไมเลส (α-amylase ; EC 3.2.1.1 ; α(1,4) – glucan glucanohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานอยู่ภายในโมเลกุลของแป้ง โดยจะตัดพันธะแอลฟา-1,4 ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จับอยู่เท่านั้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่ความยาวต่างๆกัน ไม่สามารถตัดพันธะแอลฟา-1,6 ได้ การทำงานเป็นลักษณะแบบสุ่มตัดภายในสายของ อะไมโลสหรืออะไมโลเพคตินและต้องการ Ca^{++} ร่วมกิจกรรม เอนไซม์นี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน และมีความเสถียรที่พีเอช 5.5-9 อุณหภูมิ 25-115 องศาเซลเซียส อะไมเลสนี้สามารถผลิตได้ทั้งจากพืช สัตว์ เชื้อรา และแบคทีเรีย ในอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียมักมีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงได้ เมื่อใช้แอลฟาอะไมเลสในการย่อยสลายแป้งจะช่วยลดความหนืดและทำให้ความสามารถในการย้อมติดสีไอโอดีนลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้ reducing power เพิ่มขึ้น (กล้าณรงค์, 2546) เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อทางการค้าว่า Termamyl® และมีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) (ปราณี, 2543)



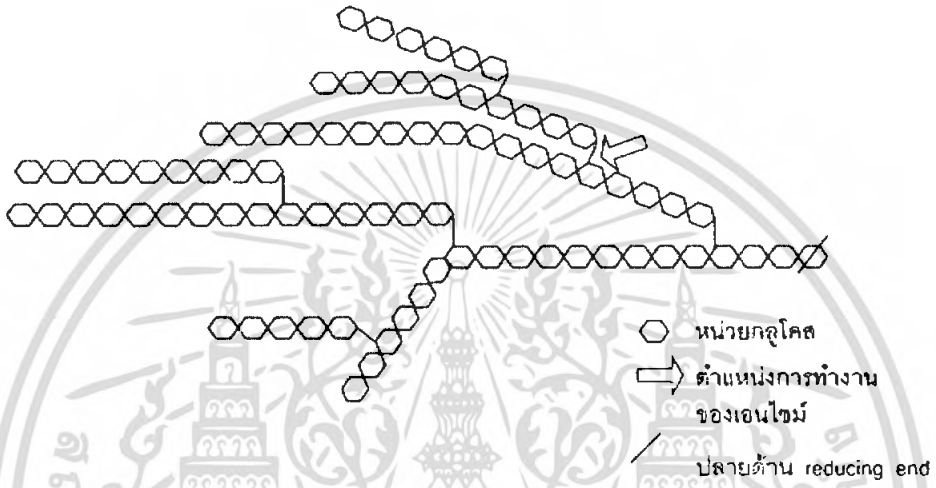
รูปที่ 10 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ที่มา : Bruinenberg (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง (debranching enzyme)

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้เฉพาะพันธะแอลฟา-1,6 กลูโคสิดิกของสายอะไมโลเพคติน ไกลโคเจน เด็กซ์ตรินที่มีกิ่งก้านสาขา โอลิแซคคาไรด์หรือพูลลูแลนเท่านั้น



รูปที่ 11 การทำงานของเอนไซม์ย่อยพันธะกิ่ง

ที่มา : Bruinenberg (1996)

2.2.2.3 การผลิตเอนไซม์อะไมเลส

1. จุลินทรีย์ที่ผลิตอะไมเลส

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืชและสัตว์ จะได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไม -เลสจากจุลินทรีย์ ม่าว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ เพราะจุลินทรีย์สามารถทำการเพิ่มจำนวนได้ง่าย และเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมแล้วจะเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมาได้ดี สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย

เชื้อรา

Olama และ Sabry (1989) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *Penicillium purpurescence* ในอาหารเหลวที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน อาหารเลี้ยงเชื้อมี พีเอช 7 โดยเติมหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7 บนเครื่องเขย่าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 15 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์ อะไมเลสสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อได้เป็นเวลา 7 วัน

Moreira และคณะ (1999) ได้ทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Aspergillus tamari* ซึ่งแยกได้จากดิน โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีการเติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้งหรือ มอลโตส หลังจากเลี้ยงเชื้อพบว่าสามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในเครื่องเขย่าโดยเอนไซม์ อะไมเลสที่ได้สามารถทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง คือ 4-10 และอุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาแยกแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสออกจากกันโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

Cherry และคณะ (2004) ได้ศึกษาการผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus fumigates* ซึ่งแยกได้จากกระเพาะแพะ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พีเอช 7 ใช้แหล่งคาร์บอนคือแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนใช้แอมโมเนียไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 เปอร์เซ็นต์

Ramachandran และคณะ (2004) รายงานว่า เชื้อ *Aspergillus orysae* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วยกากของเหลือจากการสกัดน้ำมันมะพร้าว (coconut oil cake) เป็นวัตถุดิบหลัก ซึ่งจะให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 1,327 หน่วยต่อกรัมของสับสเตรทแห้ง และเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีความชื้นเริ่มต้นเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส 1,827 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง เมื่อเติมกลูโคสและแป้งลงไปในอาหารพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด 1,911 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง และเมื่อมีการเติมเปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดถึง 3,388 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง

แบคทีเรีย

Hamilton และคณะ (1999) ทำการศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของแป้งที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. IMD 435 พบว่าการผลิตจะให้กิจกรรมอะไมเลสสูงสุดเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำตาลแลกโตส 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามชีวมวลที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำตาลแลกโตสก็จะน้อยกว่าเลี้ยงในแป้ง หรือเบต้า-ไซโตลเฮกซิน และผลผลิตจากการไฮโดรไลซีสของสารละลายน้ำแป้ง และแป้งข้าวโพด จะได้น้ำตาลกลูโคสและมอลโตส

Yang และคณะ (1999) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Streptomyces rimosus* TM-55 ในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว และแบบอาหารแข็ง พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวโดยใช้แป้ง 691.3 กรัม ตรวจพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้งแรกหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และสูงสุด เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง สำหรับการเลี้ยงในอาหารแข็งสามารถตรวจพบครั้งแรกเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 180 ชั่วโมง โดยใช้อาหารแข็ง 2,642.2 กรัม นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6-7 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35-45 องศาเซลเซียส

Soni และคณะ (2003) พบว่าจากการคัดแยก *Bacillus* sp. AS-1 และ *Aspergillus* sp. AS-2 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ได้ตามลำดับในปริมาณที่มาก โดยใช้อาหารแข็ง คือเมล็ดข้าวสาลีในการหมัก เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถกระตุ้นคงสภาพได้ในช่วงอุณหภูมิและพีเอชในช่วงกว้าง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะแสดงประสิทธิภาพในการลดความหนืดของแป้งได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสแสดงประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ 87 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายน้ำแป้ง 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดรวมกันสามารถที่จะย่อยแป้งสาลีได้สูงสุดถึง 96 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์

Wanderley และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของแอลฟาอะไม-เลสจากเชื้อยีสต์ *Cryptococcus flavus* ซึ่งแยกได้จากผลไม้บราซิล และนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของแป้ง 24 ชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีบน SEphecry S-100 column เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้เป็นไกลโคเจนโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 75 และ 84.5 กิโลดาลตัน ซึ่งหาได้จากวิธี sodium dodecyl sulfate – polyacrylamine gel electrophoresis และ gel filtration ตามลำดับ ผลผลิตที่ได้หลังจากการเลี้ยงเชื้อยีสต์บนแป้ง คือ มอลโตส และมอลโตรไตรโอส ซึ่งมีค่า K_m ของเอนไซม์บริสุทธิ์เท่ากับ 0.056 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Sukhumavasi และคณะ (1975) ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 จากลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ เช่นเดียวกันกับ Kato และคณะ (1976) ซึ่งได้ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 จากลูกแป้ง Ragi ของประเทศอินโดนีเซีย ก็สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้เช่นกัน

Saha และ Ueda (1983) พบว่าเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* IFO 0111 สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบได้ โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์ได้เท่ากับ 4.5 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก เชื้อรา *Rhizopus* sp. ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งดิบเท่ากับ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์

โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (submerge fermentation)

นิยมใช้ในการผลิตอะไมเลสจากแบคทีเรีย และกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา โดยเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ อาหารที่ใช้จะผ่านการให้ความร้อนด้วยความร้อนชื้น อุณหภูมิ 110-115 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที ปริมาณกล้าเชื้อ 3-5 เปอร์เซ็นต์ จะต้องควบคุมการให้อากาศ และ การกวน วิธีนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเพิ่มปริมาณการผลิตและการควบคุมสภาพต่างๆได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือ มีโอกาสบนเบื้อนจากเชื้ออื่นๆได้ง่าย และประสิทธิภาพของเชื้อจะลดลง จึงจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงๆ อยู่เสมอ (ดวงพร, 2530)

Eliana และคณะ (2003) ทำการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเหลวที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากดิน โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารละลายแป้งและมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเพิ่มกลูโคสจากภายนอกมีผลต่อการข่มการสร้างเอนไซม์อะไมเลส นอกจากนั้นยังพบว่ายีสต์สกัดมีผลต่อกิจกรรมอะไมเลสโดยทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 2.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้เปปโตนจะทำให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดถึง 10 กรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง (solid state fermentation)

หมายถึงการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาพที่ไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) น้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับวัตถุดิบเท่านั้น ดังนั้นปริมาณความชื้นหรือน้ำที่จุลินทรีย์นำไปใช้จึงค่อนข้างต่ำ จึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตโดย เชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งวัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่มักเป็นพวกธัญพืช หรือรำข้าว สับสเตรทที่ใช้ต้องควบคุมขนาดให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างอนุภาคของวัตถุดิบเพื่อถ่ายเทอากาศ กระบวนการหมักแบบอาหารแห้งนี้จะลดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากความชื้นในระบบค่อนข้างต่ำ และไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่มักเกิดปัญหาเรื่องการเกิดความร้อนสะสม ซึ่งมีผลกระทบต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงถึงระดับที่อาจเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ การหมักแบบอาหารแข็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ การหมักอาหารแข็งแนวระนาบ จะใช้ถาดสำหรับบรรจุสับสเตรทและจุลินทรีย์ คลุกเคล้าให้เข้ากัน และการหมักอาหารแข็งแนวดิ่ง จะใช้ภาชนะลักษณะเป็นทรงกระบอก ข้อดีและข้อเสียของระบบการหมักในอาหารแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ง่าย
2. ต้องการพื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักไม่มาก
3. เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรม ไม่ค่อยยุ่งยากและไม่แตกต่างจาก ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. หัวเชื้อที่ใช้อยู่ในรูปสปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังหมักสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (seed - tank) ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายลงได้
5. สภาพการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา มีสักษณะที่คล้ายกับที่อยู่ในธรรมชาติ จึงทำ ให้เชื้อต้องการเวลาในการปรับตัว (lag phase) สั้น การหมักจึงเกิดขึ้นได้ดี
6. ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถสกัดออกได้โดยตรง และใช้วิธีที่ง่ายและสะดวก

ข้อเสีย

1. มีความจำกัดค่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา นอกจากนั้นได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และสเตรปโตมัยซิสบางสายพันธุ์) ซึ่งทั้งนี้จุลินทรีย์จะต้องสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ
2. ปัญหาความร้อนสะสมเกิดขึ้นเมื่อการหมักอยู่ในระดับใหญ่
3. การติดตามผลการหมัก เช่น ความชื้น พีเอช เป็นต้น สามารถทำได้ยาก
4. สปอร์หัวเชื้อจำเป็นต้องใช้ในปริมาณสูง
5. วัตถุดิบที่ใช้จำเป็นต้องแปรสภาพ (pretreatment) ก่อน
6. การหาค่ามวลของเส้นใย (mycelial mass) สามารถทำได้ยาก

(วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

Baysal และคณะ (2002) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* จากบ่อน้ำพุร้อน บนอาหารแข็งซึ่งใช้รำข้าวและเปลือกข้าวเป็นสับสเตรท โดยทำการทดลองบนสภาวะที่มีความชื้น 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 พบว่าเมื่อใช้รำข้าวจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 159,520 หน่วยต่อกรัม และเมื่อใช้เปลือกข้าวจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 21,760 หน่วยต่อกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าใช้เปลือกข้าวเป็นสับสเตรท

Kunamneni และคณะ (2005) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้เชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูงคือ *Thermomyces lanuginosus* โดยใช้สับสเตรทต่างๆกัน ดังนี้ รำข้าวสาลี กากน้ำตาล รำข้าว แป้งข้าวโพด ข้าวฟ่าง รำข้าวบาร์เล่ย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซังข้าวโพด และเศษข้าวสาลี พบว่า รำข้าวสาลีให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 534 หน่วยต่อกรัมภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ความชื้นเริ่มต้น 90 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6 ปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเกลือแร่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตรต่อกรัม และอัตราส่วนน้ำหนักสับสเตรทต่อปริมาตรฟลาสก์ 1:10 เติมสารละลายน้ำแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ และเปปโตน 1 เปอร์เซ็นต์

2.2.2.4 การเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์

เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากการหมักแบบในสภาพอาหารแข็ง ไม่ได้ละลายอยู่ในน้ำเหมือนเช่นผลิตภัณฑ์จากการหมักในสภาพอาหารเหลว หลังจากการหมักสิ้นสุดลง อาจนำอาหารที่ผ่านการหมักแล้วไปลดความชื้นให้เหลือประมาณร้อยละ 10-12 บดเป็นผง แล้วนำไปใช้ได้โดยตรง หรืออาจเติมน้ำหรือสารละลายเกลือที่เหมาะสมลงไปในอาหารที่ผ่านการหมักแล้วเพื่อสกัดเอนไซม์ออกมา จากนั้นจึงนำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการต่างๆที่เหมาะสม

การแยกเอนไซม์โดยการตกตะกอนโปรตีน ตามปกติจะมีการปนเปื้อนของสารอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์อยู่ ดังนั้นถ้าต้องการเอนไซม์บริสุทธิ์ ก็ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการแยกสารอื่นๆที่ไม่ต้องการด้วยวิธีที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี อิเล็คโตรโฟเลซิส ไดอะไลซิส หรือ gel filtration (สมโภค, 2545)

Freedburg และคณะ (1975) ได้ศึกษาการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ให้บริสุทธิ์ โดยขั้นตอนการทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ร้อยละ40 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังรี้ เซฟาเด็ก จี 100 (sephadex G-100) และไบโอเจลพี 150 (Biogel P-150) เก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ร้อยละ 90

Morita และ Fujio (1997) ได้ศึกษาการแยกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. A-11 ให้บริสุทธิ์ โดยเมื่อนำมาทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 ทำให้ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ 3.61 เท่า จากนั้นนำส่วนที่แยกมาผ่านคอลัมน์ซีเอ็มเซฟลาเด็ก ซี-50 (CM- Sephadex C-150) ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ 5 เท่า

2.2.2.5 การเก็บรักษาอะไมเลส

การเก็บรักษาอะไมเลสให้มีกิจกรรมคงที่หรือลดลงเพียงเล็กน้อย จะต้องเกี่ยวข้องทั้งเรื่องพีเอชและอุณหภูมิต้องเหมาะสม มิฉะนั้นเอนไซม์จะเสียสภาพ จากนั้นก็เก็บไว้ในที่เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ตู้เย็นธรรมดา 4-5 องศาเซลเซียส อาจมีการเติมอนุมูลสารบางอย่างลงไปเพื่อเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ เก็บได้นาน 1-2 เดือน

2. แช่แข็ง นิยมอุณหภูมิต่ำกว่าศูนย์ถึง -20 องศาเซลเซียส

3. Freeze dry หรือ lyophilized เป็นการระเหิดน้ำออกจากเอนไซม์ในสภาพที่เป็นน้ำแข็ง ทำในสภาพสุญญากาศ เมื่อเสร็จแล้วสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิต่ำก็ได้

4. Immobilized enzyme โดยให้เอนไซม์เกาะกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อย่างเช่น polyacrylamide gel และแก้วที่มีรูพรุน เป็นต้น (ดวงพร, 2530)

2.2.2.6 การนำเอนไซม์อะไมเลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาขึงให้ตึงบนเครื่องทอ ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดง่าย ดังนั้นก่อนที่จะนำมาทอจะต้องนำเส้นใยด้ายมาชุบน้ำแป้ง เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนจึงต้องเอาแป้งที่ตกค้างออก โดยใช้เอนไซม์อะไมเลสในการย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีการที่กล่าวมาเป็นการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม

อุตสาหกรรมการทำขนมปัง แป้งที่ใช้ในการทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิด dextrinogenic enzyme ลงไป เพื่อย่อยโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลง แล้วเติม saccharpgenic enzyme ลงไป เพื่อเปลี่ยนแป้งบางส่วนให้เป็นน้ำตาล

การทำน้ำผลไม้ให้ใส ปกตินำผลไม้จะมีความขุ่นเพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่อะไมเลสลงไป บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาฟาเรนไฮต์ หลังจากนั้นก็กรองน้ำตาลออก ซึ่งสามารถนำไปทำเยลลี่ได้

การผลิตแอลกอฮอล์ ใช้เป็นครั้งแรกในประเทศจีน โดยผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ทำหน้าที่ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นญี่ปุ่นก็นำหลักการนี้มาผลิตแอลกอฮอล์เมื่อประมาณ 1,700 ปีมาแล้ว ซึ่งแตกต่างจากยุโรปและอเมริกาที่จะใช้ข้าวมอลต์กันในระยะแรก แต่ปัจจุบันทั้งยุโรปและอเมริกาก็หันมาใช้เอนไซม์จากราแทนจากข้าวมอลต์

