สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินจาก *Haematococcus* sp.

# FACTORS AFFECTING GROWTH AND ASTAXANTHIN PRODUCTION OF *Haematococcus* sp.

T 058532

บุปผา จงพัฒน์

BUPPHA JONGPUT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2547

วพ.
ว639ป
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58532
วัน,เดือน,ปี 25 มี.ค. 2549

ISBN 974-15-1059-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b 11242610
i

# FACTORS AFFECTING GROWTH AND ASTAXANTHIN PRODUCTION OF *Haematococcus* sp.

**BUPPHA JONGPUT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT**

**OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF**

**MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2004**

**ISBN 974-15-1059-4**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**COPYRIGHT 2004**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | **ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินจาก *Haematococcus* sp.** |
| **นักศึกษา** | **นางสาวบุปผา จงพัฒน์** |
| **รหัสประจำตัว** | **42065202** |
| **ปริญญา** | **วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** |
| **สาขาวิชา** | **เทคโนโลยีชีวภาพ** |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** | **รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง** |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม** | **ผศ. วีนา ชูโชติ** |

## บทคัดย่อ


จากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อใช้อาหารโบลด์ ที่เพาะเลี้ยงในหลอดเติมอากาศ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ คืออาหารโบลด์ที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0 และ 0.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พีเอชเริ่มต้น 7.0 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ใช้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับไม่ใช้แสง 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 วัน สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 5.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (แคโรทีนอยด์ 2.03 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.36 กรัมต่อลิตร) ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน คือ การเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต (pH 1.5) ที่ระดับ 450 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับการใช้แสงอย่างต่อเนื่อง ที่ระดับ 3000 ลักซ์ โดยสาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้ 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (แอสตาแซนทิน 0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.75 กรัมต่อลิตร) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม ที่มีอัตราการให้อากาศและอัตราการกวน 0.8 วีวีเอ็ม และ 100 รอบต่อนาที พบว่าผลิตจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 8 ที่ระดับ $12.67 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสาหร่ายเริ่มมีการผลิตแอสตาแซนทินในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์แบบ 2 ขั้นตอนในสภาวะเดียวกัน พบว่าเมื่อเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ ลงถังหมักในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง พร้อมกับใช้แสงต่อเนื่อง ที่ระดับ 3000 ลักซ์ สาหร่ายสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ 1.50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (แอสตาแซนทิน 1.70 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.13 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Factors Affecting Growth and Astaxanthin Production of *Haematococcus* sp. |
| **Student** | Miss Buppha Jongput |
| **Student ID** | 42065202 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Programe** | Biotechnology |
| **Thesis Advisor** | Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong |
| **Thesis Co-Advisor** | Asst. Prof. Weena Choochote |


## Abstract

Factors affecting growth and carotenoid production of *Haematococcus* sp. Were studied using Bold's basal medium. It was found that the Bold's basal medium contained 0.15 g/l dipotassium hydrogen phosphate without sodium chloride and initial pH 7.0 at 25 °C under 12-h light/dark illumination at 3000 lux were the optimum conditions for growth and carotenoid production. After day 10 of cultivation, 5.63 mg catotenoid/g cell dry weight (2.03 mg/l of carotenoid, 0.36 g/l of cell dry weight) were produced. To induce astaxanthin production, 450 µM ferrous sulphate (pH 1.5) was added in the medium under continuous illumination at 3000 lux. After day 10 of induced cultivation, 0.19 mg astaxanthin/g cell dry weight (0.14 mg/l of astaxanthin, 0.75 g/l of cell dry weight) were produced. The alga *Haematococcus* sp. was cultivated in 2-l fermentor at the optimized conditions with aeration and agitation rates of 0.8 vvm and 100 rpm, respectively. The highest cell density and astaxanthin were produced on day 8 and day 24, respectively. Two-stage batch culture of *Haematococcus* sp. in 2-l fermentor at the same condition was also investigated. After day 10 of cultivation 450 µM ferrous sulphate (pH 1.5) was added in the medium under continuous illumination at 3000 lux. The production of astaxanthin was 1.50 mg astaxanthin/g cell dry weight (1.70 mg/l of astaxanthin, 1.13 g/l of cell dry weight) on the day 28 of cultivation.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี ด้วยคำแนะนำ และคำปรึกษาในทุกด้าน จากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ. วีนา ชูโชติ ที่ให้คำแนะนำ ปรึกษา และให้ความอนุเคราะห์หัวเชื้อ อุปกรณ์เพาะเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งช่วยให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างราบรื่น

