สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Haematococcus* sp.

นางสาวเบญจรัตน์ ธรรมาปรีชากร
นางสาวมณีรัตน์ แววประเสริฐ
นายสถิตย์พงศ์ บุญญานุสิทธิ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2540

วพ.
ป 786 ก
เลขหมู่ 25A0
เลขทะเบียน 30612
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on optimum condition for the cultivation of

Haematococcus sp.

Miss Benjarat Thammapreechakorn

Miss Maneerat Vaewprasert

Mr. Satitpong Boonyanusit

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institue of Technology Ladkrabang

1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Haematococcus* sp.
โดย	นางสาวเบญจรัตน์ ธรรมาปรีชากร
	นางสาวมณีรัตน์ แววประเสริฐ
	นายสถิตย์พงศ์ บุญญานุสิทธิ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์วีนา ชูโชติ
	อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

_____ กรรมการ

(อาจารย์วีนา ชูโชติ)

_____ กรรมการ

(อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Haematococcus* sp.
นักศึกษา	นางสาวเบญจรัตน์ ธรรมาปรีชากร
	นางสาวมณีรัตน์ แววประเสริฐ
	นายสถิตย์พงศ์ บุญญานุสิทธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์วีนา ชูโชติ
	อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ
ภาควิชา	ชีวาวิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

การศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ BG-11 , JM และ BB โดยทุกสูตรอาหารจะเติม soil extract ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตรลงไป ให้ความเข้มแสง 3 ระดับ คือ 400 ลักซ์ 800 ลักซ์ และ 1200 ลักซ์ วัดอัตราการเจริญเติบโตทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 17 วัน ด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร พบว่าสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BB ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 13 นับจำนวนเซลล์ได้เท่ากับ 21.33×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.202

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study on optimum condition for the cultivation of *Haematococcus* sp.
Name	Miss Benjarat Thammapreechakorn
	Miss Maneerat Vaewprasert
	Mr. Satitpong Boonyanusit
Special Project Advisor	Mrs. Weena Choochote
	Mr. Mongkol Phensaijai
Department	Applied Biology
Academic Year	1997

Abstract

BG-11 , JM and BB media were used for cultivation of *Haematococcus* sp. These media were added with 10 ml/l of soil extract and the cultures were cultivated at the light intensity of 400 , 800 and 1200 lux. Cell growth of all cultures were determined every 24 h by measuring the total cell count and the absorbance at 550 nm for 17 day. The maximal growth of *Haematococcus* sp. was obtained in BB media with the light intensity of 1200 lux after 13 days of cultivation with the maximal cell number of 21.33×10^4 per ml and O.D at 0.020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์วีนา ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ตรวจและแก้ไขโครงงานพิเศษ และผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ยืมอุปกรณ์ รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา คำแนะนำ และชี้แนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ดร.สุริยา สาสนรักกิจ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อสาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง อีกทั้งยังเป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญ และมีประโยชน์ ที่ให้คณะผู้จัดทำได้ศึกษาหาข้อมูลในการทำโครงงานพิเศษนี้ขึ้นมาได้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ที่ได้ให้ความสะดวกในเรื่องเครื่องมือและอุปกรณ์การทดลองต่างๆ เพื่อนนักศึกษา ที่คอยเป็นกำลังใจ กำลังความคิด ตลอดจนให้ความร่วมมือในเรื่องต่างๆ อย่างดียิ่ง

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทกัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
- วัตถุประสงค์	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
- สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Haematococcus* sp.	3
- วงจรชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus* sp.	3
- แอสตาแซนทินในสาหร่าย *Haematococcus* sp.	4
- ประเภทของแอสตาแซนทิน	4
- การสร้างและการสะสมแอสตราแซนทรินในสาหร่าย *Haematococcus* sp.	5
- สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.	6
- ประโยชน์ของแอสตาแซนทิน	8
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย	9
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.	9
3.2 วิธีการทดลอง	9
3.2.1 การเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Haematococcus* sp. บนอาหารวุ้นBG-11	9
3.2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.ในอาหารเหลว	10
3.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ	10
3.2.2.2 การเพาะเลี้ยงและวัดผลการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.	10
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	11
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงจำนวนเซลล์($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. หลังการเพาะเลี้ยง 13 วัน 27

4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. หลังการเพาะเลี้ยง 13 วัน 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนทิน	4
4.1 stock เชื้อของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในหลอดอาหารเอียง	14
4.2 สาหร่าย *Haematococcus* sp.ระยะก่อนสร้างแอสตาแซนทินใน ในหลอดอาหารเอียง	15
4.3 สาหร่าย *Haematococcus* sp.ระยะสร้างแอสตาแซนทินใน ในหลอดอาหารเอียง	16
4.4 สาหร่าย *Haematococcus* sp.ในอาหารเหลว	17
4.5 สาหร่าย *Haematococcus* sp.ในระยะก่อนสร้างแอสตาแซนทิน	18
4.6 สาหร่าย *Haematococcus* sp.ในระยะเริ่มสร้างแอสตาแซนทิน	19
4.7 สาหร่าย *Haematococcus* sp.ในระยะสร้างและสะสมแอสตาแซนทิน	20
4.8 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์	21
4.9 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์	22
4.10 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์	23
4.11 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์	24
4.12 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์	25
4.13 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

มนุษย์ได้รู้จักสาหร่ายมาเป็นเวลานานแล้ว แต่ได้มีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์น้อยมาก ซึ่งส่วนใหญ่จะนำมาใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอยู่มากมาย การเพาะเลี้ยงโดยการให้อาหารจะทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตสูงกว่าการปล่อยให้สัตว์น้ำหากินตามธรรมชาติ อาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำนั้นมีอยู่ 2 ประเภท ได้แก่ อาหารสำเร็จรูป และอาหารที่มีชีวิต

จากรายงานการวิจัยต่าง ๆ พบว่าการใช้สารเคมีผสมในอาหารเพื่อให้เกิดสีในอาหาร หรือการใช้สารเคมีผสมในอาหารสัตว์เพื่อให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ จึงเป็นปัญหาที่นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยทั่วโลกต่างให้ความสนใจในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาวิธีแก้ไข จนกระทั่งได้ศึกษารงควัตถุหรือเม็ดสีในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สาหร่าย เป็นต้น และนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารทดแทนสารเคมีที่เป็นอันตราย

ตัวอย่างรงกวัตถุที่นำมาใช้ประโยชน์ เช่น ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) เป็นรงควัตถุสีน้ำเงินใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางซึ่งสามารถสกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina* sp. มีราคาประมาณ 12,500 บาทต่อกิโลกรัม (500A$) เบต้าแคโรทีน (beta-carotine) เป็นรงควัตถุสีส้มแดงใช้เป็นอาหารเสริมโปรไวตามินเอ สีผสมอาหาร สกัดได้จากสาหร่าย *Dunaliella* sp. มีราคาประมาณ 15,000 บาทต่อกิโลกรัม (600A$) และ แอสตาแซนทิน (astaxanthin) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีส้มแดงเช่นเดียวกับเบต้าแคโรทีน ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารหรือผสมในอาหารสัตว์ เมื่อสัตว์บริโภคเข้าไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์เม็ดสีในเซลล์สัตว์ทำให้เป็นที่ยอมรับแก่ผู้บริโภค เช่น ในปลาแซลมอนจะเป็นสีส้มแดง ในปลาทองจะมีสีจัดขึ้น ในปลาน้ำจืดและกุ้งจะทำให้มีสีสวย ส่วนในการใช้เป็นอาหารสัตว์ปีก เช่น ไก่ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีการผสมแอสตาแซนทินจะทำให้ไข่ไก่ที่ได้มีสีแดงสด นอกจากนี้ยังมีการนำไปเป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับบริโภค เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ บะหมี่ มาการีน และอาหารประเภทอื่นๆ แอสตาแซนทินนี้จะพบมากในเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ซึ่งมีราคาสูงถึงประมาณ 75,000 บาทต่อกิโลกรัม (3,000 A$) (สรวิศ 2537)

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในทางอุตสาหกรรม จึงได้มีการพัฒนาและควบคุมการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจากนักวิทยาศาสตร์หลายหน่วยงาน เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่จะเพิ่มปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายและผลิต แอสตาแซนทิน ให้ได้ปริมาณสูงสุด เพื่อใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการเพาะเลี้ยงระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

2.เพื่อศึกษาหาสภาวะแสงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus sp.* ในระดับห้องปฏิบัติการ

2. ทราบสภาวะแสงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus sp.* ในระดับห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขยายขนาดที่ใหญ่กว่าระดับห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

สัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

Haematococcus มาจากคำว่า haema = blood (ภาษากรีก) + kokkos = berry (ภาษากรีก) (กาญจนภาชน์ , 2527) สาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียว เซลล์เดียว มีหนวด 2 เส้น รูปร่างรีหรือกลม บริเวณระหว่างผนังเซลล์และโปรโตพลาสต์จะประกอบไปด้วยสารที่มีลักษณะเป็นเจล โดยทั่วไปในเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ คลอโรพลาสต์จะถูกเคลือบด้วยฮีมาโตโครม (haematochrome) ซึ่งเป็นสารพวก ketonic carotenoid-euglenorhodone มี eye spot อยู่บริเวณกลางเซลล์ใกล้ contractile vacuoles นอกจากนี้ยังมีเม็ดแป้ง (pyrenoid) จำนวนมากอยู่ภายในคลอโรพลาสต์ ในบางสภาวะ เช่น สภาวะขาดแคลนอาหาร สภาวะที่มีแสงและอุณหภูมิไม่เหมาะสม เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์อะคินีต (akinete cell) ซึ่งจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 3-4 เท่าของเซลล์ปกติ (vegetative cell) โปรโตพลาสต์ของเซลล์ในระยะพักตัวจะมีโครงสร้างที่เคลือบไว้ด้วยรงควัตถุสีแดง (Smith , 1950)

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (กาญจนภาชน์ , 2527) คือ

Phylum	Chlorophyta
Order	Volvocales
Family	Chlamydomonadaceae
Genus	*Haematococcus*

วงจรชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

สาหร่าย *Haematococcus* sp. สามารถสืบพันธุ์ได้ 2 แบบคือ

1. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เซลล์ปกติมีลักษณะกลมหรือรี มีหนวด 2 เส้น เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์ เซลล์จะพัฒนาเป็นอะคินีท มีขนาดใหญ่ขึ้น เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง ภายในมีการสะสมอาหารเพื่อการแบ่งเซลล์ จากนั้นจะเกิดการแบ่งเซลล์ได้ 2 ถึง 4 daughter cell เรียก แมคโครซูโอสปอร์ (macrozoospore) เป็นเซลล์ที่มีหนวด 2 เส้น หรือเซลล์ปกติจะแบ่งเซลล์ได้ 4 , 8 หรือ 16 ซูโอสปอร์ (zoospore) จากนั้นแต่ละซูโอสปอร์จะสร้างถุงขึ้นมาหุ้มตัวเอง หนวดจะหายไป เรียกสปอร์ในระยะนี้ว่า อะพลาโนสปอร์ (aplanospore) จากนั้นอะพลาโนสปอร์จะถูกปล่อยออกมาและพัฒนาไปเป็นเซลล์ปกติต่อไป