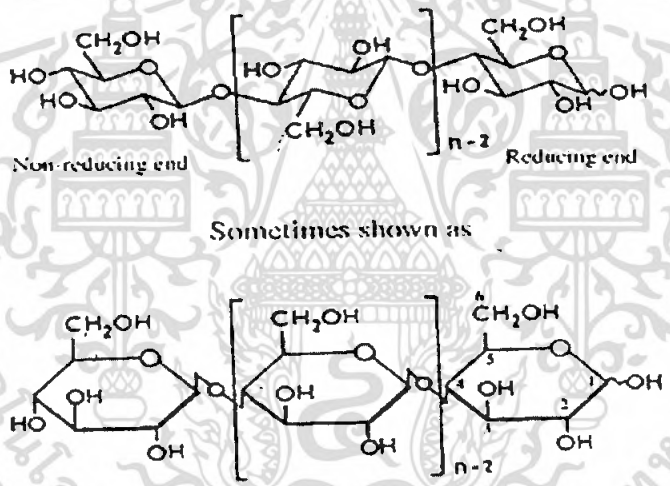
การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง ระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆจะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด เกิดการย่อยแบบสุ่มจึงได้สารหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส และเตตระแซคคาไรด์ ทำให้เกิดเจนติโอไบโอส กรดลีวูลิยิค และสารพวกเพอฟิวรัล ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดีเกิดขึ้น ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคส เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

2.2.3.1 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

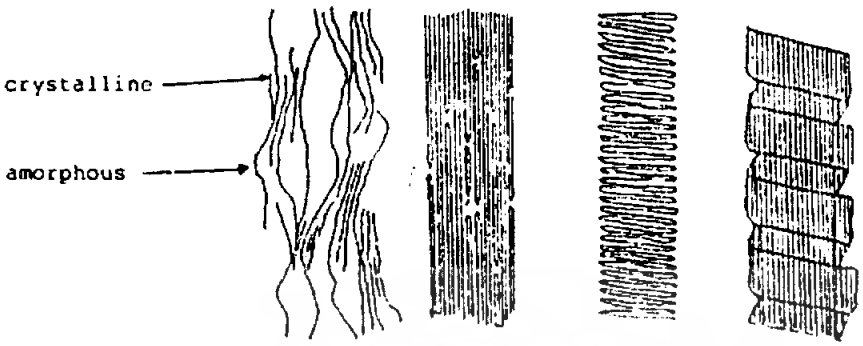
เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่สลับซับซ้อน และไม่ละลายน้ำ จุลินทรีย์จึงไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องสร้างเอนไซม์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อทำการย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กลง ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ จุลินทรีย์หลายกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้ ทั้งที่เป็นเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิส โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่าเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้ดี เช่น *A. niger* , *A. fumigatus* , *A. wentii* , *Trichoderma koningii* , *T. reesei (viride)* , *Ascobusfurfuraceus* , *Agaricus bisporus* (Eriksson และคณะ, 1990) เป็นต้น



รูปที่ 12 ลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อยเบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส ที่ต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อยเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป

ที่มา : www.biologic.uni-humburge.de/b-online/e26/3.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 รูปร่างของโครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป

ก. ฟริงเกิลไมเซล (fringle micelle) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นระเบียบ และที่ไม่เป็นระเบียบ

ข. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วน หรือพับไปมาตามแกนของเส้นใย

ค. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนาเกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิ้นจะม้วนเป็นเกลียว

ที่มา : อมรรัตน์, 2547 อ้างถึง Norkrans, 1967

2.2.3.2 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตเพื่อการค้านั้นมักเป็นเอนไซม์เซลลูเลสผสมที่สกัดได้จากเชื้อราชนิดที่แตกต่างกันไป และให้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ องค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการผลิต การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส กระทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งขึ้นอยู่กับความเหมาะสม การที่จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงและให้คุณภาพดีนั้นต้องควบคุมสภาวะต่างๆให้เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ชนิดอาหารที่ใช้ต้องเหมาะสม พีเอช การปนเปื้อน รวมทั้งคำนึงถึงราคาต้นทุนในการผลิตด้วย นอกจากนี้การใส่สารเร่งเจริญ แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ สารเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ก็เป็นสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วย สารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ สารประกอบเซลลูโลส อนุพันธุ์ของเซลลูโลส และสารที่มีพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก เช่น cellobiose, sepharose และ lactose เป็นต้น (Tsao และ Chang, 1983) การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรามีรายงานการทดลองไว้ 2 วิธี คือ การผลิตเอนไซม์โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (submerge culture) และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง (solid substrate culture)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว

การผลิตเอนไซม์แบบอาหารเหลว ได้แก่ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยนำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ชนิดเหลว (liquid synthetic medium) เช่น อาหาร Eggina & Pugh medium (Bravery, 1968) หรืออาหาร Mandels & Sternberg medium (Mandels และ Sternberg, 1979) และอาหาร MS-medium (Desai และคณะ, 1982) เป็นต้น ข้อได้เปรียบของการผลิตอาหารเหลวนี้สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ดี และง่ายต่อการควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์

การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์โดย จุลินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนในการผลิต และเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งในสภาพหมักในอาหารแข็ง และการหมักในสภาพอาหารเหลว ข้อได้เปรียบของการหมักในอาหารเหลวเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบอาหารแข็ง คือ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมักได้ดีและง่ายกว่า อย่างไรก็ตามการหมักแบบอาหารแข็งก็มีข้อดีเหนือกว่าการหมักในอาหารเหลว คือ สามารถให้ผลผลิตต่อหน่วยวัสดุหมักสูงกว่า ไม่ค่อยพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปสปอร์จึงไม่จำเป็นต้องใช้ถังเตรียมเชื้อเริ่มต้น (seed tank) เทคนิคการให้อากาศในวัสดุหมักทำได้ง่ายกว่าในสภาพการหมักแบบอาหารเหลวนอกจากนั้นการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งเป็นการเจริญของจุลินทรีย์บนวัสดุแข็งที่ไม่มีน้ำในรูปอิสระ แต่จะอยู่ในลักษณะดูดซึมนั้นจะเหมาะสมกับเชื้อราซึ่งมีความสามารถในการชอนไชไปตามวัสดุหมักอันมีผลทำให้สามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างใกล้ชิด มีผลทำให้การสร้างเอนไซม์สูงกว่า เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งได้ ดังตารางที่ 5

2.2.3.3 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การย่อยสลายเซลลูเลสด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆที่ปนเปื้อน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และปฏิกิริยาไม่รุนแรง ซึ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกรวมว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส

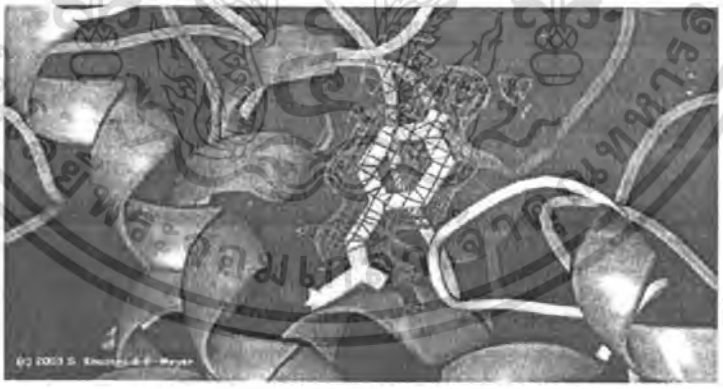
เอนไซม์เซลลูเลสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส หน่วยเล็กที่สุดหากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 เชื้อราที่สร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสในกระบวนการหมัก

เชื้อรา	เอนไซม์ที่สร้าง
Allescheria terrestris	exoglucanase, endoglucanase, β-glucosidase
Aspergillus fumigatus	Carboxymethylcellulase, Cellulose
A. niger	Cellulose
A. phoenicis	β –glucosidase
Mucor pusillus	exoglucanase, endoglucanase, β –glucosidase
Penicillium sp	Cellulose
Sporotrichum cellulophilum	Cellulose
S. thermophile	exoglucanase, endoglucanase, β –glucosidase
Trichoderma harzianum	Cellulose
T. reesei	Cellulose, β -glucosidase
T. viside	Cellulose

ที่มา : วิเชียร, 2532



รูปที่ 14 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา : www.tamu.edu/.../e-density-history/e-density.htm

ในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatina fuloca) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโต-ซัว แอคติโนมัยซิส และเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นชนิด extracellular enzyme คือปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ทำให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลส และสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการศึกษาหรือใช้ในอุตสาหกรรม

2.2.3.4 การประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูเลส

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้ในอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม เช่น ในการใช้สลายพืชผักและกากเหลือจากเกษตรกรรม การย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมัก เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ได้แก่

1. อุตสาหกรรมกระดาษ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสบางชนิดที่เหมาะสมมีส่วนช่วยลดเวลาในการตี และช่วยต้านไข ทำให้กระดาษมีคุณภาพดี
2. ใช้ในกระบวนการน้ำผักกระป๋อง
3. ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้และทำให้ใส
4. นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในส้วมถังเกรอะ
5. ใช้ในอุตสาหกรรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม
6. ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์
7. ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากเมล็ดธัญพืช
8. ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมผลิตปุ๋ยหมัก
9. นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาผลิตเป็นยาอีกด้วย โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะ และช่วยลดอาการแน่นท้อง เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเส้นใย
10. เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ช่วยสลายผนังเซลล์พืช ทำให้มีการเชื่อมโปรโตพลาสต์ของเซลล์พืช 2 ชนิด ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ที่มีค่ายิ่งต่อวงการเกษตรแผนใหม่

