รายงานการวิจัย

การผลิตชีวมวลและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสีแอสต้าแซนทีนของ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 โดยใช้ เครื่อง Supercritical Fluid Extraction ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีน เพื่อการประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

Biomass production and optimal conditions for extracting pigments astaxanthin of *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 by Supercritical Fluid Extraction in wastewater to produce noodles. for applications in the aquaculture food and cosmetics

ชุตินุช สุจริต Chutinut Sujarit

ไวกูณฐ์ ฤทธิรุฒม์ Waigoon Rittirut

ดวงพร อมรเลิศพิศาล Doungporn Amornlerdpison

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่ให้ทุ
สนับสนุนการทำวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2559 เพื่อทำวิจัยในครั้งนี้ งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จตาม
วัตถุประสงค์ได้ด้วยความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย และท้ายสุดขอบพระคุณคณาจารย์และนักวิชาการ
เอกอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ประมง ที่ได้ให้ข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยในครั้งนี้
ในการจัดทำรูปเล่มนี้ ทางคณะผู้วิจัยขอบพระคุณคณาจารย์ทุก ๆ ท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและผู้เขียน
ตำรา เอกสาร ทุกท่านที่ข้าพเจ้านำมาเป็นเอกสารอ้างอิงประกอบการเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์ อนึ่ง
ในการจัดทำเป็นเอกสารหากมีส่วนหนึ่งส่วนใดที่ผิดพลาดก็ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ชุตินุช สุจริต
สิงหาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่ให้ทุสนับสนุนการทำวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2559 เพื่อทำวิจัยในครั้งนี้ งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย และท้ายสุดขอบพระคุณคณาจารย์และนักวิชาการเอกอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ประมง ที่ได้ให้ข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ในการจัดทำรูปเล่มนี้ ทางคณะผู้วิจัยขอบพระคุณคณาจารย์ทุก ๆ ท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและผู้เขียนตำรา เอกสาร ทุกท่านที่ข้าพเจ้านำมาเป็นเอกสารอ้างอิงประกอบการเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์ อนึ่งในการจัดทำเป็นเอกสารหากมีส่วนหนึ่งส่วนใดที่ผิดพลาดก็ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ชุตินุช สุจริต
สิงหาคม 2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอสต้าแซนทีนโดยเชื้อ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ อาหารสังเคราะห์ (YM medium) และ อาหารสูตรน้ำมะพร้าวที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน (Coconut Mix Noodle, CN) อัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:3 และ 1:5 ตามลำดับ แต่ละสูตรประกอบด้วย กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร , ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร , K_2HPO_4 0.1 กรัมต่อลิตร, NaCl 0.01 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ 0.01 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2$ 0.01 กรัมต่อลิตร มีพีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5370 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน อัตราส่วน 1:3 มีค่าการเจริญในน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.23 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณสารแอสต้าแซนทีน 680 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง การเปลี่ยนแปลงพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-5.80 เติมปริมาณแหล่งกลูโคสโดยใช้น้ำตาลโตนด ร้อยละ 5 พบว่าในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลโตนดร้อยละ 5 โดยการวัดการเจริญโดยชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 9.66 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสต้าแซนทีน เท่ากับ 810 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ ได้มีการกระตุ้นการเกิดสารสีโดยใช้ Critic acid ร้อยละ 0.05 1 และ 1.5 ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ กรดcritic acid ร้อยละ 1 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 10.30 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสต้าแซนทีน เท่ากับ 930 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ถือได้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดปริมาณสารอินทรีย์และเป็นเพิ่มมูลค่าเพิ่มให้กับน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน อัตราส่วน 1:3 เติม เติมน้ำตาลโตนดร้อยละ 5 พีเอช 5.5 ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซสเซียส โดยศึกษาระดับการให้อากาศที่แตกต่างกัน พบว่า ที่ 120 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 1 , 2 และ 3 ปริมาณอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที ให้น้ำหนักเซลล์เป็น 10.48, 11.09 และ 10.90 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตแอสต้าแซนทีน เป็น 520, 980 , 1,018 และ 910 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ .

เมื่อนำเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการทำแห้งเป็นผงนำมาสกัดโดยใช้เครื่อง Supercritical Fluid Extraction โดย ใช้ความดันที่ 365 bar อัตราการไหลของ CO_2 4 cm/min ประมาณ 20 นาที เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารสีแอสต้าแซนทีน

คำสำคัญ : แอสต้าแซนทีน น้ำมะพร้าว และ น้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

Abstract

This research aimed to investigate an optimal condition for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 in two different media: synthetic YM medium and the medium added with coconut water and diluted with sewage from Thai traditional rice vermicelli plant (coconut water: sewage of 1:0, 1:1, 1:3 and 1:5 ration respectively). The basic medium formulation was composed of 10 g/L glucose, 3 g/L yeast extract, 0.1 g/L K_2HPO_4 , 0.01 g/L NaCl , 0.01 g/L $MgSO_4$ and 0.01 g/L $CaCl_2$ with initial pH 5.5. The cultures were cultivated on 200 rpm shaking bath at 50 ^oC for 120 hr. It was found that *P. rhodozyma* TISTR 5370 grew optimally when cultivated in a mixture of coconut water and Thai rice vermicelli sewage (ratio of 1:3), with growth of 3.23 g dry biomass/L and specific astaxanthin production of 680 µg/g dry cell respectively. When fan palm sugar was added to increase reducing sugar from 10 to 15, 20 and 25 g/L, it was demonstrated that the 15 g/L formulation produced highest both dry cell weight (9.66 g/L) and astaxanthin (810 µg/g dry cell weight). Furthermore, when 0.5, 1.0 and 1.5 g/L citric acid was added as supplement, it was found that 1.0-g/L citric acid formulation gave the best result: 10.30 g/L dried cell weight and 930 µg/g dry cell weight astaxanthin. This study provides a promising alternative method of sewage reduction and valorization of wastewater from Thai traditional rice vermicelli plant.

The experiments were further conducted in a mixture of coconut water and Thai rice vermicelli sewage (ratio of 1:3) medium containing 1.5 g/L in 2-L fermenter with different levels of aeration and were operated at agitation speed of 540 rpm with light intensity of 500 lux and 25 C When the aeration rate of 1, 2 and 3 vvm were appled, the dry all weight of 10.48 , 11.09 and 10.09 g/L and astaxanthin content of 520, 1018 and 910 µg/g dry all weight at 120 h. were obtained respectively.

The supercritical fluid extraction (SFE) behavior was investigated to extract astaxanthin from the red yeast *Phaffia rhodozyma* which was disrupted and dried by bead mill and spray dryers, respectively. The highest yield of carotenoids and astaxanthin with CO_2 4 cm/min for 20 s and 365 bar.

Key words: astaxanthin , coconut water and sewage from Thai traditional rice vermicelli

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ (ไทย)	(2)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(5)
สารบัญภาพ	(7)
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	13
วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการ	14
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	16
สรุปผลการทดลอง	27
ข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	29

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. การวิเคราะห์พารามิเตอร์ในน้ำทิ้งผลิตขนมจีน 16

2. ผลของการเจือจางอาหาร พีเอช ชีวมวล ปริมาณสารสีแอสต้าแซนทีน μ_{max} , $Y_{x./s}$ ของยีสต์ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 ภายในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 84 ชั่วโมง 18

3. ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนม มีการเติมน้ำตาลโตนดลงไปด้วย (CN) ได้แก่ CN-0.05, CN-1.0% และ CN-0.15% การเจือจางอาหาร พีเอช ชีวมวล และปริมาณสารสีแอสต้าแซนทีน อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์และประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตเมื่อเทียบเวลา ของยีสต์ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 ภายในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 120 ชั่วโมง 20

4. ผลของการเติมกรดซิตริกที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0.05 , 1 and 1.5% ตามลำดับ ผลของพีเอช, ชีวมวล, ปริมาณสารแอสต้าแซนทีน , μ_{max} ,ผลที่ได้เซลล์ $Y_{x./s}$ และปริมาณแอสต้าแซนทีนของ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 ภายในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 120 ชั่วโมง 22

5. ผลของสูตรอาหรรเลี้ยงเชื้อ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 โดยเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน มีการเติมน้ำตาลโตนดลงไปด้วย (CN) .ที่มีการเติมเติม กรดซิตริก ร้อยละ 1.0 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซสเซียส ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 120 ชม มีอัตราการกวนที่ระดับต่าง ๆได้แก่ 1, 2 และ 3 ปริมาตรอากาต่อปริมาตรอาหารต่อนาที 23

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

6. ผลกรดอะมิโนของ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีนและน้ำมะพร้าว 25

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. การทำผลิตเส้นขนมจีน	4
2. แสดงโครงสร้างของ (ก) เบตาแคโรทีน (ข) แอสตาแซนธิน	9
3. การเจริญเติบโตและปริมาณแอสต้าแซนทีน จากยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5730 โดยเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:3 และ 1:5 ตามลำดับอาหารที่มีความแตกต่างกัน a) พีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งและ b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอสต้าแซนทีน	17
4. การเจริญเติบโตและปริมาณแอสต้าแซนทีนของยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5730 เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำตาลตโหนด)ที่ระดับ 5, 10 และ15% a) พีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งและ b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณ แอสต้าแซนทีน	19
5. การเจริญเติบโตและปริมาณแอสต้าแซนทีนของยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5730 เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CA)ที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5% a) พีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งและ b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณ แอสต้าแซนทีน	22
6. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตีออกซิแดนท์ของแอสต้าแซนทีนที่สกัดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน	26

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มา

การบริโภคขนมจีนเป็นที่นิยมกันเป็นจำนวนมาก ส่งผลต่อการเปิดโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเส้นขนมจีนเพิ่มมากขึ้น ย่อมก่อให้เกิดปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนมากขึ้นเช่นกัน ปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนมีปริมาณสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อตัวกระทำทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี จากการศึกษาการนำน้ำทิ้งไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ เช่น ชุตินุช สุจริต (2542) ได้ศึกษานำน้ำนึ่งปลาทูน่าที่แยกโปรตีนและไขมันที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เติมกากน้ำตาลร้อยละ 5 พีเอชเริ่มต้น 5.5 เลี้ยงยีสต์*Candida tropicalis* TISTR 5146 ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 111.51 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 58.20 ไขมันร้อยละ 0.36 เถ้าร้อยละ 9.59 ความชื้นร้อยละ 1.26 ได้นำมาเลี้ยงปลากดเหลือโดยใช้ทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารร้อยละ 25 และ 50 พบว่าปลากดเหลืองมีน้ำหนักเฉลี่ย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตาย ไม่แตกต่างกับเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูงชุดควบคุมที่ใช้โปรตีนจากปลาป่น เมื่อทดแทนปลาป่นด้วยยีสต์ร้อยละ 25 พบว่าปลากดเหลืองมีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิดีกว่าชุดควบคุมและสูตรอาหารที่ทดแทนปลาป่นด้วยยีสต์ร้อยละ 50 เป็นต้น มีแนวคิดในการที่ลดปริมาณสารอินทรีย์และเป็นการผลิตชีวมวลของตัวกระทำทางชีวภาพเช่นกัน ซึ่งตัวกระทำทางชีวภาพนั้นยีสต์ *Phaffia rhodozym* TISTR 5730 ตั้งสมมติฐานว่าเชื้อยีสต์สามารถที่จะนำเอาสารอินทรีย์ดังกล่าวในน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีนไปก่อให้เกิดชีวมวลและผลิตสารแอสต้าแซนทีน จากงานวิจัย Chutinut, *et al.*, (2012) นำยีสต์ *Phaffia rhodozym* TISTR 5730 เลี้ยงในแป้งสาคูที่ผ่านการย่อยสลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่า ชีวมวล 8.77 กรัมต่อลิตร ผลิตสารแอสต้าแซนทีนได้ 726 μg/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งผลิตได้สูงกว่าอาหาร YM broth เป็นที่น่าสนใจหากสามารถที่ลดปริมาณสารอินทรีย์และผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนไดด้ เนื่องจากสารแอสต้าแซนทีนในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีทั้งหมด ซึ่งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตอาหารสัตว์และการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมอื่น ๆ นอกจากนี้อาจจะมีในธรรมชาติ ในรูปของคาร์โรทีนอยด์และการสังเคราะห์สารแอสต้าแซนทีนยังคงมีแหล่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแอสต้าแซนทีนได้ เช่น *Phaffia rhodozym* โดยมีการวิจัยจำนวนมากตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 เป็นต้นมา การผลิตแอสต้าแซนทีนก็ยังไม่สามารถผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้เนื่องจากผลผลิตต่ำ (low productivity) อาจเนื่องมาจากความเข้าใจกลไกปัจจัยต่าง ๆ ในขบวนการสร้างแอสต้าแซนทีนยังไม่เพียงพอที่จะใช้ในการควบคุมการผลิต เพื่อให้ได้ผลเลิศ ในการผลิตสารแอสต้าแซนทีน ดังนั้นจึงได้มีนักวิจัยจำนวนมากได้พยายามศึกษาหาวิธีการจะเพิ่มผลผลิตให้สามารถนำไปขยายขนาดสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ เช่น ศึกษาลดต้นทุนการผลิตแอสต้าแซนทีนโดยใช้วัตถุดิบราคาถูก เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีน ซึ่งมีค่าบีโอดี อยู่ในช่วง 3,410 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซีโอดี อยู่ในช่วง 4,940 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ผลิตเป็นปกติ หากในช่วงเทศกาลจะเพิ่มกำลังการผลิตเป็น 2 เท่า ซึ่งจะมี

