บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยพบว่าสำนักงานนโยบายพลังงานแห่งชาติ ตั้งเป้าการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ 600 ล้านลิตรต่อปีภายในปี 2554 ดังนั้นทำให้เกิดปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งคือการเกิดกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ซึ่งเป็นวัสดุเหลือเศษเหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยพบว่าการผลิตไบโอดีเซล 100 ลิตรพบว่าจะได้กลีเซอรอลดิบประมาณ 10 ลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 10 เนื่องจากการเพิ่มปริมาณการผลิตไบโอดีเซลให้มากขึ้น ทำให้ปริมาณของกลีเซอรอลดิบเพิ่มขึ้นด้วย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยรวมได้ นักวิจัยในประเทศไทยได้พยายามที่จะเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลให้มากขึ้น โดยการแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ผลิตได้กำไรเพิ่มขึ้นและเป็นการลดต้นทุนในการกำจัดกลีเซอรอลที่มีปริมาณมากเกินได้

ในขณะเดียวกันปัจจุบันการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* พบว่านักวิจัยหลายท่านได้ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ถึงร้อยละ 70-90 ของสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ผลิตได้ นับว่าจัดเป็นแหล่งที่สำคัญของสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ และสารแอสตาแซนทินปัจจุบันและพบว่าเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหารด้วย โดยสาร แอสตาแซนทินมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ๆ ถึง 10 เท่าและมากกว่าอัลฟา โทโคฟีรอล (α- tocopherol) ถึง 100-500 เท่าการผลิตสารแซนโทฟิลล์ในปัจจุบันนี้สามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยบริษัทที่ผลิตได้คือ Hoffman La Rhoch เพียงบริษัทเดียว ทำให้มีราคาสูงมาก เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยากมาก โดยราคาขายในท้องตลาดของแอสตาแซนทินพบว่ามีค่าสูงมากถึง 25,000-30,000 ดอลลาร์ต่อกิโลกรัมโดยมีสารแอสตาแซนทินเป็นองค์ประกอบร้อยละ 8 เท่านั้น ดังนั้นการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจมากขึ้น ดังนั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาการได้มุ่งเน้นศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการปรับสภาวะของอาหารและสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อที่เชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้มากขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารแอสตาแซนทินในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ดังนั้นจะเห็นว่าได้มีการประยุกต์ใช้วัตถุดิบจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อกันอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตสารแอสตาแซนทินและเป็นการลดภาวะสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและจากกระบวนการผลิตต่าง ๆ ตลอดจนเป็นการเพิ่มคุณค่าการใช้ประโยชน์ของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอีกด้วย ดังนั้นในแผนการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการเพาะเลี้ยง และการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* และประยุกต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินให้มากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเตรียมและประยุกต์ใช้กลีเซอรอลที่เป็นของเหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตสารแอสตาแซนทิน

2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอล

3. หาวิธีการเพิ่มปริมาณผลผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* โดยมีกลีเซอรอลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้ง

2. ลดต้นทุนในการกำจัดของเหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

3. ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากปริมาณของกลีเซอรอลที่มีปริมาณมากเกินไป

4. ได้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกที่เตรียมได้จากกลีเซอรอลในการเพาะเลี้ยงและผลิตสารแอสตาแซนทิน

5. สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินที่มีมูลค่าสูงที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง

6 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแอสตาแซนทินในอาหารที่เตรียมได้จากกลีเซอรอล

1.4 แนวทางการดำเนินการวิจัย

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นที่ 1 การตรวจเอกสาร รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้กลีเซอรอล การเพาะเลี้ยงและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* รวมถึงการเตรียมอุปกรณ์ที่สำคัญที่ใช้ในการเตรียมอาหารและการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ วางแผนและกำหนดขอบเขตงานในการดำเนินงานวิจัย

ขั้นที่ 2 ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอ-ดีเซล โดยศึกษาถึงปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ไขมัน และอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทิน

ขั้นที่ 3 ศึกษาวิธีการเตรียมกลีเซอรอลเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยต้องผ่านกระบวนการทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์บางส่วนเพียงพอที่สามารถนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยผ่านกระบวนการโดยการเติมกรดเกลือ (HCl) เพื่อเปลี่ยนสบู่ให้กลายเป็นกรดไขมันและแยกชั้นสารอินทรีย์ออก และจากนั้นเติมด้วยสารละลายโซดาไฟเพื่อทำให้เป็นกลางและเข้าเครื่องระเหยเพื่อแยกคืนเมทานอลที่คงเหลือกลับคืนมาอีกส่วนหนึ่ง และจากนั้นทำบริสุทธิ์กลีเซอรอลด้วยการกลั่นภายใต้สุญญากาศและกลีเซอรอลที่กลั่นได้จะถูกนำไปผ่านอุปกรณ์ฟอกสีด้วยถ่านกัมมันต์เพื่อให้เป็นผลผลิตที่ไม่มีสีและมีความบริสุทธิ์มากกว่า 95.5 %

ขั้นที่ 4 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินในอาหารที่เตรียมจากกลีเซอรอล โดยจะศึกษาถึงค่าการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารกลีเซอรอลที่เตรียมได้

ขั้นที่ 5 หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกลีเซอรอล โดยจะศึกษาถึงผลของปริมาณของกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอสตาแซนทิน ผลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เตรียมได้จากกลีเซอรอล รวมถึงระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินให้มากที่สุด

ขั้นที่ 6 ปรับปรุงคุณภาพอาหารที่เตรียมได้จากกลีเซอรอล เพื่อให้เชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินให้มากที่สุด โดยอาจเพิ่มสารที่มีคุณสมบัติในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous*

โดยสถานที่ทำการทดลอง ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.5 ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ตลอดโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2551 ถึงกันยายน 2552

ขั้นตอนการวิจัย	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-ตรวจเอกสารเพิ่มเติม เตรียมอุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับใช้ในงานวิจัย	⟷	⟷										
เก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่าง	⟷	⟷	⟷									
ศึกษาคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากกลีเซอรอล				⟷	⟷							
การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*						⟷	⟷	⟷	⟷			
การศึกษาวิธีการสกัดและหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous*									⟷			
ศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อให้ได้ปริมาณที่มากที่สุด										⟷	⟷	
สรุปผลและจัดพิมพ์รายงาน					⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷

บทที่ 2
ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

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 หมู่ ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่ โดยโครงสร้างหลักประกอบด้วย acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene โดยสมบัติการดูดกลืนแสงของสารแคโรทีนอยด์ขึ้นอยู่กับสายของ conjugated double bond ที่ทำหน้าที่เป็นโครโมฟอร์ (chromophore) ซึ่งให้สีที่มองเห็นได้ในช่วงแสง visible สารกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ carotene ซึ่งเป็นโมเลกุลของ acylclic $C_{40}H_{56}$ carotene ที่ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจน โดยคาร์บอนเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเดี่ยวสลับพันธะคู่ และที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างจะมีอะตอมของคาร์บอนเกาะกันเป็นวงเรียก วงแหวนไอโอโนน (ionone ring) ตัวอย่างเช่น เบต้าแคโรทีน (β-caroten))และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นแคโรทีนอยด์ที่โมเลกุลประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และมีการเพิ่มอนุพันธุ์ของออกซิเจนเป็นองค์ประกอบของแคโรทีนด้วย เช่น ไฮดรอกซี (-OH) คีโตน (-C=O) อัล-ดีไฮด์ (-CHO) คาร์บอกซี (-COOH) หรือ อีพอกไซด์ (epoxide group) ตัวอย่าง ได้แก่ เอคไคนีโนน (echinenone) แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) และสารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น

2.1.1 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 โดยแสงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างซิสและทรานส์ของพันธะคู่ (cis-trans double bonds) ทำให้เปลี่ยนช่วงการดูดกลืนแสงและทำให้สีของสารแคโรทีนอยด์เปลี่ยน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาสารแคโรทีนอยด์ในตัวทำละลายบริสุทธิ์ บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท และสภาวะแวดล้อมเป็นสุญญากาศหรือก๊าซเฉื่อย บริเวณที่ปราศจากแสงและอุณหภูมิต่ำหรือใช้สารต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อช่วยให้แคโรทีนอยด์มีความเสถียรสูงขึ้น

2.1.2 บทบาทและความสำคัญของสารแอสตาแซนทินในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

1. เป็นรงควัตถุที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง คือ เป็นสารดูดซับพลังงานแสงและมีหน้าที่ขนส่งพลังงานให้กับคลอโรฟิลล์ เอ ทำให้พืชสามารถเกิดการสังเคราะห์ในช่วงคลื่นที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถดูดกลืนแสงได้

2. มีบทบาทต่อกระบวนการป้องกันแสงของแบคทีเรียและมนุษย์ในบางสภาวะแวดล้อม

3. เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของจุลินทรีย์และเป็นสารที่ช่วยเพิ่มสีสันของดอกไม้เพื่อดึงดูดความสนใจของแมลงที่ช่วยในการผสมเกสรในการขยายพันธุ์พืช

4. เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเช่น อุตสาหกรรมอาหาร การเลี้ยงสัตว์ การแพทย์และเภสัชกรรม รวมทั้งอุตสาหกรรมด้านความงาม โดยแอสตาแซนทินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยสามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกและช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง สารแอสตาแซนทินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพใช้ในการรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ ต่อต้านการอักเสบ และช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงได้มีการนำสารแอสตาแซนทินไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรมรวมถึงการผลิตเครื่องสำอางนอกจากนี้สารแอสตาแซนทินยังช่วยในการป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันด้วย

ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับมนุษย์คือ เนื่องจากสารแอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุที่มีสีแดง ส้ม และ ชมพู ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับมนุษย์ คือ การนำมาใช้เป็นสารสีผสมอาหาร (food colorants) ซึ่งสารแอสตาแซนทินที่เป็นที่ต้องการของตลาดการค้าสำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร คือ สีส้ม และสีแดง โดยส่วนใหญ่ผสมในเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ใช้แต่งสีขนมเค้ก และคุกกี้ รวมทั้งลูกอมและไอศกรีม เป็นต้น ส่วนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ จะใช้ผสมในอาหารสัตว์ เช่น อาหารปลา อาหารสุกร อาหารโค รวมทั้งอาหารสัตว์ปีก ซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านี้มีสีสันเป็นที่น่าสนใจต่อการบริโภค สารแอสตาแซนทินเป็นสารที่ให้ผลดีต่อสัตว์ เช่น ไก่ที่เลี้ยงเป็นการค้าจะมีการเติมสารแอสตาแซนทินลงไปเพื่อเพิ่มสีในไข่แดง เพิ่มการสร้างไข่ของไก่ เพิ่มการเจริญของลูกไก่และลดการตายเนื่องจากการติดเชื้อในถุงไข่แดง (yolk sac) ช่วยให้สีของไข่แดงและเนื้อของสัตว์ปีกมีสีเหลืองทอง เป็นต้น นอกจากนี้ได้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอาหารสำหรับปลาแซลมอน (salmon) ปลาเทราท์ (trout) กุ้งมังกร เพื่อให้มีสี

ชมพ ู่เมื่อเติมเซลล์ของ *X. dendrorhous* ที่ทำให้แตกลงในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาเทราท์ ปลาแซลมอน สารแอสตาแซนทินจะถูกดูดซับที่บริเวณลำไส้ ทำให้ปลาแซลมอนนั้นมีสีชมพูสด เพิ่มความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อของแซลมอน ซึ่งการเติมสารแอสตาแซนทินลงในอาหารของสัตว์ต่าง ๆ ดังกล่าว เป็นเพิ่มมูลค่าของสัตว์นี้ให้มากขึ้นและยังเป็นเพิ่มสีสันให้กับสินค้า รวมทั้งยังมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคเนื่องจากมีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

2.1.3 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 เปอร์เซ็นต์ในปี 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 ตลอดจนการเลือกกระบวนการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อชนิดนี้

2.1.4 เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารแอสตาแซนทินในงานวิจัย

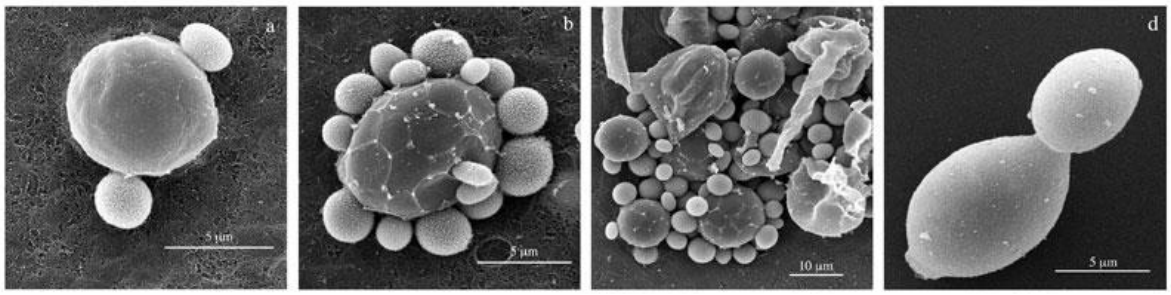
Xanthophyllomyces dendrorhous เดิมมีชื่อเรียกว่า *Phaffia rhodozyma* เป็นยีสต์ในตระกูล Basidiomycetous สามารถทำการหมักในกลูโคสและได้สารแคโรทีนอยด์ที่มีชื่อเรียกว่า แอสตาแซนทีน ยีสต์ชนิดนี้พบว่าได้มีการศึกษาในการผลิตสารแอสตาแซนทิน เป็นระยะเวลานานมากถึง 30 ปี โดยค้นพบครั้งเรียกในปี 1976 หลังจากนั้นได้รับความสนใจเรื่อยมา จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ถึง 70-90 เปอร์เซนต์ของสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ผลิตได้ นับว่าจัดเป็นแหล่งที่สำคัญของสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ และสารแอสตาแซนทินปัจจุบันพบว่าเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหารด้วย โดยสาร แอสตาแซนทินมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ๆ ถึง 10 เท่าและมากกว่าอัลฟา โทโคฟลีรอล (α- tocopherol) ถึง 100-500 เท่า การผลิตสารแอสตาแซนทินในปัจจุบันนี้สามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยบริษัทที่ผลิตได้คือ Hoffman La Rhoch เพียงบริษัทเดียว ทำให้มีราคาสูงมาก เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยากมาก โดยราคาขายในท้องตลาดของแอสตาแซนทินพบว่ามีค่าสูงมากถึง $25,000-30,000 ต่อกิโลกรัมโดยมีสารแอสตาแซนทินเป็นองค์ประกอบ 8% ดังนั้นการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจมากขึ้น แต่การผลิตจากจุลินทรีย์ *X. dendrorhous* พบว่ามีปัญหาที่สำคัญ 2 ประการคือ เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้น้อย ในเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้มีการปรับปรุงพันธุ์ และผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์นี้มีความเหนียวมาก ทำให้ยากต่อการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการศึกษาการผลิตสารกลุ่มคาโรทีนอยด์จากเชื้อยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *Rhodotorular glutinis* พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารคาโรทีนอยด์ชนิดเบต้าแคโรทีน โทรูลาโรดีนและโทรูลีนได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารแซนโทรฟิลล์ชนิดแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่าสารแอสตาแซนทินนี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหลายเท่า ดังนั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาการได้มุ่งเน้นศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยการปรับสภาวะของอาหารและสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อที่เชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้มากขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารแอสตาแซนทินในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2.1.5 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous*