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และคุณป้าที่ให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเพื่อนร่วมงานทุกท่านในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง ที่คอยให้กำลังใจ และความช่วยเหลือกับผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณประสิทธิ์ แผ้วบาง คุณพยอม เกียรติกำจร คุณวิทยา เขียวเขิน คุณเอกภพ ภาเรือง คุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ และคุณอนิทัต ทองจันทร์ ที่ช่วยให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ และสารเคมีในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

บุปผา จงพัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ ..... IV

สารบัญตาราง..... VIII

สารบัญรูป..... IX

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา ..... 2

1.3 สมมติฐานของการศึกษา..... 2

1.4 ทฤษฎีหรือแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย..... 3

1.5 ขอบเขตการวิจัย..... 3

1.6 ขั้นตอนการศึกษา..... 3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 4

2.1 แอสตาแซนทิน..... 4

2.1.1 โครงสร้างของแอสตาแซนทิน..... 4

2.1.2 ไอโซเมอร์ของแอสตาแซนทิน..... 5

2.1.3 แอสตาแซนทินเอสเทอร์..... 6

2.1.4 ประโยชน์ของแอสตาแซนทิน..... 7

2.2 สาหร่าย *Haematococcus* sp. ..... 8

2.2.1 การจัดจำแนก ..... 8

2.2.2 รูปร่างและลักษณะ ..... 8

2.2.3 วงชีวิตของสาหร่าย ..... 9

2.2.4 รงควัตถุที่พบในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ..... 10

2.2.5 การสังเคราะห์แอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*..... 11



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....16
2.3.1 วิธีการเพาะเลี้ยง.....16
2.3.2 สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....17
2.3.3 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย.....17
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย.....17

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ .....21
3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และสาหร่าย.....21
3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....23
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง .....24
3.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....24
3.3.2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....24
3.3.3 การศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่เติมและไม่เติมอากาศ.....26
3.3.4 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน .....28
3.3.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร .....28
3.3.6 การวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....31
3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทิน ในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมด .....31
3.3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินในสารละลายแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC.....32
3.3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ .....33

4.1 ผลของการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....33

4.2 ผลของการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....41

4.2.1 ผลของโซเดียมอะซิเตต .....41

4.2.2 ผลของโซเดียมไนเตรท .....43

4.2.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ .....45

4.2.4 ผลของเฟอรัสซัลเฟต .....47

4.2.5 ผลของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต .....47

4.2.6 ผลของความเข้มแสง .....48

4.3 ผลของการศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และและสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่เติมและไม่เติมอากาศ.....52

4.4 ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน .....58

4.4.1 ปัจจัยทางด้านแสง.....58

4.4.2 ปัจจัยทางด้านแสงร่วมกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟต.....61

4.5 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร .....65

4.5.1 ผลของการศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....65

4.5.2 ผลของการศึกษาหาระยะเวลาการเจริญ (culture age) ที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ผลิตแอสตาแซนทิน .....70

4.5.3 ผลของการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน.....73



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....81

5.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....81

5.2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....81

5.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่เติมและไม่เติมอากาศ .....82

5.4 ปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน .....82

5.5 การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร.....83

บรรณานุกรม.....84

ภาคผนวก ก. .....89

ภาคผนวก ข. .....90

ภาคผนวก ค. .....91

ประวัติผู้เขียน.....102



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

2.1 ผลของการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *H. pluvialis* .....11

3.1 แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโบลด์..... .....23

4.1 ผลของการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์.....35

4.2 ผลของการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง.....38

4.3 ผลของการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบขั้นตอนเดียว .....67

4.4 ผลของการเจริญ และการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน.....75