การก่อเกิดน้ำเสียเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่าเช่นเดียวกัน โดยที่โรงงานส่วนใหญ่จะมีการบำบัดน้ำเสียเพียงการกักพักน้ำไว้ให้ตกตะกอนแล้วปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลให้เกิดกลิ่นเหม็นรบกวนจนเกิดการร้องเรียนจากประชาชนที่อยู่ใกล้เคียงโรงงานผลิตเส้นขนมจีนในบางพื้นที่ จากปัญหาน้ำเสียจากโรงงานขนมจีนที่ก่อให้เกิดกลิ่นรบกวน เป็นปัญหาด้านการสุขาภิบาลและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากคุณภาพน้ำเสียมีค่าความสกปรกสูง ดังนั้นเพื่อให้โรงงานผลิตเส้นขนมจีนสามารถดำเนินกิจการและอยู่ร่วมกับชุมชนได้ จึงจำเป็นต้องมีระบบบำบัดน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตและกระบวนการบำบัดน้ำเสีย เพื่อป้องกันผลกระทบจากของเสียที่เกิดขึ้น และหากสามารถนำน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีน ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนเป็นการลดปริมาณสารอินทรีย์ เป็นลดต้นทุนในการผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนได้อีกทางหนึ่งด้วย ด้วยเหตุดังกล่าวนี้ จึงมีแนวคิดในการนำมาเป็นสารที่ใช้ในการผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนเพื่อหาสภาวะที่เหมาสม มาดัดแปลงเพื่อพัฒนาให้มีความใกล้เคียงกับสูตรอาหารสังเคราะห์มากที่สุด กับการสร้างแอสต้าแซนทีน ซึ่งก็น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาการผลิตและเพิ่มศักยภาพของการผลิตแอสต้าแซนทีนในระดับอุตสาหกรรมในอนาคตดังนั้นเพื่อให้สามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยคุ้มทุนจึงควรศึกษาหาสภาวะที่ให้ผลเลิศและลดต้นทุนในการผลิตแอสต้าแซนทีน โดยนำวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตรในท้องถิ่นมาใช้ก่อประโยชน์สูงสุด

ตรวจเอกสาร

1.ขนมจีน

ขนมจีน เป็นอาหารที่คนไทยรู้จักกันมานานและมีการนิยมบริโภคขนมจีนเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ปัจจุบันการผลิตขนมจีนมีรูปแบบการผลิตอยู่ในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือนขนาดย่อม และขนาดใหญ่ เพื่อตอบสนองต่อปริมาณความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งจากกระบวนการผลิตที่มีการใช้ข้าวสารเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตขนมจีนและการใช้น้ำในกระบวนการผลิตขนมจีนปริมาณมากส่งผลให้มีการก่อเกิดน้ำเสียปริมาณมากตามมาประกอบกับกระบวนการผลิตที่มีการใช้ข้าวสารเป็นวัตถุดิบส่งผลให้น้ำเสียที่เกิดขึ้นมีการปนเปื้อนสารอินทรีย์ในรูปของค่าบีโอดีและซีโอดีสูง ส่วนคุณลักษณะน้ำเสียจากโรงงานผลิตเส้นขนมจีนแห่งหนึ่งในจังหวัดตรัง จากกระบวนการผลิตที่ก่อให้เกิดน้ำเสีย และการปนเปื้อนสารอินทรีย์ปริมาณมากในน้ำเสียที่เกิดขึ้นส่งผลให้หากมีการปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะจะก่อให้เกิดการเน่าเสียของแหล่งน้ำนั้นและกลิ่นเหม็นรุนแรง เป็นปัญหามลพิษทางน้ำส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยาทางน้ำและประชาชนที่อาศัยอยู่ในชุมชนที่อยู่บริเวณใกล้เคียง ซึ่งได้มีแนวคิดในการนำน้ำทิ้งขนมจีนมาผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดปริมาณสารอินทรีย์และได้เซลล์ยีสต์เพื่อนำไปใช้ในอาหารสัตว์ นับว่าเป็นแนวทางหนึ่งในการเลือกใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้เป็นอย่างดี

จากการตรวจสอบกระบวนการผลิตขนมจีนของโรงงานแห่งหนึ่งในจังหวัดตรัง พบว่ามีกำลังการผลิตในช่วงวันปรกติเท่ากับ 1,200 กก./วัน จะก่อเกิดน้ำเสีย 22 – 25 ม.^{3}/วัน (18 – 20 ลิตร/กก.ผลผลิตเส้นขนมจีน) และในช่วงเทศกาลจะเพิ่มกำลังการผลิตเป็น 2 เท่า ซึ่งจะมีการก่อเกิดน้ำเสียเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่าเช่นเดียวกัน โดยที่โรงงานส่วนใหญ่จะมีการบำบัดน้ำเสียเพียงการกักพักน้ำไว้ให้ตกตะกอนแล้วปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลให้เกิดกลิ่นเหม็นรบกวนจนเกิดการร้องเรียนจากประชาชนที่อยู่ใกล้เคียงโรงงานผลิตเส้นขนมจีนในบางพื้นที่ จากปัญหาน้ำเสียจากโรงงานขนมจีนที่ก่อให้เกิดกลิ่นรบกวน เป็นปัญหาด้านการสุขาภิบาลและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากคุณภาพน้ำเสียมีค่าความสกปรกสูง ดังนั้นเพื่อให้โรงงานผลิตเส้นขนมจีนสามารถดำเนินกิจการและอยู่ร่วมกับชุมชนได้ จึงจำเป็นต้องมีระบบบำบัดน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตและกระบวนการบำบัดน้ำเสีย เพื่อป้องกันผลกระทบจากของเสียที่เกิดขึ้น

อย่างไรก็ตามเนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตเส้นขนมจีนส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มธุรกิจขนาดย่อม ดังนั้นงบประมาณสำหรับการจัดการน้ำเสียทั่งในส่วนของการก่อสร้าง การควบคุมดูแลระบบและการกำจัดของเสียอื่นๆ จึงมีส่วนสำคัญต่อการตัดสินในเลือกรูปแบบการจัดการน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมประเภทนี้ งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาวิธีการจัดการน้ำเสียที่ก่อเกิดจากโรงงานผลิตเส้นขนมจีนโดยพิจารณาถึงศักยภาพในการกำจัดหรือบำบัดสิ่งสกปรก ความสามารถในการควบคุมดูแลและพิจารณาถึงผลพลอยได้จากกระบวนการกำจัดของเสีย

ข้าวสาร

↓

แช่ข้าวสารทิ้งไว้ 1 คืน

↓

นำข้าวสารมาบดย่อยให้เป็นแป้ง

↓

หมักข้าวที่บดละเอียดแล้วใสเข่งรองผ้าขาว
ทิ้งไว้ 1 คืน

↓

ก่อนทำการต้มแป้งที่หมักแล้วนำมานวด
ให้เข้ากันอีกครั้ง

↓

ต้มน้ำให้เดือดในกระทะ★

↓

นำแป้งหมักที่นวดแล้วมาอัดใส่ลงในกระป๋องอัดแป้ง หลังจากนั้น
แป้งจะออกมาเป็นเส้นตามขนาดของเส้นขนมจีน

↓

ลงในกระทะที่ต้มน้ำเดือดจะได้เป็นเส้นขนมจีน
ลอยในน้ำต้มที่เดือด

↓

ตักเส้นขนมจีนที่ได้ไปใส่ในตะกร้าการจัดตามขนาดของตะกร้า
แบบใหญ่ แบบเล็ก หรือจะจับจีบ ตามความต้องการ

ภาพที่ 1 การทำผลิตเส้นขนมจีน

หมายเหตุ

★ : น้ำต้มเส้นขนมจีนเมื่อเย็นแล้วจะเป็นน้ำเสีย ได้นำมาทำการทดลองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองนี้

2. เชื้อยีสต์

การลดปริมาณสารอินทรีย์ โดยการใช้ตัวกระทำทางชีวภาพถือได้ว่าเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและหากสามารถที่ผลิตสารสีได้ ถือว่าเป็นการใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่า เพราะนอกจากจะเป็นสารให้สีแล้วเป็นสารที่มีประโยชน์ค่อนข้างสูงมาก สารแอสต้าแซนทีน เป็นรงควัตถุในกลุ่มแซนโธฟิลล์ที่ให้สีชมพูถึงสีแดงพบมากในสัตว์ทะเล รายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันชี้ให้เห็นถึงคุณประโยชน์ที่สำคัญในด้านต่าง ๆ เช่น การมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก สามารถป้องกันการเกิดการออกซิเดชั่น ของไขมันและการทำลายของเซลล์เมมเบรนและเนื้อเยื่ออันเนื่องมาจากกออกซิเจน (Simpson *et al*., 1981 ; Torrissen , 1989) รงค-วัตถุ ชนิดนี้โดยส่วนใหญ่ไม่สามารถผลิตจากธรรมชาติได้เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสูง ถึงแม้สามารถผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้แต่ผลผลิตที่ได้ยังคงต่ำ (low productivity) อาจเนื่องมาจากความเข้าใจกลไกปัจจัยต่าง ๆ ในขบวนการสร้างแอสต้าแซนทีนยังไม่เพียงพอพอที่จะใช้ในการควบคุมการผลิต ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลเลิศในการผลิตชีวมวลและการสกัดสารสีแอสต้าแซนทีนของเชื้อ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ และการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ นอกเหลือไปจากคุณสมบัติการเป็นสารให้สีเพียงอย่างเดียว เช่น อาหารสัตว์น้ำ อาหารคน และ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นต้น และในการผลิตสารสีแอสตาแซนทีนจากเชื้อยีสต์ ถือได้ว่าเป็นการผลิตแบบอินทรีย์ เพื่อการนำไปประยุกต์แบบการใช้สารสีอินทรีย์ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่และสามารถช่วยส่งเสริมอาชีพให้กับคนในท้องถิ่นได้อีกด้วย

งานวิจัยเกี่ยวกับการนำตัวกระทำชีวภาพเพื่อลดปริมาณของเสีย

Noonai (1981) ได้ทำการทดลองเลี้ยง *C. tropicalis* ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษที่บางปะอิน พบว่า สามารถเจริญได้เซลล์สูงสุด ร้อยละ30

Welsh และ Zall (1984) ได้ทดลองเลี้ยงยีสต์ (*Candida utillis*) ในน้ำเกลือที่ได้จากการดองปลาในเรือ เพื่อบำบัดน้ำส่วนนี้ ก่อนที่จะปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่ายีสต์ทำให้ค่าบีโอดี ของน้ำทิ้งลดลงร้อยละ 84 ภายในเวลา 3 วัน และได้เซลล์ยีสต์ ซึ่งมีโปรตีนร้อยละ 60 เป็นผลพลอยได้

อโณทัย คมเศวต (2519) ได้ศึกษาการเจริญของ (*Candida utillis*) ในน้ำมะพร้าวเพื่อผลิตยีสต์เป็นอาหารสัตว์ พบว่าได้น้ำหนักแห้ง 12 กรัมต่อลิตร มีโปรตีนในเซลล์ ร้อยละ 49 ของน้ำหนักแห้ง

ปราโมทย์ ศิริโรจน์ (2521) ได้ทดลองคัดเลือกยีสต์ในน้ำต้มถั่ว ซึ่งเป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารถั่วเหลือง พบว่า ยีสต์ (*Candida utillis*) NRRL-Y 900 ให้โปรตีนในเซลล์สูงสุดร้อยละ 45.3

ชุตินุช สุจริต (2541) ได้ศึกษานำน้ำนึ่งปลาทูน่าที่แยกโปรตีนและไขมันที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เติมกากน้ำตาลร้อยละ 5 พีเอชเริ่มต้น 5.5 เลี้ยงยีสต์*Candida tropicalis* TISTR 5146 ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 111.51 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 58.20 ไขมันร้อยละ 0.36 เถ้าร้อยละ 9.59 ความชื้นร้อยละ 1.26 ได้นำมาเลี้ยงปลากดเหลือโดยใช้ทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารร้อยละ 25 และ 50 พบว่า ปลากดเหลืองมีน้ำหนักเฉลี่ย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตาย ไม่แตกต่างกับเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูงชุดควบคุมที่ใช้โปรตีนจากปลาป่น เมื่อทดแทนปลาป่นด้วยยีสต์ร้อยละ 25 พบว่าปลากดเหลืองมีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ดีกว่าชุดควบคุมและสูตรอาหารที่ทดแทนปลาป่นด้วยยีสต์ร้อยละ 50

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีอากาศ ในสภาพปลอดอากาศหมักกลูโคสได้เร็วกว่าในสภาพที่มีอากาศ เหตุที่เป็นดังนี้ เพราะกลูโคสขัดขวางกระบวนหายใจของยีสต์ในสภาวะที่มีอากาศนั่นเอง ปรากฏการณ์ดังกล่าวรู้จักกันในนาม พาสเจอร์เอฟเฟกต์ (Pasteru Effect) กลูโคสเข้มข้น 5% สามารถกดการสังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการหายใจได้

