การคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตแคโรทีนอยด์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตระดับขวดเขย่า

Screening of Carotenoid Producing Marine Bacteria and Optimization of Production in Shake-Flask Culture

ธีรศักดิ์ อนันตพงศ์

Theerasak Anantapong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University
2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตแคโรทีนอยด์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตระดับขวดเขย่า
ผู้เขียน นายธีรศักดิ์ อนันตพงศ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....
(ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ
(ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

....กรรมการ
(ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

....กรรมการ
(ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตแคโรทีนอยด์ และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตระดับขวดเขย่า
ผู้เขียน	นายธีรศักดิ์ อนันตพงศ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

แคโรทีนอยด์มีความสำคัญในการเป็นสารเสริมอาหาร, เครื่องสำอาง, เวชภัณฑ์ และอาหารสัตว์ โดยทั่วไปสามารถผลิตได้จากพืช, แบคทีเรียจากทะเล, จุลสาหร่าย และการสังเคราะห์ทางเคมี การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตแคโรทีนอยด์ที่แยกได้จากทะเลจำนวน 37 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากความสามารถในการผลิตรงควัตถุที่มีสี แดง, ส้ม และเหลือง และนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เพื่อคัดเลือกเชื้อให้เหลือ1สายพันธุ์โดยอาศัยโฟโตไดโอดแอเรย์ดีเทคเตอร์ เอชพีแอลซี ในการตรวจวิเคราะห์ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 ที่แยกได้จากตะกอนดินในทะเลสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด และมีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อแบคทีเรียจากทะเลสายพันธุ์ CNA058 ดังนี้ คือ พีเอชเริ่มต้นที่ 7, อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขยา 250 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้เท่ากับ 6.9 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากทะเลสายพันธุ์ CNA058 ในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน เชื้อสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณ 20.94 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญ, ปริมาณสารสีทั้งหมดและแคโรทีนอยด์ในการเจริญของเซลล์ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน คือ ยีสต์สกัด, น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุดคือ 47.51 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

Thesis Title	Screening of carotenoid producing marine bacteria and optimization of production in shake-flask culture
Author	Mr. Theerasak Anantapong
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2007

Abstract

Carotenoid pigments have many important applications in the nutraceutical, cosmetics, pharmaceutical and feed industries, which can be produced by plants, marine bacteria, microalgae and chemical synthesis. This study aimed to screen marine bacteria isolated from sediment, sponge, algae, biofilm, coral and shell for carotenoid production and to optimize culture conditions for the production of carotenoid by selected strain. After the isolation, the total of 37 different marine bacterial strains were selected according to yellow and red pigments production. Selected strains were then analyzed for carotenoid content using DAD high-performance liquid chromatography (DAD-HPLC) method. Marine bacterium strain CNA058, isolated from sediment obtained from Songkhla lake, was selected because of its highest carotenoid content. The optimal pH, temperature and agitation rate for the growth and carotenoid production of strain CNA058 were 7.0, 25^{o}C and 250 rpm, respectively and the yield of carotenoid was 6.9 mg/g wet cell. However, when CNA058 was cultivated in different carbon sources the carotenoid content varied dramatically. The highest carotenoid content of 20.94 mg/g wet cell was obtained when glucose was used as a carbon source at the concentration of 5 g/l medium. The carotenoid contents also varied when CNA058 was cultivated in different nitrogen sources i.e. yeast extract, tuna condensate and surimi washing water. The highest carotenoid content (47.51 mg/g wet cell) was obtained when yeast extract was used as nitrogen source at the concentration of 20 g/l.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้รวมไปถึงแนวทางในการดำเนินชีวิตและโอกาสดีๆที่อาจารย์มอบให้ในการเรียนตลอดมา ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ ที่ให้คำแนะนำต่างๆในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ กรรมการผู้แทนจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร และขอขอบพระคุณ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัท สงขลาแคนนิ่ง มหาชน จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำนึ่งปลาทูน่า และ บริษัทแปซิฟิคแปรรูปสัตว์น้ำสงขลา จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำล้างซูริมิ เพื่อนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยส่วนหนึ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้กำลังใจและโอกาสในการศึกษามาโดยตลอด รวมถึงเพื่อนๆพี่ๆน้องๆและเจ้าหน้าที่ ในคณะอุตสาหกรรมเกษตรและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนทุกๆท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ด้วยดี

ธีรศักดิ์ อนันตพงศ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (3)

Abstract (4)

กิตติกรรมประกาศ (5)

สารบัญ (6)

รายการตาราง (7)

รายการภาพ (9)

บทที่

1. บทนำ 1
    - บทนำต้นเรื่อง 1
    - บทตรวจเอกสาร 3
    - วัตถุประสงค์ 31
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ 32
    - วัสดุ อุปกรณ์ 32
    - วิธีการทดลอง 34
    - วิธีการวิเคราะห์ 35
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 39
    - ผลการทดลอง 39
4. สรุปผลการทดลอง 64

เอกสารอ้างอิง 65

ภาคผนวก 72
- ภาคผนวก ก 73
- ภาคผนวก ข 74
- ภาคผนวก ค 77

ประวัติผู้เขียน 91

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แหล่งของแคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์ 6
2. โครงสร้างและการเรียกชื่อแคโรทีนอยด์ 7
3. จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งสารสี 17
4. สรุปการผลิตแคโรทีนอยด์โดยกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์ 19
5. การแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแคโรทีนอยด์โดยวิธีการทางโครมาโทกราฟี 20
6. การใช้ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ 25
7. แหล่งของแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติ 28
8. โครงสร้างหลักของแคโรทีนอยด์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ 28
9. ปริมาณรูปแบบและระดับของแคโรทีนอยด์ที่มีความสำคัญกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจากแหล่งต่างๆ 29
10. เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลสำหรับการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตแคโรทีนอยด์ 39
11. เชื้อแบคทีเรียจากทะเล 37 สายพันธุ์ 42
12. การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อที่แยกได้จากทะเล 77
13. การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA001, 058 074 และ 112 79
14. การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ที่ความเร็วรอบ150, 200 และ 250 รอบต่อนาที 79
15. การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส 80
16. การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058ที่ pH 6, 7 และ 8 80
17. การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร 81
18. การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร 81
19. การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058โดยใช้แป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร 82
20. การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058โดยใช้น้ำยางเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร 82

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

21. การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 โดยใช้ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้น 1, 5, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร 83
22. การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 โดยใช้น้ำล้างซูริมิเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 15 กรัมต่อลิตร 84
23. การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 โดยใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1, 5 และ15 กรัมต่อลิตร 85

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

1. โครงสร้างของ lycopene (a), β,β-carotene (b), β,ε-carotene (c), zeaxanthin (d), lutein (e) 3

2. โครงสร้างของ crocetin (a), bixin (b) และ ε,ε-carotene (c) 4

3. ขั้นตอนสำคัญของชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ โดยทั่วๆไป 9

4. ชีวสังเคราะห์ของไอโซพรีนอยด์ 12

5. กระบวนการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์โดยสรุป 13

6. หน้าที่ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ 14

7. แผนผังการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ 18

8. แสดงแผนภูมิการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแคโรทีนอยด์จากแหล่งธรรมชาติ 24

9. โครงสร้างของ astaxanthin (3,3’-dihydroxy-carotene-4,4’-dione) (a), astaxanthin 3R,3’S (b), astaxanthin 3R,3’R (c) 27

10. ร้อยละของชนิดตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์ 41

11. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA001 44

12. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 44

13. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA074 45

14. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA112 45

15. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA001ที่ความยาวคลื่น A) 210 นาโนเมตร, B) 474 นาโนเมตร 47

16. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA001 47

17. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 ที่ความยาวคลื่น A) 210 นาโนเมตร, B) 474 นาโนเมตร 48

18. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 48

19. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA074 ที่ความยาวคลื่น A) 210 นาโนเมตร, B) 474 นาโนเมตร 49

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

20. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA074 49
21. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA112 50
22. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA112 50
23. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ 51
24. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ 51
25. ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058ในอาหาร FP Medium 52
26. เซลล์เปียกของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อหลังจากการปั่นเหวี่ยง 53
27. สารสกัดแคโรทีนอยด์ ในตัวทำละลายผสมระหว่าง methanol : acetone (2:1) 53
28. สารสกัดแคโรทีนอยด์ใน methanol 53
29. สารสกัดแคโรทีนอยด์ในรูปแห้งจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 54
30. ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 54
31. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 55
32. ผลของ pH ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 56
33. ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 58
34. ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 58
35. ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีแป้งสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 59

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

36. ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำยางที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 59
37. ผลของแหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ 60
38. ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มียีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 61
39. ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำล้างซูริมิที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 62
40. ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 62
41. ผลของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ 63
42. กราฟมาตรฐานการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth สภาวะที่มืด 74
43. กราฟมาตรฐานการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ในอาหารสูตร FP สภาวะที่มืด 75
44. กราฟมาตรฐานการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ในอาหาร nutrient broth สภาวะที่สว่าง 75
45. กราฟมาตรฐานการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ในอาหารสูตร FP สภาวะที่สว่าง 76
46. กราฟมาตรฐานของแคโรทีนอยด์ 76
47. อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 27F 86
48. อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 339F 87
49. อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 785F 88
50. อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 1099F 89
51. แสดงลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 90

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำมีพื้นที่การเลี้ยงไม่ต่ำกว่า 500,000 ไร่ในประเทศไทย ผลผลิตที่ได้ส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นมูลค่านับหลายหมื่นล้านบาทต่อปีและนอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำหรือกุ้งทะเลชนิดอื่นๆอีกหลายอุตสาหกรรมด้วยกันเช่น การแปรรูปสัตว์น้ำ อาหารสัตว์ และยารักษาโรค เป็นต้น ซึ่งนับว่าอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งนั้นก่อให้เกิดการจ้างงานและนำรายได้เข้าสู่ประเทศไม่น้อยกว่าอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่สำคัญของประเทศ

อย่างไรก็ดีการเพาะเลี้ยงกุ้งในระดับอุตสาหกรรมนั้นก็มีปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญอยู่หลายประการ จากรายงานของ Fast และ Menasaveta (2000) พบว่าโรคระบาดในกุ้งเลี้ยง ปัญหาด้านคุณภาพในบ่อเลี้ยง และลักษณะทางคุณภาพของกุ้งที่ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคนั้นเป็นปัญหาหลักที่สำคัญ แนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าวย่อมต้องอาศัยการทำวิจัยเพื่อศึกษาถึงสาเหตุและแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น สำหรับในประเทศไทยนั้นการวิจัยเกี่ยวกับสาเหตุและการเกิดโรคของกุ้งรวมทั้งแนวทางและวิธีการป้องกัน การรักษาโรคได้รับความสนใจจากนักวิจัยค่อนข้างมาก (Rengpipat *et al*, 1998a) ในขณะที่งานวิจัยเพื่อปรับปรุงคุณภาพของกุ้งที่ได้จากการเลี้ยงเช่น ขนาดและน้ำหนักของตัวกุ้ง ตลอดไปจนถึงสีของตัวกุ้งซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในการกำหนดราคาของกุ้งและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากกุ้งนั้นมีอยู่น้อยมาก (Chien and Jeng, 1992; No and Storebakken, 1992; มะลิ บุณยรัตนผลิน และคณะ, 2543) สารที่ช่วยเร่งหรือปรับปรุงคุณภาพสีในตัวกุ้งที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่อยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ยังต้องอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศอีกทั้งยังมีราคาแพงเนื่องจากสารดังกล่าวต้องอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ถึงแม้ว่าผู้ผลิตบางรายอาศัยกรรมวิธีการผลิตแคโรทีนอยด์โดยการสกัดจากวัตถุดิบธรรมชาติเช่น มะเขือเทศ แครอท หรือดอกดาวเรือง แต่ก็มีปัญหาเรื่องผลผลิตที่ได้มีปริมาณที่ต่ำทำให้ไม่มีความคุ้มทุนในการที่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งหรือผู้ผลิตอาหารกุ้งจะใช้สารดังกล่าวเพื่อเติมลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความต้องการของเกษตรกรและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำกับขนาดของตลาดที่จะรองรับสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีคุณสมบัติในการเร่งหรือเสริมสร้างสีที่เป็นที่ต้องการในตัวกุ้งโดยเฉพาะในกลุ่ม astaxanthin ซึ่งมีรายงานว่าพบ

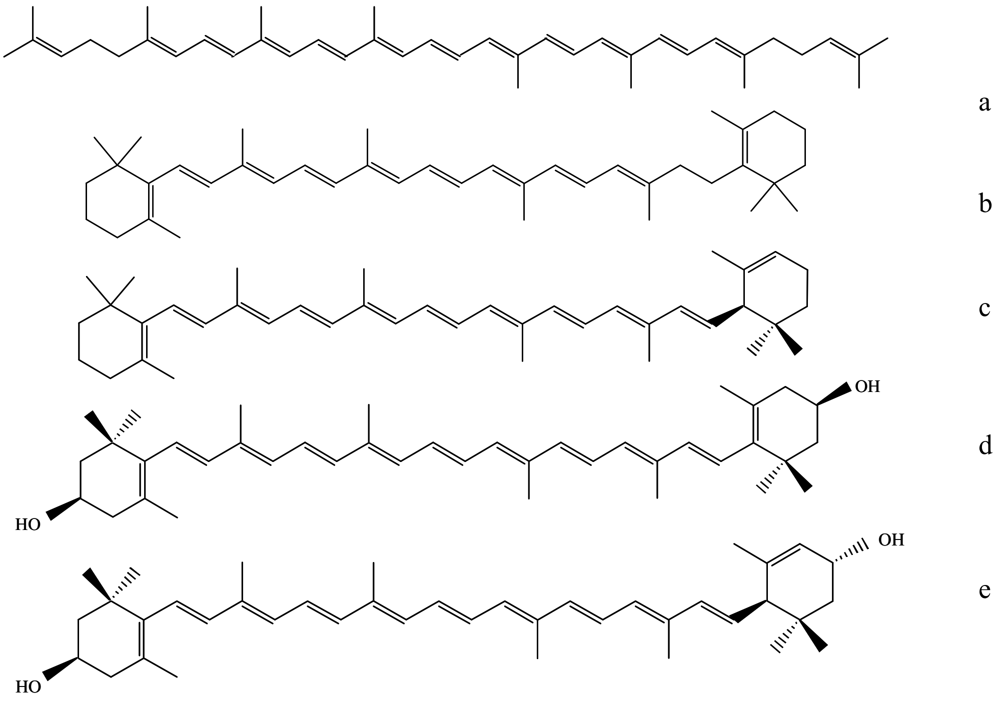
ในจุลินทรีย์ สัตว์และพืชทะเลหลายชนิด (Bjorland *et al.*,1989) ประกอบกับการสังเกตพบในการศึกษาวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ว่ามีแบคทีเรียจากทะเลหลายชนิดที่สามารถสร้างสารสีเหลือง ส้ม และแดงได้ดี จึงน่าจะมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้และศักยภาพของจุลินทรีย์จากทะเลเพื่อใช้เป็นแหล่งที่มาชนิดใหม่ของสารแคโรทีนอยด์สำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งและสัตว์น้ำประเภทอื่นๆ เช่น ปลาสวยงาม เป็นต้น

บทตรวจเอกสาร

แคโรทีนอยด์ (carotenoid)

แคโรทีนอยด์จัดเป็นรงควัตถุจากธรรมชาติที่เป็นที่รู้จักกันดีมากที่สุดชนิดหนึ่ง โดยมีการศึกษามาตั้งแต่ก่อนศตวรรษที่19 แต่อาจมีชื่อเรียกต่างกันไป เช่น repper หรือ parprika (1817), saffron (1818), annatto (1831),และ autumn leaves (1837) ตามแหล่งที่มา ในปีค.ศ. 1907 Willstatter ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์ ชนิดแรกที่สามารถหาสูตรโครงสร้างได้ คือ carotene ($C_{40}H_{56}$) และ xantophylls ($C_{40}H_{56}O_2$) ที่แยกได้จากใบไม้

ต่อมาในปี ค.ศ.1930 Karrer และคณะได้ศึกษาและรายงานเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ เช่น lycopene, β,β-carotene (β-carotene), β,ε-carotene (α-carotene), zeaxanthin, และ lutein (xanthophyll) ดังแสดงในภาพที่ 1

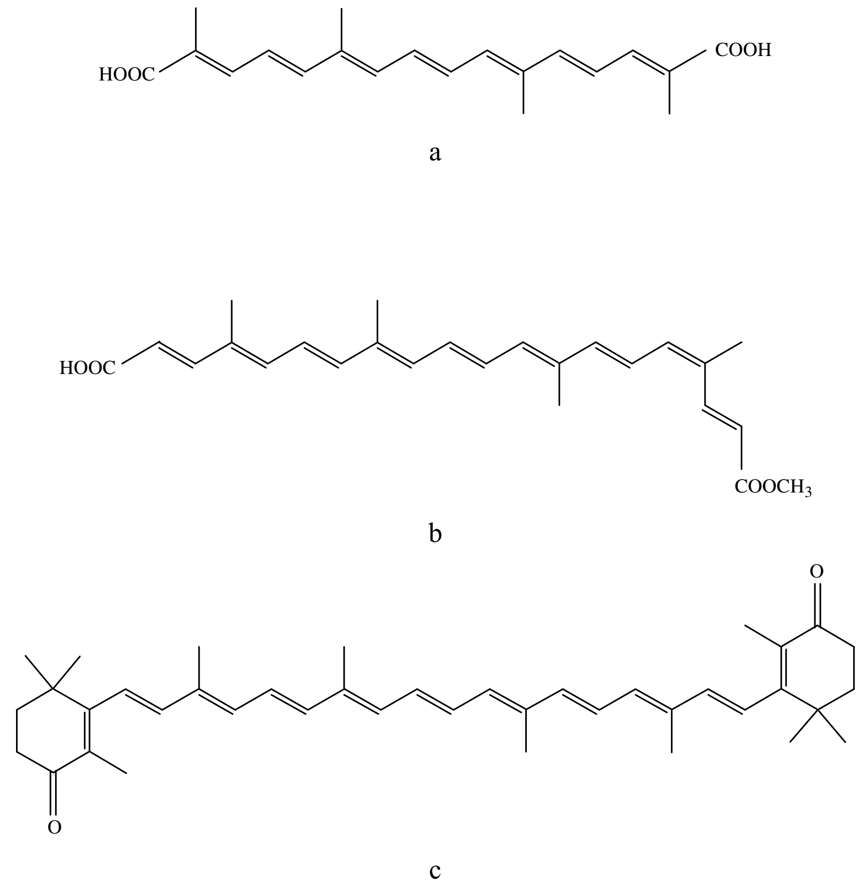


ภาพที่ 1 โครงสร้างของ lycopene (a), β,β-carotene (b), β,ε-carotene (c), zeaxanthin (d), lutein (e)

Figure1. Structures of lycopene (a), β,β-carotene (b), β,ε-carotene (c), zeaxanthin (d), lutein (e).

ที่มา : Eugster (1969)

และในปีเดียวกันได้มีรายงานเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์เพิ่มเติมอีก 3 ชนิด คือ crocetin, bixin, ε,ε-carotene ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ crocetin (a), bixin (b) และ ε,ε-carotene (c)

Figure 2. Structures of crocetin (a), bixin (b) and ε,ε-carotene (c).

ที่มา : Eugster (1969)

หลังจากนั้นการศึกษาและรายงานเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วโดยในปี 1971 Isler ได้รายงานโครงสร้างของแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นมาถึง 230 ชนิด ต่อมาในปี 1987 จำนวนโครงสร้างพื้นฐานของแคโรทีนอยด์มีเพิ่มขึ้นประมาณ 450 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มี 130 ชนิดที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และในปี 1993 มีรายงานว่าแคโรทีนอยด์นั้นมีมากกว่า 600 โครงสร้าง และน่าจะเพิ่มมากขึ้นอีกต่อไปในอนาคต

แคโรทีนอยด์จัดเป็นสารในกลุ่ม tetraterpenoids ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในพืชและสิ่งมีชีวิตทั้งที่สามารถสังเคราะห์แสงได้และแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ตลอดไปถึงยีสต์

และเชื้อรา แคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐานที่เรียกว่า isoprene unit ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอมต่อกันเป็นสายคาร์บอนที่มีพันธะคู่และเดี่ยวสลับกันแต่ต่างกันที่ปลายสุดของสายคาร์บอน (Waldenstedt *et al.,*2003) และมีคุณสมบัติเป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง, ส้ม, แดงจนถึงสีม่วง อีกทั้งยังมี คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ, สารต้านมะเร็งและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ที่มีความสำคัญมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา, เครื่องสำอาง, เคมี, อาหารและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Li *et al.,* 2001) ถึงแม้ว่าแคโรทีนอยด์จะมีโครงสร้างที่ต่างกันมากกว่า 600 ชนิด แต่มีแคโรทีนอยด์จำนวนน้อยเท่านั้นที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ในขณะที่สัตว์เกือบทุกชนิดจะต้องได้รับสารแคโรทีนอยด์จากการบริโภค โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่สามารถสะสมแคโรทีนอยด์ในร่างกายได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่สัตว์ปีก เช่น นกและไก่มีความสามารถที่จะสะสมแคโรทีนอยด์ได้มากในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ผิวหนัง, ขนนก, เนื้อเยื่อไขมันและไข่แดง (Durrer *et al.,* 2004) ทำให้มีความจำเป็นที่สัตว์เหล่านี้ต้องได้รับแคโรทีนอยด์จากการบริโภคในปริมาณที่เหมาะสมจากแหล่งต่างๆ เช่น อาหาร, สารเสริมอาหาร

แหล่งที่มาของแคโรทีนอยด์

โดยทั่วไปแล้วมีรายงานว่าแคโรทีนอยด์นั้นสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ตัวอย่าง เช่น พืช ได้แก่ แครอท, มะเขือเทศ, ส้ม, บลูเบอรี่, เมล็ดองุ่น และดอกดาวเรือง สัตว์ ได้แก่ ปลาแซลมอน, ปลาเทราท์, กุ้ง และแพลงตอน จุลินทรีย์ อาทิเช่น ยีสต์ *Phaffia rhodozyma, Brevibacterium, Mycobacterium lacticola, Agrobacterium auratim*

จุลินทรีย์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์

ชนิดและประเภทของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้จะแสดงในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 จะแสดงโครงสร้างและการเรียกชื่อของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 1 แหล่งของแคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์

Table 1. Microbial sources of carotenoids.

Microorganism	Carotenoid
Carotene sources	
Fungi : *Blakeslea trispora*	Lycopene, β-carotene
Phycomyces blakesleeanus	β-carotene
Non-photosynthetic bacteria	
: *Streptomyces chrestomyceticus*, *subsp. rubescens*	Lycopene
Xanthophylls sources	
Green algae : *Spongiococcum excentricum*	Lutein
Chlorella pyrenoidosa	Lutein
Fungi : *Dacrymyces deliquescens*	Lutein
Non-photosynthetic bacteria :	
Flavobacterium sp.	
Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus	Unidentified xanthophylls
Mycobacterium phlei	Unidentified xanthophylls
Monocyclic ketocarotenoids sources	
Non-photosynthetic bacteria :	
Deinococcus radiophilus	Derivatives of 4-keto-γ-Carotene
Mycobacterium smegmatis	Derivatives of 4-keto-γ-carotene
Bicyclic ketocarotenoids sources	
Cyanobacteria : *Anabaena variabilis*	Cantaxanthin
Aphanizomenon flos-aquae	Cantaxanthin
Nostoc commune	Cantaxanthin
Green algae (N-deficiency)	

ที่มา : Nelis และ De Leenheer (1989)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1. (Cont.)

Microorganisms	Carotenoids
Dictococcus cinnabarinus	Cantaxanthin
Haematococcus pluvialis	Astaxanthin
Fungi /yeast : *Phaffia rhodozyma*	Astaxanthin
Non-photosynthetic bacteria :	
Brevibacterium KY-4313	Cantaxanthin
Rhodococcus maris/Mycobacterium brevicale 32-MCT	Cantaxanthin
Mycobacterium lacticola	Astaxanthin
Brevibacterium 103	Astaxanthin
Fungi /yeast : *Rhodotorula* sp., *Rhodospordium* sp.	Torulene, torularhodin
Non-photosynthetic bacteria :	
Methylotrophs	Miscellaneous
Photosynthetic bacteria : *Rhodobacter capsulatus*	Spheroidene, Spheroidenone

ที่มา : Nelis และ De Leenheer (1989)

ตารางที่ 2 โครงสร้างและการเรียกชื่อแคโรทีนอยด์

Table 2. Structures and nomenclature of carotenoids.

Trivial name	Semi-systematic name	Systematic name (IUPAC)
A. Carotenes		
Lycopene	Lycopene	ψ,ψ-Carotene
B. Hydroxy-xanthophylls		
Lutein	3,3’-Dihydroxy-α-carotene	(3R,3’R,6’R)-β-ε-Carotene-3,3’-diol
Zeaxanthin	3,3’-Dihydroxy-β-carotene	(3R,3’R)- β-β-Carotene-3,

ที่มา : Nelis และ De Leenheer (1989)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Table 2. (Cont.)

Trivial name	Semi-systematic name	Systematic name (IUPAC)
		3’-diol
C. Monocyclic ketocarotenoids		
D. Bicyclic ketocarotenoids	4-Keto-γ-carotene	β,ψ-Carotene-4-one
Canthaxanthin	4,4’-Diketo-β-carotene	β,β-Carotene-4,4’-dione
Astaxanthin	3,3’-Dihydroxy-4,4’-diketo-β-carotene	3,3’-Dihydroxy-β,β-carotene-4,4’dione (3S,3’S หรือ 3R,3’R)
Rhodoxanthin	3.3’-Diketoretrodehydro-β-carotene	4’,5’-Didehydro-4,5’-retro-β,β-carotene-3,3’-dione
Torulene	3’,4’-Dehydro-γ-carotene-β-carotene	3’,4’-Dehydro-β,ψ-carotene
Torularhodin	16’-Carboxyl-3’,4’-dehydro-γ-carotene	3’,4’-dehydro-β,ψ-carotene-16’-oic acid
Spheroidene	1-Methoxy-1,2,7’,8’-tetrahydro-3,4-dehydrolycopene	1-Methoxy-3,4-didehydro-1,2,7’,8’-tetrahydro-ψ,ψ-carotene
Spheroidenone	1-Methoxy-2-keto-1,2,7’,8’,-Tetrahydro-3,4-dehydrolycopene	1-Methoxy-3,4-didehydro-1,2,7’,8’-tetrahydro-ψ,ψ-carotene-2-one

ที่มา : Nelis และ De Leenheer (1989)

โดยทั่วไปแคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Ether carotenes ได้แก่แคโรทีนอยด์ซึ่งมีคาร์บอนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบเท่านั้น เช่น β-carotene และ lycopene

2. Xantophylls ได้แก่แคโรทีนอยด์ซึ่งมีคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น astaxanthin, cantaxanthin, lutein, zeaxanthin และ β-cryptoxanthin เป็นต้น

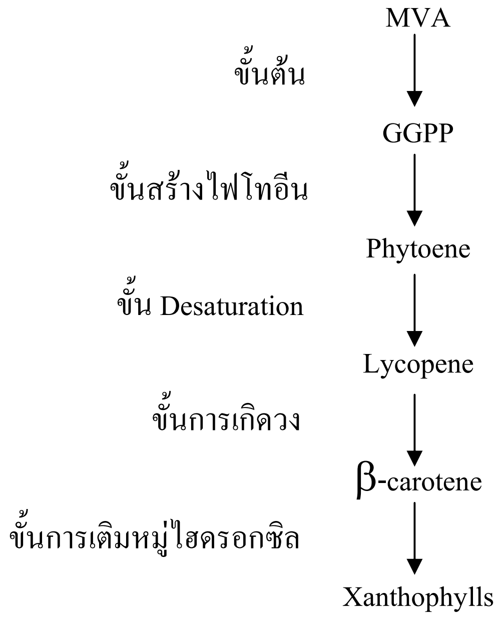
แคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของ C_{40} tetraterpenoids ซึ่งประกอบด้วยหน่วยไอโซปรีนจำนวน 8 หน่วย คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่ง

ของ conjugated double bonds ที่ทำหน้าที่เสมือนโครโมฟอร์ (chromophore) ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

แคโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอนน้อยหรือมากกว่า 40 คาร์บอนนั้นอาจอยู่ในรูปสายยาว (acyclic) เช่น lycopene หรือ วงกลม (cyclic) เช่น β-carotene และมีการจัดเรียงพันธะคู่แบบซีส หรือ ทรานส์ (cis-trans configuration) หรือเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (oxygenation) เช่นในกรณีของ xanthophylls เช่น lutein, zeaxanthin, cantaxanthin, cryptoxanthin, neoxanthin และ violaxanthin เป็นต้น

ชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์ (Carotenoids Biosynthesis)

โดยทั่วไปขั้นตอนสำคัญในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์โดยทั่วไป ดังแสดงในภาพที่ 3


MVA
ขั้นต้น
GGPP
ขั้นสร้างไฟโทอีน
Phytoene
ขั้น Desaturation
Lycopene
ขั้นการเกิดวง
β-carotene
ขั้นการเติมหมู่ไฮดรอกซิล
Xanthophylls

ภาพที่ 3 ขั้นตอนสำคัญของชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ โดยทั่วๆไป

Figure 3. Summary of carotenoid biosynthesis.