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | โครงสร้างของหน่วยไอโซปรีน | 4 |
| 2.2 | แสดงโครงสร้างของแอสตาแซนทิน | 4 |
| 2.3 | แสดงคอนฟิกูเรชั่นไอโซเมอร์ (configruration isomers) ของแอสตาแซนทิน | 5 |
| 2.4 | แสดงซิส-ทรานซ์ไอโซเมอร์ (*cis-trans* isomers) ของแอสตาแซนทิน | 6 |
| 2.5 | แสดงโครงสร้างของแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์ | 7 |
| 2.6 | แสดงลักษณะของเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. | 8 |
| 2.7 | แสดงรูปแบบวงชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* | 10 |
| 2.8 | แสดงวิถีสังเคราะห์แอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์ของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* | 12 |
| 2.9 | แสดงการสังเคราะห์ isopentenyl pyrophosphate (IPP) โดยใช้ DOXP pathway | 13 |
| 2.10 | แสดงการสังเคราะห์ไฟโตอีนโดยปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation) | 14 |
| 2.11 | แสดงการสังเคราะห์ไลโคปีนโดยปฏิกิริยา desaturation หรือ dehydrogenation | 14 |
| 2.12 | แสดงการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนจากปฏิกิริยาการเกิดวงหรือปฏิกิริยาไซไคลเซชั่นของไลโคปีน | 15 |
| 2.13 | แสดงการสังเคราะห์แอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์จากเบต้าแคโรทีน | 15 |
| 2.14 | แสดงการสังเคราะห์แอสตาแซนทินจากเบต้าแคโรทีนทางด้านลักษณะโครงสร้างของโมเลกุล | 16 |
| 3.1 | ลักษณะของหลอดเลี้ยงสาหร่ายที่ให้อากาศด้านล่างของหลอด ขนาด 300 มิลลิลิตร | 27 |
| 3.2 | ลักษณะของขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีการเติมอากาศ ขนาด 1 ลิตร | 27 |
| 3.3 | ลักษณะของถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. | 29 |
| 4.1 | แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ | 34 |
| 4.2 | แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง | 37 |
| 4.3 | ลักษณะของเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ใช้ในการทดลอง | 39 |
| 4.4 | การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่เติมโซเดียมอะซิเตตระดับต่างกัน | 42 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


รูปที่ หน้า

4.5 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่เติมโซเดียมอะซิเตตระดับต่างกันเป็นเวลา 10 วัน .....42

4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน .....44

4.7 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน .....44

4.8 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน .....46

4.9 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ต่างกันเป็นเวลา 10 วัน .....46

4.10 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตต่างกัน .....49

4.11 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นเฟอรัสซัลเฟต ต่างกันเป็นเวลา 10 วัน .....49

4.12 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ ที่มีความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่างกัน .....50

4.13 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน .....50

4.14 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ภายใต้ความเข้มแสงต่างกัน.... .....51

4.15 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมที่ความเข้มแสงต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน .....51



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


รูปที่ หน้า

4.16 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสมในสภาวะที่ไม่เติมอากาศ .....53

4.17 ผลของการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ด้วยอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง สูตรโบลด์ และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ในสภาวะไม่เติมอากาศ เป็นเวลา 40 วัน ..... 54

4.18 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสมในสภาวะเติมอากาศ .....56

4.19 ผลของการใช้ปัจจัยด้านแสงต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....59

4.20 ผลของการใช้ปัจจัยด้านแสงต่อการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....59

4.21 ผลของการใช้ปัจจัยด้านแสงร่วมกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....62

4.22 ผลของการใช้ปัจจัยด้านแสงร่วมกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟตต่อการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. .....62

4.23 สารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อถูกกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทินด้วยการให้แสงแบบต่อเนื่อง และการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ร่วมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 10 วัน .....64

4.24 แสดงการเจริญ การผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และร้อยละของออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 24 วัน .....66

4.25 สารสกัดแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....69

4.26 ผลของการหาระยะเวลาการเจริญ (culture age) ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เหมาะสมสำหรับใช้ปัจจัยกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทิน.....71

4.27 ลักษณะของเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างแอสตาแซนทิน.....72



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


รูปที่ หน้า

4.28 แสดงการเจริญ การผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และค่าร้อยละการละลายได้ของออกซิเจนในอาหารที่ใช้เลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบ 2 ขั้นตอน .....74

4.29 ผลของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักแบบสองขั้นตอน ..... 79

4.30 สารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน .....80

4.31 ลักษณะเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างกัน .....80

ก1 กราฟมาตรฐานของสารละลายแอสตาแซนทิน จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....89