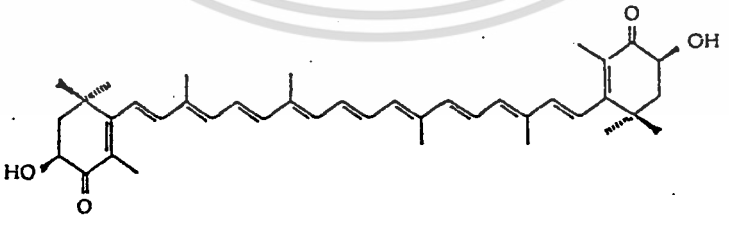
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

ภายในเซลล์อะคินีทจะเกิดการแบ่งตัวได้ 32 ถึง 64 ซูโอสปอร์ มีหนวด 2 เส้น เรียกซูโอสปอร์นี้ว่า ไมโครซูโอสปอร์ (microzoospore) จากนั้นจะเกิดการรวมกันของซูโอสปอร์แบบไอโซแกมมี (isogamy) ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์โดยการรวมเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) ที่มีขนาดและรูปร่างเหมือนกันไว้ภายในเซลล์แม่ ซึ่งภายหลังจากการผสมแล้ว จะมีหนวด 4 เส้น จากนั้นเซลล์จะสลัดหนวดทิ้งและพัฒนาเป็นเซลล์ปกติต่อไป

แอสตาแซนทิน (astaxanthin) ในสาหร่าย *Haematococcus* sp.

แอสตาแซนทิน มีสูตรทางเคมีคือ 3,3'-diketo-4,4'-dihydroxy-β-carotene (Fan และคณะ , 1994) และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 จัดเป็น secondary carotenoid เป็นรงควัตถุสีแดงที่พบมากในสาหร่าย *Haematococcus* sp. ซึ่งเมื่อทำการสกัดแคโรทีนอยด์จากเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ด้วย Fast Atom Tandem Mass Spectrometry (FAB) สามารถแยกแคโรทีนอยด์ได้ 17 ชนิด คือ beta-apo-8'-carotenal , astaxanthin , alpha-carotene , beta-carotene , gamma-carotene , zeta-carotene , canthaxanthin , beta-cryptoxanthin , isozeaxanthin (pelargonate) , neoxanthin , neurosporene , nonaprene , lutein , lycopene , phytoene , phytofluene และ zeaxanthin (Van-breemen และคณะ , 1995) ซึ่งจะพบแอสตาแซนทินปริมาณมากถึง 80 % ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด นอกจากนี้ยังสามารถพบแอสตาแซนทินปริมาณมากในเซลล์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* จัดเป็นพวก red basidiomycetous yeast หรือที่รู้จักกันในชื่อ phaffia yeast (Marcalith , 1992)



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนทิน (Marcalith , 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเภทของแอสตาแซนทิน

สามารถแบ่งประเภทของแอสตาแซนทินได้ 3 isomer โดยอาศัยหลักของการดูดกลืนแสง คือ

1. (3R , 3'R) - Astaxanthin
2. (3R , 3'S) - Astaxanthin
3. (3S , 3'S) - Astaxanthin

โดยมีสัดส่วนดังนี้ 15 % , 43.7 % และ 41.3 % (Van-breemen และคณะ ,1995)

Van-breemen และคณะ (1995) ศึกษาองค์ประกอบแคโรทีนอยด์ในหัวกุ้งชนิดหนึ่ง โดยนำรงควัตถุจากหัวกุ้ง มาวิเคราะห์โดย HPLC พบว่า แคโรทีนอยด์หลักประกอบด้วย astaxanthin . astaxanthin isomer และ astaxanthin diester ซึ่งมีสัดส่วน 36.1 % , 31.5 % และ 17.5 % ตามลำดับ

Yuan และคณะ (1997) ได้รายงานว่า Astaxanthin ester มี 6 ชนิด Astaxanthin ester 4 เป็นตัวหลัก ซึ่งมีประมาณ 44-49 % ของแอสตาแซนทินทั้งหมด แอสตาแซนทินทั้ง 6 ชนิดนี้มีค่าการดูดกลืนแสงเหมือนกัน โดยจะมีความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง mobile phase คือ 481.3 นาโนเมตร

การสร้างและการสะสมแอสตาแซนทินในสาหร่าย *Haematococcus* sp.

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะผลิตคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เอ และ บี primary carotenoids โดยเฉพาะเบต้าแคโรทีน (β-carotene) และ ลูเทอิน (lutein) (Zlotnik และคณะ ,1993) Donkin (1976) ได้พบว่าการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะที่ถูกจำกัดอาหารเช่น ภาวะที่จำกัดไนโตรเจน สาหร่ายจะผลิต secondary carotenoid เช่น แคนตาแซนทิน (cantaxanthin) โดยเฉพาะแอสตาแซนทินที่มีรงควัตถุสีแดง Lee และ Soh (1991) ได้รายงานไว้ว่าจะพบแอสตาแซนทินในปริมาณสูงสุดใน สาหร่าย *Haematococcus lacustris* ที่เลี้ยงในอาหารที่จำกัดไนโตรเจนเมื่อมีอัตราการเจือจางต่ำสุด และมีปริมาณการให้แสงสูง

Lee และ Ding (1994) ศึกษาการสร้างแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus lacustris* พบว่าในช่วงที่เซลล์หยุดการแบ่งตัว เซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกลม ไม่มีหนวด จากนั้นจะมีการเพิ่มขนาดและมีผนังหนาขึ้นจนเป็น akinete cell และจะมีการสะสม secondary carotenoid รวมถึงแอสตาแซนทินด้วย และในขบวนการผลิตสาร metabolite นี้จะต้องใช้พลังงานซึ่งได้จากการสังเคราะห์แสง (Zlonik และคณะ ,1993) ซึ่งการสะสมนี้ไม่มีความสำคัญในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของเซลล์ แต่มีนักวิจัยบางท่านแย้งข้อสรุปนี้ว่าการสะสมแอสตาแซนทินจะช่วยให้มีการเจริญของเซลล์ได้อย่างรวดเร็วในระยะ initial growth phase

Zlonik และคณะ (1993) ศึกษาสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยนำมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 2000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารอยู่ 700 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีการให้แสงอย่างต่อเนื่อง จากผลการทดลองที่ได้ สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากเซลล์ปกติจนไปถึง อะพลาโนสปอร์ไว้ว่า เซลล์ปกติจะมีสีเขียวรูปไข่ มีหนวด 2 เส้น ปริมาตรสารในเซลล์ต่ำ มีอัตราการสังเคราะห์และการแบ่งเซลล์สูง รงควัตถุที่พบจะเป็นคลอโรฟิลล์เอ , บี และ ลูเทอิน หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ เซลล์จะมีขนาดเพิ่มขึ้น หยุดการแบ่งตัว แต่เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้ รงควัตถุที่พบก็ยังเป็นคลอโรฟิลล์เอ , บี และ ลูเทอิน เหมือนเดิม ระยะนี้เซลล์จะเริ่มมีการสะสมแอสตาแซนทิน ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 เซลล์จะมีปริมาตรเพิ่มขึ้น หยุดการแบ่งเซลล์ ไม่เคลื่อนที่ อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงในขณะที่อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น มีการสะสมแอสตาแซนทินมากขึ้น และในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 เซลล์จะเปลี่ยนแปลงเป็นอะพลาโนสปอร์ที่มีสีแดง เซลล์ไม่เคลื่อนที่และไม่แบ่งตัว อัตราการสังเคราะห์แสงลดต่ำลงเหลือเพียง 1 ใน 3 ของอัตราการสังเคราะห์แสงจากเซลล์ปกติ อัตราการหายใจลดลงแต่ก็ยังสูงกว่าเซลล์ปกติ ปริมาณคลอโรฟิลล์ยังคงเดิม แต่จะมีแอสตาแซนทินสูงสุด

Lee และ Soh (1991) ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus lacustris* ในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 6-8 ได้รายงานว่าแอสตาแซนทินจะมีหน้าที่หลักในเซลล์คือทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากความเข้มแสงสูงๆ อัตราการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะไม่เกี่ยวข้องกับอัตราการสะสมแอสตาแซนทิน และการสะสมแอสตาแซนทินจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อเซลล์สิ้นสุดการแบ่งตัวแล้ว ซึ่งการสะสมนี้จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์จากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์ในระยะพักตัว รวมทั้งจะไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์อีกด้วย นอกจากนี้การสะสมแอสตาแซนทินจะถูกกำหนดโดยความเข้มแสงที่ใช้

Fan และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลกระทบของ diphynylamine ต่อการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน ในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* พบว่า 30 mu M diphynylamine สามารถยับยั้งการสังเคราะห์แอสตาแซนทินในขั้นการเปลี่ยนแปลงจากเบต้าแคโรทีนไปเป็น echinenone และ canthaxanthin ซึ่งสารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นตัวกลางในวิถีของการสังเคราะห์แอสตาแซนทินใน *Haematococcus pluvialis*

Chumpolkulwong และคณะ (1997) ได้ศึกษาการสังเคราะห์แอสตาแซนทินจากเบต้าแคโรทีน โดยพบว่าบางส่วนของ membrane-bound enzyme ในสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* มี zeaxanthin เป็นตัวกลางในการสังเคราะห์ ส่วนเอนไซม์ monooxygenase จะยับยั้งการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

แสงและอุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญที่ควบคุมอัตราการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. โดยตรง จากการศึกษาโดย Fan และคณะ (1994) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิในช่วงนี้จะทำให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและทำให้เกิดการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นโดยที่อุณหภูมิมีผลต่อการแบ่งเซลล์และอัตราการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ภายในเซลล์ กล่าวคืออุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้การแบ่งเซลล์และอัตราการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ลดลง แต่ไม่มีผลต่ออัตราการสังเคราะห์โปรตีน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่นการเลี้ยง *Haematococcus* sp. ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีการแบ่งตัวลดลงและอัตราการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์จะลดลงในขณะที่ปริมาณโปรตีนจะสูงกว่าเซลล์ของ *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส ดังนั้นทุกๆ เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น (เส้นผ่าศูนย์กลาง มากกว่า 25 ไมโครเมตร) และเป็นที่น่าสังเกตคือในเซลล์ขนาดใหญ่จะยังคงมีสีเขียวในระหว่างที่อยู่ในช่วงการเจริญและจะไม่เกิดการสะสมแอสตาแซนทิน