ถึงแม้ยีสต์จะเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ แต่ผลที่เกิดจากการใช้น้ำตาลจะต่างกัน พบว่าในสภาพปลอดอากาศยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ส่วนในที่มีอากาศยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นพลังงานได้เซลล์ออกมามาก ที่เหลือเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ

ในการแบ่งเซลล์ของยีสต์นั้นพบว่า (*Candida utillis*) มีการแบ่งเซลล์เป็นอิสระไม่ขึ้นกับขนาดเซลล์หรือสารอาหาร แต่จะขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่าง การแบ่งเซลล์จะเกิดได้ดีเมื่อความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 3.5 – 5.0 โดยเฉพาะที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 พบว่าการแตกหน่อของยีสต์จะเร็วมาก โดยจะเริ่มแตกหน่อหลังจากเติมสารอาหารลงไปแล้ว 90 นาที และอัตราการแตกหน่อของยีสต์เป็น 74 เปอร์เซ็นต์ต่อชั่วโมง แต่การแตกหน่อยของ (*Candida utillis*) จะช้ามากที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2.5

วัตถุดิบที่ใช้เลี้ยงยีสต์ได้ดีและเป็นที่นิยมคือ กากน้ำตาล ซึ่งอาจจะได้จากอ้อยหรือหัวฝักกาดหวาน (beet root) ก็ได้ ซึ่งองค์ประกอบของกากน้ำตาลจะผันแปรตามแหล่งที่ได้และวิธีการผลิตน้ำตาล ตามปกติกากน้ำตาลจะขาดแคลนธาตุไนโตรเจนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ จึงจำเป็นต้องเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาจให้ในรูปของ แอมโมเนีย นอกจากนี้ก็ต้องการฟอสฟอรัสเช่นกัน ในการฆ่าเชื้อในอาหารเหลว ทำได้โดยทำกากน้ำตาลที่เจือจางให้ร้อนเป็น 95 องศาเซลเซียสก่อน แล้วจึงฆ่าเชื้อที่ติดมากับสารอาหารที่ 140-145 องศาเซลเซียส เป็น 4 วินาที แล้วทำให้เย็นลงรวดเร็ว หรือทำให้ร้อนเป็น 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ก็ได้ อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงยีสต์จะเป็น 30 องศาเซลเซียส ถ้ามีการให้อากาศจะต้องมีการคนและให้อากาศตลอดเวลาจึงเกิดฟองขึ้นได้ ซึ่งแก้ไขโดยการเติมสารป้องกันฟองลงไปด้วย

3. สารสีแอสต้าแซนทีน

แอสต้าแซนทีนเป็นรงค์วัตถุพื้นฐานที่พบได้ในเนื้อสัตว์จำพวก salmonid ได้แก่ ปลาเซลมอน และปลาเทราท์ และสัตว์จำพวก crustaceans เช่นกุ้ง กั้ง และปูต่างๆ ซึ่งตามธรรมชาติแล้วสัตว์เหล่านี้จะได้รับรงควัตถุนี้จากอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด ทำให้สีของเนื้อสัตว์มีสีสันจืดจาง ไม่สวย และขายได้ในราคาต่ำ ดังนั้นผู้เลี้ยงจึงนิยมใช้แอสต้าแซนทีน เติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์เพื่อที่จะทำให้สัตว์น้ำดังกล่าวมีสีสันสวยงามและขายได้ในราคาสูง (Johnson *et al*., 1980 ; Sigurgisladottir *et al.,* (1994) ได้ทำการทดลองเลี้ยงปลาเซลมอนโดยใช้แอสต้าแซนทีนและโทโคเฟอรอล เพื่อเปรียบเทียบลักษณะและรสชาติของเนื้อปลา พบว่าสีส้มแดงของเนื้อปลาที่ได้จากการเติมแอสต้าแซนทีนนั้นให้ลักษณะและรสชาติของเนื้อดี แต่โทโคเฟอรอลนั้นจะไม่มีผลต่อลักษณะและรสชาติของเนื้อ

แอสต้าแซนทีนมีสมบัติเป็น *strong antioxidant* ที่สูงกว่าแคโรทีนอยด์อื่น ๆ (Terao, 1989) จึงมีส่วนช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งและเนื้องอกได้ในหนู (Palozza and krinsky, 1992) เนื่องจากการเกิดโรคมะเร็งและเนื้องอกนั้นมีอนุมูลอิสระเป็นจุดเริ่มต้นและส่งเสริมการเกิดเซลล์มะเร็ง

แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) เป็นสารในกลุ่มแซนโทรฟิลล์ ตระกูลแคโรทีนอยด์ที่มีสีชมพูถึงแดง
จากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พบว่าแอสตาแซนธินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวหรือค่าแสดงการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีประสิทธิภาพสูงกว่าโคเอนไซม์คิวเทน 800 เท่า สูงกว่าคาทีชินซึ่งเป็นสารสกัดจากชาเขียว 560 เท่าและมีค่าสูงกว่าวิตามินซี 6,000 เท่า (Nishida et al., 2007) จากการศึกษาเพิ่มเติมของ Shimidzu และคณะ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินอี 550 เท่า และสูงกว่าเบต้าแคโรทีน 40 เท่า

ความปลอดภัยในการใช้กับเครื่องสำอางและอาหารเสริมสารแอสต้าแซนทีน ปลอดภัยสำหรับการใช้เป็นเครื่องสำอาง จากจำนวนผู้เข้าร่วมการทดลองทั้งหมด 45 คน (ทั้งหญิงและชาย) ที่รับการทดสอบ Standard Japaanese Patch พร้อมรายงานผลในเวลา 24-48 ชั่วโมงหลังการทดสอบผิวชั้นนอกนั้นเกิดอาการเนื่องจากพลาสเตอร์กาวเท่านั้น ไม่มีอาการที่เกิดจากแอสต้าแซนทีนแต่อย่างใด (Takaichi et al., 2003)

ปัจจุบันมีบริษัทที่ผลิตแอสต้าแซนทีนขึ้นรายเดียวคือ บริษัท F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd. ที่ผลิตเฉพาะ ออลทรานส์ แอสต้าแซนทีน (all- trans astaxanhtin) ซึ่งได้รับการอนุมัติจากหน่วยงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้ใช้เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงปลาแซลมอน แต่เมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มการบริโภคในปัจจุบันพบว่า ผุ้คนส่วนใหญ่เริ่มมีความระมัดระวังในการบริโภคอาหารที่มีการสังเคราะห์เจือปน (food additive) ดังนั้นการใช้แอสต้าแซนทีนที่ได้จากธรรมชาติน่าจะปลอดภัยและได้รับความไว้วางใจจากผู้บริโภคมากกว่า นอกจากนั้นแอสต้าแซนทีนได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยากและซับซ้อน จึงทำให้มีราคาแพงมากโดยแอสต้าแซนทีนมีความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ มีราคาสูงถึง *2,500* เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม และเมื่อนำไปผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์จะดูดซึมได้ไม่ดีเท่ากับแคโรทีนอยด์ที่ได้จากธรรมชาติ (Gil-Hwan *et al*., 1989 *และ* Johnson *และ*Schroeder, 1995) ยีสต์ที่สามารถผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนได้ กล่าวคือ *Phaffia rhodozyma* เป็นสายพันธุ์เดียวของยีสต์ที่สามารถสร้างแอสต้าแซนทีนได้ โดย *Johnson and Lewis (1979)* ได้ทดลองเลี้ยง *Phaffia rhodozyma* ใน *standard medium* พบว่าการเจริญจะหยุดเมื่อกลูโคสในอาหารไม่มีแล้ว แต่การสร้างแอสต้าแซนทีนจะยังคงสร้างต่อไป และพีเอช 4.5 นั้นจะเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแอสต้าแซนทีนของยีสต์ ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแอสต้าแซนทีนคือ cellulobiose โดยที่ cellulobiose จะใช้ได้เฉพาะในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้นซึ่งต่างกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ สำหรับแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการสร้างแคโรทีนอยด์ค่อนข้างจำกัดมาก มีการศึกษาโดยนำ *Phaffia rhodozyma* เลี้ยงในน้ำมะพร้าว กากน้ำตาล การไฮโดรไลซิสจากลูกพืช น้ำองุ่น น้ำแป้งสาคู เป็นต้น (*Dominguz and Torres,* 2004; Chutinut

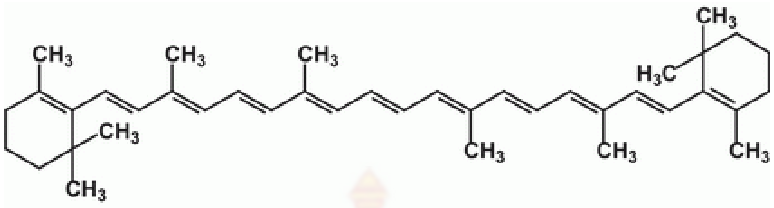
et al., 2012) สามารถสารชีวมวลและสารสีแอสต้าแซนทีนได้เป็นอย่างดี ในปัจจุบันได้มีการนำสารสีแอสต้าแซนทีนไปใช้ในประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น

จะมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะในลูกปลาขนาดเล็ก (*Ellis,* 1988).งานวิจัยของ *Naguib , 2000* และ *Baker* และคณะ *2004* พบว่า สารแอสต้าแซนทีนมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติออกซิแดนท์ มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า เบตาแคโรทีน ลูทีน ซีแซนธิน และ แคนธาแซนธิน ประมาณ *10* เท่า และมีประสิทธิภาพสูงกว่า วิตามินอีกประมาณ *500* เท่า ได้มีผลการวิจัยของ *Jyanouchi* และ คณะ , *2000* พบว่า แอสต้าแซนทีนมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ระบบทางเดินอาหาร หรือ อาจช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอกและกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูได้

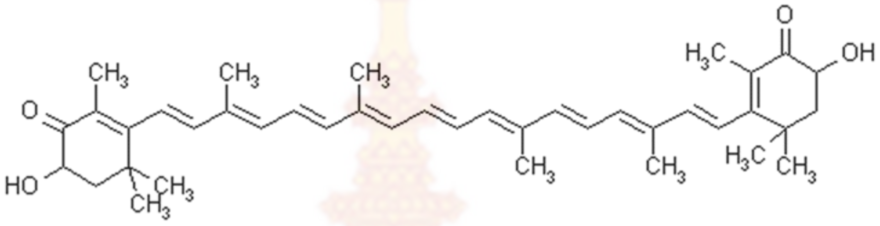
Yamashita (2006) .ได้ทำการวิจัยทางคลินิกโดยศึกษาแบบ Single Blind Randomized Control ในอาสาสมัครหญิงที่อายุประมาณ 47 ปี จำนวน 49 คน โดยให้รับประทานแอสตาแซนธิน 2 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง อาสาสมัครรู้สึกว่าสุขภาพผิวดีขึ้น คือ ความแห้งและหยาบกระด้างของผิวลดลง ผิวมีความชุ่มชื้นเพิ่มขึ้น ความยืดหยุ่นมากขึ้น ริ้วรอยลดลง

3.1 โครงสร้างทางเคมีแอสต้าแซนทีน

แอสต้าแซนทีน 3,3’-dihydroxy-β-β’-carotene -4-4’-dione) จัดอยู่ในกลุ่มของแซนโธฟิลล์ หรืออาจเรียกว่า คีโตแคโรทีนอยด์ (Ketocarotenoid) เนื่องจากมีโครงสร้างอยู่ในลักษณะที่อยู่ในรูปของเบตา-แคโรทีน (รูปที่ 1 ก) ที่ถูกเติมออกซิเจน โดยโครงสร้างหลักประกอบไปด้วยแกนไฮโดรคาร์บอน ระหว่างคาร์บอนอะตอมจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่ ที่เรียกว่า polyene โดยปลายทั้งสองข้างเป็นวงแหวนแบบปิด (Ionone rings) ของไฮโดรคาร์บอน ตรงปลายวงแหวนจะมีหมู่ของไฮดรอกซิลและออกซิเจน (รูปที่ 1 ข) ลักษณะโครงสร้างแบบ polyene มีส่วนสาคัญที่ช่วยในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี ลักษณะการดูดกลืนคลื่นแสงตลอดจนมีคุณสมบัติ lipophilic ส่วนวงแหวนค่อนข้างมีขั้ว ซึ่งความมีขั้วจะลดลง เมื่อแอสตาแซนธินถูก เอสเทอริไฟด์ แอสตาแซนธินสามารถพบโดยอยู่อย่างอิสระ หรือทาปฏิกิริยาทางเคมีร่วมกับโปรตีน ที่เรียกว่า Carotenoproteins หรือทาปฏิกิริยากับ lipoproteins ที่เรียกว่า Carotenolipoproteins ทาให้มีสีเขียวหรือน้าเงิน แทนที่จะมีสีแดงหรือส้มดาซึ่งปรากฏอยู่ในกุ้งลอบสเตอร์ แคโรทีนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการดูดซับพลังงานกระตุ้นจาก Singlet oxygen ทาให้เกิดการเสื่อมสลายของโมเลกุลแคโรทีนอยด์แทนที่จะไปทาลายโมเลกุลหรือเนื้อเยื่ออื่นๆ นอกจากนี้ยังป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดจากการสลายของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่สามารถเร่งการเสื่อมสลายของไขมันในเมมเบรนต่อไปได้