ที่มา : Cerda และ Olmedo (1985)

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์โดยจุลินทรีย์จะเกิดภายในเซลล์หรือเส้นใยเท่านั้น เช่นเดียวกับสารเทอร์ปีนอยด์ทั้งหลาย โดยเริ่มต้นแคโรทีนอยด์จะสังเคราะห์ขึ้นจากกรดมีวาโลนิก (mevalonic acid, MVA) ที่มีการรวมตัว (condensation) ของไอโซปรีนไอโซเมอร์ 2 ไอโซเมอร์ของไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต (isopentenylpyrophosphate, IPP) และไดเมทิลแอลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethy allyl pyrophosphate, DMAPP) เพื่อเกิดเป็นเจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranylpyrophosphate, GPP) ฟาร์เนซิลไพโรฟอสเฟต (farnesylpyrophosphate FPP) และ C_{20} เทอร์ปีนอยด์ เจอรานิลเจอรานิลไพโรฟอสเฟต (C_{20} terpenoid geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) ตามลำดับ หลังจากนั้นมีการรวมตัวด้านท้ายของ 2 โมเลกุลของ GGPP ก็จะเกิดเป็น prephytoenepyrophosphate (PPPP) และเปลี่ยนต่อไปเป็นไฟโทอีน (phytoene) หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยากำจัดไฮโดรเจน (dehydrogenation) 4 ขั้นตอน ก็จะได้ไลโคปีน

ไฟโทอีนในเชื้อราพบในรูปที่มีการจัดพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 15 เป็นแบบซีส (15-cis configuration) เมื่อผ่านขั้นตอนปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชันก็เปลี่ยนแบบทรานส์ (trans configuration) ของไฟโตฟลูอีน และได้ทรานส์แคโรทีนอยด์ (trans carotenoids) ปฏิกิริยาการเกิดวง (cyclization) ของแคโรทีนไม่อิ่มตัวและไม่เป็นวง (unsaturated acyclic carotenes) ทำให้ได้วงบีตา (β-ring) ความสัมพันธ์ชีวสังเคราะห์ระหว่างแคโรทีนอยด์ ที่มีการแปรเปลี่ยนรูปสารที่เกี่ยวข้องโดยปฏิกิริยาเคมีต่างๆดังลำดับต่อนี้

1. การเปลี่ยนรูปสารไฟโทอีน เป็นไลโคปีน โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนชัน 4 ขั้นตอน

2. การเปลี่ยนรูปไลโคปีน เป็นสารสเฟียรอยดีน (spheroidene) โดยมีการเติมโมเลกุลของน้ำที่พันธะคู่ (double bond) ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 2 ปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ปฏิกิริยาเมทิลเลชันของหมู่ OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1

3. การเปลี่ยนรูปจากสารสเฟียรอยดีน เป็นสารสเฟียรอยดีโนน (spheroidenone) โดยปฏิกิริยาการเติมหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2

4. การเปลี่ยนรูปจากสารไลโคปีน เป็นแกมมา-แคโรทีน โดยปฏิกิริยาการเกิดวงที่ปลาย 1 และ 2 ได้ที่มีปลายบีตาที่ตำแหน่ง 1 (1 β end group)

5. การเปลี่ยนรูปจากสารไลโคปีน เป็นบีตา-แคโรทีน โดยปฏิกิริยาการเกิดวง ได้สารที่มีปลายบีตาที่ตำแหน่ง 2 (2 β end group) เพิ่ม

6. การเปลี่ยนรูปจากสารไลโคปีน เป็น แอลฟา-แคโรทีน โดยปฏิกิริยาการเกิดวง ได้สารที่มีปลายบีตาที่ตำแหน่ง 1 และปลายซีตา ที่ตำแหน่ง 1 (1β- และ 1 ε end group)

7. การเปลี่ยนรูปแกมมา-แคโรทีน เป็นสารโทรูลีน (torulene) โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3′ และ 4′

8. การเปลี่ยนรูปสารโทรูลีนเป็นสารโทรูลาโรดิน (torularhodin) โดยปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนที่ปลายโครงสร้าง

9. การเปลี่ยนรูปแกมมา-แคโรทีนเป็นสาร 4-คีโต-แกมมา-แคโรทีน (4-keto-γ-carotene) โดยปฏิกิริยาการเติมหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่ง 4 มีไฮดรอกซีเลชัน ตามด้วยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน

10. การเปลี่ยนสารบีตา-แคโรทีนเป็นสารซีแซนทิน โดยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่คาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 3′ โดยต้องการโมเลกุลของออกซิเจนด้วย ปฏิกิริยานี้พบในการที่แอลฟา-แคโรทีนกลายเป็นลูเทอีน

11. การเปลี่ยนรูปสารซีแซนทินเป็นสารโรโดแซนทิน (rhodoxanthin) โดยกลไกที่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่เข้าใจว่ามีการเติมหมู่ OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 การสูญเสีย H ที่มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 4′ การสูญเสียโมเลกุลน้ำและการดีไฮโดรจีเนชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 3′ ตามลำดับ

12. การเปลี่ยนรูปสารบีตา-แคโรทีนเป็นสารแคนทาแซนทินโดยการเติมหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 4′ มีปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน ตามด้วย ดีไฮโดรจีเนชัน

13. การเปลี่ยนรูปสารบีตา-แคโรทีนเป็นสารแอสทาแซนทิน (astaxanthin) โดยปฏิกิริยาของข้อ 10 และข้อ 11

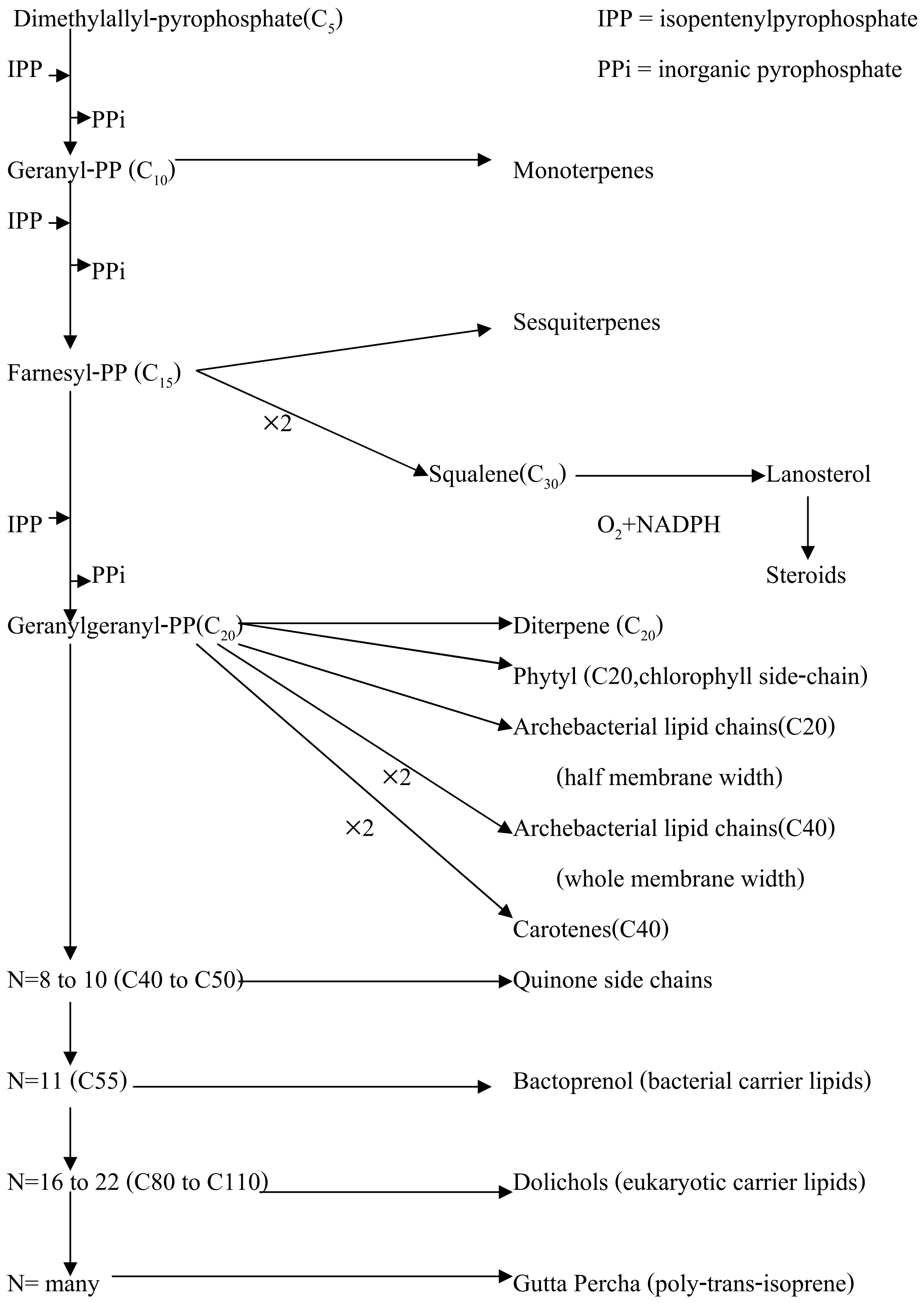
นิวโรสปอรีน (neurosporene) ให้ทั้ง acyclic lycopene และ cyclic β-zeacarotene ซึ่งสารทั้ง 2 นี้ให้แกมมา-แคโรทีน (γ-carotene) ซึ่งพบในเชื้อราหลายชนิด (Bramley และ Mackenzie, 1988)

เมื่อเกิดปฏิกิริยาสร้างโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอีกขั้นก็เปลี่ยนเป็น (γ) เป็นบีตา-แคโรทีนเป็นขั้นตอนสุดท้ายมีผลให้เกิดแซนโทฟิลล์ ซึ่งได้แก่ สารซีแซนทิน แคนทาแซนทิน เป็นต้น

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาการดึงหมู่ไฮโดรเจน (dehydrogenation) และการเกิดวงแหวน (cyclization) นั้นมีการศึกษาน้อยมาก

แคโรทีนพบเป็นพิเศษในสเฟียโรโซมหรือลิปิดบอดี้ (spherosome หรือ lipid bodies) แต่การสังเคราะห์เกิดในเอ็นโดพลาสมิกเร็กติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER) แคโรทีนจะสะสมในส่วนชั้นกลางที่ชอบไขมันของ ER เมื่อสเฟอโรโซมมีขนาดที่เหมาะสมก็จะแยกออกมาและเคลื่อนไปกับการไหลของไซโตพลาสซึม (Wanner *et al*., 1981)

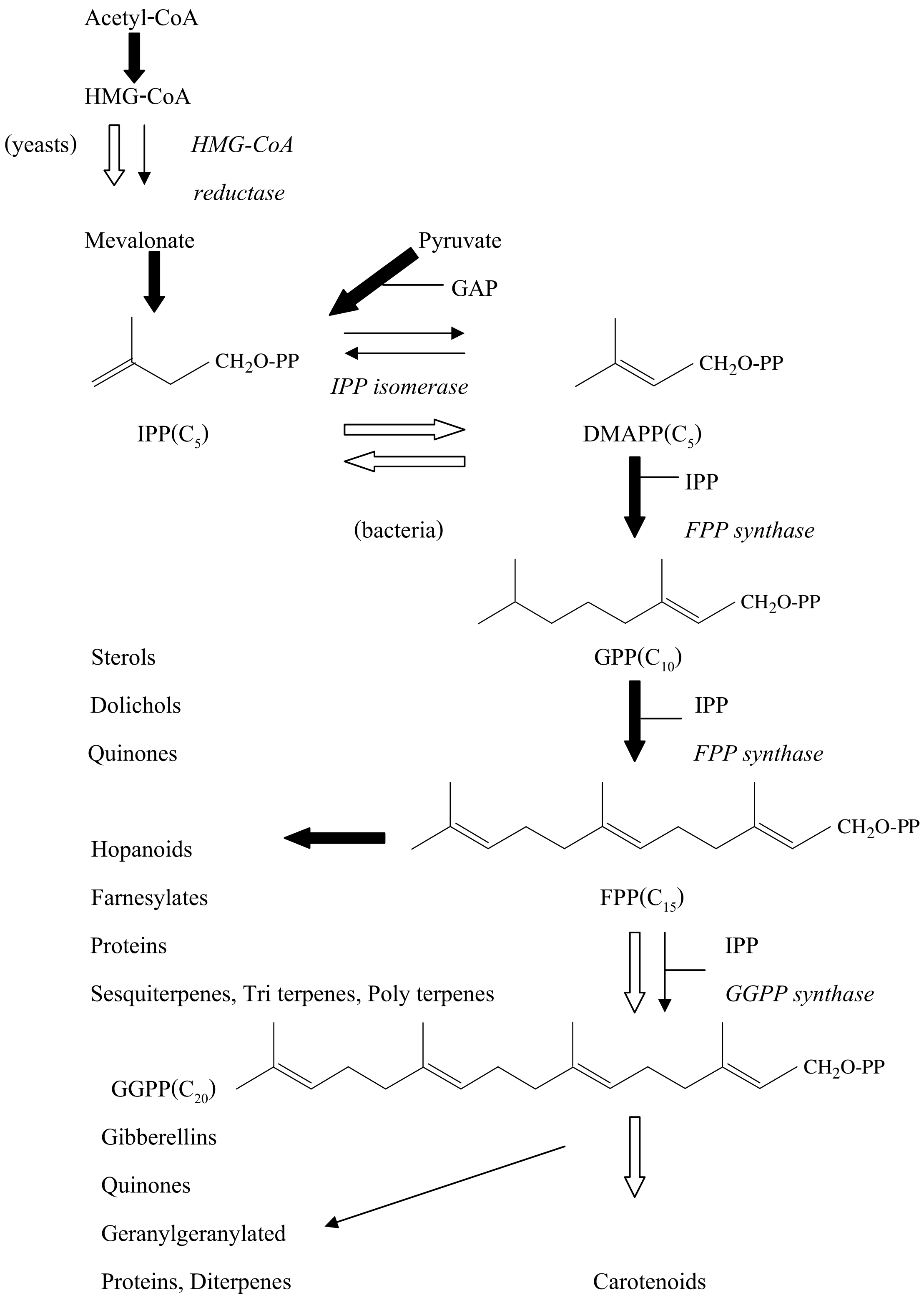
แผนภูมิแสดงชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์โดยละเอียดเริ่มจะแสดงในภาพที่ 4 และ 5 สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์ จะแสดงในภาพที่ 6


Dimethylallyl-pyrophosphate(C5)
IPP = isopentenylpyrophosphate
PPi = inorganic pyrophosphate
IPP
PPi
Geranyl-PP (C10)
Monoterpenes
IPP
PPi
Sesquiterpenes
Farnesyl-PP (C15)
×2
Squalene(C30)
Lanosterol
IPP
O2+NADPH
PPi
Steroids
Geranylgeranyl-PP(C20)
Diterpene (C20)
Phytyl (C20,chlorophyll side-chain)
Archebacterial lipid chains(C20)
(half membrane width)
×2
×2
Archebacterial lipid chains(C40)
(whole membrane width)
Carotenes(C40)
N=8 to 10 (C40 to C50)
Quinone side chains
N=11 (C55)
Bactoprenol (bacterial carrier lipids)
N=16 to 22 (C80 to C110)
Dolichols (eukaryotic carrier lipids)
N= many
Gutta Percha (poly-trans-isoprene)

ภาพที่ 4 ชีวสังเคราะห์ของไอโซพรีนอยด์

Figure 4. Isopreniods biosynthesis.

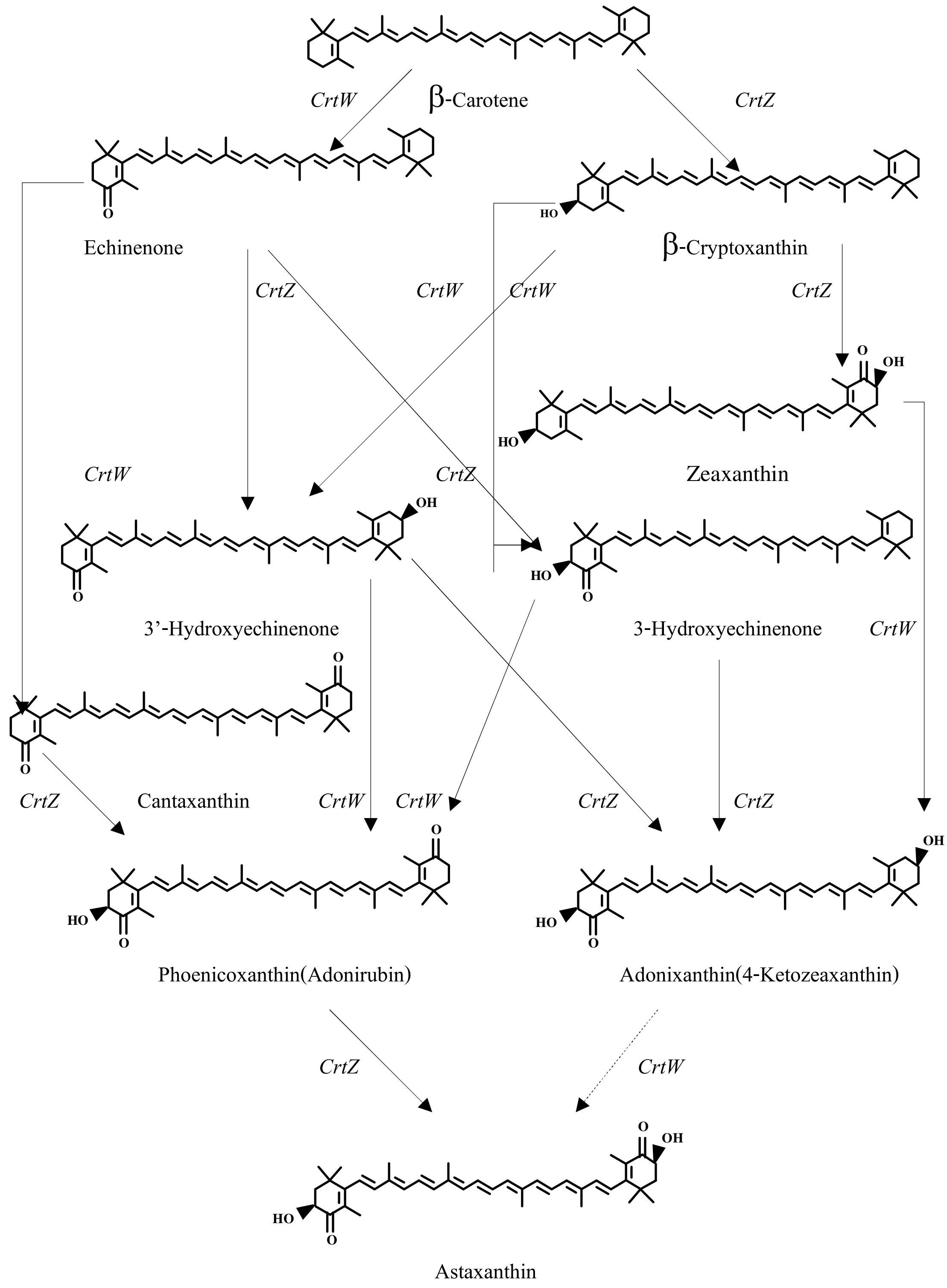
ที่มา : Visser และคณะ (2003)


Acetyl-CoA
HMG-CoA
(yeasts)
HMG-CoA reductase
Mevalonate
Pyruvate
GAP
CH2O-PP
IPP isomerase
CH2O-PP
IPP(C5)
DMAPP(C5)
(bacteria)
IPP
FPP synthase
CH2O-PP
Sterols
Dolichols
Quinones
GPP(C10)
IPP
FPP synthase
CH2O-PP
Hopanoids
Farnesylates
Proteins
Sesquiterpenes, Tri terpenes, Poly terpenes
FPP(C15)
IPP
GGPP synthase
GGPP(C20)
CH2O-PP
Gibberellins
Quinones
Geranylgeranylated
Proteins, Diterpenes
Carotenoids

ภาพที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์โดยสรุป

Figure 5. Summary of isoprenoid biosynthesis.

ที่มา : Misawa และ Shimada (1998)


β-Carotene
CrtW
CrtZ
Echinenone
β-Cryptoxanthin
CrtZ
CrtW
CrtW
CrtZ
Zeaxanthin
CrtW
CrtZ
3’-Hydroxyechinenone
3-Hydroxyechinenone
CrtW
Cantaxanthin
CrtZ
CrtW
CrtW
CrtZ
CrtZ
Phoenicoxanthin(Adonirubin)
Adonixanthin(4-Ketozeaxanthin)
CrtZ
CrtW
Astaxanthin
HO
OH
O

ภาพที่ 6 หน้าที่ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

Figure 6. Functions of the carotenoid biosynthetic genes.

ที่มา : Misawa และ Shimada (1998)

นอกจากแคโรทีนอยด์จะสามารถสังเคราะห์ขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติแล้ว ในปี ค.ศ. 1956 บริษัท Hoffman-LaRoche ได้เริ่มต้นการสังเคราะห์สารบีตา-แคโรทีนโดยวิธีการทางเคมี ซึ่งได้มีการปรับปรุงกระบวนการให้ดีขึ้นจนกระทั่งในปัจจุบัน

หน้าที่ของแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์พบมากในพืช เชื้อรา และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง บทบาทโดยทั่วไปของแคโรทีนอยด์ คือ ป้องกันการถูกทำลายของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยแสง (lethal photo-oxidation) (Blum, 1941) โดยเฉพาะความเสียหายที่เกิดจากการแผ่รังสีของคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (visible light)

Griffiths และคณะ (1955) ได้รายงานผลการวิจัยของ Stanier ที่พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจำพวก non-sulfur bacteria เช่น *Rhodopseudomonas spheroids* เมื่อทำให้กลายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ไม่มีสารสีแคโรทีนอยด์แตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่ (blue-green mutant) ซึ่งจะสะสมเฉพาะสารไฟโทอีนที่ไม่มีสี ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ใช้ไฟโทอีนเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ซึ่งจะดึงหมู่ไฮโดรเจนออกไป ทำให้เกิดสีแคโรทีนอยด์ได้ เมื่อเลี้ยง *R. spheroides* ในสภาพมีอากาศและมีแสง พบว่าเชื้อเจริญได้ปกติ แต่เกิดการยับยั้งการสร้างสารสีทั้งแบคทีริโอคลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ ในขณะที่ตัวกลายพันธุ์สีเขียวแกมน้ำเงินมีการเจริญปกติในสภาพขาดอากาศแต่มีแสง หรือสภาพมีอากาศแต่ไม่มีแสง (มืด) แต่ถ้าเลี้ยงในสภาพมีอากาศและมีแสง พบว่าการเจริญลดลงทันที มีการตายเกิดขึ้นเป็นผลจากโฟโตไดนามิกแอกชั่น (photodynamic action) ซึ่งเป็นผลกระทบเนื่องจากแสงและอากาศร่วมกันทำให้สามารถยืนยันได้ว่าแคโรทีนอยด์ทำหน้าที่ในการป้องกันการทำลายของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยแสง

นอกจากนี้การทดลองของ Goldstrohm และ Lily (1965) ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่ต้องการแสงในการสร้างสี (photochromogenic fungus) เช่น *Dacryopinax spathularia* เมื่อเจริญในที่มืดจะไม่สร้างสี แต่เมื่อได้รับแสงแดด (2000-70,000 fe) นาน 2 ชั่วโมง เชื้อราเหล่านี้ตายไปกว่า 89 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่เลี้ยงในสภาพมีแสงและเกิดสีแต่แรกจะรอดชีวิตและเจริญได้ทั้งหมด

แคโรทีนอยด์จากแบคทีเรีย

แคโรทีนอยด์ในแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เกิดจากการสังเคราะห์โดยกระบวนการ chemoorganotropic และกลุ่มที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสง

(photosynthetic carotenogenesis) ทั้งนี้แคโรทีนอยด์ที่ได้จาก chemoorganotrophic bacteria พบทั้งแคโรทีนอยด์ที่มีองค์ประกอบเป็น C30, C40 และ C50

แคโรทีนอยด์ชนิด C30 (C30 carotenoids) หรือ ไดอะโปแคโรทีนอยด์ (diapocarotenoids) จะพบได้ในแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Staphylococcus aureus* (Suzue *et al.*, 1967) *Streptococcus faecium* (Ciegler, 1965) และ *Pseudomonas rhodos* (Andrews *et al.*, 1976) และกลุ่มแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมที่ชอบเกลือ (halococci) (Sutter, 1975) ในขณะที่มีรายงานว่าสามารถพบ C40 carotenoids ได้ใน *Sarcina litoratis, Cellulomonas dehydrogenans, Halobacterium cutirubrum, Brevibacterium* ที่สร้างแคนทาแซนทิน(canthaxanthin) (Ross, 1979) *Flavobacterium* สร้างซีแซนทิน (zeaxanthin) (Ben-Amotz and Avron, 1983) มักพบ C50 carotenoids ในรูปของสารแบคทีริโอรูบีริน (bacterioruberin) ที่พบในแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือและยังพบในรูปของสารดีคาปรีโนแซนทีน (decaprenoxanthin) ที่พบใน Corynebacteria อีกด้วย (Sutter, 1975)

สาร Glycosylated carotenoids หรือแคโรทีนอยด์ที่มีโมเลกุลน้ำตาลเป็นองค์ประกอบจะพบในแบคทีเรีย Order Myxobacteriales ซึ่งเป็นแบคทีเรียไกลดิงที่พบทั่วไปในดิน ลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็นทรงกระบอกสามารถรวมตัวเกิดเป็น fruiting bodies ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ สีของ myxospore fruiting bodies มีตั้งแต่สีเหลือง, ส้ม, แดง หรือ ม่วงเข้ม แคโรทีนอยด์ที่แยกจากแบคทีเรียไกลดิงมีมากกว่า 60 ชนิด ที่มีความยาวคาร์บอนปกติแต่มีโครงสร้างทั้งที่เป็นหรือไม่เป็นวงกลมและมีโมเลกุลน้ำตาลเช่น กลูโคส หรือแรมโนส จับที่หมู่ไฮดรอกซี่ เช่น มิคโซแบคทิน (Myxobactin) ที่พบใน *Myxococus fulvus* เป็นต้น (Fiasson *et al.,* 1970)

ในขณะที่แบคทีเรียไกลดิง (gliding bacteria) ที่ไม่สร้าง fruiting bodies แต่เซลล์ยังคงมีสี สีเหลือง หรือสีส้มในสกุล *Cytophaga Flexibacter* และ *Sporocytophaga* นั้นพบว่ารงควัตถุที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นสารโพลีอีน (polyene) ไม่ใช่แคโรทีนอยด์ (Fiasson *et al.,* 1970)

ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม Mycobacteria ที่ไม่ก่อให้เกิดวัณโรค จะพบสารแคโรทีนอยด์เป็นสีเหลืองและส้มทั้งที่ต้องอาศัยแสง (photochromogenic) หรือสร้างได้ในที่มืด (scotochromogenic) จึงมีการใช้คุณสมบัติการสร้างสีนี้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ โดย Ichiyama และคณะ (1988) พบว่า photochromogenic Mycobacteria สามารถสร้างบีต้า-แคโรทีนได้ ในขณะที่กลุ่ม scotochromogenic Mycobacteria สร้างแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) ทั้งในที่มืดและมีแสง แซนโทฟิลล์ที่พบเป็นสารซีแซนทิน (seaxanthin) และเอสโซแซนทิน (eschscholtxanthin) จากแบคทีเรีย *Mycobacterium phlei* และ *Micrococcus aureus* ตามลำดับและสามารถพบสารทั้งสองใน *Mycobacterium chubuense*

ส่วนแคโรทีนอยด์ที่พบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น purple bacteria ส่วนใหญ่จะสร้างแคโรทีนอยด์ที่มีหมู่เม็ธทอกซีที่คาร์บอนตำแหน่งที่หนึ่ง หรือในรูปของสารสปิริลโลแซนทิน (spirilloxanthin) หรือสเฟียรอยดีน (spheroidene) โดยที่ *Rhodopseudomonas spheroides* และ *R. capsulatus* สร้างสเฟียรอยดีโนน (spheroidenone) ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม purple non-sulphur bacteria เช่น *Rhodospirillum rubrum* และ *R. palustrus* รวมทั้งกลุ่ม photolithotrophic sulphur bacteria เช่น *Chromatium* spp. สร้างสารสปิริโลแซนทิน รายชื่อจุลินทรีย์พร้อมด้วยผลิตภัณฑ์สารสีสำคัญที่เชื้อเหล่านี้ผลิตได้นั้นแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งสารสี

Table 3. Microbial source of pigment.