ส่วนความเข้มแสงนั้นจะมีผลต่อการสะสมแอสตาแซนทิน คือ เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการสะสมแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น Fanและคณะ(1994)พบว่า *Haematococcus* sp. จะสามารถปรับตัวให้มีการเจริญได้อย่างเต็มที่ในช่วงความเข้มแสง 90-400 ไมโครเมตรควานตาต่อตารางเมตรต่อวินาที (ประมาณ 360-1600 ลักซ์) Lee และ Ding (1994) พบว่าการให้ความเข้มแสง 400 ลักซ์ จะทำให้มีปริมาณแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ปริมาณไนโตรเจนในอาหารก็จะเป็นตัวกำหนดการเจริญของสาหร่ายได้ คือในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง จะทำให้อะคินีทเจริญและแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องได้อะพลาโนสปอร์ และในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน สาหร่ายจะผลิต secondary carotenoid โดยเฉพาะแอสตาแซนทิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของแอสตราแซนทิน

1. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

นำแอสตาแซนทินมาผสมในอาหารสัตว์ เมื่อสัตว์บริโภคเข้าไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดสีของสัตว์ เช่น เพิ่มสีแดงในเนื้อปลาแซลมอน ในกุ้ง ปลาทอง และในปลาน้ำจืดบางชนิด เพิ่มสีแดงในไข่ไก่ทำให้เป็นที่ต้องการของตลาดผู้บริโภคซึ่งการให้สีในอาหารไก่เป็นขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญอย่างหนึ่งในการอุตสาหกรรมสัตว์ปีกแผนใหม่ (Fan และคณะ , 1994)

การให้แอสตาแซนทินแก่ปลาแซลมอนตั้งแต่ระยะแรกในการเพาะเลี้ยง สังเกตพบว่าแอสตาแซนทินมีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างมาก รวมทั้งการมีชีวิตรอด และความเข้มข้นของวิตามินเอในปลา ส่วนในกลุ่มปลาแซลมอลที่ได้รับอาหารที่ไม่มีแอสตาแซนทิน พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการมีชีวิตรอดต่ำ ดังนั้นแอสตราแซนทินจึงมีความจำเป็นต่อปลาแซลมอน โดยเฉพาะการให้อาหารในช่วงแรกที่ทำการเพาะเลี้ยง (Christiansen และคณะ , 1994)

2. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

เพื่อเพิ่มสีแดงให้แก่ผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เบเกอรี่ บะหมี่ มาการีน และอุตสาหกรรมอาหารประเภทอื่น ๆ (Marcalith , 1992)

3. ใช้ในทางการแพทย์

Jyonouchiและคณะ (1995) ศึกษาผลกระทบของแคโรทีนอยด์ต่อการสร้างอิมมูโนกลอบูลิน (immunogloburin , Ig) โดยวิธีการสร้างเม็ดเลือด ตรวจสอบโดยสุ่มตัวอย่างเลือดจากกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นผู้ใหญ่และจากทารก ภายใต้สภาวะที่เพาะเลี้ยงเซลล์มีการเติมแคโรทีนอยด์ลงไป ระดับอิมมูโนกลอบูลินของเซลล์ในหลอดที่เลี้ยงไว้จะถูกแยกเบต้าแคโรทีนและแอสตาแซนทิน ซึ่งเบต้าแคโรทีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีวิตามินเอ ส่วนแอสตาแซนทินเป็นแคโรทีนอยด์ที่ไม่มีวิตามินเอ เบต้าแคโรทีนและแอสตาแซนทินจะกระตุ้นการสร้างอิมมูโนกลอบูลินเอ็ม (IgM) เพื่อตอบสนองต่อ T-dependent polyclonal

จากการศึกษาพบว่าการเลี้ยงเซลล์โดยเติมแคโรทีนอยด์ จะมีการสร้างอิมมูโนกลอบูลินเอ (IgA) เพื่อการตอบสนองต่อสารกระตุ้น T-dependent polyclonal เพิ่มมากขึ้น โดยมีอัตราการสร้างที่สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เติมแคโรทีนอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ใช้เป็นตัวป้องกันการออกซิเดชั่น

แอสตาแซนทินที่สะสมในเซลล์ระยะอะคินีท จะต้านการเกิด oxidative ที่มากเกินไปได้ (Kobayashi และคณะ , 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.

1. จานเพาะเชื้อ
2. หลอดทดลองขนาดกลาง
3. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
5. หม้อสแตนเลส
6. ไม้พายสแตนเลส
7. สำลี
8. ขวดอาหาร
9. เครื่องลามินาร์
10. ตู้อบลมร้อน
11. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
12. ลักซ์มิเตอร์
13. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
14. กล้องจุลทรรศน์และฮีมาไซโตมิเตอร์
15. เครื่องปรับอุณหภูมิ
16. เครื่องเขย่า

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Haematococcus* sp. บนอาหารวุ้น BG-11

นำตัวอย่างสาหร่าย *Haematococcus* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มาทำการเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อสาหร่ายจากหลอดตัวอย่างแล้วนำไปลากด้วยเทคนิค streak plate ลงบนอาหารวุ้น BG-11 ที่มีการเติม soil extract ลงไป 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร ในหลอดอาหารเอียง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20-25^{0}C เป็นเวลา 10-14 วัน สาหร่ายจะเจริญตามรอย streak เป็นโคโลนีสีเขียว และจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีส้มแดง ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่เหมาะต่อการเพิ่มปริมาณสาหร่ายให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลว

3.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BB ที่มีการเติม soil extract ลงไป 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร โดยใช้ลวดถ่ายเชื้อสาหร่ายจากหลอดอาหารเอียงลงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนเชื้อสาหร่าย 1 หลอดอาหารเอียงต่ออาหารเหลว 1 ฟลาสก์ จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการให้อากาศและเพื่อป้องกันการตกตะกอนของเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10-14 วัน เชื้อที่ได้จะมีการเจริญเติบโตเห็นเป็นสีเขียวเข้ม ทำการขยายพันธุ์ต่อเพื่อให้ได้หัวเชื้อที่มีปริมาณมากเพียงพอ โดยใช้ปิเปตต์ที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดเชื้อที่ได้การการขยายครั้งแรก 10 มิลลิลิตร แทนการใช้เชื้อจากหลอดอาหารเอียง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เชื้อสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขั้นนี้ จะเป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะต่างๆ

3.2.2.2 การเพาะเลี้ยงและวัดผลการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 120 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.023 ควบคุมสูตรอาหาร 3 สูตร ได้แก่ อาหารเหลวสูตร BG-11 , สูตร JM และสูตร BB โดยอาหารทุกสูตรมีการเติม soil extract ลงไป 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร และควบคุมระดับความเข้มแสง 3 ระดับ คือที่ 400 ลักซ์ , 800 ลักซ์ และ 1200 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟติดตั้ง แยกเลี้ยงสาหร่ายในแต่ละระดับความเข้มแสง โดยให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. 3 ซ้ำในแต่ละปัจจัย เขย่าฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงด้วย shaker ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย *Haematococcus* sp. จากฟลาสก์เลี้ยงทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 17 วัน โดยเก็บตัวอย่างจากฟลาสก์เลี้ยงมา 3 มิลลิลิตร เพื่อนำมาวัดอัตราการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับเซลล์ และวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. โดยใช้เชื้อสาหร่าย *Haematococcus* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยมาทดลอง ซึ่งทำการควบคุมสูตรอาหารและระดับความเข้มแสง ทำการวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นเวลา 17 วัน พบว่าในทุกสูตรอาหารและระดับความเข้มแสงเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะมีค่าจำนวนเซลล์สูงขึ้นทุกวันจนถึงวันที่ 13 ปริมาณเซลล์ที่นับได้จะมีปริมาณมากที่สุด แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป ปริมาณเซลล์จะค่อยๆ ลดลง จึงใช้ปริมาณเซลล์ในวันที่ 13 เป็นตัวเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย ซึ่งให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB (a1b3) จะมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด นับจำนวนเซลล์ในวันที่ 13 ได้เท่ากับ 21.33×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.10 และ ตารางที่ 1) ปัจจัยที่ให้ค่าจำนวนเซลล์รองลงมาคือ สาหร่าย *Haematococcus* sp ที่เลี้ยงในอาหารสูตร JM (a2b3) และที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (a3b3) ซึ่งนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 13 ได้เท่ากับ 20.67×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 9×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ที่ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ในทุกสูตรอาหารจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB (a1b2) จะมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด นับจำนวนเซลล์ในวันที่ 13 ได้เท่ากับ 8×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.9 และ ตารางที่ 1) ปัจจัยที่ให้ค่าจำนวนเซลล์รองลงมาคือ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (a3b2) และที่เลี้ยงในอาหารสูตร JM (a2b2) ซึ่งนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 13 ได้เท่ากับ 4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ในทุกสูตรอาหารจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ และ 800 ลักซ์ โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (a3b1) จะมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด นับจำนวนเซลล์ในวันที่ 13 ได้เท่ากับ 4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.8 และ ตารางที่ 1) ซึ่งมากกว่าอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร JM (a2b1) และที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB (a1b1) ซึ่งนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 13 ได้ต่ำกว่า 2.33×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สาเหตุที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์นี้ สาหร่าย *Haematococcus* sp. เจริญได้ดีในอาหารสูตร BG-11 อาจเนื่องมาจากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีระดับความเข้มแสงต่ำจะเจริญได้ดีใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสูตร BG-11 มากกว่าอาหารสูตร JM และ BB แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีระดับความเข้มแสงสูง จะเจริญได้ดีในอาหารสูตร BB และ JM มากกว่าอาหารสูตร BG-11

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบแฟคทอเรียล ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05% (ภาคผนวก) ได้ว่า สูตรอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระดับความเข้มแสงแต่ละระดับให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และปัจจัยร่วมระหว่างสูตรอาหารและระดับความเข้มแสง ก็ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ซึ่งเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้ว่า การเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารแต่ละสูตร และในระดับความเข้มแสงแต่ละระดับ จะให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. แตกต่างกันไป โดยสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในทุกสูตรอาหาร จะเจริญได้ดีในสภาวะที่ระดับความเข้มแสงสูง และจะเจริญเติบโตได้น้อยที่ระดับความเข้มแสงต่ำ และจะเจริญเติบโตได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BB ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์