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของ (ก) เบตาแคโรทีน (ข) แอสตาแซนธิน

3.2 แหล่งของแอสต้าแซนทีน

1) สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี

ปัจจุบันมีบริษัทที่ผลิตแอสต้าแซนทีนขึ้นรายเดียวคือ บริษัท F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd. ที่ผลิตเฉพาะ ออลทรานส์ แอสต้าแซนทีน (all- trans astaxanhtin) ซึ่งได้รับการอนุมัติจากหน่วยงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้ใช้เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงปลาแซลมอน แต่เมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มการบริโภคในปัจจุบันพบว่า ผู้คนส่วนใหญ่เริ่มมีความระมัดระวังในการบริโภคอาหารที่มีการสังเคราะห์เจือปน (food additive) ดังนั้นการใช้แอสต้าแซนทีนที่ได้จากธรรมชาติน่าจะปลอดภัยและได้รับความไว้วางใจจากผู้บริโภคมากกว่า นอกจากนั้นแอสต้าแซนทีนได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นมีขั้นตอนที่ยุ่งยางและซับซ้อน จึงทำให้มีราคาแพงมากโดยแอสต้าแซนทีนมีความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ มีราคาสูงถึง 2,500 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม และเมื่อนำไปผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์จะดูดซึมได้ไม่ดีเท่ากับแคโรทีนอยด์ที่ได้จากธรรมชาติ (Gil-Hwan et al., 1989 และ Johnson และSchroeder, 1995)

2) สังเคราะห์ขึ้นในธรรมชาติ

แอสต้าแซนทีนในธรรมชาติมักจะอยู่ในรูป carotenoid protein complex ซึ่งมีสีต่าง ๆ มากมายจากเหลืองถึงแดง น้ำเงิน เขียว น้ำตาล เป็นต้น แอสต้าแซนทีนที่อยู่ในรูป carotenolipo(glyco)protein จะแทรกอยู่ในส่วนของไขมัน เช่น ไข่ของ crustacean แต่ในแอสต้าแซนทีนที่อยู่ในรูป carotenoprotein จะต่ออยู่กับโปรตีนโดยไม่ใช้พันธะ โควาเลนต์ แอสต้าแซนทินที่อยู่ในรูป carotenoprotein ที่รู้จักดีที่สุดคือ รงค์วัตถุสีน้ำเงินของ crustacyania (Zagalsky and

Jones, 1982; Renstrem et al., 1982) รงควัตถุสีเหลือจากกุ้งมังกร (lobster) (Zagalsky, 1982) แอสต้าแซนทีนอาจอยู่ในรูปที่ถูก esterified เช่นละลายในไขมันใน hepatopan creas ของ crustacean หรือเมื่อถูก esterified ในรูป diol อิสระ ซึ่งพบในเนื้อแซลมอน (Aandrewes and Starr, 1976) แอสต้าแซนทีนเป็นรงควัตถุที่พบมากในยีสต์ *Phaffia* rhodozyma ซึ่งจะอยู่ในรูปของ 3R, 3’R (Johnson and Lewis, 1979)

3) แหล่งจุลินทรีย์

3.1) ยีสต์และรา

Phaffia rhodozyma เป็นสายพันธุ์เดียวของยีสต์ที่สามารถสร้างแอสต้าแซนทีนได้ โดย Johnson and Lewis (1979) ได้ทดลองเลี้ยง *Phaffia rhodozyma* ใน standard medium พบว่าการเจริญจะหยุดเมื่อกลูโคสหมด แต่การสร้างแอสต้าแซนทินจะยังคงสร้างต่อไป และพีเอช 4.5 นั้นจะเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแอสต้าแซนทีนของยีสต์ ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแอสต้าแซนทินคือ cellulobiose โดยที่ cellulobiose จะใช้ได้เฉพาะในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้นซึ่งต่างกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ สำหรับแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการสร้างแคโรทีนอยด์ค่อนข้างจำกัดมาก

3.2) แบคทีเรีย

Mycobacterium lactiola เป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่มีรายงานว่าสามารถสร้างแอสต้าแซนทินในอาหรที่มีสารไฮโดรคาร์บอนได้ จะไม่สร้างในอาหารnutrient agar (Hass and Bushnell, 1944) *Brevibacterium* sp. เป็นแบคทีเรียสามารถสร้างแอสต้าแซนทินได้เช่นกัน *Halobacterium salinarium* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างรงควัตถุชนิด ketocarotenoid (Calo et al., 1995)

3.3) สาหร่าย

สาหร่ายที่สามารถสร้างแอสต้าแซนทีนได้มีหลายชนิดแต่ละชนิดต้องมีสภาวะที่เหมาะสมจึงจะสร้างได้ดีแตกต่างกัน เช่น *Haematococcus* sp (Droop, 1955) *Chlorella fusa*, *Chloreela zofingiensis* (Borowitzka, 1989) เป็นต้น

4) หน้าที่หลักของแอสต้าแซนทีน

4.1) ทำหน้าที่ในการเกิดสี (pigmentation)

จากการศึกษาของ Storebakken และคณะ (1986) ศึกษาการใช้แคร์โรทีนอยด์เพื่อเพิ่มคุณภาพสีของเนื้อปลา Atlantic salmon โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ astaxanthin, astaxanthin diplmitate และ canthaxanthin ที่ระดับ 0,30,60 และ 90 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทดลองผสมในอาหารให้ปลากินเป็นเวลา 56 สัปดาห์ พบว่า astaxanthin ทำให้เนื้อปลามีสีแดงมากที่สุด รองลงมากคือ canthaxanthin และ astaxanthin dipalmitate ตามลำดับ ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้โดยขบวนการสังเคราะห์ (biosynthesis) ของ carotenoid โดย

carotenoid ที่มีอยู่ในธรรมชาติจะมีอยู่หลายแบบ ซึ่งเมื่อสัตว์น้ำพวกปลาและกุ้งกินเข้าไปจะผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่างๆ ให้อยู่ในรูป end product คือ astaxanthin แล้วดูดซึมเข้ากล้ามเนื้อ (D' abramo และคณะ , 1983) เพราะฉะนั้น การให้ carotenoid ในรูป astaxanthin จะสามารถดูดซึมได้เร็วกว่า canthaxanthin และคุณสมบัติในการรวมตัวกับ lipoprotein ที่ดีกว่าของ astaxanthin ทำให้มีการตกค้างในกล้ามเนื้อมากกว่าด้วย ดังนั้นการใช้ astaxanthin จึงให้ผลดีกว่าการใช้ canthaxanthin

4.2) หน้าที่ทางสรีวิทยา (Physiological Function)

Astaxanhtin มีผลทางสรีระวิทยาของสัตว์น้ำหลายประการ ได้แก่ ช่วยป้องกันเซลล์ที่อาจถูกทำลายจากสารพิษต่าง ๆ ที่เกิดจากขบวนการบางอย่างในร่างกายสัตว์เอง ทำให้เซลล์มีสภาพที่ดี และเป็นแหล่งของออกซิเจนที่สำคัญในเซลล์ นอกจากนี้ยังเป็นสาร Analogous ของวิตามินละลายในไขมันอีกด้วยการป้องกันภายในเซลล์ โดยธรรมชาติแล้ว astaxanthin มีความสามารถในการจับและการทำลายสารพิษต่าง ๆ ซึ่งขบวนการดังกล่าวเป็นการป้องกันและรักษาสภาพของเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม การเจริญเติบโตและพัฒนาอย่างรวดเร็วของเซลล์นั้น ทำให้เกิดการผลิตสารพิษต่าง ๆ รวมทั้งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต่าง ๆ ที่ได้จากขบวนการทางเคมีในร่างกาย ตัวอย่างเช่น free radicals lipid peroxides และสารพวก oxidative ต่าง ๆ นั้น ถ้าไม่ถูกจับและทำลายโดย astaxanthin แล้วสารเหล่านี้จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ (Miki, 1991) เป็นแหล่งเก็บออกซิเจนในเซลล์ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำมาก ๆ เช่น ในไข่ซึ่งมีการเจริญเติบโต และมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของเซลล์พบว่า astaxanthin สามารถช่วยทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อ มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้เป็นปกติและเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในปากแม่ปลาในดิน มักมีเม็ดสีมากกว่าไข่ที่พัฒนาในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนสูง (Tacon, 1981) สุขภาพและภูมิคุ้มกันโรคปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดแรกที่มีระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งคล้ายคลึงกับสัตว์เลือดอุ่นทั่วไป ระบบภูมิคุ้มกันของปลาประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น Plasma cell, Macrophage Lymphocyte, Basophill, Eosinophil และอวัยวะในระบบน้ำเหลือง (Lymphoid organ) ได้แก่ ไตส่วนหน้า ประกอบด้วย Haempopietic tissue ที่มี Lymphocyte, Macrophage และ Plasma cell ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการสร้าง antibody ม้าม ประกอบด้วยหลอดเลือดขนาดเล็ก (ellipsoid) ที่มี macrophage และ reticular fiber จำนวนมาก ม้ามทีหน้าที่สำคัญในการทำลายเม็ดเลือดแดงและเก็บสะสมเหล็กเพื่อนำกลับมาสร้างเม็ดเลือด และต่อมไทมัส พบบริเวณผนังด้านบนส่วนปลายของคอหอย บริเวณช่องกระพุ้งแก้มใกล้โคนครีบ หู ซึ่งประกอบด้วย lymphocyte ที่กำลังพัฒนาจำนวนมาก จะมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะในลูกปลาขนาดเล็ก (Ellis, 1988).

4. การประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์น้ำ

สารแอสต้าแซนทีน

การผสมแอสต้าแซนทินในอาหารเพื่อเร่งสีของสัตว์น้ำ สัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์ carotenoid ได้ด้วยตัวเอง จึงต้องรับ carotnoid ในรูปของอาหาร เมื่อผ่านขบวนการย่อยแล้ว carotenoid จะถูกดูดซึมผ่านผนังทางเดินอาหารร่วมกับไขมันอื่น ๆ ในรูปที่แตกต่างกันไป ขึ้นกับสภาพภายในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำแต่ละชนิด carotenoid เหล่านี้จะสะสมอยู่ภายในร่างกายเป็น

ผลให้เกิดสีขึ้นในส่วนต่างๆ ในกุ้งและปูก็มีแคโรทีนนอยด์ซึ่งรวมอยู่กับโปรตีนทำให้ได้เป็นสีน้ำเงิน หรือเทาอมน้ำเงิน เกิดจากสารแอสต้าแซนทีน ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีสีแดง เมื่อรวมกับโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน พบได้ในเปลือกกุ้ง ปู และลอบสเตอร์ สำหรับปลาแซลมอน สีแดงของเนื้อปลาเกิดเนื่องจากแคโรทีนอยด์หลายชนิด เช่น แอสต้าแซนทีน (astaxanthin) ,แคนธาแซนธิน (canthaxanthin), ลูเทอิน(lutein) , ทูนาแซนธิน (tunasanthin) และทาราแซนธิน (tararxanthin), (Simpson et al., 1981 ; Torrissen , 1989)

สีของปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ มีความสำคัญต่อผู้บริโภคไม่แพ้ขนาดและรูปร่างของสัตว์น้ำ ดังนั้นนักเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงพยายามผลิตอาหารที่มีส่วนผสมของแคโรทีนอยด์เพื่อเร่งสีของสัตว์น้ำให้เข้มขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถจำหน่ายได้ในราคาสูงขึ้น การจะเลือกใช้แคโรทีนอยด์ชนิดใดต้องพิจารณาถึงชนิดของสัตว์น้ำด้วย ทั้งนี้เพราะสัตว์น้ำต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการเปลี่ยนและสะสมแคโรทีนอยด์ได้ต่างกัน

มะลิ และคณะ (2537) ทดลองศึกษาผลการเสริม canthaxanthin และ แอสต้าแซนทินระดับต่าง ๆ ในอาหารต่อสีของกุ้งกุลาดำ ทดลอง 6 สูตร ระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า การเสริมรงค์วัตถุทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร เมื่อเสริมแอสต้าแซนทีน 50 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกุ้ง 4 สัปดาห์ ก็เพียงพอที่จะช่วยให้กุ้งมีสีตามที่ตลาดต้องการ

บานชื่น (2532) ทดลองเลี้ยงปลาดุกอุยด้วยอาหารที่ผสมสาหร่ายเกลียวทองสด (Spirulina sp.) ที่ระดับต่าง ๆ เมื่อใช้สาหร่ายเกลียวทองสดผสมในอาหารปริมาณ ตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ความเข้มของสีเนื้อปลาจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของสาหร่ายเกลียวทอง

วุฒิพร (2527) ทดลองผสมรงค์วัตถุจากแหล่งต่าง ๆ กับอาหาร ได้แก่ สาหร่ายสไปรูไลนา , กุ้งป่น , carophyll red,หอยแมลงภู่ กลีบดอกดาวเรืองแห้งพันธุ์ , กลีบดอกดาวเรืองแห้งพันธุ์ไซเวอร์เรียนและฟักทอง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 15 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้นของสีมากกว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองอื่น ๆ