ก2 กราฟมาตรฐานของสารละลายแอสตาแซนทิน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ .....89



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอสตาแซนทิน (astaxanthin) หรือ 3,3' - dihydroxy-β,β'- carotene 4,4'-dione เป็นสารพวกคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) ที่ถูกออกซิไดซ์มาจากเบต้าแคโรทีน (β-carotene) เป็นสารต้นตอ (precursor) ของวิตามินเอ และมีประสิทธิภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ดีกว่าเบต้าแคโรทีนและวิตามินอี (Johnson และ An, 1991) เป็นรงควัตถุที่ให้สีส้มแดงกับกล้ามเนื้อ ผิวหนังและไข่ของสัตว์น้ำ เช่น ปลาแซลมอน (salmon) ปลาเทราท์ (trout) ปลากระพง กุ้งมังกร (lobster) และไข่ของสัตว์ปีก เป็นต้น โดยรูปแบบ (form) และระดับของแอสตาแซนทินจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของปลา เช่น ในปลาแซลมอนจะพบแอสตาแซนทินในรูปของแอสตาแซนทินเอสเทอร์ (esterified astaxanthin) ซึ่งมีไขมันประกอบมากที่สุดที่บริเวณผิวหนังและไข่ และจะพบแอสตาแซนทินในรูปอิสระ (free astaxanthin) คือไม่มีไขมันเป็นองค์ประกอบที่บริเวณกล้ามเนื้อ ซีรัม และอวัยวะภายใน ส่วนในกุ้งจะพบในรูปของแอสตาแซนทินเอสเทอร์มากที่สุดที่บริเวณผิวหนัง (Aquasearch, 2000) ทำให้กล้ามเนื้อและผิวหนังของสัตว์น้ำมีสีแดงน่ารับประทานและสามารถขายได้ในราคาสูง แต่เนื่องจากสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์สารพวกแคโรทีนอยด์ได้จึงจำเป็นต้องได้รับสารเหล่านี้จากอาหาร แต่มีปัญหาคือสัตว์บางชนิดไม่สามารถเปลี่ยนแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆไปเป็นแอสตาแซนทินได้ เช่น กุ้งและปลาแซลมอน ดังนั้นการเติมสารสีหรือรงควัตถุที่เป็นแอสตาแซนทินลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโดยตรงจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มสีของกล้ามเนื้อและผิวหนังได้ดีกว่า

แหล่งของแอสตาแซนทินส่วนใหญ่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี (synthetic astaxanthin) ซึ่งมีข้อเสียคือเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์จะดูดซึมได้ไม่ดีเท่ากับแคโรทีนอยด์จากธรรมชาติ และเนื่องจากเป็นสารสังเคราะห์จึงอาจเป็นผลเสียต่อผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำเหล่านี้ได้ แอสตาแซนทินยังสกัดได้จากเปลือกกุ้งและเปลือกปูบด หรือการไฮโดรไลซ์ส่วนที่เหลือทิ้งจากกุ้งและปู (Gildberg และ Stenberg, 2001) ซึ่งมีข้อเสียคือมีระดับของเถ้า ไคติน และความชื้นสูง นอกจากนั้นแอสตาแซนทินยังผลิตโดยจุลินทรีย์ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium lacticola* และ *Brevibacterium* sp. ฟังไจ *Peniophera* sp. แต่จะให้ผลผลิตได้ในระดับต่ำ (Johnson และ An, 1991) เชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ผลิตได้ 3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Johnson และ Schroeder,1996) สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ผลิตได้ 5.8-6.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Yin-Nin Ma และ Chen, 2001) และ *Haematococcus* sp. ผลิตได้ 50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง(Johnson และ An, 1991) ดังนั้นสาหร่าย *Haematococcus* sp. จึงเป็นที่น่าสนใจในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารสีแอสตาแซนทิน

ปัจจุบันได้มีการใช้สาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นแหล่งให้สารสีแอสตาแซนทินโดยเติมลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปลาเทราท์ (trout) ปลาแซลมอน (salmon) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ปลากระพง (*Chrysophy major*) ปลากระพงแดง (*Lutjanus* sp.) ปลานิลสีแดง (*Tilapia nilotica* Linn.) และปลาสวยงามหลายชนิด เช่น ปลาทอง (*Carasius auratuss*) ปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) และในกลุ่มปลาหมอสี เป็นต้น นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกนิยมผสมในอาหารเพื่อเร่งสีในไข่แดง ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง และพบว่าแอสตาแซนทินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งและสามารถป้องกันรังสีอัลตร้าไวโอเลตได้ (Lorenz และ Cysewski, 2000; ชลธิชา โชติสิทธิพงษ์, 2541)