การวิเคราะห์ผลด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวกลื่น 550 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงในวันแรกเท่ากับ 0.023 พบว่าทุกปัจจัย จะมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นทุกวันคาบคู่ไปกับการเพิ่มปริมาณเซลล์ จนถึงวันที่ 13 ซึ่งที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด มีค่าเท่ากับ 0.202 (รูปที่ 4.13 และตารางที่ 2) ปัจจัยที่ให้ค่าดูดกลืนแสงรองลงมาคือ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร JM และที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.165 และ 0.095 ตามลำดับ

ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์ และ 800 ลักซ์ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าต่ำกว่าที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ในทุกปัจจัย โดยที่ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.046 รองลงมาคือสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 และที่เลี้ยงในอาหารสูตร JM ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.045 และ 0.042 ตามลำดับ (รูปที่ 4.12 และ ตารางที่ 2)ส่วนที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.037 รองลงมาคือสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร JM และที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.027 และ 0.020 ตามลำดับ (รูปที่ 4.11 และ ตารางที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายหลังจากวันที่ 13 ค่าจากการนับเซลล์จะลดลง แต่ค่าการดูดกลืนแสงยังคงเพิ่มต่อไปเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ในวันที่ 13 แล้ว สาหร่าย *Haematococcus* sp. จะสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ขึ้นเป็นรงควัตถุสีแดง ได้แก่ แอสตาแซนทิน ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างสาหร่าย *Haematococcus* sp. มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่าสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะสร้างและเก็บแอสตาแซนทินไว้ภายในเซลล์ทำให้เซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นสีแดง (รูปที่ 4.7) บางเซลล์เมื่อมีอายุมาก เซลล์ก็จะแตกออกแล้วจึงปล่อยแอสตาแซนทินออกมาสู่อาหาร สีแดงของแอสตาแซนทินที่เซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. สร้างขึ้นจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวกลื่น 550 นาโนเมตรมีค่าสูงขึ้นทั้งที่จำนวนเซลล์ลดลง (Jeffery และคณะ , 1989)

จากการทดลองจะพบว่าค่าที่ได้จากการวัดการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตร JM จะต่ำกว่าในอาหารสูตร BB ไม่มากนัก และจากการสังเกตหลังจากวันที่ 17 ของการทดลองพบว่าสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตร JM จะเปลี่ยนเป็นสีแดงได้ก่อนสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตร BB อาจเนื่องมาจากในอาหารสูตร JM มีปริมาณในโตรเจนน้อยกว่าอาหารสูตร BB จากการศึกษาของ Donkin (1976) พบว่า การเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารที่ขาดแคลนแหล่งในโตรเจนจะทำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. มีการสร้างแอสตาแซนทินดังนั้น ถ้าต้องการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพื่อสกัดแอสตาแซนทินการใช้อาหารสูตร JM จะดีกว่าอาหารสูตร BB

สรวิศ เผ่าทองศุข (2537) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* เพื่อผลิตเบต้าแคโรทีน โดยใช้สาหร่าย *Dunaliella salina* ที่แยกสายพันธุ์ได้จากนาเกลือจังหวัดสมุทรสงคราม มาเพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงสาหร่ายกลางแจ้งขนาด 9.1 ตารางเมตร ความลึก 0.2 เมตร มีใบพัดหมุนเวียนน้ำในบ่อให้มีสภาวะแวดล้อมสม่ำเสมอกัน ได้จำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 22 เท่ากับ 1.5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ได้จากการทดลองนี้จะพบว่า สาหร่าย *Haematococcus* sp. จะโตเร็วกว่าและจะให้ปริมาณเซลล์มากกว่า คือ จะได้จำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 13 เท่ากับ 21.33×10^4 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทดลองนี้ เลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนน้อยและยังมีการเขย่าให้อากาศอย่างเพียงพอ ถ้านำสาหร่าย *Haematococcus* sp. ไปเลี้ยงในบ่อเปิดแบบการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* สาหร่าย *Haematococcus* sp. อาจจะเจริญเติบโตได้ช้ากว่าและนับจำนวนเซลล์ได้น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป

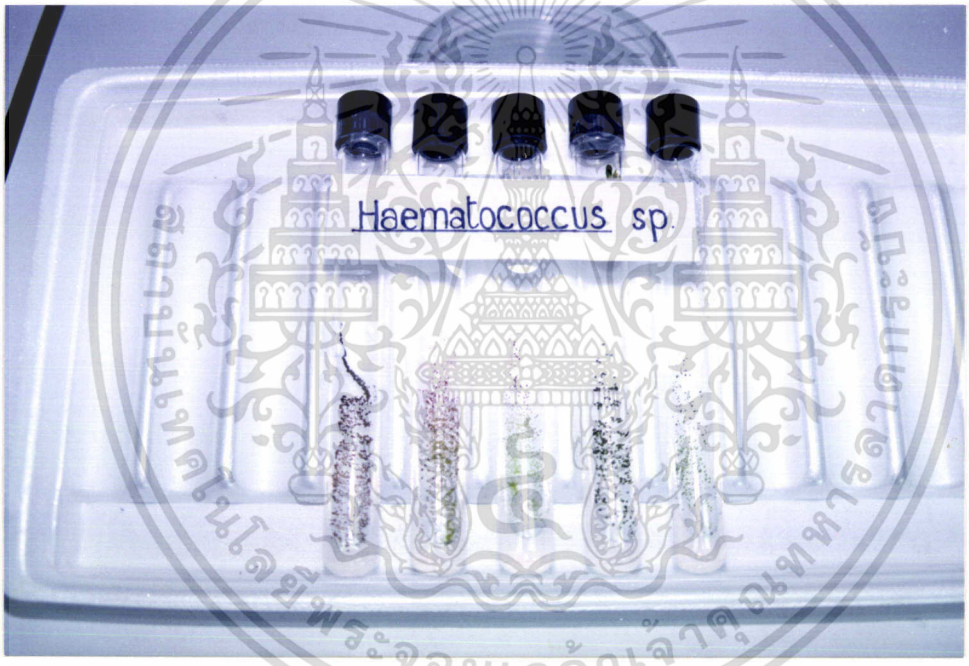
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* ต้องใช้น้ำเค็มจากทะเลในการเพาะเลี้ยง ซึ่งถ้าต้องการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการนำเอาน้ำเค็มมาใช้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. สามารถเพาะเลี้ยงได้ในน้ำจืด จึงมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า อีกทั้งสาหร่าย *Haematococcus* sp. ให้รงควัตถุที่เป็นแอสตาแซนทิน ซึ่งมีราคาสูงกว่าเบต้าแคโรทีนที่เป็นรงควัตถุที่สกัดได้จากสาหร่าย *Dunaliella salina*

เมื่อพิจารณาที่สูตรอาหารจะพบว่า อาหารสูตร BB จะเจริญได้ดีที่ความเข้มแสง 800 ลักซ์ และ 1200 ลักซ์ อาหารสูตร JM จะเจริญได้เป็นอันดับรองจากอาหารสูตร BB ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ และเป็นอันดับรองจากอาหารสูตร BG-11 ที่ ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์ ส่วนอาหารสูตร BG-11 จะเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์

จากการวิเคราะห์ผลทั้ง 2 วิธี จะให้ผลเหมือนกันคือ สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ จะให้ผลการเจริญเติบโตสูงสุด

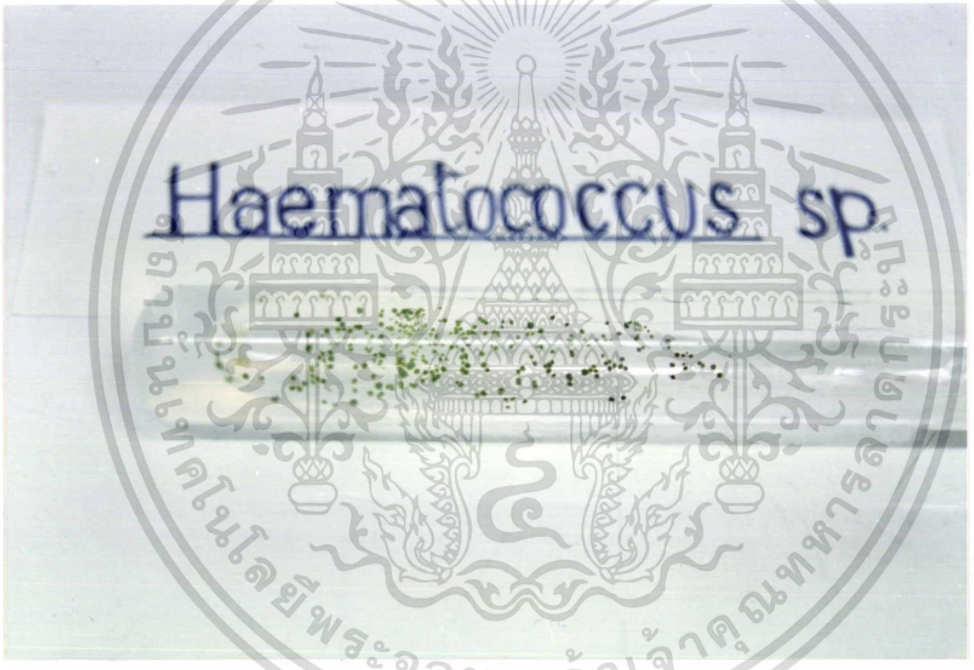
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 stock เชื้อสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในหลอดอาหารเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

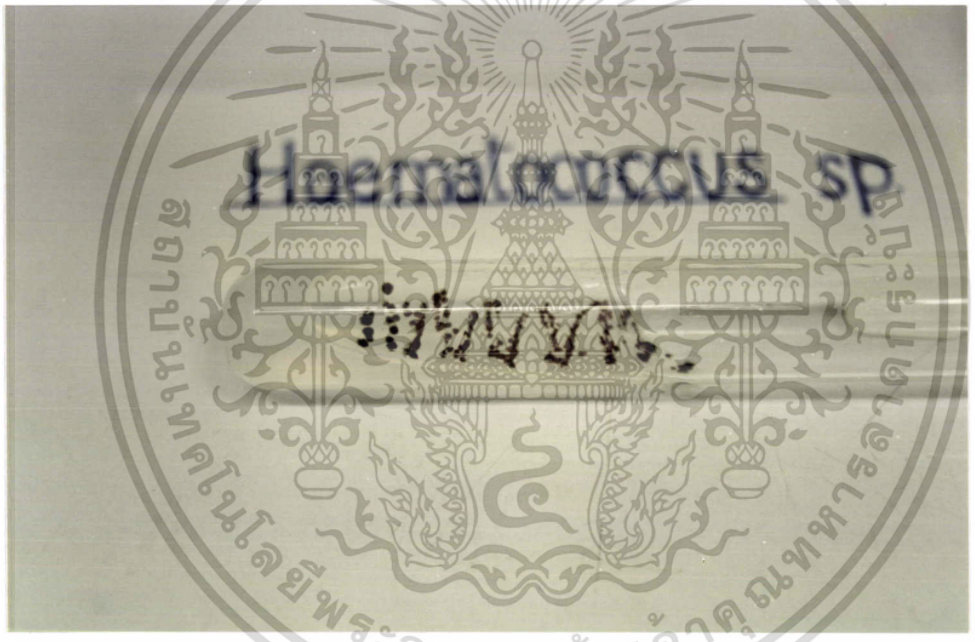
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 4.2 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ระยะก่อน
สร้างแอสตาแซนทินในหลอดอาหารเอียง