2.2.3.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sibtain และคณะ (2003) ศึกษาการชักนำเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) และเอนไซม์เซลลูเลส (cellulose) ด้วยเชื้อ *Trichoderma harzianum* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่า กลูโคสจะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ ขณะที่ไซแลนและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจะสามารถชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส จะมีค่ามากสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Vogel'medium ที่มีพีเอช 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาวะที่มีการเขย่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ikram-ul-Haq และคณะ (2001) ที่พบว่าพีเอช 5.5 จะทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงสุด

จากรายงานของ Maria และคณะ (1996) พบว่าเชื้อรา *Pestalotriopsis* sp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์บางชนิดได้ เช่น *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และพบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไลเปสได้ โดยเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารเหลวที่มีพีเอช 7.0 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับรายงานของ Gomes และคณะ (1992) ที่เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma viride* Bt2169 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 31.1 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด

จากบทความวิจัยของรัตนะ ชังวัดดี และคณะ (2545) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อใช้อาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก Mendels และคณะ (1976) ที่ปรับ พีเอช 4.0 ถึง 4.5 มียีสต์สกัด (yeast extract) เข้มข้นร้อยละ 0.4 เป็นแหล่งไนโตรเจน เซลลูโลสของแบคทีเรียเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณสปอร์เชื้อรา 8×10^{8} สปอร์ต่อกรัมวัสดุหมัก โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตได้แสดงกิจกรรมสูงสุดซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ D'Sousa และ Volfava (1982) ที่พบว่าเชื้อ *Aspergillus terreus* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลู-เลสได้สูงสุดที่พีเอช 5.0

Roman และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส และบีต้ากลูโคไซเดสโดยเชื้อ *Chaetomium erraticum* สำหรับเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและบีต้ากลูโคไซเดสจะเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง (static condition) โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเอนไซม์ทั้งสามชนิดผลิตได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 10.0 โดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 2 ถ้าเป็นเชื้อ *Chaemotium* สายพันธุ์อื่น จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียสและพีเอชอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 5.0 (Fahnrich และ Irrgang , 1982 ; Lakshmikant และ Mathur , 1990)

ในการผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคไซเดสและเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสโดยเชื้อ *Neurospora crassa* พีเอชที่เหมาะสมคือ 6.0 ส่วนการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส พีเอชที่เหมาะสมคือ 7.0 (Yazadi และคณะ, 1990) ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆโดยเฉพาะเชื้อ *Trichoderma* และ *Aspergillus* spp. พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3.4 ถึง 6.3 (Shewale และ Sadana , 1981 ; Ortega , 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rao และคณะ (1982) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Pestalotiopsis vesicolor* เป็นเวลา 7 วันในอาหารเหลวที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 24 ± 1องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในส่วนของเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส และบีต้ากลูโคไซเดสสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 5.0 ขณะที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอช 4.5 โดยพบว่าเอนไซม์บีต้ากลูโคไซเดสจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลสตามลำดับ

Rao และคณะ (1983) ศึกษาพบว่าเชื้อ *Pestalotiopsis vesicolor* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 3 เท่าของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเอนไซม์บีต้ากลูโคไซเดส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 และเชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง (PDA slant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อใหม่ทุก ๆ 1 เดือน

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์	บริษัท
Yeast extract	Scharlar Chemic S.A.
Malt extract	Scharlar Chemic S.A.
Peptone	HiMedia Laboratory
Glucose	Fluka Biochemical
Agar	-
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อรา	
Potato dextrose agar	-

3.3 สารเคมี

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์	Merck Schuchardt OHG
เฮกเซน	Asia Pacific Specialty Chemicals
อะซิโตน	-
แมกนีเซียมซัลเฟต	-
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	-
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	-
กรดซิตริก	-
ยูเรีย	-
แคลเซียมคลอไรด์	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

	บริษัท
เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง	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

3.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

3.5.1.1 การเตรียมหัวเชื้อของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

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 นำไป ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

2. การเตรียมหัวเชื้อ (preculture)

ทำการเขี่ยเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียงลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ขวดละ 1 ลูปเต็ม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเขย่าใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 28 ชั่วโมง (Tinoi และคณะ, 2006)

3.5.1.2 การเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทิน

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหาร YM โดยชั่งกลูโคส 10 กรัม yeast extract 3 กรัม malt extract 3 กรัม เปปโตน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ตวงใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

2. สภาวะที่ใช้ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

ปิเปตหัวเชื้อใส่ อาหารเหลวที่เตรียมไว้ ขวดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด

3.5.1.3 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแอสตาแซนทิน และปิเปตหัวเชื้อลงไป 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 องศา-เซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักเซลล์คงที่

3.5.1.5 การหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้วิธีสกัดด้วยสารละลาย DMSO (Dimethylsulfoxide extraction)

ปิเปตน้ำหมัก 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500g อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer จากนั้นนำผงแห้งของเซลล์ยีสต์ไปสกัดสารแอสตาแซนทินด้วย DMSO 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายเฮกเซน (hexane) ลงไป 40 มิลลิลิตรเพื่อทำการแยกสารแอสตาแซนทินออกจาก DMSO และเทลงในกรวยแยกทำการสกัดโดยการเขย่า 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จะเกิดการแยกชั้น จะได้สารแอสตาแซนทินอยู่ในชั้นของเฮกเซน ทำการสกัดซ้ำด้วย DMSO และเฮกเซนจนกว่าตัวเซลล์ของยีสต์ไม่มีสีหรือสารสกัด เฮกเซนไม่มีสี จากนั้นนำส่วนของเฮกเซนมารวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยภายใต้สุญญากาศ (evaporator) จนเหลือสารละลายประมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณของสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ ดังสูตร

ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)

$$= \frac{\text{ปริมาตรสารสกัดแอสตาแซนทิน(มล.) x ค่าการดูดกลืนแสงที่ 474 นาโนเมตร x 100}}{\text{21 x น้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (กรัม)}}$$

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

3.5.2 การผลิตเอนไซม์ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์จากเชื้อ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553

1. การเตรียมหัวเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

การเตรียมอาหารสำหรับหัวเชื้อ

เตรียมอาหาร PDB โดยชั่ง PDB 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ตวงใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

การเตรียมหัวเชื้อ (pre-culture)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในเชื้อรา *T. harzianum* TISTR 3553 ที่อยู่บนอาหารวุ้นเอียง PDA และเขย่าจนได้สารละลายแขวนลอยสปอร์ จากนั้นถ่ายสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสอัตราการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

2. การผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์เตรียมได้โดยชั่งกลูโคส 8.634 กรัม , $(NH_4)_2SO_4$ 2.79 กรัม , KH_2PO_4 2.0 กรัม , $NaH_2PO_4.2H_2O$ 15.13 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม, กรดซิตริก 18.23 กรัม , เปปโตน 1.0 กรัม, ยูเรีย 0.6 กรัม และ Tween-80 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้เข้ากันและเติมแร่ธาตุได้แก่ $Fe\ SO_4.\ 7H_2O$ 5.0 มิลลิกรัม , $Mn\ SO_4.\ H_2O$ 1.6 มิลลิกรัม , $Zn\ SO_4.\ 7H_2O$ 1.4 มิลลิกรัม และ $CaCl_2.\ 2H_2O$ 2 มิลลิกรัม จากนั้นเติมผนังเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเบเกอร์ยีสต์ที่เตรียมไว้ (Baker's yeast cell wall) 0.5 กรัม ละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ขวดวัดปริมาตร ตวงใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

สภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

เติมหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้สำหรับเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 rev ต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง นำไปวัดปริมาณเซลล์แห้ง และหาปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้

3.5.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730

3.5.3.1 การวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูคาเนส (Glucanase)

1. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส (Miller, 1959)

สารละลายลามินาริน ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

ละลายลามินาริน 10 กรัม ในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 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 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 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 อยู่จากนั้นผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย กรด3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5 dinitrosalicylic acid)

เตรียมโดยละลายกรด3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัมและโพแทสเซียมตาเทรด ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 250.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ (NaOH) 16 กรัมในน้ำ 200 มิลลิลิตรคนให้เข้ากันปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง

2. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนส

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี 0.45 มิลลิลิตรของสารละลายลามินาริน (laminalin) 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1โมลต่อลิตร ความเป็นกรดด่าง 5.0 จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นปิเปตสารละลาย 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที และปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเขย่าให้กัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วไปหาค่าน้ำตาลกลูโคสเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส x ความเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส x เวลา x ปริมาตรเอนไซม์ (มล)}}$$

หมายเหตุ : 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.5.3.2 การวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

(Takashima และคณะ, 1996)

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

สารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

เตรียมโดยละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 1 กรัมจนละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย กรด3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5 dinitrosalicylic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

เจือจางสารละลายเอนไซม์ในความเจือจางที่เหมาะสม ผสมสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเติมสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 3 มิลลิลิตรนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำก๊อกให้เย็น เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในรูปของน้ำตาลกลูโคส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเตรียมหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 3 มิลลิลิตร ก่อนใส่สารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และขั้นตอนอื่นๆเหมือนกับการหาตัวอย่างน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ในตัวอย่าง ส่วนแบลงค์ (blank) เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส x ความเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส x เวลา x ปริมาตรเอนไซม์ (มล)}}$$

หมายเหตุ : 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัมภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.5.4 การย่อยผนังเซลล์ยีสต์เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้

