

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การใช้แอสตาแซนทินจากสาหร่ายคลอโรคอคคัม
เพื่อเร่งสีในปลาทอง

Using of astaxanthin from *Chlorococcum* sp. for
enhancing color in goldfish (*Carassius auratus*)

โดย

ผศ. ดร. อัจฉรี เรืองเดช

รศ. ดร. นงนุช เล้าหะวิสุทธิ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ได้รับทุนวิจัยจากรายได้ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
ประจำปีงบประมาณ 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้แอสตาแซนทินจากสาหร่ายคลอโรคอคคัมเพื่อเร่งสีในปลาทอง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัจฉรี เรืองเดช

บทคัดย่อ

ตลาดปลาสวยงามกำลังเติบโตดีในหลายประเทศทำให้ปลาที่มีสีสวยเป็นที่นิยมกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงอาหารที่ทำให้ปลามีสีสวย พบว่าสารสีที่สามารถทำให้ปลาสีสวยได้นั้นคือ สารสีแดง แอสตาแซนทินซึ่งสารสีนี้สามารถสร้างขึ้นโดยสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงได้ง่ายในสภาพอากาศของไทย งานวิจัยฉบับนี้ จึงมีการศึกษาถึงสภาวะต่างๆที่จะสามารถทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถสร้างสารสีแดงขึ้นมาได้ โดยเปรียบเทียบอาหาร 2 สูตรที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ระหว่างสูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร BG-11 medium และเมื่อทำการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลง pH พบว่าการปรับ pH ให้คงที่ที่ 4.0 จะทำให้สาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียวและมีอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์สูงที่สุด แต่การเจริญไม่ดี เมื่อศึกษาการให้โอโซนพบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย ส่วนการทำให้ขาดธาตุอาหารพบว่าเมื่อลดสารอาหารสูตร BG-11 medium ลงเมื่อนำสาหร่ายมาดูภายใต้กล้องจะพบว่าสาหร่ายทั้งที่ขาดไนโตรเจนและที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีการสะสมสารสีแดงภายในเซลล์

การศึกษากการให้ปลาทองบริโภคอาหารผสมสารสีที่ได้จากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อหาระดับที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความเข้มสีแดง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ วัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีบนตัวปลาด้วยเครื่องวัดสี และเปรียบเทียบการเจริญเติบโต พบว่าชุดการทดลองที่เสริมด้วยสารสีจาก *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มของสีแดงบริเวณลำตัวมากที่สุดคือ 17.41 ± 0.19 โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเสริมสารสี (9.18 ± 0.21) แต่ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและน้ำหนักตัว

RCH

SH

391

.C474

05147

เลขหมู่..... 84049

เลขทะเบียน..... 25 ก.ย. 2551

วัน, เดือน, ปี.....

11989832

คำสำคัญ : สาหร่ายคลอโรคอคคัม แอสตาแซนทิน ปลาทอง สารสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Using of astaxanthin from *Chlorococcum* sp. for enhancing color in goldfish
(*Carassius auratus*)

Uscharee Ruangdej

ABSTRACT

Aquarium fish trading is going to be the high value market especially the colorful fish. Astaxanthin, red pigment, is used as enhancing color in aquarium fish culture which produced by *Chlorococcum* sp. microalgae. In order to have the mass culture of high astaxanthin content in *Chlorococcum* sp., we studied on the various appropriate conditions. First, we compared the Modified Chlorella medium and BG-11 medium on the growth of *Chlorococcum* sp. The result showed that *Chlorococcum* sp. can grow better in BG-11 medium due to high carbon source. Second, we investigated the various conditions as pH range, ozone supply, and nutrients deficiency on astaxanthin production. We found that pH at 4.0 made the yellowish color of *Chlorococcum* sp. and the highest carotenoid/chlorophyll ratio but the growth is poor, the same result as ozone supply. On the contrary, nitrogen and phosphorus deficiency could show the red color inside the cells of *Chlorococcum* sp. under microscope.

The experiment on colorant goldfish fed with *Chlorococcum*'s pigment extracted to fish for 8 weeks. The result revealed markedly in red color (17.41 ± 0.19) in the group of feeding 40 percent pigment extracted higher than control group fed without pigment extracted (9.18 ± 0.21) significantly ($P < 0.05$) but no statistically difference on the growth.

Keyword: Chlorococcum, astaxanthin, goldfish, pigment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลองและวิจารณ์	21
สรุปผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	45



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ช่วงเวลาที่ใช้ การดูดกลืนสูงสุด และการระบุชนิดของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ในเซลล์สาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp.	6
2	ส่วนประกอบของแคโรทีนอยด์ (% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด) ของเซลล์สาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน	14
3	ความเข้มข้นของ <i>trans</i> - astaxanthin อีسترและ astaxanthin ทั้งหมดในสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp.	15
4	องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp.	22
5	อัตราการเจริญเติบโต ($\times 10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน) ของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นต่างกัน	23
6	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($\mu\text{g/L}$) ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{g/L}$) และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ปรับ pH ให้คงที่ต่างกัน	25
7	อัตราการเจริญเติบโต ($\times 10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน) ของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการทำให้ขาดธาตุอาหารต่างกัน	28
8	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ ในสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุต่างกัน	32
9	น้ำหนักของปลาทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม <i>Chlorococcum</i> sp. ระดับต่างๆ	32
10	ความยาวตัวของปลาทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม <i>Chlorococcum</i> sp. ระดับต่างๆ	33
11	ระดับความเข้มสีแดงบนผิวปลาแต่ละชุดการทดลองที่ทำการวัดในแต่ละครั้ง	34
12	ระดับความเข้มสีเหลืองบนผิวปลาแต่ละชุดการทดลองที่ทำการวัดในแต่ละครั้ง	36
13	ระดับความสว่างของสีบนผิวปลาแต่ละชุดการทดลองที่ทำการวัดในแต่ละครั้ง	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp.	5
2	chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของเม็ดสีที่สกัดจากเซลล์สาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp.	5
3	วัฏจักรสมมติสำหรับการสังเคราะห์ astaxanthin จาก β -carotene ผ่าน canthaxanthin ในเซลล์สาหร่าย <i>Haemotococcus pluvialis</i> และเซลล์สาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp.	8
4	วัฏจักรสมมติสำหรับการสังเคราะห์ adonixanthin และ astaxanthin ในเซลล์สาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp.	9
5	การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ในสูตรอาหาร Modified Chlorella medium และสูตรอาหาร BG-11 medium	21
6	การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ในสูตรอาหาร BG-11medium ที่ทำการปรับ pH เริ่มต้นต่างกัน	24
7	สีของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH ให้คงที่ต่างกัน	25
8	สาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ที่ผ่านการให้อิโคโนนที่เวลาต่างกัน	26
9	ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ที่ผ่านการให้อิโคโนนที่เวลาต่างกัน	27
10	การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำให้ขนาดธาตุอาหารต่างกัน	28
11	สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง	29
12	สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขนาดธาตุฟอสฟอรัส	30
13	สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขนาดธาตุไนโตรเจน	30
14	สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขนาดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส	31

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15	35
16	36
17	38
18	39
<p>(control) T2 คือปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. 10 เปอร์เซ็นต์ T3 คือปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. 20 เปอร์เซ็นต์ และ T4 คือปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. 40 เปอร์เซ็นต์</p>	
ภาพผนวกที่	หน้า
1	45
2	45

คำนำ

การนำสารสีแดงที่ผลิตโดยสาหร่ายขนาดเล็กไปใช้ประโยชน์ทางการค้ากำลังเป็นที่สนใจ เนื่องจากสารสีแดงที่กล่าวถึงมีอยู่หลายรูปและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทั้งทางการประมงและทางการแพทย์ โดยเฉพาะ astaxanthin จะเป็นสารสีแดงที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่โดดเด่นและช่วยในการชักนำให้เกิดสีจึงทำให้สารสีแดงรูปนี้ถูกนำไปใช้ผสมอาหารเร่งสีในปลาสวยงาม ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิต astaxanthin ได้มีหลายชนิดเช่น *Haematococcus pluvialis* , *Chlorella zofinginus* และ *Chlorococcum* sp. เป็นต้น

Chlorococcum เป็นสาหร่ายขนาดเล็กชนิดหนึ่งซึ่งสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ก็เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถเปลี่ยนสารสีเขียวในเซลล์ให้เป็นสารสีแดงได้ในสภาวะที่ทำให้เกิดความเครียด มีอัตราการเจริญเติบโตดี เลี้ยงง่ายในระบบกลางแจ้ง และมีความทนสูงทั้งในที่ที่มี pH รุนแรงและอุณหภูมิสูงๆ ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยที่ส่งเสริมการสร้างสารสีแดงในสาหร่ายชนิดนี้เป็นจำนวนมาก

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษการเปรียบเทียบหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ที่จะทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. มีการเจริญเติบโตดีที่สุดและศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีแดงในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ซึ่งประกอบด้วย pH ของอาหารที่ใช้เลี้ยง การให้ออกซิเจน การปรับเปลี่ยนชนิดของสารอาหารในกลุ่มไนโตรเจน และฟอสฟอรัส หรือทำให้เกิดสภาวะเครียด เพื่อให้ได้สภาพแวดล้อมที่สามารถทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. สร้างสารสีแดงพวกแคโรทีนอยด์ให้ได้มากที่สุด หลังจากนั้นนำไปใช้ในการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสีในปลาทอง เพื่อที่จะนำสารสีที่ได้จากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ไปใช้ประโยชน์ในการผสมอาหารสำหรับปลาสวยงามต่อไป

การตรวจเอกสาร

ประโยชน์ของสารสีแดงที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก

แคโรทีนอยด์หรือสารสีแดงจะเป็นเม็ดสีจำพวกละลายได้ในไขมัน (Lipophilic pigment) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากการสร้างของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหลายชนิด เม็ดสีเหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นในสิ่งมีชีวิตจำพวกพืชที่สร้างอาหารเองได้โดยจะอยู่ในเนื้อเยื่อไทลาคอยด์มีหน้าที่เป็นส่วนร่วมในกระบวนการ การเก็บเกี่ยวแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์อาหารและใช้ในการป้องกันการทำลายจากกระบวนการ photooxidative ส่วนในสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้และในมนุษย์แคโรทีนอยด์ก็เป็นส่วน ประกอบที่สำคัญในระบบต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะในกลุ่มของ ketocarotenoid หรือ secondary carotenoid จะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีและมีส่วนร่วมในการยับยั้งสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสีแดงที่กล่าวถึงนี้สามารถช่วยในการเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ Liu and Lee (2003) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของ secondary carotenoid ที่สกัดจากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ต่อการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นพาหะที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โรคแผลในกระเพาะอาหาร และโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร โดยใช้หนู BALB/c เพศเมียมาทำให้ติดเชื้อด้วยการให้ *Helicobacter pylori* ที่ 10^9 CFU ผ่านทางหลอดเข้าสู่กระเพาะอาหาร 3 ครั้ง/ 2 วัน นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่นำมาทำการรักษาด้วยการให้เซลล์ที่สกัดจากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. (ที่มี secondary carotenoid 10 mg/kg ของน้ำหนักตัว/วัน ในน้ำมันข้าวโพด 0.5 - 0.18 ml) นาน 2 สัปดาห์ และกลุ่มที่ไม่ได้ทำการรักษาจะให้กินน้ำมันข้าวโพด 0.5 ml นาน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ของการให้เซลล์สาหร่ายสกัดและน้ำมันข้าวโพดครั้งสุดท้าย นำหนูทั้ง 2 กลุ่มมาฆ่าแล้วย้ายกระเพาะอาหารไปทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องและทำการให้คะแนนการอักเสบพร้อมทั้งนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori*

ผลที่ได้พบว่าในกลุ่มของหนูที่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่รักษาด้วยเซลล์สาหร่ายสกัดที่บรรจุ secondary carotenoid มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่เมือกของกระเพาะอาหารลดลงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มติดเชื้อที่ไม่ได้ทำการรักษาและคะแนนการอักเสบของแผลในกระเพาะอาหารในหนูที่ติดเชื้อจะลดลงหลังจากที่ได้รับการรักษาด้วย secondary carotenoid ซึ่งรูปแบบของสารสีแดงที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กมีอยู่หลายรูปในลักษณะของโครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละรูปแบบก็ถูกนำไปใช้ประโยชน์แตกต่างกันไป โดยสารสีแดงที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายและคนส่วนใหญ่รู้จักก็คือ astaxanthin ซึ่งประโยชน์ของ astaxanthin มีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ใช้ผสมอาหารสัตว์

astaxanthin เป็นรงควัตถุพื้นฐานที่พบได้ในเนื้อสัตว์จำพวก salmonids ได้แก่ ปลาแซลมอนและปลาเทราท์และสัตว์จำพวก crustaceans เช่น กุ้ง กั้ง และปูต่างๆ ซึ่งตามธรรมชาติแล้วสัตว์เหล่านี้จะได้รับรงควัตถุนี้จากอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดทำให้สีของเนื้อสัตว์มีสีส้มจืดจางไม่สวยและขายได้ในราคาต่ำ (Lorenz and Cysewski, 2000) ดังนั้นผู้เลี้ยงจึงนิยมใช้ astaxanthin เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงเพื่อที่จะทำให้สัตว์น้ำดังกล่าวมีสีส้มสวยงามและขายได้ราคาสูง ซึ่งมีคำแนะนำให้ใช้ astaxanthin ประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงปลาแซลมอนเป็นระยะเวลาประมาณ 2-4 เดือน ก็จะทำให้ปลามีสีส้มสวยงาม (Johnson et al., 1980) นอกจากนี้จะช่วยในการสร้างสีแล้ว astaxanthin ยังช่วยให้ไข่ของ salmonids มีอัตราการรอดสูง ฟักตัวดีและยังกระตุ้นให้ปลามีการเจริญเติบโตได้ดี

สำหรับอุตสาหกรรมสัตว์ปีกได้มีการทดลองใช้ astaxanthin ที่สกัดจากเปลือกกุ้งร่วมกับ lutein เพียงเล็กน้อยผสมลงในอาหารเลี้ยงสัตว์ พบว่าสามารถทำให้ได้ไข่แดงมีสีเหลืองมากขึ้น ความเข้มข้นของสีจะใกล้เคียงกับที่ใช้ lutein ปริมาณมากเพียงอย่างเดียวและเมื่อมีการใช้ astaxanthin เพียงอย่างเดียวจะทำให้ไข่แดงนั้นมีสีชมพูซึ่งจะไม่พบลักษณะของไข่แดงที่เป็นสีชมพูนี้ในอาหารเลี้ยงที่ผสม astaxanthin ร่วมกับ lutein (Marusich and Bauernfeind, 1989)