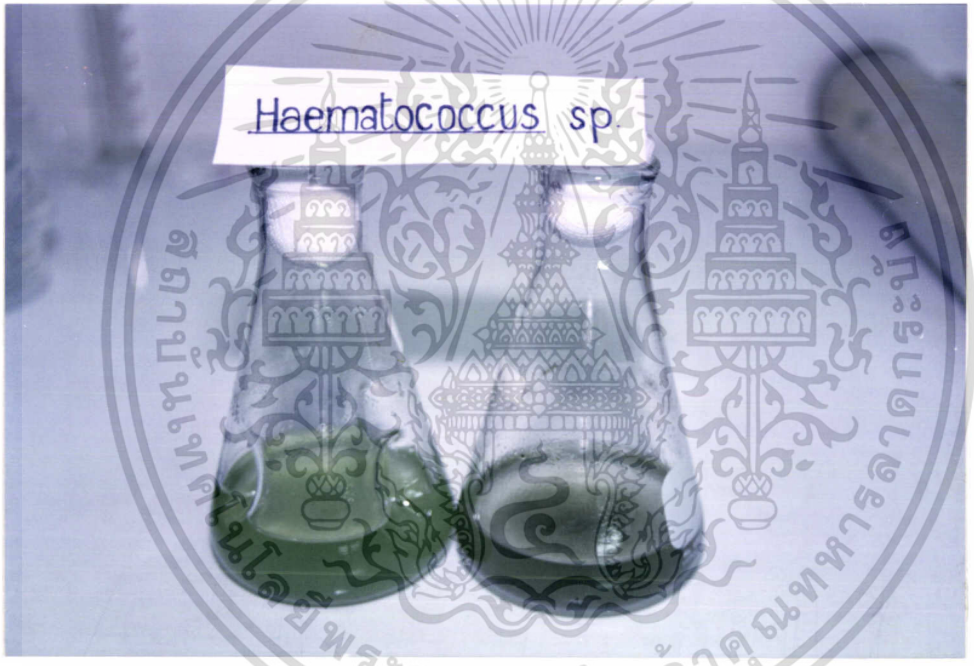
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30612



รูปที่ 4.3 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ระยะ
สร้างแอสตาแซนทินในหลอดอาหารเอียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.5 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ระยะก่อนสร้างแอสตาแซนทิน (400 x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

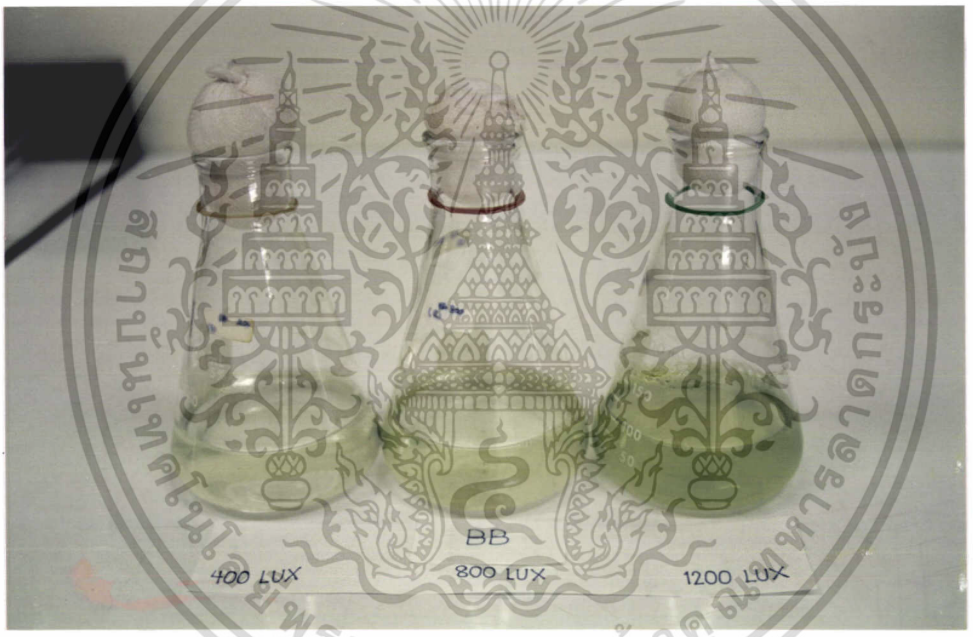
รูปที่ 4.6 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ระยะเริ่มสร้างแอสตาแซนทิน (400 x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ระยะสร้างและสะสมแอสตาแซนทิน

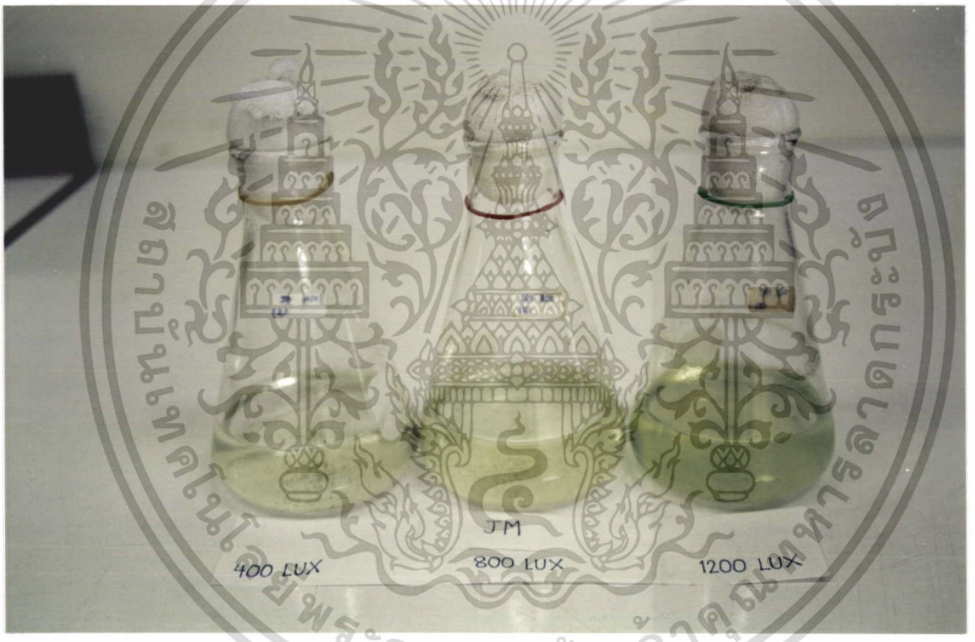
(1000 x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