3.5.4.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 สำหรับการสกัด

ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินและเก็บเซลล์ยีสต์ไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยและนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (homogenizer) เพื่อเตรียมผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์สำหรับใช้ในการสกัด จากนั้นนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dry) แล้วนำไปสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

1. การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตรในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปีเปตสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้ ลงไป .01 , 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* TISTR 5730

2. การศึกษาผลจากปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ที่เหมาะสมในการสกัดสาร แอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปีเปตสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ได้จาก 3.5.4.2.1 เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายโซเดียมอะซิ-เตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปีเปตสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 , 35 , 40 , 45 , 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้

4. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

เตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายโซเดียมอะซิ-เตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตรจากนั้นปีเปตสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้ลงไป แล้วเขย่าให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 5, 10, 12, 20, 25, 30 และ 45 นาที จากนั้นหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

ในการศึกษาความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 จึงต้องศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เพื่อหาระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญเติบโตและสร้างสารแอสตาแซนทินมากที่สุด โดยเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (Yeast malt medium) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) (กรัมต่อลิตร) และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

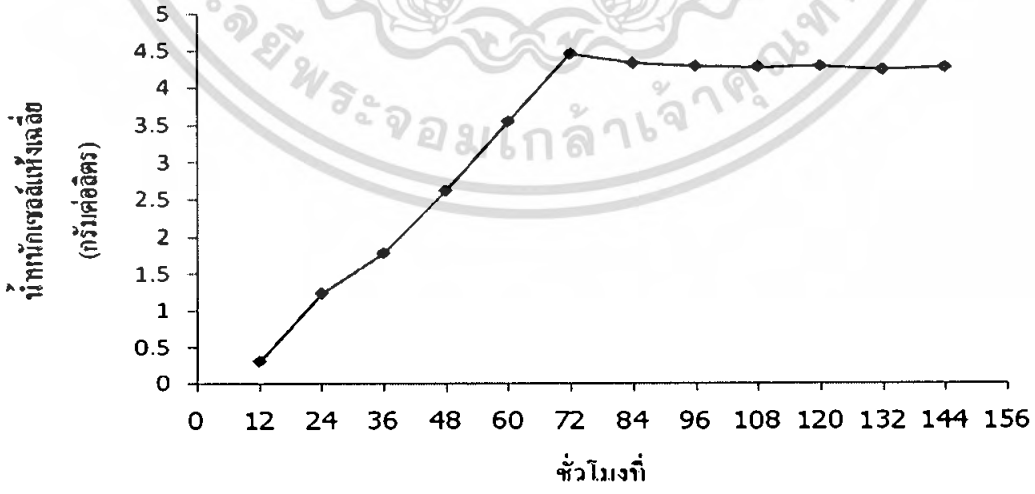
จากการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม (Tinoi และคณะ, 2006) และเก็บเชื้อทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากนั้นหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จะได้ว่าในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มถ่ายเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่าเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างต่ำเนื่องจากเซลล์อยู่ในช่วงการปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น โดยลักษณะของการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งจะเป็นไปอย่างรวดเร็วและพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.45 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไป หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 72 ชั่วโมง คือในช่วงเวลา 84 - 144 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย แสดงว่าเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 มีการเจริญเติบโตที่คงที่ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์แห้งที่เวลาในการเลี้ยงเชื้อต่างกันพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 และ รูปที่ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)
12	0.30^{j}
24	1.23^{i}
36	1.77^{h}
48	2.61^{g}
60	3.54^{f}
72	4.45^{a}
84	4.32^{b}
96	4.28^{c}
108	4.27^{cd}
120	4.28^{cd}
132	4.23^{e}
144	4.26^{d}

หมายเหตุ : a , b , c , d , e , f , g , h , i , j หมายถึงความแตกต่างกันของชุดข้อมูล โดยเรียงอันดับตามตัวอักษร ถ้าตัวอักษรเหมือนกันหมายความถึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน



รูปที่ 15 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

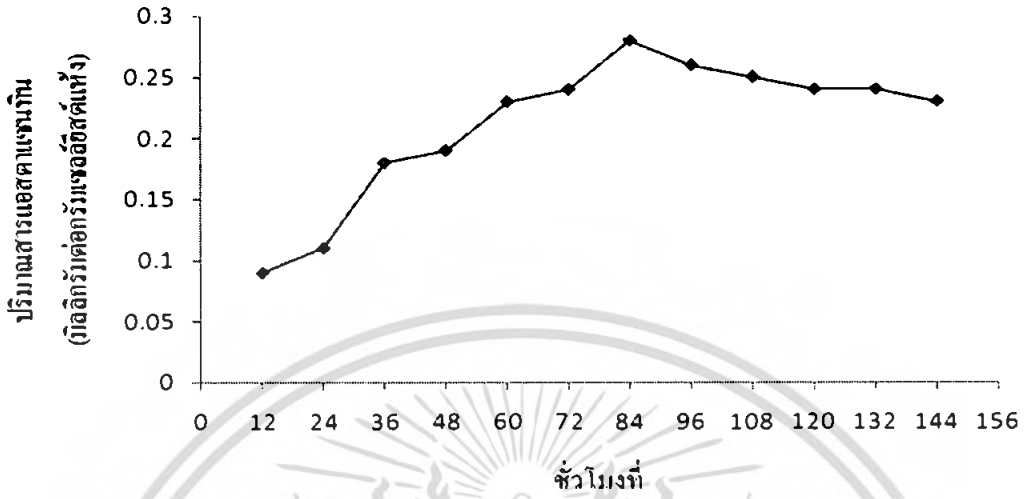
ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ได้เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมและเก็บเชื้อทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่าในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ เชื้อมีการผลิตสารแอสตาแซนทินในปริมาณที่น้อยมากเพราะเซลล์อยู่ในช่วงเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์จึงมีการผลิตสารแอสตาแซนทินน้อยมากโดยมีค่าเท่ากับ 5.96 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 16 และเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานมากขึ้นในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่ามีการสร้างสารแอสตาแซนทินจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ และปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินที่ผลิตจากเชื้อจาก *X. dendrorhous* ที่ผลิตได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ซึ่งมีการสร้างสารแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 24.53 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปการผลิตสารแอสตาแซนทินมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยแสดงผลในตารางที่ 7 และรูปที่ 16

ตารางที่ 7 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

ชั่วโมงที่	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
12	5.96^{k}	0.09^{g}
24	13.34^{j}	0.11^{f}
36	15.80^{i}	0.18^{e}
48	16.33^{h}	0.19^{e}
60	16.34^{h}	0.23^{d}
72	21.39^{c}	0.24^{cd}
84	24.53^{a}	0.28^{a}
96	22.57^{b}	0.26^{b}
108	21.36^{d}	0.25^{bc}
120	20.77^{e}	0.24^{cd}
132	20.42^{f}	0.24^{cd}
144	19.67^{g}	0.23^{d}

หมายเหตุ : a , b , c , d , e , f , g , h , i , j , k หมายถึงความแตกต่างกันของชุดข้อมูล โดยเรียงอันดับตามตัวอักษร ถ้าตัวอักษรเหมือนกันหมายความถึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เลี้ยงในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

4.2 การผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เพื่อใช้ในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730

การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *T. harzianum* TISTR 3553 เพื่อใช้ในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เพื่อการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ให้ได้มากที่สุด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เตรียมไว้สำหรับใช้ผลิตเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 โดยนำไปตรวจวัดหาค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูคาเนส (glucanase activity) โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่ทดสอบ โดยทดสอบการทำงานของเอนไซม์ด้วยการย่อยลามินาริน (Laminarin) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นประเภทกลูแคน พบว่าสารละลายเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตได้จาก *T. harzianum* TISTR 3553 มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.000045 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ เมื่อตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase activity) โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส I ไมโครกรัมภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ โดยทดสอบการทำงานของเอนไซม์ด้วยการย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxy methyl cellulose) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นประเภทเซลลูโลส พบว่าไม่สามารถตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. Dendrorous* TISTR 5730 ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

4.3.1 ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730

จากการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* TISTR 5730 ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และนำมาศึกษาการย่อยผนังเซลล์โดยใช้ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *T. harzianum* TISTR 3553 ที่แตกต่างกันคือ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิลิตร โดยสภาวะที่ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์คือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเชื้อ *X. dendrorous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *T. harzianum* TISTR 3553 ที่ปริมาณต่างๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 17