Microoganism	Pigment	Reference
Bacteria		
Mycobacteria	carotenoid	Ichiyama *et al*., (1988)
Yeast		
Phaffia rhodozyma	carotenoid	Johnson and Lewis (1979)
Rhodotorula sp.	carotenoid	Goodwin (1972)
Algae		
Dunaliella salina	carotenoid, vitamin F	Borowitzka (1989)
Haematococcus pluvialis	astaxanthin	Lorenz (1998)
Spirulina maxima	carotenoid, Protein cell vitamin B12, pigment	Borowitzka (1988)
Fungi		
Amanita muscaria	betalain purple, Red, orange and yellow	Hendry and Houghton (1992)
Blakeslea trispora	carotenoid	Ninet and Renaut (1979)
Cantharellus cinnabarinus	canthaxanthin	Hendry and Houghton (1992)
Monascus purpureus	monascus	Palo *et al.,* (1960)
Phycomyces blakesleeanus	carotenoid	Ninet and Renaut (1979)

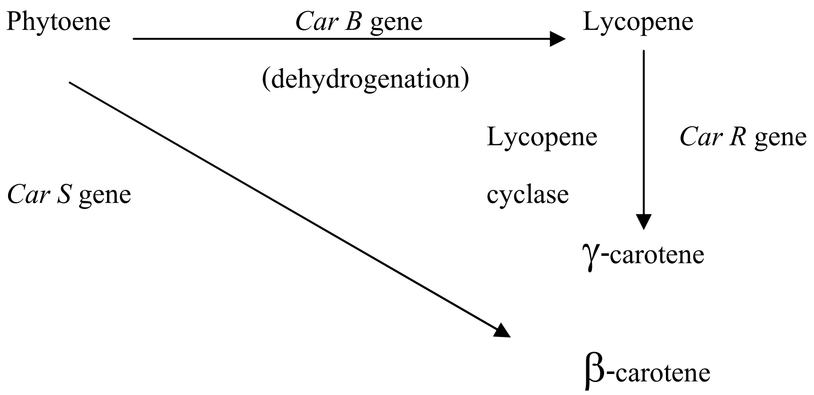
การควบคุมการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

กระบวนการชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์นั้นมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ ทั้งในด้านบวกและด้านลบ อาทิเช่น

1. การกระตุ้นโดยแสง มีรายงานว่าแสงสามารถกระตุ้นการสร้างแคโรทีนอยด์เมื่อเลี้ยงเชื้อรา Phycomyces ในสภาวะที่มีแสงโดยพบว่าปริมาณของสารบีตา-แคโรทีนเพิ่มเป็น10 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเดียวกันที่เลี้ยงในที่มืด (Bergman และคณะ, 1969) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Blum (1941) ที่เสนอแนะว่าแสงเป็นปัจจัยแรกในการควบคุมการสร้างแคโรทีนก่อนปัจจัยอื่นๆ เช่น การผสมพันธุ์ ฮอร์โมนกรดไทรสปอริก และสารอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต้น นอกจากนี้ Rau (1976) ได้ยืนยันถึงผลของการกระตุ้นการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยแสง โดยทดลองกับเชื้อราจำนวน 13 สายพันธุ์ พบว่ามีความจำเป็นต้องเติมสารบางชนิดเช่น p-hydroxy mercuribenzoate และ p-chloromercuribenzoate ในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Fusarium aquaeductum* และ *Cephalosporium diospyros* ที่เลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากแสงเพื่อทดแทนการให้แสงดังกล่าวจึงจะสร้างแคโรทีนอยด์ได้

2. บีตา-ไอโอโนน (β-ionone) และ กรดไทรสปอริก (trisporic acid) Ciegler (1965) รายงานว่าสารทั้งสองมีผลสนับสนุนการสร้างแคโรทีนอยด์โดยไม่มีส่วนที่จะเกิดเป็นส่วนใดส่วนหนึ่งของโครงสร้างแคโรทีนอยด์ซึ่งเป็นลักษณะ steering effect มิใช่สารเริ่มต้น (precursors)

3. การแสดงออกของยีน กลุ่มนักวิทยาศาสตร์สเปน (Cerda-Olmedo, 1985) ได้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แผนผังการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์

Figure 7. Diagram of gene involving with carotenoid biosynthesis.

ที่มา : Cerda และ Olmedo (1985)

จากความรู้เกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ดังกล่าวทำให้สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อทำให้เกิดการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้นเช่น ในกรณีของสายพันธุ์กลายของ *Car S* mutants ที่สามารถผลิตบีตา-แคโรทีนได้สูงถึง 6,000 ไมโครกรัมต่อกรัมของเซลล์แห้งในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่สามารถผลิตสารเดียวกันได้เพียง 2,000 ไมโครกรัมต่อกรัมของเซลล์แห้งเท่านั้น Ootaki (1973) ได้ใช้วิธีรวม (grafting) เส้นใยอ่อนของ *P. blakesleenus* สายพันธุ์กลายให้ได้ heterokaryons ที่ผลิตแคโรทีนได้สูงถึง 25,000 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และ Murillo-Aranjo และคณะ (1982)ได้จดสิทธิบัตรของการเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์โดยกระบวนการดังกล่าวเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ตารางที่ 4 สรุปการผลิตแคโรทีนอยด์โดยกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพจุลินทรีย์

Table 4. Summary of carotenoid production by microbiotechnolgy.

Microorganism	pigment	Commercial status	Application
Bacteria			
Brevibacterium ssp.	canthaxanthin		
Flavobacterium spp.	seazanthin		
Yeast			
Rhodotorula spp.	torularodein		Hue of yolk
Phaffia rhodozyma	astaxanthin		Feed additive for crab, shrimp, shellfish, chicken, fish and salmon
Fungi			
Phycomyces blakesleeanus	β-carotene		
Blakeslea trispora	β-carotene		
Algae			
Spongiococcum excentricum	lutein	Algae pond A-Zanth company, Iowa	

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Margalith (1992)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4. (Cont.)

Microorganism	pigment	Commercial status	Application
Dunaliella sp.	β-carotene	Algae N.T.B. Co. and Western Biotechnology	Health food

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Margalith (1992)

การสกัดและการแยกแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแคโรทีนอยด์โดยวิธีการทางโครมาโทกราฟี

Table 5. Separation and purification of carotenoids by chromatography.

Carotenoid	Source	Stationary phase	Mobile phase
i) 1. β,ε-Carotene 2. β,β-Carotene	Carrot Palm oil	MgO/Hyflo Supercel(1:1) (extrusion)	Petroleum
ii) Perdeuteraed 1. β,ε-Carotene 2. β,β-Carotene	Green algae (*Scenedesmus obliquus, Chlorella vulgaris*) Grown in D_2O	Powdered sugar+3%starch MgO/Celite (1:2)	Petroleum/ Propanol (99:5:0.5) Petroleum/ acetone
iii) 1. β,ε-Carotene 2. β,β-Carotene 3. 7,8,7’,8’-Tetrahydro-lycopene	tomato papaya kale squash	MgO/ Hyflo Supercel(1:1) (activated at 110^0C)	Petroleum/ acetone (1 to 15%)

ที่มา : Bernhard และ Friedrich (1995)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (Cont.)

Carotenoid	Source	Stationary phase	Mobile phase
4. β,Ψ- Carotene 5. Lycopene			
iv) 1. 15Z-Phytoene 2. 15Z,9’Z-Phytofluene 3. 9Z,9’Z-ξ- Carotene 4. 9Z,7’Z,9’Z-Neurosporene 5. 7Z,9Z,7’Z,9’Z-Lycopene (=prolycopene)	tangerine tomoto	MgO	Hexane/ acetone (Diacetone alcohol formed as artifact removed with H_2O)
v) Purification of commercially availableβ,β-Carotene	FLUKA	1.Alumina II-III 2.Alumina I	Hexane/ether (4^0C)
vi) 1. Lutein 2. Zeaxanthin	*Tagetes erecta* (petal extract)	1.Alumina III 2.MgO/Dicalite (2:1) 3.Alumina IV	Benzene/ Methanol Petroleum acetone Hexane ether
vii) 1.Zeaxanthin 2. Fucoxanthin	*Fucus serratus*	1.Acidic alumina IV 2.$CaCO_3$	Benzene/ 0 to 20% ethyl acetate Benzene/ 0 to 100% Acetone

ที่มา : Bernhard และ Friedrich (1995)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (Cont.)

Carotenoid	Source	Stationary phase	Mobile phase
viii) 1.Luteoxanthin 2.Auroxanthin 3.Fucoxanthin 4.Neoxanthin 5.Fucoxantinol	*Fucus serratus*	Silica	Hexane/ 0 to 100% acetone
ix) 3-Hydroxy-5,6-epoxy-5,6-dihydroapocarotenals	Partail synthesis	$CaCO_3$	Benzene/ Petroleum
x) 1.Lutein 2.3’-Epilutein	*Taraxacum officinale* lutein fraction	Mg CO_3	Petroleum/ acetone (17:3)
xi) 1.(3S,5R,6S)-8’-Apoviolaxanthinal 2.(3S,5S,6R)-8’-	Valencia Orange, citraurin	$CaCO_3$ (vacuum)	Benzene/ Petroleum (1:3)
xii) 1.(3R,3’R)-Astaxanthin di-(-)-camphanate 2.(3R,3’S)-Astaxanthin di-(-)-camphanate 3.(3S,3’S)-Astaxanthin di-(-)-camphanate	Synthesized astaxanthin (rac/meso 1:1)	Silica (0.040-0.063mm)	Toluene/ether/ isopropanol (89:9:2)
xiii) 1.13Z-β,β-Carotene 2.13Z,15Z-β,β-Carotene	Synthesized mixture	Neutral Alumina I	Hexane/ 0 to 4% ether
xiv) 1.15Z-Violaxanthin 2.13Z-Violaxanthin	*Viola tricolor*	$CaCO_3$ (vacuum)	Benzene/ 0 to 4% acetone
xv) 1.9Z- Violaxanthin 2.9Z,9’Z- Violaxanthin	*Viola tricolor*	$CaCO_3$ (vacuum)	Benzene/ Petroleum(4:1)

ที่มา : Bernhard และ Friedrich (1995)

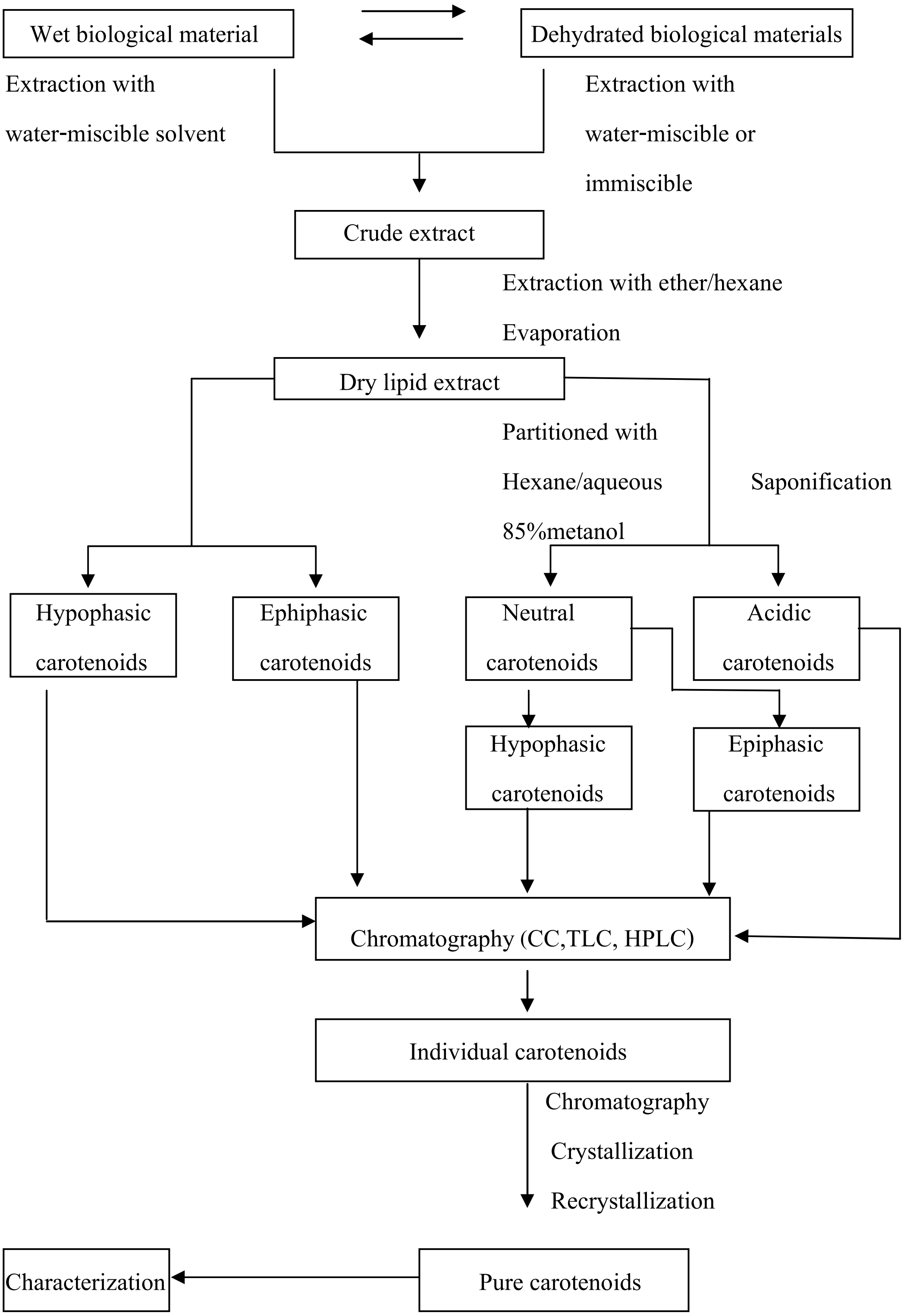
ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (Cont.)

Carotenoid	Source	Stationary phase	Mobile phase
3.9Z,13'Z- Violaxanthin 5.9Z,13Z- Violaxanthin 6.all-E- Violaxanthin			
xvi) 1.all-E-Fucoxanthin 2.13'Z- Fucoxanthin 3.13Z- Fucoxanthin 4.9'Z- Fucoxanthin	*Fucus,* *Ascophyllum* *Pelvetia* or *Laminaria*	Sucrose	Hexane/ 0.5 to 2% propanol
xvii) Mangicrocin	*Crocus* *sativus*	1.Sephadex LH20 2.Silica	Ethanol/ 40%water Chloroform
xviii)Carotenoid sulphates	Synthesized astaxanthin	Silica	Ethyl acetate/ methanol

ที่มา : Bernhard และ Friedrich (1995)

กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแคโรทีนอยด์จากแหล่งธรรมชาติแสดงในภาพที่ 8


Wet biological material
Dehydrated biological materials
Extraction with
water-miscible solvent
Extraction with
water-miscible or
immiscible
Crude extract
Extraction with ether/hexane
Evaporation
Dry lipid extract
Partitioned with
Hexane/aqueous
85%metanol
Saponification
Hypophasic
carotenoids
Ephiphasic
carotenoids
Neutral
carotenoids
Acidic
carotenoids
Hypophasic
carotenoids
Epiphasic
carotenoids
Chromatography (CC,TLC, HPLC)
Individual carotenoids
Chromatography
Crystallization
Recrystallization
Characterization
Pure carotenoids

ภาพที่ 8 แสดงแผนภูมิการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแคโรทีนอยด์จากแหล่งธรรมชาติ

Figure 8. Diagram of separation and purification of natural carotenoids.

ที่มา : Jensen และคณะ (1995)

การใช้ประโยชน์จากแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากแหล่งธรรมชาติเช่นพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ มีปริมาณโดยรวมเท่ากับ 100 ล้านตันต่อปี (Cormier, 1998) และมีการนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน ทั้งในรูปของสารให้สี วิตามิน สารถนอมอาหาร และใช้เป็นยา ดังสรุปไว้ในตารางที่ 6

โดยจะพบว่าประสิทธิภาพของแคโรทีนอยด์ในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินอี ถึง 550 เท่า และมีประสิทธิภาพสูงกว่าเบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ที่สกัดมาจากเมล็ดองุ่นถึง 40 และ 17 เท่า ตามลำดับ

แคโรทีนอยด์นอกจากมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้วยังสามารถที่จะป้องกันการเกิดมะเร็ง, ยับยั้งการเกิดแผลเปื่อย, ป้องกันการเสียหายหรือยืดอายุของเซลล์รวมทั้งป้องกันการเกิดโรคหัวใจหรือโรคเกี่ยวกับเส้นเลือดแคโรทีนอยด์ที่เป็นสนใจกันมากชนิดหนึ่งคือ astaxanthin เนื่องจากโครงสร้างของ astaxanthin มีอยู่ประมาณ 3 ชนิดแต่ที่พบมากที่สุด คือ astaxanthin (3,3’-dihydroxy-carotene-4,4’-dione) ดังแสดงในภาพที่ 9 (Guerin *et al.,*2003)

ตารางที่ 6 การใช้ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ

Table 6. Applications of carotenoid.

Carotenoid	Colour	Application of carotenoid
Xanthophylic carotenoids		feed additive, hue of yolk
Canthaxanthin	orange-red	snack, milk, fat, trout and feed additive
Astaxanthin		magarine and food
		salmon, trout, shrimp, mantis shrimp and poultry feed and antioxidant
Carotenoid without xanthophylls		provitamin A
		vitamin A
Carotenoid with xanthophylls		antioxidant
		enhancement of the immune response
		anti tumor, anticancer and anti-aging
β-carotene oil base	yellow	butter, magarine, cheese,

ที่มา : Britton (1992), Margalith (1992), Lorenz (1998)

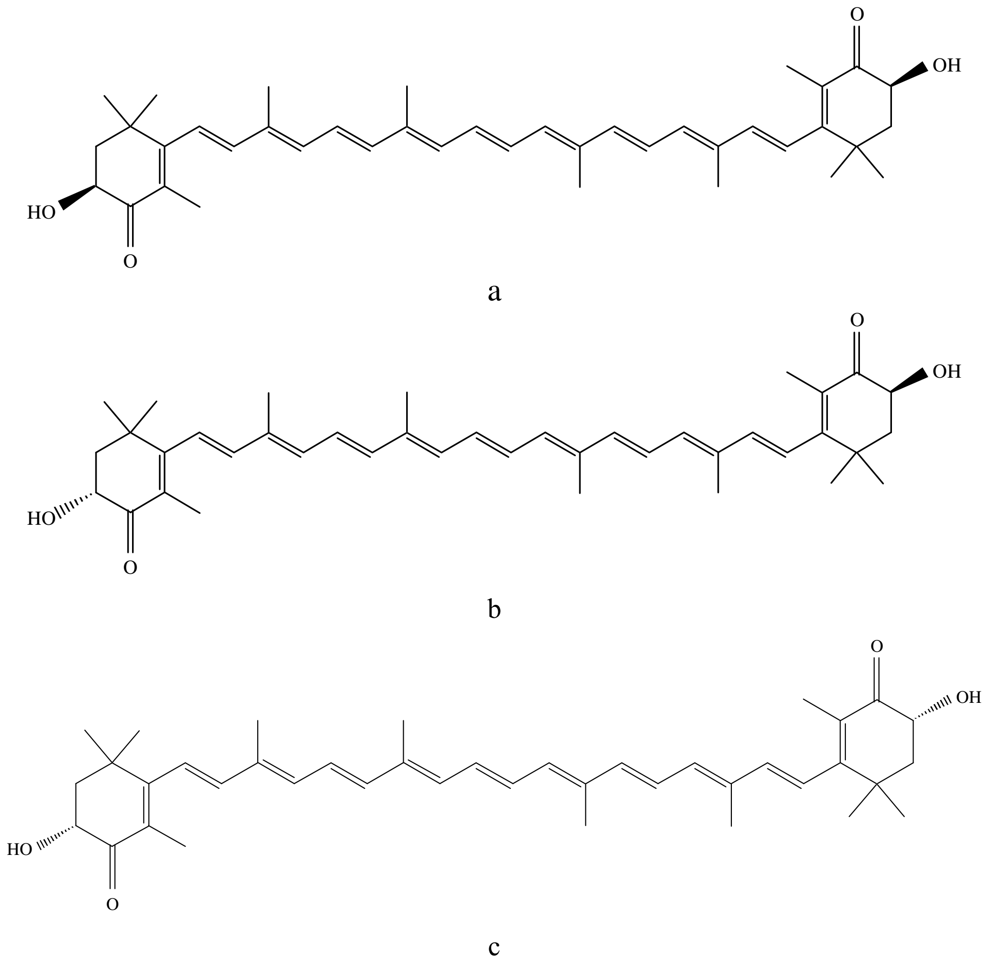
ตารางที่ 6 (ต่อ)

Table 6. (Cont.)

Carotenoid	Colour	Application of carotenoid
	orange	fat food , eggs, snack and pasta
		salad, milk products, pop corn, tomato products
		etc. and anticancer
β-carotene 8’-apo-β-		soft drink, specially orange
Carotene-8’al	yellow	desserts and sweets
(water-dispersible preparation)		soup and meat products
Canthaxanthin		medicine, anti-oxidant and anticancer

ที่มา : Britton (1992), Margalith (1992), Lorenz (1998)

จะเห็นได้ว่าปัจจุบันแคโรทีนอยด์นั้น ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, เคมี, อาหาร, ยา และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารสำหรับสัตว์น้ำ เช่น การเพาะเลี้ยงปลาแซลมอน, ปลาเทร้าท์ และกุ้งซึ่งนิยมนำสารสีแคโรทีนอยด์มาผสมในอาหารเพื่อปรับปรุงคุณภาพด้านสีของเนื้อสัตว์น้ำเหล่านี้ให้เป็นที่ยอมรับของตลาดและผู้บริโภค โดยทั่วไปแคโรทีนอยด์ มีราคาจำหน่ายอยู่ที่ประมาณ 2,500-3,000 เหรียญสหรัฐ/กิโลกรัม และทุกๆ ปีปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่จำหน่ายมีมูลค่าถึง 200 ล้านเหรียญสหรัฐและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Malea *et al.,*2005) ถึงแม้ว่าร้อยละ 95 ของแคโรทีนอยด์ ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้มาจากการสังเคราะห์ก็ตามแต่ความต้องการที่จะผลิตแคโรทีนอยด์จากแหล่งธรรมชาตินั้นมีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไม่มีสารประภทโลหะหนักตกค้างและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Bocaneegra *et al.,* 2004)



ภาพที่ 9 โครงสร้างของ astaxanthin (3,3’-dihydroxy-carotene-4,4’-dione) (a), astaxanthin 3R,3’S (b), astaxanthin 3R,3’R (c)

Figure 9. Structure of astaxanthin (3,3’-dihydroxy-carotene-4,4’-dione) (a), astaxanthin 3R,3’S (b), astaxanthin 3R,3’R (c).

ที่มา : Guerin และคณะ (2003)

แหล่งที่มาที่สำคัญของแคโรทีนอยด์มีอยู่สองแหล่งด้วยกัน คือ

1.การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยวิธีการทางเคมีนั้นแตกต่างกันโดยอาจจะใช้สารเคมีหรือโครงสร้างของสารเริ่มต้นที่เหมือนหรือต่างกันก็ได้ แต่ผลผลิตสุดท้ายที่ออกมานั้นก็จะเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่งชนิดใด

2. จากสิ่งมีชีวิต กระบวนการผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งสองวิธีนี้สามารถที่จะผลิตแคโรทีนอยด์ได้ออกมามีโครงสร้างที่เหมือนกัน แต่เมื่อมาเปรียบเทียบเกี่ยวกับคุณสมบัติต่างๆของแคโรทีนอยด์ที่ได้แล้ว พบว่าแคโรทีนอยด์ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติมีคุณสมบัติที่ดีกว่าแคโรทีนอยด์ที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี และมีความปลอดภัยเนื่องจากปราศจากสารตกค้างจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น สารที่มีหมู่ฮาโลเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจที่จะศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากสิ่งมีชีวิตเพิ่มมากขึ้น โดยแหล่งของแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แหล่งของแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติ

Table 7. Carotenoid from natural sources.