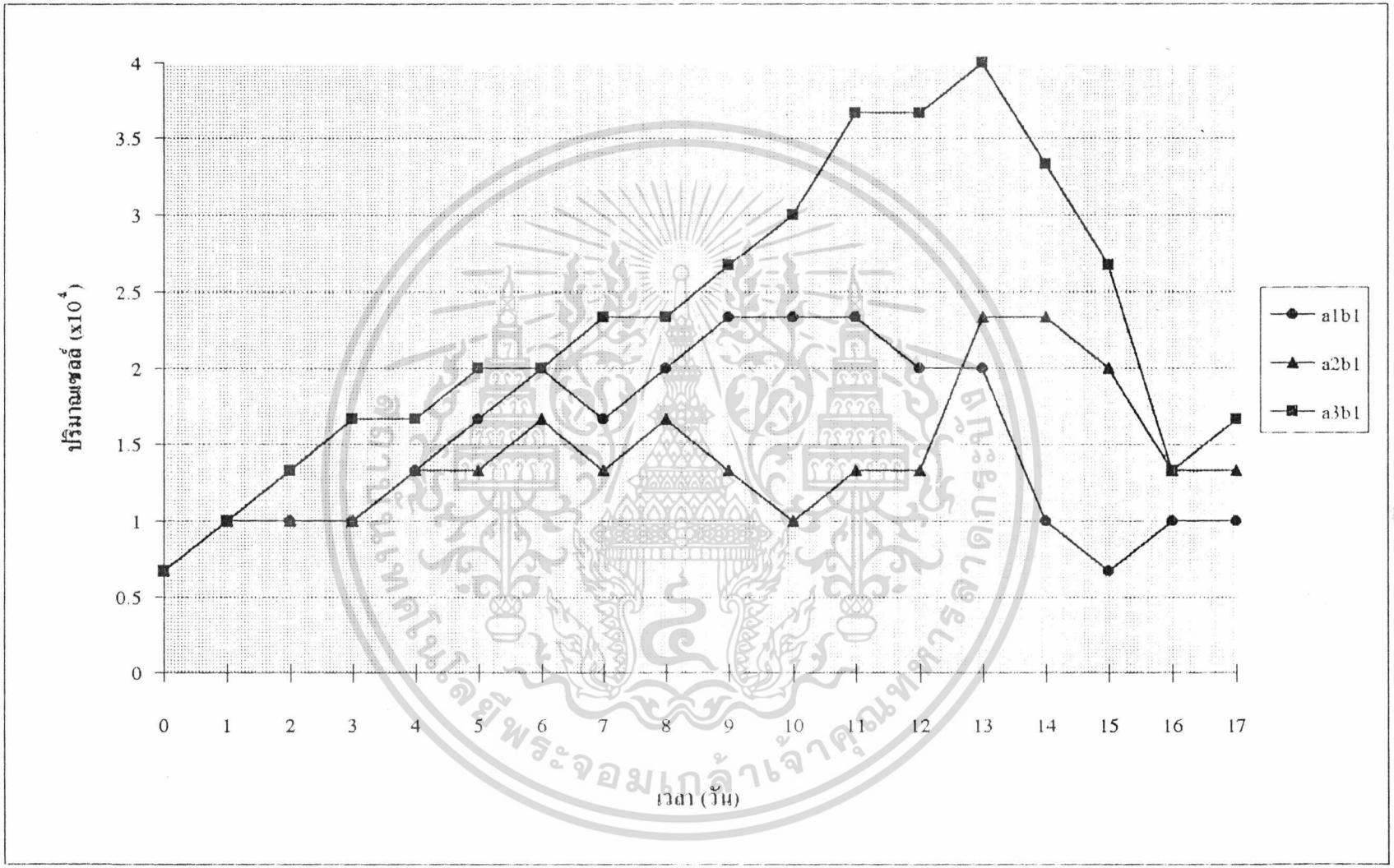


รูปที่ 4.9 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร JM

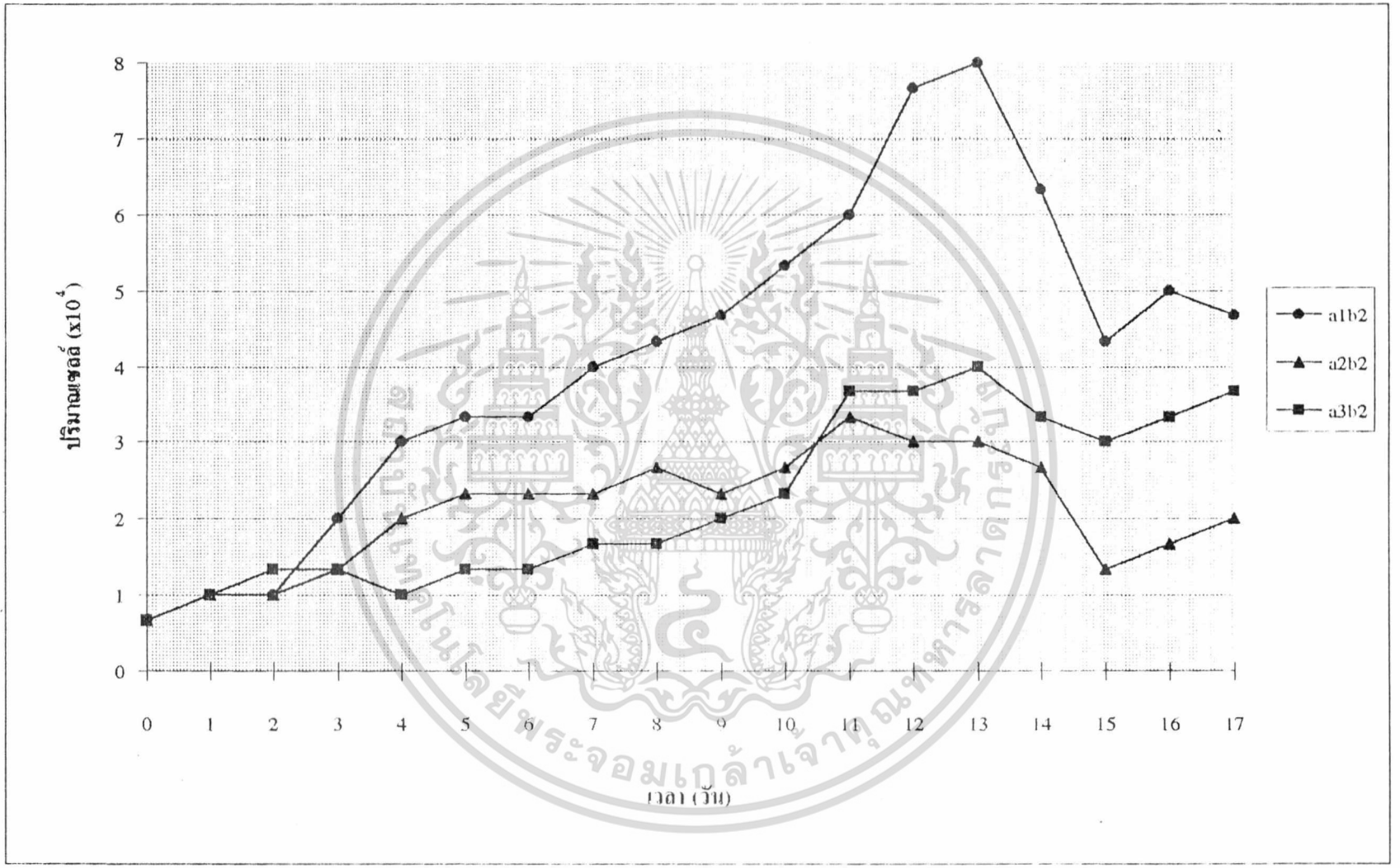
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.10 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11

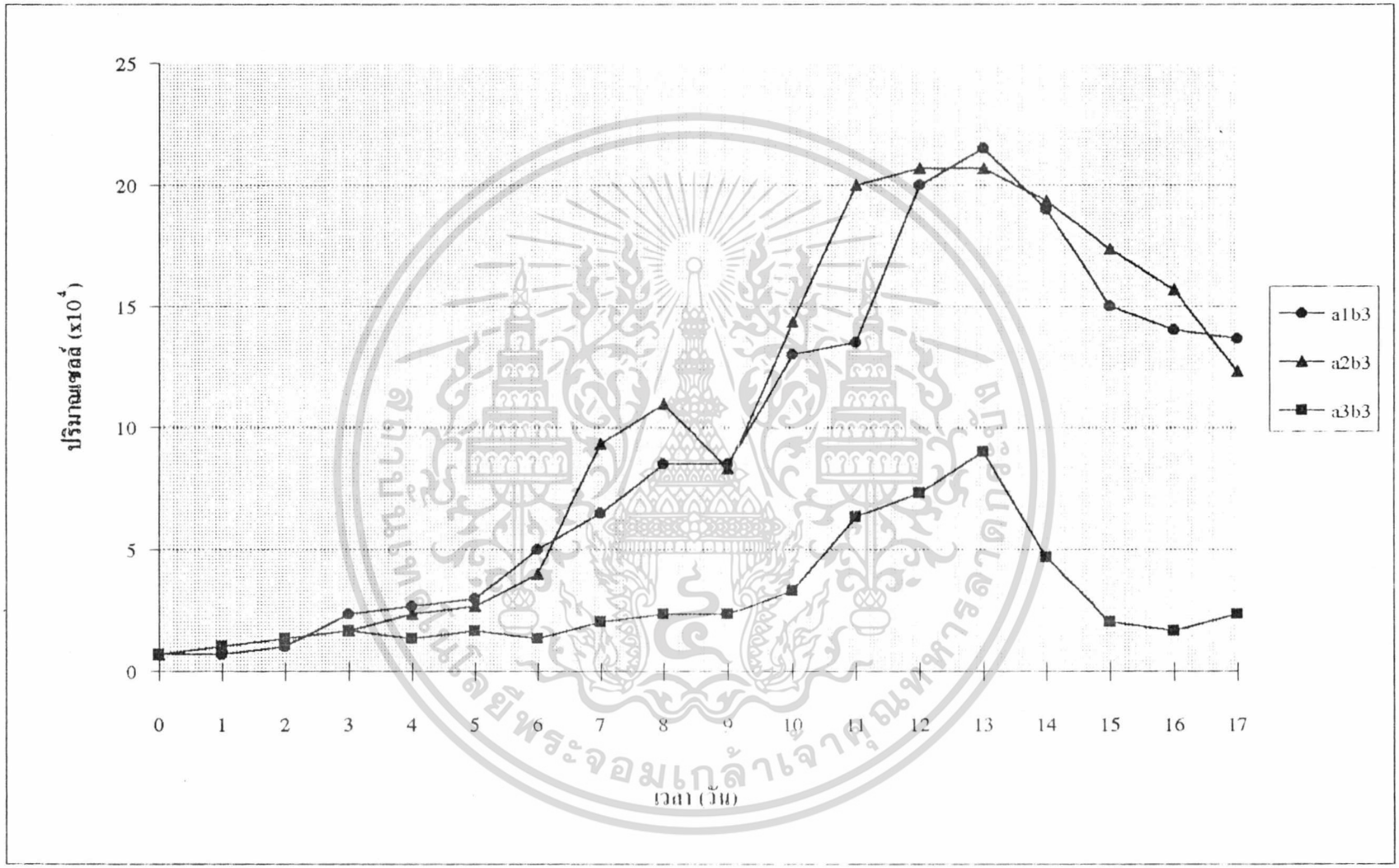
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



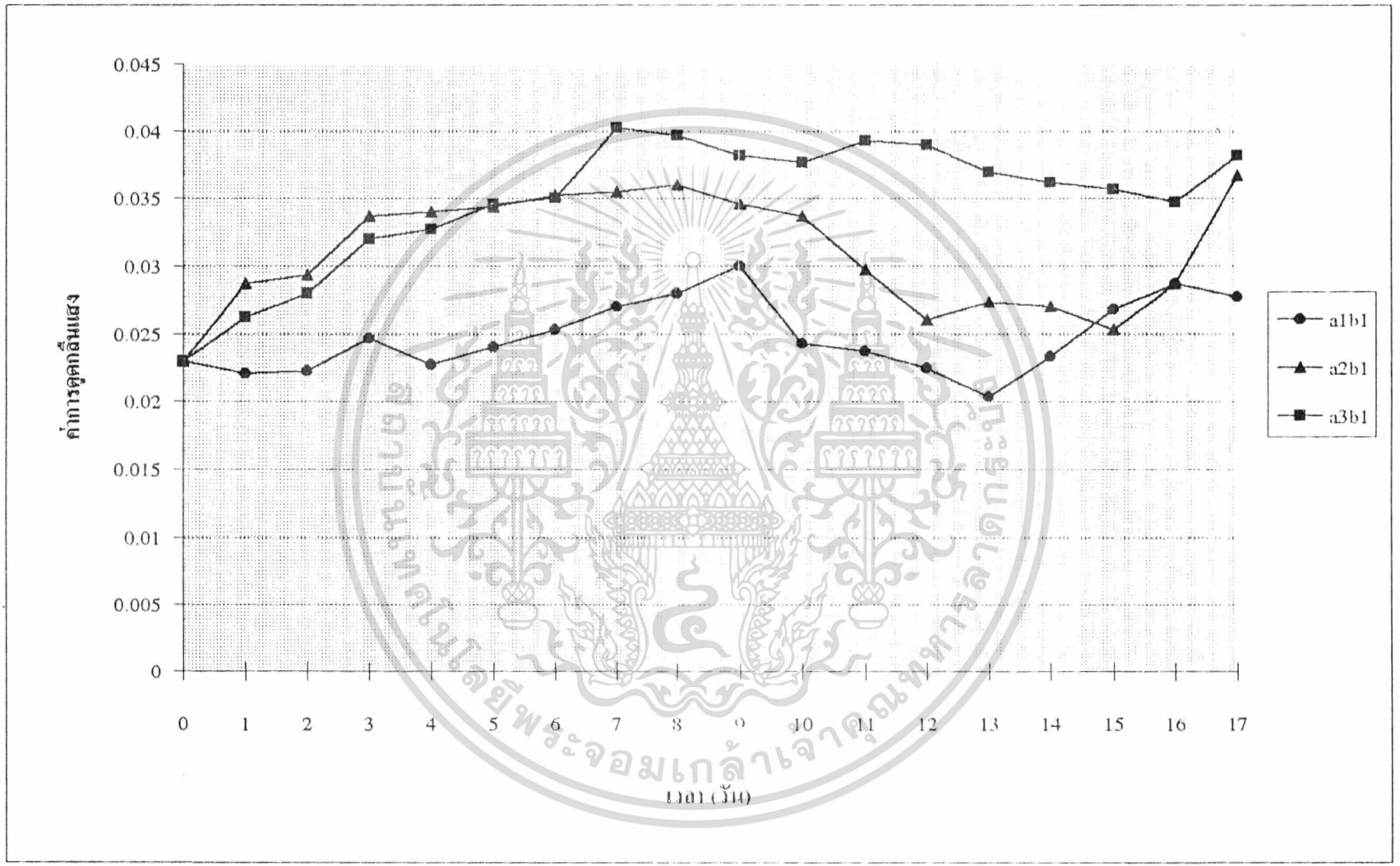
รูปที่ 4.11 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (x10^4 เซลล์/มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์