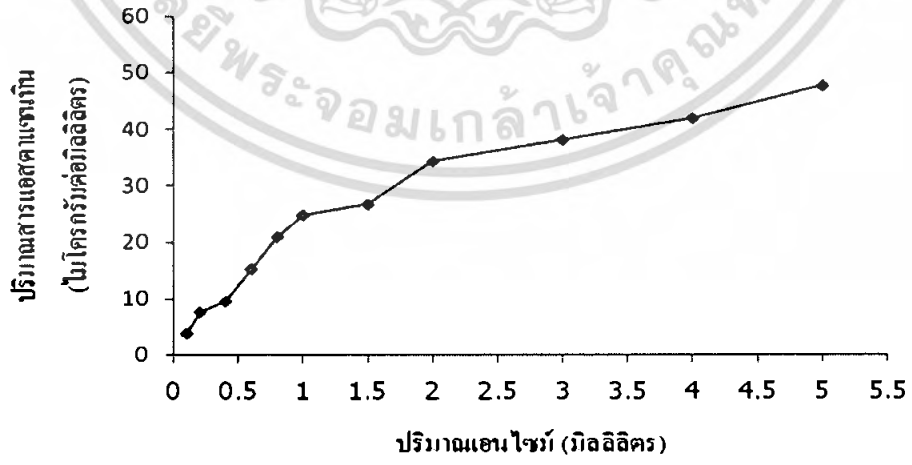
จากการศึกษาการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ด้วยปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรสามารถย่อยเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 และได้สารแอสตาแซนทินในปริมาณที่มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 47.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากรูปที่ 17 และเมื่อใช้เอนไซม์ในปริมาณน้อยทำให้ความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X .dendrorous* TISTR 5730 เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาได้น้อย และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้มากขึ้น พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากการย่อยผนังเซลล์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย เนื่องจากใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มากเกินพอ และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เมื่อใช้ปริมาณของเอนไซม์แตกต่างกันพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 5 มิลลิลิตรจะให้ค่าปริมาณสารแอสตาแซนทินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่น้อยกว่า 5 มิลลิลิตรในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ปริมาณเอนไซม์จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* TISTR 5730

ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.1	3.81^{k}
0.2	7.62^{j}
0.4	9.52^{i}
0.6	15.24^{h}
0.8	20.95^{g}
1.0	24.76^{f}
1.5	26.67^{e}
2.0	34.29^{d}
3.0	38.10^{c}
4.0	41.90^{b}
5.0	47.62^{a}

หมายเหตุ : a , b , c , d , e , f , g , h , i , j , k หมายถึงความแตกต่างกันของชุดข้อมูล โดยเรียงอันดับตามตัวอักษร ถ้าตัวอักษรเหมือนกันหมายความถึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน



รูปที่ 17 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorous* TISTR 5730 เริ่มต้นที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

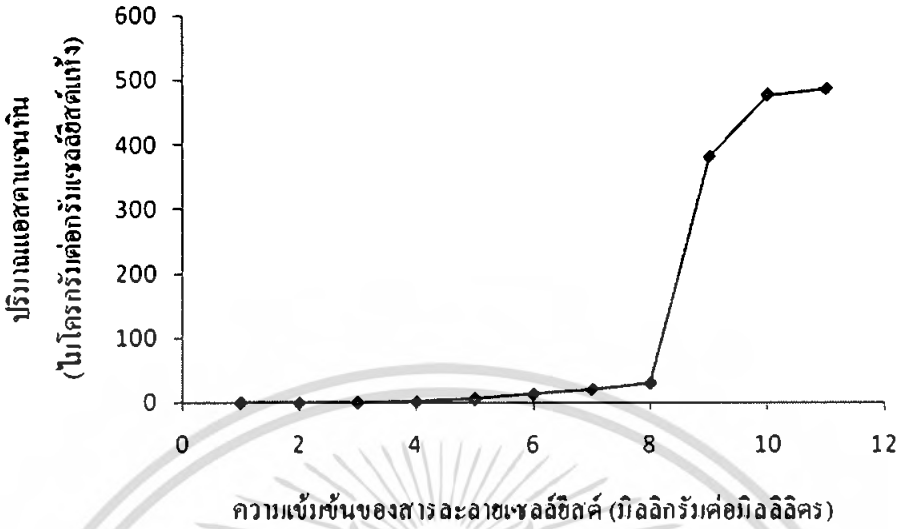
จากการทดลองเมื่อเตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ลงไป 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาสกัดหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ด้วยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 18

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้โดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
4	1.90^{i}
5	5.71^{h}
6	13.33^{g}
7	20.95^{f}
8	30.47^{e}
9	42.33^{d}
10	47.62^{c}
11	48.56^{b}
12	49.20^{a}

หมายเหตุ : a , b , c , d , e , f , g , h , i หมายถึงความแตกต่างกันของชุดข้อมูล โดยเรียงอันดับตามตัวอักษร ถ้าตัวอักษรเหมือนกันหมายความถึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 แสดงปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

จากรูปที่ 18 เมื่อสกัดสารแอสตาแซนทินโดยการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 โดยใช้สารละลายเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 5 มิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์มากขึ้น ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีค่าสูงเมื่อใช้สารละลายเซลล์ยีสต์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินจากสารละลายเซลล์ยีสต์ได้ปริมาณ 47.62 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง และพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อใช้ปริมาณสารละลายเซลล์ยีสต์เริ่มต้นต่างกัน และปริมาณสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีปริมาณสารแอสตาแซนทินมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเทียบกับร้อยละของการสกัดสารที่ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ 10 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละของการสกัดมากกว่า ดังนั้นจึงเลือกปริมาณสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจากสารละลายเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

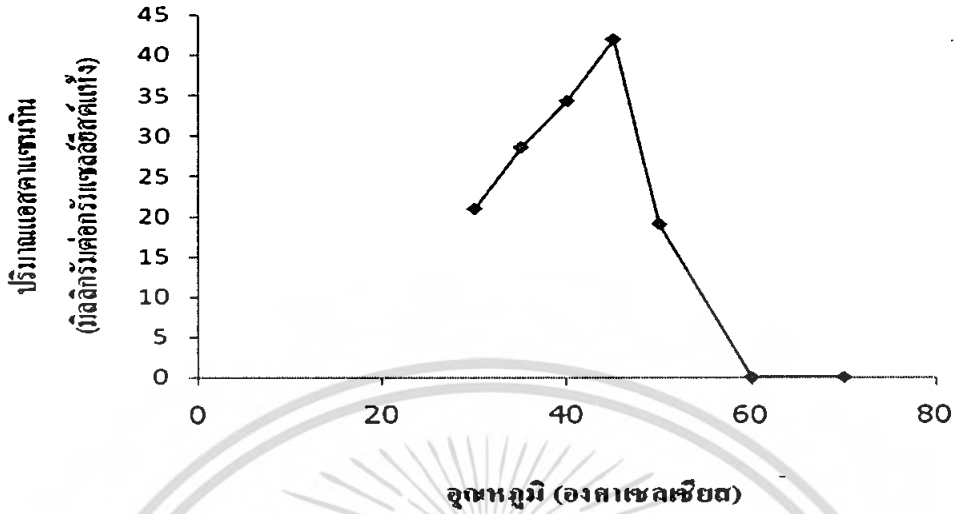
จากการทดลองเมื่อเตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ลงไปปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาสกัด หาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ได้จากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 19

ตารางที่ 10 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
30	20.95[d]
35	28.57[c]
40	34.28[b]
45	41.90[a]
50	19.04[e]
60	0.00[f]
70	0.00[f]

หมายเหตุ : a , b , c , d , e , f หมายถึงความแตกต่างกันของชุดข้อมูล โดยเรียงอันดับตามตัวอักษร ถ้าตัวอักษรเหมือนกันหมายความถึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

จากรูปที่ 19 เมื่อศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 โดยใช้อุณหภูมิในการสกัดเพื่อย่อยผนังเซลล์ยีสต์แตกต่างกัน พบว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ได้น้อยทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัด พบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 มีค่าเพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์มีค่าเท่ากับ 41.90 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง จากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงมากกว่า 45 องศาเซลเซียส พบว่าความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 จะลดลง และที่อุณหภูมิ 60 - 70 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถเกิดการย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์เพื่อให้ได้สารแอสตาแซนทินออกมาได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เกิดการเสียสภาพในการทำงาน เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้ทุกอุณหภูมิมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 ผลของเวลาในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

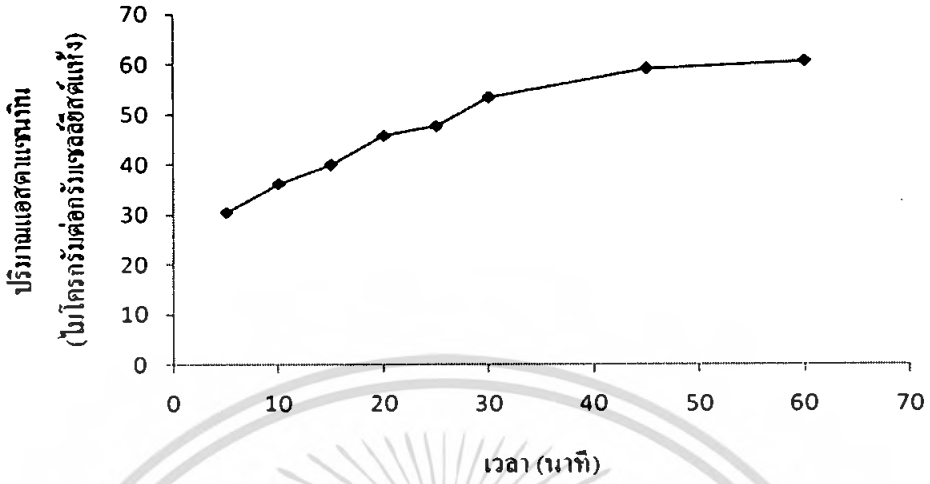
จากการทดลองเมื่อเตรียมสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1โมลต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 12, 20, 25, 30 และ 45 นาที จากนั้นนำมาสกัดหาปริมาณสารแอสตาแซนทิน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