Sources	Carotenoid concentration (ppm)
Salmonids	~ 5
Plankton	~ 60
Krill	~ 120
Arctic shrimp	~ 1,200
Phaffia sp.	~ 8,000
Heamatococcus pluvilis	~ 40,000

ที่มา : Torissen (1996)

ตารางที่ 8 โครงสร้างหลักของแคโรทีนอยด์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ

Table 8. Main structure of carotenoid in aquatic animal tissues.

Species	Type of tissue					
	Skin	Flesh	Digestive gland	Ovaries	Serum	Eggs
Salmonids	Esterified	Free	Free	Free	Free	Esterified
Shrimp	Esterified	Esterified	Free	Free	N.A.	Free
Red seabream	Esterified	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

ที่มา : Miki (1991) N.D. : not determined

ตารางที่ 9 ปริมาณ รูปแบบ และระดับของแคโรทีนอยด์ที่มีความสำคัญกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจากแหล่งต่างๆ

Table 9. Content, form and level of carotenoid important for aquatic culture from various sources.

Aquaculture species	Content (mg/kg)	Form (Free/Esterified)	Main isomer
Sockeye salmon	26-37	Free,esterified	3S,3’S
Coho salmon	9-21	Free,esterified	3S,3’S
Chum salmon	3-8	Free,esterified	3S,3’S
Chinook salmon	8-9	Free,esterified	3S,3’S
Pink salmon	4-6	Free,esterified	3S,3’S
Atlantic salmon	3-11	Free,esterified	3S,3’S
Rainbow trout	1-3	Free,esterified	3S,3’S
Salmon egg	0-14	Esterified	N.A.
Red seabream	2-14	Esterified	N.A.
Red seabream egg	3-8	N.A.	N.A.
Black tiger prawn	10-150	Esterified,free	3S,3’S
Lobster	-	Esterified,free	Free
Copepods	39-84	Esterified	N.A.
Krill	46-130	Esterified	3R,3’R
Krill oil	727	Esterified	3R,3’R
Crayfish meal	137	Esterified	N.A.
Arctic shrimp	1160	Esterified	3S,3’S
Yeast	30-800	Esterified	3R,3’R
Synthetic astaxantihn	80,000	Free	3R,3’S
Haematococcus pluvilis	10,000-30,000	Esterified	3S,3’S

N.A. : not available

ที่มา : Miki (1991)

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาของแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติแล้วพบว่าการศึกษาเกี่ยวกับแคโรทีนอยด์จากแบคทีเรียในทะเลยังมีปรากฏไม่มากนัก ในขณะที่แบคทีเรียในทะเลหลายชนิดที่มีลักษณะของโคโลนีที่มีสีเหลือง ส้ม แดง ไปจนถึงม่วง ซึ่งคาดว่าจะมีแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่งชนิดใดเป็นองค์ประกอบ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่มีคุณสมบัติในการสร้างแคโรทีนอยด์เพื่อใช้เป็นแหล่งที่ใช้ผลิตแคโรทีนอยด์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่มีคุณสมบัติในการสร้างแคโรทีนอยด์
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแคโรทีนอยด์จากแบคทีเรียจากทะเลที่แยกและคัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สำหรับนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ ได้แก่เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลในคลังสายพันธุ์เชื้อของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเก็บไว้ในอาหาร Nutrient Broth ในน้ำทะเลที่มีกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์ที่แยกเพิ่มเติมจากการศึกษาวิจัยนี้

2. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่มีการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์

อาหารสำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้น และการเก็บรักษาเชื้อ คือ อาหาร Nutrient Broth และ Nutrient Agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลธรรมชาติที่ผ่านการกรองแล้ว

อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ คือ Modified FP Medium (Dufosse และ Echanove, 2005) ประกอบด้วย กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร, ยีสต์ 20 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร, Casamino Acid 5 กรัมต่อลิตร และ น้ำทะเลธรรมชาติที่ผ่านการกรองแล้ว 1 ลิตร

3. สารเคมี

- Acetone (LAB-SCAN, IRELAND)
- Acetonitrile (LAB-SCAN, IRELAND)
- Ethanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Hexane (LAB-SCAN, IRELAND)
- Isopropanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Methanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Water (LAB-SCAN, IRELAND)
- Standard carotenoid (BioAstin, SINGAPORE)

- Glucose (Boots manufacturing, THAILAND)
- K_2HPO_4 (Ajax Finechem, NEW ZEALAND)
- Yeast extract (HIMEDIA, INDIA)
- Nutrient broth (LAB-SCAN, IRELAND)
- Casamino Acid (LAB-SCAN, IRELAND)
- Tuna condensate (SONGKLA CANNING, THAILAND)
- Surimi washing water (PFP, THAILAND)

อุปกรณ์

- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubater shaker) รุ่น VS-8480SRN
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Buchi)
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100
- เครื่อง Perkin Elmer GeneAmp PCR System รุ่น 2400
- คอลัมน์ชนิด reversed phase (Phenomenex Luna C18, 10 x 250 mm)
- เครื่องอบอากาศร้อน (Hot air oven) รุ่น MOV. 212
- เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น Jasco V 530
- เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง รุ่น CG 842
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น VS-8480SRN
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น LA 230S
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 1502-S
- ตู้เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส PT 203
- โถดูดความชื้น (Desicator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น ABS1200

วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์

1.1 การเก็บตัวอย่าง

การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์เริ่มจากการเก็บตัวอย่างชนิดต่างๆจากทะเลที่เป็นแหล่งของแบคทีเรีย เช่น น้ำทะเล สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ฟองน้ำ ปะการัง หอย ปลาดาว พืชทะเล เช่น สาหร่าย หญ้าทะเล ตะกอนดินในทะเล และวัสดุอื่นๆ ในทะเล เช่นไม้ เศษเชือก เปลือกหอย เนื่องจากข้อมูลจากการศึกษาการแยกเชื้อ Actinomycetes และ Gliding bacteria เบื้องต้นก่อนหน้านี้พบว่าตัวอย่างเหล่านี้มักเป็นแหล่งของแบคทีเรียที่มีการสร้างสีชนิดต่างๆ โดยจะทำการเก็บตัวอย่างทั้งจากบริเวณชายฝั่งทะเลและที่น้ำลึกระดับ 10-30 เมตร ในจังหวัดสงขลาและจังหวัดใกล้เคียงเช่น ตรัง กระบี่ สตูล โดยเก็บตัวอย่างสำหรับใช้แยกแบคทีเรียที่ต้องการได้ 100 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เก็บได้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ10-15 องศาเซลเซียส) เพื่อชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ในตัวอย่างจนกว่าจะทำการแยกเชื้อโดยวิธี spread plate technique

1.2 การแยกเชื้อจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 0.5 × 0.5 ซ.ม. โดยอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อปนเปื้อน นำตัวอย่างที่ตัดแล้วมาโฮโมจิไนซ์ในหลอดแก้วที่บรรจุด้วยน้ำทะเลที่มีการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มล. จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนได้ตัวอย่างที่มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วทั้ง 4 ระดับมา 0.1 มล. เกลี่ยลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตร nutrient agar ซึ่งใช้น้ำทะเลในการเตรียม บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรีย

คัดเลือกเชื้อโคโลนีที่มีลักษณะสีเหลือง ส้ม และแดง จำนวน 37 สายพันธุ์และแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยการเขี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง nutrient agar เก็บรักษาเชื้อที่แยกและคัดเลือกได้บนอาหาร nutrient agar ที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อใช้เป็นเชื้อที่จะต้องนำมาใช้งานต่อไปและมีการถ่ายเชื้อทุกๆ3เดือน นอกจากนี้ยังเก็บรักษาเชื้อทั้งหมดไว้ใน nutrient broth ที่มี 50 เปอร์เซ็นต์สารละลายกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาเชื้อในระยะยาว

2. การเตรียมสารสกัดหยาบแคโรทีนอยด์

2.1 การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท และแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นแล้วว่ามีคุณสมบัติในการสร้างสารสีชนิดต่างๆรวมกับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารสีที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลจำนวนหนึ่งมาคัดเลือกต่อไปโดยการเลี้ยงเชื้อใน nutrient broth ที่มีน้ำทะเลธรรมชาติที่ผ่านการกรองแล้วเป็นองค์ประกอบหลักและสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียเช่น yeast extract และ peptone (ยีสต์สกัด 20 กรัม, กลูโคส 5 กรัม, KH_2PO_4 1 กรัม, casamino acid 5 กรัม และน้ำทะเล 1 ลิตร) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในฟลาก์สขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเหลวบรรจุอยู่ 100 มล. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบแคโรทีนอยด์

นำ nutrient broth ที่มีเซลล์ของแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อแยกเซลล์ออกจากส่วนของสารละลายนำเซลล์ที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างอะซิโตนและเมทานอล (2:1 ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 25 มล. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อแยกเซลล์และตัวทำละลายออก สกัดเซลล์ที่เหลือซ้ำด้วยอะซิโตน ปริมาตร 25 มล. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์และตัวทำละลายออกจากกันนำตัวทำละลายที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกันและระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ชั่งน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส) และปราศจากแสงโดยการหุ้มภาชนะด้วยอะลูมินั่มฟลอยด์

3 การทดสอบหาชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์

3.1 การเตรียมสารสกัดแคโรทีนอยด์เพื่อวิเคราะห์ด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์และ High Performance Liquid Chromatography

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.2 ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วมาละลายด้วยเมทานอล นำสารละลายมากรองด้วย Nylon membrane ขนาด 0.2 µm เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ด้วย Diode Array Detector HPLC ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสง UV/Vis ของสารตัวอย่างในระหว่างที่ทำการวิเคราะห์ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 210-660 นาโนเมตร โดย HPLC โครมาโตแกรม และ UV/Vis สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการเปรียบเทียบและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์กลุ่มที่มีศักยภาพในการเพิ่มสี

ในกุ้ง เช่น astaxanthin ในปริมาณที่สูง เนื่องจาก HPLC โครมาโตแกรมสเปกตรัมจะบอกถึงจำนวนชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างสารสกัดโดยเทียบกับสารแคโรทีนอยด์มาตรฐานแต่ละชนิด ในขณะที่ UV/Vis สเปกตรัมจะช่วยในการจำแนกชนิดของแคโรทีนอยด์โดยการเปรียบเทียบลักษณะสเปกตรัมกับข้อมูลการดูดกลืนแสงของสารแคโรทีนอยด์มาตรฐานแต่ละชนิดเช่นกัน สำหรับการวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วย spectrophotometer นั้นจะทำโดยการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วย Diode Array Detector HPLC แต่จะใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 3 มิลลิลิตรและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารแคโรทีนอยด์มาตรฐาน

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในสารสกัด ด้วย Photodiode Array Detector HPLC

วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในสารตัวอย่างที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.1 ด้วย Photodiode Array Detector HPLC โดยใช้คอลัมน์ซิลิกาชนิดC_{18} reversed phase (Thermo Hypersil BDS C18 5µm, 4.0×250 mm) ที่ดัดแปลงโดยการเคลือบด้วย Phosphoric acid ก่อนปรับสมดุลด้วยสารละลาย mobile phase (hexane/acetone, 18:82) ที่อัตราการไหลของตัวทำละลายเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 10 นาที ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพีกของ แคโรทีนอยด์ จะสามารถสังเกตได้ที่ระยะเวลา 2-3 นาที และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร โดยมีการเปรียบเทียบกับตัวอย่าง แคโรทีนอยด์มาตรฐานทุกครั้งในการวิเคราะห์ (Sachidra *et al.*, 2005; Erasan *et al.*, 2004)

4. การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ ในปริมาณสูงสุด

คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูงสุดจากตัวอย่างทั้งหมด เพื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์กับแคโรทีนอยด์มาตรฐานที่นำไปวิเคราะห์ด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์และ Photodiode Array Detector HPLC

5.การเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อที่มีการผลิต แคโรทีนอยด์โดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ4 มาเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยใช้ primer 4 ชนิด คือ 27F, 339F, 785F และ 1099F ซึ่งจะครอบคลุมลำดับเบสทั้งหมด 1500 เบส

6. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทะเลและการผลิตในห้องปฏิบัติการ

6.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแคโรทีนอยด์ จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 4

จะแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม และการหาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า 250 มล. การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะทำโดยการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตลอดจนสารอาหารหรือแร่ธาตุที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยเลือกศึกษาทีละปัจจัยและเลือกชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนไนโตรเจน ตลอดจนสารอาหารและแร่ธาตุที่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ สูงสุดมาศึกษาปัจจัยทางกายภาพต่อไป สำหรับปัจจัยทางกายภาพที่จะศึกษาได้แก่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และความเร็วรอบในการเขย่า โดยจะทำการศึกษาทีละปัจจัยและเลือกค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด

6.1.1 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพ

ความเร็วรอบในการเขย่า (อัตราการให้อากาศ)โดยจะศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าด้วยกัน 3 ระดับ คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที

พีเอช ซึ่งในการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการศึกษาพีเอชที่แตกต่างด้วยกัน 3 ระดับ คือ 6, 7 และ 8

อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์ จะศึกษาอุณหภูมิที่ต่างกัน 3 ค่า คือ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส

วิธีการเลี้ยงเชื้อเหมือนกับการทดลองข้อ 2.1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient broth ในน้ำทะเล และวิธีการสกัดสารแคโรทีนอยด์ ทำตามวิธีข้อ 2.2 รวมทั้งวิธีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารแคโรทีนอยด์เหมือนกับข้อ3.2 เมื่อได้ผลจากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพแล้ว นำไปศึกษาปัจจัยทางเคมีหรือการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

6.1.2 การศึกษาการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอย่างละ 4 แหล่งด้วยกันคือ

แหล่งคาร์บอน

1. แป้งสาลีที่ผ่านการทำให้เกิด gelatinization โดยนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที
2. ซูโครส
3. กลูโคส

4. น้ำยาง

โดยจะใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการทดลองที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและความเร็วรอบในการเขย่า 250 rpm เป็นเวลา 5 วัน

แหล่งไนโตรเจน

1. น้ำนึ่งปลาทูน่า ที่มีปริมาณ total nitrogen เท่ากับ 0.56 % (w/v)
2. น้ำล้างซูริมิ ที่มีปริมาณ total nitrogen เท่ากับ 0.05 % (w/v)
3. Yeast extract ที่มีปริมาณ total nitrogen เท่ากับ 11.10 % (w/w)

โดยจะใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการทดลองที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 15 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและความเร็วรอบในการเขย่า 250 rpm เป็นเวลา 5 วันโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อเหมือนกับการทดลองข้อ 2.1 และวิธีการสกัดสารแคโรทีนอยด์ ทำตามวิธีข้อ 2.2 รวมทั้งวิธีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารแคโรทีนอยด์เหมือนกับข้อ 3.2

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่สามารถผลิตสารแคโรทีนอยด์

จากการเก็บตัวอย่างในทะเลบริเวณจังหวัดภูเก็ต สุราษฎร์ธานี ปัตตานี ชลบุรี และสงขลา โดยบริเวณที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นหาดทรายและโขดหินในแนวน้ำขึ้นน้ำลงและบริเวณน้ำลึกประมาณ 1□-3□เมตรที่มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ตามระบบนิเวศน์ในแต่ละแห่งเช่น แนวปะการัง โขดหินหรือเนินทราย สามารถนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ส้ม และแดง ได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 1□เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลสำหรับการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตแคโรทีนอยด์

Table1□ Marine derived bacteria selected for carotenoid production.

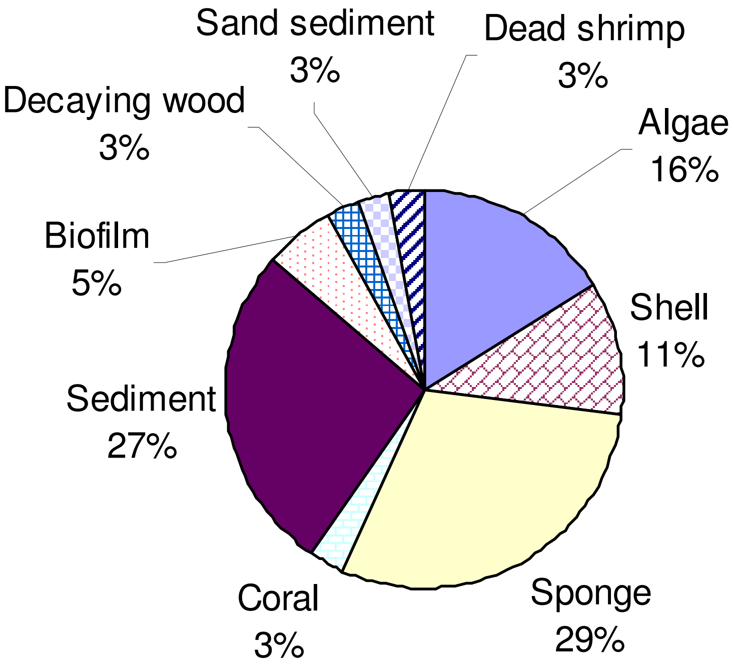
Code	Location	Source	Colour of colony
CNA□□1	Losin	Sponge	Red
CNA□□4	Losin	Alga	Yellow
CNA□□6	Tao Island	Shell	Yellow
CNA□□8	Losin	Sponge	Yellow
CNA□1□	Losin	Coral	Yellow
CNA□13	Losin	Shell	Yellow
CNA□14	Losin	Alga	Yellow
CNA□18	Losin	Sponge	Yellow
CNA□22	Losin	Sponge	Red
CNA□27	Tao Island	Sponge	Red
CNA□33	Losin	Alga	Red
CNA□34	Losin	Sponge	Red
CNA□35	Losin	Sponge	Yellow
CNA□51	Phuket	Sediment	Red

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table10. (Cont.)

Code	Location	Source	Colour of colony
CNA053	Tao Island	Sponge	Yellow
CNA054	Tao Island	Biofilm	Yellow
CNA058	Phuket	Sediment	Red
CNA061	Sattaheep	Decaying wood	Red
CNA063	Sattaheep	Sand sediment	Yellow
CNA074	Tao Island	Dead shrimp	Red
CNA075	Tao Island	Shell	Red
CNA112	Songkla lake	Sediment	Red
CNA113	Songkla lake	Sediment	Red
CNA114	Songkla lake	Sediment	Red
CNA142	Talay noy	Sediment	Yellow
CNA148	Talay noy	Sediment	Red
CNA149	Talay noy	Sediment	Red
PK5.1	Phuket	Sponge	Yellow
PK14.2	Phuket	Sponge	Yellow
PK18.1	Phuket	Sponge	Yellow
PK18.2	Phuket	Alga	Red
PK21.1	Phuket	Alga	Yellow
PK22.1	Phuket	Alga	Red
PK29.1	Phuket	Shell	Purple
PK29.2	Phuket	Biofilm	Red
PK34.1	Phuket	Sediment	Yellow
PK34.2	Phuket	Sediment	Yellow

หมายเหตุ Losin กองหินโลซิน จ.ปัตตานี, Sattaheep สัตหีบ จ.ชลบุรี
Tao Island เกาะเต่า จ.ชุมพร, Songkla lake สมิหลา จ.สงขลา
Phuket แหลมพันวา จ.ภูเก็ต, Talay noy ทะเลน้อย จ.พัทลุง



ภาพที่ 10 ร้อยละของชนิดตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์

Figure 10. Percentage of specimens used for isolation of carotenoid producing bacteria.

จากตัวอย่างทั้งหมดของเชื้อที่โคโลนีมีลักษณะสีเหลือง ส้ม และแดงจำนวน 37 ไอโซเลท พบว่าร้อยละ 29 ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ มาจาก ฟองน้ำ รองลงมาคือ ตะกอนดิน (ร้อยละ27), สาหร่าย (ร้อยละ16), เปลือกหอย (ร้อยละ 11), ฟิล์มชีวภาพ (ร้อยละ 5) และอื่นๆอีกร้อยละ 3 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่11

จากเชื้อทั้งหมดที่คัดเลือกมาได้นั้นสามารถที่จะแบ่งเชื้อเป็น2 กลุ่มด้วยกัน คือ actinomycetes จำนวน 27 ไอโซเลทซึ่งมีการกำหนดรหัสตัวอย่างเป็น CNA และกลุ่มที่เป็นแบคทีเรียอื่นๆจำนวน 10 ไอโซเลท มีการกำหนดรหัสตัวอย่างเป็น PK

2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรียจากทะเล

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์เพื่อศึกษาว่าเชื้อสายพันธุ์ใดมีการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยใช้แคโรทีนอยด์ในทางการค้าเป็นสารมาตรฐานและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์โดยอาศัยเครื่อง Diode Array Detector HPLC พบว่าเชื้อ

แบคทีเรียทั้ง 37 สายพันธุ์ที่นำมาทดลอง มีเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์ คือ สายพันธุ์ CNA001, CNA058, CNA078 และ CNA112

จากการทดลองเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ ที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์ผลิตโดยวิเคราะห์ด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์ซึ่งจะวัดโดยการสแกนความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 นาโนเมตรถึง 600 นาโนเมตรเพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ใดที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์โดยวิเคราะห์ด้วย Diode array detecter อีกครั้งที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อสายพันธุ์ใดมีการผลิตแคโรทีนอยด์ที่น่าสนใจ

ตารางที่ 11 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลทั้ง 37 สายพันธุ์

Table 11. Total carotenoid content of 37 marine bacterial isolates.

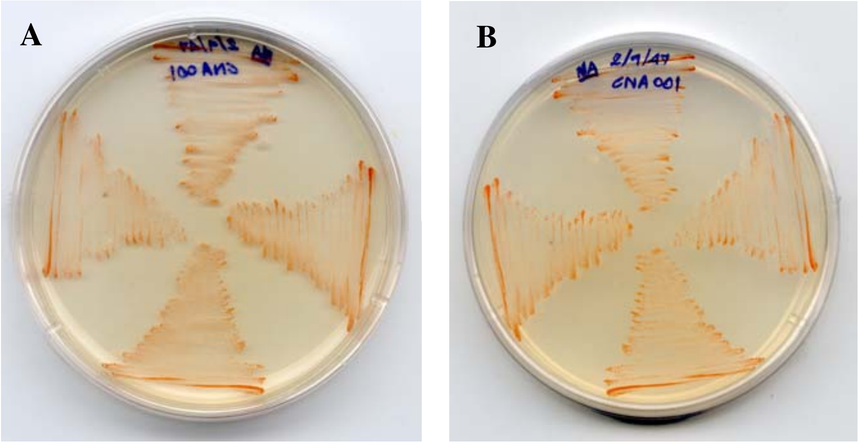
Strain	Sample	Colour	Total carotenoid (mg/g cell)
CNA001	Sponge	Red	**1.051**
CNA004	Alga	Yellow	0.017
CNA006	Shell	Yellow	0.014
CNA008	Sponge	Yellow	0.013
CNA010	Coral	Yellow	0.013
CNA013	Shell	Yellow	0.009
CNA014	Alga	Yellow	0.008
CNA018	Sponge	Yellow	0.008
CNA022	Sponge	Red	0.043
CNA027	Sponge	Red	0.264
CNA033	Alga	Red	0.149
CNA034	Sponge	Red	0.122
CNA035	Sponge	Yellow	0.005
CNA051	Sediment	Red	0.152
CNA053	Sponge	Yellow	0.021
CNA054	Biofilm	Yellow	0.014
CNA058	Sediment	Red	**3.462**

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (Cont.)

Strain	Sample	Colour	Total carotenoid (mg/g cell)
CNA061	Decaying wood	Red	0.113
CNA063	Sand sediment	Yellow	0.043
CNA074	Dead shrimp	Red	**2.892**
CNA075	Shell	Red	0.135
CNA112	Sediment	Red	**1.793**
CNA113	Sediment	Red	0.152
CNA114	Sediment	Red	0.145
CNA142	Sediment	Yellow	0.021
CNA148	Sediment	Red	0.433
CNA149	Sediment	Red	0.154
PK5.1	Sponge	Yellow	0.015
PK14.2	Sponge	Yellow	0.023
PK18.1	Sponge	Yellow	0.018
PK18.2	Alga	Red	0.202
PK21.1	Alga	Yellow	0.021
PK22.1	Alga	Red	0.300
PK29.1	Shell	Purple	0.023
PK29.2	Biofilm	Red	0.208
PK34.1	Sediment	Yellow	0.004
PK34.2	Sediment	Yellow	0.017

โดยเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้เป็นแบคทีเรียกลุ่ม actinomycetes ทั้งหมดและเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อในกลุ่มของแบคทีเรียจากทะเลที่ใช้ลักษณะของโคโลนีที่สีสดและเข้มกว่าซึ่งควรจะมีการผลิตแคโรทีนอยด์ในกลุ่มของ astaxanthin แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วไม่มีเชื้อสายพันธุ์ใดเลยที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดนี้ แต่ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ว่าอาจจะเป็นแคโรทีนอยด์กลุ่มอื่นๆ ภาพที่ 11 แสดงลักษณะของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในส่วนที่เจริญเหนือผิวอาหารและใต้ผิวอาหาร

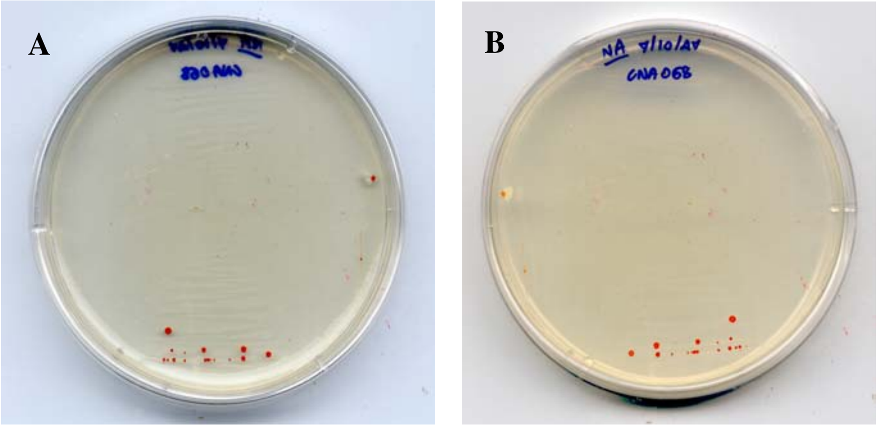


ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA001

A) ลักษณะโคโลนีเหนือผิวอาหาร B) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวอาหาร

Figure11. Colonies of bacterium strain CNA001.

A) Aerial mycelium B) Substrate mycelium

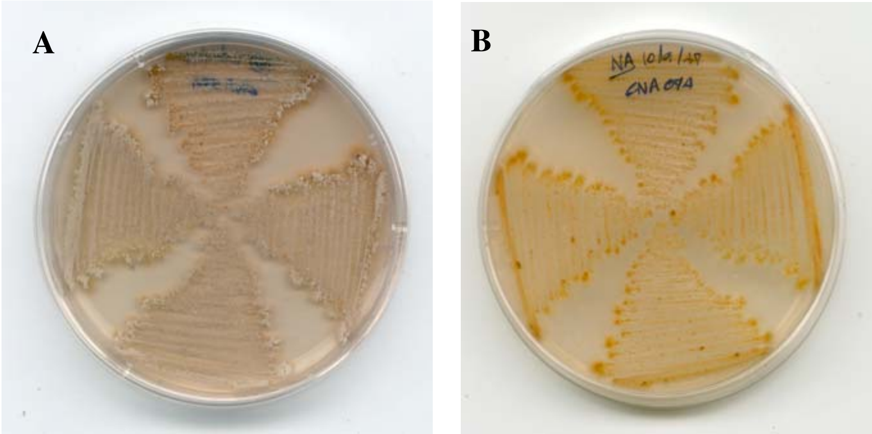


ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058

A) ลักษณะโคโลนีเหนือผิวอาหาร B) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวอาหาร

Figure 12. Colonies of bacterium strain CNA058.