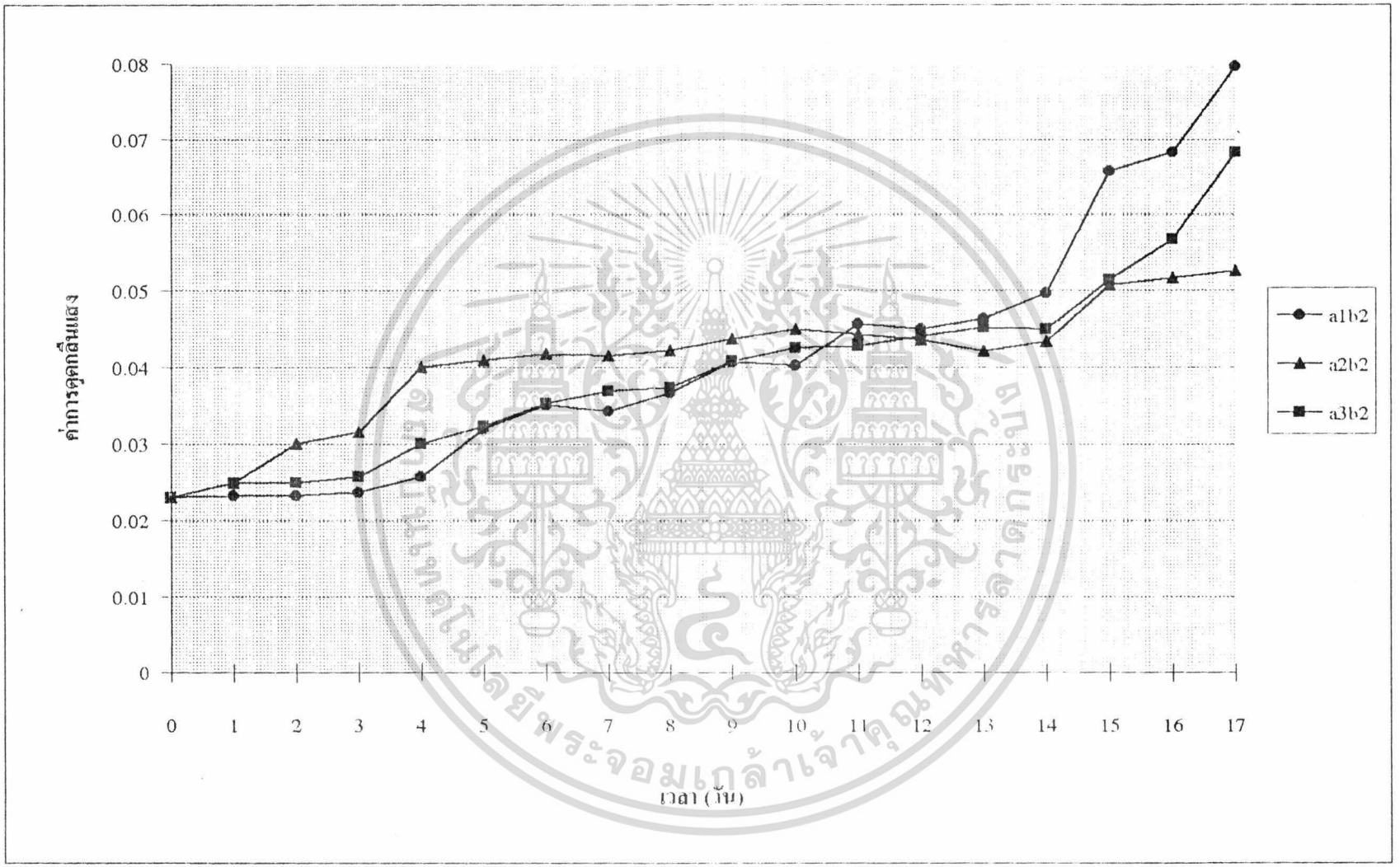
รูปที่ 4.12 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (x10^4 เซลล์/มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์



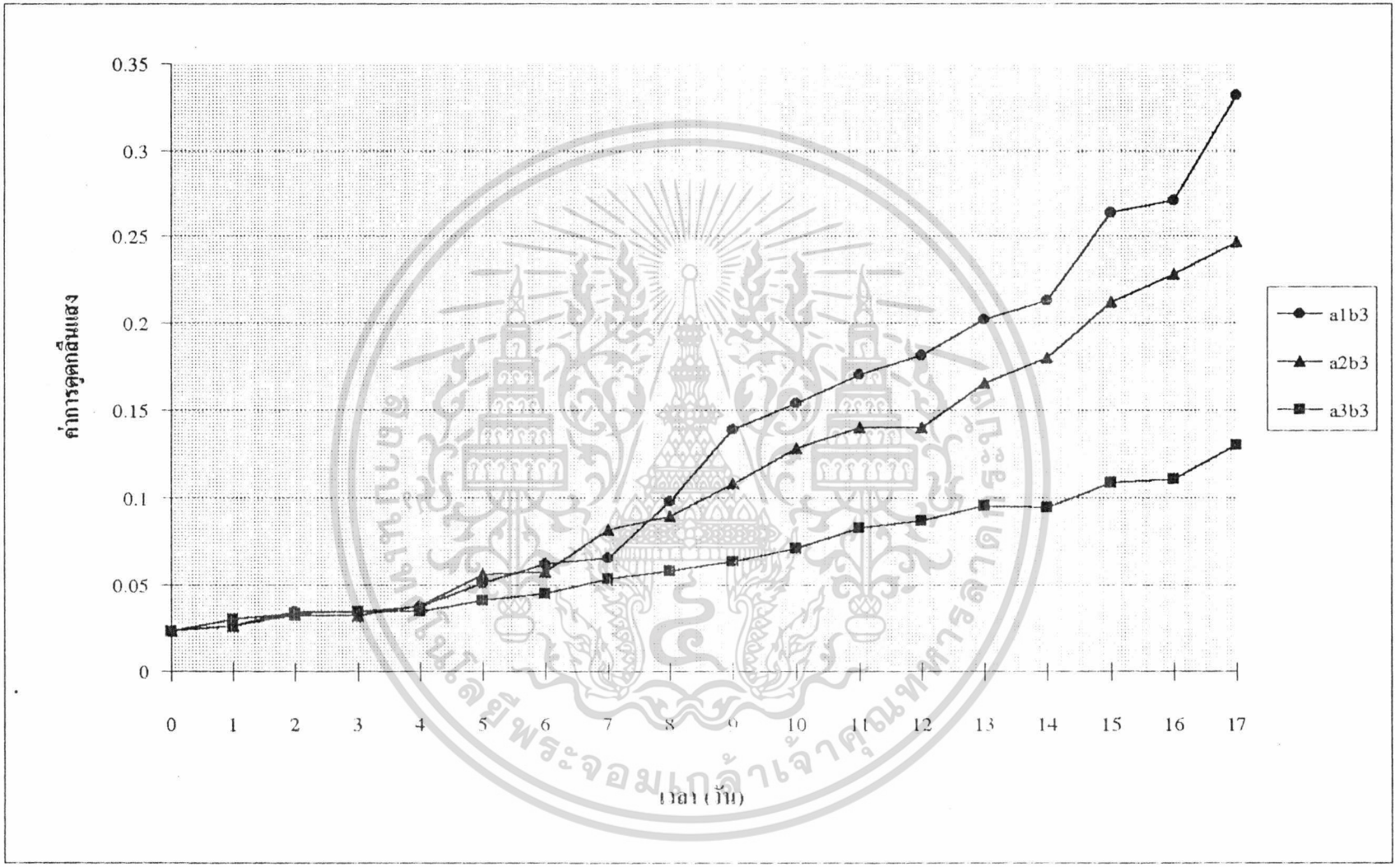
รูปที่ 4.13 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (x10^4 เซลล์/มิลลิลิตร) ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. หลังการเพาะเลี้ยง 13 วัน

สูตรอาหาร	ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์ (b1)	ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์ (b2)	ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ (b3)
BB (a1)	2	8	21.3
JM (a2)	2.33	3	20.67
BG-11 (a3)	4	2	9

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. หลังการเพาะเลี้ยง 13 วัน

สูตรอาหาร	ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์ (b1)	ระดับความเข้มแสง 800 ลักซ์ (b2)	ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ (b3)
BB (a1)	0.020	0.046	0.202
JM (a2)	0.027	0.042	0.165
BG-11 (a3)	0.037	0.045	0.095

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตร BB , JM และ BG-11 ที่ระดับความเข้มแสงต่างกัน จะให้ผลการเจริญที่แตกต่างกันโดยที่ระดับความเข้มแสงสูงๆ สาหร่าย *Haematococcus* sp. จะมีอัตราการเจริญสูงกว่าที่ระดับความเข้มแสงต่ำ สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่า สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BB ที่ระดับความเข้มแสง 1200 ลักซ์ จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยในวันที่ 13 ของการทดลองสามารถนับจำนวนเซลล์ได้ 21.33×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.202 และอาหารที่วัดผลการเจริญได้รองมาคือ อาหารสูตร JM ซึ่งสามารถวัดผลการเจริญได้ 20.67×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.165

ผลการทดลองที่ได้นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้แฟคทอเรียลเพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลองที่ได้ ได้ข้อสรุปว่าสูตรอาหารแต่ละสูตรที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะให้ผลการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระดับความเข้มแสงแต่ละระดับจะให้ผลการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และปัจจัยร่วมระหว่างสูตรอาหารและระดับความเข้มแสงก็ให้ผลการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองที่ได้ปรากฏว่าสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีความเข้มแสงสูง และมีแนวโน้มว่าสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อให้ระดับความเข้มแสงสูงขึ้น ดังนั้นหากต้องเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.ให้ได้ปริมาณมากๆ จึงควรให้ระดับความเข้มแสงที่มากกว่าในการทดลองนี้

2. ในการทดลองนี้ใช้ฟลาสก์แบบธรรมดาในการเพาะเลี้ยง การให้อากาศจึงยังไม่ดีพอ ดังนั้นน่าจะใช้ shaker flask ซึ่งจะทำให้สามารถให้อากาศได้ดีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์ **สาหร่าย** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2527.