เวลา (นาที)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
5	30.47^{h}
10	36.19^{g}
15	40.00^{f}
20	45.71^{e}
25	47.61^{d}
30	53.33^{c}
45	59.04^{b}
60	60.45^{a}

หมายเหตุ : a , b , c , d , e , f , g , h หมายถึงความแตกต่างกันของชุดข้อมูล โดยเรียงอันดับตามตัวอักษร ถ้าตัวอักษรเหมือนกันหมายความถึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 แสดงเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

จากรูปที่ 20 เมื่อย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ที่เวลาในการบ่มเพื่อย่อยผนังเซลล์ยีสต์แตกต่างกัน จะได้ว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์เป็นเวลา 5 นาที สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ได้ในปริมาณน้อยเนื่องจากเวลาสั้นเกินไปสำหรับเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้และเมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์มากขึ้นพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จะมีปริมาณสารแอสตาแซนทินมากขึ้นเนื่องจากเอนไซม์มีเวลาในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้ และเอนไซม์สามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้มากที่สุดเมื่อให้เวลาได้ย่อยเป็นเวลานาน 45 นาที ซึ่งสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินจากสารละลายเซลล์ยีสต์ได้ปริมาณ 59.04 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง เมื่อให้เวลาในการย่อยเป็นเวลา 60 นาทีพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดในแต่ละช่วงเวลาที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยที่ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เมื่อใช้เวลา 45 นาทีมีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นที่เวลา 45 นาที จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ได้

จากการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

45 นาที จะได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 59.04 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดจาก *X. dendrorhous* TISTR 5730 ด้วยวิธีการสกัดด้วย DMSO โดยการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาจากเซลล์ได้ทั้งหมด โดยมีปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้เท่ากับ 454.286 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง จะได้ว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 คิดเป็นร้อยละ 13 ของปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธี DMSO สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารแอสตาแซนทินได้โดยการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

จากการทดลองได้ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (Yeast malt medium) พีเอช เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งมีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 4.45 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 มีปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง และมีค่าเท่ากับ 24.53 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินมีความสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ยีสต์ คือเมื่อปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นปริมาณสารแอสตาแซนทินจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย จากการทดลองพบว่าปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Tinoi และคณะ (2006) ซึ่งได้เลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM และ อาหารที่เป็นสารสกัดจากกากมัสตาร์ด (mustard waste media) โดยการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ามีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดที่เลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากมัสตาร์ดมีค่าเท่ากับ 19.6 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้เท่ากับ 25.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงผลของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยที่ Vázquez (2001) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* ที่มีสายพันธุ์ต่างกัน ได้แก่ *X. dendrorhous* ATCC 24202, ATCC 24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24261 และ NRRLY-10921 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM ที่เติมน้ำตาลไซโลส (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 38.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Cruz และคณะ (1998) ได้นำสารสกัดไม้ยูคาลิปตัสที่ได้จากการย่อยสลาย (hemicellulose hydrolysate of Eucalyptus globules wood) ที่มีการสกัดลิกนินออกมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารแอสตาแซนทิน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสารสกัดไม้ยูคาลิปตัสที่ได้จากการย่อยสลาย ประกอบด้วยกลูโคสและเซลโลไบโอส (cellobiose) และสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 2.14 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* เป็นเวลา 74 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และในการศึกษาเพื่อเพิ่มการผลิตสารแอสตาแซนทิน จากการศึกษาของ An และคณะ (2001) ได้เลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* ใน sugar beet blackstrap molasses โดยใช้กากน้ำตาลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่เติมยูเรีย 30 กรัมต่อกากน้ำตาล 1 ลิตร และโซเดียมฟอสเฟท (sodium phosphate, NaH_2PO) 5 กรัมต่อกากน้ำตาล 1 ลิตร ซึ่งหลังเพาะเลี้ยงจะได้ปริมาณเซลล์ยีสต์มากที่สุดเท่ากับ 36 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าอาหารที่ต่างชนิดกันมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* และในการศึกษาเพื่อเพิ่มการผลิตสารแอสตาแซนทิน พบว่าได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินโดยการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เพื่อกระตุ้นให้มีการผลิตสารแอสตาแซนทินให้มากขึ้น โดย Wang และ คณะ (2005) ได้ทำการเลี้ยง *X. dendrorhous* AS 2.1557 ร่วมกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างกัน คือ *Rhodotorula rubra* AS 2.670, *Rhodotorula glutinis* AS 2.703, *Panus conchatus* AS 5.154, *Coriolus versicolor* AS 5.48, *Mucor mucedo* AS 3.2531, *Mortieralla alpina* M-23 พบว่า *X. dendrorhous* จะมีปริมาณเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Mucor mucedo* AS 3.2531 โดยมีปริมาณเซลล์ยีสต์เท่ากับ 9.1 กรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Rhodotorula glutinis* AS 2.703 สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงสุด 2.23 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของ Echavarri-Erason และคณะ (2003) พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* นั้น จะช่วยเพิ่มการผลิตสารแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์ที่อยู่ใกล้กับเชื้อรา และช่วยเพิ่มปริมาณสารแอสตาแซนทินได้มากขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์แห้ง 1 กรัม และจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Epicoccum nigrum* จะช่วยสร้างระบบที่ใช้สร้างสารแอสแซนทินในเชื้อกลายพันธุ์ (mutant) ที่ไม่สามารถสร้างสารแอสตาแซนทินได้

5.2 การสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

ในการศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เพื่อสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ยีสต์ให้ได้ปริมาณมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้กับการสกัดสารด้วยวิธี DMSO พบว่าประสิทธิภาพการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* คิดเป็น 13 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่สกัดด้วย DMSO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ในการศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ *B. circulans* CCRC 11590 ซึ่งในการศึกษาของ Johnson และคณะ (1978) ได้ศึกษาการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* สายพันธุ์ UCHU-FS501 โดยเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ร่วมกับ *B. circulans* CCRC 11590 ในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร โดยใช้เทคนิคการเลี้ยงแบบแบทช์ 2 ระยะ โดยระยะแรกเพาะเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* และในระยะสองเพาะเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ร่วมกับ *B. circulans* พบว่าความสามารถในการย่อยผนังเซลล์สูงสุดของ *B. circulans* เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยใช้ยีสต์ไนโตรเจนเบส เป็นแหล่งไนโตรเจนและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ผนังเซลล์ของ *X. dendrorhous* เป็นตัวเหนี่ยวนำให้ *B. circulans* ผลิตเอนไซม์กลูคาเนส พบว่าการเหนี่ยวนำเกิดได้เร็วที่สุดเมื่อเติมผนังเซลล์ 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิตสารแอสตาแซนทินได้ปริมาณ 9010 ไมโครกรัมต่อลิตรในช่วงแรกและจะผลิตสูงขึ้นเมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในช่วงแรก โดยอาหารยีสต์ไนโตรเจนเบสจะส่งเสริมความสามารถในการสกัดและกิจกรรมในการย่อยของ *B. circulans* สูงสุดในระยะที่สอง

จากการศึกษาของ Yoshida และคณะ (1997) ได้สกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces rochei* strain PHA-34 โดยเอนไซม์ที่ได้ประกอบด้วยเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูแคน-ไฮโดรไลเซส และเอนไซม์เบต้า 1,6 กลูแคน-ไฮโดรไลเซส ซึ่งพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *S. rochei* นั้นสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ปริมาณมากกว่าการสกัดโดยวิธีทางกายภาพ เช่น การบดโดยใช้เม็ดบีด หรือวิธีทางเคมี เช่น การใช้กรดแลคติก (lactic acid) หรือการสกัดด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ และ Hui Ni และคณะ (2006) ได้ปรับปรุงการสกัดสารแอสตาแซนทินโดยใช้วิธีทางเคมีโดยปัจจัยที่ใช้ในการสกัดได้แก่ การใช้กรด การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ อุณหภูมิและเวลา ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของกรดแลคติกที่ 5.55 โมลต่อลิตร อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งที่ 20.25 มิลลิลิตรต่อกรัม อุณหภูมิสำหรับใช้ในการสกัดสารที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้เวลาการสกัด 3 นาที พบว่าได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินและแคโรทีนอยด์ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 1,294.7 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 1,516.0 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ โดยวิธีทางเคมีนี้มีประสิทธิภาพในการสกัดสูง แต่ความเป็นพิษต่ำ และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ยุ่งยาก และจากการศึกษา An และ Choi (2003) ได้ปรับปรุงการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการใช้กรดไฮโรคลอริกทำลายผนังเซลล์ยีสต์ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลต่อลิตร อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาได้มากที่สุด และจะได้ว่าปัจจัยที่มีผลในการสกัดได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก แต่การใช้กรดไฮโดรคลอริกพบว่ามีผลทำให้สารแอสตาแซนทินเกิดการเสื่อมสภาพ (decomposed) ไปและการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางด้านอาหาร และในการศึกษาทางด้านการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical method) พบว่า Tinoi และคณะ (2004) ได้ศึกษาการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ด้วยการใช้วิธี Freeze-thaw ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) พบว่าสามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้ 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารที่สกัดได้ทั้งหมดด้วยวิธี DMSO แต่การสกัดด้วยวิธีนี้พบว่าขั้นตอนในการสกัดค่อนข้างยุ่งยาก และต้องใช้เวลานานในการสกัดสารแอสแซนทินออกมาจากเซลล์ยีสต์ได้ จากการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* ด้วยเอนไซม์กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* jmc 2504 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีทางชีวภาพที่ใช้สภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรง ดังนั้นจึงเป็นอีกวิธีที่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินออกมาอย่างรวดเร็วและลดการเสื่อมสภาพของสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ ธนรัตนพัฒนกิจ, นัฐ ภัทรศิริน, วีระ แก้วสมนึก.2547. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา Aspergillus sp. REB2 จากลูกแป้ง. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิตราวดี สมศรี, ศุภพร อินทร์พรหม.2549. การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปราณี อ่านเปรื่อง.2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยาภรณ์ มฤคพันธุ์, สุมลรัตน์ ปานทอง. 2549. การประยุกต์ใช้วิธีซิมเพลกซ์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์กลูคาเนสจากเชื้อ Bacillus circulans JMC 2504. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิชุดา เกตุใหม่ .2546. การศึกษาการผลิต การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จากเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3254 . สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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: 283-286.