Boonyaratpalin (1975) ทดลองใช้กลีบดอกดาวเรืองและสารให้สีที่สกัดจากเมล็ด annattoผสมลงในอาหารเพื่อเป็นแหล่งของคาร์โรทีนอยด์ โดยทดลองในปลาออสการ์ (Astronotus ocellatus Cuvier) และ ปลาเสือสุมาตรา (Barbus tetrazona Bleeker) พบว่า ปลาเสือสุมาตราที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของกลีบดอกดาวเรือง จะมีสีแดงเข้มและสดอย่างเห็นได้ชัดเจนกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของสารสีที่สกัดจากเมล็ด annoatto และอาหารที่ไม่ได้ใส่สารสี

5.การประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) เป็นสารในกลุ่มแซนโทรฟิลล์ ตระกูลแคโรทีนอยด์ที่มีสีชมพูถึงแดงจากการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พบว่าแอสตาแซนธินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวหรือค่าแสดงการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีประสิทธิภาพสูงกว่าโคเอนไซม์ คิวเทน 800 เท่า สูงกว่าคาทีซินซึ่งเป็นสารสกัดจากชาเขียว 560 เท่าและมีค่าสูงกว่าวิตามินซี 6,000 เท่า (Nishida et al., 2007) จากการศึกษาเพิ่มเติมของ Shimidzu และคณะ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินอี 550 เท่า และสูงกว่าเบต้าแคโรทีน 40 เท่า

ความปลอดภัยในการใช้กับเครื่องสำอางและอาหารเสริมสารแอสต้าแซนทีน ปลอดภัยสำหรับการใช้เป็นเครื่องสำอาง จากจำนวนผู้เข้าร่วมการทดลองทั้งหมด 45 คน (ทั้งหญิงและชาย) ที่รับการทดสอบ Standard Japaanese Patch พร้อมรายงานผลในเวลา 24-48 ชั่วโมงหลังการทดสอบผิวชั้นนอกนั้นเกิดอาการเนื่องจากพลาสเตอร์กาวเท่านั้น ไม่มีอาการที่เกิดจากแอสต้าแซนทีนแต่อย่างใด (Takaichi et al., 2003)

วันวิสา และ สุรพงษ์ (2556) ได้ทำการทดลองเสริมสารแอสต้าแซนทีนเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นและลดเลือนริ้วรอยในครีม ครีมแอสต้าแซนทีนมีประสิทธิภาพมากกว่าครีมเบนมาตรฐานในการเพิ่มความชุมชื้นและลดเลือนจุดด่างดำของผิวรอบดวงตาได้ในสัปดาห์ที่ 2 และครีมแอสต้าแซนทีนมีประสิทธิภาพมากกว่าครีมเบสมาตรฐาน ในการเพิ่มความชุมชื้นและลดรอยแดงของผิวรอบดวงตาได้ในสัปดาห์ที่ 4 แต่ ครีมแอสตาแซนทีนไม่สามารถลดเลือนริ้วรอยของผิวรอบดวงตาได้ทั้งในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เช่นเดียวกับครีมเบสมาตรฐาน

2.วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.1 ศึกษาการผลิตชีวมวลของ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีน

1.2 ศึกษาสภาวะในการสกัดสารสีของ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 โดยใช้เครื่อง Supercritical Fluid Extraction

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การเตรียมหัวเชื้อ

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง *Phaffia rhodozyma* TISTR 5370 ได้ซื้อจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี การเก็บรักษาเชื้อในอาหารวุ้นเอียง YM ใน 40% glycerol ก่อนทำการทดลองต้องมีการกระตุ้นการเจริญเติบโตในอาหาร YM broth ซึ่งประกอบด้วย 1% glucose, 0.5% peptone, 0.3% malt extract, 0.3% yeast extract ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ใส่อาหารเหลว 50 มล.เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที มีความเข้มแสงที่ 500 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟแบบ cool white fluorescent เป็นระยะเวลา 24-48 ชม. โดยพีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 ปรับพีเอชด้วย 1N HCl กว่าเข้าฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองใช้ 10 % มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.5 จะได้หัวเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 – 10^8 cfu/ml (Chutinut, 2009)

2.การเตรียมน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

ได้เก็บน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตขนมจีนที่ อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง โดยนำน้ำทิ้งขนมจีนที่ได้จากการต้มเส้นขนมจีน(ที่อยู่ในกระทะ) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาใส่ขวดพลาสติกเกรด A เป็นจำนวน 500 ลิตร เก็บรักษาขวดพลาสติกดังกล่าวไว้ในถังพลาสติกอีกชั้นหนึ่งซึ่งมีน้ำแข็งใช้ในการเดินทางเพื่อเก็บรักษาตัวอย่าง หลังจากนั้นนำน้ำทิ้งขนมจีนมาใส่ร่วมกันในถังพลาสติกใบใหญ่และทำการกวนให้เข้ากัน นำไปต้มโดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซสเซียส ใช้ระยะเวลา 30 นาทีเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นและนำใส่ขวดพลาสติกเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง โดยทำการเก็บรักษาตู้แช่และใช้การทดลองต่อไป

3.การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ในการทดลองนี้ใช้สูตร YM broth เป็นสูตรควบคุมและการเลี้ยงเชื้อเพื่อทำหัวเชื้อเริ่มต้น สูตรที่ใช้ในการทดลอง ดัดแปลงมาจาก (chutinut, 2009 และ chutinut et al, 2012) โดยประกอบด้วย น้ำมะพร้าวต่อน้ำทิ้งโรงานขนมจีนอัตราส่วน 1:1, 1:3 และ 1:5 ตามลำดับ (CN medium) แต่ละสูตรประกอบด้วยกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร , ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร , K_2HPO_4 0.1 กรัมต่อลิตร, NaCl 0.01 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ 0.01 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2$ 0.01 กรัมต่อลิตร มีพีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 ศึกษาการแหล่งกลูโคสที่ในการเลี้ยงยีสต์ ได้แก่ นำตาลตโหนด โดยใช้น้ำตาลตโหนดที่ระดับ 1 5 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ศึกษาการใช้กรด citric acid ร้อยละ ได้แก่ 1 5 และ 10 ตามลำดับ

3.สภาวะการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มล, บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มล.ซึ่งใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที และ มีความเข้มแสง 500 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟ cool white fluorescent ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซสเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน (144 ชั่วโมง)

4.การวิเคราะห์

การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดความขุ่น ที่การดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้วิธีของ Kurane et al (1994) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวงซ์ โดยวิธีของ Somogyi-

Nelson (1944) การวิเคราะห์สารสีแอสต้าแซนทีน โดยดัดแปลงจาก (Britton et al,1995 and Jian-Ping et al.,1997.) ในการวิเคราะห์สารสีแอสต้าแซนทีนนั้นเริ่มทำการวิเคราะห์หลังจากชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลองเป็นระยะเวลา 6 วัน (ชั่วโมงที่ 120)

5. การผลิตในถังหมัก

นำน้ำที่ได้จากการเลี้ยงในขั้นที่ 2 นำมาผลิตชีวมวลในถังหมักแบบกะโดยดัดแปลงสภาวะจาก Sujarit (2009) โดยใช้การหมักแบบกะ สภาวะการกวน 500 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาต่อปริมาตรต่ออาหารต่อนาที มีระยะเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อผลิตชีวมวล และทำให้เซลล์แห้งด้วยเครื่อง Freeze-dried เพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป

6. ศึกษาการสกัดโดยใช้เครื่อง Supercritical Fluid Extraction

ทำการแยกเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม จากตอนที่ 2 ทำกาสกัดสารแอสต้าแซนทีนดัดแปลงวิธีของ (Britton et al., 1995 Jian-Ping et al., 1997 และ Sujarit, 2009) นำไปสกัดอีกครั้งโดยใช้เครื่อง Supercritical Fluid Extraction โดย ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความดัน ที่ 300, 500 และ 700 bar , อุณหภูมิที่ใช้ ได้แก่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของ CO_2 ที่ 0.27 และ 0.54 cm/min เป็นต้น สำหรับการสกัดเพื่อให้ได้สารสีแอสต้าแซนทีนสูงสุด โดยวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า ฤทธิแอนตี้ออกซิเดนท์ และกรดอะมิโน (ส่งตรวจที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1.ผลของน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

โรงงานทำเส้นขนมจีน นำน้ำทิ้งในส่วนที่เป็นน้ำที่ต้มเส้นขนมจีน ซึ่งในกระบวนการทำขนมจีนเป็นการทำขนมจีนแบบหมักแป้งโดยมีการหมักแป้ง 1-2 วัน และนำมาทำการทำขนมจีน ได้น้ำทิ้งที่มีลักษณะขาว ข้น ซึ่งทำการเก็บหลังจากที่ต้มขนมจีนเสร็จ นำมาทำการกรองและเก็บไว้ในตู้เย็น นำวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ โดยทำการวิเคราะห์หาซีโอดี บีโอดี ปริมาณของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอย และน้ำมันและกรีส ดังตารางที่ 1

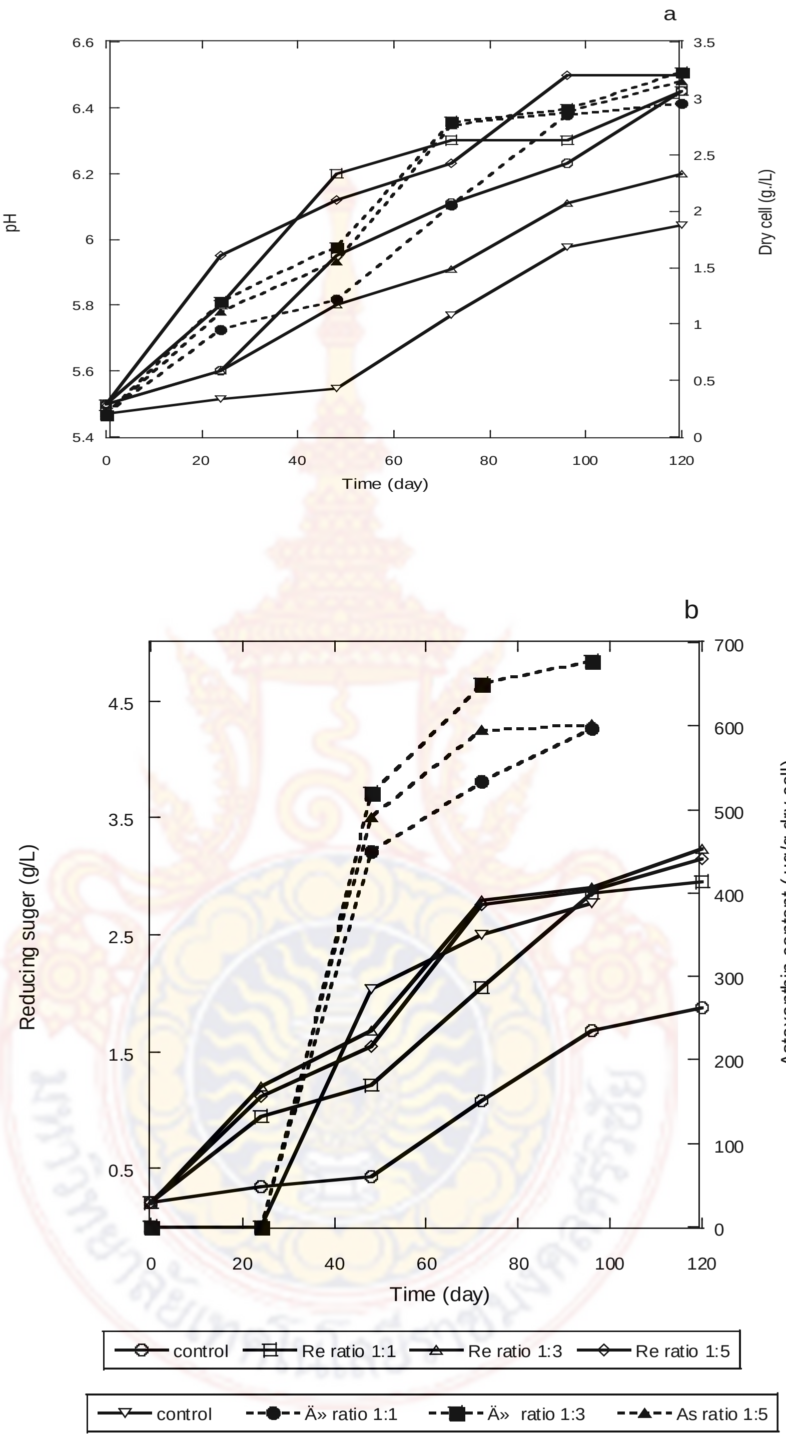
ตารางที่ 1 การวิเคราะห์พารามิเตอร์ในน้ำทิ้งผลิตขนมจีน

Parameter	Treatments
BOD (mg/L)	18600
COD (mg/L	5288
TS (mg/L)	3196
TSS (mg/L)	1536
Oil and Grease (mg/L)	7336
Aw (%)	23.51
Ash (%)	1.950
Protein (%)	2.1
Oil (%)	0.20