A) Aerial mycelium B) Substrate mycelium

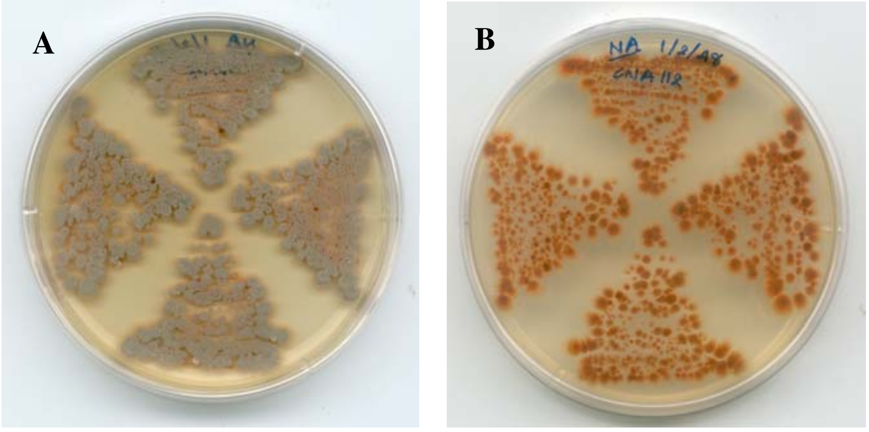


ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA074

A) ลักษณะโคโลนีเหนือผิวอาหาร B) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวอาหาร

Figure 13. Colonies of bacterium strain CNA074.

A) Aerial mycelium B) Substrate mycelium



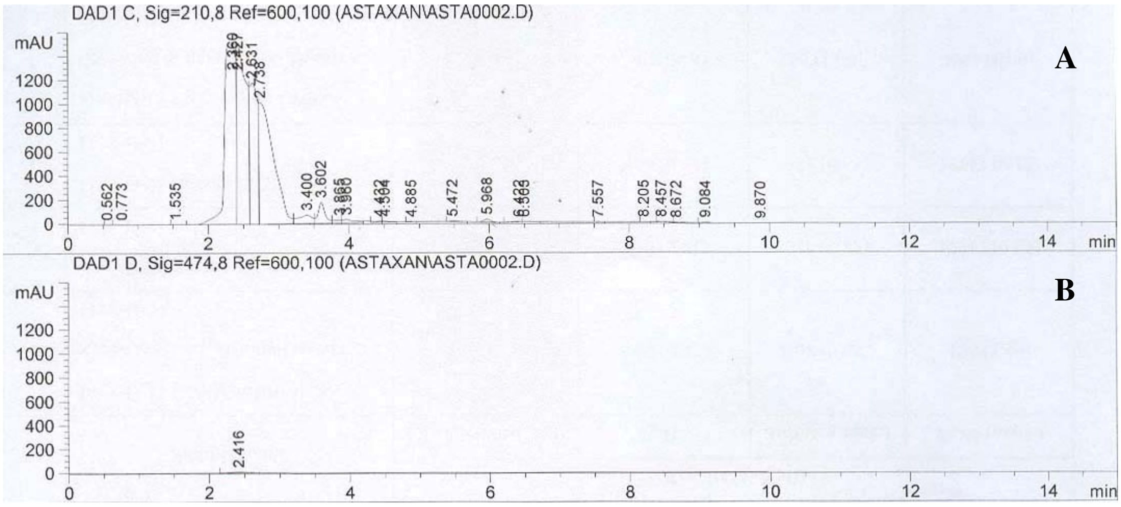
ภาพที่ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA112

A) ลักษณะโคโลนีเหนือผิวอาหาร B) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวอาหาร

Figure 14. Colonies of bacterium strain CNA112.

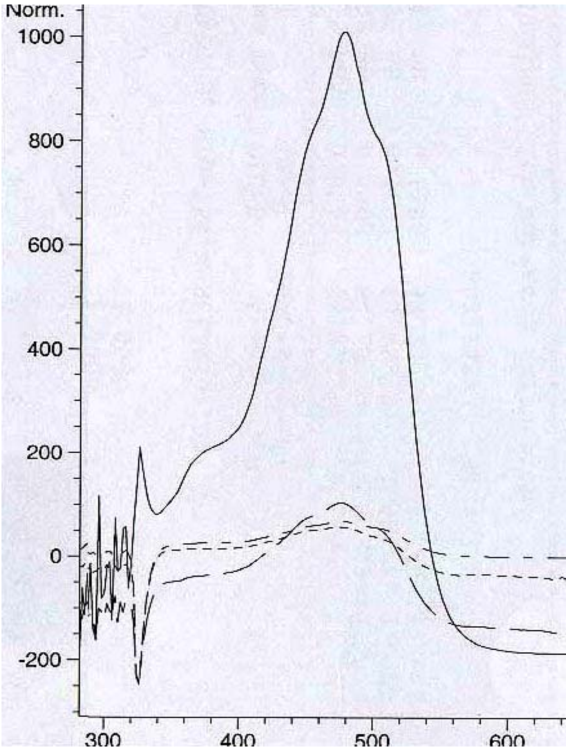
A) Aerial mycelium B) Substrate mycelium

ผลการวิเคราะห์การหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ในเชื้อที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถสรุปได้ว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นั้น สายพันธุ์ CNA001 มีการผลิตแคโรทีนอยด์น้อยที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 15 และ16 ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์ CNA058 มีการผลิตแคโรทีนอยด์มากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 17 โดยพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC ซึ่งมีการเทียบกับสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ โดยจะเทียบเวลาที่พีคของสารมาตรฐานเกิดขึ้นกับตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ในการใช้ HPLC ในการตรวจวัดจะใช้ความยาวคลื่นด้วยกัน 2 ความยาวคลื่น คือ 210 และ 474 นาโนเมตร ตามลำดับเนื่องจากที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรจะให้ข้อมูลของสารที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างเกือบทุกชนิดในขณะที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตรจะเป็นการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่แท้จริง ส่วนเชื้ออีก 2 สายพันธุ์ คือ CNA074 และ CNA112 เมื่อดูผลจาก Diode array spectrum แล้วผลจะไม่ตรงกับสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ถึงแม้ว่าพีคจะขึ้นมาที่เวลาใกล้เคียงกันก็ตาม ดังแสดงในภาพที่ 19-22 โดยจะเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ที่มี retention time เท่ากับ 2.643 นาที และในขณะเดียวกันรูปแบบของการดูดกลืนแสงที่วัดโดย Diode array Detector ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 23 และ 24 ตามลำดับ โดยเชื้อสายพันธุ์ CNA058 เมื่อดูผลจาก Diode array spectrum แล้ว spectrum จะตรงกับสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์และมีการผลิตมากกว่าเชื้ออีก 3 สายพันธุ์อีกด้วยจึงเลือกเชื้อสายพันธุ์ CNA058 มาศึกษาต่อในการเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์



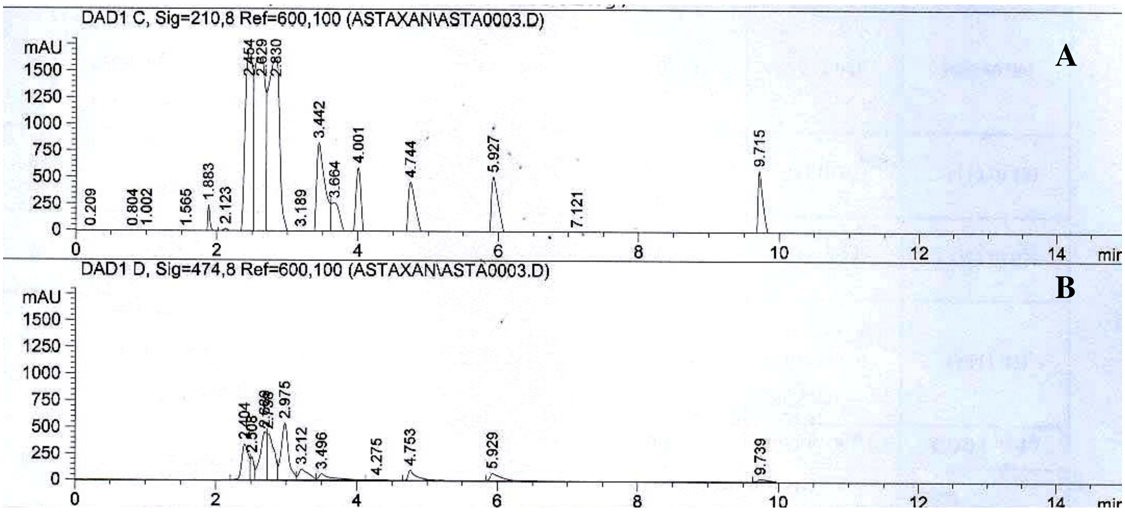
ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA001 ที่ความยาวคลื่น A) 210 นาโนเมตร, B) 474 นาโนเมตร

Figure 15. Chromatogram of HPLC analysis of carotenoid from bacterium strain CNA001 at A) 210 nm, B) 474 nm



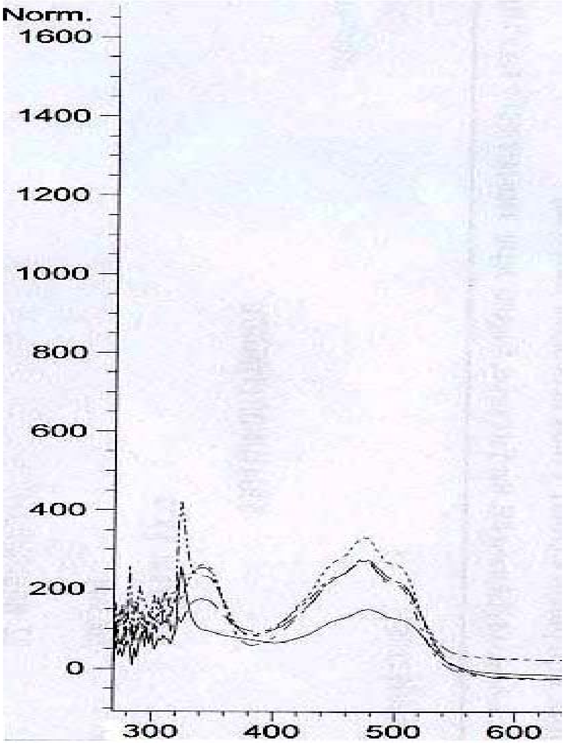
ภาพที่ 16 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA001

Figure 16. Diode array spectrum of carotenoid from bacterium strain CNA001.



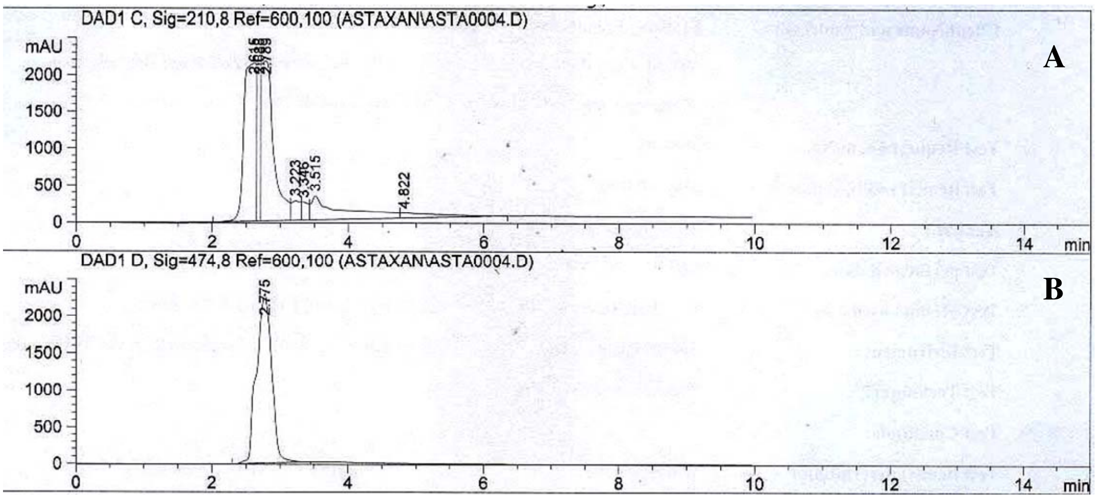
ภาพที่ 17 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 ที่ความยาวคลื่น A) 210 นาโนเมตร, B) 474 นาโนเมตร

Figure 17. Chromatogram of HPLC analysis of carotenoid from bacterium strain CNA058 at A) 210 nm, B) 474 nm



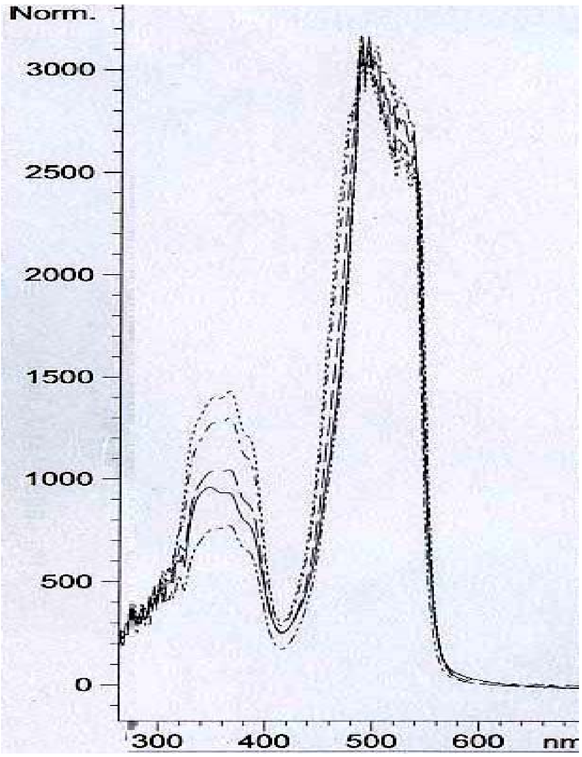
ภาพที่ 18 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058

Figure 18. Diode array spectrum of carotenoid from bacterium strain CNA058.



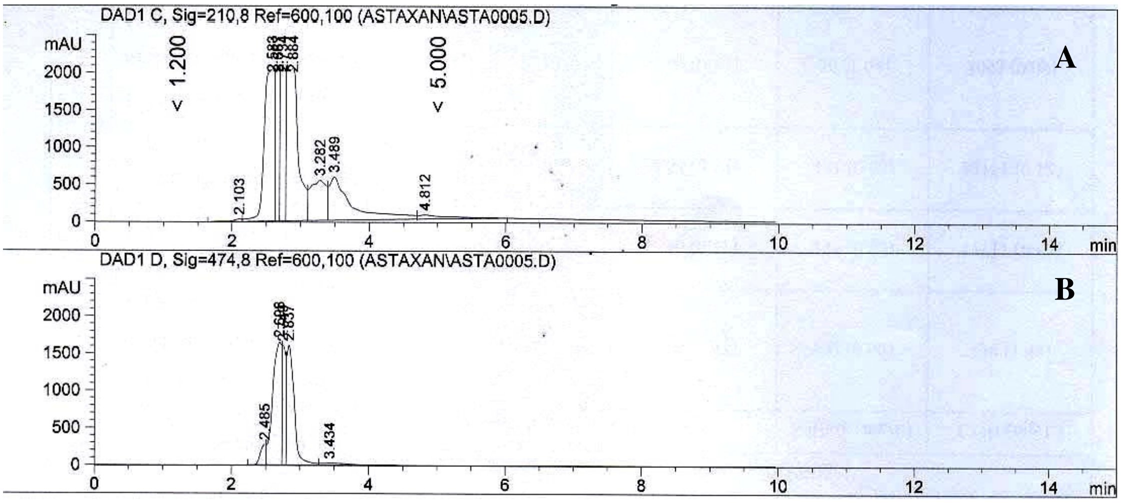
ภาพที่ 19 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA074 ที่ความยาวคลื่น A) 210 นาโนเมตร, B) 474 นาโนเมตร

Figure 19. Chromatogram of HPLC analysis of carotenoid from bacterium strain CNA074 at A) 210 nm, B) 474 nm



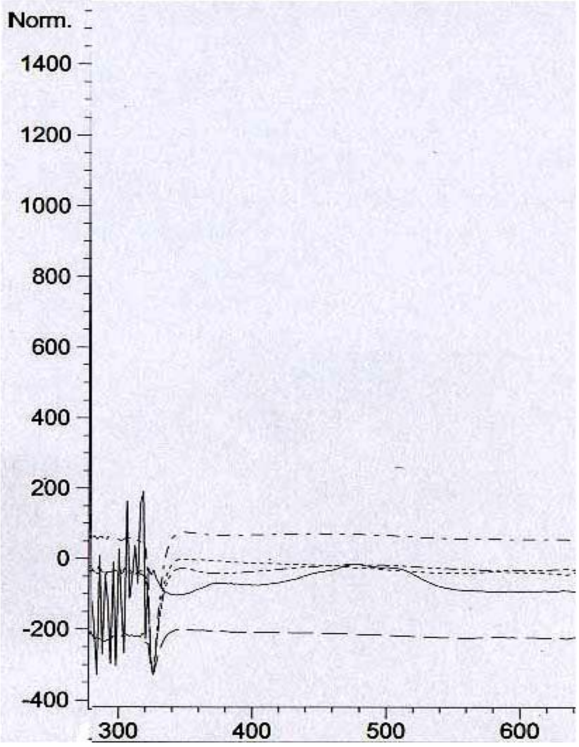
ภาพที่ 20 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA074

Figure 20. Diode array spectrum of carotenoid from bacterium strain CNA074.



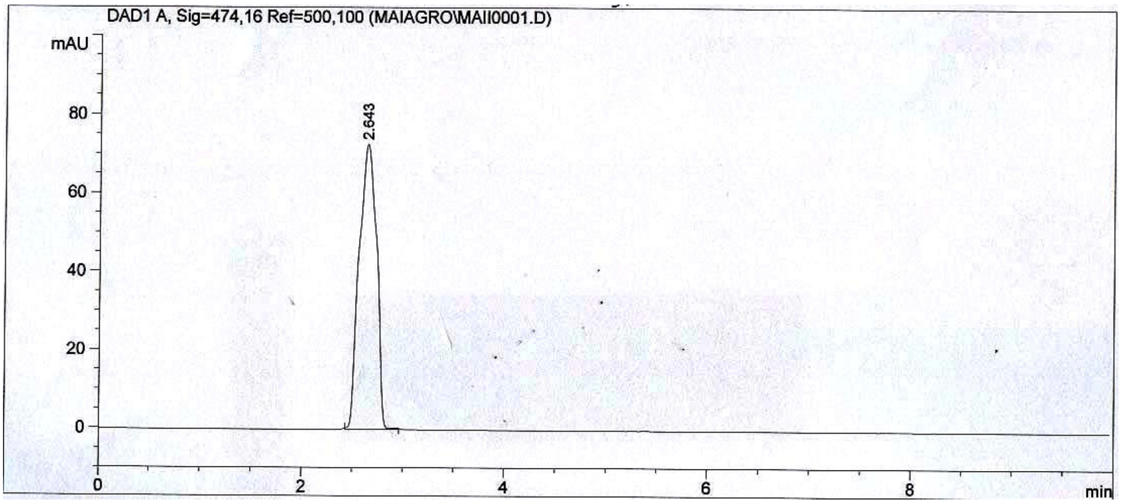
ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA112 ที่ความยาวคลื่น A) 210 นาโนเมตร, B) 474 นาโนเมตร

Figure 21. Chromatogram of HPLC analysis of carotenoid from strain CNA112 at A) 210 nm, B) 474 nm



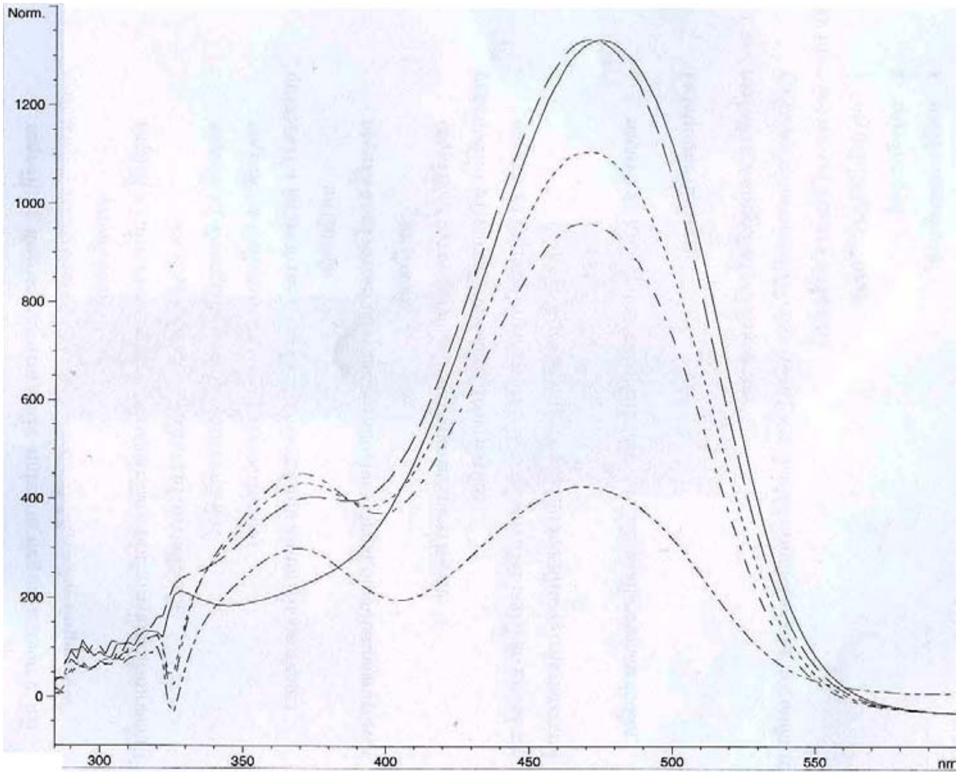
ภาพที่ 22 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA112

Figure 22. Diode array spectrum of carotenoid from bacterium strain CNA112.



ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์

Figure 23. Chromatogram of HPLC analysis of standard carotenoid.



ภาพที่ 24 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์

Figure 24. Diode array spectrum of standard carotenoid.

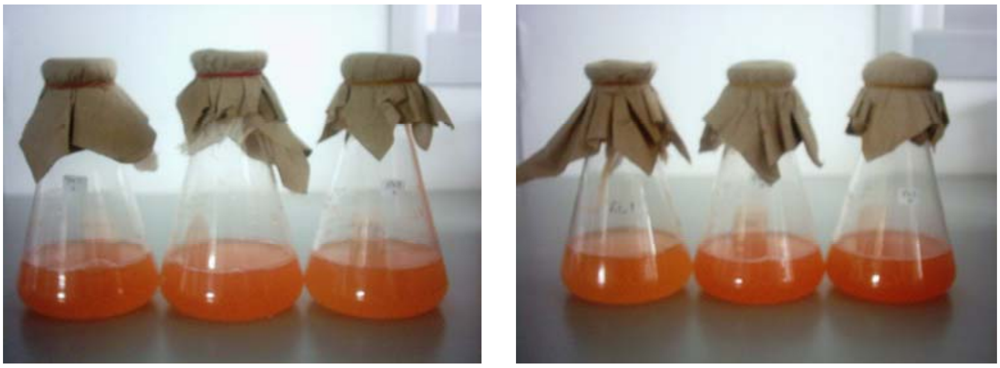
3. การเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์โดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

จากการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียจากทะเลสายพันธุ์CNA058โดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Gordonia terrae* ที่ระดับความเหมือน 93% รองลงมาจะเป็นเชื้อ *Gornodia* sp. CNJ752 PL04, *Gornodia terrae* strain NML88-1049, *Gornodia terrae* strain CC-S5-2, *Gornodia terrae* strain CC-S5-1 และ *Gornodia terrae* strain CC-S2a ซึ่งมีความใกล้เคียงกันที่ระดับ 93% จากข้อมูลดังกล่าวสามารถที่จะสรุปในเบื้องต้นได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลสายพันธุ์ CNA058 นี้น่าจะจัดอยู่ในจีนัสใหม่ได้

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแคโรทีนอยด์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทะเลและการผลิตในห้องปฏิบัติการ

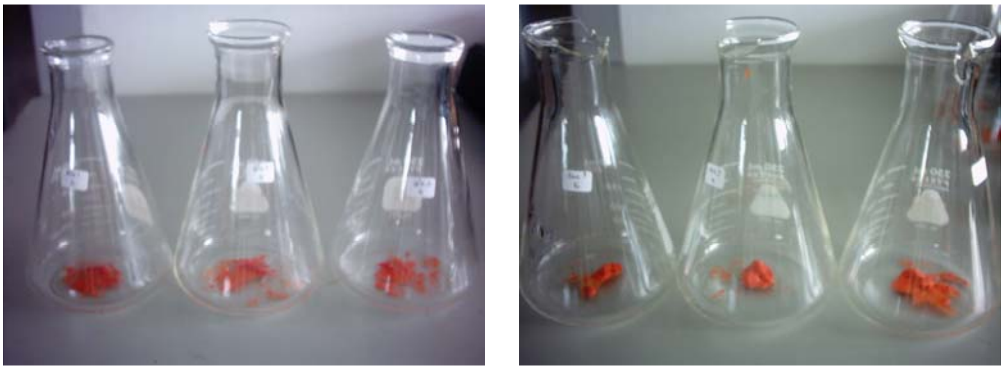
ในการศึกษาวิจัยนี้จะมุ่งที่การเพิ่มการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซึ่งจะใช้ปัจจัย 2 ชนิดด้วยกัน คือ ปัจจัยทางกายภาพ และ ปัจจัยทางเคมีหรือการหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ตั้งแต่กระบวนการเลี้ยงเชื้อจนถึงกระบวนการสกัดสารแคโรทีนอยด์ก่อนจะนำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่เชื้อ CNA058 สร้างขึ้นในแต่ละสภาวะการทดลองด้วย DAD HPLC ดังแสดงในภาพที่ 25-29



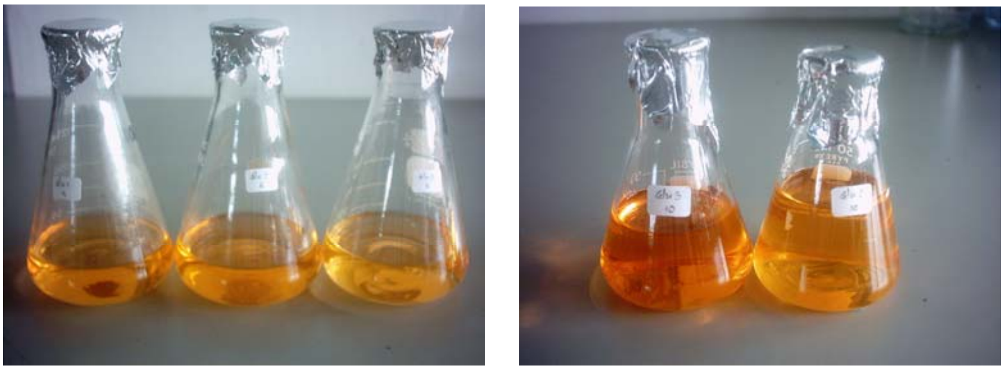
ภาพที่ 25 ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 ในอาหาร FP Medium

Figure 25. Growth of bacterium strain CNA058 in FP medium.