2. ใช้ผสมในอาหารมนุษย์

ใช้ astaxanthin ผสมในปุ๋ยมื้อทำให้ปุ๋ยมื้อมีสีแดงนํารับประทานยิ่งขึ้น (สุดสายชล, 2541)

3. ใช้ในทางการแพทย์

Jyonouchi et al. (1996) รายงานว่า astaxanthin สามารถเพิ่มทีเซลล์ผู้ช่วย (T-helper) ในหนูได้สูงกว่าคาโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ โดยการเพิ่มของทีเซลล์ผู้ช่วยนี้ทำให้หนูมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังยังสามารถเพิ่ม T-dependent immunoglobulin ใน human peripheral blood mononuclear cell นอกจากนี้ astaxanthin ยังมีสมบัติเป็น strong antioxidant ที่สูงกว่าแคโรทีนอยด์อื่นๆ ทำให้เชื่อว่าสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งและเนื้องอกนั้นมีอนุมูลอิสระเป็นจุดเริ่มต้นและส่งเสริมการเกิดเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการที่ astaxanthin มีสมบัติเป็น antioxidant ที่สูงจึงมีส่วนช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้

แหล่งของ astaxanthin

จากที่กล่าวมาพบว่า astaxanthin เป็นสารสีแดงที่มีประโยชน์มาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต astaxanthin เป็นจำนวนมาก ซึ่งแหล่งของ astaxanthin จะประกอบไปด้วย

1. การสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีการทางเคมี
2. การสังเคราะห์ขึ้นโดยธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. แหล่งจากพืชและสัตว์

4. แหล่งจากจุลินทรีย์

ราและยีสต์ มีการพบ astaxanthin ในเชื้อราสกุล *Peniophora* (Hymenomycetes) เพียงสกุลเดียวเท่านั้นและยีสต์เพียงชนิดเดียวคือ *Phaffia rhodozyme* ที่สามารถสร้าง astaxanthin ได้
แบคทีเรีย พบว่า *Halobacterium salinarium* สามารถสร้าง astaxanthin ได้ 265 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

สาหร่าย ซึ่งในส่วนของสาหร่ายที่สามารถสร้าง astaxanthin ได้มีดังนี้ *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguiana*, *Euglena rubina*, *Chlorella fusa*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlamydomonas nivalis*, *Neosporangiococcum* sp., *Neochloris wimmeri*, *Sporangiopsis typical*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus* sp. และ *Chlorococcum* sp.

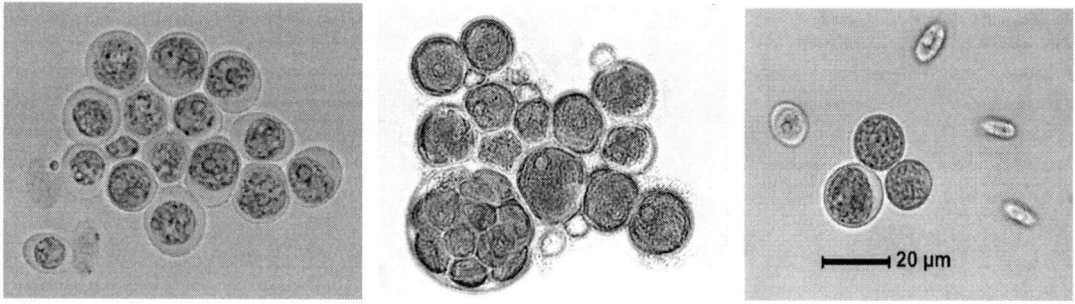
ซึ่งในส่วนของสาหร่ายก็เป็นแหล่งของการผลิต astaxanthin ที่น่าสนใจและถูกนำมาใช้ทางการประมงโดยเฉพาะการนำไปใช้ในการเร่งสีในปลาสวยงาม โดยแหล่งผลิต astaxanthin ที่สำคัญคือสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* และจากการที่ astaxanthin สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายจึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิต astaxanthin เป็นจำนวนมากซึ่งสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ก็เป็นสาหร่ายชนิดหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากมีรงควัตถุบรรจุเป็นจำนวนมาก มีอัตราการเติบโตดี เลี้ยงง่ายในระบบบกล่างแจ่มรวมทั้งมีความทนสูง

ลักษณะของสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

Chlorococcum sp. ในสภาพปกติจะเป็นเซลล์เดี่ยวแต่บางครั้งอาจจะเห็นเป็นกลุ่มโคโลนีเล็กๆประกอบด้วย 2-4 เซลล์ มีสารพวกเจลาตินหุ้มเซลล์ เซลล์จะมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือป็นรูปไข่ ขนาดเซลล์ไม่คงที่ บางครั้งมีลักษณะเป็นผ้าเมื่อเปียกชื้นหรือมีน้ำท่วมหรือแช่บริเวณผิวหน้าเมื่อจะมีลักษณะบางและเห็นไม่เด่นชัด เซลล์เดี่ยวๆแต่ละเซลล์จะมีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยเกือบเต็มเซลล์หรือบางชนิดจะอยู่ด้านข้างเซลล์และถูกหุ้มด้วยไฟรินอยด์(ยูดี้, 2549)โครงสร้างเซลล์ที่เห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง และข้อมูลที่แสดงรายละเอียดของโมเลกุลจะแสดงให้เห็นว่า *Chlorococcum* sp. มีหลายสายพันธุ์

การสืบพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศ แหล่งกำเนิดของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสจะถูกแบ่งในระหว่างที่ zoospores ถูกปล่อยออกจากแหล่งกำเนิดที่ผนังเซลล์ หนวดทั้งสองเส้นจะทำหน้าที่กั้น zoospores และในระยะแรกจะมีอายุสเปอตและคอนแทรกไทล์เวคิวโอลก่อนจะมีการพัฒนาใหญ่ขึ้น เป็น vegetative cells หลังจากผ่านไปหลายวัน ถ้าอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดน้ำจะพบเซลล์ในรูป aplanospore มากกว่า zoospores ส่วนไซโกตที่มีผนังหนาหรือ hypnospore จะมีการพัฒนาเข้าสู่ vegetative cells ในระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

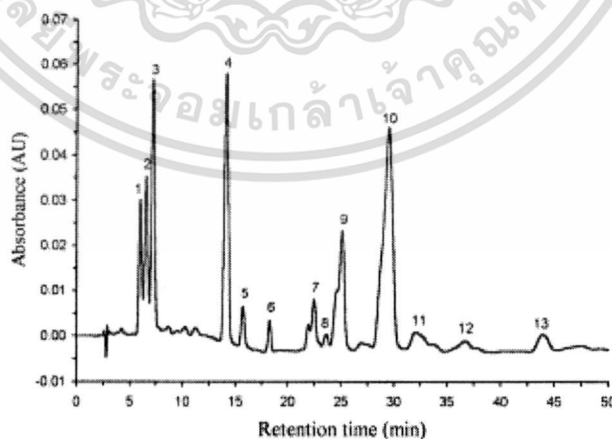


ภาพที่ 1 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ที่มา : <http://silicasecchidish.conncoll.edu/>

รูปแบบของสารสีที่พบในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ส่วนประกอบของแคโรทีนอยด์ในเซลล์ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะมีความซับซ้อนและมี ketocarotenoid เป็นแคโรทีนอยด์หลัก ซึ่งส่วนมากอยู่ในรูป ketocarotenoid ester ของกรดไขมันต่างๆ Yuan et al. (2002) พบว่าจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของแคโรทีนอยด์ในเซลล์ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยใช้เครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC) จะพบ astaxanthin (free และ ester), adonixanthin (free และ ester), canthaxanthin, β -carotene, lutein และ cis-isomers บางตัวของ ketocarotenoid เป็นองค์ประกอบอยู่ ซึ่งเซลล์ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะมี ester ของ astaxanthin, adonixanthin และ canthaxanthin อิสระเป็นแคโรทีนอยด์หลักซึ่งจะแตกต่างจากสาหร่าย *Haemotococcus pluvialis* ที่มีแคโรทีนอยด์หลักเพียงอย่างเดียวคือ astaxanthin



ภาพที่ 2 Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของเม็ดสีที่สกัดจากเซลล์

สาหร่าย *Chlorococcum* sp. สำหรับการระบุชนิดของจุดสูงสุดจะแสดงในตารางที่ 1

ที่มา : Yuan et al. (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ช่วงเวลาที่ใช้ การดูดกลืนสูงสุด และการระบุชนิดของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ใน เซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

หมายเลข Peak	ช่วงเวลา (นาที)	การดูดกลืนสูงสุด (nm)	สารสี
1	6.0	480.0	<i>Trans</i> -astaxanthin
2	6.6	(459.2) 469.2	adonixanthin
3	7.2	445.1 474.0	lutein
4	14.1	479.4	canthaxanthin
5	15.7	377.8 469.2	<i>Cis</i> -canthaxanthin
6	18.1	464.4 652.3	Chlorophyll <i>b</i>
6'	19.1	464.4 652.3	Chlorophyll <i>b</i> '
7	22.0	480.0	astaxanthin esters
	22.5	(464.3) 474.0	astaxanthin esters
8	23.6	435.4 663.6	Chlorophyll <i>a</i>
9	24.6	482.5	astaxanthin esters
	25.1	(464.3) 474.0	adonixanthin esters
10	28.8	482.5	astaxanthin esters
	29.5	(464.3) 474.0	adonixanthin esters
11	32.2	(464.3) 474.0	adonixanthin esters
	33.5	355.4 464.4	<i>Cis</i> -adonixanthin esters
12	36.7	(464.3) 474.0	adonixanthin esters
13	44.0	454.7 483.6	β -carotene

ที่มา : Yuan et al. (2002)

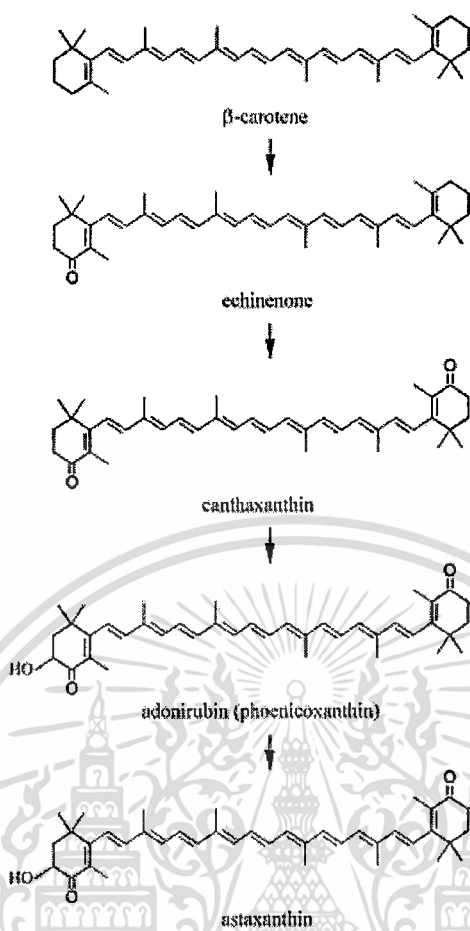
นอกจากนี้ Liu and Lee (1999) ได้ทำการวิเคราะห์หาส่วนประกอบของ secondary carotenoid ในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เช่นเดียวกันโดยเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ด้วยอาหารสูตร A9 medium ในถังหมักที่ทำการให้แสง 22 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 30 °C จากนั้นทำการสกัดแคโรทีนอยด์แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค spectroscopic techniques และวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์จะพบว่าในสาหร่าย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlorococcum sp. ที่มี canthaxanthin, 3'hydroxyechinenone, adonirubin และ adonixanthin เป็นองค์ประกอบหลักคิดเป็น 32%, 23%, 12% และ 9% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

การได้มาของ astaxanthin ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

สารสีที่พบในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในส่วนของ β -carotene สามารถจะเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลไปเป็น echinenone, canthaxanthin และ endogenous xanthophylls ตัวอื่นๆได้ โดยผ่านปฏิกิริยา hydroxylation reaction 2 ปฏิกิริยา ที่ c-3 และ 3' และผ่านการออกซิไดซ์โดยตรง 2 ขั้นตอนเพื่อไปเป็นกลุ่ม ketone ที่ c-4 และ 4' ซึ่ง Yuan et al. (2002) รายงานว่า สาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะสังเคราะห์ astaxanthin จาก β -carotene ผ่านหลายวัฏจักรและการแสดงตัวของ canthaxanthin และ adonixanthin ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะชี้ให้เห็นว่าการสังเคราะห์ astaxanthin ในสาหร่ายชนิดนี้แตกต่างจากสาหร่าย *Haemotococcus pluvialis* และมีการเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์กว่าโดยในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะมี astaxanthin จำนวนมากที่ถูกสังเคราะห์จาก β -carotene ผ่าน canthaxanthin เช่นเดียวกับสาหร่าย *Haemotococcus pluvialis*

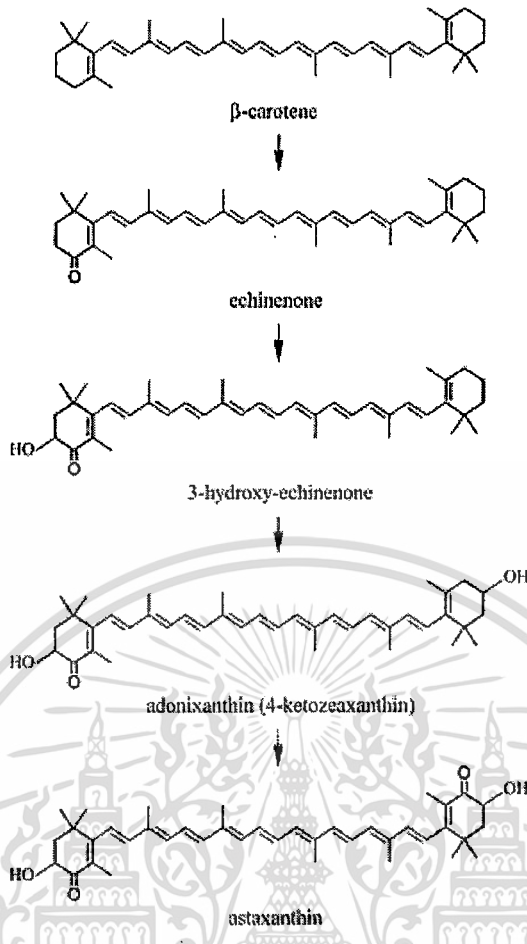
นอกจากนี้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะสามารถสังเคราะห์ astaxanthin จาก β -carotene ผ่าน adonixanthin ได้อีกวัฏจักรหนึ่งซึ่งแตกต่างจากสาหร่าย *Haemotococcus pluvialis* แต่จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC จะพบ adonixanthin เป็นจำนวนมากซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ astaxanthin ผ่าน adonixanthin เป็นสิ่งที่ยุ่งยากดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า adonixanthin จะเป็นตัวสุดท้ายของการ hydroxylation ของ echinenone