สรวิศ เผ่าทองศุข "เรื่องเทคโนโลยีชีวภาพสาหร่าย" **จดหมายข่าวทรัพยากรทางน้ำ** 2(2),2537 : หน้า 6.

Becker , E.W. **Microalgae : Biotechnology and Microbiology** . Cambridge University Cress , 1994 .

Chapman ,V.J. **The Algae** . New York , pp 22-25 , 1962 .

Christiansen , R. , Lie . O. and Torrissen . O.J. **Effect of Astaxanthin and VitamiaA on Growth and Survival during First Feeding of Atlantic Salmon** . *Aquaculture and Fisheries Management* , 25(9) (1994) : 903-914.

Chumpolkulwong , N. , Kakizono , T. , Ishii , H. and Nishio , N. **Enzymatic Conversion of β-Carotein Astraxanthin by Cell Extract of a Green-Algae *Haematococcus pluvialis*** . *Biotech. Letter* , 19(5) (1997) : 443-446 .

Donkin . P. **Ketocarotenoid Biosynthesis by *Haematococcus lacutris*** *Phytochemistry.* , 15(1976) : 711-715.

Fan , L. , Vonshak , A. and Boussiba , S. **Effect of Temperature and Irradiance on Growth of *Haematococcus pluvialis*** (Chlorophyceae) . *J.Phycol.* , 30(1994) : 829-883.

Fogg , G.E. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology** , pp 56-131 , 1975.

Fritsch F.E. **The structure and reproduction of the Algae** . Cambridge University ; pp 82- 85 , 1961.

Hager,C. andW.Braune. **Funtional Aspect of Secondary Carotecoids in *Haematococcus sp.*** **(Volvocales)** . *J.Phycol.* ,30 (1994) : 241-248.

Jeffery , G.H. , Basset , J. , Mendham , J. and Denney , R.C. **Textbook of Quantitative Chemical Analysis** . 5th ed. , pp 646 , 660 , Bath Press , England , 1989.

Jyonouchi , H. Sun , S. and Gross , M. **Effect of Carotenoid on Vitro Immun-globulin Production by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells** . *Nutrint and cancer* , 23(2) (1995) : 171-183.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kobayashi , M. , Kakizono , T. , Nishio , N. , Nagai , S. , Karimura , Y. and Tsugi , Y. **Antioxidant Role of Astraxanthin in the Green Algae *Haematococcus pluvialis*** . *Apply Microbiology and Biotech* , 48(3) (1997) :351-358.

Lee , Y.K. and Ding , S.Y. Cell Cycle and Accumulation of Astaxnthin in ***Haematococcus lacustris*** (Chlorophyta). *J. Phycol* , 30(1994) : 445-449.

Lee . Y.K. and Soh , C.W. **Accumulation of Astaxanthin in *Haematococcus lacustris*** (Chlorophyta) . *J. Phycol* , 27(1991) : 575-577.

Marcalith , P.Z. **Pigment Microbiology** . pp 58 . Haifa . 1992.

Moya , M.J., Sanchez-Guardamino , M.L., Vilavella , A. And Barbera , E. **Growth of Haematococcus : A Contribution to Kinetic Modelling**. *J. Chem . Tech . Biotechnol* , 68(1997) : 303-309.

Smith , G.M. **The Fresh Water Algae of The United States.** pp 40-111 . Mcgraw-Hill book company , 1950.

Van-breemen . R.B. , Schmitz . H.H. and Schwartz . H.J. **Fast Atom Bombardent Tandem Mass Spectrometry of Carotenoid**. *J. of agriculture of food chemistry* , 43(2) (1995) : 384-389.

Yuan . JP. , Gong , XD. and Chem . F. **Separation and Analysis of Carotenoid and Chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by High Performance Liquid Chromatoghaphy Photodiode Array Detection**. *J. of agriculture of food chemistry* , 45(5) (1997) : 1952-1956.

Zlotnik , I. , Sukenik , A. and Dubnisky , Z. **Physiological and Photosynthetic Changes During the Formation of Red Aplanospores in the Chlorophyta *Haematococcus pulvialis***. *J. Phycol* , 29(1993) : 463-469.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.

1. BB Medium (Bold's Basal Medium)

			per 200 ml
Stocks	(1)	$NaNO_3$	5.0 g
	(2)	$MgSO_4.7H_2O$	1.5 g
	(3)	NaCl	0.5 g
	(4)	K_2HPO_4	1.5 g
	(5)	KH_2PO_4	3.5 g
	(6)	$CaCl_2.2H_2O$	0.5 g
	(7)	Trece elements solution:	per litre
		$ZnSO_4.7H_2O$	8.82 g
		$MnCl_2.4H_2O$	1.44 g
		MoO_3	0.71 g
		$CuSO_4.5H_2O$	1.57 g
		$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.49 g
		May need autoclaving to dissolve	
			per 100 ml
	(8)	H_3BO_3	1.14 g
	(9)	EDTA - KOH solution:	
		$EDTANa_2$	5.0 g
		KOH	3.1 g
			per litre
	(10)	$FeSO_4.7H_2O$	4.98 g
		conc H_2SO_4	1.0 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Medium

Stock solutions 1-6	10.0 ml each
Stock solutions 7-10	1.0 ml each

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรโดยการเติมน้ำที่ไม่มีประจุ (deionized water) สำหรับอาหารวุ้น เติมวุ้นในปริมาณ 15 กรัม/ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

2. BG11 (Blue-Green Medium)

Stocks		per litre
(1)	$NaNO_3$	15.0 g
		per 500 ml
(2)	K_2HPO_4	2.00 g
(3)	NaCl $MgSO_4.7H_2O$	3.75 g
(4)	$CaCl_2.2H_2O$	1.80 g
(5)	Citric acid	0.30 g
(6)	Ammonium ferric citrate green	0.30 g
(7)	$EDTANa_2$	0.05 g
(8)	Na_2CO_3	1.00 g
(9)	Trece metal solution:	per litre
	H_3BO_3	2.86 g
	$MnCl_2.4H_2O$	1.81 g
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.22 g
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39 g
	$CuSO_4.5H_2O$	0.08 g
	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.05 g

Medium	Stock solutions 1	100.0 ml
	Stock solutions 2-8	10.0 ml each
	Stock solutions 9	1.0 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรโดยการเติมน้ำที่ไม่มีประจุ (deionized water) ปรับ pH ให้เป็น 7.1 ด้วย NaOH หรือ HCl สำหรับอาหารวุ้น เติมวุ้นในปริมาณ 15 กรัม/ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

3. JM (Jaworski's Medium)

Stocks		per 200 ml
(1)	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	4.20 g
(2)	KH_2PO_4	2.48 g
(3)	$MgSO_4.7H_2O$	10.0 g
(4)	$NaHCO_3$	3.18 g
(5)	EDTAFeNa	0.45 g
	$EDTANa_2$	0.45 g
(6)	HBO_3	0.496 g
	$MnCl_2.4H_2O$	0.278 g
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.20 g
(7)	Cyanocobalamine	0.008 g
	Thiamine HCl	0.008 g
	Biotin	0.008 g
(8)	$NaNO_3$	16.0 g
(9)	$Na_2HPO_4.12H_2O$	7.2 g

Medium	perlitre
Stock solutions 1-9	1.0 ml each

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรโดยการเติมน้ำที่ไม่มีประจุ (deionized water) สำหรับอาหารวุ้น เติมวุ้นในปริมาณ 15 กรัม/ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีการเตรียม soil extract

1. คัดเลือกแหล่งของดินที่เหมาะสมที่จะนำมาทำ soil extract โดยต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของดินดังต่อไปนี้

- ลักษณะของดินต้องเป็นดินร่วนที่ปราศจากสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์อาศัยอยู่
- เป็นดินที่ไม่เคยได้รับการปนเปื้อนจากสารพิษ , ปุ๋ย หรือ มูลสัตว์ จากการเกษตรกรรม

2. ขุดดินจากแหล่งที่คัดเลือกโดยขุดหน้าดินทิ้งไปก่อนประมาณ 15-30 เซนติเมตร แล้วขุดนำดินที่ลึกลงไปมาใช้

3. นำดินที่ขุดได้มาแยกเอาเศษใบไม้และเศษรากไม้ออก รวมถึงแยกเอาแมลงหรือสัตว์ขนาดเล็กที่อาจปนมากับดินออกด้วย

4. นำดินที่ได้มาประมาณ 3 กิโลกรัมใส่ลงในหม้อสแตนเลสขนาดใหญ่ เติมน้ำกลั่นให้สูงกว่าผิวของดิน 10 เซนติเมตรแล้วใส่ลูกแก้วประมาณ 20-30 เม็ด

5. นำมาต้มเพื่อสกัดสารในดิน โดยต้มน้ำดินเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีการคนอย่างสม่ำเสมอ หลังจากต้มแล้วทิ้งไว้ให้เย็นข้ามคืน แล้วนำมาต้มใหม่ ทำเช่นนี้เป็นเวลา 3 วัน โดยสังเกตระดับน้ำเสมอๆ ถ้าระดับน้ำลดลงทำการเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาณสูงกว่าผิวดิน 10 เซนติเมตรอยู่ตลอดเวลา

6. หลังจากการต้มครั้งสุดท้ายแล้วจะทิ้งไว้ให้น้ำดินตกตะกอนเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ แล้วแยกส่วนน้ำออกจากส่วนตะกอนดิน โดยน้ำที่แยกออกมาได้จะมีสีเหลืองเข้ม

7. นำน้ำที่แยกออกมาได้มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส น้ำที่ปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนดินออกหมดแล้วจะมีสีเหลืองใส ซึ่งสามารถนำไปใช้งานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวัดอัตราการเจริญ

1. การนับจำนวนเซลล์

ใช้กล้องจุลทรรศน์และฮีมาไซโตมิเตอร์ (Improved Neubauer) นับจำนวนเซลล์จำนวนเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. = จำนานเซลล์ที่นับได้ใน 25 ช่องใหญ่รวมกันx10^4 (เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

2. การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Becker , 1994)

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแฟคทอเรียลเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ว่า ปัจจัยต่างๆ มีผลต่ออัตราการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 1 Analysis of varience ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่สภาวะต่างๆ

SOV	df	SS	MS	F	F_{table}
A	2	1053.629	526.820	75.26*	3.55
B	2	104.963	52.480	7.50*	3.55
AxB	4	232.593	580150	8.31*	2.93
Error	18	126.000	7.000		
Total	26	1517.187	58.350		

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05%

A = สูตรอาหาร

B = ระดับความเข้มแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้