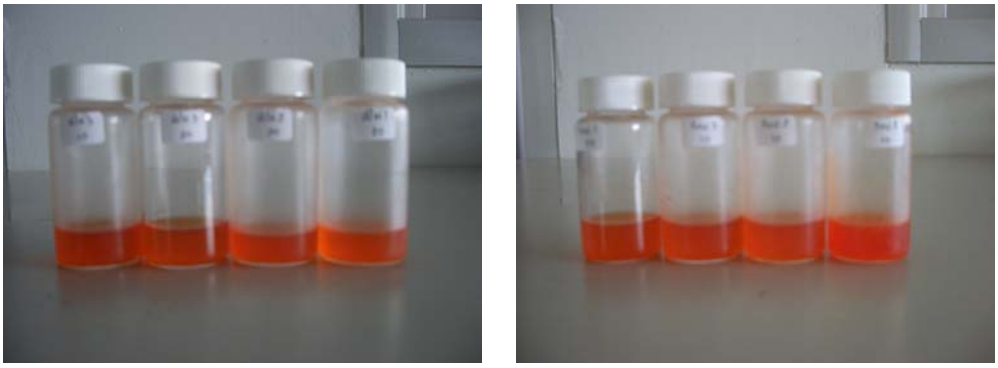
ภาพที่ 26 เซลล์เปียกของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อหลังจากการปั่นเหวี่ยง

Figure 26. Wet cells of bacterium strain CNA058 after centrifugation.



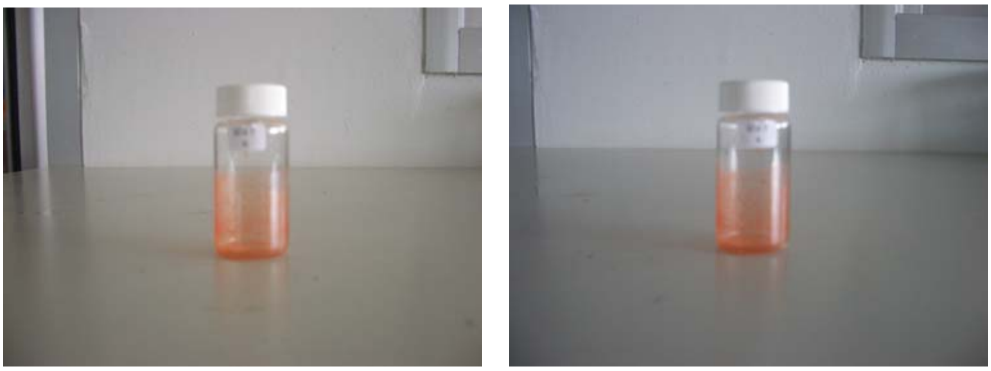
ภาพที่ 27 สารสกัดแคโรทีนอยด์ ในตัวทำละลายผสมระหว่าง methanol : acetone (2:1)

Figure 27. Extraction of carotenoid in solvent mixture of methanol : acetone (2:1).



ภาพที่ 28 สารสกัดแคโรทีนอยด์ใน methanol

Figure 28. Carotenoid extract in methanol.

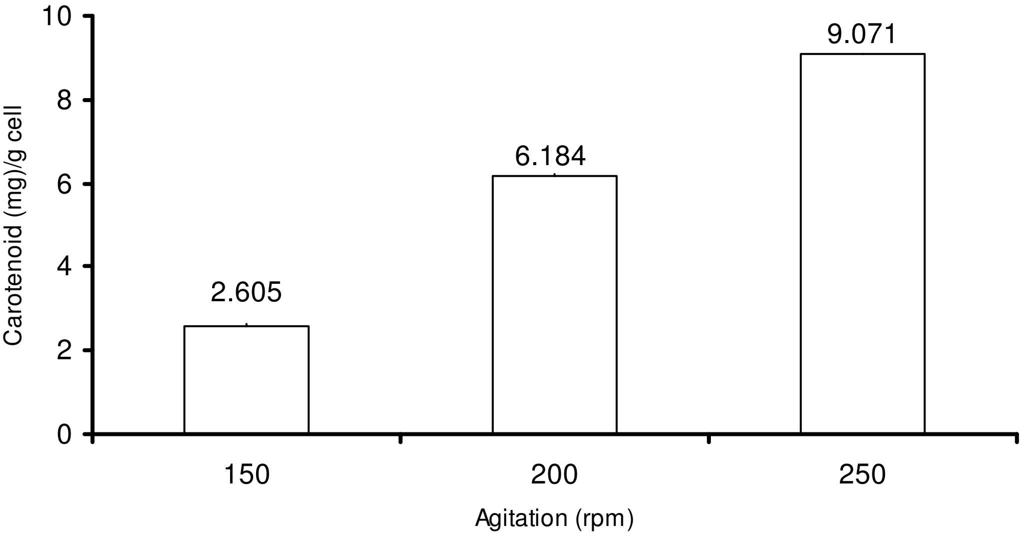


ภาพที่ 29 สารสกัดแคโรทีนอยด์ในรูปแห้งจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058

Figure 29. Dried carotenoid extract from bacterium strain CNA058.

4.1 ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า 250 มล.

ศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธ์ CNA058 ที่คัดเลือกได้เบื้องต้น โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าระหว่างการเลี้ยงเชื้อที่ 150, 200 และ 250 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และวัดปริมาณของแคโรทีนอยด์โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 30

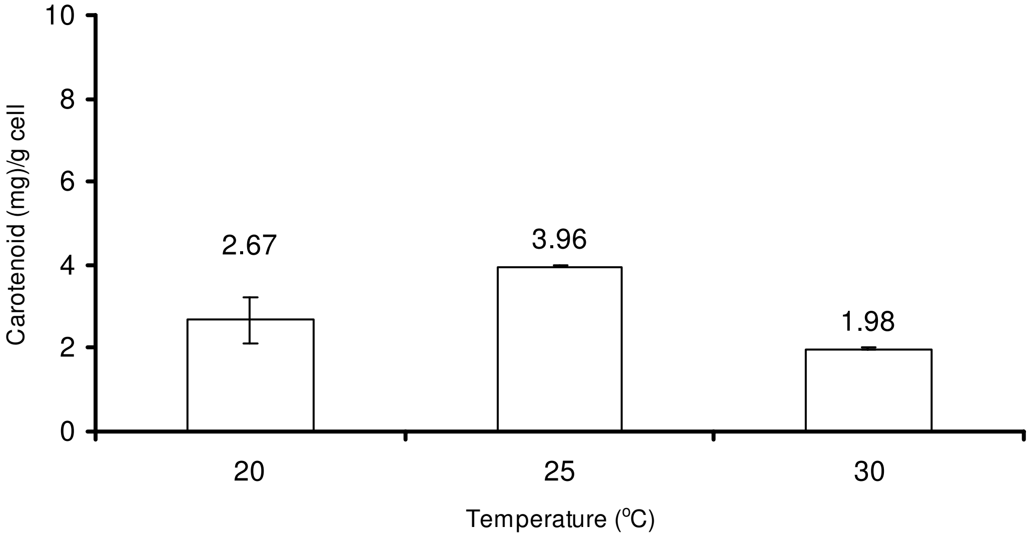


ภาพที่ 30 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058

Figure30. Effect of agitationtion on carotenoid production by bacterium strain CNA058.

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ที่ใช้ความเร็วรอบในการเขย่าต่างกัน คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าการเพิ่มปริมาณการให้อากาศให้ผลดีต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษากระบวนการชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของเบตาแคโรทีนซึ่งจะเปลี่ยนเป็นแคโรทีนอยด์ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนก็จะทำให้เกิดการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มากยิ่งขึ้นทั้งนี้กระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทั่วไปจะสิ้นสุดที่เบตาแคโรทีนแต่มีพืชหรือจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์ต่อไปเป็นแคโรทีนอยด์ได้ เช่นรายงานของ Yamane และคณะ (1997) ที่พบว่าออกซิเจนมีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ กล่าวคือเมื่อออกซิเจนละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่มากพอการผลิตแคโรทีนอยด์ ก็จะมากขึ้น และจากการทดลองของ Fung และ Chen (2005) ในการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ ใน *Chlorella zofingiensis* โดยใช้ H_2O_2 กระตุ้นการผลิต แคโรทีนอยด์และสามารถที่จะเพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์ จาก 9.9 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 12.58 กรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเชื้อสายพันธุ์ CNA058 โดยใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm และวัดปริมาณของแคโรทีนอยด์ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังแสดงในภาพที่ 31



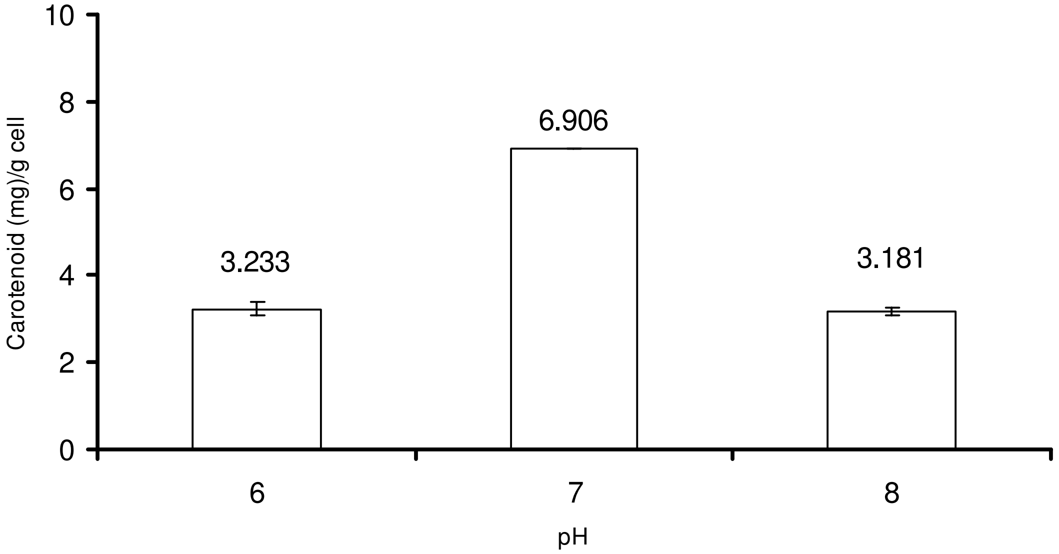
ภาพที่ 31 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058

Figure 31. Effect of temperature on carotenoid production by bacterium strain CNA058.

พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 สามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 3.96 กรัมต่อกรัมเซลล์ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ใช้

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปแทนที่จะส่งเสริมการผลิตแคโรทีนอยด์ กลับจะส่งผลลบต่อการผลิตแคโรทีนอยด์เนื่องจากแคโรทีนอยด์นั้นไวต่อความร้อนจึงเกิดการเสื่อมสภาพหรือเปลี่ยนรูปไปเป็นสารชนิดอื่นได้ โดยในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อจากรายงานของ Ramirez และคณะ(2001)ได้มีการควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ 4 ค่าด้วยกัน คือ 21, 23, 25 และ 27 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่ำก็จะส่งผลทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลงทำให้ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่ำลงไปด้วย

จากการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์ ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธ์ CNA058 ที่คัดเลือกได้เบื้องต้น ที่พีเอช 6, 7 และ 8 ในสภาวะที่มีการเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 200 rpm, อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และวัดปริมาณของแคโรทีนอยด์ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลการทดลองพบว่าที่พีเอช 7 เชื้อสายพันธุ์ CNA058 มีการผลิตแคโรทีนอยด์มากที่สุดดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 ผลของ pH ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058

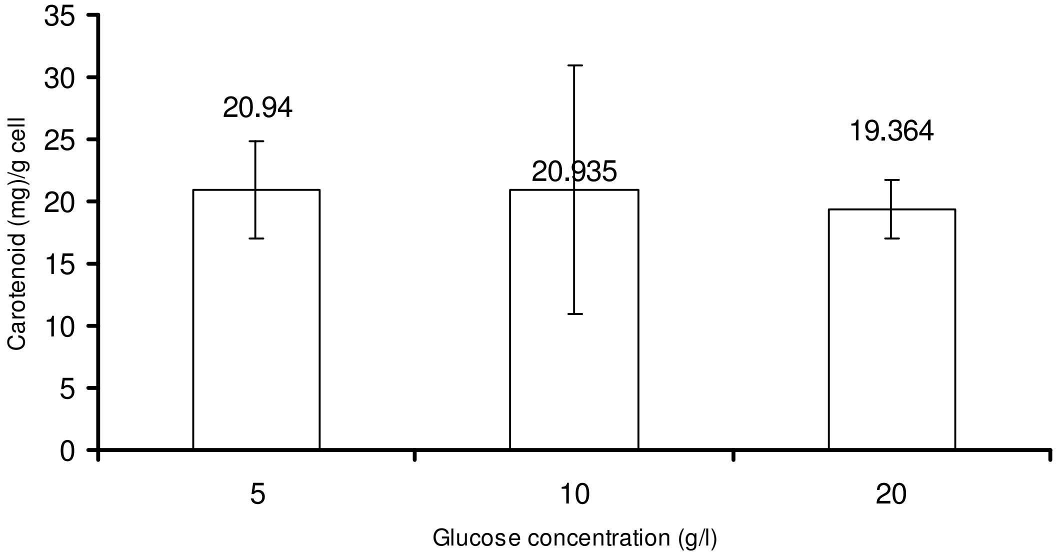
Figure 32. Effect of pH on carotenoid production by bacterium strain CNA058.

โดยเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตแคโรทีนอยด์ที่พีเอช 6, 7, 8 ได้ในปริมาณ 3.233, 6.906 และ 3.181 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโดยปกติน้ำทะเลจะมีพีเอชอยู่ที่ 6.8-7.2 ดังนั้นพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 จึงเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ เพราะเป็นพีเอชที่อยู่ในช่วงของพีเอชของน้ำทะเล ถ้าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าหรือสูงกว่า 7 อาจจะส่งผลต่อการเจริญและอาจจะไปมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ด้วยเช่นกัน

4.2 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

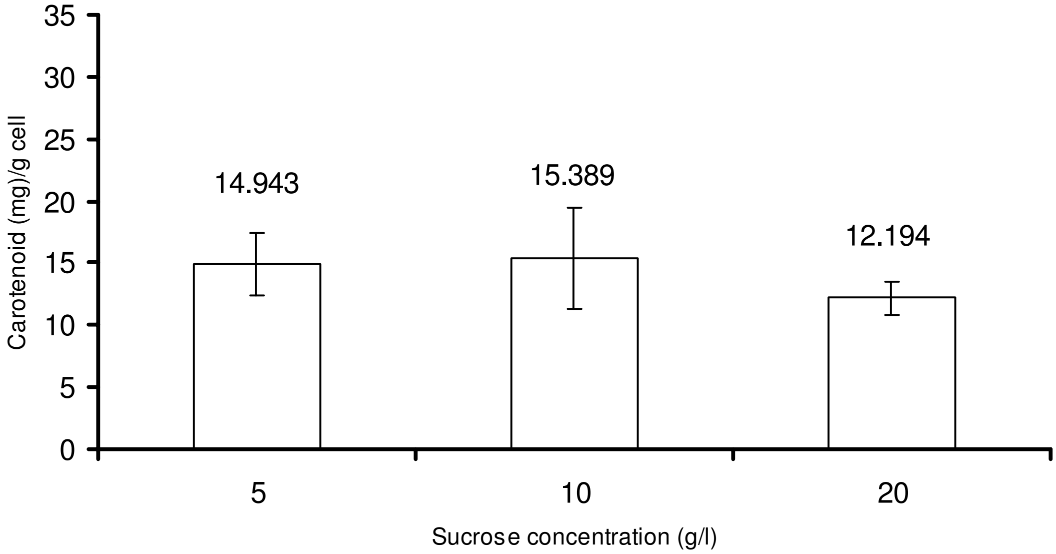
การศึกษาปัจจัยทางเคมีหรือการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ โดยศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปริมาณที่เหมาะสมของสารอาหารดังกล่าวต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ ในการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิดด้วยกัน คือ กลูโคส, ซูโครส, แป้งสาลี และน้ำยาง โดยกลูโคสจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เชื้อแบคทีเรียสามารถที่จะนำไปใช้ได้โดยตรงในกระบวนการ glycolysis จนเกิดการสร้าง isoprenoid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ในขณะที่น้ำตาลซูโครสจะน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วยกลูโคสและฟรุกโตสซึ่งเชื้อต้องสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการ glycolysis ส่วนแป้งสาลีจะเป็นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเชื้อที่จะนำไปใช้จะต้องสร้างเอนไซม์ในการย่อยหลายขั้นตอนเพื่อจะนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตแคโรทีนอยด์ สำหรับน้ำยางที่ประกอบด้วยไอโซปรีนหลายหน่วยต่อกันและคาดว่าจะเป็นพรีเคอร์เซอร์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆจึงนำน้ำยางมาใช้เป็นตัวเร่งในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และในส่วนของการศึกษาหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 จะทดลองโดยใช้ ยีสต์สกัด, น้ำล้างซูริมิ และน้ำนึ่งปลาทูน่า โดยเน้นแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือของโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเมื่อนำไปใช้ในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อแบคทีเรีย

4.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน 4 ชนิดด้วยกัน คือ กลูโคส, ซูโครส, แป้งสาลี และ น้ำยาง โดยใช้ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรที่ 250 rpm, 25 องศาเซลเซียส และวัดปริมาณของแคโรทีนอยด์ ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 33, 34, 35 และ 36 ตามลำดับ



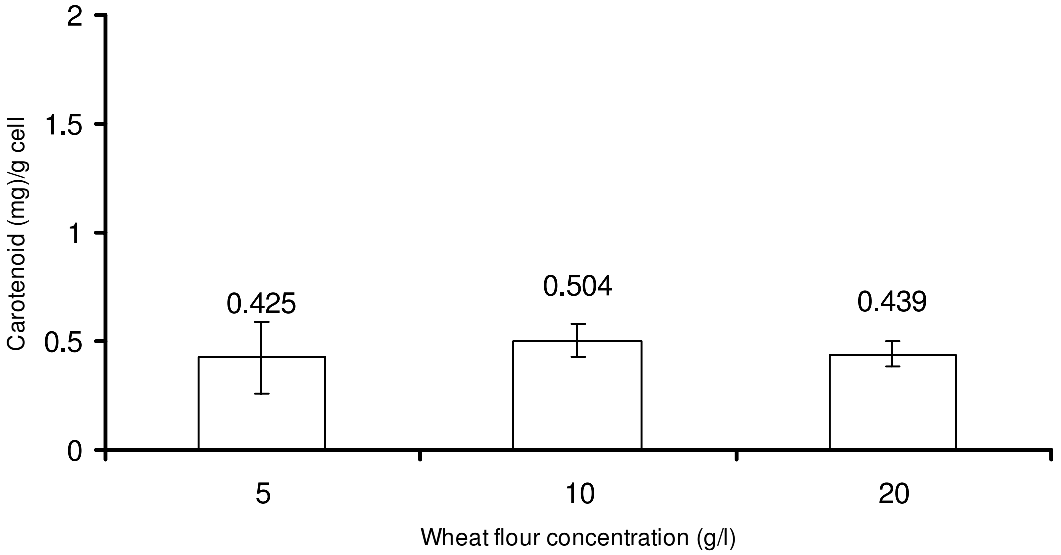
ภาพที่ 33 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Figure 33. Carotenoid content of CNA058 when cultivated in media with different glucose concentrations.



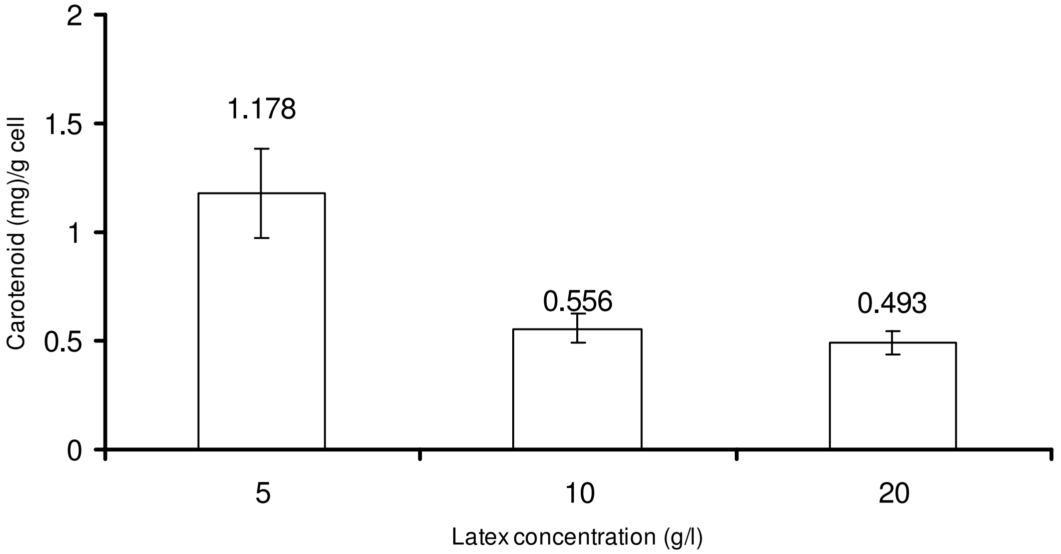
ภาพที่ 34 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Figure 34. Carotenoid content of CNA058 when cultivated in media with different surose concentrations.



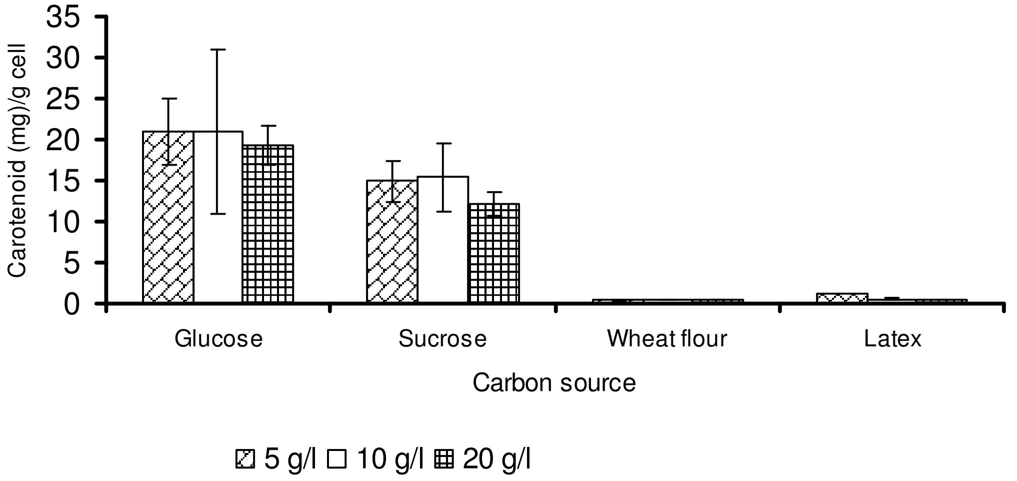
ภาพที่ 35 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีแป้งสาลีที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Figure 35. Carotenoid content of CNA058 when cultivated in media with different wheat flour concentrations.



ภาพที่ 36 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำยางที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Figure 36. Carotenoid content of CNA058 when cultivated in media with different latex concentrations.

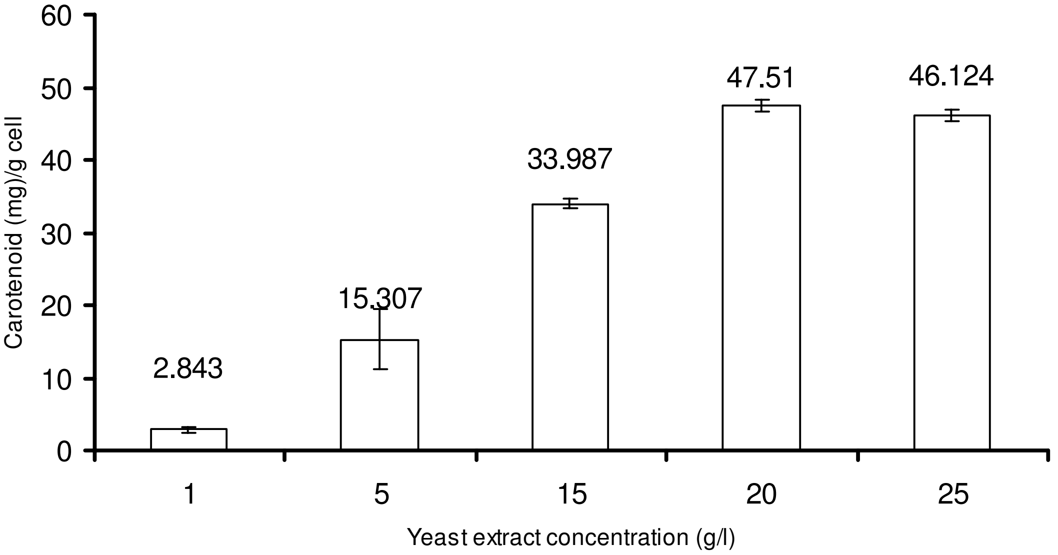


ภาพที่ 37 ผลของแหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดต่อปริมาณแคโรทีนอยด์

Figure 37. Effect of carbon sources on carotenoid production.