ภาพที่ 3 วัฏจักรสมมติสำหรับการสังเคราะห์ astaxanthin จาก β -carotene ผ่าน canthaxanthin ในเซลล์สาหร่าย *Haemotococcus pluvialis* และเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ที่มา : Yuan et al. (2002)

ในการผลิตสารสีแดงจากสาหร่ายขนาดเล็กจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการคือ กระบวนการเพื่อเพิ่มมวลสาหร่ายและกระบวนการชักนำให้สาหร่ายผลิตสารสีแดง ซึ่งในการศึกษาก่อสร้างสารสีแดงในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ก็ใช้วิธีการเดียวกันคือทำการเพิ่มมวลสาหร่ายจากนั้นจึงนำไปทำการชักนำให้สร้างสารสีแดง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารสีแดงมีดังนี้



ภาพที่ 4 วัฏจักรสมมติสำหรับการสังเคราะห์ adonixanthin และ astaxanthin ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ที่มา : Yuan et al. (2002)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเพิ่มมวลสาหร่ายให้ได้จำนวนมากจะต้องทราบปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะคล้ายกับการเลี้ยงสาหร่ายชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นปัจจัยหลักๆ ได้ดังนี้

1. ธาตุอาหาร

การเจริญเติบโตของสาหร่ายขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย ซึ่งอาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1.1. กลุ่มธาตุอาหารหลัก (macronutrient) คือธาตุอาหารที่ประกอบเป็นโครงสร้างของสาหร่ายดังนั้นจึงต้องใช้เป็นปริมาณค่อนข้างมาก ประกอบด้วย คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโปแตสเซียม (ลัดดา, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อประโยชน์แก่ผู้อื่น โดยผู้จัดทำให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.1. คาร์บอน ที่พีชนำไปใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคืออินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายใช้คาร์บอนประเภทอินทรีย์ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งละลายได้ในน้ำหรือในรูปของเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต ส่วนคาร์บอนประเภทอินทรีย์จะอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตเช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งความต้องการชนิดรวมทั้งปริมาณของสารประกอบคาร์บอนจะแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย Zhang and Lee (2001) ได้ทำการทดลองผลกระทบของสารประกอบคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงแบบ heterotrophic ใน flask ด้วยอาหารสูตร medium A ที่ถูกเขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมงโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันและที่ระดับต่างๆ ผลที่ได้พบว่า *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีใน monosaccharides แต่จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน polysaccharides ซึ่งในส่วนของแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตแบบ heterotrophic ของ *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 คือ กลูโคสที่ความเข้มข้น 20 – 40 mM ซึ่งจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มกลูโคสอย่างพอเหมาะลงไปในการเลี้ยงจะทำให้ผลผลิตมวลรวมของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 เพิ่มขึ้น

1.1.2. ไนโตรเจน มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ โดยปริมาณไนโตรเจนของพีชมีปริมาณร้อยละ 7-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ยกเว้นไดอะตอม ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่นเนื่องจากซิลิกาเป็นธาตุที่สำคัญของผนังเซลล์ไดอะตอม หรือในสาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้งมาทดแทน สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแก๊สได้อีกด้วยแต่มีสาหร่ายบางชนิดเท่านั้นคือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ได้แก่เกลือ 3 ชนิด คือ ไนเตรต ไนไตรท์ และแอมโมเนีย ถ้าแหล่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวจะทำให้ระดับของ pH ของอาหารลดต่ำอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นอันตรายต่อสาหร่าย ไนไตรท์เป็นสารละลายอนินทรีย์ซึ่งพีชหลายชนิดต้องการใช้ในปริมาณไม่เกิน 1 มิลลิโมล ถ้ามากกว่านี้จะทำให้เกิดอันตราย ส่วนสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่พีชนำเข้าไปใช้ได้แก่ ยูเรีย เอไมด์ (amide) กลูตามีน (glutamine) และเอสพาราจีน (asparagines) ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดดี ส่วนสารอินทรีย์ชนิดอื่น ได้แก่ กรดอะมิโน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไกลซีน เซรีนอะลามีน) กรดกลูตามิกและกรดแอสพาร์ติกนั้นสาหร่ายต้องการใช้เพื่อการเติบโตซึ่งแตกต่างกันตามชนิด ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุ หรือสารสี (pigments) ของเซลล์ รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย (ลัดดา, 2539)

1.1.3. ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชเพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลเสียต่อการเจริญเติบโต คือ ปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์-เอ RNA และ DNA จะลดลงแต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรต จะเพิ่มขึ้นมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ได้มีการทำการทดลองผลกระทบของไซเตียมฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตโดยใช้สารฟอสเฟต 5 ชนิด คือ Na_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ แทนฟอสเฟต ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้น 25 ppm โดยเริ่มเลี้ยงสาหร่ายที่ความหนาแน่น 1.67×10^4 เซลล์/มล. ให้แสงที่ความเข้มข้น 10000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน และให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3% ผลที่ได้พบว่า $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ จะทำให้ได้เซลล์จำนวนสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากฟอสเฟตชนิดอื่นๆ (วิไลลักษณ์และคณะ, 2549)

1.1.4. ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ ได้แก่ เกลือของโลหะ คือซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์

1.1.5. แคลเซียม เป็นธาตุอาหารจำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย เช่น สาหร่ายสีเขียวบางชนิด สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม สันนิษฐานว่าแคลเซียมมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเกล็ด (scale) และโครงสร้างสาหร่าย โดยเฉพาะสาหร่ายน้ำเค็มหรือมีบทบาทสำคัญในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

1.1.6. ไซเตียม เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดที่ต้องการซึ่งในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการไซเตียมในปริมาณมากกว่ากลุ่มอื่นที่อยู่ในน้ำจืด ไซเตียมเป็นธาตุอาหารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด และพืชสามารถใช้ไซเตียมทดแทนโปแตสเซียมในกรณีที่แหล่งน้ำขาดโลหะชนิดนี้

1.1.7. โปแตสเซียม เป็นธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิด อัตราส่วนของไซเตียมและโปแตสเซียมจะมีผลต่อการใช้คลอโรฟิลล์ของสาหร่าย

1.1.8. แมกนีเซียม เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์

1.2. กลุ่มธาตุอาหารรอง (micronutrient) ได้แก่ธาตุอาหารซึ่งสาหร่ายต้องการน้อย มักมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม ธาตุอาหารรองเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็นเช่น เอนไซม์ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตหรือเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของเอนไซม์ที่สำคัญบางชนิด ลัดดา (2539) กล่าวว่า มี 2 ประเภทคือ ธาตุอาหารรองอินทรีย์และธาตุอาหารรองอนินทรีย์ ได้แก่ เหล็ก โบรอน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โมลิบดีนัม วานาเดียม โคบอลท์ นิกเกิล ซีลีเนียม และเซเลเนียม

2. แสง

แสงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตและความต้องการของปริมาณแสงของสาหร่าย แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน Hu (2004) กล่าวว่าโดยทั่วไปเมื่อความเข้มของแสงลดลงจะทำให้สาหร่ายมีการตอบสนองโดยการสะสม chlorophyll *a* และสารสีที่ใช้เก็บเกี่ยวแสงอื่นๆ (เช่น chlorophyll *b*, chlorophyll *c*, phycobiliproteins และ primary carotenoid) เพิ่มขึ้นแต่ในทางตรงกันข้ามถ้าสาหร่ายได้รับความเข้มแสงมาก Chlorophyll *a* และสารสีอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์จะลดลงในขณะที่ secondary carotenoid ซึ่งเป็นสารสีที่ใช้ในการป้องกันเซลล์จะเพิ่มขึ้น

3. อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่าย นอกจากนี้ยังมีผลต่อขนาดของเซลล์และองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย โดยทั่วไปสาหร่ายน้ำจืดเกือบทุกชนิดเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-25 °C ส่วนสาหร่ายน้ำเค็มจะชอบอุณหภูมิตั้งแต่ 15-25 °C แต่สำหรับสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ 30-35 °C (Zhang et al., 1997)

4. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างซึ่งสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการในระดับที่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเติบโตดีในน้ำสภาพเป็นกลางจนถึงสภาพเป็นด่างหรือมีค่าของ pH 6.5-7.5 สาหร่ายสีเขียวบางกลุ่มเช่นเดสมีด ชอบน้ำที่สภาพเป็นกรดอ่อนหรือเป็นกรดซึ่งมีค่าของ pH ระหว่าง 5.5-6.5 โดยทั่วไปสาหร่ายส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นด่าง

5. ความเค็ม

จะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม สาหร่ายบางชนิดสามารถทนเค็มได้ดีแต่ยังไม่มีการรายงานเรื่องความเค็มที่สาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถอาศัยอยู่ได้แต่สำหรับในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่สามารถสร้างสารสีแดงได้เช่นเดียวกับสาหร่ายชนิดนี้ได้มีการศึกษาผลกระทบของความเค็มต่อการเจริญเติบโต Borowitzka et al. (1991) กล่าวว่าสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มีความทนเค็มต่ำโดยทนความเค็มประมาณ 1% ของ NaCl และนอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเติม NaCl ลงในอาหารเลี้ยงจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตต่ำลงและมีการเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูป aplanospore มากขึ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ปัจจัยที่นำมาใช้ในการส่งเสริมการสร้างสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะมีอยู่หลายปัจจัยด้วยกันแบ่งเป็น

1. แสง

จะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการส่งเสริมการสร้างแคโรทีนอยด์และในการศึกษาส่วนมากจะใช้แสงร่วมกับการศึกษาปัจจัยอื่นเพื่อเพิ่มการสร้างสารสีต่างๆ ในส่วนของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorococcum* sp. ก็มีการสะสมของ ketocarotenoid เป็นจำนวนมากเมื่อเลี้ยงภายใต้การให้แสง Zhang and Lee (2001) รายงานว่าแสงจะช่วยส่งเสริมกระบวนการสร้างแคโรทีนอยด์และ ketocarotenoid ที่ได้จากการเลี้ยงภายใต้การให้แสงจะมากกว่าการเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารเคมีถึง 3 เท่า

2. ออกซิเจน

จะเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการเปลี่ยนรูปของสารสีแดง Liu and Lee (2001) กล่าวว่า การเปลี่ยนรูปของ β -carotene ไปเป็นสารสีตัวอื่นจะต้องอาศัยออกซิเจน ซึ่งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน β -carotene จะเปลี่ยนไปเป็น monohydroxylated ($3'$ -hydroxyechinenone และ adonirubin) และ monoketolated product (echinenone, $3'$ -hydroxyechinenone และ adonixanthin) เป็นจำนวนมากเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเปลี่ยนไปอยู่ในรูป dihydroxylated (adonixanthin) และ dioxygenated product (cantaxanthin, adonirubin และ adonixanthin)

3. กลูโคสหรือแหล่งคาร์บอน

จะเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดย Yuan et al. (2002) ได้ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. 2 แบบโดยแบบที่ 1 ให้เจริญเติบโตแบบ autotrophic ใน Erlenmeyer flask ที่บรรจุอาหารสูตร basal medium แกว่งที่ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 25 °C และให้แสงที่ 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์และแบบที่ 2 ให้เจริญเติบโตแบบ heterotrophic โดยเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่จะทำการเพิ่มกลูโคสลงไป ในอาหารสูตร basal medium 0.3 % หลังจากนั้นนำสาหร่ายไปสกัดและทำการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้จากการวิเคราะห์จะชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยการเติมกลูโคสลงไป 0.3 % จะทำให้องค์ประกอบของ β -carotene, lutein และ astaxanthin ลดลงแต่ในส่วนของ adonixanthin และ canthaxanthin จะเพิ่มสูงขึ้น

4. hydrogen peroxide

จัดเป็น reactive oxygen species (ROS) ที่ใช้กันมากในการชักนำให้เกิดการสร้างสารสีแดง Ma and Chen (2001) รายงานว่าการสร้าง *trans*-astaxanthin อีสาระในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะถูกทำให้เพิ่มขึ้นจาก 3.664 เป็น 5.724 mg / g ของน้ำหนักแห้งของเซลล์

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของแคโรทีนอยด์ (% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด) ของเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

สารสี	อาหารเลี้ยงไม่มีกลูโคส	อาหารเลี้ยงเติมกลูโคส 0.3%
Astaxanthin	23.2 ± 1.1	17.2 ± 0.9
Adonixanthin	26.5 ± 1.4	36.7 ± 1.6
Canthaxanthin	7.1 ± 0.3	18.9 ± 1.0
Lutein	36.7 ± 1.5	25.9 ± 1.2
β-carotene	6.5 ± 0.4	1.3 ± 0.1

ที่มา : Yuan et al. (2002)

(มี astaxanthin ทั้งหมด 80.8 %) ในการเลี้ยงที่เติม hydrogen peroxide 0.1 mM ภายใต้การให้แสงที่ 22 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ *trans*-astaxanthin อิสระจะแสดงให้เห็นว่า hydrogen peroxide 0.1 mM มีผลต่อการส่งเสริมการสร้าง *trans*-astaxanthin อิสระ และองค์ประกอบของ *trans*-astaxanthin อิสระจะต่ำที่สุดในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีทั้งการให้แสง และ hydrogen peroxide 0.1 mM ซึ่งจะได้ *trans*-astaxanthin อิสระภายใต้สภาวะนี้เป็น 0.260 mg / g ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งผลที่ได้สนับสนุนให้เห็นถึงความสำคัญของ hydrogen peroxide ต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. นอกจากนี้ Zhang and Lee (2001) ก็ได้ทำการทดลองผลกระทบของ hydrogen peroxide (H_2O_2) ต่อองค์ประกอบของ astaxanthin ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. เช่นเดียวกัน แต่ทำการเหนี่ยวนำในที่มืดโดยการเพิ่มสารเคมีที่ทำให้เกิดความเครียดซึ่งประกอบด้วย 10 μM H_2O_2 , 80 mM acetone และ 1 mM Fe^{2+} ลงไปในการเพาะเลี้ยง *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 เพื่อให้สาหร่ายสร้าง astaxanthin และ ketocarotenoid ผลที่ได้พบว่า ketocarotenoid ทั้งหมดและ astaxanthin จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 32.5 mg/l และ 9.8 mg/l ตามลำดับในวันที่ 10 ของการเหนี่ยวนำ และ astaxanthin ที่ได้จะคิดเป็น 30 % ของ ketocarotenoid ทั้งหมด