ลักษณะของเชื้อ *X. dendrorhous*

Xanthophyllomyces dendrorhous หรือ *Phaffia rhodozyma* ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่ม basidiomycetous เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติของผนังเซลล์ รูปแบบของการแตกหน่อ การสร้างสารสี และคุณสมบัติทางด้านเมทาบอลิก *X. dendrorhous* มีลักษณะการสร้างเบสิดิ

โอ-สปอร์ (basidiospore) แบบโฮโลเบสิเดียม (holobasidium) จากเส้นใยที่มีสองนิวเคลียสโดยตรง และไม่สร้างเทลิสปอร์ (telispore) และมีการแตกหน่อเป็นแบบเอนเทอโรบลาสติก (enteroblastic) คือ การแตกหน่อจะเกิดจากการมีรอยแยกบนผนังเซลล์ของเซลล์แม่ ดังรูปที่ 2.1 โดยที่ชั้นในของผนังเซลล์แม่ยื่นเจริญออกไปเพื่อสร้างชั้นนอกสุดของผนังของหน่อ และขาดออกจากเซลล์แม่ หลังจากที่มีหน่อจำนวนมากเกิดที่บริเวณเดียวกันตำแหน่งที่สร้างหน่อบนเซลล์แม่จะล้อมรอบด้วย คอลลา (colla) ราจำพวก basidiomycetous จะมีผนังเซลล์บาง ๆ แต่มีหลายชั้น ชั้นในมีหลายชั้นทั้งที่บางโปร่งและทึบแสง และชั้นนอกค่อนข้างกระจาย และมีผนังกั้นเส้นใยเป็นรูปแบบธรรมดาที่มีผนังเซลล์ยื่นเข้าไปตรงกลางรู



รูปที่ 2.1 เซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous*

http://expertvoices.nsdl.org/pathwaysnews/files/2007/06/sem-multibudding-highres.jpg

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 พบมากที่ผนังกั้นแยกหน่อออกจากเซลล์แม่และที่บริเวณรอยแผลจากการ

แตกหน่อและกระจายในผนังเซลล์ส่วนอื่น ๆ เล็กน้อย นอกจากโพลิแซคคาไรด์แล้วองค์ประกอบส่วนน้อยที่พบในผนังเซลล์ยีสต์ คือ โปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์ฟอสเฟต

เนื่องจากสารแอสตาแซนทินเป็นสารที่ถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ *X. dendrorhous* ดังนั้นจะพบการสะสมของสารแอสตาแซนทินและสารแคโรทีนอยด์อื่น ๆ ภายในเซลล์ของยีสต์ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยปริมาณสารที่มีการสะสมจะพบว่ามีการสะสมบริเวณไขมันโมเลกุลเล็ก ๆ (lipid globules) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) โดยมีการสังเคราะห์ที่บริเวณไมโตคอนเดรีย (mitochondria) แล้วนำไปสะสมที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยปริมาณการสะสมของสารแอสตาแซนทินจะแตกต่างกัน ในเซลล์ที่มีอายุน้อยจะมีการสะสมน้อยกว่าเซลล์ที่อายุมาก เนื่องจากเซลล์อายุน้อยจะมีปริมาณของโมเลกุลไขมันน้อยกว่าเซลล์ที่มีอายุมากกว่า

รูปที่ 2.2 Astaxanthin glubules ในเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous*

http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/176-2.jpg

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous*

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

แหล่งไนโตรเจน

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

ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย

ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะสาร2 ชนิดนี้รวมอยู่ในกระบวนการถ่ายโอนพลังงาน นอกจากนี้เหล็ก โคบอลต์ ทองแดง และสังกะสี เป็นธาตุที่ขาดไม่ได้ มักได้มากับน้ำหรือติดมากับสารตัวอื่น ๆ สารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น กรดอะมิโนหรือวิตามินอาจต้องเติมลงในอาหารเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าขาดเช่นกัน

ปัจจัยทางกายภาพ

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมความเป็นกรดเบส จะมีผลยับยั้งการผลิตสารแอสตาแซนทิน ดังนั้นการผลิตสารแอสตาแซนทินต้องกระทำในสภาพอาหารที่ไม่มีบัฟเฟอร์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและแอสพาราจีนที่มีค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 6.0เมื่อเชื้อเจริญจะมีผลให้ความเป็นกรดลดลง การลดค่าความเป็นกรดเบสอย่างรวดเร็วจะมีการผลิตแคโรทีนอยด์เกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน

อุณหภูมิ

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

แสง

แสงมีความสำคัญในการสร้างสารแอสตาแซนทินในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ในราหลายชนิด พบว่าแสงและปริมาณออกซิเจนมีบทบาทในการเป็นตัวชักนำในการสร้างสารแอสตาแซนทิน สำหรับการผลิตสารแอสตาแซนทินได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Phycomyces blakesleeanus* ในที่ไม่มีแสง พบว่าผลผลิตมีปริมาณพอสมควร แต่ถ้าใช้แสงกระตุ้นผลผลิตจะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ดังนั้นการเพาะเลี้ยง

เชื้อเพื่อผลิตสารสีสารแอสตาแซนทินพบว่าแสงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง แต่การเลี้ยงเชื้อในที่ที่มีแสงนั้น ควรจะต้องควบคุมความเข้มของแสงให้พอเหมาะ ถ้าความเข้มของแสงมากเกินไป แสงอาจจะมีผลต่อสารสีที่ผลิตได้ โดยอาจทำให้เกิดการเสียสภาพหรือสูญสลายของสารสีได้ การเจริญและการสร้างรงควัตถุของ *X. dendrorhous* ถูกยับยั้งโดยแสงที่มีความเข้มสูงๆ การสร้างแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *X. dendrorhous* จะถูกชักนำเมื่อมีความเข้มแสงต่ำ ๆ แสงสีน้ำเงินจะชักนำให้เกิดการสร้างสารสีมากกว่าแสงสีแดง เหลือง หรือแสงสีเขียว เมื่อยีสต์นั้นเจริญบนอาหาร YM agar ที่อุณหภูมิ 7.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

การเจริญเติบโตและการสร้างรงควัตถุ

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

การศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินสำหรับงานวิจัยนี้ ให้ความสนใจปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารสีคือ อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสทาแซนทีน โดยมีวัตถุประสงค์ในการนำเอาของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด โดยการนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารของเชื้อเพื่อผลิตสารแอสตาแซนทิน ซึ่งสิ่งที่นำมาเป็นข้อพิจารณาเลือกวัตถุดิบเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ได้แก่

1. ราคา (cost) วัตถุดิบควรมีราคาถูก

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

3. หาได้สม่ำเสมอตลอดปี (availability) และมีปริมาณมากเพื่อป้องกันปัญหาการขาดแคลน

4. ความสะดวกหรือความยุ่งยากในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งต้องระวังในเรื่องอุณหภูมิ แสง ความชื้นและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

ส่วนการเลือกวัตถุดิบเพื่อเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อและผลิตสารสีแคโรทีนอยด์นั้น ต้องทำการเลือกอาหารที่ต้องไม่มีสีในตัวเอง เพื่อไม่ให้เป็นปัญหาในการเก็บเกี่ยวสารสี หรือสกัดสารสีในภายหลัง ซึ่งประเทศไทยควรมีการวิจัยใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม ต่างๆ โดยทำให้ได้มาตรฐานการผลิตและส่งออก

2.2 กลีเซอรอล (Glycerol)

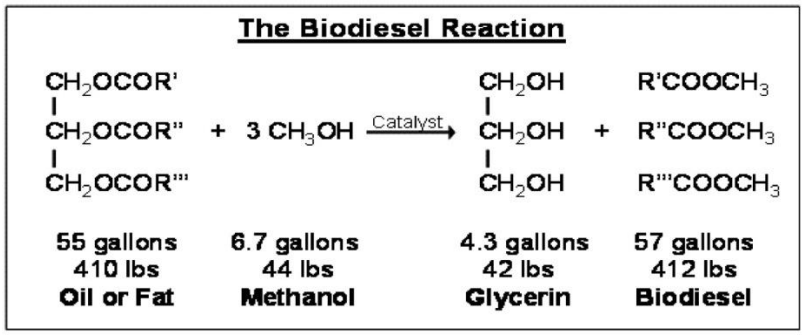
กลีเซอรอล (glycerol) จัดเป็นสารประกอบประเภท trihydric alcohol โดยมีสูตรทั่วไปคือ $CH_2OHCHOHCH_2OH$ ซึ่งอาจรู้จักกันแพร่หลายในชื่อ กลีเซอรีน (glycerin) และมีชื่อทางการว่า propane-1,2,3-triol หรือ 1,2,3-propanetriol หรืออาจเรียกว่า 1,2,3-trihydroxypropane คุณสมบัติของ กลีเซอรอลโดยทั่วไป ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เป็นของเหลวที่มีความหนืดและมีความหวาน บางครั้งอาจจัดเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) เนื่องในโครงสร้างมีหมู่ –OH (alcoholic hydroxyl groups) 3 หมู่อยู่ในโมเลกุล ทำให้กลีเซอรอลมีความสามารถในการละลายน้ำได้ กลีเซอรอลมักพบโดยทั่วไปในธรรมชาติ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของสารประกอบประเภทไขมันและน้ำมัน และถือว่าเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการย่อยสลายไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมันหรือเกลือของกรดไขมัน

สำหรับงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นในการใช้ประโยชน์กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนผลิตไบโอดีเซล โดยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากการเตรียมไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน กลีเซอรอลสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ได้ในหลายอุตสาหรรม เช่น ยา เครื่องสำอาง อาหาร สำหรับโรงงานไบโอดีเซล ที่มีการใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นวัตถุดิบวันละ 10.6 ตัน เพื่อผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้เดือนละประมาณ250,000 ลิตร (3,000,000 ล้านลิตร/ปี) และสามารถผลิตกลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้เดือนละ 17,500 กิโลกรัม (210,000 กิโลกรัม/ปี) และปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยพบว่าสำนักงานนโยบายพลังงานแห่งชาติ ตั้งเป้าในการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ 600 ล้านลิตรต่อปีภายในปี 2554 ดังนั้นทำให้เกิดปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งคือ การเกิดกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยพบว่าการผลิตไบโอดีเซล 100 ลิตรพบว่าจะได้กลีเซอรอลดิบประมาณ 10 ลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 10 เนื่องจากการเพิ่มปริมาณการผลิตไบโอดีเซลให้มากขึ้น ทำให้ปริมาณของกลีเซอรอลดิบเพิ่มขึ้นด้วย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยรวมได้ นักวิจัยในประเทศไทยได้พยายามที่จะเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลให้มากขึ้น โดยการแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ผลิตได้กำไรเพิ่มขึ้นและเป็นการลดต้นทุนในการกำจัดกลีเซอรอลที่มีปริมาณมากเกินได้

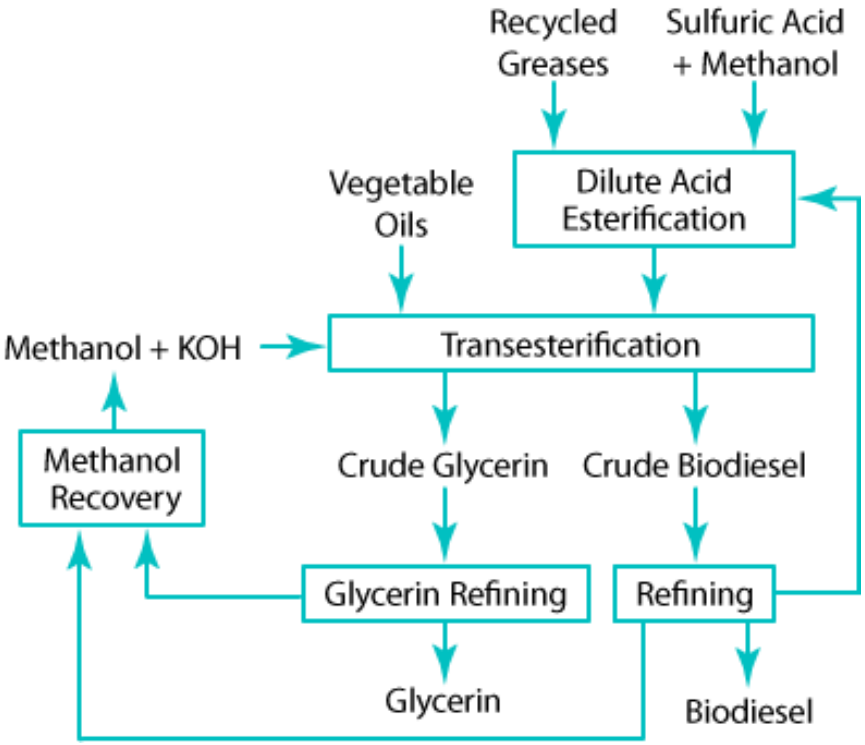
2.2.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่งที่รัฐบาลให้ความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากสามารถทดแทนการใช้น้ำมันดีเซล ซึ่งใช้มากในการขนส่งอันมีผลกระทบโดยตรงต่อปัจจัยการดำเนินธุรกิจ โดยมีการกำหนดแผนพัฒนาไบโอดีเซลระดับประเทศตั้งเป้าทดแทนการใช้น้ำมันดีเซลวันละ 8.5 ล้านลิตรต่อวัน ในปี พ.ศ.2555 หรือ ร้อยละ 10 ของความต้องการใช้น้ำมันดีเซล ด้วยการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันใช้แล้ว เป็นวัตถุดิบหลัก

กระบวนการผลิตไบโอดีเซล เป็นกระบวนการเปลี่ยนน้ำมันพืชหรือสัตว์ ซึ่งเป็นสารประกอบไตรกลีเซอไรด์ โดยผ่านกระบวนการการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ในแอลกอฮอลล์ (alcohol) เช่น เมทานอล (methanol) หรือ เอธานอล (ethanol) โดยมีด่าง (sodium hydroxide หรือ potassium hydroxide) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalysts) ที่ทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลงอยู่ในรูปของเอสเตอร์ ethyl ester หรือ methyl esters) ที่เรียกว่า ไบโอดีเซล (biodiesel) และมีกลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลพลอยได้ (by-product) ดังได้แสดงในรูปที่ 2.3



ที่มา: http://web.mit.edu/biodiesel/img/chemical%20rxn2.jpg



รูปที่ 2.3 แผนผังกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ที่มา : http://www.afdc.energy.gov/afdc/fuels/images/flowchart_biodiesel_prod.gif

ไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก สามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยตรง หรือเติมเป็นส่วนผสมในดีเซลใช้ในเครื่องยนต์ โดยไม่ต้องปรับแต่เครื่องยนต์และให้พลังงานเช่นเดียว กับน้ำมันดีเซลปกติ ไบโอดีเซลได้รับการจดทะเบียนเป็นเชื้อเพลิงบริสุทธิ์หรือสารเติมเชื้อเพลิง โดยองค์กร Environmental Protection Agency (EPA) และจัดอยู่ในเชื้อเพลิงที่ถูกต้องตามกฎหมายการค้า

สำหรับสัดส่วนของวัตถุดิบที่ใช้และสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิต โดยประมาณ คือ น้ำมันพืช 100 ลิตร ต้องใช้เมนทานอลในการทำปฏิกิริยา 20 กิโลกรัม สารเร่งปฏิกิริยา 1 กิโลกรัม จะทำให้ได้ผลผลิตเป็นไบโอดีเซล 95 ลิตร และมีผลพลอยได้เป็นกลีเซอรอล 10 กิโลกรัม ไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติตามมาตรฐานสากลและมีการจัดการ เพื่อป้องกันปัญหามลพิษและสิ่งแวดล้อม ผลพลอยได้เป็นกลีเซอรอล สามารถกลั่นเป็นกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง จุดสำคัญของการผลิตไบโอดีเซลเพื่อให้ได้คุณสมบัติตามมาตรฐานสากลต้องเป็นการผลิตที่มีปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชันเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้ว ต้องมีการกำจัดสารเร่งปฏิกิริยา กำจัดกลีเซอรอล กำจัดแอลกอฮอลล์ และกรดไขมันอิสระออกจึงจะได้ไบโอดีเซลที่ไม่เกิดผลเสียต่อเครื่องยนต์

2.2.2 ขั้นตอนการทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์

1) กลีเซอรอลดิบจากขั้นตอนการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันจะถูกนำมาเติมกรดเกลือ (HCl) เพื่อเปลี่ยนสบู่ที่มีอยู่ให้กลายเป็นกรดไขมันและแยกชั้นสารอินทรีย์ออก
2) จากนั้นกลีเซอรอลเหลวจะถูกเติมด้วยสารละลายโซดาไฟเพื่อทำให้เป็นกลางก่อนที่จะนำไปเข้าเครื่องระเหยเพื่อแยกคืนเมทานอลที่คงเหลือกลับคืนมาอีกส่วนหนึ่ง จากนั้นจะเป็นขั้นตอนการระเหยน้ำออกเพื่อให้ขั้นตอนในการกลั่นไม่ต้องทำงานหนักมาก
3) การทำบริสุทธิ์กลีเซอรอลจะทำด้วยการกลั่นภายใต้สุญญากาศ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ของกลีเซอรอล
4) กลีเซอรอลที่กลั่นได้จะถูกนำไปผ่านอุปกรณ์ฟอกสีด้วยถ่านกัมมันต์ เพื่อให้เป็นผลผลิตที่ไม่มีสีและมีความบริสุทธิ์มากกว่า 95.5 % ซึ่งสามารถขายได้ในเกรดของยา

ต่อมาได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยจากรายงานการวิจัยของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้หาแนวทางในการแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารประกอบมูลค่าเพิ่มต่าง ๆ พบว่า

สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol ซึ่งเป็นสาระสำคัญในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ โดยการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย คือ สายพันธุ์ *Enterobacter radicincitans* ที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยสาร 1,3-propanediol เป็นสารโมโนเมอร์ที่มีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ใช้ในการสังเคราะห์โพลิเอสเทอร์ (polyester) สารหล่อลื่น (lubricant) ตัวทำละลาย หรือสามารถนำมาผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) นอกจากนี้การผลิตสาร 1,3-propanediol พบว่าในต่างประเทศได้ให้ความสำคัญและมีการพัฒนาการผลิตสารด้วยเช่นเดียว โดยพบว่าสามารถผลิตได้โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น เช่น *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* หรือ เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ใน genus *Enterobacter, Clostridium, Lactobacillus* และ *Bacillus* (Gonzalez-Pajuelo และคณะ, 2004; Lin และคณะ, 2005; Zhao และคณะ, 2006; Cheng และคณะ, 2006 และ Yazdani และ Gonzalez, 2007)

นอกจากนี้กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถนำไปประยุกต์ในการผลิตพลังงานและสารเคมีอื่น ๆ ด้วย โดย Biebl (2001) ได้ผลิตบิวทานอล (butanol) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Clostridium pasteurienum* พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ 17 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Javis และคณะ (1997) ได้ผลิตเอธานอลและฟอร์เมท (formate) จากกระบวนการหมักกลีเซอรอลของเชื้อ *Klebsiella planticola* ที่แยกจากกระเพาะของ red deer พบว่าสามารผลิตได้ 2 กรัมต่อลิตรแต่ต้องใช้เวลานานมาก และต่อมา Ito และคณะ (2005) ได้มีการผลิตกาซไฮโดรเจน (H_2) และเอธานอล จากกลีเซอรอลที่มีของเหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลร่วมด้วยโดยใช้เชื้อ *Enterobacter aerogenes* พบว่าสามารถผลิตเอธานอลได้สูงถึง 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการผลิตเอธานอลร่วมกับไฮโดรเจน หรือการผลิตเอธานอลร่วมกับฟอร์เมทได้แสดงถึงศักยภาพในการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลที่เป็นของเหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเป็นแนวทางอีกทางหนึ่งที่เป็นเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล

จากคุณสมบัติของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่เป็นสารที่มีความหนืด และไม่เป็นพิษต่อคน (Carey, 2002) ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ผสมอาหาร ไอศกรีมไซรัป (syrups) เพื่อเพิ่มความหวานให้กับอาหารและเพิ่มสีหรือความมันวาว (shiny)ให้กับอาหารเหมือนวานิลลา และเป็นส่วนผสมของขี้ผึ้งหรือครีมต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบหนึ่งในยา โดยเฉพาะยาแก้ไอ ซึ่งใช้เป็นสารหล่อลื่น (lubricant) ทำให้ทานยาง่ายขึ้นและที่สำคัญเป็นส่วนประกอบหลักในผลิตเครื่องสำอาง personal care เช่น ครีมและโลชั่นบำรุงผิว จะช่วยในการป้องกันการสูญเสียความชื้นของผิว ไม่ให้ผิวหนังแห้งและแตก และยังช่วยให้ผิวหนังอ่อนนุ่มด้วย (Blichmann และคณะ, 1989; Orth และ Appa, 2000; Loden และ Wessman, 2001) ในยาสีฟันเป็นส่วนที่ช่วยให้เนื้อของยาสีฟันเรียบเสมอกันและมีความมันวาว นอกจากนี้ยังเป็นส่วนผสมของยาสระผม เพื่อช่วยให้ง่ายต่อการเทออกจากขวด และผสมในสบู่เพื่อให้เนื้อสบู่โปร่งแสงแวววาว

ขณะเดียวกันอนุพันธ์ของกลีเซอรอลพบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง จากการประยุกต์ใช้กลีเซอรอลอย่างกว้างขวาง จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแปรรูปของเหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในรูปกลีเซอรอลดิบ ดังนั้นในงานวิจัยจึงได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับเทคนิค หรือวิธีการต่าง ๆ ในการทำให้กลีเซอรอลดิบที่ได้จากการบวนการดังกล่าวมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น เพื่อที่สามารถนำไปประยุกต์ทางด้านเครื่องสำอาง รวมถึงการเตรียมกลีเซอรอลให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของกลีเซอรอล ซึ่งพบว่าสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายเช่นเดียวกับกลีเซอรอลบริสุทธิ์

2.3 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* อย่างกว้างขวาง รวมทั้งได้ศึกษาแหล่งของอาหารต่าง ๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นอาหารหรือสับสเตรต 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 กรัมต่อลิตรพบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 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 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Haard, 1988) ต่อมาได้ศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น sugarcane ซึ่งแบ่งเป็น stalk shell และ stalk pith ที่มีปริมาณคาร์บอน 44-32 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน และ fresh sugarcane ที่มีปริมาณคาร์บอน 15 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 11.6, 10.8 และ 14.05 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ (Fontana และคณะ, 1996) ในการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่เป็น enzymatic wood hydrolysates ที่มีไซโลส (xylose) กลูโคส (glucose) และเซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นองค์ประกอบ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 2.14 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cruz และ Parajó, 1998)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* สายพันธุ์เดิม TISTR 5730 โดยเลี้ยงในอาหารที่เตรียมได้จากของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต AIT (Allylisothio cyanate) พบว่าการผลิตสารแอสตาแซนทินจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่เตรียมได้จากกากมัสตาร์ดจะได้ว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากการเติมกากมัสตาร์ดเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดในการให้ปริมาณของมวลเซลล์และแอสตาแซนทินเท่ากับ 19.6 กรัมต่อลิตร และ 25.8 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งเป็นการปรับปรุงการผลิตแอสตาแซนทินให้เพิ่มขึ้นเป็น 11 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหาร YM และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ได้จากกากมัสตาร์ดประเภทอื่น ๆ จะพบว่าเพิ่มการผลิตแอสตาแซนทินได้ 2.1-1.3 เท่า (Tinoi และคณะ, 2006)

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

นอกจากนี้ในการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถนำวัตถุดิบที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต โดยใช้ทดแทนสารตั้งต้นสังเคราะห์สำเร็จรูปที่มีราคาแพง และยังเป็นการเพิ่มความสามารถในการผลิตสารแอสตาแซนทินด้วย 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) และต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้น้ำอ้อยในการผลิตสารแอสตาแซนทิน พบว่าสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 1300 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือ 6500 ไมโครกรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาได้มีการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะของการหมัก โดยใช้ factorial design เป็น 2 ขั้นตอน โดยในขั้นแรกศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินในระดับความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ กันและปฏิสัมพันธ์ของสารอาหารพบว่าการผลิตเพิ่มขึ้น 23 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณรงควัตถุในเซลล์ลดลง 16 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นที่สองได้ทำการผันแปรค่ากรดด่างและระดับการกวนที่มีผลต่ออัตราการถ่ายโอนออกซิเจน พบว่าเพิ่มขึ้นทั้ง

ปริมาณรงควัตถุ (418 ไมโครกรัมแอสตาแซนทินต่อกรัมของยีสต์) และการผลิตรงควัตถุ (1987 ไมโครกรัมต่อลิตร) (Ramirez และคณะ, 2001) ได้ศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินจากน้ำผลอินทผลัมโดยสายพันธุ์กลายของ *X. dendrorhous* ที่มีการปรับปรุงสารพันธุกรรมให้มีการผลิตสูงขึ้น พบว่าเมื่อใช้อาหารที่ประกอบด้วยน้ำผลอินทผลัมเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงสุด 6170 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อมีปริมาณน้ำตาลในอาหารซึ่งได้จากน้ำผลอินทผลัม 22.4 กรัมต่อลิตร การใช้อาหารที่มีน้ำผลอินทผลัมสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้อาหาร Yeast extract-Malt extract นอกจากนี้การออกแบบการทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของสายพันธุ์สำหรับการผลิตสารแอสตาแซนทินจากการเลี้ยงแบบฟาสก์เขย่า (shaker flask) พบว่าสภาวะที่เหมาะที่สุดในการผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงสุด คือ ที่อุณหภูมิ 19.7 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 11.25 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์และความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.5 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะเหล่านี้พบว่าสายพันธุ์ 2 -25 ของ *X. dendrorhous* สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้ 8100 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการผลิตโดยใช้สภาวะเดิม เป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินวิธีหนึ่ง

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

ขณะเดียวกันในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตน้ำมันและไขมันจากจุลินทรีย์พบว่าได้มีการประยุกต์ใช้ของเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปอาหารต่าง ๆ หรือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เตรียมเพื่อเป็นแหล่งอาหารหรือสารตั้งต้นในการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันและไขมันจากจุลินทรีย์ ซึ่งอีกแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนในการในการผลิตน้ำมันและไขมันจากจุลินทรีย์เนื่องจากอาหารสำเร็จรูปมีราคาแพงมาก และเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือใช้ที่มีปริมาณมากด้วย โดยจากการศึกษาของ Pananikolaou และ Aggelis (2002) ได้ศึกษาการผลิตไขมันจากเชื้อ *Yarrowia lipolytica* และได้ประยุกต์ใช้กลีเซอรอลที่เป็นของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม (by-product) มาประยุกต์เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไขมัน พบว่าสามารถผลิตไขมันได้ร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งจากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นสามารถนำกลีเซอรอลที่เป็นของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้ได้ ทำให้เห็นแนวทางในการประยุกต์เอากลีเซอรอลดิบที่ได้กระบวนการผลิตไบโอดีเซลต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เป็นแหล่ง

คาร์บอนสำหรับเพื่อผลิตไขมันเพื่อเตรียมเป็นไบโอดีเซลได้ ซึ่งเป็นการนำกลีเซอรอลกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable) ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันได้อีกทางหนึ่งด้วย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง YM จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารวุ้นเอียง YM ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.2 กลีเซอรอลดิบ

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ของ บริษัท ปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย จำกัด

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

	บริษัท
yeast extract	Biomark laboratories
malt extract	Britania laboratories
peptone	Biomark laboratories
glucose	Fluka Biochemical

3.4 สารเคมี

สารเคมี	**บริษัท**
Acetone	VWR International
Acetronitrile	Brightchem SDN BHD
Bromo thymal blue	Ajax Finechem Pty Ltd
Dimethyl sulfoxide	Merck Schuchardt OHG
Ethanediol	VWR International
Hexane	Brightchem SDN BHD
Methanol	Brightchem SDN BHD
Petroleum ether	Labscan Asia
Sodium chloride	Ajax Finechem Pty Ltd

Sodium hydroxide	Ajax Finechem Pty Ltd
Sodium periodate	VWR International
Standard astaxanthin	Dr.Ehrcnstonfar Gmblt
Sulfuric acid	Ajax Finechem Pty Ltd

3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

อุปกรณ์และเครื่องมือ	**บริษัท**
เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Mettler-Todedo, Thailand
หม้อนึ่งอัดความดัน	Tomy-Seiko ES-315
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply
เครื่องเขย่าผสม	Scientific industries,Inc.
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Unitron
เครื่องหมุนเหวี่ยง	Falcon Sunyo U.S.A.
ตู้อบลมร้อน	Sheldon Manufacturing,Inc.
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง	United Instrument
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Shimadzu
เครื่องแก้ว	Pyrex
ชุดกรองระบบสุญญากาศ	Whatman
เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ	Heidolph Germany
เตาเผาอุณหภูมิสูง	Carbolite Furnaces England
ถ้วยกระเบื้อง (crucible)	HCT
กรวยแยก	Witeg W-Germany Preciso
ขวดวัดปริมาตร	Witeg Germany Diffico
Hot plate	E.G.O Germany
HPLC	Shimadzu,Japan,LC-20AD
คอลัมน์ HPLC	GL Science Inc,Japan