An G., Jang B. and Cho M. 2001. Cultivation of the Carotenoid-Hyperproducing Mutant 2A2N 0f Red Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with Molasses. *J. Bioscience Bioengineering.* 92:121-125.

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.

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.

Bailey M.J., Siika-aho M., Valkeajarvi A. and Penttila M.E. 1993. Hydrolytic properties of two cellulases of *Trichoderma reesei* expressed in yeast, *Biotechnol. Appl. Biochem.*17:65–76.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cruz J.M. and Parajo J.C. 1998. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chem.* 63:479-484.

De Moraes, L.M.P., Astolfi-Filho, S. and Ulhao, C.J. 1999. Purification and some properties of an α-amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol Biotechnol.* 15:561–564.

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.

Freer, S.N. (1993) Purification and characterization of the extracellular α-amylase from *Streptococcus* sp. JB 1. *Appl Environ Microbiol.* 59, 1398–1402.

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.

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.

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.

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.

Mary M. 1974. Production and Applications of Cellulase Laboratory Procedures Handbook. U.S. Army Materials Laboratories

Nutan D. Mahadik, Kulbhushan B. Bastawde, Ulka S. Puntambekar, Jayant M. Khire and Digambar V. G. 2003. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. *Process biochem.* 39:2031-2034

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prakasham R.S., Subba R. C., Sreenivas R. R. and Sarma P.N. 2007. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori* . *J. Appl. Microbiol.* 102 : 204–211.

Rana D.S., Theodore K., Naido G.S.N and Panda T. 2003. Stability and kinetics of -β-1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum. Process biochem.* 39:149-155.

Shah A.R. and Madamwar D. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and characterization. Pro*cess biochem.* 40:1763-1771

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.

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.

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.

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

Yoshida M., Nishi A., Ohbuchi K., Horo T., Matsuzawa A., Hamachi M., and Kumagai C.1997. Screening of the Lytic Enxyme for the Red Yeast *Phuffia rhodozyma* Cell Wall and Extraction of Astaxanthin. General Research Laboratory. Ozeki Corp. Nishinomiya 663. Seibutsu kogaku 75: 229-238.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ชั่วโมงที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง 1 (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง 2 (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)
12	0.34	0.25	0.30
24	1.32	1.14	1.23
36	1.82	1.71	1.77
48	2.97	2.25	2.61
60	3.49	3.59	3.54
72	4.43	4.47	4.45
84	4.34	4.30	4.32
96	4.36	4.21	4.28
108	4.28	4.25	4.27
120	4.23	4.34	4.28
132	4.15	4.32	4.23
144	4.23	4.29	4.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่474 นาโนเมตร	ปริมาณแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)	ความเข้มข้นของสารแอสตาแซนทิน(มิลลิกรัมต่อลิตร)
12	0.023	0.09	5.96
24	0.059	0.11	13.34
36	0.185	0.18	15.80
48	0.303	0.19	16.33
60	0.597	0.23	16.34
72	0.637	0.24	21.39
84	0.743	0.28	24.53
96	0.689	0.26	22.57
108	0655	0.25	21.36
120	0.641	0.24	20.77
132	0.637	0.24	20.42
144	0.610	0.23	19.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* TISTR 5730

ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 474 นาโนเมตร	ปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.1	0.002	4	3.81
0.2	0.004	4	7.62
0.4	0.005	4	9.52
0.6	0.008	4	15.24
0.8	0.011	4	20.95
1.0	0.013	4	24.76
1.5	0.014	4	26.67
2.0	0.018	4	34.29
3.0	0.020	4	38.10
4.0	0.022	4	41.90
5.0	0.025	4	47.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้โดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ยีสต์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 474 นาโนเมตร	ปริมาณของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
4	0.001	4	1.90
5	0.003	4	5.71
6	0.007	4	13.33
7	0.011	4	20.95
8	0.016	4	30.47
9	0.020	4	42.33
10	0.025	4	47.62
11	0.028	4	48.56
12	0.030	4	49.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าการดูดกลืนแสง 474 นาโนเมตร	ปริมาณของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
30	0.011	4	20.95
35	0.015	4	28.57
40	0.018	4	34.28
45	0.022	4	41.90
50	0.010	4	19.04
60	0.000	4	0.00
70	0.000	4	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง 474 นาโนเมตร	ปริมาณของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)
5	0.016	4	30.47
10	0.019	4	36.19
15	0.021	4	40.00
20	0.024	4	45.71
25	0.025	4	47.61
30	0.028	4	53.33
45	0.031	4	59.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ANOVA

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	69.491	11	6.317	66889.955	0.000
Within Groups	0.002	24	0.000		
Total	69.493	35			

DUNCAN

time	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12.00	3	0.3000									
24.00	3		1.2300								
36.00	3			1.7700							
48.00	3				2.6100						
60.00	3					3.5400					
132.00	3						4.2300				
144.00	3							4.2600			
108.00	3							4.2700	4.2700		
120.00	3							4.2767	4.2767		
96.00	3								4.2800		
84.00	3									4.3200	
72.00	3										4.4500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.057	0.245	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่เวลาต่างๆ

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ANOVA

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	837.525	11	76.139	761386.0	0.000
Within Groups	0.002	24	0.000		
Total	837.527	35			

DUNCAN

time	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12.00	3	5.96										
24.00	3		13.34									
36.00	3			15.80								
48.00	3				16.33							
60.00	3				16.34							
144.00	3					19.67						
132.00	3						20.42					
120.00	3							20.77				
108.00	3								21.36			
72.00	3									21.39		
96.00	3										22.57	
84.00	3											24.53
Sig.		1.000	1.000	1.000	0.233	1.000	1.000	1.000	0.057	0.245	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ) การวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่เวลาต่างๆ

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง)

ANOVA

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	0.115	11	0.010	104.091	0.000
Within Groups	0.002	24	0.000		
Total	0.117	35			

DUNCAN

time	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
12.00	3	0.09						
24.00	3		0.11					
36.00	3			0.18				
48.00	3			0.19				
60.00	3				0.23			
144.00	3				0.23			
132.00	3				0.24	0.24		
120.00	3				0.24	0.24		
108.00	3				0.24	0.24		
72.00	3					0.25	0.25	
96.00	3						0.26	
84.00	3							0.28
Sig.		1.000	1.000	0.233	0.284	0.274	0.233	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 ที่มีผลต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorous* TISTR 5730

ANOVA

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	6475.646	11	647.565	6475646	0.000
Within Groups	0.002	22	0.000		
Total	6475.648	32			

DUNCAN

enzyme	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0.10	3	3.81										
0.20	3		7.62									
0.40	3			9.52								
0.60	3				15.24							
0.80	3					20.95						
1.00	3						24.76					
1.50	3							26.67				
2.00	3								34.29			
3.00	3									38.10		
4.00	3										41.90	
5.00	3											47.62
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้โดยการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างกัน

ANOVA

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	8712.832	8	1089.104	1E+007	0.000
Within Groups	0.002	18	0.000		
Total	8712.833	26			

DUNCAN

yeast	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
4.00	3	1.90								
5.00	3		5.71							
6.00	3			13.33						
7.00	3				20.95					
8.00	3					30.47				
9.00	3						42.33			
10.00	3							47.62		
11.00	3								48.56	
12.00	3									49.20
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

ANOVA

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	4666.763	6	777.794	1E+007	0.000
Within Groups	0.001	14	0.000		
Total	4666.764	20			

DUNCAN

temp	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
60.00	3	0.0000					
70.00	3	0.0000					
50.00	3		19.0400				
30.00	3			20.9500			
35.00	3				28.5700		
40.00	3					34.2800	
45.00	3						41.9000
Sig.		1.000	1.000	0.233	0.284	0.274	0.233

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์เวลาที่เหมาะสมในการสกัดแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้เอนไซม์ ที่ผลิตได้จากเชื้อ *T. harzianum* TISTR 3553

ANOVA

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	2413.206	7	344.744	170947.3	0.000
Within Groups	0.032	16	0.002		
Total	4666.764	23			

DUNCAN

time	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
5.00	3	30.4700							
10.00	3		36.2567						
15.00	3			40.0000					
20.00	3				45.7100				
25.00	3					47.6100			
30.00	3						53.3300		
45.00	3							59.0400	
60.00	3								60.4500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้