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ *trans*-astaxanthin อีสาระ และ astaxanthin ทั้งหมดในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

การเพาะเลี้ยง	<i>trans</i> -astaxanthin อีสาระ (mg/ของนน.แห้งเซลล์)	astaxanthin ทั้งหมด (mg/ของนน.แห้งเซลล์)	<i>trans</i> -astaxanthin อีสาระ (% astaxanthin ทั้งหมด)
ให้แสง , เพิ่ม H ₂ O ₂	5.724 ± 0.33	7.086 ± 0.35	80.8 %
ให้แสง , ไม่เพิ่ม H ₂ O ₂	3.664 ± 0.32	5.464 ± 0.47	67.1 %
ไม่ให้แสง , เพิ่ม H ₂ O ₂	0.521 ± 0.042	1.782 ± 0.12	29.2 %
ไม่ให้แสง , ไม่เพิ่ม H ₂ O ₂	0.260 ± 0.034	1.034 ± 0.08	25.1 %

ที่มา : Ma and Chen (2001)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหาร 2 สูตร คือสูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium ทำการทดลองกลุ่มละ 5 ซ้ำ โดยการวัดค่าความยาวคลื่นเทียบกับจำนวนเซลล์ทุกวัน

1.1. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. รหัส C8438 จากห้องเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงมาเลี้ยงในอาหาร 2 สูตรคือสูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium โดยนำมาเลี้ยงใส่หลอดทดลองจากนั้นนำมาขยายต่อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สาหร่ายเริ่มต้น 1.68×10^5 เซลล์/ซีซี ทำการให้อากาศพร้อมทั้งให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง นาน 36 วัน เพื่อเปรียบเทียบว่าอาหารสูตรใดทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. เจริญเติบโตดีที่สุด บันทึกข้อมูลจากการวัดค่าความยาวคลื่น (Spectrophotometer) เทียบกับจำนวนเซลล์ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและสังเกตลักษณะของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 2 ทดสอบหาปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างสารสี

2.1. ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยทำการทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ

2.1.1. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $49.96 \pm 0.32 \times 10^4$ เซลล์/ซีซี มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือสูตร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 ด้วย HCl 1 N และ NaOH 1 N โดยให้แสงตลอดเวลาและทดลองนาน 3 สัปดาห์ โดยวัดค่าความยาวคลื่นทุกวันเพื่อนำไปเทียบจำนวนเซลล์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต

2.1.2. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. มาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH ให้คงที่ตลอดการทดลองที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 ด้วย HCl 1 N และ NaOH 1 N นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บสาหร่ายด้วยการกรองโดยใช้กระดาษกรอง GF/C แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด พร้อมทั้งทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในระดับ pH ที่ต่างกัน

2.2. ศึกษาผลกระทบของการให้อาหารต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยทำการทดลองกลุ่มละ 5 ซ้ำ

นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. มาทำการให้อิโชนที่เวลาต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นนำสาหร่ายที่ทำการให้อิโชนมาเลี้ยงโดยให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมงนาน 7 วันแล้วทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและเก็บสาหร่ายด้วยการกรองโดยใช้กระดาษกรอง GF/C แล้วนำไปวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

2.3. ศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยทำการทดลองกลุ่มละ 5 ซ้ำ

2.3.1. เลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ให้เกิดความเครียดในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัสและขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

2.3.1.1. ทำการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหารสูตร BG-11 medium นาน 10 วันเพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ จากนั้นย้ายสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ไปเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน (ไม่ใส่ NaNO_3), ขาดฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ NaNO_3 และ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โดยให้แสงที่ความเข้มแสง $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการความยาวคลื่นแสงทุกวันเพื่อเทียบจำนวนเซลล์หาความแตกต่างของการเจริญเติบโตนาน 30 วัน

2.3.2. เลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ให้เกิดความเครียดในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำการลดสารอาหารลงเหลือเพียงครึ่งเดียวและทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน, ฟอสฟอรัสและขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยทำการทดลองละ 5 ซ้ำ

2.3.2.1. ทำการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหารสูตร BG-11 medium นาน 10 วันเพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์จากนั้นทำการเก็บสาหร่ายและทำการล้างเซลล์สาหร่ายด้วยอาหารที่เตรียมไว้คือลดสารอาหารลงเหลือเพียงครึ่งเดียวและทำให้ขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยการใช้วิธีการแกว่งเหวี่ยง

2.3.2.2. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ล้างจนสะอาดที่คิดว่าไม่มีธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเหลืออยู่มาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือเพียงครึ่งเดียวและทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน (ไม่ใส่ NaNO_3), ขาดฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ NaNO_3 และ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โดยให้แสงที่ความเข้มแสง $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ตลอดเวลา ทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีพร้อมสังเกตลักษณะของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 10 วัน ทำการทดลองเป็นเวลา 30 วันจากนั้นทำการเก็บสาหร่ายไปทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

การทดลองที่ 3 ทดสอบการผสมสารสีจากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อเร่งสีปลาของแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (Complete randomized design ; CRD) โดยให้ความเข้มข้นของรงควัตถุที่สกัดจากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 0, 10, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดที่ 1 กลุ่มควบคุม (ไม่มีการเสริม *Chlorococcum* sp. ในอาหาร)

ชุดที่ 2 กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมสารสีจาก *Chlorococcum* sp. 10 เปอร์เซ็นต์

ชุดที่ 3 กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมสารสีจาก *Chlorococcum* sp. 20 เปอร์เซ็นต์

ชุดที่ 4 กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมสารสีจาก *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. และการเก็บเกี่ยว

1.1 สาหร่าย *Chlorococcum* sp. รหัส 8438 เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 pH 7.4 โดยใช้ น้ำกรงที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (121 องศาเซลเซียส 15 นาที) เลี้ยงในหลอดทดลองโดยมีหัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้น 10% ของอาหารเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ตลอด 24 ชั่วโมง (เขย่าวันละ 2 ครั้ง) เมื่อเซลล์สาหร่ายเพิ่มจำนวนมากขึ้น (ประมาณ 1 สัปดาห์) จึงทำการขยายเซลล์สาหร่ายใส่ขวดน้ำเกลือขนาด 1 ลิตร โดยมีการให้อากาศและตั้งให้ได้รับแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอด 24 ชั่วโมง ปิดปากขวดด้วยสำลีและอคูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันการปนเปื้อน เลี้ยงสาหร่ายอีกประมาณ 1 สัปดาห์

1.2 ทำการเก็บเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยรวบรวมเซลล์ที่ตกตะกอนมาเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทของเหลวด้านบนทิ้ง เก็บเซลล์ด้านล่าง โดยการแช่ที่ 0 องศาเซลเซียส และไม่ให้อากาศจนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง

1.3 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสีคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่ายที่เลี้ยง

1.3.1 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

1.3.1.1 กรองสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตรผ่านกระดาษกรอง GF/C บดกระดาษกรองด้วยที่บดให้เนื้อเยื่อละเอียด แล้วเติมอะซีโตน 90 เปอร์เซ็นต์ที่ลown้อยลงในภาชนะที่ใช้บดจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.3.1.2 ถ่ายตัวอย่างทั้งหมดลงในหลอด centrifuge สีขาวหรือหลอดที่บดแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.1.3 นำตัวอย่างในหลอด centrifuge มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ค่อยๆดูดสารละลายที่มีสีด้านบนคือคลอโรฟิลล์ และ ระวังวัตถุอื่นๆที่จะละลายอยู่ในอะซีโตนออกมาวัดการดูดกลืนแสง ระวังอย่าให้รบกวนตะกอนด้านล่าง

1.3.1.4 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 , 663 , 645 , 630 nm นำมาคำนวณ โดยหักลบค่าความขุ่นจาก 750 nm ก่อน แล้วคำนวณตามสูตร

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/L}) = \frac{[11.64 (\text{Abs}663) - 2.16 (\text{Abs}645) + 0.1 (\text{Abs}630)]E(F)}{V(L)}$$

F = Dilution factor (ถ้า Abs663 มากกว่า 0.99 ควรทำการเจือจางตัวอย่างก่อนวัด)

E = ปริมาตรของอะซีโตนที่ใช้ในการสกัด (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรของน้ำที่ใช้กรอง (ลิตร)

L = ความกว้างของเซลล์ที่ใช้วัด (เซนติเมตร)

1.3.2 การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

1.3.2.1 ชั่งสารหยาบ 1.00 กรัม ลงใน screw cap test tube เติมอะซีโตน 25 มิลลิลิตร

1.3.2.2 นำตัวอย่างแช่ลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที แล้วนำออกแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 3 นาที

1.3.2.3 นำตัวอย่างปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสด้านบนออกเก็บในที่มีดและเย็น ส่วนตะกอนด้านล่างเติมอะซีโตนอีก 25 มิลลิลิตร ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จนกระทั่งส่วนตะกอนใสไม่มีสี

1.3.2.4 เมื่อทำการปั่นแยกตะกอนออกแล้ว นำส่วนใสทั้งหมดรวมกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask แล้วถ่ายลงในกรวยแยกสารขนาด 250 มิลลิลิตร

1.3.2.5 เติม diethyl ether ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงผสมกันในกรวยแยกแกว่งเบาๆ เพื่อให้สารละลายแยกชั้น (ห้ามเขย่าเพราะจะทำให้เกิดการแตกตัว) ทิ้งไว้ 2-3 นาที สารละลายจะแยกชั้น จากนั้นปล่อยส่วนล่างทิ้ง

1.3.2.6 ชั้นบนซึ่งเป็นชั้นที่มีแคโรทีนอยด์ ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วเอกลำนี้เป็นเอกลำที่ส่งวิเคราะห์เพื่อการศึกษาค้นคว้า เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายลงในกระบอกตวง บันทึกปริมาตร

1.3.2.7 นำตัวอย่างแคโรทีนอยด์ที่แยกได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย UVVis ที่ความยาวคลื่น 350-550 นาโนเมตร ใช้อะซีโตนเป็น Blank ถ้าค่าที่ได้เกินกว่า 0.9 ต้องเจือจางตัวอย่างด้วยอะซีโตน ปิดฝา cuvette ทุกครั้งที่วัด

2. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงปลาทอง

2.1 เตรียมการสกัดโดยนำสาหร่ายสดหนัก 50 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เย็น 95 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร เทลงขวดพลาสติกที่เตรียมไว้ จากนั้นใส่เม็ดพลาสติกทรงกลมลงไป เขย่าจนเซลล์แตก(เซลล์จะมีสีซีด) ประมาณ 10-15 นาที รังควัตถุจะละลายอยู่ในแอลกอฮอล์

2.2 กรองส่วนใสนำไปฉีดพ่นเคลือบกับอาหารไฮเกรดขนาดเล็ก 100 กรัม โดยที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. 5 กรัม ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ใช้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. 10 กรัม และที่ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ใช้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. 20 กรัม ทั้งอาหารที่ผสมไว้จนแห้ง

2.3 เก็บอาหารที่ผสมสาหร่าย *Chlorococcum* sp. แล้วห่ออะลูมิเนียมฟอยด์ให้มิดชิดนำไปเก็บรักษาในช่องแช่เย็นปกติที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเลี้ยงปลาทองด้วยอาหารผสมรังควัตถุที่ได้จากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สด

3.1 เตรียมน้ำในถังขนาด 20 ลิตร จำนวน 12 ถัง ใส่ตัวกรองสำหรับกรองของเสียถังละ 1 ตัว ทำการให้อากาศแต่ละถังโดยการต่อตัวกรองเข้ากับปั๊มลม

3.2 นำปลาทองจุ่มต่างทับทิมที่ความเข้มข้น 5 ppm ประมาณ 30 วินาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคและปรสิตที่ติดมากับปลาทดลอง

3.3 ปล่อยปลาทองลงถัง ถังละ 20 ตัว (น้ำหนักประมาณ 2.5 กรัม)

3.4 ให้อาหารทุกวัน วันละ 2 ครั้ง (3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัว) โดยอาหารที่ให้แต่ละชุด การทดลองมีความแตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นพร้อมทั้งตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ น้ำ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 8 สัปดาห์

การบันทึกข้อมูล

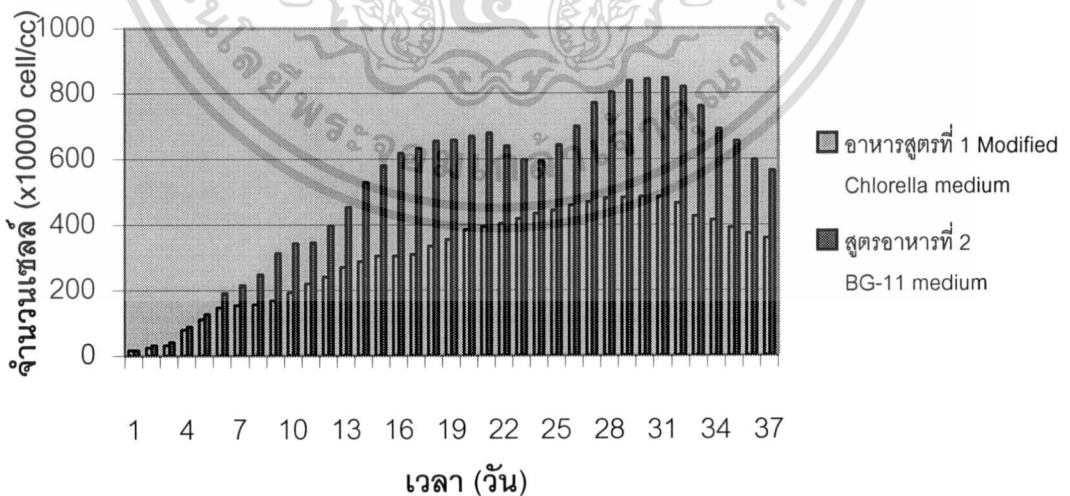
1. บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญเติบโต เช่น น้ำหนัก และความยาวตัว ซึ่งเก็บข้อมูลก่อนทำการเลี้ยงและหลังจากนั้นทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

2. บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับสีบนตัวปลา โดยทำการวัดความเข้มสีบริเวณส่วนลำตัวด้วยเครื่องวัดสี (Chromameter) ยี่ห้อ Konica Minolta รุ่น CR-10 ก่อนการทดลองและทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