3.6 วิธีดำเนินการทดลอง

3.6.1 การเตรียมกลีเซอรอลดิบเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน

3.6.1.1 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ ในกลีเซอรอลดิบ

1 การวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลดิบ

ชั่งกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลประมาณ 0.50 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร และหยดโบรโมไทมอลบลู 5-7 หยด จากนั้นทำให้เป็นกรดโดยการเติมสารละลายกรดซัดฟุริกความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร จนสารละลายเป็นสีเหลือง ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 3.0 แล้วปรับสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมเปอร์ไอโอเดตปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วปิดด้วยกระจกนาฬิกาตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และเติมสารละลายอีเทนไดออล 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.125 โมลต่อลิตร โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าเมื่อถึงจุดยุติ ส่วนแบลงก์ใช้น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรแทนตัวอย่าง แล้วบันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ จากนั้นคำนวณหาปริมาณร้อยละกลีเซอรอล

2 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าตามมาตรฐาน ISO 2098-1972

นำถ้วยกระเบื้อง (crucible) ที่ใช้ในการวิเคราะห์มาเผาในเตาเผา (Muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 750 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปิดสวิตซ์เตาเผา รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 120-100 องศาเซลเซียส จึงนำถ้วยกระเบื้องออกมาใส่ในโถดูดความชื้น รอจนเย็นแล้วชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งกลีเซอรอลดิบประมาณ 10 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้อง แล้วนำไปเผาในเตาให้ความร้อนจนไม่มีควันโดยทำในตู้ดูดควัน จากนั้นนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 750 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว จากนั้นปิดสวิทซ์เตาเผา รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 120-100 องศาเซลเซียส จึงนำถ้วยกระเบื้องออกมาใส่ในโถดูดความชื้น รอจนเย็นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนและคำนวณหาปริมาณร้อยละของเถ้าทั้งหมด

3 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าซัลเฟตตามมาตรฐาน ISO 1616-1976

เผาถ้วยกระเบื้องด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิ 850 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปิดสวิทซ์เตาเผา รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 120-100 องศาเซลเซียส นำออกจากเตาเผาแล้วทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้นและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นชั่งกลีเซอรอลดิบ 10 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องแล้วนำไปเผาไล่ควันด้วยเตาให้ความร้อนจนกระทั่งไม่มีควัน ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 หยดและเผาไล่ควันต่อจนไม่มีควัน แล้ว

นำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 850 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิดสวิทซ์เตาเผา รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 120-100 องศาเซลเซียส นำออกจากเตาเผาทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนและคำนวณหาร้อยละปริมาณเถ้าซัลเฟต

3.6.1.2 การทำกลีเซอรอลบริสุทธิ์

นำกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 3 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 5 จนสารละลายแยกเป็น 3 ชั้น จากนั้นเทใส่กรวยแยก จะได้ชั้นบนสุดเป็นส่วนของไขมัน ชั้นกลางเป็นตะกอนสบู่และสารอื่น ๆ ส่วนชั้นล่างสุดเป็นส่วนของกลีเซอรอล จากนั้นนำส่วนของกลีเซอรอลที่แยกได้มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 จากนั้นนำไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เกลือเกิดการตกตะกอน หลังจากนั้นแยกเกลือออกด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วนำไปสกัดด้วยเฮกเซนและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการตกตะกอนเกลืออีกเป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองตะกอนเกลือออกด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำไประเหยเฮกเซนออกจนได้กลีเซอรอลที่มีลักษณะใส มีสีเหลือง แล้วนำไปฟอกสีกลีเซอรอลที่ได้ด้วยผงถ่านกัมมันต์ในอัตราส่วนผงถ่านต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 1 : 10 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วกรองผงถ่านกัมมันต์ออกด้วยการกรอง จะได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ใส ไม่มีสี และนำไปหาปริมาณกลีเซอรอล และสามารถนำกลีเซอรอลที่ได้ไปเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการการเจริญของเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* เพื่อผลิตแอสตาแซนทินต่อไป

3.6.2 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM

3.6.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ *X. dendrorhous*

1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหัวเชื้อ

เตรียมอาหารสำหรับหัวเชื้อ YM (Yeast extract - Malt extract medium) โดยมีส่วนประกอบของอาหาร (ต่อลิตร) กลูโคส 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 3 กรัม สารสกัดมอลต์ 3 กรัม และเปปโตน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร โดยการตวงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่ใน ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับหัวเชื้อต่อไป

2 การเตรียมหัวเชื้อ (preculture)

เขี่ยเชื้อ *X. dendrorhous* ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียงลงในขวดรูปชมพู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ 1 ลูปเต็ม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเขย่าโดยใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่ได้ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้จำนวนเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้

3.6.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินในอาหาร YM

1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหาร YM โดยมีส่วนประกอบของอาหาร (ต่อลิตร)กลูโคส 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 3 กรัม สารสกัดมอลต์ 3 กรัม และเปปโตน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นตวงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็นเพื่อนำไปใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตแอสตาแซนทินต่อไป

2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตแอสตาแซนทินในอาหาร YM

ปิเปตหัวเชื้อ (preculture) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างมาทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง

3.6.2.3 การหาปริมาณเซลล์ยีสต์แห้ง (cell dry weight)

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ใส่ถ้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ที่ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนและคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.6.2.4 การหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จาก *X. dendrorhous* โดยใช้วิธีสกัดด้วย DMSO (Dimethylsulfoxide extraction)

ปิเปตน้ำหมักปริมาตร 40 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง นำตัวเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่านาน 10 นาที แล้วเทใส่กรวยแยก จากนั้นเติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) 30 มิลลิลิตร และอะซิโตน (acetone) 20 มิลลิลิตร เขย่านาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น จากนั้นแยกชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์และอะซิโตนที่มี

แอสตาแซนทินออกมาสกัดซ้ำ 2 ครั้งหรือจนกระทั่งตะกอนเซลล์ไม่มีสีและสารสกัดที่ได้ไม่มีสี แล้วนำสารสกัดแอสตาแซนทินที่ได้มารวมกัน และทำให้เข้มข้นโยการระเหยตัวทำละลายออกด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ระเหยจนเหลือปริมาณของสารสหักแอสตาแซนทินเท่ากับ 3 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (HPLC) ต่อไปและคำนวณหาปริมาณสารแอสตาแซนทินในหน่ายไมโครกรัมต่อลิตร และไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

3.6.3 การประยุกต์ใช้กลีเซอรอลสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous*

3.6.3.1 การศึกษาการใช้กลีเซอรอลเพื่อทดแทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM

เตรียมอาหารที่ทดแทนกลูโคสด้วยกลีเซอรอล โดยมีส่วนประกอบของอาหาร (ต่อลิตร) กลีเซอรอลที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 3 กรัม สารสกัดมอลต์ 3 กรัม และเปปโตน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นตวงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นปิเปตหัวเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตรลงไป และบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทุกๆ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทินต่อไป

3.6.3.2 การศึกษาการใช้กลีเซอรอลเพื่อส่งเสริมการผลิตสารแอสตาซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM โดยมีส่วนประกอบของอาหาร (ต่อลิตร)กลูโคส 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 3 กรัม สารสกัดมอลต์ 3 กรัม และเปปโตน 5 กรัม กลีเซอรอลที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว 10 กรัมละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นตวงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นปิเปตหัวเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตรลงไป และบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทุกๆ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทินต่อไป

3.6.3.3 การศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารแอสตา-แซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous*

กลีเซอรอลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 20 และเปปโตน ร้อยละ 5 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตหัวเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทุก ๆ 12 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทินต่อไป

3.6.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous*

3.6.4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินด้วยการหาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสง (Absorption spectra)

นำสารละลายแอสตาแซนทินมาตรฐาน สารสกัดแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM และอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน มาทำการสแกนเพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นในช่วง 350 – 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ Shimadzu UV-1601 จะได้สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของแอสตาแซนทิน

3.6.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินและหาปริมาณสารแอสตาแซนทินด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

นำสารมาตรฐานแอสตาแซนทิน 0.25 กรัม ที่มีความบริสุทธิ์ 95.8% มาละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเตรียมในขวดวัดปริมาตรสีชาขนาด 50 มิลลิลิตรความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร เพื่อเตรียมเป็นสารละลายแอสตาแซนทินมาตรฐาน จากนั้นปิเปตสารมาตรฐานแอสตาแซนทินและเตรียมให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC Agilent HP 1100 series คอลัมน์ C18 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 474 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตไนไตรล์กับเมทานอลในอัตราส่วน 90:10 และอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำสารสกัดแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM อาหารกลีเซอรอลทดแทนกลูโคส อาหารกลีเซอรอลเสริมการผลิตแอสตาแซนทินและอาหารกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน มาวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินโดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารแอสตาแซนทิน

3.6.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

3.6.5.1 ผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อการผลิตแอสตาแซนทิน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 50 โดยมีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 5 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อภายใต้หม้อนึ่งอัดความดันเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมไว้ลงไป 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทุก ๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทินต่อไป

3.6.5.2 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตแอสตาแซนทิน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยมีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 5 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อภายใต้หม้อนึ่งอัดความดันเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมไว้ลงไป 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทุก ๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทินต่อไป

3.6.5.3 ผลของเวลาในการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งไนโตรเจน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยมีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 5 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เตรียมได้ให้มีค่าที่เหมาะสม นำไปฆ่าเชื้อภายใต้หม้อนึ่งอัดความดันเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมไว้ลงไป 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทุก ๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งและสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทินต่อไป

3.6.6 การปรับปรุงคุณภาพของอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous*

การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยได้เลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ ไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอินทรีย์ คือ สารสกัดยีสต์ สารสกัดมอลล์ เปปโตน และยูเรีย ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride) และแอมโมเนียมไนเตรต (ammonium nitrate) โดยใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสม และปริมาณของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้สัดส่วนปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 85 ซึ่งเป็นสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทิน

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาองค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบและการทำบริสุทธิ์บางส่วนของกลีเซอรอล

จากกลีเซอรอลดิบเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มีลักษณะข้นหนืด มีสีน้ำตาลเข้ม โดยกลีเซอดิบเป็นส่วนที่เหลือจากการแยกเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลออกแล้ว ดังนั้นจึงมีส่วนผสมอื่นที่นอกเหนือจากกลีเซอรอลปนอยู่ด้วย ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ก่อน ทั้งนี้เพื่อสามารถทราบปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบและปริมาณของกลีเซอรอล ซึ่งส่งผลถึงขั้นตอนและวิธีการในการทำบริสุทธิ์กลีเซอรอลเพื่อสามารถนำกลีเซอรอลที่ได้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของเชื้อและเพื่อใช้ในการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrrhous* ต่อไป

4.1.1 องค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบ

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ ในกลีเซอรอลดิบ ซึ่งได้วิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ คือ ปริมาณกลีเซอรอล เถ้า เถ้าซัลเฟต น้ำและสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ โดยหาปริมาณของกลีเซอรอลในกลีเซอรอลดิบด้วยการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมเปอร์ไอโอเดตตามมาตรฐาน BS 5711 : Part 3 พบว่ากลีเซอรอลดิบประกอบด้วยกลีเซอรอล คิดเป็นร้อยละ 40.37 จากนั้นได้วิเคราะห์หาปริมาณเถ้าและเถ้าซัลเฟต ตามมาตรฐาน ISO 2098-1972 และ ISO 1616-1976 ตามลำดับ โดยพบว่ามีปริมาณเถ้าร้อยละ 6.25 และเถ้าซัลเฟตร้อยละ 4.45 เป็นองค์ประกอบนอกจากนี้ในกลีเซอรอลดิบยังประกอบไปด้วยน้ำ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลคิดเป็นร้อยละ 53.98 และเมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของกลีเซอรอลดิบพบว่ามีค่าเท่ากับ 9.0 ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบ

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)
กลีเซอรอล	42.35 $\pm$0.20
เถ้า	6.25 $\pm$ 0.12
เถ้าซัลเฟต	4.45 $\pm$ 0.10
น้ำและสารอินทรีย์อื่น ๆ	46.95$\pm$0.34
ค่าความเป็นกรดด่าง	9.0

เนื่องจากลักษณะของกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นของเหลวหนืด ข้น สีน้ำตาลเข้มดำ และไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้เพราะว่ามีส่วนผสมของไบโอดีเซล กรดไขมันอิสระ กลีเซอไรด์ เศษตะกอน และสบู่ปนรวมมาด้วย จึงทำให้ปริมาณของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในส่วนผสมนี้มีปริมาณน้อย โดยมีค่าคิดเป็นร้อยละ 42.35 เท่านั้น ซึ่งยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ยกเว้นเพื่อเป็นเชื้อเพลิงเท่านั้น และจากการวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณเถ้าและเถ้าซัลเฟต และสารอินทรีย์หลงเหลืออยู่ในปริมาณมาก อาจเนื่องมาจากในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีการใช้สารอินทรีย์และตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณมาก ทำให้บางครั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถใช้สารอินทรีย์หรือตัวทำละลายได้หมด นอกจากนี้ยังพบสารประกอบสบู่รวมทั้งกรดไขมันอิสระในปริมาณมาก และเมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของกลีเซอรอลดิบพบว่ามีค่าเท่ากับ 9.0 ซึ่งเป็นเบส ซึ่งเป็นผลมาจากยังคงมีตัวเร่งปฏิกิริยาหลงเหลืออยู่ด้วย ดังนั้นในการจะใช้ประโยชน์กลีเซอรอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อนั้น จึงต้องทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์ก่อน เพื่อส่วนผสมอื่นที่ปนมามีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ได้ ซึ่งส่งผลต่อการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อด้วย

4.1.2 การทำบริสุทธิ์กลีเซอรอลดิบ

จากการนำกลีเซอรอลดิบที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ อมร และคณะ (2550) โดยใช้กรดซัลฟิวริกในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้กลีเซอรอลเกิดการแยกชั้น โดยปรับให้ค่า pH เท่ากับ 3 เพื่อกำจัดสบู่ที่เกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมเป็นไบโอดีเซลให้อยู่ในรูปกรดไขมันและเกลือ พบว่าสารผสมจะแยกออกเป็น 3 ชั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และองค์ประกอบของสารผสมที่ได้จากการทำบริสุทธิ์กลีเซอรอล แสดงในตารางที่ 4.2

รูปที่ 4.1 แสดงการแยกชั้นขององค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์กลีเซอรอล

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบของส่วนผสมในขั้นตอนการทำกลีเซอรอลบริสุทธิ์

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)
กลีเซอรอลบริสุทธิ์	86.53±0.25
ชั้นกรดไขมันอิสระ	5.35±0.42
ชั้นตะกอนสบู่	62.98±0.20
ชั้นกลีเซอรอล	29.59±0.72