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ซีโอดี บีโอดี ปริมาณของแข็งทั้งหมด ของแข็งแขวนลอย น้ำมันและกรีส พบว่า ปริมาณทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (ตารางที่ 1) และ เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีน และไขมัน พบว่า ปริมาณร้อยละ 2.10 และ 0.20 ตามลำดับ มีปริมาณสารอาหารที่อยู่ในน้ำทิ้งขนมจีนในระดับที่ไม่มากและหากต้องการนำมาเลี้ยงเชื้อต้องมีการเติมสารเพื่อการเจริญเติบโตต่อไป

2.ผลการเจริญของเชื้อยีสต์ในน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน

จากการทดลองพบว่า ผลการเลี้ยงเชื้อ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:3 และ 1:5 ตามลำดับ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตและปริมาณแอสต้าแซนทีน จากยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5730 โดยเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:3 และ 1:5 ตามลำดับอาหารที่มีความแตกต่างกัน a) พีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งและ b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอสต้าแซนทีน

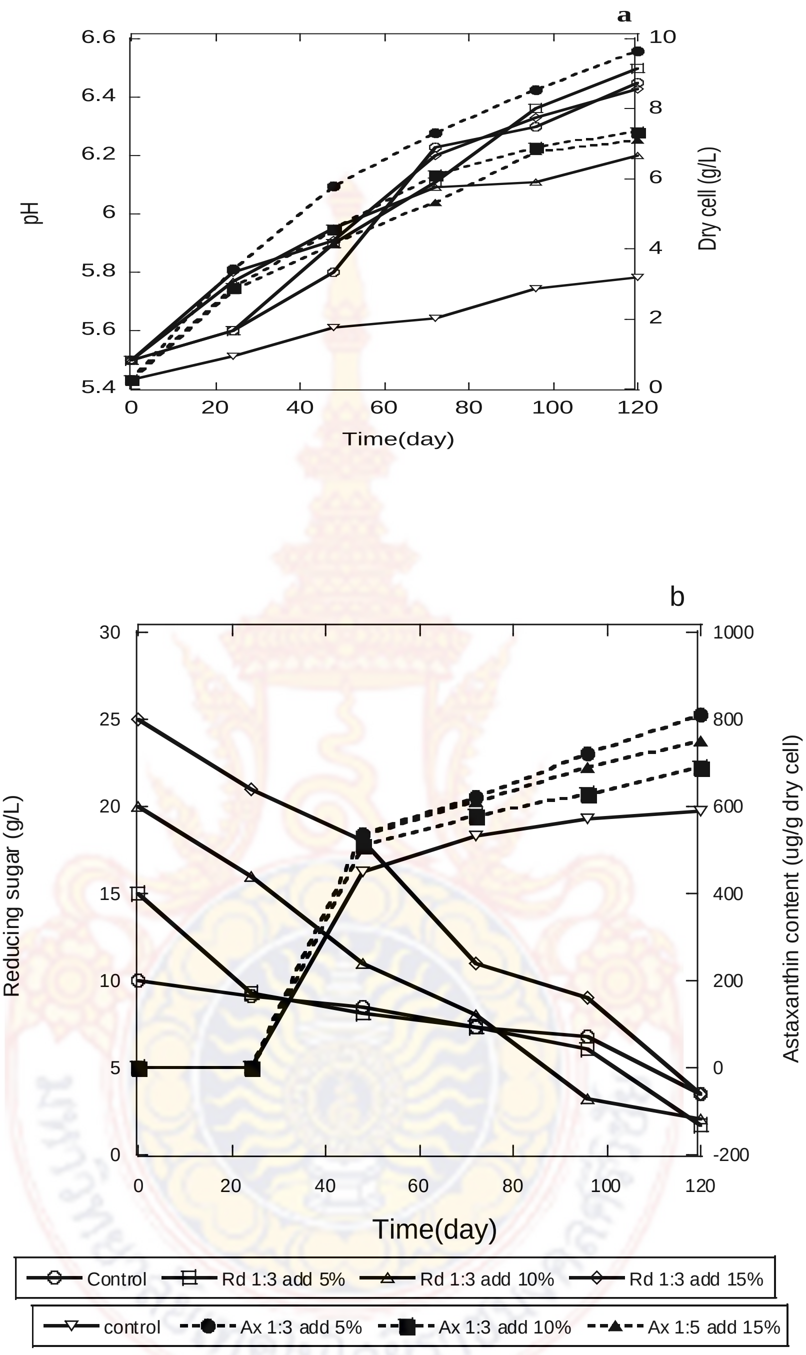
ตารางที่ 2 ผลของการเจือจางอาหาร พีเอช ชีวมวล ปริมาณสารสีแอสต้าแซนทีน μ_{max} , $Y_{x./s}$ ของยีสต์ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 ภายในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทีเวลา 84 ชั่วโมง

Parameters	pH	Biomass (g/L)	Astaxanthin μg/g dry cell weight	μ_{max} (h^{-1})	$Y_{x./s}$ g dry cell weight /g glucose)
Control	6.45	3.19	320	0.15	0.21
CN 1:1	6.10	2.95	590	0.14	0.45
CN 1:3	5.80	3.23	680	0.11	0.38
CN1:5	6.20	3.15	610	0.13	0.57

จากการทดลองพบว่า ผลการเลี้ยงเชื้อ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:3 และ 1:5 ตามลำดับ พีเอชเริ่มต้น 5.5 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่า ยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5370 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนอัตราส่วน 1:3 มีค่าการเจริญในน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.23 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณสารแอสต้าแซนทีน 680 μg/g dry cell weight การเปลี่ยนแปลงพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-5.80 ส่วนการเจริญในน้ำมะพร้าวที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนอัตราส่วน 1: 1 และ 1:5 มีการเจริญต่ำกว่าในการเจริญในน้ำมะพร้าวที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3 ซึ่งถ้าพิจารณาต้นทุนการผลิตสามารถที่จะลดระยะเวลาและได้ผลผลิตเร็ว ถือว่าเป็นผลดีต่อการลงทุน ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกน้ำมะพร้าวที่มีการเจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนในอัตราส่วน 1.3 ใช้ในการทดลองแหล่งคาร์บอนในข้อต่อไป

3.ผลของแห่งคาร์บอนในการเจริญของเชื้อยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5370

ในการศึกษาแหล่งกูลโคสที่ใช้ในการทดลอง ใช้น้ำตาลโตนด ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 10 และ 15 ตามลำดับ เติมลงในน้ำมะพร้าวซึ่งเจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน 1:3 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5370 เจริญได้ทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลโตนดที่ใช้ในการทดลอง เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลโตนดร้อยละ 5 โดยการวัดการเจริญโดยชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 9.66 กรัมต่อลิตร และการผลิตปริมาณสารแอสต้าแซนทีน เท่ากับ 810 μg/g dry cell weight เนื่องจากน้ำตาลโตนดมีองค์ประกอบด้วยคุณค่าสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ดังกล่าว พบน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโทศ โดยมีปริมาณ 2.88, 2.60 และ 2.83 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ โปรตีนร้อยละ 0.02-0.03 พีเอช 4.69 กรดซิตริกร้อยละ 0.098 (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 4) (สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา. 2542.) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยที่ใช้น้ำตาลโตนดเป็นแหล่งคาร์บอนในการทำหัวเชื้อในการผลิตกุ้งส้ม พบว่าลักษณะของกุ้งส้มที่ได้จากการหมัก โดยสูตรที่สอง ซึ่งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคนั้นประกอบด้วย เกลือร้อยละ 6.5 น้ำตาลร้อยละ 30 พบว่า พีเอช 3.84 และเกิดกรดแลกติก 3.20-4.1% ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 7.48 % ที่วันที่ 15 ของการหมัก ลักษณะปรากฏ ตัวกุ้งส้มมีสีส้มสด กลิ่นของกุ้งส้มที่ชวนรับประทาน มีกลิ่นรสเปรี้ยวของกรด มีกลิ่นหอมหวาน (ชุตินุช และ ไวกูณฐ์ , 2557)



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตและปริมาณแอสต้าแซนทีนของยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5730 เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำตาลตโหนด)ที่ระดับ 5, 10 และ15% a) พีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งและ b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณ แอสต้าแซนทีน

ตารางที่ 3 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน มีการเติมน้ำตาลโตนดลงไปด้วย (CN) ได้แก่ CN-0.05, CN-1.0% และ CN-0.15% การเจือจางอาหาร พีเอช ชีวมวล และปริมาณสารสีแอสต้าแซนทีน อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์และประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตเมื่อเทียบเวลา ของยีสต์ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 ภายในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 120 ชั่วโมง

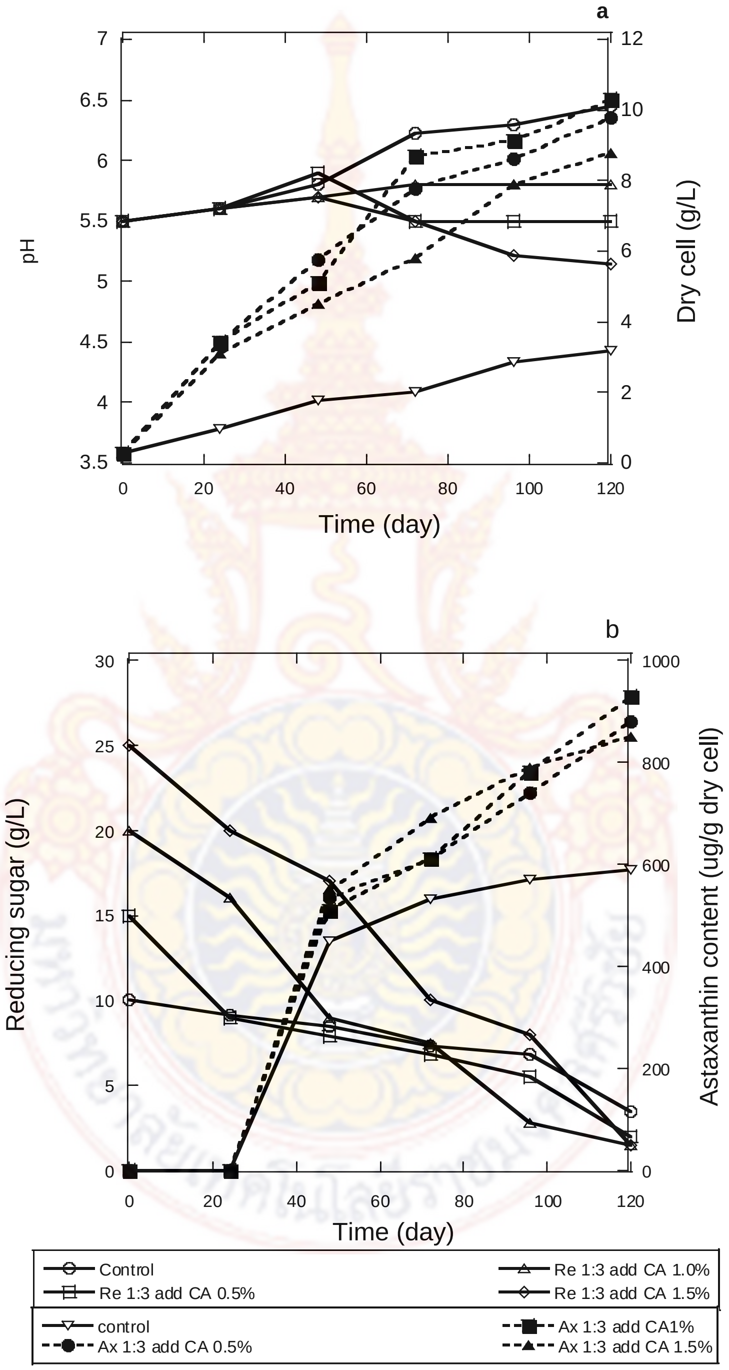
Parameters	pH	Biomass (g/L)	Astaxanthin μg/g dry cell weight	μ_{max} (h^{-1})	$Y_{x./s}$ g dry cell weight /g glucose)
Control	6.45	3.19	320	0.15	0.21
CN- 0.05%	6.50	9.66	810	0.17	0.28
CN 0.10%	5.70	7.35	518	0.11	0.24
CN 0.15%	5.43	6.78	650	0.18	0.17

จากภาพที่ 4 และตารางที่ 3 พบว่า เมื่อมีการเติมสารแหล่งคาร์บอนลงไปเพื่อทำให้เกิดการเจริญเติบและผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนขึ้นในปริมาณที่สูงขึ้น พบว่า เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนลงไปในระดับที่ 0.05, 0.10 และ 0.15% ตามลำดับนั้น พบว่า เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงดังกล่าวที่ระดับ 0.05% มีปริมาณที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ และ การผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนั้น มีพีเอชเท่ากับ 6.50 ปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้เท่ากับ 9.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสารสีแอสต้าแซนทีนได้เท่ากับ 810 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังในตารางที่ 3 และ ภาพที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง Fang and Cheng, 1993 ; Zheng et al., 2006 และ Chutinut, 2009 การเติมแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5370 หากมีการเติมมากไปมีผลต่อการเกิด Crabtree positive metabolism ซึ่งเกี่ยวข้องกับปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการเจริญของเชื้อยีสต์ดังกล่าวด้วย ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปนำแหล่งคาร์บอนที่เติมลงในที่ระดับ 0.05% ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4.ผลของกรดซิตริกเพื่อช่วยในการกระตุ้นในการผลิตสารสีแอสต้าแซนทีน