ผลการทดลองและวิจารณ์

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร 2 สูตร คือ สูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยใช้สาหร่ายรหัส C8438 คือ *Chlorococcum humicola* Naegeli ในสูตรอาหาร 2 สูตรคือ สูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium (ตารางที่ 4) ที่ทำการเลี้ยงแบบให้อากาศและให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง พบว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร BG-11 medium ทั้งนี้เป็นเพราะสูตรอาหาร BG-11 medium มีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าและสูตรอาหาร BG-11 medium มี $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_{10}$ และ Na_2CO_3 ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ จึงทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 medium เจริญได้ดีกว่าที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร Modified Chlorella medium (ภาพที่ 5) ซึ่งจากผลครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. เจริญเติบโตในสูตรอาหาร BG-11 medium ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงสาหร่ายแกมน้ำเงินได้ดีกว่าสูตรอาหาร Modified Chlorella medium ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่เป็นสาหร่ายสีเขียวเหมือนกันทำให้เห็นว่าสาหร่ายชนิดนี้ต้องการสารอาหารปริมาณค่อนข้างสูงและสามารถเพิ่มจำนวนได้มากถึง 8×10^6 เซลล์/ซีซี ได้นานกว่า 30 วัน



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร Modified Chlorella medium และสูตรอาหาร BG-11 medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ส่วนประกอบ	BG-11 medium (g/L)	Modified Chlorella medium (g/L)
NaNO ₃	1.5	0.117
K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.04	-
KH ₂ PO ₄	-	0.015
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	0.0087
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	-
CaCl ₂	-	0.0017
EDTA	-	0.005
ไดโซเดียมแมกนีเซียม EDTA	0.001	-
C ₆ H ₈ O ₁₀	0.006	-
Ferric ammonium citrate	0.006	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	0.0004
Na ₂ CO ₃	0.02	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	0.0002
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222	0.0009
H ₃ BO ₃	0.00286	0.00114
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.00181	0.00014
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000035	-
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-	0.000049
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00039	-
MoO ₃	-	0.00007
Vitamin B12	-	0.000005

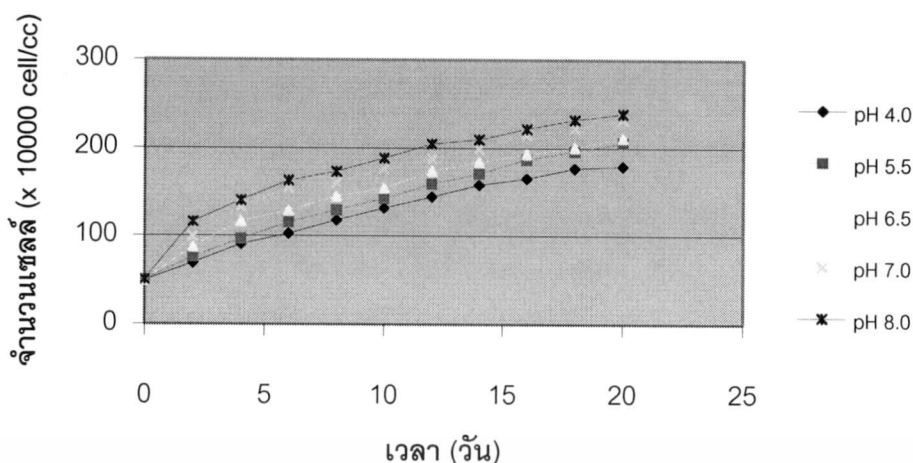
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

2.1. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น $4.99 \pm 0.32 \times 10^5$ เซลล์/มล. มาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH อาหารเริ่มต้นเป็น 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 โดยให้แสงที่ความเข้มแสง $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทำการวัด pH ในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่า pH ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้น ทุกกลุ่มทดลองจาก pH ของอาหารเริ่มต้นที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 จะมีค่าที่วัดในวันที่ 21 ของการทดลองเป็น 7.68, 8.15, 8.56, 9.13 และ 9.57 ตามลำดับ และเมื่อเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ระดับ pH เริ่มต้นตั้งแต่ 4.0-8.0 (ภาพที่ 6) โดยจะมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันดีที่สุดในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 8.0 ส่วนอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันต่ำที่สุดจะพบในกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4.0 (ตารางที่ 5) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Zhang et al. (1997) ที่ทำการศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่แยกมาจากผนังกำแพงในสูตรอาหารปรับปรุง A9 ที่ทำการปรับ pH เริ่มต้นที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ในถัง stirred tank fermentors โดยใช้เซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 0.1-0.15 กรัม/ลิตร ภายใต้การให้แสงที่ $200 \text{ mol photon}/\text{m}^2\text{s}$ ที่อุณหภูมิ $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ พบว่าสาหร่ายชนิดนี้

ตารางที่ 5 อัตราการเจริญเติบโต ($\times 10^4$ เซลล์/มล./วัน) ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นต่างกัน

pH	อัตราการเจริญเติบโต ($\times 10^4$ เซลล์/มล./วัน)
4.0	6.61 ± 0.29^a
5.5	7.69 ± 0.32^{ab}
6.5	7.92 ± 0.33^{ab}
7.0	8.61 ± 0.27^{ab}
8.0	8.97 ± 0.24^b



ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสื่อบุอาหาร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH เริ่มต้นต่างกัน

จะสามารถเจริญเติบโตได้ระหว่าง pH 5.5-9.0 และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ประมาณ 7.0-8.0 โดยมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH เริ่มต้น 8.0 ซึ่งคิดเป็น 0.066 ต่อชั่วโมง ส่วน pH เริ่มต้นที่ 4.0 และ 10.0 สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตได้ถึงวันที่ 4 และ 7 ของการทดลองเท่านั้นแต่จากการทดลองนี้ที่ pH 4.0 สาหร่ายสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็นระยะเวลา นานกว่า 20 วัน

2.2. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. มาเลี้ยงในสื่อบุอาหาร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH ให้คงที่ตลอดการทดลองที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 นาน 2 สัปดาห์พบว่าสีของสาหร่ายในกลุ่มที่มีการปรับ pH ให้คงที่ที่ 4.0 จะมีสีเขียวอมเหลือง ที่ pH มีสีเขียวอ่อน ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงอาหารที่ปรับ pH ให้คงที่ที่ 6.5, 7.0 และ 8.0 มีสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 7) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสีในเซลล์สาหร่ายพบว่าที่ pH 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 จะมีค่าคลอโรฟิลล์ เอ เฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยคิดเป็น 1609.36 ± 166.46 , 2445.84 ± 201.03 , 3798.07 ± 218.54 , 5619.39 ± 122.80 และ 6081.09 ± 199.85 ไมโครกรัม/ลิตร ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเป็น 5892.48 ± 158.68 , 4582.80 ± 173.78 , 6539.63 ± 156.37 , 6855.15 ± 257.05 และ 5739.39 ± 162.25 ไมโครกรัม/ลิตร ซึ่งเมื่อนำค่ามาหาอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ จะได้เป็น 3.66, 1.87, 1.72, 1.22 และ 0.94 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งจากผลที่ได้จะแสดงให้เห็นว่าในสถานะที่เป็นกรดสาหร่ายจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลง ในขณะที่อัตราส่วนของ แคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ เอ เพิ่มขึ้น ผลการทดลองสอดคล้องกับ Brown et al. (1967) ที่พบว่าสาหร่าย *Chlorococcum wimmeri* ที่ทำการเลี้ยงในสถานะที่เป็นกรดจะ

แสดงอัตราส่วนของคลอโรฟิลล์ต่อสารสีแดงลดลงและการเลี้ยงในสภาวะที่เป็นกรดเป็นการเร่งให้มีการเปลี่ยนแปลงสารสีจากสีเขียวไปเป็นสีแดงเมื่อให้ความเข้มแสงต่ำๆ

ตารางที่ 6 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($\mu\text{g/L}$) ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{g/L}$) และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ปรับ pH ให้คงที่ต่างกัน

pH	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($\mu\text{g/L}$)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{g/L}$)	แคโรทีนอยด์/ คลอโรฟิลล์
4.0	1609.36 \pm 166.46 ^a	5892.48 \pm 158.68 ^a	3.66
5.5	2445.84 \pm 201.03 ^b	4582.80 \pm 173.78 ^b	1.87
6.5	3798.07 \pm 218.54 ^c	6539.63 \pm 156.37 ^c	1.72
7.0	5619.39 \pm 122.80 ^d	6855.15 \pm 257.05 ^c	1.22
8.0	6081.09 \pm 199.85 ^e	5739.39 \pm 162.25 ^a	0.94



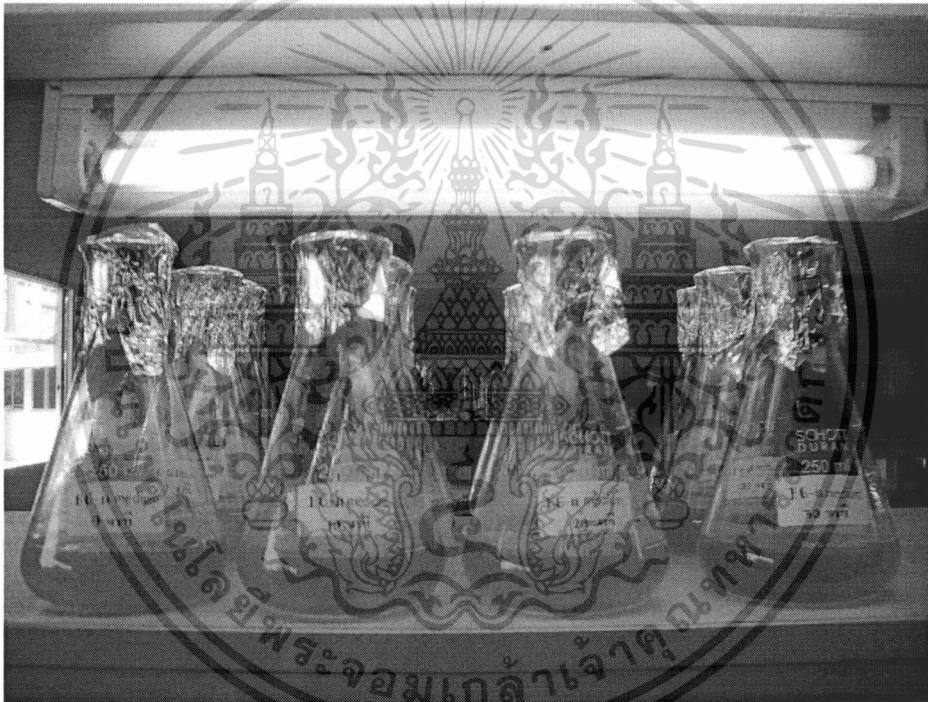
ภาพที่ 7 สีของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำการปรับ

pH ให้คงที่ต่างกัน จากซ้ายไปขวาคือ pH 4, 5, 6, 7, และ 8 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

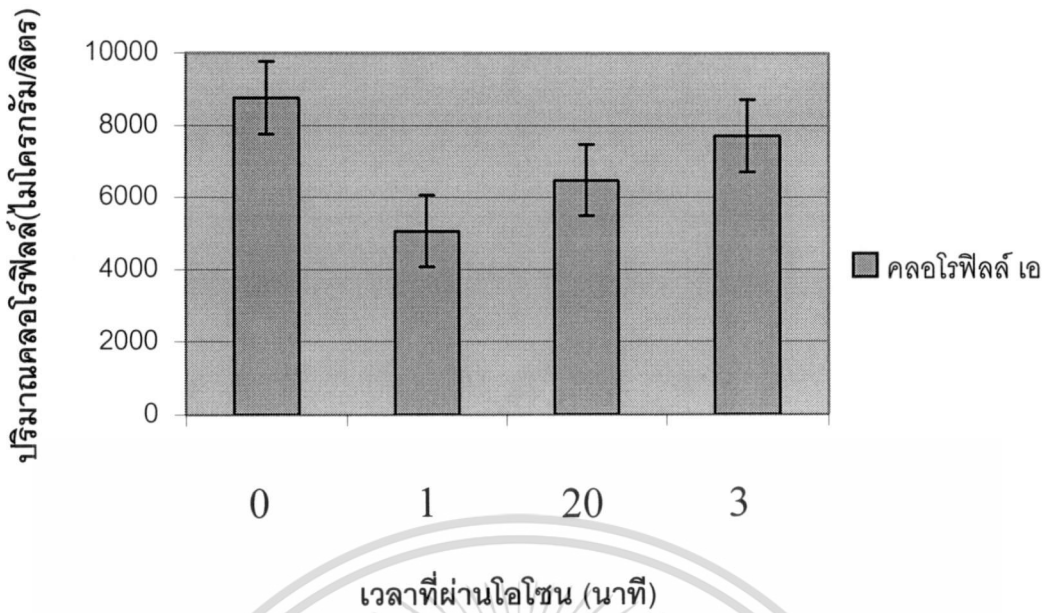
3. ศึกษาผลกระทบของการให้โอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

3.1. สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่นำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ผ่านการให้โอโซนที่เวลาต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 10, 20 และ 30 นาที และเลี้ยงโดยให้แสง 24 ชั่วโมง นาน 7 วัน พบว่าสีของสาหร่ายไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 8) แต่เมื่อนำไปทำการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ พบว่าปริมาณ คลอโรฟิลล์ เอ ที่ทำการให้โอโซนทั้ง 4 ระดับจะแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยในกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำการผ่านโอโซนจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มากที่สุดคิดเป็น 8761.88 $\mu\text{g/L}$ และในกลุ่มที่ทำการให้โอโซนที่ 30, 20 และ 10 นาที จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เป็น 7710.12, 6479.42 และ 5064.96 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ผ่านการให้โอโซนที่เวลาต่างกัน จากซ้ายไปขวาคือ 0, 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ผ่านการให้ไอโซนที่เวลาต่างกัน

4. ศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

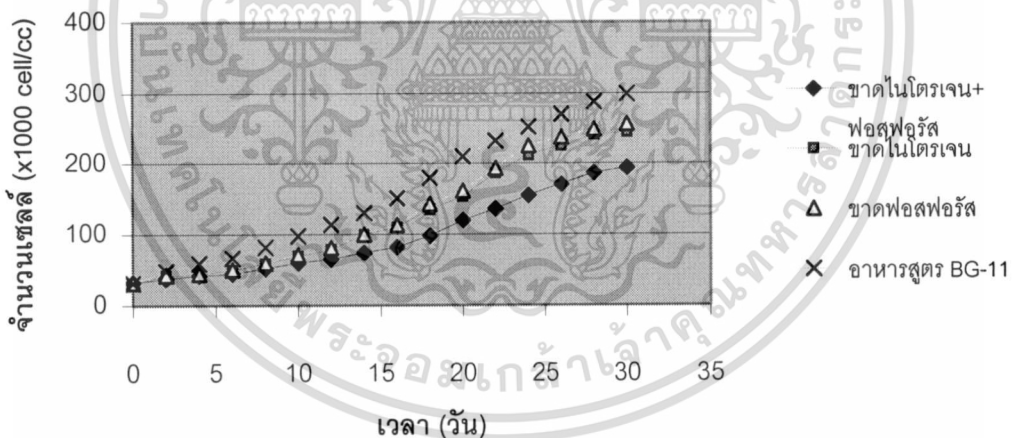
4.1. เลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน (ไม่ใส่ NaNO_3) ขาดฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ NaNO_3 และ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ที่ทำการให้แสงที่ความเข้มแสง $20 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง นาน 30 วัน พบว่าในกลุ่มที่เลี้ยงโดยทำให้ขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดและกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium จะมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยเป็น 6.03 ± 0.49 และ 8.92 ± 0.64 ($\times 10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน) ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ทำให้ขาดไนโตรเจนและทำให้ขาดฟอสฟอรัสจะมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 10) แม้ว่าผลที่ได้จะแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน ขาดฟอสฟอรัส และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสยังสามารถเจริญเติบโตได้แต่จะมีการเจริญเติบโตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 medium แต่ในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ชัดเจนเพราะมีการใช้สาหร่ายเริ่มต้นที่มีอาหารเดิมอยู่ด้วย 10% จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายยังสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารโดยใช้อาหารที่มาพร้อมสาหร่ายในตอนเริ่มต้นในการเจริญเติบโตจึงทำให้ผลของการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในการทดลองนี้ไม่ใช่การขาดธาตุอาหารอย่างสิ้นเชิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 อัตราการเจริญเติบโต ($\times 10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน) ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการทำให้ขาดธาตุอาหารต่างกัน

อาหารเลี้ยง	อัตราการเจริญเติบโต ($\times 10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน)
กลุ่มควบคุม	8.92 ± 0.64^a
ขาดฟอสฟอรัส	7.13 ± 0.44^b
ขาดไนโตรเจน	7.10 ± 0.36^b
ขาดไนโตรเจน+ฟอสฟอรัส	6.03 ± 0.49^c

4.2. สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำการลดสารอาหารลงเหลือเพียงครึ่งเดียวและทำให้ขาดไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยเลี้ยงแบบให้แสงตลอด 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 วัน ทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและลักษณะสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสาหร่ายที่ทำการลดสารอาหารเหลือเพียง



ภาพที่ 10 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดธาตุอาหารต่างกัน

ครึ่งหนึ่งมีสีเขียวเข้ม ลักษณะเซลล์ที่เห็นใต้กล้องจุลทรรศน์มีขนาดใหญ่ ผนังเซลล์หนา เซลล์แยกกันอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่เกาะกลุ่มกัน (ภาพที่ 11) สาหร่ายที่ทำการลดอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดฟอสฟอรัสมีสีเขียวเข้มขุ่น ขนาดเซลล์เล็กและผนังเซลล์บางกว่ากลุ่ม

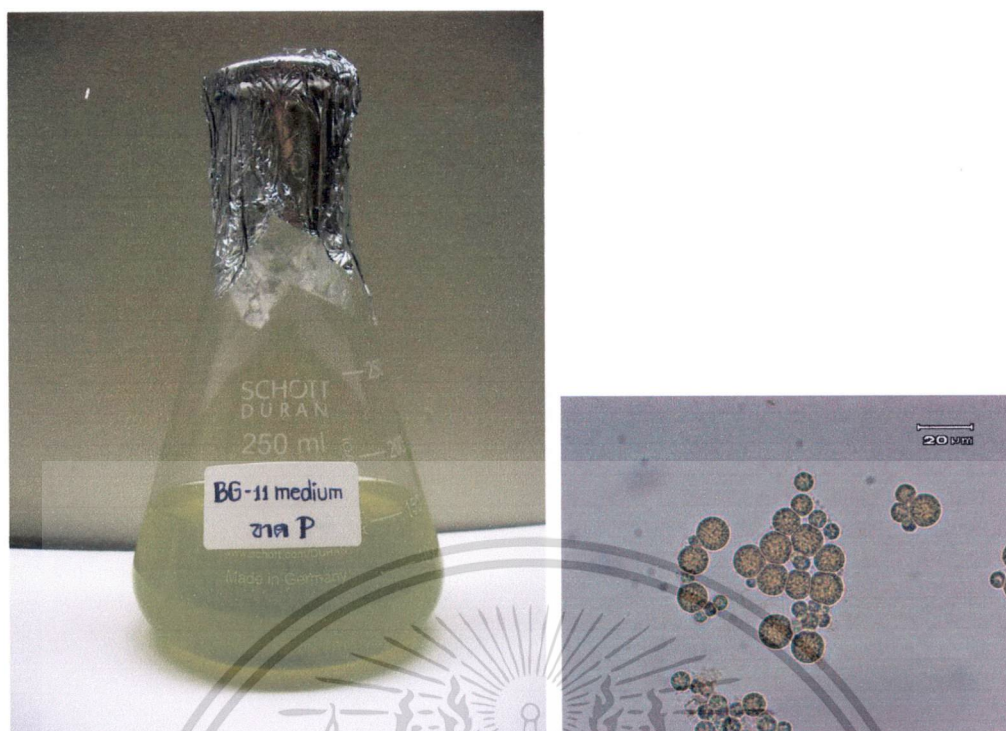
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่ามีการอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและสังเกตเห็นสารสีแดงเป็นจุดสีแดงเล็กๆอยู่ภายในเซลล์ (ภาพที่ 12) สาหร่ายที่ทำการลดอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดไนโตรเจนจะมีสีเขียวเมื่อนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเซลล์สาหร่ายบางเซลล์มีการสะสมสารสีแดงซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดเจน ขนาดเซลล์เล็กกว่ากลุ่มอื่นและเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน (ภาพที่ 13) ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงโดยทำให้ขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีสีเขียว ขนาดเซลล์เล็กกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ขาดฟอสฟอรัส เซลล์อยู่รวมเป็นกลุ่มแต่ยังเห็นเป็นเซลล์เดี่ยวๆเช่นเดียวกับกลุ่มขาดฟอสฟอรัสและมีการสะสมสารสีแดงเช่นเดียวกับกลุ่มขาดไนโตรเจนโดยเห็นเป็นจุดสีแดงเล็กๆอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องของ Boussiba et al. (1999) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารสีในสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดฟอสฟอรัสและทำให้ขาดไนโตรเจน และให้แสงที่ $100 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และวิเคราะห์ astaxanthin ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้พบว่า การเลี้ยงสาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนและที่ขาดฟอสฟอรัสจะทำให้สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้นและมีการสะสม astaxanthin เพิ่มขึ้น 4% ของน้ำหนักแห้ง แต่อัตราการสะสม astaxanthin ภายใต้สภาวะที่ทำให้ขาดไนโตรเจนจะเกิดขึ้นเร็วกว่า

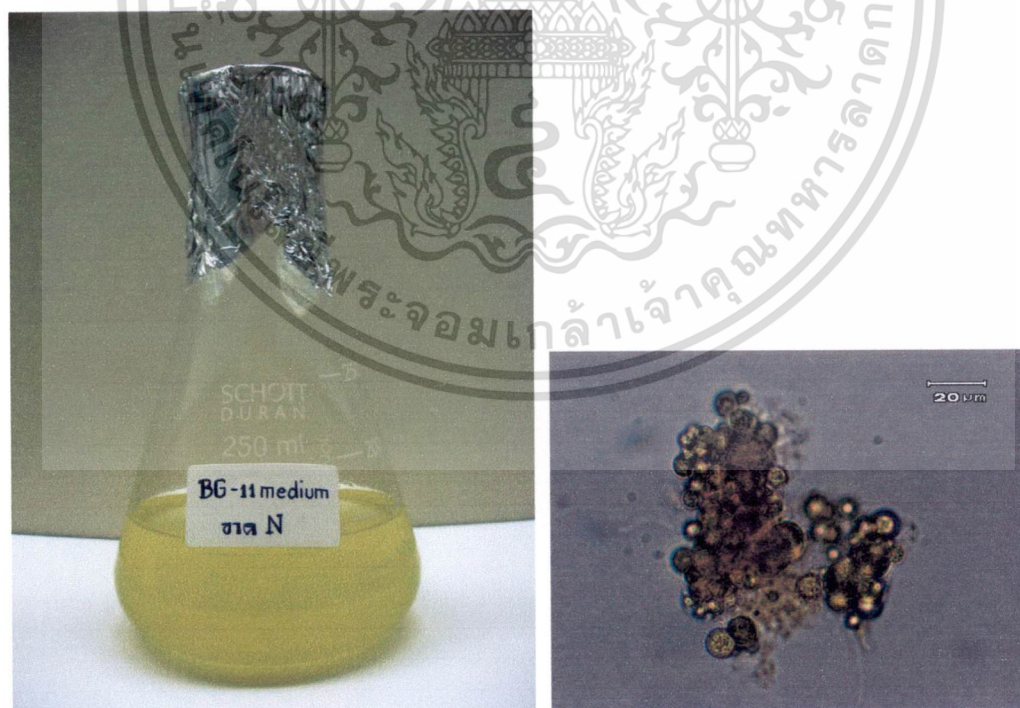


ภาพที่ 11 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

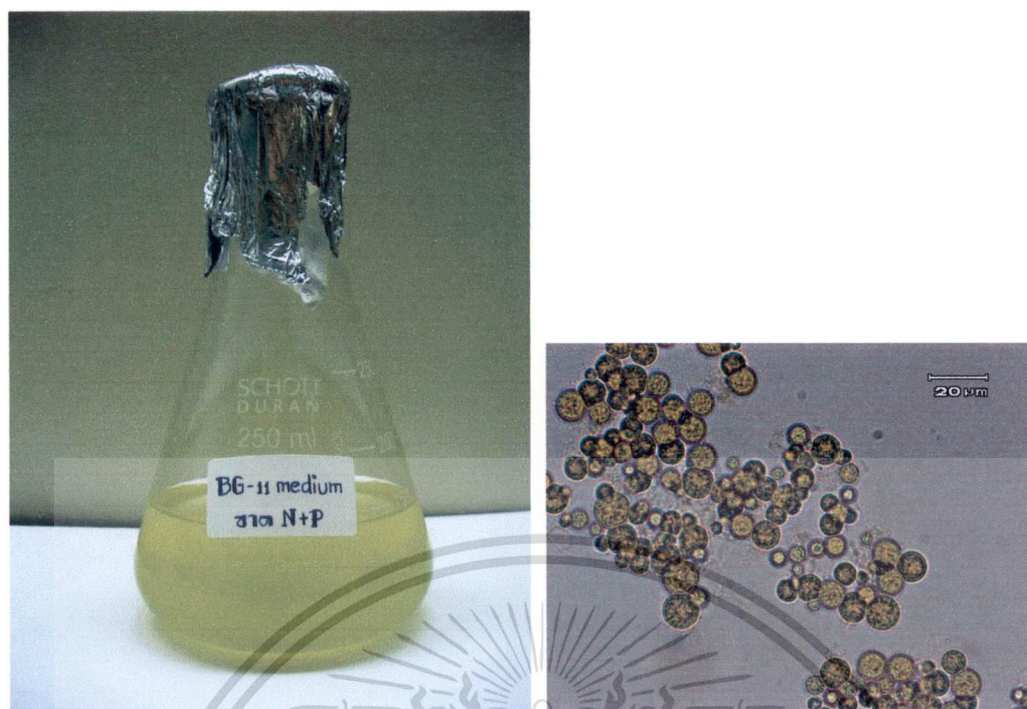


ภาพที่ 12 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง และทำให้ขาดธาตุฟอสฟอรัส (คือไม่ใส่ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ลงในอาหารเลี้ยง)



ภาพที่ 13 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง และทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน (คือไม่ใส่ $NaNO_3$ ลงในอาหารเลี้ยง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง และทำให้ขาดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (คือไม่ใส่ NaNO_3 และ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ลงในอาหารเลี้ยง)

นอกจากนี้เมื่อนำสาหร่ายไปทำการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ พบว่ากลุ่มควบคุมที่ทำการเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งทั้งกลุ่มที่ทำให้ขาดไนโตรเจนและกลุ่มที่ทำให้ขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จะไม่แสดงความแตกต่างกันทางสถิติโดยมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เป็น 1636.71 ± 251.11 และ 1994.10 ± 239.63 $\mu\text{g/L}$ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเป็น 3540.22 ± 209.28 และ 3740.45 ± 223.56 $\mu\text{g/L}$ และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์คิดเป็น 2.16 และ 1.88 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณคลอโรฟิลล์ของทั้งสองกลุ่มนี้จะแตกต่างจากกลุ่มสาหร่ายที่เลี้ยงแบบขาดฟอสฟอรัสและกลุ่มควบคุมที่ทำการลดสารอาหารลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง โดยสาหร่ายในกลุ่มที่เลี้ยงแบบขาดฟอสฟอรัสจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เท่ากับ 3082.22 ± 375.64 $\mu\text{g/L}$ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเป็น 5110.54 ± 162.37 $\mu\text{g/L}$ และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์คิดเป็น 1.66 ส่วนกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เท่ากับ 4232.68 ± 230.94 $\mu\text{g/L}$ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเป็น 6053.75 ± 183.69 $\mu\text{g/L}$ และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์คิดเป็น 1.43 (ตารางที่ 8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ ในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุต่างกัน

สูตรอาหาร	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ($\mu\text{g/L}$)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{g/L}$)	แคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์
กลุ่มควบคุม	4232.68 \pm 230.94 ^a	6053.75 \pm 183.69 ^a	1.43
ขาดฟอสฟอรัส	3082.22 \pm 375.64 ^b	5110.54 \pm 162.37 ^b	1.66
ขาดไนโตรเจน	1636.71 \pm 251.11 ^c	3540.22 \pm 209.28 ^c	2.16
ขาดไนโตรเจน+ฟอสฟอรัส	1994.10 \pm 239.63 ^c	3740.45 \pm 223.56 ^c	1.88

5. ผลของอาหารผสมสารสีจากสาหร่ายต่อการเจริญเติบโตของปลาทอง

จากการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักสุดท้ายของปลาทอง และความยาวตัวของปลาทองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ระดับต่างๆกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8 และ 9)

เมื่อครบ 8 สัปดาห์น้ำหนักสุดท้ายของปลาทองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0, 10, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 4.45 \pm 0.62, 4.96 \pm 0.30, 5.74 \pm 0.45 และ 5.09 \pm 0.48 กรัม ตามลำดับ ความยาวตัวของปลาทองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0, 10, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 5.36 \pm 0.18, 5.67 \pm 0.24, 5.90 \pm 0.13 และ 5.53 \pm 0.20 กรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 9 น้ำหนักของปลาทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. ระดับต่างๆ

อาหารผสมสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. (%)	ระยะเวลา (สัปดาห์)				
	0	2	4	6	8
0	1.70 \pm 0.14 ^a	2.83 \pm 0.12 ^a	3.30 \pm 0.33 ^a	3.81 \pm 0.27 ^a	4.45 \pm 0.62 ^a
10	2.03 \pm 0.11 ^a	3.32 \pm 0.53 ^a	3.59 \pm 0.04 ^a	3.84 \pm 0.07 ^a	4.96 \pm 0.30 ^a
20	1.95 \pm 0.03 ^a	2.65 \pm 0.10 ^a	3.39 \pm 0.25 ^a	4.23 \pm 0.45 ^a	5.74 \pm 0.45 ^a
40	1.94 \pm 0.09 ^a	3.23 \pm 0.03 ^a	3.40 \pm 0.39 ^a	4.51 \pm 0.37 ^a	5.09 \pm 0.48 ^a

*อักษรที่ไม่ต่างกันแถวเดียวกัน หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

6. ผลของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มสีของปลาทอง

จากการศึกษา การเปลี่ยนแปลงความเข้มของสีผิวปลาทอง ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมสาหร่ายสีจากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. 0, 10, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีผิวบริเวณลำตัวด้วยเครื่องวัดสี (Chromameter) ซึ่งอ่านค่าในระบบ CIE L a* b* ทุกๆ 2 สัปดาห์ จนกระทั่งครบ 8 สัปดาห์ โดยค่า L คือความสว่างของสี ค่า a* คือความเข้มของสีแดง และค่า b* คือความเข้มของสีเหลือง

ตารางที่ 10 ความยาวตัวของปลาทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. ระดับต่างๆ

อาหารผสมสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. (%)	ระยะเวลา (สัปดาห์)				
	0	2	4	6	8
0	3.21±0.16 ^a	4.37±0.06 ^a	4.92±0.04 ^a	4.98±0.18 ^a	5.36±0.18 ^a
10	3.34±0.27 ^a	4.54±0.33 ^a	4.83±0.08 ^a	4.98±0.11 ^a	5.67±0.24 ^a
20	3.26±0.16 ^a	4.23±0.05 ^a	5.03±0.07 ^a	5.31±0.32 ^a	5.90±0.13 ^a
40	3.19±0.11 ^a	4.69±0.02 ^a	4.93±0.20 ^a	5.20±0.17 ^a	5.53±0.20 ^a

*อักษรที่ไม่ต่างกันในแต่ละแถว หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ค่าความเข้มของสีแดงบริเวณลำตัว (a*) ของปลาทอง

ผลของค่าความเข้มของสีแดงบริเวณลำตัว (a*) มีค่าความเข้มของสีแดงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 10)

ในสัปดาห์ที่ 2 ค่าความเข้มของสีแดงในชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าความเข้มของสีแดงมากที่สุดคือ 11.06 ± 0.75 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้อาหารเสริม *Chlorococcum* sp. 20 เปอร์เซ็นต์

ในสัปดาห์ที่ 4 ทำการวัดค่าความเข้มของสีแดงในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มของสีแดงมากที่สุดคือ 13.27 ± 0.51 โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้อาหารเสริม *Chlorococcum* sp. 20 เปอร์เซ็นต์

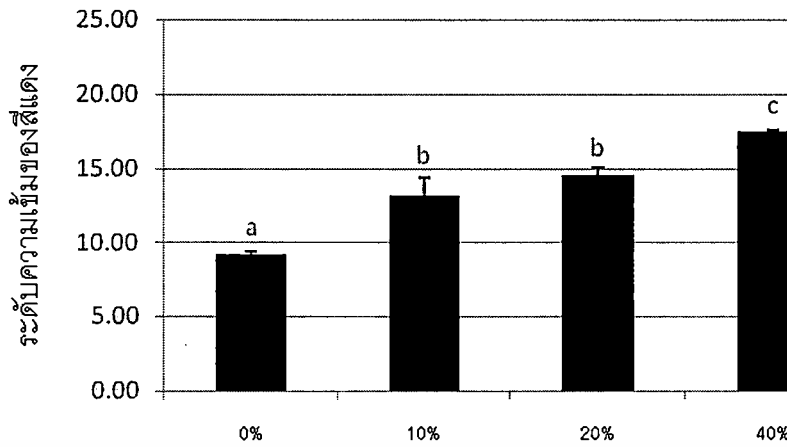
ในสัปดาห์ที่ 6 ทำการวัดค่าความเข้มของสีแดงในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มของสีแดงมากที่สุดคือ 13.86 ± 0.59 โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์

ในสัปดาห์ที่ 8 ทำการวัดค่าความเข้มของสีแดงในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มของสีแดงมากที่สุดคือ 17.41 ± 0.19 โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 ระดับความเข้มของสีแดงบนผิวปลาแต่ละชุดการทดลองที่ทำการวัดในแต่ละครั้ง

อาหารผสมสำหรับราย	ระยะเวลา (สัปดาห์)				
	0	2	4	6	8
<i>Chlorococcum</i> sp. (%)					
0	8.03 ± 0.72^a	8.43 ± 0.21^a	9.18 ± 0.42^a	9.07 ± 0.12^a	9.18 ± 0.21^a
10	8.20 ± 0.03^a	8.55 ± 0.19^a	9.96 ± 0.44^a	12.78 ± 1.28^b	13.12 ± 1.26^b
20	8.23 ± 0.09^a	10.47 ± 0.06^b	11.98 ± 0.93^b	13.44 ± 0.78^b	14.54 ± 0.55^b
40	8.31 ± 0.19^a	11.06 ± 0.75^b	13.27 ± 0.51^b	13.86 ± 0.59^b	17.41 ± 0.19^c

*อักษรที่ไม่ต่างกันแถวเดียวกัน หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)



อาหารผสมสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ภาพที่ 15 ระดับความเข้มข้นของสีเขียวบนผิวปลาในแต่ละชุดการทดลอง

ค่าความเข้มข้นของสีเขียวบริเวณลำตัว (b^*) ของปลาทอง

ผลของค่าความเข้มข้นของสีเขียวบริเวณลำตัว (b^*) มีค่าความเข้มข้นของสีเขียวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 12)

ในสัปดาห์ที่ 2 ค่าความเข้มข้นของสีเขียวในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. และ ชุดควบคุม

ในสัปดาห์ที่ 4 ทำการวัดค่าความเข้มข้นของสีเขียวในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มข้นของสีเขียวน้อยที่สุด คือ 28.20 ± 0.22 โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับชุดควบคุม

ในสัปดาห์ที่ 6 ทำการวัดค่าความเข้มข้นของสีเขียวในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. และชุดควบคุม

ในสัปดาห์ที่ 8 ทำการวัดค่าความเข้มข้นของสีเขียวในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มข้นของสีเขียวน้อยที่สุด คือ 24.39 ± 1.30 โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ระดับความเข้มของสีเหลืองบนผิวปลาแต่ละชุดการทดลองที่ทำการวัดในแต่ละครั้ง

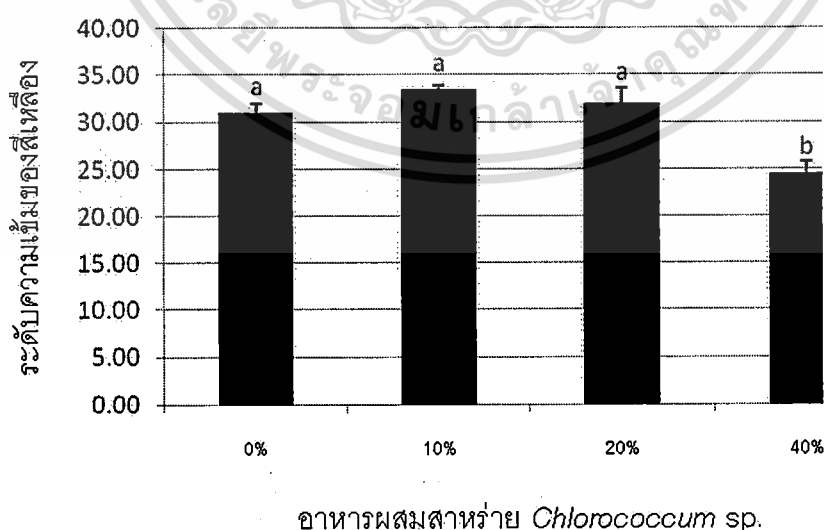
อาหารผสมสาหร่าย <i>Chlorococcum</i> sp. (%)	ระยะเวลา (สัปดาห์)				
	0	2	4	6	8
0	30.76±2.82 ^a	30.31±1.07 ^a	29.28±1.64 ^a	31.84±0.81 ^a	30.97±1.02 ^b
10	33.96±2.07 ^a	30.92±2.08 ^a	32.32±0.61 ^b	32.48±1.73 ^a	33.39±0.50 ^b
20	34.24±0.75 ^a	32.54±3.26 ^a	32.52±0.25 ^b	33.48±1.38 ^a	31.85±1.84 ^b
40	34.24±1.01 ^a	36.19±0.56 ^a	28.20±0.22 ^a	29.84±0.80 ^a	24.39±1.30 ^a

*อักษรที่ไม่ต่างกันแถวเดียวกัน หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ค่าความสว่างของสีบริเวณลำตัว (L) ของปลาทอง

ผลของค่าความสว่างของสีบริเวณลำตัว (L) ของปลาหม่อมมาลาวิทอง มีค่าความสว่างของสีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 12)

ในสัปดาห์ที่ 2 ทำการวัดค่าความสว่างของสีในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. และชุดควบคุม



ภาพที่ 16 ระดับความเข้มของสีเหลืองบนผิวปลาในแต่ละชุดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสัปดาห์ที่ 4 ค่าความสว่างของสีในชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าความสว่างของสีน้อยที่สุด คือ 57.33 ± 1.80 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์

ในสัปดาห์ที่ 6 ค่าความสว่างของสีในชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าความสว่างของสีน้อยที่สุด คือ 52.33 ± 1.86 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์

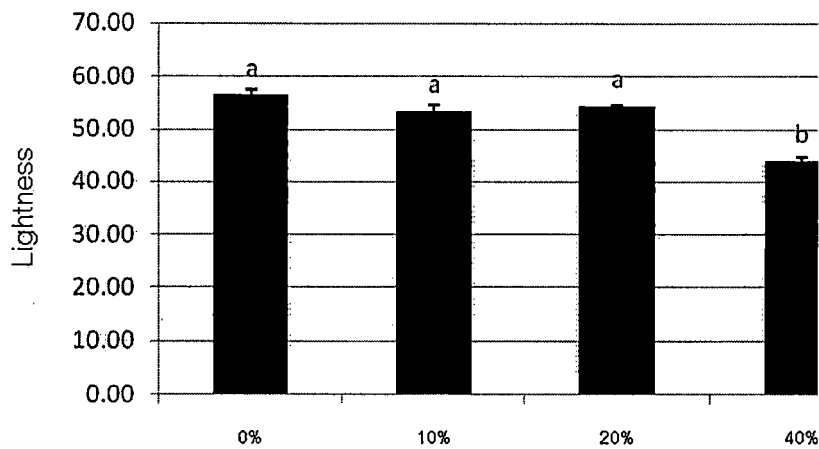
ในสัปดาห์ที่ 8 ค่าความสว่างของสีในชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าความสว่างของสีน้อยที่สุด คือ 43.92 ± 0.60 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลองที่ให้อาหารที่เสริม *Chlorococcum* sp. 0, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 ระดับความสว่างของสีบนผิวปลาแต่ละชุดการทดลองที่ทำการวัดในแต่ละครั้ง

อาหารผสมสำหรับราย	ระยะเวลา (สัปดาห์)				
	0	2	4	6	8
<i>Chlorococcum</i> sp. (%)					
0	57.17 ± 1.01^a	60.27 ± 0.40^a	63.79 ± 2.64^b	60.64 ± 1.57^b	56.33 ± 1.06^b
10	57.24 ± 1.60^a	63.37 ± 0.40^a	64.63 ± 0.82^b	57.96 ± 1.80^{ab}	53.28 ± 1.38^b
20	55.69 ± 0.72^a	57.45 ± 3.50^a	61.44 ± 0.25^{ab}	57.78 ± 1.62^{ab}	54.30 ± 0.15^b
40	56.19 ± 0.86^a	63.01 ± 0.77^a	57.33 ± 1.80^a	52.33 ± 1.86^a	43.92 ± 0.60^a

*อักษรที่ไม่ต่างกันในแต่ละแถวเดียวกัน หมายถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

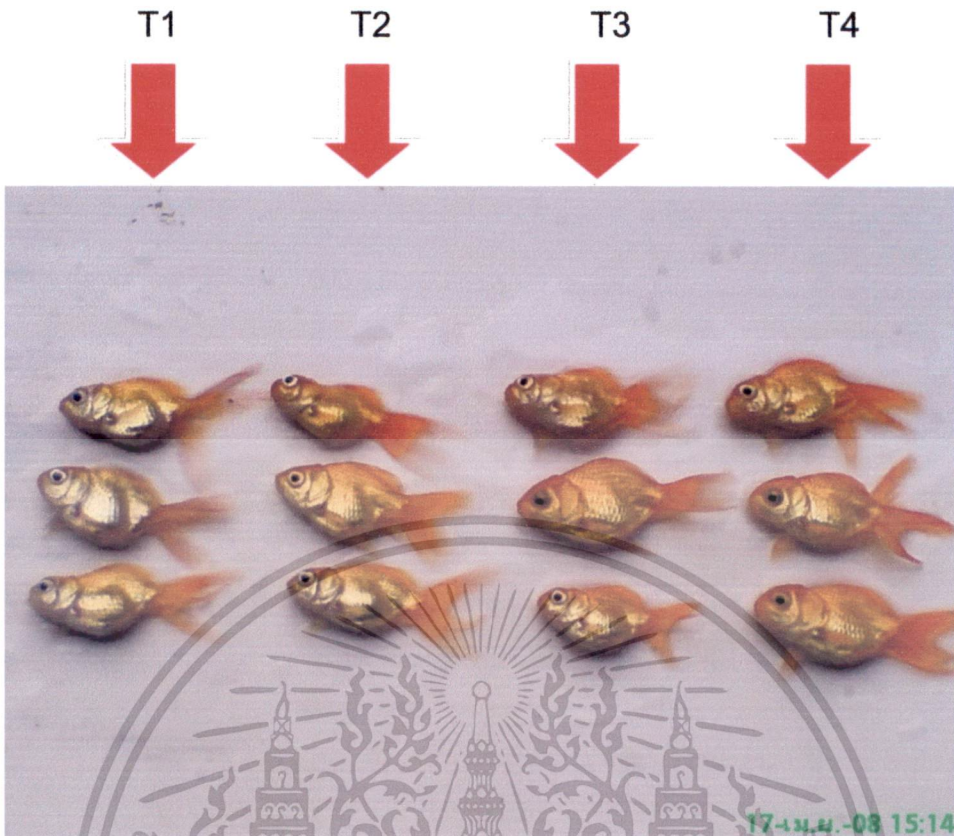
จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การให้อาหารที่มีส่วนผสมของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ตั้งแต่ 10-40 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเกิดสีแดงบริเวณลำตัวของปลาทอง ปลาจะเริ่มมีสีแดงเข้มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 และทำให้สีเหลืองบริเวณลำตัวลดลง เมื่อระดับความเข้มข้นของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหารสูงขึ้นสามารถทำให้ความเข้มสีแดงเข้มมากขึ้นบริเวณลำตัว และทำให้สีเหลืองบริเวณลำตัวลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Paripatananont et al., (1999) ได้ทำการศึกษาระดับของแอสตาแซนทินที่เหมาะสมต่อการเกิดสีในปลาทอง โดยแบ่งปลาออกเป็น 3



อาหารผสมสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ภาพที่ 17 ค่า lightness ของแต่ละชุดการทดลอง

กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว น้ำหนักประมาณ 10 กรัม จากนั้นให้อาหารที่เสริมด้วยแอสตาแซนทินที่ระดับ 0-100 mg/kg เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยจะสุ่มปลาแต่ละกลุ่มมาตรวจสอบและวัดสีที่ได้ชั้นผิวหนัง ซึ่งพบว่ากระบวนการสร้างเซลล์สีจะถูกกระตุ้นให้มีการพัฒนาการสร้างสีได้ดีหลังจากได้รับปริมาณแอสตาแซนทินที่อยู่ในช่วง 0-40 mg/kg และระดับที่เหมาะสมที่สุดคือ 36-37 mg/kg แต่ถ้ามีการเพิ่มปริมาณแอสตาแซนทินในระดับที่มากกว่า 40 mg/kg การให้สีก็จะไม่เกิดประสิทธิภาพใดๆ



ภาพที่18 เปรียบเทียบสีผิวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง T1 คือ ปลาในกลุ่มควบคุม (control) T2 คือ ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย *Chlorococcum* sp. 10 เปอร์เซ็นต์ T3 คือ ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย *Chlorococcum* sp. 20 เปอร์เซ็นต์ และ T4 คือ ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์

สรุป

1. พบว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. รหัส C8438 จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร BG-11 medium เนื่องจาก BG-11 medium มีปริมาณของไนโตรเจนสูงกว่าอาหารสูตร *Chlorella* medium และในสูตร BG-11 medium มี $C_6H_8O_{10}$ และ Na_2CO_3 ซึ่งจัดเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ใช้ในการเจริญเติบโตได้จึงทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium เจริญเติบโตได้ดีกว่า

2. การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตโดยเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ปรับ pH เริ่มต้นที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 พบว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ตั้งแต่ pH อาหารเริ่มต้น 4.0-8.0 แต่จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อปรับ pH อาหารเริ่มที่ 7.0 และ 8.0 หรือในสภาพที่เป็นต่าง ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ปรับ pH ในอาหารสูตร BG-11 medium ให้คงที่ตลอดการทดลองที่ระดับต่างๆ 5 ระดับ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH ให้คงที่ที่ 4.0 จะมีสีเหลืองเขียวและมีอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์สูงที่สุด ส่วนอาหารที่ปรับ pH ให้คงที่ที่ 5.5 จะมีสีเขียวอ่อนและที่ 6.5-8.0 จะมีสีเขียวเข้ม โดยอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์จะลดต่ำลงเมื่อปรับ pH ให้คงที่สูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสภาพที่เป็นกรดหรือ pH ต่ำจะทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. มีการสะสมแคโรทีนอยด์หรือสารสีแดงสูงขึ้นในขณะที่จะปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดน้อยลง

3. การศึกษาผลกระทบของการให้ออกซิเจนต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยทำการให้ออกซิเจนที่เวลาต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 10, 20 และ 30 นาที เมื่อจบการทดลองพบว่าสีในสาหร่ายทุกกลุ่มไม่ต่างกันโดยในแต่ละกลุ่มจะมีสีเขียวเข้มแต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์จะพบว่าสาหร่ายในกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำการผ่านออกซิเจนจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงที่สุด และเมื่อทำการให้ออกซิเจนปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดลง โดยการให้ออกซิเจนที่ 10 นาทีจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ น้อยที่สุด

4. การศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ให้อาหารที่ทำให้ขาดไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่าสาหร่ายเมื่อขาดธาตุอาหารก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้แต่ผลการทดลองไม่อาจยืนยันได้ชัดเจนเพราะมีการให้อาหาร 10% จากตอนเริ่มต้นจึงทำให้ผลของการขาดธาตุอาหารไม่ชัดเจน ส่วนการศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ทำการลดสารอาหารลดเหลือครึ่งหนึ่งแล้วทำให้ขาดธาตุอาหารต่างกัน พบสาหร่ายที่เลี้ยงแบบขาดไนโตรเจนและขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีสีเหลืองและสีเหลืองเขียว ในขณะที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีสีเขียวขุ่น ส่วนกลุ่มควบคุมที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีสีเขียวเข้ม นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะมีการสะสมสารสีแดงทั้งในสภาวะการเลี้ยงที่ทำให้ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส แต่จะมีการสะสมสารสีแดงมากที่สุดเมื่อลดสารอาหารในสูตร BG-11 medium ลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดไนโตรเจน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร BG-11 medium โดยสามารถเจริญเติบโตได้ตั้งแต่ pH เริ่มต้นที่ 4.0-8.0 แต่อัตราการเจริญเติบโตต่อวันจะดีที่สุดที่ pH 8.0 หรือในสภาวะที่เป็นด่าง ส่วนในสภาวะที่เป็นกรดจะทำให้สาหร่ายชนิดนี้มีการเปลี่ยนคลอโรฟิลล์ไปเป็นแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มขึ้น ในขณะที่การลดอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งแล้วทำให้ขาดไนโตรเจนจะทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. มีการสะสมสารสีแดงหรือแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด

5. จากการศึกษาผลของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในการเร่งสีปลาทอง โดยผสมกับอาหารปลาไฮเกรดขนาดเล็กโปรตีน 45 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 10, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าการวัดสีในกลุ่มของปลาที่ได้รับอาหารเสริมด้วยสารสีที่ได้จาก *Chlorococcum* sp. มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับทุกกลุ่มการทดลองรวมทั้งกลุ่มควบคุม โดยปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ จะพบระดับความเข้มของสีแดงบนผิวตัวปลาสูงสุด รองลงมาคือ 20, 10 เปอร์เซ็นต์และกลุ่มควบคุมตามลำดับ ส่วนค่าระดับความเข้มของสีเหลืองบนผิวตัวปลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปลาในกลุ่มทดลองอื่นๆ โดยในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมด้วย *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสีเหลืองบนผิวตัวที่ต่ำสุด ส่วนค่าความสว่างบนผิวปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *Chlorococcum* sp. มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างทุกกลุ่มการทดลอง โดยในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *Chlorococcum* sp. 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความสว่างของสีผิวที่ต่ำสุด และยังไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และน้ำหนักตัว โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

สรุปได้ว่าค่าสีเฉลี่ยบริเวณลำตัวของปลาทองสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้จากการให้อาหารผสมสารสีจากสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ดังนั้นสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอาหารเร่งสีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

เอกสารอ้างอิง

- ยวดี พีรพรพิศาล. 2549. สหรัยวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, เชียงใหม่. 546 น.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2539. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 131 น.
- วิไลลักษณ์ จำรูณ สาริต โกวิทวที และชนิษฐา ไชเจริญ. 2549. ผลของโซเดียมฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของ *Chlorococcum* sp.. โพรแกรมนิเทศศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, กรุงเทพฯ.
- สุดสายชล หอมทอง. 2541. การผลิต astaxanthin จากสาหร่าย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Borowitzka, M.A., J.M. Huisman and A. Osborn. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Applied Phycology*. 3: 295-304.
- Boussiba, S., W. Bing, J.P. Yuan, A. Zarka and F. Chen. 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. 21: 601-604.
- Brown, T.E., F.L. Richardson, M.L. Vaughn. 1967. Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales). *Phycologia*. 6:167-184.
- Choubert, G., M. M. Mendes-pinto, and R. Morais. 2006. Pigmenting effect of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* : Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. *Aquaculture*. 257: 429-436.
- Hu, Q. 2004. Environmental effects on cell composition. pp. 83-88. In Richmond, A. editor. *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publ. co., USA.
- Johnson, E.A., T.G. Villa and M.J. Lewis. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture*. 20: 123-134.
- Jyonouchi, H., S. Sun, M. Mizokami and M.D. Gross. 1996. Effect of various carotenoid on clone, effector-stage T-helper cell activity. *Nutrition and Cancer*. 26: 313-324.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Liu, B.H. and Y. K. Lee. 1999. Composition and biosynthetic pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. *Biotechnology Letters* 21:1007-1010.
- Liu, B.H. and Y.K. Lee. 2001. *In vitro* biosynthesis of xanthophylls by cell extracts of a green alga *Chlorococcum*. *Plant Physiol Biochem.* 39: 147-154.
- Liu, B.H. and Y.K. Lee. 2003. Effect of total secondary carotenoid extracts from *Chlorococcum* sp. on *Helicobacter pylori* – infected BALB/c mice. *International Immunopharmacology.* 3: 979-986.
- Lorenz, R.T. and G.R. Cysewski. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Tibtech.* 18: 160-166.
- Ma, R. Y. N. and F. Chen. 2001. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. *Process biochemistry* 36:1175-1179.
- Masojidek, J., G. Torzillo, J. Kopecky, M. Koblizek, L. Nidiaci, J. Komenda, A. Lukavska, and A. sacchi. 2000. Change in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. Grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *Applied Phycology.* 12: 417-426.
- Maurusich, W.L. and S.C. Bauernfeind. 1989. Oxycarotenoids in poultry feeds. pp. 319-462. *In* Bauernfeind, S.C. editor. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors.* Food Science and Technology a series of Monograph. Academic Press. Inc., London.
- Paripatananont, T., J.Tangtrongpairoj, A.Sailasuta and N.Chansue. 1999. Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of the world aquaculture society* 30:454-460.
- Xu, X., Z. Jin, H. Wang, X. Chen, C. Wang and S. Yu. 2006. Effect of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* on the pigmentation of goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of the world aquaculture society* 37:282-288.
- Yaun, J. P., F. Chen, X. Liu and X. Z. Li. 2002. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. *Food chemistry* 76:319-325.

Zhang, D. H., Y. K. Lee, M. L. Ng and S. M. Phang. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *Journal of Applied Phycology*9:147-155.

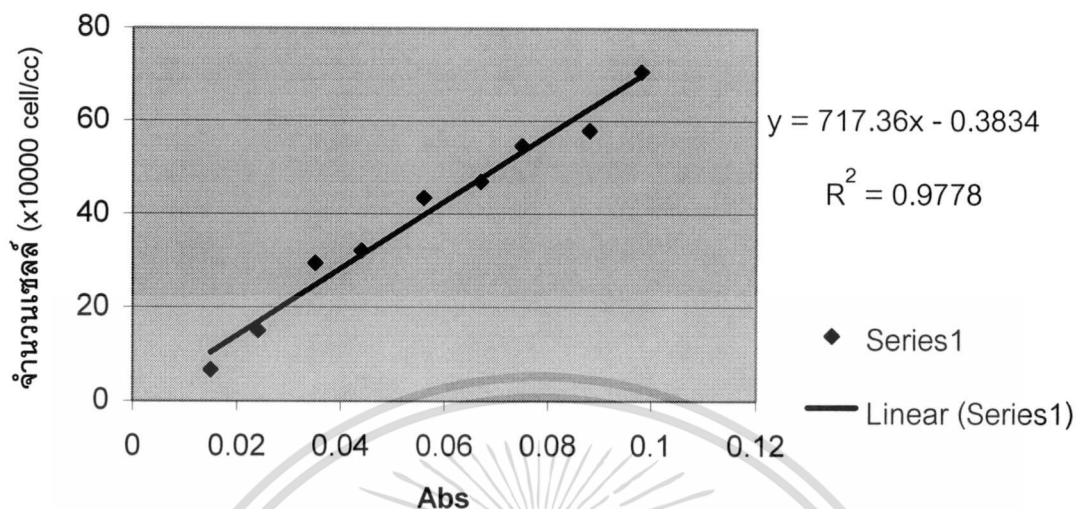
Zhang, D.H. and Y.K. Lee. 2001. Two – step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. Strain MA-1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 537-540.

<http://silicasecchidish.conncoll.edu/>

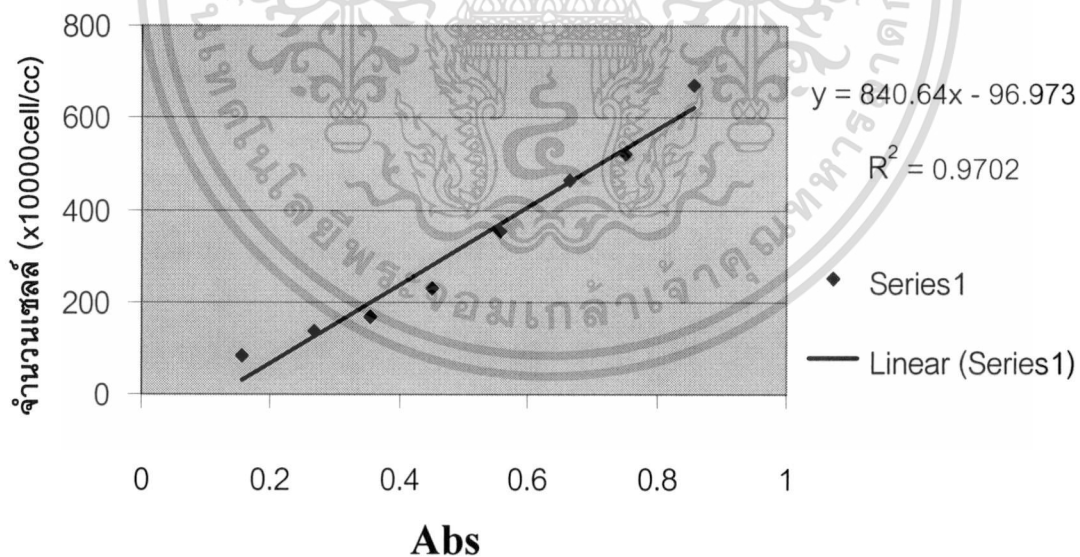


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก



ภาคผนวกที่ 1 สมการอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 680 nm (Abs ที่ 0.01-0.09)



ภาคผนวกที่ 2 สมการอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 680 nm (Abs ที่ 0.1-0.9)