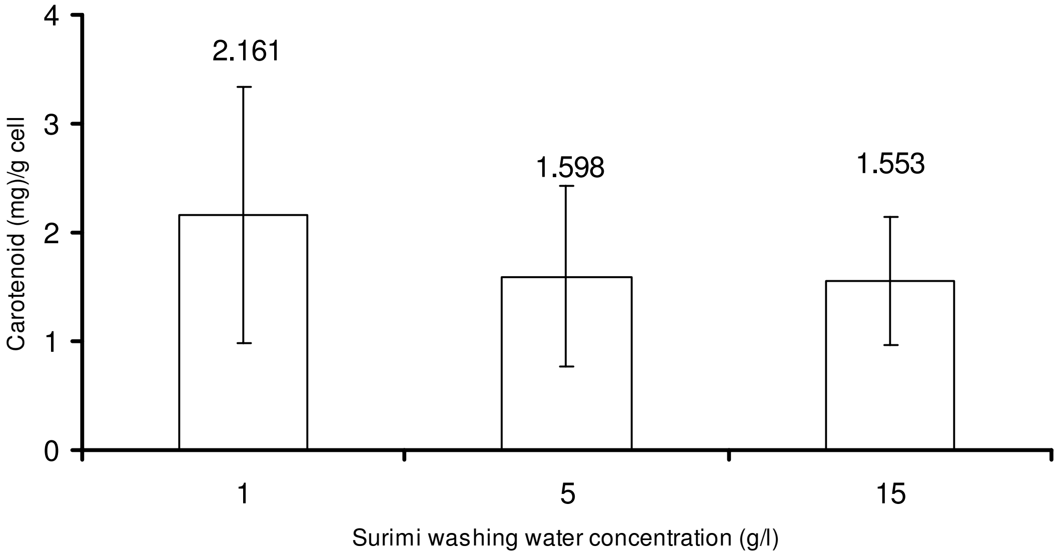
จากการเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด คือ กลูโคส, ซูโครส, แป้งสาลี และ น้ำยาง ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่ 250 rpm, อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่ากลูโคสที่มีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ เพราะเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดแล้ว พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ซูโครส, น้ำยาง และ แป้งสาลี ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลูโคสทั้ง 3 ความเข้มข้นแล้ว พบว่ากลูโคสที่ความเข้มข้น 5 กรัมและ 10 กรัมต่อลิตรจะส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ที่ไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติดังแสดงในภาพที่ 37 ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ คือ 5 กรัมต่อลิตรเนื่องจากไม่ต้องใช้กลูโคสเกินความจำเป็นทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Meyer และ Preez (1994) พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนเชื้อ CNA058 สามารถที่จะผลิตแคโรทีนอยด์ ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นแล้วว่ากลูโคสสามารถที่จะเป็นแหล่งคาร์บอนให้เชื้อมีการสร้างแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด ส่วนแหล่งคาร์บอนอื่นๆนั้น เชื้อจะต้องอาศัยเอนไซม์ต่างๆในการที่จะย่อย แหล่งคาร์บอนนั้นๆให้กลายเป็นหน่วยย่อยที่เชื้อสามารถจะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ ทำให้ปริมาณผลผลิตที่ได้น้อยกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอน

4.2.2 การศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CNA058 โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ ยีสต์สกัด, น้ำล้างซูริมิ และน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 15 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะการใช้อากาศที่ความเร็วรอบเท่ากับ 250 rpm, อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดปริมาณของแคโรทีนอยด์ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 38, 39 และ 40 ตามลำดับ



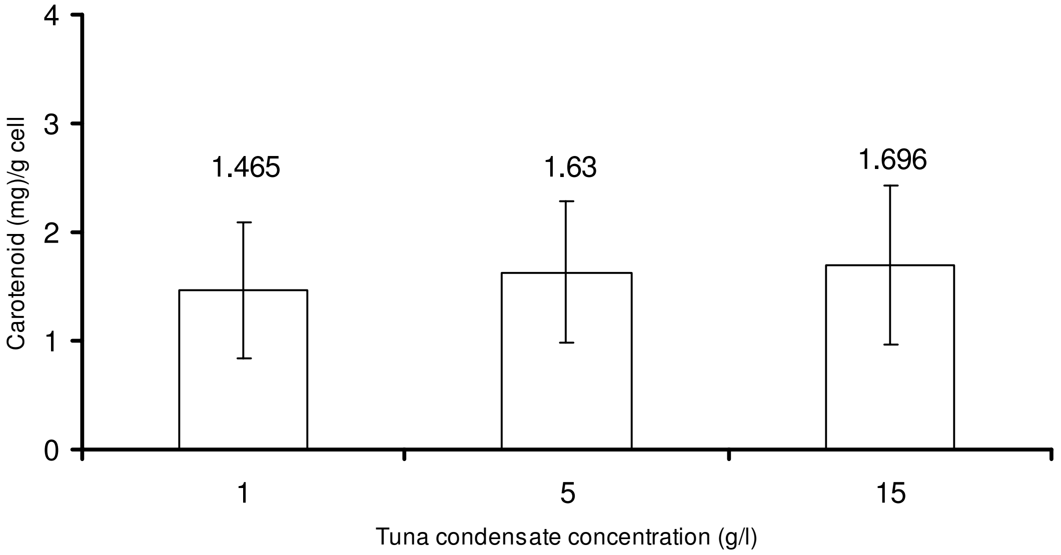
ภาพที่ 38 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มียีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Figure 38. Carotenoid content of CNA058 when cultivated in media with different yeast extract concentrations.



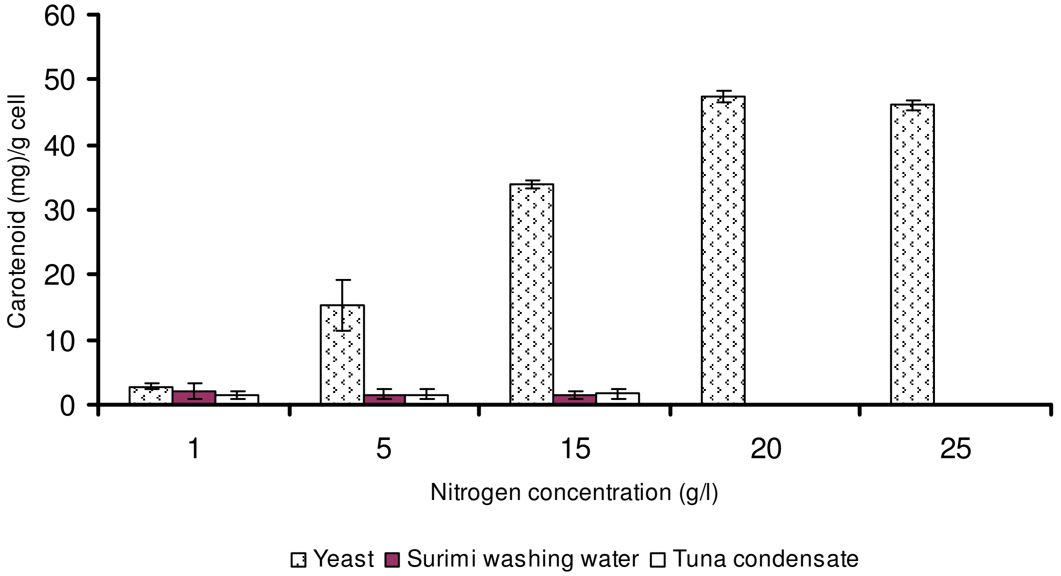
ภาพที่ 39 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำล้างซูริมิที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Figure 39. Carotenoid content of CNA058 when cultivated in media with different surimi washing water concentrations.



ภาพที่ 40 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อCNA058ในอาหารที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

Figure 40. Carotenoid content of CNA058 when cultivated in media with different tuna condensate concentrations.



ภาพที่ 41   ผลของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดต่อปริมาณแคโรทีนอยด์

Figure 41. Effect of nitrogen sources on carotenoid production.

จากการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ ยีสต์สกัด, น้ำล้างซูริมิ และน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 15 กรัมต่อลิตร โดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการให้อากาศที่ความเร็วรอบเท่ากับ 250 rpm, อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ได้มากที่สุด คือ ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้เท่ากับ 47.51 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ รองลงมาคือ น้ำล้างซูริมิ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรผลิตได้ 2.161 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และแหล่งไนโตรเจนที่ผลิตได้น้อยที่สุด คือ น้ำนึ่งปลาทูน่า ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรซึ่งผลิตได้ 1.63 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 41 ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณโปรตีนหรือ total nitrogen ในน้ำล้างซูริมิและน้ำนึ่งปลาทูน่ามีปริมาณที่น้อยกว่ายีสต์สกัด (0.56 %(w/v), 0.05 % (w/v) ตามลำดับ) จึงทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีเช่นเดียวกับยีสต์สกัด

และจากการวิเคราะห์อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้ว พบว่าจะต้องใช้แหล่งไนโตรเจนจากยีสต์สกัดมากกว่าแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นกลูโคสถึง 4 เท่า (กลูโคส 5 กรัมต่อลิตรและยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร) เชื้อ CNA058 จึงจะสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ ได้สูงสุดเท่ากับ 47.51 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

บทที่ 4

สรุป

จากการเก็บตัวอย่างในทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อแยกเชื้อที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์ พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 37 สายพันธุ์ โดยมาจากตัวอย่างประเภทฟองน้ำมากที่สุด คือ ร้อยละ □9 แต่เมื่อนำมาคัดเลือกซึ่งโดยการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ แล้วมีเพียง 4 สายพันธุ์ที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์สูง ได้แก่สายพันธุ์ CNA001, CNA058, CNA074 และ CNA11□โดยที่สายพันธุ์ CNA058 แยกได้จากตะกอนดินสามารถที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.46□มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ CNA058 มีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบในการเขย่า □50 รอบต่อนาที โดยพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงคือ □5 องศาเซลเซียส โดยมีการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 47.51 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสที่มีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรจะส่งผลให้การผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด คือ □0.94 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และอัตราการเจริญ, ปริมาณสารสีทั้งหมดและแคโรทีนอยด์ในการเจริญของเซลล์ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน คือ ยีสต์สกัด, น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำล้างซูริมิ จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด คือ 47.51 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักที่ความเข้มข้น □0 กรัมต่อลิตร โดยอาหารสูตรที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน,ไนโตรเจนและ ธาตุอาหารที่จำเป็นจะช่วยในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ *Sarcina litoratis, Cellulomonas dehydrogenans, Halobacterium cutirubrum, Brevibacterium* and *Flavobacterium* ในทางการค้าเชื้อสายพันธุ์ CNA058 มีประสิทธิภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ที่มากกว่า และเมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วสามารถที่จะอธิบายได้ว่าแหล่งของคาร์บอน, ไนโตรเจนและธาตุอาหารที่จำเป็นมีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

และในการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียจากทะเลสายพันธุ์ CNA058 โดยการวิเคราะห์ของ 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Gordonia terrae* ที่ระดับความคล้ายคลึงเท่ากับร้อยละ 93

เอกสารอ้างอิง

มะลิ บุณยรัตนผลิน, กิจการ ศุภมาตย์ และ ชูศักดิ์ บริสุทธ์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ:VIII. ผลของสารสี(astaxanthin) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบของเลือดระบบภูมิคุ้มกันโรคและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. ว.สงขลานครินทร์ วทท.22 (ฉบับพิเศษ) : 633-639.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2542. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.น.179-200.

Aksu, Z. and Eren, A.T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochem. 40:2985-2991.

Andrews, A.G., Phaff,H.J. and Starr,M.P. 1976. Carotenoids of *phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. Phytochem. 15:1009-1011.

Appleton, G.S., Kieber, R.J. and Payne, W.J. 1955. The sterol content of fungi II. Screening of representative yeasts and molds for sterol content. Appl. Microbiol. 3 : 249-251.

Bernhard, K.M. and Friedrich,B. 1995. Spatially and temporally defined molecular knockouts. Curr. Biol. 11:112-123.

Bjorland, T., Liaaen-Jensen, S. and Thorndsen, J. 1989. Carotenoids of marine chrysophyte *Pelagococcus subviridis* from Norwegian Sea. Phytochem. 28:3347-3353.

Bocanegra, A.R.D., Legarreta, I.G., Jeronimo, F.M. and Campocosio, A.T. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technol. 92:209-214.

Borowitzka, 1989. Microalgal Biotechnol. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. 1995. Carotenoids Vol.1A: Isolationand Analysis. Birkhauser Verlag, Basel.

Chen, F. and Fung, P.I. 2005. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. Process Biochem. 40:3491-3496.

Chien, Y.H. and Jeng, S.C. 1992. Pigmenttation of kurama prawn, *Panaeus japonicus* bate by various pigment sources and levels and feeding regimes. Aquaculture.102:333-346.

Ciegler, F. 1965. Microbial carotenogenesis. Adv. Appl. Microbiol. 7:1-34.

Doi, M., Tsunemi, Y., Asahi, S., Akiyama, S. and Nakao, Y. 1988. *Bacillus subtilis* mutants producing uridine in high yields. Agric. Biol. Chem. 52 : 1479-1484.

Dufosse, L. and Echanove, M.C. 2005. The last step in the biosynthesis of ary carotenoids in the cheese ripening bacteria Brevibacterium linens ATCC 9175 (*Brevibacterium auranticum* sp. nov.) involes a cytochrom P450-depent monooxygenase. Food Res. Int. 38:967-973.

Dulancy, E.L. 1957. Preparation of ergosterol containing yeast. U.S. Patent 2,817,624.

Durrer, S., Schlmid, P. and Schlumpf, M. 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-an update. Toxicology. 205:113–122.

Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. 1997. The carotenoids as anti-oxidants. Photochem. Photobiol. 41:189-200.

Erasun, C.E. and Johson, E.A. 2004. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum.* FEMS Yeast Res. 4:511- 519.

Eugster, H. 1995. Carotenoids Vol.1A: History: 175 years of carotenoid chemistry. Birkhauser Verlag Basel.

Fast, A.L. and Menasaveta, P. 2000. Some recent issue and innovations in marine shrimpond culture. Rev. Fish. Sci. 8 :151-233.

Fiasson, J.L., Petersen, R.H., Bouchez, M.P. and Aspin, N. 1970. The effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite and assimilation by *Dunaliella tertiolecta*. J. Gen. Microbiol. 54:327-336.

Florent, J. and Ninet, L. 1979. Vitamin B_{12}. Microbiol. Technol. 2:497-519.

Fontana, J.D., Czeczuga, B., Bonfim, T.M.B., Chociai, M.B., Oliveira, B.H., Guimaraes, M.F. and Baron, M. 1996. Bioproduction of carotenoids:The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. Bioresource Technol. 58:121-125.

Fung, P. and Chen, F. 2005. Employment of oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. Process Biochem. 40:3491-3496.

Goodwin, T.W. 1972. Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. Ind. Microbiol. 11 : 29-88.

Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama, K., Yamashita, E. and Terada, H. 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochem. Biophys. Acta. 1512:251-258.

Guerin, M., Huntlay, M.E. and Olaizula, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol. 5:130-145.

Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D. 1992. Natural food colorants. Blackie, Glasgow and London.

Iigusa, H., Yoshida, Y. and Hasunuma, K. 2005. Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. FEBS Letters. 579:4012-4016.

Izumi, Y. and Yamada, H. 1989. Microbial production of biotin, Biotechnology of vitamins, Pigments and Growth Factors. *In* E.J. Vandamme. Appl. Sci. Res. 5:231-256.

Jensen, S.L., Gesser, B., Deleuran, B. and Lund, b. 1995. Interleukin-8 induces its own production in CD4T lyphocytes : A process regulated by interleukin 10. Biochem. Bioph. Res. 3:660-669.

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

Johana, M.O., Ake, L., Annette, P. and Peter, H. 2003. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. J. Pharm. Sci. 19:299-304.

Katsuhiko, F., Eri, I., Hisatoshi, N., Osamu, O. and Akihiko, S. 2006. Isolation of the non-fastidious microalga with asataxanthin-accumulating property and its potentialfor application to aquaculture. Aquaculture. 261:285-293.

Kopsel, C., Moltgen, H., Schuch, H., Auweter, H., Kleinermanns, K., Martin, H.D. and Bettermann, H. 2005. Structure investigations on assembled astaxanthin molecules. J. Mol. Struct. 750:109-115.

Latscha, T. 1991 Carotenoid in aquatic animal nutrition. In proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. Thailand and Indonesia. 68-79.

Li, H.B. and Chen, F. 2001. Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococcum* sp. By high-speed counter-current chromatography. Chromatography A, 925:133-137.

Lim, G.B., Lee, S.Y., Lee, E.K., Haam, S.J. and Kim, W.S. 2002. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. J. Biochem. Eng. 11:181- 187.

Liu, Y.S., Wu, J.Y. and Ho, K.P. 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. J. Biochem. Eng. 27:331-335.

Lopez, M., Arce, L., Garrido, J., Rios, A. and Valcarcel, M. 2004. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. Talanta. 64:726-731.

Lorenz, R.T. 1998. A technical review of Natu Rose TM *Haematococeus* algae meal. Nature. 4: 209-220.

Lorenz, R.T. and Cysewski R. 2000. Commercial potential for *Heamatococus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Tech. Phys+. 18:90-110.

Malea, M.C.G., Brindley, C., Rio, E.D., Acien, F.G., Fernandez, J.M. and Molina, E. 2005. Modelling of and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. Biochem. Eng. J. 26:107-114.

Meyer, P.S. and Preez, J.C.D. 1994. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. Appl. Microbiol. Bitechnol. 40:780-785.

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

Misawa, N. and Shimada, H. 1998. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. Biotechnol. 59:169-181.

Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure. Appl. Chem. 63:141-146.

Nageswara, R.R., Naseeruddin, A.S. and Nageswara, R.B. 2005. Preparative isolation and charaterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography. Chromatography.1076:189-192.

Ninet, L. and Renaut, J. 1979. Carotenoids. Microbiol. Technol 2:529-544.

No, H.K. and Storebakken, T. 1992. Pigmentation of rainbow trout with astaxanthin and cantaxanthin in freshwater and seawater. Aquaculture. 101:123-134.

Ozaki, M., Tagiwa, S. and Kimura, T. 1972. The accumulation of orotic acid and orotidine by a mutant of *Streptomyces showdoensis*. Amino Acid. Nucleic. Acids. Res. 26 : 24-30.

Palo, M.A., Vidal-Adeva, L. and Maceda, L. 1960. Study on ang-kak and its production. Phillipine J. Sci. Soc. 89 :1-22.

Peter, S.M. and James, C.D.P. 1994. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemmostat culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:780-785.

Perlman, D. 1977. Microbial production of therapeutic compounds. Microbiol. Technol 20:251-307.

Pfander, H., Deli, J., Molnar, P., Matus, Z., Toth, G. and Traber, B. 2001. Prenigroxanthin [(all-*E*,3*R*,3%*S*,6%*S*)-b,g-carotene-3,3%,6%-triol], a novel carotenoid from red paprika (*Capsicum annuum*). Tetrahedron Lett. 42:1395–1397.

Ramirez, J., Gutierrez, H. and Gschaedler, A. 2001. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodogy. Biotechnol. 88:259-268.

Rao, R.N., Alvi, S.N. and Rao, B.N. 2005. Preparative isolation and characterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography. Chromatography A, 1067:189-192.

Rengpipat, S., Phianphak,W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. 167:301-313.

Ross. I. K. 1979. Biology of fungi. McGraw-Hill, New York.

Sachindra, N.M. and Mahendrakar, N.S. 2005. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. Bioresource Technol. 96:1195-1200.

Sarada, R., Tripathi, U. and Ravishankar, G.A. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochem. 37:623-627.

Schoefs, B. 2003. Chlorophyll and carotenoid analysis in food product. A practical case-by-case view. Anal. Chem. 22 :115-123.

Shimizu, N. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. Fisheries. Sci. 62 :134-7.

Shimizu, S., Esumi, A., Komaki, R. and Yamada, H. 1984. Production of coenzyme A by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes* resistant to oxypantetheine. Appl. Environ. Microbiol. 48 : 1118-1122.

Shimizu, S. and Yamada, H. 1989. Microbial production of polysaturated fatty acids, Biotechnology of Vitamins, Pigment and Growth Factors. Appl. Sci. 3: 105-121.

Silhankova, L. 1985. Genetic control of thiamine excretion and of its suppression in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Inst. Brew. 91 : 238-241.

Stahl, W., Sies, H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim. Biophys. Acta. 1740:101-107.

Sutter, R.P. 1975. Mutations affecting sexual development in Phycomyces blakesleeanus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72:127-300.

Tani, Y. 1989. Microbial production of vitamin K_2 and vitamin K_1, Biotechnology of Vitamins, Pigment and Growth Factors. *In* E.J. Vandamme. Appl. Sci. 5:123-136.

Tani, Y., Nagamatsu, T., Izumi, Y. and Ogata, K. 1972. Studies on vitamin B_6 metabolism in micro-organisms. Part XI. Extractcellular formation of vitamin B_6 by marine and terrestrial micro-organisms and its control. Agric. Biol. Chem. 36 : 189-197.

Tani, Y. and Tsumura, H. 1989. Screening of tocopherol-production microorganisms and α-tocopherol production by *Euglena gracilis Z.* Agric. Biol. Chem. 53 : 305-312.

Tinoi, J., Rakariyatham, N. and Deming, R.L. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process.Biochem. 40:2551-2557.

Torissen, O.J. 1996. Effective use of carotenoids for salmon flesh pigmentation. Aquat. Sci. 2:45-48.

Van Lanen, J.M. 1954. Production of vitamins others than riboflavin. Chemical. 2:191-216.

Visser, H., Ooyen, V. and Verdoes, J.C. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. FEMS Yeast Res. 4:221-231.

Vustin, M.M., Belykh, E.N. and Kishilova, S.A. 2003. Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. Microbiol. 73:751-757.

Waldenstedt, L., Inborr, J., Hansson, I., Elwinger, K. 2003. Effects of astaxanthin-rich algal meal (*Haematococus pluvalis*) on growth performance,caecal campylobacter and clostridial counts and tissue astaxanthin concentration of broiler chickens. Anim. Feed Sci. Tech. 108:119-132.

Wang, W., Yu, L. and Zhou, P. 2005. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xantophyllomyces dendrorhous*. Bioresource Technol. 3:25-32.

Yamane, Y.I., Higashida, K., Nagashimada, Y., Kakizono, T. and Nishio, N. 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch culture: Kinetic and stoichiometric analysis. Appl. Environt. Microbiol. 63: 4471-4478.

Yokoyama, A., Shizuri, Y. and Misawa, N. 1998. Production of carotenoids, astaxanthin glucosides, by *Escherichia coli* transformants carrying carotenoid biosynthetic genes. Tetrahedron Lett. 39:3709-3712.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. FP Medium (ดัดแปลงจาก Galaup และคณะ, 2005)

D-glucose	20	กรัม
Casamino acid	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
Sea water	1	ลิตร

นำส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดละลายในน้ำทะเลที่กรองแล้วปริมาตร 1 ลิตร โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2. Nutrient broth

Nutrient broth	8	กรัม
Sea water	1	ลิตร

นำ nutrient broth ละลายในน้ำทะเลปริมาตร 1 ลิตร โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient agar

Nutrient broth	8	กรัม
Agar	20	กรัม
Sea water	1	ลิตร

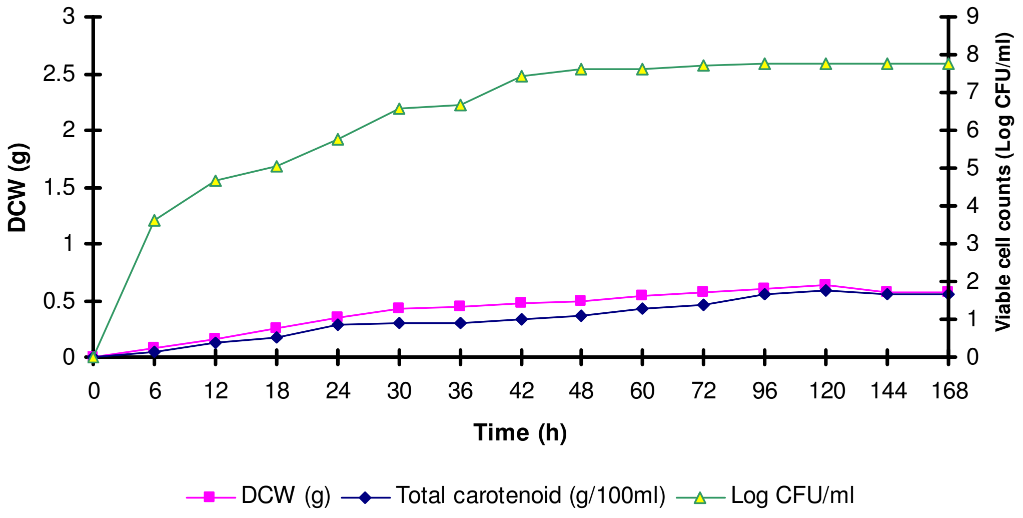
นำ nutrient broth ละลายในน้ำทะเลที่กรองแล้วปริมาตร 1 ลิตร โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานของเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี

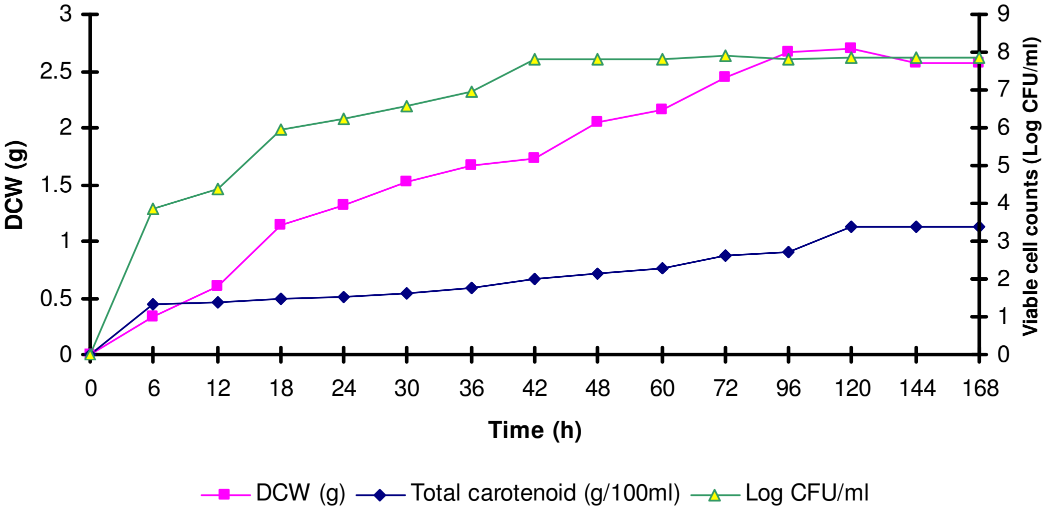
1. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อสายพันธ์ CNA058

เตรียมกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร nutrient broth เก็บตัวอย่างหาน้ำหนักเซลล์ทุกวัน โดยใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ด้วยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์) โดยนำเชื้อและอาหารไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสแล้วนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างเวลาการเลี้ยงเชื้อกับน้ำหนักเซลล์แห้ง



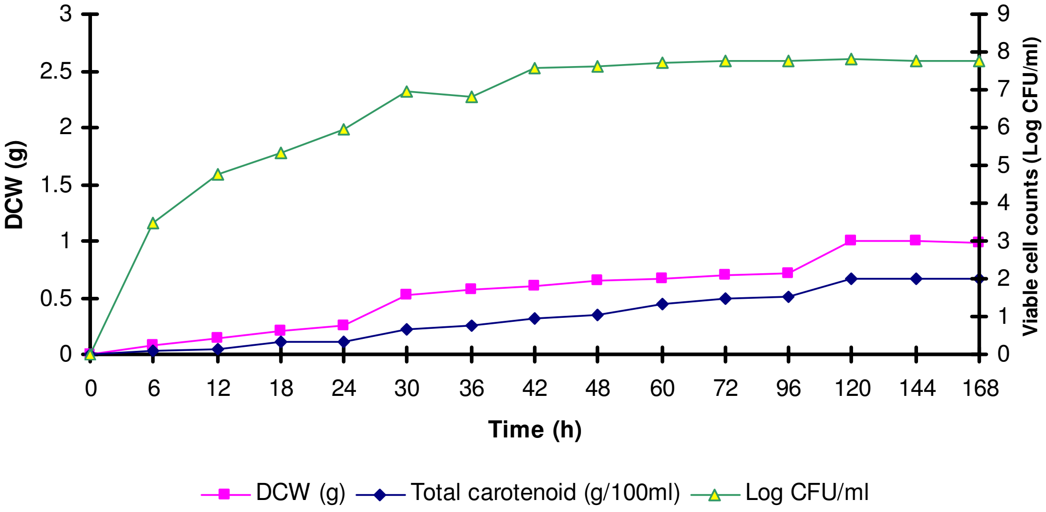
ภาพที่ 42 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth สภาวะที่มืด

Figure 42. Growth curve of CNA058 in nutrient broth in dark condition.