ในการเพิ่มการผลิตสารสีแอสต้าแซนทีนนั้น ได้มีการเติมสารหลายชนิดเพื่อที่จะเป็นตัวกระตุ้นในการผลิตสารสีให้มีปริมาณมาก กรดซิตริกเข้มข้นเติมลงในอาหารเพื่อเป็นสารที่ช่วยในการกระตุ้นเพิ่มในขบวนการสังเคราะห์สารสีแอสต้าแซนทีน (Folres-Cotera et al.,2001) พบว่าได้มีการเติมกรดซิตริกเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนัก/ปริมาตร เติมลงไปในน้ามะพร้าวที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน 1:3 พีเอชเริ่มต้นเท่ากบ 5.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5370 เจริญได้ดี โดยการวัดการเจริญโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 10.33 กรัมต่อลิตร และการผลิตปริมาณสารแอสต้าแซนทีน เท่ากับ 930 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ (ดังตารางที่ 4 และ ภาพที่ 5) สอดคล้องกับการเติมสารกรดซิตริกเข้มข้น ที่ระดับ 0.15 น้ำหนัก/ปริมาตร เติมลงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในฟลาสก์ที่สภาวะเดียวกันกับการใช้อาหารสังเคราะห์ MB พบว่า สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์และทำให้เกิดการผลิตแอสต้าแซนทีนมากที่สุด

ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและแอสต้าแซนทีน มีค่าเป็น 13.25 กรัมต่อลิตร และ 1,051 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ชุตินุช , 2009)



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตและปริมาณแอสต้าแซนทีนของยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5730 เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมกรดซิตริกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (CA)ที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5% a) พีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งและ b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอสต้าแซนทีน

ตารางที่ 4 ผลของการเติมกรดซิตริกที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0.05 , 1 and 1.5% ตามลำดับ ผลของพีเอช, ชีวมวล, ปริมาณสารแอสต้าแซนทีน , μ_{max} ,ผลที่ได้เซลล์ $Y_{x./s}$ และปริมาณแอสต้าแซนทีน ของ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 ภายในสภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 120 ชั่วโมง

Parameters	pH	Biomass (g/L)	Astaxanthin μg/g dry cell weight	μ_{max} (h^{-1})	$Y_{x./s}$ g dry cell weight /g glucose)
Control	6.45	3.19	320	0.15	0.21
CN 0.05%	5.50	9.66	880	0.15	0.22
CN 1%	5.80	10.30	930	0.15	0.28
CN1.5%	5.13	9.80	850	0.17	0.27

5.ผลการเจริญในการเลี้ยงในถังหมัก

พบว่าจากการศึกษาการเจริญของ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ในอาหารสังเคราะห์ CN ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) 0.05, 0.1และ 0.15% เติมกรดซิตริกที่ 1.0%ในฟลาสก์ที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 0.5% ให้ผลดีที่สุดโดยให้ผลการเจริญของยีสต์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 9.66 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตแอสต้าแซนทีนเป็น 810 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 120 ชั่วโมง

ส่วนการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ตามสัดส่วนของการเลี้ยงในฟลาสก์ มีอัตราการกวนที่ระดับอัตราการให้อากาศเป็น 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ให้ผลการเจริญของยีสต์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเป็น 11.09 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตแอสต้าแซนทีนเป็น 1,018 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 โดยเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน มีการเติมน้ำตาลโตนดลงไปด้วย (CN) . ที่มีการเติมเติมกรดซิตริก ร้อยละ 1.0 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซสเซียส ความเข้ม แสง 500 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 120 ชม มีอัตราการกวนที่ระดับต่าง ๆได้แก่ 1, 2 และ 3 ปริมาตรอากาต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

Parameters	pH	Biomass (g/L)	Astaxanthin μg/g dry cell weight	μ_{max} (h^{-1}	$Y_{x./s}$ g dry cell weight /g glucose)
Control	7.15	10.19	520	0.20	0.31
Air 1 rpm	7.50	10.48	980	0.21	0.38
Air 2 rpm	7.18	11.09	1,018	0.10	0.21
Air 3 rpm	7.25	10.90	910	0.18	0.27

จากตารางที่ 5 พบว่า เมื่อเลี้ยง *Phaffia rhdozyma* TISTR 5730 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวเจือจางกับน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน ที่ 1:3 และเติมกรดซิตริกที่ 1.0% และนำมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้สภาวะอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ปริมาณการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาต่อปริมาตรอาหารต่อนาทีความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซสเซียส โดยศึกษาระดับการให้อากาศที่แตกต่างกัน พบว่า ที่ 120 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 1 , 2 และ 3 ปริมาณอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาทีให้น้ำหนักเซลล์เป็น 10.48, 11.09 และ 10.90 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตแอสต้าแซนทีน เป็น 520, 980 , 1,018 และ 910 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ดังตารางที่ 5)

6. ศึกษาสภาวะในการสกัดสารสีของ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 โดยใช้เครื่อง Supercritical Fluid Extraction

จากการศึกษาการสกัดสารสีแอสต้าแซนทีนโดยใช้เครื่อง **Supercritical Fluid Extraction** ค่าวัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่อนข้างแพง แต่ในการกสัดด้วยวิธีการนี้มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ปฏิบัติงานเป็นอย่างมาก และ สารที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์ได้ เช่น ในด้านอาหาร และ เครื่องสำอาง ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีการนำผลที่ได้ไปศึกษาต่อด้านผลิตเครื่องสำอางในโอกาสต่อไป จากการศึกษาด้วยวิธีการสกัดด้วยเครื่อง **Supercritical Fluid Extraction** มีสภาวะดังนี้ หลักการที่ว่าของเหลวจะถูกเรียกว่า superficial เมื่อ อุณหภูมิและความดันของมันเกินจุดวิกฤตในบริเวณจุดวิกฤตนี้ของเหลวที่อยู่ในสภาวะ superficial จะมีสมบัติที่ไม่ปกติ เช่น ความหนืดต่ำ การแพร่สูง และมีแรงตึงผิวต่ำ ด้วยสมบัติเหล่านี้ของเหลวที่อยู่ในสภาวะ superficial จะมีความสามารถในการแพร่เข้าสู่เมทริกซ์ที่มีเนื้อละเอียดมากมากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ดั้งเดิม ดังนั้นให้ผลผลิตการสะกดของวัสดุที่ต้องการสูงขึ้น เมื่อนำสารกสัดไปสกัดโดยใช้วิธีของ Gio-Bin Linn et al., 2002 โดยผ่านการทำให้เซลล์แตกโดยการบดด้วยลูกแก้ว (bead mill) และการทำให้แห้งด้วย spray driner พบว่า ผลผลิตแอสต้าแซนทีนสุงสุดเมื่อใช้คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน 102-500 bar อุณหภูมิที่ 40-60 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของ CO_2 อยู่ในช่วง 0.27 และ 0.54 cm/min และมีการเสริมสาร

สกัดเป็นเอทานอลที่ระดับ 1,5,10 และ 15 % ตามลำดับ พบกว่า การสกัดให้ได้ปริมาณแดสต้าแซนทีน ที่สูง ควรใช้ two step pressure gradient ที่เปลี่ยนความดันจาก 300 เป็น 500 บาร์ ความเข้มข้น ของแอสต้าแซนทีนในส่วนที่สองที่ 500 บาร์ เพิ่ม 4และ 10 เท่า ที่ 40 และ 60 องศาเซสเซียส ตามลำดับ ผลผลิตเพิ่มประมาณ 40-50เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองได้ทำตามวิธีนี้พบว่า

ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการทำแห้งเป็นผงนำมาสกัดโดยใช้เครื่อง Supercritical Fluid Extraction โดย ใช้ความดันที่ 365 bar อัตราการไหลของ CO_2 4 cm/min ประมาณ 20 นาที เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารสีแอสต้าแซนทีน และนำสารดังกล่าวไปทดลองต่อไป ในด้านเครื่องสำอาง

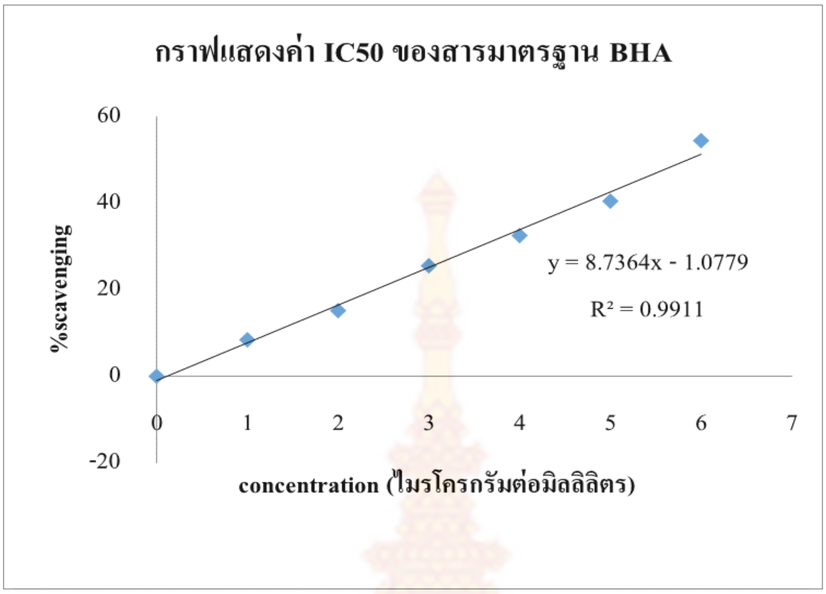
หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ใช้หัวเชื้อที่เตรียมในอาหาร YM medium เป็นหัวเชื้อโดยร้อยละ 0.5 โดยเลี้ยงในปริมาณ พบว่า สภาวะการเลี้ยงใช้อาหารอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน (Coconut Mix Noodle, CN) โดยมีการศึกษาปริมาณที่ใช้ในการ ทดลอง ทางด้านปริมาณอากาศ ที่ระดับต่าง ๆ 1 , 2 และ 3 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที พบว่า พบว่าใช้เลี้ยงในถังขนาด 10 ลิตร .ใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 4.6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยให้อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศา เซลเซียส ความเข้มแสงที่ 500 ลักซ์ จะได้ปริมาณเซลล์ 12.58 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตแอส ต้าแซนทีน 1,134 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่เวลา 120 ชั่วโมง สูงที่สุด จึงเลือกการทดลองนี้ใน การทดลองต่อไป เพื่อนำไปศึกษาการประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์น้ำและเครื่องสำอาง

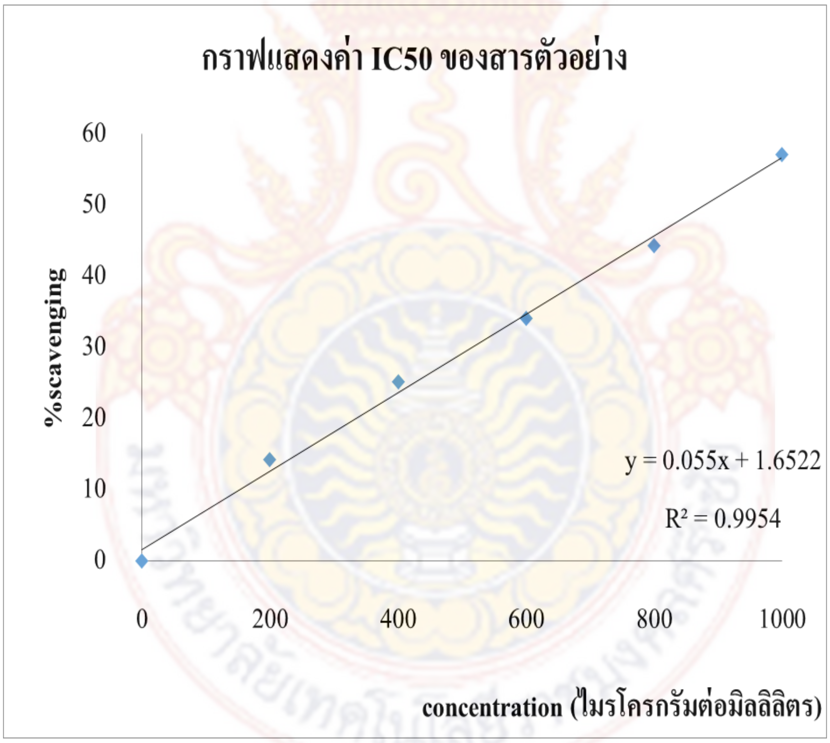
นำผลที่ได้จากการทดลองเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวไปวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน ณ มหาวิทยาลัยมหิดลได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลกรดอะมิโนของ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานผลิตขนมจีนและน้ำมะพร้าว

Component	RV-CM medium (mg/ 100 mg)
Aspartc acid	2.35
Serine	1.34
Glutamic acid	2.60
Glycine	1.40
Histidine	0.56
Arginine	1.54
Threonine	1.38
Alanine	1.95
Proline	1.17
Cystine	0.72
Tyrosine	0,72
Valine	1.45
Lysine	1.39
Isoleucine	1.11
Leucine	1.87
Phenylalanine	1.04