จากรูปที่ 4.1 และจากตารางที่ 4.2 จะได้ว่าชั้นล่างสุดเป็นส่วนของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่แยกได้ คิดเป็นร้อยละ 29.59±0.72 ของส่วนผสมทั้งหมด ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลว มีความหนืดเล็กน้อย สีเหลืองใส ส่วนชั้นของตะกอนสบู่จะเป็นส่วนชั้นกลางซึ่งมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ซึ่งปนอยู่กับสารเจือปนอื่นด้วย (charred substance) คิดเป็นร้อยละ 62.98±0.20 ของส่วนผสมทั้งหมดและชั้นบนสุด คือชั้นของกรดไขมันอิสระที่เหลือจากการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล คิดเป็นร้อยละ 5.35±0.42 ของส่วนผสมทั้งหมด และจากนั้นทำการแยกส่วนของกลีเซอรอลเพื่อนำไปให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วนำไปกำจัดน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นกรองเพื่อแยกกลีเซอรอลออก แล้วเติมเฮกเซนเพื่อกำจัดกรดไขมัน น้ำมัน โมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์ที่หลงเหลือให้แยกออกจากชั้นของกลีเซอรอล เพื่อให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จากนั้นกำจัดสีของกลีเซอรอลด้วยผงถ่านกัมมันต์พบว่ากลีเซอรอลที่ได้เป็นของเหลวใส และเมื่อผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แล้วพบว่าจะได้ปริมาณของกลีเซอรอลบริสุทธิ์คิดเป็นร้อยละ 86.53±0.25

ซึ่งความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลที่ได้พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกันกับการศึกษาของอมร และคณะ (2550) ที่ได้นำกลีเซอรอลจากกระบวนผลิตไบโอดีเซลที่เตรียมจากน้ำมันพืช โดยได้ศึกษาองค์ประกอบในกลีเซอรอลดิบพบว่า มีปริมาณกลีเซอรอล เถ้า น้ำและสารอินทรีย์อื่น ๆ เท่ากับร้อยละ 31.45 55.77 และ 12.44 ตามลำดับ และมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9.2 และจากนั้นได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิในการทำบริสุทธิ์กลีเซอรอล พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 2-4 และอุณหภูมิเท่ากับ 20 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์คิดเป็นร้อยละ 82-86 ซึ่งกลีเซอรอลที่บริสุทธิ์ที่แยกได้นี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ได้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งจากการศึกษาของปิยนาฏ (2547) ได้นำกลีเซอรอลที่ได้จากการผลิตน้ำมันดีเซลชีวภาพของน้ำมันพืชใช้แล้วมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วย 4 ขั้นตอน คือ การระเหยเมทานอล การกำจัดเบสโดยการทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกและการสกัดสิ่งเจือปนอินทรีย์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ การกลั่นสุญญากาศ และการกำจัดสีและกลิ่นด้วยผงถ่านกัมมันต์พบว่า กลีเซอรอลที่ผ่านการบำบัดทั้ง 4

ขั้นตอน จะมีความเข้มข้น ประมาณ ร้อยละ 98 โดยน้ำหนัก และมีสมบัติเป็นไปตามที่มาตรฐานอุตสาหกรรมกำหนด ต่อมาภายหลังพนิดา และคณะ (2550) ได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนทางเคมี โดยกำจัดเมทานอลด้วยการกลั่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และกำจัดสบู่ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร ทำให้กลีเซอรอลเข้มข้นจากร้อยละ 49 เป็นร้อยละ 86 นอกจากนี้ นพวรรณ และคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาในขั้นตอนการแยกองค์ประกอบของกลีเซอรอลจากเดิมแยกด้วยกรด พบว่าใช้ระยะเวลานาน จึงศึกษาการแยกด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง โดยใช้ความเร็วรอบ 720 รอบต่อนาที พบว่าสามารถลดเวลาในการแยกองค์ประกอบแต่ละชั้น นอกจากนี้ยังได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์สูงขึ้นจากร้อยละ 82 เป็นร้อยละ 92 ซึ่งการใช้เทคนิคปั่นด้วยความเร็วสูง ซึ่งทำให้ได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์มากขึ้นร้อยละ 12

4.2 การเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730

4.2.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM

จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหาร YM โดยเลี้ยงในสภาวะความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเก็บเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากนั้นหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำไปสกัดหาปริมาณแอสตาแซนทินโดยทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และสกัดด้วยตัวทำละลายผสมปิโตรเลียมอีเทอร์และอะซิโตนอัตราส่วน 3 ต่อ 2 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ด้วยวิธี HPLC และคำนวณหาปริมาณสารแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้ โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2

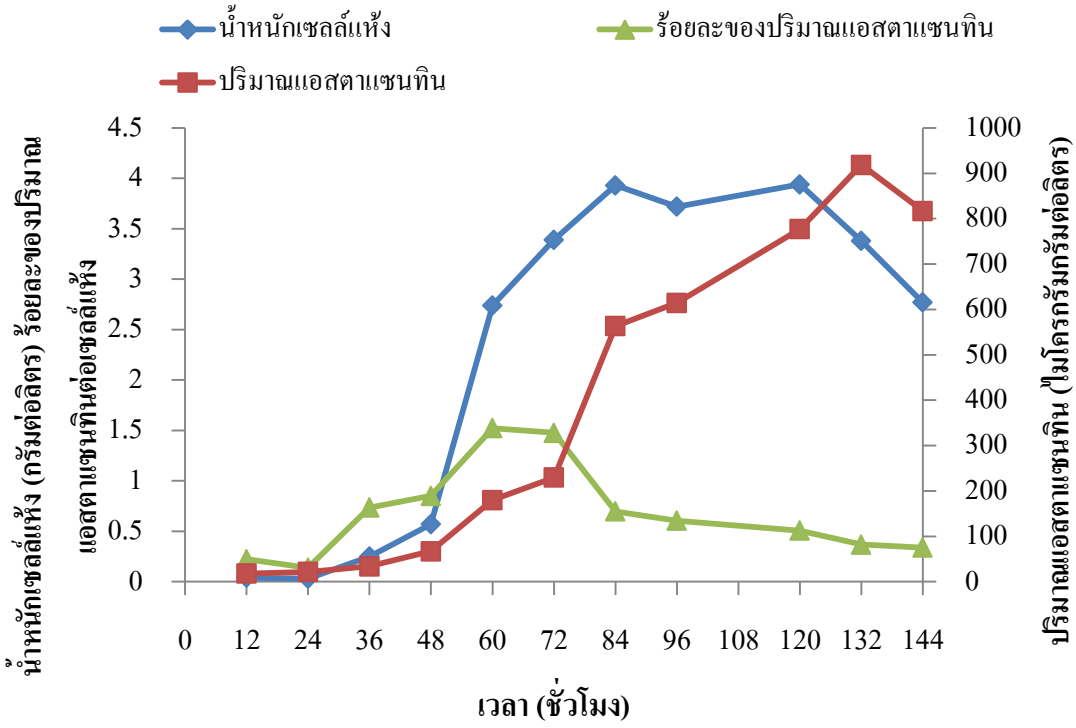
การเจริญของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 พบว่าในช่วงแรกของการเจริญที่ชั่วโมงเริ่มต้นถึงชั่วโมงที่ 36 เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 0.04 - 0.25 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเชื้อยังอยู่ในสภาวะของการปรับตัวหรือการเตรียมการ (lag phase) เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์และปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและอาหาร ส่งผลให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งค่อนข้างต่ำ คือ มีค่าประมาณ 0.04 - 0.25 กรัมต่อลิตร และหลังจากชั่วโมงที่ 36 เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว เพราะเริ่มที่จะเข้าสู่ระยะที่สองของการเจริญเป็นระยะของการเพิ่มจำนวน เซลล์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ (log phase) จนถึงการเจริญชั่วโมงที่ 84 น้ำหนักของเซลล์แห้งเท่ากับ 3.93 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อจะเข้าสู่ระยะของการเจริญคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 84-120 เมื่อนำข้อมูลของน้ำหนักเซลล์แห้งมาวิเคราะห์ผลทางสถิติแล้ว จึงกล่าวได้ว่าเชื้อมีการ

ตารางที่ 4.3 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous*

ชั่วโมง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	แอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อลิตร)
12	0.04^{h}	18.00^{k}
24	0.03^{i}	21.64^{j}
36	0.25^{g}	33.97^{i}
48	0.57^{f}	66.94^{h}
60	2.74^{d}	180.03^{g}
72	3.39^{c}	229.52^{f}
84	3.93^{a}	563.47^{d}
96	3.72^{b}	614.58^{c}
120	3.94^{a}	777.07^{b}
132	3.38^{c}	918.72^{a}
144	0.77^{e}	817.14^{e}

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2. ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

การเจริญเติบโตสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 84 เนื่องจากชั่วโมงที่ 84 และ ชั่วโมงที่ 120 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ชั่วโมงที่ 132 น้ำหนักของเซลล์แห้งจะลดลงเหลือ 3.38 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเจริญ (death phase) อัตราการตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทั้งอาจเนื่องมาจากการสารอาหารถูกใช้จนหมด และเห็นได้ชัดเจนมากขึ้นเมื่อเชื้อเจริญถึงชั่วโมงที่ 144 ซึ่งจะพบว่า มีน้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลงเหลือเพียง 0.77 กรัมต่อลิตร

สำหรับการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยในช่วงแรกของการเจริญที่ชั่วโมงเริ่มต้นถึงชั่วโมงที่ 12 เชื้อผลิตสารแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่น้อยมาก คือสามารถผลิตได้อยู่ที่ประมาณ 18 ไมโครกรัมต่อลิตรเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากอยู่ในช่วงของการเจริญของเชื้อ และการสร้างองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ จึงทำให้สารแอสตาแซนทินถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่น้อย และเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่าเชื้อเริ่มที่จะมีการผลิตแอสตาแซนทินได้เพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 21.64 ไมโครกรัมต่อลิตร และเชื้อสามารผลิตแอสตาแซนทินได้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และเพิ่มขึ้นในอัตราที่ค่อนข้างเร็ว ในช่วงของการเจริญคงที่ จนปริมาณสารแอสตาแซนทินผลิตได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 132 โดยเชื้อสามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 918.72 ไมโครกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นพบว่าการสะสมของสารแอสตาแซนทินในเซลล์ยีสต์มีปริมาณที่ลดลง จนมีค่าเท่ากับ 317.14 ไมโครกรัมต่อลิตร เนื่องจากเชื้อเข้าสู่ระยะของการตายของเชื้อ ทำให้ปริมาณของสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีค่าลดลง

4.2.2 การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

4.2.2.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 เมื่อใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคสในอาหาร YM

จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในสูตรอาหาร YM โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคส โดยใช้ปริมาณกลีเซอรอลเทียบเท่ากับปริมาณกลูโคสในอาหาร YM คือ 10 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเก็บเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และสกัดหาปริมาณแอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อลิตร)

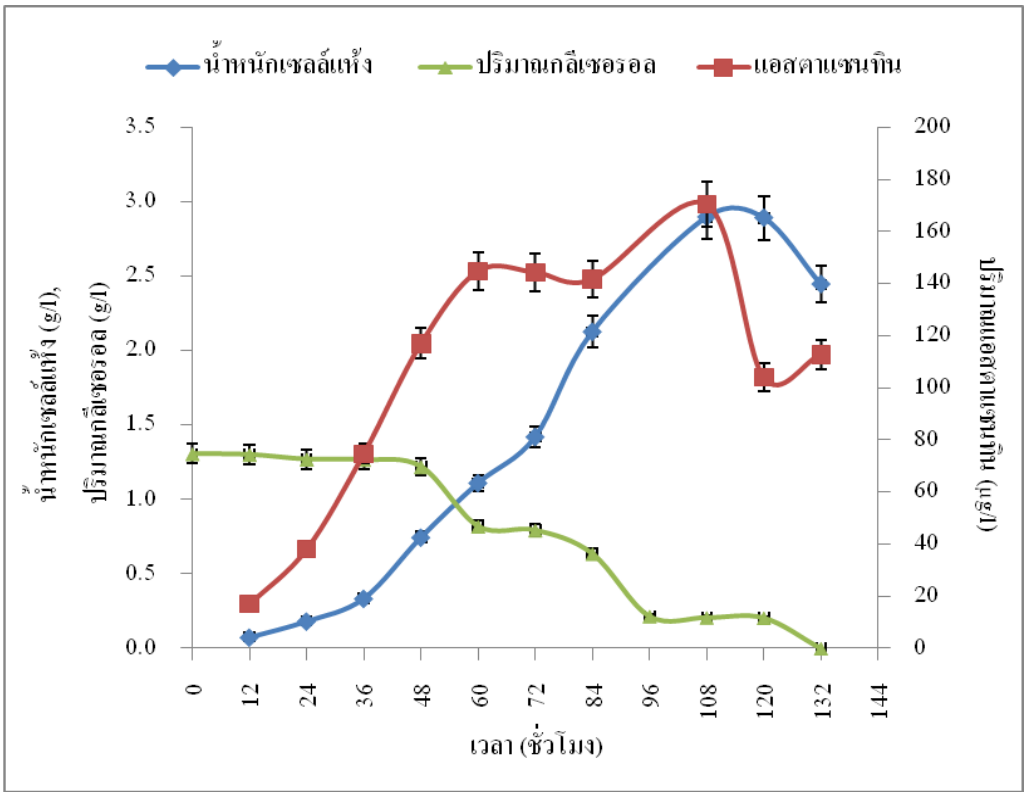
ตารางที่ 4.4 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM ที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคส

ชั่วโมง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	แอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00	0.00	1.3058
12	0.07^{i}	16.97^{i}	1.3003
24	0.18^{h}	38.07^{h}	1.2695
36	0.33^{g}	74.66^{g}	1.2663
48	0.74^{f}	116.91^{d}	1.2189
60	1.11^{e}	144.79^{b}	0.8187
72	1.42^{d}	144.34^{b}	0.7932
84	2.12^{c}	141.66^{c}	0.6356
108	2.89^{a}	170.41^{a}	0.2067
120	2.89^{a}	104.08^{f}	0.2046
132	2.44^{b}	112.82^{e}	0.0000

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2. ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การเจริญเติบโตของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคสในสูตร YM พบว่าชั่วโมงที่ 12 ของการเจริญเชื้อมีการเจริญค่อนข้างน้อยโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 0.07 กรัมต่อลิตรเท่านั้น เนื่องจากเชื้อยังไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในทันที ต้องมีการเตรียมตัวและปรับตัวให้เข้ากับอาหารใหม่และสภาพแวดล้อมใหม่ เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่าน้ำหนักของเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.18 กรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นจากชั่วโมงที่ 36 - 108 พบว่าเชื้อเข้าสู่ระยะของการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นอย่างรวดเร็ว และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่า 0.33-2.89 กรัมต่อลิตร และพบว่าที่ชั่วโมงที่ 108 เชื้อมีการเจริญสูงที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.89 กรัมต่อลิตร และพบว่าเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของชั่วโมงที่ 108 และ 120 นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญคงที่ และเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 132 พบว่า เชื้อเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเจริญแล้ว เชื้อมีการเจริญลดลง โดยพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์มีค่าลดลงเหลือ 2.44 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลทดแทนกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

การผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยเลี้ยงในอาหาร YM ที่มีกลีเซอรอลทดแทนกลูโคส โดยสารแอสตาแซนทินถูกผลิตขึ้นตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ ซึ่งพบว่าเชื้อสามารถผลิตสารได้มากขึ้นเรื่อย ๆ เป็น 2 เท่า โดยในชั่วโมงที่ 12 พบว่าเชื้อสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 16.97 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อไปในชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญที่เพิ่มขึ้นทำให้สามารถผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นเป็น 38.07 ไมโครกรัมต่อลิตร และสามารถผลิตเพิ่มขึ้นอีกเป็น 74.66 ไมโครกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 36 และหลังจากนั้นพบว่าการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ ในชั่วโมงที่ 60 – 84 พบว่าการผลิตสารแอสตาแซนทินค่อนข้างคงที่ โดยพบปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ประมาณ 144.34 -144.79 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และเมื่อเวลาผ่านไปจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 108 พบว่าเชื้อมีการผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 170.41 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าเป็นเวลาที่เชื้อมีการผลิตสารแอสตาแซน

ทินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และหลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 108 – 120 พบว่า *X. dendrorhous* ผลิตสารแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่ลดลง

ในการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลทดแทนกลูโคสในอาหาร YM พบว่าเชื้อมีการนำกลีเซอรอลไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยเชื้อมีการนำกลีเซอรอลไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ใช้ทดแทนกลูโคส มีปริมาณ 1.3058 กรัมต่อลิตร และจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *X. dendrorhous* พบว่าในระยะแรกของการเจริญ กลีเซอรอลถูกนำไปใช้ได้เพียงเล็กน้อย หลังจากชั่วโมงที่ 36 พบว่าเชื้อสามารถนำกลีเซอรอลไปใช้ได้ในปริมาณที่มากขึ้นเนื่องจากเชื้ออยู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ จึงมีการนำเอากลีเซอรอลไปใช้ในการแบ่งเซลล์และผลิตสารแอสตาแซนทิน ซึ่งพบว่าเชื้อสามารถนำกลีเซอรอลไปใช้ได้อย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 120 เหลือกลีเซอรอลอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 0.2046 กรัมต่อลิตรเท่านั้น และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไปอีกจนถึงชั่วโมงสุดท้าย คือ ชั่วโมงที่ 132 ไม่พบปริมาณกลีเซอรอลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเชื้อนำกลีเซอรอลไปใช้ได้จนหมด

4.2.2.2 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ในอาหารกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยความเข้มข้นของกลีแซอรอลบริสุทธิ์เริ่มต้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก จากนั้นเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และทำการเก็บเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 288 ชั่วโมง

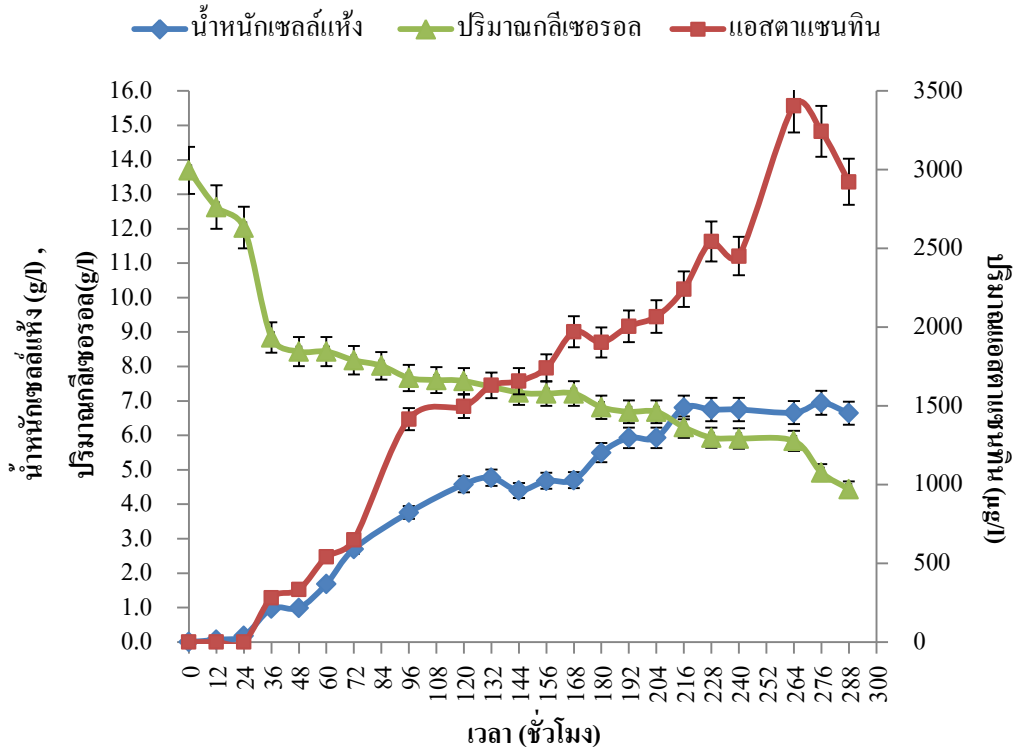
จากการทดลองได้นำกลีเซอรอลไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ร่วมกับการใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมมีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นอยู่ 13.6911 กรัมต่อลิตร ตามตารางที่ 4.5 และจากรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นถึงการนำกลีเซอรอลไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ โดยพบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* มีการนำกลีเซอรอลไปใช้เพียงเล็กน้อยอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 288 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้าย เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลยังพบว่ามีกลีเซอรอลเหลืออยู่ในอาหาร 4.4394 กรัมต่อลิตร แสดงว่าเชื้อยังไม่มีความสามารถนำกลีเซอรอลไปใช้ได้หมด

ตารางที่ 4.5 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ชั่วโมง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	แอสตาแซนทิน (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	-	-	13.6911
12	0.06^{o}	0.00^{t}	12.6268
24	0.18^{n}	0.00^{t}	12.0332
36	0.97^{m}	281.66^{s}	8.8444
48	0.99^{m}	332.94^{r}	8.4348
60	1.68^{l}	541.25^{q}	8.4348
72	2.70^{k}	649.20^{p}	8.1819
96	3.76^{j}	$1,415.77^{o}$	7.6663
120	4.58^{h}	$1,496.60^{n}$	7.6062
132	4.77^{f}	$1,630.35^{m}$	7.5764
144	4.40^{i}	$1,657.03^{l}$	7.2440
156	4.68^{g}	$1,741.09^{k}$	7.2153
168	4.70^{gf}	$1,969.88^{i}$	7.2153
180	5.50^{e}	$1,903.02^{j}$	6.8183
192	5.93^{d}	$2,005.75^{h}$	6.6851
204	5.93^{d}	$2,067.32^{g}$	6.6851
216	6.81^{b}	$2,241.30^{f}$	6.2394
228	6.75^{b}	$2,544.40^{d}$	5.9328
240	6.75^{b}	$2,451.42^{e}$	5.9092
264	6.66^{c}	$3,406.66^{a}$	5.8394
276	6.94^{a}	$3,243.33^{b}$	4.9216
288	6.64^{c}	$2,922.61^{c}$	4.4394

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2. ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

จากการทดลองได้เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณแอสตาแซนทินจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ อาหาร YM อาหารที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคส อาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 ร่วมกับการใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* สามารถเจริญเติบโตและผลิตแอสตาแซนทินได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 6.66 กรัมต่อลิตร และ 3.407 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 264 และ 276 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้มีค่าเท่ากับ 3.94 กรัมต่อลิตรและ 0.919 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 120 และ132 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณแอสตาแซนทินที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าสูงกว่าปริมาณแอสตาแซนทินที่เลี้ยงในอาหาร YM และอาหารที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคสสูงถึง 3.71 และ 19.99 เท่า ตามลำดับ การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคสพบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถเจริญและผลิตสารแอสตาแซนทินได้เพียง 2.90 กรัมต่อลิตร และ 0.170 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็น

เวลา 108 ชั่วโมง ซึ่งมีการเจริญและปริมาณแอสตาแซนทินน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ เนื่องมาจากว่าปริมาณกลีเซอรอลที่ใช้ทดแทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณที่น้อยเกินไป ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ จึงมีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้ค่อนข้างน้อย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร จะเห็นได้ว่าเชื้อมีการใช้กลีเซอรอลค่อนข้างเร็วและต่อเนื่อง จนกระทั่งใช้ได้หมดในชั่วโมงที่ 132 อย่างไรก็ตามปริมาณกลีเซอรอลที่พบในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นมีประมาณ 13.69 กรัมต่อลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 288 ชั่วโมงพบว่ามีปริมาณกลีเซอรอลเหลืออยู่ 4.44 กรัมต่อลิตร จากปริมาณกลีเซอรอลที่เหลืออยู่นี้ ทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่าในการศึกษาครั้งต่อไป ควรจะใช้ปริมาณกลีเซอรอลที่ลดลง เพื่อให้เชื้อสามารถนำกลีเซอรอลไปใช้ได้อย่างคุ้มค่าและมีประสิทธิภาพมากที่สุด

ตารางที่ 4.6 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุดที่เชื้อ *X. dendrorhous* ผลิตได้ในอาหารทั้ง 3 สูตร

ชนิดของอาหาร	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
YM	3.94[b]	0.919[b]
กลีเซอรอลทดแทนกลูโคสในอาหาร YM	2.89[c]	0.170[c]
กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน	6.66[a]	3.407[a]

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

2. ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการศึกษาของ Endang และคณะ (1998) ที่มีการนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยนำกลีเซอรอลทางการค้ามาเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับยีสต์สกัดและเปปโตน เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินโดยเชื้อ *Phaffia rhodozyma* PR 190 พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.25±0.02 ต่อชั่วโมง มีปริมาณของสารแอสตาแซนทินทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 0.76 มิลลิกรัมต่อกรัม ผลได้ของมวลชีวภาพจากกลีเซอรอลเพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 0.5±0.02 กรัมต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตสารแอสตาแซนทินจำเพาะกับอัตราการเจริญสูงสุด พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.075 ต่อชั่วโมง มีปริมาณแอสตาแซนทินมากสุดมีค่าเท่ากับ 33.7 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากกระบวนการหมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

นอกจากจะมีการนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนเพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินแล้ว ยังมีการนำกลีเซอรอลมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารอื่น อาทิเช่น การศึกษาของ Eda และคณะ (2008) ที่ศึกษาการผลิต recombinant human erythropoietin (rHuEPO) โดยนำกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อ *Pichia pastoris* โดยใช้วัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลที่แตกต่างกัน เช่น ดอกคาโนล่า (canola) ข้าวโพด ถั่วเหลือง และดอกทานตะวัน ผสมกับเมทานอลบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 หรือ 1 ต่อ 3 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 หรือ ร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการทดลองพบว่ากลีเซอรอลที่ได้จากคาโนลาเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยใช้คาโนลาต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 โมลาร์ และความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 31 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเซลล์มีค่าเท่ากับ 10.5 กรัมต่อลิตร ผลผลิตที่ได้จากสับสเตรตมีค่าเท่ากับ 1.48 มิลลิกรัมต่อกรัม ผลได้ของเซลล์ต่อสับสเตรตมีค่าเท่ากับ 0.57 มิลลิกรัมต่อกรัม และพบว่าอัตราส่วนของการใช้กลีเซอรอลดิบให้ค่าต่างๆสูงกว่าการใช้กลีเซอรอลบริสุทธ์ถึง 4 เท่า นอกจากนี้กมลดารา (2552) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Pichia pastoris* GS115 เพื่อการผลิตมวลเซลล์และสารเมทาบอไลซ์ โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน พบว่าเชื้อมารถผลิตกรดอะซิติก เอทานอลและ กรดซิตริกได้ โดยชนิดและปริมาณของสารเมทาบอไลท์ที่ผลิตได้ ขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจนและเกลือที่เติมลงไป เมื่อศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลเซลล์โดยใช้วิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตมวลเซลล์ประกอบด้วยกลีเซอรอลมีค่าเท่ากับ 28.33 กรัมต่อลิตร เปปโตนมีค่าเท่ากับ 8.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีค่าเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ทำให้สามารถผลิตมวลเซลล์ได้มีค่าเท่ากับ 8.66 กรัมต่อลิตร และเมื่อศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ต่อการผลิตมวลเซลล์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที หลังจากการศึกษาส่วนประกอบของอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยง พบว่ามวลเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ โดยได้มวลเซลล์สูงสุด 18.93 กรัมต่อลิตร และประสิทธิภาพในการผลิตเท่ากับ 0.67 กรัมของมวลเซลล์ต่อกรัมของกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

ในปัจจุบันพบว่าได้มีการนำของเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากกระบวนการต่างๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทิน จากการศึกษาของ Ramirez และคณะ (2006) ที่มีการนำสายพันธุ์กลายของเชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ที่เจริญเติบโตในอาหาร Yucca ที่มีการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ โดยมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชพบว่าการเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดและออกซิเจนมีผลทำให้การผลิตแอสตาแซนทินและมวลชีวภาพเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ มีการผลิตแอสตาแซนทินสูงสุดเป็น 23.810 มิลลิกรัมกรัมต่อลิตร และมีมวล

ชีวภาพเป็น 39 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาของ Tinoi และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตสารแอสตาแซนทินโดยเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 ที่นำของเหลือทิ้งจากการผลิตมัสตาร์ดที่แตกต่างกันมาทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินได้ดีที่สุดในอาหาร MPH (mustard waste precipitated hydrolysate) ซึ่งพบว่าผลได้ของมวลชีวภาพมีค่าเท่ากับ 19.6 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 25.8 กรัมต่อลิตร การใช้อาหาร MPH จะทำให้ได้ผลผลิตสารแอสตาแซนทินที่สูงกว่าอาหาร YM ธรรมดา และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มาจากของเหลือทิ้งจากการผลิตมัสตาร์ดชนิดอื่นๆ พบว่ามีค่ามากกว่าเป็น 1.3-2.1 เท่า ต่อมา Jirasripongpun (2007) ได้ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์โดยเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* ที่กลายพันธุ์โดยรังสีแกมม่า (GM807) หรือรังสีนิวตรอน (n485) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในกากน้ำตาล พบว่าผลิตแคโรทีนอยด์ได้ร้อยละ 5 ปริมาตรต่อปริมาตรของกากน้ำตาล โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4 พบว่าสายพันธุ์ GM807 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากกว่าสายพันธุ์ N485 ถึง 1.5 เท่า และยังพบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์แต่มีผลต่อการสร้างแคโรทีนอยด์ซึ่งสามารถผลิตได้มีค่าเท่ากับ 450 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ จากการศึกษาข้างต้น พบว่ามีการนำของเหลือทิ้งมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นสับสเตรตในการผลิตสารแอสตาแซนทิน ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ได้มีการนำกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาเป็นสับสเตรตเพื่อผลิตแอสตา-แซนทินโดยเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 เช่นเดียวกัน