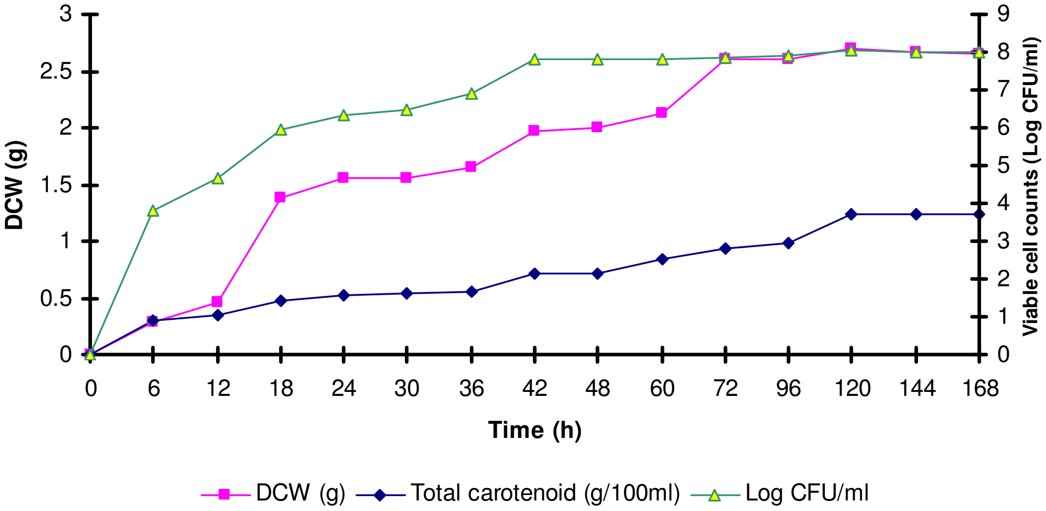
ภาพที่ 43 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ในอาหารสูตร FP สภาวะที่มืด

Figure 43. Growth curve of CNA058 in FP medium in dark condition.



ภาพที่ 44 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ในอาหาร nutrient broth สภาวะที่สว่าง

Figure 44. Growth curve of CNA058 in nutrient broth in light condition.

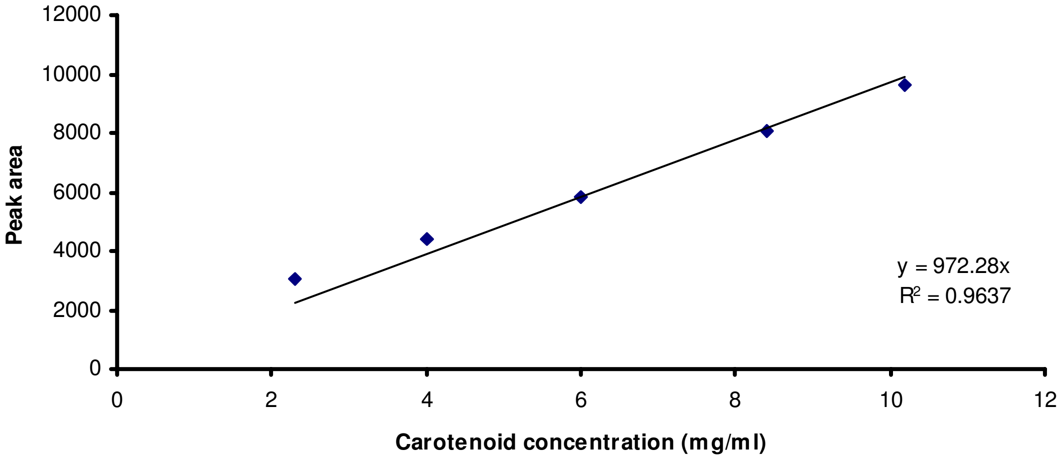


ภาพที่ 45 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์ CNA058 ในอาหารสูตร FP สภาวะที่สว่าง

Figure 45. Growth curve of CNA058 in FP medium in light condition.

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานของแคโรทีนอยด์

เตรียมสารมาตรฐานแคโรทีนอยด์ในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน นำไปวัดปริมาณพื้นที่ใต้กราฟด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Diode Array Detector เป็นตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 และ 474 nm. สำหรับเปรียบเทียบกับสารสกัดแคโรทีนอยด์ ที่สกัดได้จากเชื้อสายพันธุ์ CNA058



ภาพที่ 46 กราฟมาตรฐานของแคโรทีนอยด์

Figure 46. Standard curve of carotenoid.

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่ 12 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อที่แยกได้จากทะเล

Table 12. Growth and carotenoid production of marine bacterium.

Strain	Bottle weight (g)	content weight (g)	carotenoid (g)
PK5.1	13.5074	13.5228	0.0154
PK14.2	13.2114	13.2344	0.0230
PK18.1	13.5286	13.5466	0.0180
PK18.2	13.2493	13.2695	0.0202
PK21.1	13.0935	13.1150	0.0215
PK22.1	13.2346	13.5353	0.3007
PK29.1	13.5224	13.5460	0.0236
PK29.2	13.5044	13.5252	0.0208
PK34.1	13.4243	13.4185	0.0142
PK34.2	13.0248	13.0424	0.0176
CNA001	13.1984	13.2089	0.0105
CNA004	13.1934	13.2104	0.0170
CNA006	13.2896	13.3037	0.0141
CNA008	13.2184	13.2320	0.0136
CNA010	13.2733	13.2865	0.0132
CNA013	13.1636	13.1726	0.0090
CNA014	13.1573	13.1653	0.0080
CNA018	13.1754	13.1834	0.0080
CNA022	13.3031	13.3074	0.0043
CNA027	13.4059	13.4705	0.0646
CNA033	13.1843	13.3333	0.1490

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Table 12. (Cont.)

Strain	Bottle weight (g)	content weight (g)	carotenoid (g)
CNA034	13.2339	13.2461	0.0122
CNA035	13.2177	13.2741	0.0564
CNA051	13.2805	13.2957	0.0152
CNA053	13.2105	13.2315	0.0210
CNA054	13.1148	13.1288	0.0140
CNA058	13.3542	13.3655	0.0113
CNA061	13.6871	13.6981	0.0110
CNA063	13.2251	13.2681	0.0430
CNA074	13.1539	13.1928	0.0389
CNA075	13.1224	13.2576	0.1352
CNA112	13.3639	13.3818	0.0179
CNA113	13.5842	13.5994	0.0152
CNA114	13.4102	13.5552	0.1450
CNA142	13.0312	13.0522	0.0210
CNA148	13.5001	13.5044	0.0043
CNA149	13.2657	13.2811	0.0154

ตารางที่ 13 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA001, 058 074 และ 112

Table 13. Growth and carotenoid production of marine bacterium strain CNA001, 058 074 and 112.

Strain	cells weight (g/l)	carotenoid (g/g cell)
CNA001	47.2	0.1326
CNA058	51.4	0.2122
CNA074	116.1	0.5287
CNA112	52.9	0.399

ตารางที่ 14 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 ที่ความเร็วรอบ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที

Table 14. Growth and carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 at 150, 200 and 250 rpm.

Agitation(rpm)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
150	6	2.596
150	5.7	2.62
150	61	2.60
200	5.7	6.16
200	5.5	6.216
200	5.8	6.178
250	4.2	9.068
250	4.5	9.075
250	4.3	9.072

ตารางที่ 15 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส

Table 15. Growth and carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 at 20, 25 and 30 °C

Temperature(°C)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
20	6.2	2.16
20	6.5	3.26
20	5.9	2.59
25	10.1	3.99
25	10.8	3.97
25	11.2	3.93
30	11.8	1.99
30	10.9	1.95
30	12.0	2.00

ตารางที่ 16 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 ที่พีเอช 6, 7 และ 8

Table 16. Growth and carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 at pH 6, 7 and 8.

pH	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
6	19.5	3.323
6	19.9	3.322
6	19.2	3.055
7	10.8	6.905
7	11.0	6.910
7	10.3	6.904
8	11.5	3.235
8	11.1	3.077
8	11.4	3.234

ตารางที่ 17 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

Table 17. Carotenoid production from marine bacterium strain CNA058 by glucose concentration is carbon source at 5, 10 and 20 g/l.

Glucose (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
5	2.1	25.244
5	2.2	20.146
5	1.7	17.431
10	1.5	14.244
10	2.3	16.048
10	5.1	32.514
20	2.8	17.494
20	2.4	22.007
20	5	18.591

ตารางที่ 18 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ 058 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

Table 18. Carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 with the sucrose concentrations is at 5, 10 and 20 g/l.

Sucrose (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
5	5.7	17.804
5	8.1	14.090
5	5.9	12.918
10	12.6	10.179
10	6.5	16.988
10	7.6	18.460
20	5.7	12.044
20	5.5	10.904

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (Cont.)

Sucrose (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
20	6.3	13.634

ตารางที่ 19 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ 058 โดยใช้แป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

Table 19. Carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 with the wheat flour concentrations at 5, 10 and 20 g/l.

Wheat flour (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
5	41.5	0.233
5	16.1	0.526
5	13.9	0.517
10	23.7	0.473
10	28.8	0.449
10	28.9	0.590
20	62.2	0.374
20	61.3	0.482
20	62.4	0.461

ตารางที่ 20 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ 058 โดยใช้น้ำยางเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

Table 20. Carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 with the latex concentrations at 5, 10 and 20 g/l.

Latex (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
5	8.8	0.944
5	6.2	1.280

ตารางที่ 20 (ต่อ)

Table 20. (Cont.)

Latex (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
5	7.3	1.310
10	9.9	0.483
10	14.3	0.578
10	12.3	0.608
20	22.8	0.469
20	21.8	0.457
20	14.8	0.554

ตารางที่ 21 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1, 5, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

Table 21. Carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 with the yeast extract concentrations at 1, 5, 15, 20 and 25 g/l.

Yeast (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
1	3.3	3.320
1	3.8	2.535
1	3.9	2.674
5	9.7	12.033
5	9.9	14.063
5	9.5	19.826
15	22.3	34.641
15	23.0	33.596
15	23.0	33.726
20	25.7	47.900
20	26.2	45.523
20	24.8	48.109

ตารางที่ 21 (ต่อ)

Table 21. (Cont.)

Yeast (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
25	26.3	46.776
25	26.7	46.377
25	28.8	45.219

ตารางที่ 22 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 โดยใช้น้ำล้างซูริมิเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 15 กรัมต่อลิตร

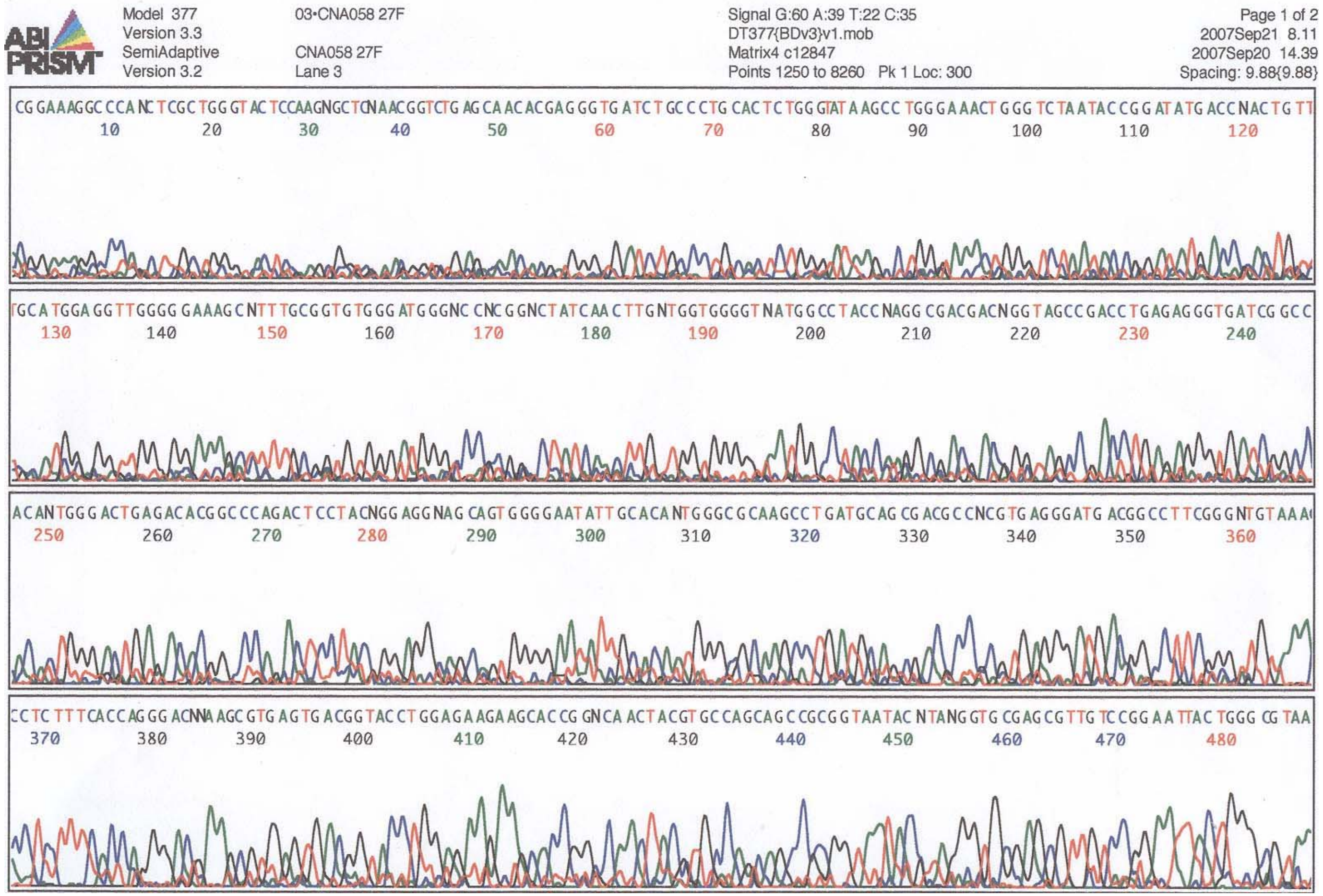
Table 22. Carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 with the surimi washing water concentrations at 1, 5 and 15 g/l.

Surimi washing water (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
1	1.9	1.873
1	1.5	1.156
1	1.4	3.455
5	1.8	2.554
5	1.9	0.985
5	1.6	1.257
15	2.0	1.811
15	2.0	1.964
15	2.0	0.886

ตารางที่ 23 การผลิตแคโรทีนอยด์ของเชื้อ CNA058 โดยใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 15 กรัมต่อลิตร

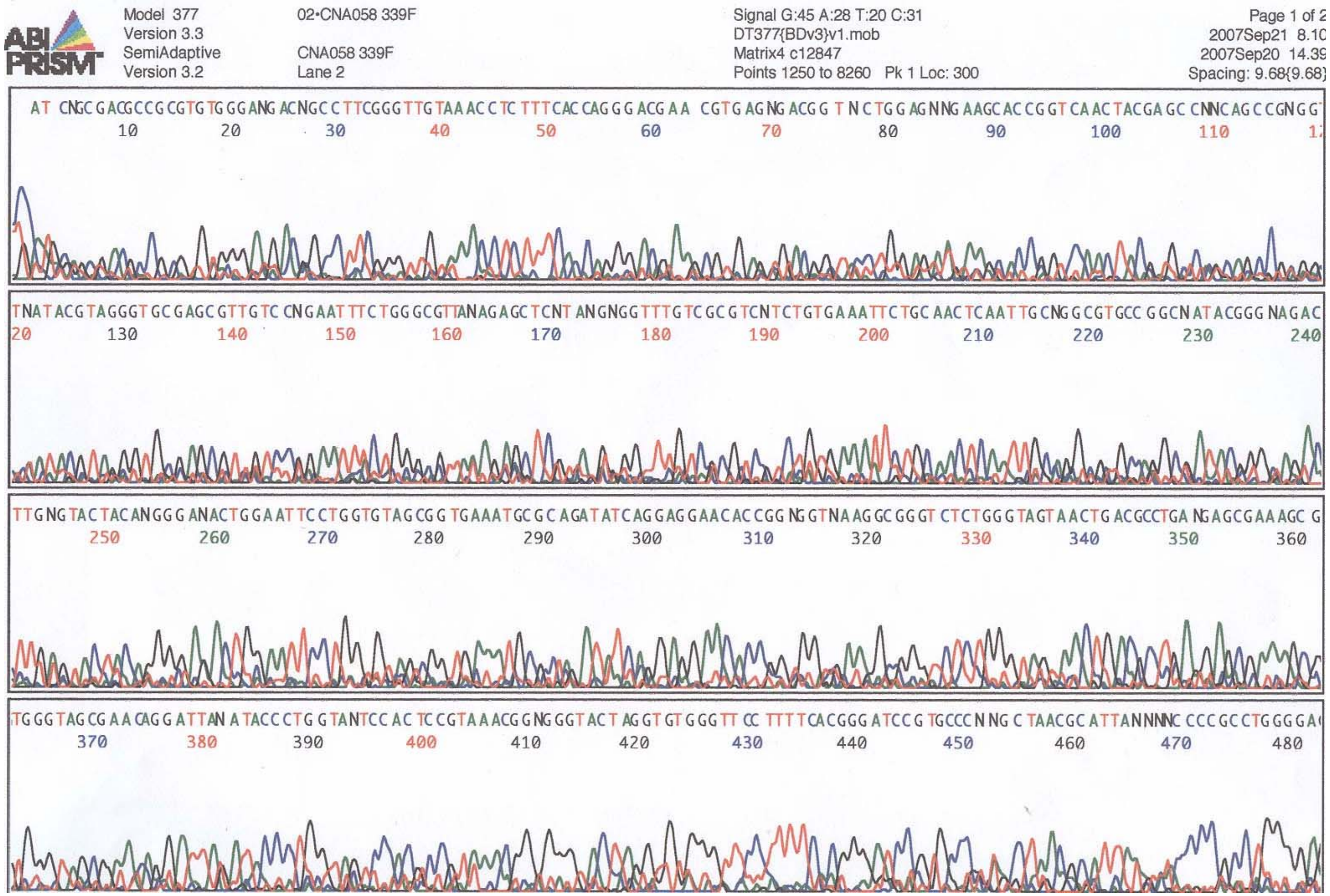
Table 23. Carotenoid production of marine bacterium strain CNA058 with the tona condensate concentrations at 1, 5 and 15 g/l.

Tuna condensate (g/l)	cells weight (g/l)	total carotenoid (mg)/g cell
1	1.7	0.745
1	1.9	1.904
1	2.0	1.746
5	2.0	2.066
5	1.9	0.875
5	1.8	1.949
15	2.3	1.719
15	2.2	0.949
15	2.3	2.420



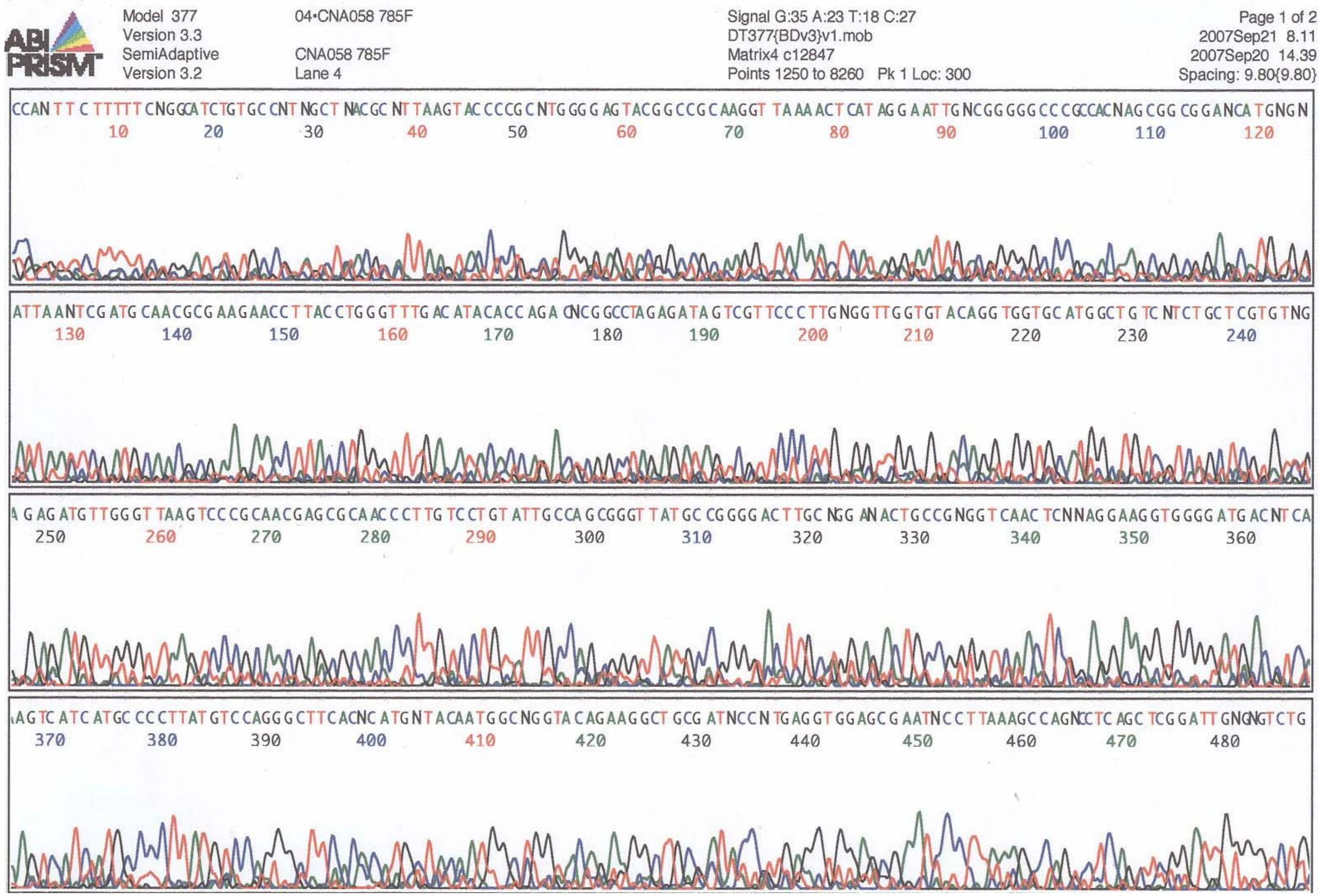
ภาพที่ 47 อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 27F

Figure 47 Electropherogram of CNA058 with 27F primer



ภาพที่ 48 อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 33 F

Figure 48 Electropherogram of CNA058 with 33 F primer



Model 377
Version 3.3
SemiAdaptive
Version 3.2

04•CNA058 785F

CNA058 785F
Lane 4

Signal G:35 A:23 T:18 C:27
DT377{BDv3}v1.mob
Matrix4 c12847
Points 1250 to 8260 Pk 1 Loc: 300

Page 1 of 2
2007Sep21 8.11
2007Sep20 14.39
Spacing: 9.80{9.80}

CCANTTCTTTTTCNGGCATCTGTGCCNTNGCTNACGCNTTAAGTACCCCGCNTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCATAGGAATTGNCGGGGGCCCGCCACNAGCGGCGGANCATGNGN

ATTAANTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGACNCGGCCTAGAGATAGTCGTTCCCTTGNGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCNTCTGCTCGTGTNG

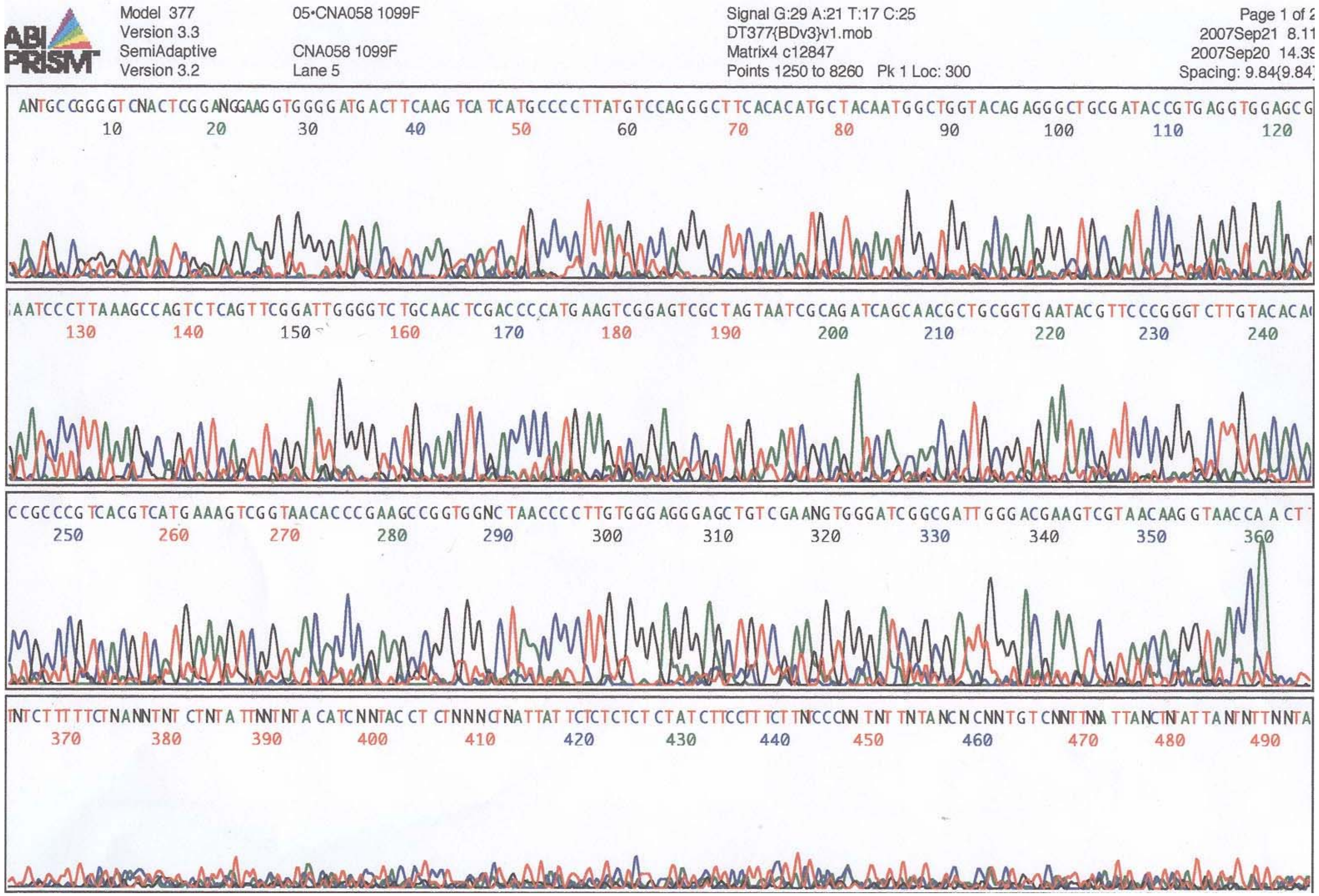
AGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTTGCNGGANACTGCCGNGGTCAACTCNNAGGAAGGTGGGGATGACNTCA

AGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACNCATGNTACAATGGCNGGTACAGAAGGCTGCGATNCCNTGAGGTGGAGCGAATNCCTTAAAGCCAGNCCTCAGCTCGGATTGNGNGTCTG

10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480

ภาพที่ 4 อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 785F

Figure 4 Electropherogram of CNA058 with 785F primer



ภาพที่ 50 อิเลคโตรฟีโรแกรมของ CNA058 เมื่อใช้ primer ชนิด 10 F

Figure 50 Electropherogram of CNA058 with 10 F primer

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายธีรศักดิ์ อนันตพงศ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4882060

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2546

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Theerasak Anantapong, Kidchakan Supamataya and Akkharawit Kanjana-Opas**.** 2549. Isolation and Optimization of Astaxanthin Production by Marine Bacteria in Shaked Flask Cultivation. The 7th Nation Graduate Research Conference. Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani, Thailand. 4-5 April 2007.