จากตารางที่ 6 พบว่ายีสต์ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5370 มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในการเจริญเติบโต เหมาะสมต่อการนำไปเพื่อพัฒนาเป็นอาหารสัตว์น้ำ เมื่อนำสารสกัดที่ได้นำมาวิเคราะห์สารแอนตีออกซิเดนท์ พบว่าดังภาพที่ 6





ภาพที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตีออกซิแดนท์ของแอสต้าแซนทีนที่สกัดได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

พบว่าสารสีแอสต้าแซนทีน เป็นสารสีที่มีการสกัดจากขั้วสูงมาก และเมื่อนำมาคำนวณสาร BHA ได้มากเช่นเดียวกัน แต่อาจจะต้องหาวิธีการที่เหมาะสมเนื่องจากสาร BHA ละลายในเมทานอล สารสีแอสต้าแซนทีนมีความเป็นขั้วสูงจะละลายได้ในเมทานอลน้อย แต่อาจจะละลายในเอทานอลได้ สารที่ได้ 881.09 Ug/ml เนื่องจากสารแอสต้าแซนทีนนี้จะนำไปประโยชน์ใช้ในอาหารสัตว์และ

เครื่องสำอาง จึ่งไม่สามารถนำไปละลายได้ในสารที่มีอันตรายและไม่เหมาะสมในการที่จะนำไปพัฒนาต่อไปในสิ่งมีชีวิต ด้วยเหตุผลดังกล่าวมีข้อจำกัดในการละลายเพื่อให้สามารถได้ทราบข้อเท็จจริงว่าหากละลายในสารเอทาธอลแล้วจะมีปริมาณสารที่ต้องการนั้นพบว่าสารตัวอย่างมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีโดยมีค่าIC50 เท่ากับ 881.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อ10มิลลิลิตร หากเพิ่มความเข้มข้นในการทดลองDPPHฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ หรือ ค่าIC50 จะมากขึ้นด้วย

สรุปผลการทดลอง

1.สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอสต้าแซนทีนโดยเชื้อ *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730 ในอาหาร อาหารสูตรน้ำมะพร้าวที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีน (Coconut Mix Noodle, CN) ประกอบด้วย กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร , ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร , K_2HPO_4 0.1 กรัมต่อลิตร, NaCl 0.01 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ 0.01 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2$ 0.01 กรัมต่อลิตร มีพีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ *P. rhodozyma* TISTR 5370 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำมะพร้าว ที่เจือจางด้วยน้ำทิ้งโรงงานขนมจีนอัตราส่วน 1:3 ให้ผลการเจริญของยีสต์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.23 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณสารแอสต้าแซนทีน 680 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาของการเลี้ยงเชื้อ 120 ชั่วโมง เติมแหล่งกลูโคสโดยใช้น้ำตาลโตนด ร้อยละ 5 พบว่าในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลโตนดร้อยละ 5 โดยการวัดการเจริญโดยชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 9.66 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสต้าแซนทีน เท่ากับ 810 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ เมื่อเติมกรดซิตริกร้อยละพบว่าเมื่อใช้ กรดcritic acid ร้อยละ 1 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 10.30 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารแอสต้าแซนทีน เท่ากับ 930 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์

เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร.. ความเข้มแสง 500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซสเซียส โดยศึกษาระดับการ

ให้อากาศที่แตกต่างกัน พบว่า ที่ 120 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศ 1 , 2 และ 3 ปริมาณอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที ให้น้ำหนักเซลล์เป็น 10.48, 11.09 และ 10.90 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตแอสต้าแซนทีนเป็น 520, 980 , 1,018 และ 910 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ .

2. เมื่อนำเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการทำแห้งเป็นผงนำมาสกัดโดยใช้เครื่อง Supercritical Fluid Extraction โดย ใช้ความดันที่ 365 bar อัตราการไหลของ CO_2 4 cm/min ประมาณ 20 นาที เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารสีแอสต้าแซนทีน และนำสารดังกล่าวไปทดลองต่อไปในด้านเครื่องสำอาง

3. ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด พบว่า มีปริมารกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตทั้งหมด ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อได้

4. ปริมาณสารสารสีแอสต้าแซนทีน เป็นสารสีที่มีการสกัดจากขั้วสูงมาก และเมื่อนำมาคำนวณสาร BHA ได้มากเช่นเดียวกัน แต่อาจจะต้องหาวิธีการที่เหมาะสมเนื่องจากสาร BHA ละลายในเมทานอล สารสีแอสต้าแซนทีนมีความเป็นขั้วสูงจะละลายได้ในเมทานอลน้อย แต่อาจจะละลายในเอทานอลได้สารที่ได้ 881.09 Ug/ml สารตัวอย่างมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ

881.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อ10มิลลิลิตร หากเพิ่มความเข้มข้นในการทดลองDPPHฤทธิ์การต้าน
อนุมูลอิสระ หรือ ค่า IC_{50} จะมากขึ้นด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำวัตถุในท้องถิ่นเช่น น้ำตาลจาก น้ำตาลมะพร้าว มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายในชุมชน
2. ในการทดลองเรื่องการเลี้ยงในถังหมักควรทำการออกแบบถังหมักเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

ชุตินุช สุจริต. 2542. การเลี้ยงยีสต์ในน้ำนึ่งปลาทูน่าหลังการแยกโปรตีนและไขมัน. ในรายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 16. ณ โรงแรมโซฟิเทล ราชาออคิด จังหวัดขอนแก่น.

ชุตินุช สุจริต, ไวกูณฐ์ ฤทธิรุฒม์ และสุแพรวพันธ์ โลหะลักษณาเดช. ๒๕๕๕. การยับยั้งจุลินทรีย์ในปูดองเค็มโดยสารสกัดหยาบจากต้นยอป่า วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. ๖(๒) กรกฎาคม-ธันวาคม. ๒๕๕๕ : ๖๙-๗๗.

ชุตินุช สุจริต อุไรวรรณ วัฒนากุล วัฒนาวัฒนากุล และ สมรักษ์ รอดเจริญ. 2557. การลดปริมาณสารอินทรีย์โดยใช้ตัวกระทำทางชีวภาพในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียววารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร (ฉบับพิเศษ) เมษายน. : 151-157.

ชุตินุช สุจริต และ ไวกูณฐ์ ฤทธิรุฒม์. 2557. การปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์กุ้งส้มจากกุ้งทะเลโดยวิธีการหมักแบบใช้เชื้อบริสุทธิ์. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. กรกฎาคม-ธันวาคม. 8(2) : 51-58.

บานชื่น ชลสวัสดิ์. 2532. การใช้สาหร่ายเกลียวทองสดเป็นส่วนประกอของอาหารผสมสำหรับเลี้ยงปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มะลิ บุณยรัตผลิน, จารุรัตน์ วรรณโกวัฒน์, ชูศักดิ์ บริสุทธิ์ และ สุจินต์ บุญช่วย. 2537. ผลของแอสต้าแซนทีนที่ระดับต่าง ๆ ต่อสีของกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 18. สถาบันวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง , สงขลา. 11 น.

วุฒิพร พรหมขุนทอง . 2527. ผลของรงค์วัตถุคาโรทินยอด์ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนสีของปลาแฟนซีคาร์พ, *Cyprinus carpio* Linn. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันวิสา เจริญวัฒน์ และ สุรพงษ์ ลูกหนุมารเจ้า. 2556. การศึกษาประสิทธิผลของครีมแอสตาแซนทีนเมื่อเปรียบเทียบกับครีมเบสมาตรฐานเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นและลดเลือนริ้วรอย www.mfu.ac.th/school/anti-aging/File_PDF/research56/Proceeding56_17.pdf

สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา. 2542. ตาลโตนดสงขลา. : สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา.

อโณทัย คมเศวต.2519. การศึกษาการเจริญของยีสต์อาหารสัตว์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

AOAC. 2000. Official Methnods of Analysis. 14 th ed., Association of Official Analysis Chemists, Washington, D.C. 1018 p.

Baker, R. and C. Gunther. 2004. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. Trends in Food Science & technology. 15: 464-480.

Borowitzka, M.A. 1989. Fats, oils and hydrocarbons, pp 27-58. *In* Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka, eds. Micro-algal Biotechnology. Cambridge university Press. Cambridge.

Britton, G. (1976). General carotenoid methods. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. 3, 49.

Calo. P., T. de Miguel, C Sieiro. J.B. Velazquenz and T.G. Villa. 1995. Ketocarotenoids in halobacteria : 3-hydroxy-echinenoune and trans-astaxanthin. J of App. Bac. 79 : 282-285.

Chutinut Sujarit, Chairat Siripatana and Waigoon Rittirut**.** 2012. PRODUCTION OF ASTAXANTHINFROM FLOUR BY *Phaffia rhodozyma* TISTR 5730**.** The 1st Mae Fah Luang University International Conference 2012, "Future Challenges Towards ASEAN Integration" Mae Luang University , Chiang Rai, Thailand, 29 November- 1 December, 2012, pp .1-8.

D' Abramo, L.R., N.A. Baum, C.E. Bordner and D.E. Conklin. 1983. Carotenoid as a source Of pigmentation in juvenile lobsters fed a purified diet. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40: 699-704.

Droop, M.R. 1955. Carotenoigesesis in *Haematococcus pluvialis*. Nature. 195:42.

Dominquz – Bocanegra, A.R.and Torres.-Munoz, J.A. 2004. Astaxanthin hyper production by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. Applied Microbiology and Biotechnology. 66, 249-252.

Doungporn Amornledpion. 2008. Potential of brown marine algae, patina minor Yamaha, as nutraceutical and cosmeceutical doctor of philosophy in biotechnology. The graduate school Chiang Mai University.

Ellis, A.E. 1988. Ontogeny of the immune system in teleost fish, pp. 20-31. In A.E. Eillis (ed.). Fish Vaccination. Academic Press, London.

Fang. T. J., and Cheng, Y., S. 1993. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodoayma* through mutation and Optimization of culture conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering. 75 : 466-469.

Flores-Cotera, J .B., Martin, R. and Sachez.S. (2001). Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence o f varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium . Applied Microbial Biotechnology. 55: 541-347.

Gill-Hwan, A., D.B. Schuman and E.A. Johnson, 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutantswith increased astaxanthin content. Applied and Environmental Microbiology.55: 116-124.

Jian-Ping Y., Xiian, D. I. And Feng, C. 1997. Separation and analysis of carotenoids and chlorophylls in *Hamatococcus lacustris* by high-performance liquid chromatography photodiode array detection. Journal of Agricultral and food Chemistry. 45, 1952-1956.

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

Johnson, E.A., T.G. Villa and M.J. Lewis. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source salmonid diets. Aquaculture. 20: 123-134.

Jyonocuchi, H., Sun, S., lijima, K., and Gross, M.D. 2000. Antitmor activity of astaxanthin and its mode of action. Nutrtion and Cancer., 36: 59-65.

Marz, U. 2008. The global market for carotenoids. Retrieved March 8, 2009, from http:// www.bccresearch.com/report/FODO25B. html.

Naguib. Y.M.A. 2000. Anntioxidant activites of astaxanthin and related carotenoids .J. Agric Food Chem., 48: 1150-1154.

Nishida .Y., Yamashita.E., and Miki.W. 2007. Quenching activities of common hydrophillic and lipophillic antioxidants against single oxygen using chemiluminescence detection system. Carotenoid Science. 11: 16-20.

Noonai.A. 1981. Single cell Protein Production from spent sulfiteliquor. M.S. Thesis. Mahidol University.

Sigurgisladottir, S., C.C. Parrish., D.P. Lall and P.G. Ackman. 1994. Effects of feeding natural tocopherol and astaxantin on Atlantic Salmon (salmo-solar) fillet quality. Food-Research-Internation. 27: 23-32.

Sujrit.C, . 2009. Optimization and Modeling of Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozymat* TISTR 5730. Thesis Program in Biotechnology ,Walailak University

Terao. J. 1989. Antioxidant activity of β-caotene-related carotenoids in solution. Lipid. 24: 659-661.

Takaichi. S, Matsui, K., Nakamura. M., Muramatsu.M., Hanada. S. 2003. Fatty acid of astaxanthin esters in krill determined by mild mass spectrometry. Comparative Biochemistry ans Physiology Part B. 136 : 317-322.

Torrissen. O.J. 1986. Pigmentation of salmonids : Interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. Aquaculture. 79:363-374.

Welsh, F. W and Zall, R. R. 1984. Single cell protein from waste fishery refrigeration brines. Process Biochem. 19: 122-123.

Yamashita E. 2006. The effects of a dietary supplement containing Astaxanthin on skin condition. Carotenoid Science, 2006; 10:91-95.

Zagalsky, P.F. 1982. A study of the yellow astaxanthin-protein of lobster xarapace. Comp. Biochem. Physiol. 71B : 243.

Zagalsky, P.F. and R. Jones. 1982. Quaternary structures of the astaxanthin proteins of *Velella velella* and of α-cruatacyania of lobster carapace, as revealed in electron microscopy. Comp. Biochem. Physiol. 71B: 237.

Zheng,Y.G., Hu, Z. C., Wang, Z. and Shen, Y.C. 2006. Large-scale production of Astaxanthin by Xanthophyllomyces dendrerhous. Food and Byproducts. Processing. 84(C2), 164-166.