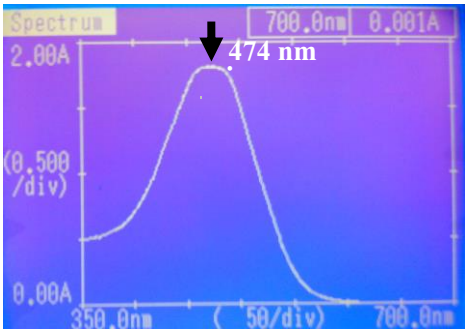
อย่างไรก็ตามกลีเซอรอลดิบที่เป็นผลพลอยได้นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์เนื่องจากมีเมทานอลหรือเอทานอลหลงเหลืออยู่ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถจะเจริญได้ต้องทนต่อแอลกอฮอล์ได้ ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องนำกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้มาผ่านกระบวนการแยกกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆได้มากกว่ากลีเซอรอลดิบ ซึ่งจากผลการทดลองในการใช้กลีเซอรอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* ต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้สูงสุดที่ยาวนานกว่าสูตรอาหาร YM และอาหารที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคส ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาในเรื่องของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อาทิ เช่น ความเร็วรอบ อุณหภูมิ ระยะเวลา ความเป็นกรดด่าง ปริมาณกลีเซอรอล เป็นต้น เพื่อให้เชื้อ *X. dendrorhous* สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้สูงสุดในระยะเวลาที่สั้นลง ซึ่งต้องทำการศึกษากันต่อไปในอนาคต

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730

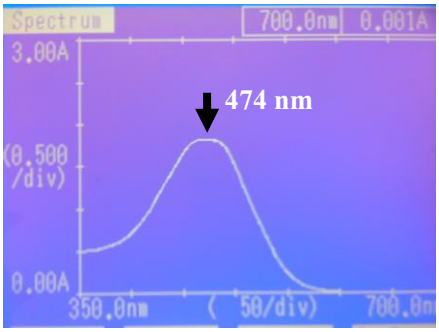
4.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินด้วยการหาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสง (Absorbtion spectra)

การวิเคราะห์หาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารแอสตาแซนทินด้วยเครื่องสเปกโตโฟโทมิเตอร์ Shimadzu UV-1601 โดยนำสารละลายแอสตาแซนทินที่เชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM และในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน มาวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 300-700 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานแอสตาแซนทิน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าสเปกตรัมค่าการดูดกลืนของสารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้มีลักษณะเหมือนกับสารมาตรฐานแอสตาแซนทิน โดยพบว่าค่าความยาวคลื่นที่สารแอสตาแซนทินดูดกลืนแสงมากที่สุดคือ 474 นาโนเมตร

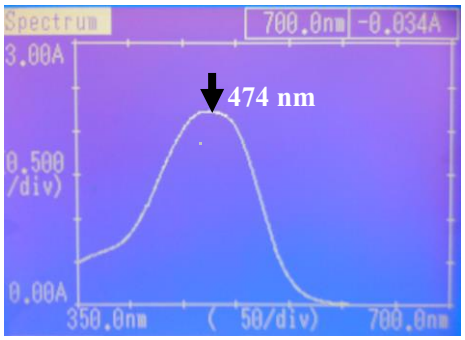
ก.)



ข.)



ค.)

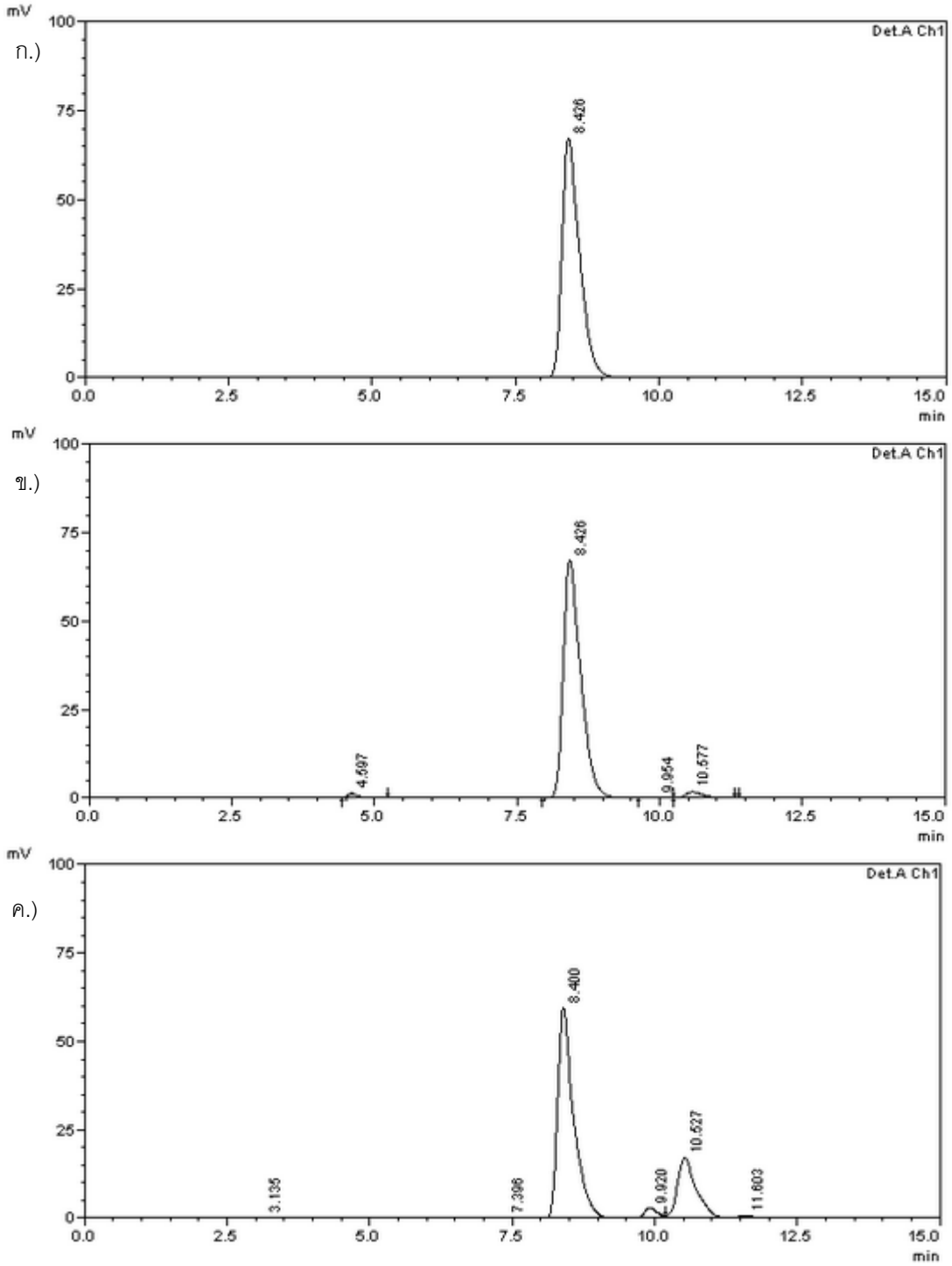


รูปที่ 4.5 แสดงสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารแอสตาแซนทินที่เชื้อ *X. dendrorhous* ผลิตได้ที่ความยาวคลื่น 300-700 นาโนเมตร ก.) สารมาตรฐานแอสตาแซนทิน ข.) สารแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ค.) สารแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

4.3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

นำสารมาตรฐานแอสตาแซนทิน สารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากเชื้อที่ผลิตขึ้นในอาหาร YM และอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC Shimadzu, Japan, LC-20AD โดยใช้คอลัมน์ GL Science Inc., Japan C18 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 474 นาโนเมตร โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายผสมอะซิโตไนไตรล์กับเมทานอลอัตราส่วน 9 ต่อ 1 อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.4 จากโครมาโทแกรมที่ได้พบว่าสารมาตรฐานแอสตาแซนทินใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์นับจากเวลาเริ่มต้นของการวิเคราะห์ถึงตำแหน่งเวลาที่ดีเทคเตอร์อ่านสัญญาณสูงสุด หรือค่าเวลารีเทนชัน (retention time, R_t) มีค่าเท่ากับ 8.42 นาที และเมื่อวิเคราะห์สารแอสตาแซนทินที่เชื้อ *X. dendrorhous* ผลิตได้ในอาหาร YM และในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีค่าเวลารีเทนชันเท่ากับ 8.42 และ 8.40 นาที ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเวลารีเทนชันที่ได้จากสารแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้กับสารมาตรฐานแอสตาแซนทินพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

ในการศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคการหาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสง (Absorption spectra) ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโทมิเตอร์ เพื่อหาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของสารแอสตาแซนทิน พบว่าสารแอสตาแซนทินมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 474 นาโนเมตร จากนั้นได้พิสูจน์เอกลักษณ์สารแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตขึ้นอีกครั้งด้วยเทคนิค HPLC จากโครมาโทแกรมแสดงให้เห็นว่าพีคหลักที่พบคือสารแอสตาแซนทินมีค่าเวลารีเทนชันประมาณ 8.4 นาที ซึ่งพีคอื่นที่พบอาจเป็นสารแคโรทินอยด์ชนิดอื่น คาดว่าอาจเป็น เบตา-แคโรทีน เนื่องจากแบตา-แคโรทีนเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนเป็นแอสตาแซนทินในวิถีของเชื้อ *X. dendrorhous* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Parajo และคณะ (1997) พบว่าการผลิตแคโรทินอยด์โดยเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* การเจริญขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแคโรทีนอยด์ที่ *X. dendrorhous* สร้างขึ้นส่วนใหญ่คือแอสตาแซนทิน นอกจากนี้ยังพบเอคไคนีโนน 3-ไฮดรอกซีเอคไคนีโนนและแคน-ตาแซนทินอีกด้วย ต่อมา Vazquez (2001) ได้ศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ใน 6 สายพันธุ์ (ATCC 24202, ATCC24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24261 และ NRRL Y-10921) ที่เจริญในอาหารที่มีไซโลส แคโรทีนอยด์ถูกผลิตขึ้นจากในสภาวะที่มีแสงหรือไม่มีแสง จากนั้นจะถูกสกัดออกจากมวลชีวภาพ และพิสูจน์เอกเอกลักษณ์และปริมาณด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งสายพันธุ์ทั้งหมดสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีในสภาวะที่มีแสงสว่าง พบว่าสายพันธุ์ ATCC 24202 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์หลักคือแอสตาแซนทิน โดยความเข้มข้นแอสตาแซนทินที่ผลิตในสภาวะที่มีแสงพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 65 เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญในสภาวะไม่มีแสง นอกจากนี้ยังมีการผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นอีก อาทิ



รูปที่ 4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารแอสตาแซนทิน ก) สารมาตรฐานแอสตาแซนทิน ข) สารสกัดแอสตาแซนทินจากอาหาร YM ค) สารสกัดแอสตาแซนทินจากอาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เช่น แคนตาแซนทิน (canthaxanthin) 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เอคไคนีโนน 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีความเข้มข้นน้อยมากเมื่ออยู่ในสภาวะไม่มีแสง โดยเฉพาะเอคไคนีโนนไม่สามารถตรวจพบได้ในสภาวะที่มีแสง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Ukibe และคณะ (2008) โดยใช้เทคนิคโฟรไซโตเมททรี (flow cytometry, FCM) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *X. dendrorhous* สายพันธุ์กลาย ซึ่งผลิตแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่มากขึ้น โดยทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอสตาแซนทินภายในเซลล์กับความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ที่เปล่งออกมาจากเซลล์ พบว่าความยาวคลื่นสูงสุดของแอสตาแซนทินที่ละลายในอะซิโตนจะมีค่าเท่ากับ 570 นาโนเมตร แต่ปริมาณแอสตาแซนทินภายในเซลล์มีการเปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 675 นาโนเมตร ซึ่งแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของ *X. dendrorhous* จึงใช้การเปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 675 นาโนเมตร ในการทดสอบ แล้วตรวจหาเซลล์ที่ทำให้กลายพันธุ์ด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต พบว่าประสบความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้สูงถึง 1.5-3.8 เท่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น พบว่า เชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* สามารถผลิตแคโรทีนอยด์หลักคือแอสตาแซนทิน

4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลตาแซนทินเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

4.4.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของกลีเซอรอลในการผลิตแอสตาแซนทิน

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ X. dendrorhous ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นต่างกัน โดยแปรผันปริมาณกลีเซอรอลในช่วง 5 – 50 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยจะพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นให้มากขึ้น เชื้อสามารถเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้มากขึ้น และแต่ละความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลพบว่าความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทินจะแตกต่างกัน และ โดยปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นที่พบว่าเชื้อมีการเจริญและสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้มากที่สุดคือ 50 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 13.3 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอสตาแซนทินเท่ากับ 19.2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นผลผลิตเทียบกับปริมาณกลีเซอรอลเท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อกรัมกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไป โดยมีอัตราในการผลิตแอสตาแซนทินเท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่ร้อยละของกลีเซอรอลถูกใช้ไปเท่ากับร้อยละ 64 เท่านั้นทำให้เหลือกลีเซอรอลปริมาณร้อยละ 36 ดังนั้นในการผลิตแอสตาแซนทินเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด พบว่าปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้มีประสิทธิภาพสูงสุดเทียบเท่ากับการใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรโดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าความสามารถในการใช้กลีเซอรอลในอาหารได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดจะใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.7 แสดงผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในกระบวนการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous*

ตัวแปร (Parameters)	ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)				
	5	10	20	30	50
Cultivation time (h)	96	108	120	120	120
Glycerol consumption (g/L)	5	10	20	30	32
Glycerol consumption (%)	100	100	100	100	64
Astaxanthin content (mg/L)	2.25	6.54	12.15	18.6	19.2
Astaxanthin yield coefficient (mg/g glycerol consumed)	0.45	0.62	0.61	0.62	0.60
Astaxanthin production rate (mg/L.h)	0.02	0.06	0.10	0.16	0.16
Cell dry weight (g/L)	2.10	4.15	8.45	12.7	13.3
Cell yield coefficient (g /g glycerol consumed)	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
Cell production rate (g/L.h)	0.02	0.04	0.07	0.11	0.11

4.4.2 ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแอสตาแซนทิน

ในการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่มีกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* โดยได้ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเซียส จากนั้นวัดการเจริญและปริมาณแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8 จากการผลการทดลองพบว่าในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 – 7.0 พบเชื้อ *X. dendrorhous* มีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6.0 เชื้อมีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้มากที่สุด โดยในการเจริญของเชื้อ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 พบมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 13.4 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตเซลลล์ที่ได้เทียบกับปริมาณกลีเซอรอลที่ใช้เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล ส่วนการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* พบว่าเชื้อสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้มากที่สุดเท่ากับ 19.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลผลิตแอสตาแซนทินที่ได้เมื่อเทียบกับปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไปมีค่าเท่ากับ 0.65 มิลลิกรัมต่อกรัมกลีเซอรอล โดยมีอัตราในการผลิตแอสตาแซนทินเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อ

ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าเมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างให้น้อยกว่าหรือมากกว่า 6.0 พบว่าเชื้อจะมีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้น้อยลง

ตารางที่ 4.8 ผลของค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous*

ตัวแปร (Parameters)	**ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น**			
	4.0	5.0	6.0	7.0
Glycerol consumption (g/L)	27.2	28.5	30	28.4
Glycerol consumption (%)	86	92.5	100	90
Astaxanthin content (mg/L)	15.2	17.2	19.5	16.4
Astaxanthin yield coefficient (mg/g glycerol consumed)	0.56	0.61	0.65	0.58
Astaxanthin production rate (mg/L.h)	0.13	0.14	0.16	0.14
Cell dry weight (g/L)	10.8	11.6	13.4	11.2
Cell yield coefficient (g /g glycerol consumed)	0.40	0.41	0.45	0.39
Cell production rate (g/L.h)	0.09	0.10	0.11	0.09

4.4.3 การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เมื่อเพาะเลี้ยง *X. dendrorhous* เพื่อศึกษาการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าเมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อโดยติดตามน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 14.7 กรัมต่อลิตร และเทียบค่าประสิทธิภาพของผลผลิตเซลล์ที่ได้เทียบกับกลีเซอรอลที่ใช้ไปมีค่าเท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล โดยพบว่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น โดยมีช่วงของการเจริญดีที่สุดที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 72 – 120 ชั่วโมงโดยมีค่าอัตราในการเจริญสูงที่สุดเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับการผลิตแอสตาแซนทินพบว่าเชื้อสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้มากที่สุดเท่ากับ 19.8 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง โดยคิดเทียบต่อปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 0.66 มิลลิกรัมต่อกรัมกลีเซอรอล

ตารางที่ 4.9 การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

ตัวแปร (Parameters)	เวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
Glycerol consumption (g/L)	4.2	11.8	20.3	27.5	30	30	30	30
Glycerol consumption (%)	14.0	39.0	81.0	91.7	94.6	100	100	100
Astaxanthin content (mg/L)	1.80	6.40	11.2	15.4	19.5	19.8	19.5	18.9
Astaxanthin yield coefficient (mg/g glycerol consumed)	0.43	0.54	0.55	0.56	0.65	0.66	0.65	0.63
Astaxanthin production rate (mg/L.h)	0.07	0.13	0.16	0.16	0.16	0.14	0.12	0.09
Cell dry weight (g/L)	1.40	4.60	8.40	11.3	13.7	14.7	14.0	13.8
Cell yield coefficient (g /g glycerol consumed)	0.33	0.39	0.41	0.41	0.46	0.49	0.47	0.46
Cell production rate (g/L.h)	0.06	0.09	0.12	0.12	0.11	0.10	0.08	0.07

4.5 การปรับปรุงคุณภาพของอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous*

ในการเพิ่มปริมาณการผลิตแอสตาแซนทินโดยการปรับปรุงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งส่งผลต่อการผลิตแอสตาแซนทินด้วย โดยได้เลือกแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ สารสกัดมอลล์ เปปโตนและยูเรีย ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ โดยปริมาณที่เติมจะใช้ค่าสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N) ที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* เท่ากับ 85 ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.10

จากการศึกษาการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณการเจริญและการผลิตแอสตาทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ โดยสารสกัดยีสต์และเปปโตน พบเชื้อมีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้ใกล้เคียงกันและได้ปริมาณมากที่สุด โดยมีค่าอัตราในการ

เจริญของเชื้อเท่ากับ 0.11 และเมื่อเทียบต่อปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้มีค่าเท่ากับ 0.53 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีกลีเซอรอลเพียงอย่างเดียวพบว่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.5 นอกจากนี้สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอนินทรีย์พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อได้ใกล้เคียงกับสารสกัดยีสต์และเปปโตน โดยพบเชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 15.5 กรัมต่อลิตรด้วย สำหรับการเพิ่มปริมาณการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ พบว่าสารสกัดยีสต์สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตแอสตาแซนทินได้ดีที่สุด โดยเชื้อสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 20.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.68 กรัมต่อกรัมกลีเซอรอล โดยมีอัตราการผลิตแอสตาแซนทินเท่ากับ 0.14 รองลงมาคือ เปปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟต โดยพบปริมาณแอสตาแซนทินใกล้เคียงกันและเชื้อมีอัตราในการผลิตแอสตาแซนทินได้ใกล้เคียงกันด้วย

ตารางที่ 4.10 การปรับปรุงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเพิ่มการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินด้วยแหล่งไนโตรเจน

ตัวแปร (Parameters)	**Cell dry weight**			**Astaxanthin**		
	Cell dry weight (g/L)	Cell yield coefficient (g /g glycerol)	Cell production rate g/L.h)	Astaxanthin content (mg/L)	Astaxanthin yield coefficient (mg/g glycerol)	Astaxanthin production rate (mg/L.h)
สารสกัดยีสต์	15.8	0.53	0.11	20.4	0.68	0.14
สารสกัดมอลล์	12.3	0.41	0.08	18.6	0.62	0.13
เปปโตน	15.4	0.51	0.11	19.6	0.65	0.14
ยูเรีย	11.5	0.38	0.08	14.4	0.48	0.10
$(NH_4)_2SO_4$	15.5	0.52	0.11	19.2	0.64	0.13
NH_4NO_3	12.4	0.41	0.09	15.8	0.53	0.11
NH_4Cl	10.7	0.36	0.07	12.8	0.43	0.09

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมและสามารถเพิ่มการผลิตได้เมื่อเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินได้

บทที่ 5
สรุปผลงานวิจัย

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ ในกลีเซอรอลดิบ ซึ่งได้วิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ คือ ปริมาณกลีเซอรอล เถ้า เถ้าซัลเฟต น้ำและสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ พบว่ากลีเซอรอลดิบประกอบด้วยกลีเซอรอล คิดเป็นร้อยละ 40.37 ปริมาณเถ้าและเถ้าซัลเฟต ร้อยละ 6.25 และ 4.45 ตามลำดับ นอกจากนี้ในกลีเซอรอลดิบยังประกอบไปด้วยน้ำ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลคิดเป็นร้อยละ 53.98 และเมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของกลีเซอรอลดิบพบว่ามีค่าเท่ากับ 9.0 ซึ่งปริมาณกลีเซอ รอลที่วิเคราะห์ได้นี้มีปริมาณน้อยมากสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ได้ จึงต้องทำบริสุทธิ์กลีเซอรอลด้วยการทำให้เป็นกรด พบว่าจะได้ชั้นของกลีเซอรอลที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส และมีปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์คิดเป็นร้อยละ 86.5 และส่วนที่เหลือเป็นส่วนของกรดไขมันอิสระและตะกอนสบู่ที่ปนมาด้วย

เมื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกลีเซอรอลดิบที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR5730 พบว่าจากการทดลองได้เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณแอสตาแซนทินจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ อาหาร YM อาหารที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคส และอาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 ร่วมกับการใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* สามารถเจริญเติบโตและผลิตแอสตาแซนทินได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 6.66 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 264 ชั่วโมง และ 3.407 มิลลิกรัมแอสตาแซนทินต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 276 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้มีค่าเท่ากับ 3.94 กรัมต่อลิตรและ 0.919 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 120 และ132 ชั่วโมง ตามลำดับ และการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคสพบว่าเชื้อ *X. dendrorhous* สามารถเจริญละผลิตสารแอสตาแซนทินได้เพียง 2.90 กรัมต่อลิตร และ 0.170 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 108 ชั่วโมง เท่านั้น

สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคการหาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสง (Absorption spectra) ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโทมิเตอร์ เพื่อหาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของสารแอสตาแซนทิน พบว่าสารแอสตาแซนทินมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 474 นาโนเมตร จากนั้นได้พิสูจน์เอกลักษณ์สารแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตขึ้นอีกครั้งด้วยเทคนิค HPLC

จากโครมาโทแกรมแสดงให้เห็นว่าพีคหลักที่พบคือสารแอสตาแซนทินมีค่าเวลารีเทนชันประมาณ 8.4 นาที

สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ X. dendrorhous ในอาหารที่มีกลีเซอรอลที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง และเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตแอสตาแซนทินได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มแหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตนหรือ แอมโมเนียมซัลเฟตได้

ดังนั้นจากการวิจัยนี้พบว่ากลีเซอรอลดิบที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น สามารภนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *X. dendrorhous* เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินได้ โดยกลีเซอรอลที่นำมาใช้นั้นต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ก่อนเพราะว่าส่วนผสมอื่นมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ และในการผลิตสารแอสตาแซนทอนจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น สามารถนำมาใช้ดีเมื่อเป็นส่วนส่งเสริมหรือเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมสำหรับการเจริญของเชื้อและการผลิตสารแอสตาแซนทิน ทั้งจึงเป็นการลดต้นทุนในการผลิตสารแอสตาแซนทิน เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นส่วนช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

กมลดารา เหรียญสุวรรณ, 2552, การหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการผลิตมวลเซลล์และสารเมทาบอไลท์ จากเชื้อ *Pichia pastoris* GS115 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นพวรรณ ชนัญพานิช, วัฒนา ปิ่นเสม, บุญมี บุญยะผลานันท์ และ Byun H., 2552, การทำกลีเซอรีนจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์, วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 19 ฉบับที่ 1.

บุษบา ยงสมิทธิ์, 2540, จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยนาฏ อินทนกูล, 2547, การทำกลีเซอรอลที่ได้จากการผลิตน้ำมันดีเซลชีวภาพให้บริสุทธิ์, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พนิดา สามพรานไพบูลย□ , จีราวัฒน□ โพธิ์ไพบูลย□ และชลธี มหธนานุวัติพันธ์, 2550, การเพิ่มความ เข□มข□นกลีเซอรอลจากของเหลือทิ้งในการผลิตไบโอดีเซลด□วยกระบวนการทางเคมี, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี, วิทยาลัยวิศวกรรมศาสตร, □ มหาวิทยาลัยรังสิต, การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17.

อมร อุดเสน, อมรศิริ กุมพล และอธิวัฒน์ เจริญบุตรม, 2550, การทำกลีเซอรอลจากผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Biebl, H. 2001. Fermentation of glycerol by Clostridium pasteurianum bath and continuous culture studies. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27: 18-26.

Blichmann, C.W., Serup, J. and Winther, A. 1989. Effect of single application of a moisturizer: evaporation of emulsion water, skin surface temperature , electrical conductance, electrical capacitance and skin surface (emulsion) lipids. Acta Derm. Venereol. (Stockh.) 69: 327-330.

Carey, F.A. Organic Chemistry. New York: McGraw-Hill, 2002.

Cheng, K.K., Zhang, J.A., Lin, D.H., Sun, Y., Yang, M.D. and Xu, J.M. 2006. Production of 1,3-propanediol by Klebsiella pneumonae from glycerol broth. Biotechnol. Lett. 28: 1817-1821.

Eda, C., Nalan, O., Nuray, O. and Pinar, C., 2008. Use of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol as the Carbon Source for Fermentation Process by Recombinant *Pichia pastoris*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47 : 2985-2990.

Endang, K., Philippe, G., Gerard, G. and Philippe, J.B., 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnology Letters*. 20 : 929-934.

Floréncio J.A., Soccol C.R., Furlanetto L.F., Bonfim T.M.B., Krieger N., Baron M., and Fontana J.D. 1998. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. Bioprocess Eng., 19, 161-164.

Fontana J.D., Chocial M.B., Baron M., Guimaraes M.F., Maraschin M., Ulhoa, C., Florencio J.A and Bonfim T.M.B. (1997). Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: optimization of low-cost culture media and yeast cell-wall lysis. Appl. Biochem. Biotechnol., 63/65, 305-314.

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

Gonzalez-Pajuelo, M, Andrade, J.C. and Vasconcelos, I. 2004. Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 31: 442-446.

Ito. T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T. and Nishio. N. 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol in a metabolically engineered Escherichia coli by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. Biotechnol. Prog. 18: 694-699.

Javis, G.N.,Moore, E.R.B., and Thiele, J.H. 1997. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a Klebsiella planticola strain isolated rom red deer. J. Appl. Microbiol. 83: 166-174.

Jirasripongpun K., Pewlong W.,Natsathmonthra W. and Suthiyaporn1 S., 2007. Carotenoids Production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* Mutant Grown on Molasses., *Kasetsart J.* (Nat. Sci.) 41 : 667 - 674 .

Lin, R.H., lLiu, H.J. Hao, L., Cheng, K. and Liu, D.H. 2005. Enhancement of 1,3-propanediol production by Klebsiella pneumoniae with formulate addition. Biotechnol Lett. 27: 1755-1759.

Loden, M. and Wessman, C. 2001. The influence of a cream containing 20% glycerin and its vehicle on skin barrier properties. Inter. J. Cosmetic Science. 23: 115-119.

Martin, A.M., Acheamparg, E.,Patel, T.R. 1993. Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. J. Chem. Tech. Biotechnol., 58, 223-230.

Mayer, P.S., Du Preez, J.C. and Kilian, S.G. 1993. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 514-520.

Okagbue, N.R. and Lewis, J.M. 1996. Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 33-39.

Orth, D.S. and Appa, Y. 2000. Glycerine: a natural ingredient for moisturizing skin. In: Dry skin and moisturizers: chemistry and function (M. Loden and H. I. maibach, eds.) pp213-228. CRC Press, Boca Raton.

Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabeelina* grown on high-sugar content media. Biores. Technol. 95: 287-291.

Parajo, J.C., Santos, V. and Vázquez, M., 1997. Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnol. Lett.* 19 : 139–141.

Parajó J.C., Santos V. and Vázquez M. 1998. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. Process Biochem., 33, 181-187.

Ramírez. J., Gutierrz, H. and Gschaedler, A. 2001. Optimization of astaxanthin production by *Phaffian rhodozyma* though factorial design and response surface methodology. 8: 259-268.

Ramirez J.,Obledo N., Arellano M. and Herrera E., 2006.Astaxanthin production by *Phaffia Rhodozyma* in a fed-batch culture using a low cost medium feeding.*e-Gnosis* (online) 4 : Art.5.

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.

Ukibe, K., Katsuragi, T., Tani, Y.and Takagi, H. 2008, Effcient screening forastaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiol Lett.* 286 : 241–248.

Vázquez M. 2001. Effect of the Light on Carotenoid Profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* Strains (formerly *Phaffia rhodozyma*.). *Food technol. biotechnol. 39* (2) : 123–128.

Yazdani, S.S. and Gonzalez, R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Current opinion in Biotechnol. 18: 213-219.

Yamane,Y-U., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. and Nishio, N. 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by Phaffia

rhodozyme in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4471-4478.

Zhao, Y.N., Chen, G. and Yao, S.J. 2006. Microbial production of 1,3-propanediol from encapsulated Klebsiella pneumonae. Biochem. Eng. J. 2006: 93-99.