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวสูตรโบลด์และสูตรโบลด์ดัดแปลงที่เติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตร

2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

3. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน

4. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

5. เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย (culture age) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เหมาะสมสำหรับการใช้สภาวะกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทิน

6. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน

## 1.3 สมมติฐานของการศึกษา

สาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นสาหร่ายที่สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ในปริมาณสูง เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิประมาณ 15-28 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญจะผลิตแอสตาแซนทินในปริมาณต่ำ แต่ในขณะที่สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญสาหร่ายจะสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่สูง ประกอบกับเป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตค่อนข้างช้า ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายในระบบปิดจะทำให้ผลิตสาหร่ายได้จำนวนมาก จากนั้นทำการกระตุ้นสาหร่ายให้ผลิตแอสตาแซนทินในระยะการเจริญที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

แอสตาแซนทินเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตขึ้นโดยสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในระยะที่การเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่มีสารอาหารจำกัด และมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในระยะการเจริญ (exponential phase) จนถึงช่วงต้นของระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) จากนั้นจึงนำสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวไปทดลองใช้ปัจจัยชักนำที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายในระยะการเจริญแบบคงที่ ให้ผลิตแอสตาแซนทิน

## 1.5 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ใช้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

## 1.6 ขั้นตอนการศึกษา

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวสูตรโบลด์และสูตรโบลด์ดัดแปลงที่เติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในหลอดเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันธาตุอาหารและระดับความเข้มแสง จากนั้นจึงหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน โดยใช้วิธีให้แสงแบบต่อเนื่องที่ระดับความเข้มแสงต่างกัน และที่ระดับความเข้มแสงต่างกันร่วมกับเฟอรัสซัลเฟต จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และระยะการเจริญที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน โดยใช้สภาวะกระตุ้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้น พร้อมกับศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์แบบ 2 ขั้นตอน (การเพาะเลี้ยงที่มีการใช้ปัจจัยกระตุ้นให้สาหร่ายที่เจริญในระยะการเจริญแบบคงที่ผลิตแอสตาแซนทิน)

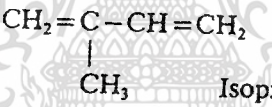
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

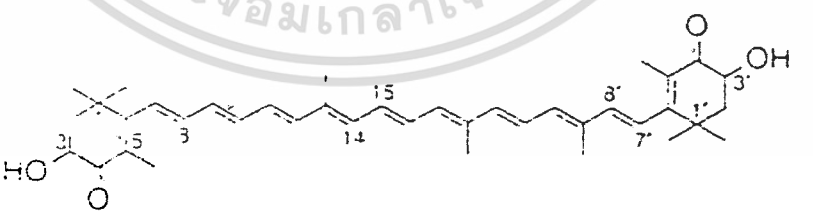
## 2.1 แอสตาแซนทิน

### 2.1.1 โครงสร้างของแอสตาแซนทิน

แอสตาแซนทิน (astaxanthin) หรือ (3,3'- dihydroxy-β,β'-carotene 4,4'-dione) เป็นสารพวกคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) ที่ถูกออกซิไดซ์มาจากเบต้าแคโรทีน (β-carotene) มีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากไอโซพีนอยด์ 8 โมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว โดยแต่ละไอโซพีนอยด์เกิดจากคาร์บอนเชื่อมต่อกัน 5 อะตอมด้วยพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่ (รูปที่ 2.1) และบริเวณส่วนปลายทั้งสองข้างของอะตอมของคาร์บอนจะมาเกาะกันเป็นวงเรียกว่า ionone ring และมีการเพิ่มออกซิเจนไฮดรอกซิล (OH) เข้าไปทั้งสองข้างที่บริเวณ C-3 และ C-3' ของ ionone ring (chiral centers) ดังรูปที่ 2.2




**รูปที่ 2.1** โครงสร้างของหน่วยไอโซปรีน (Isoprene unit) (Gross, 1991)



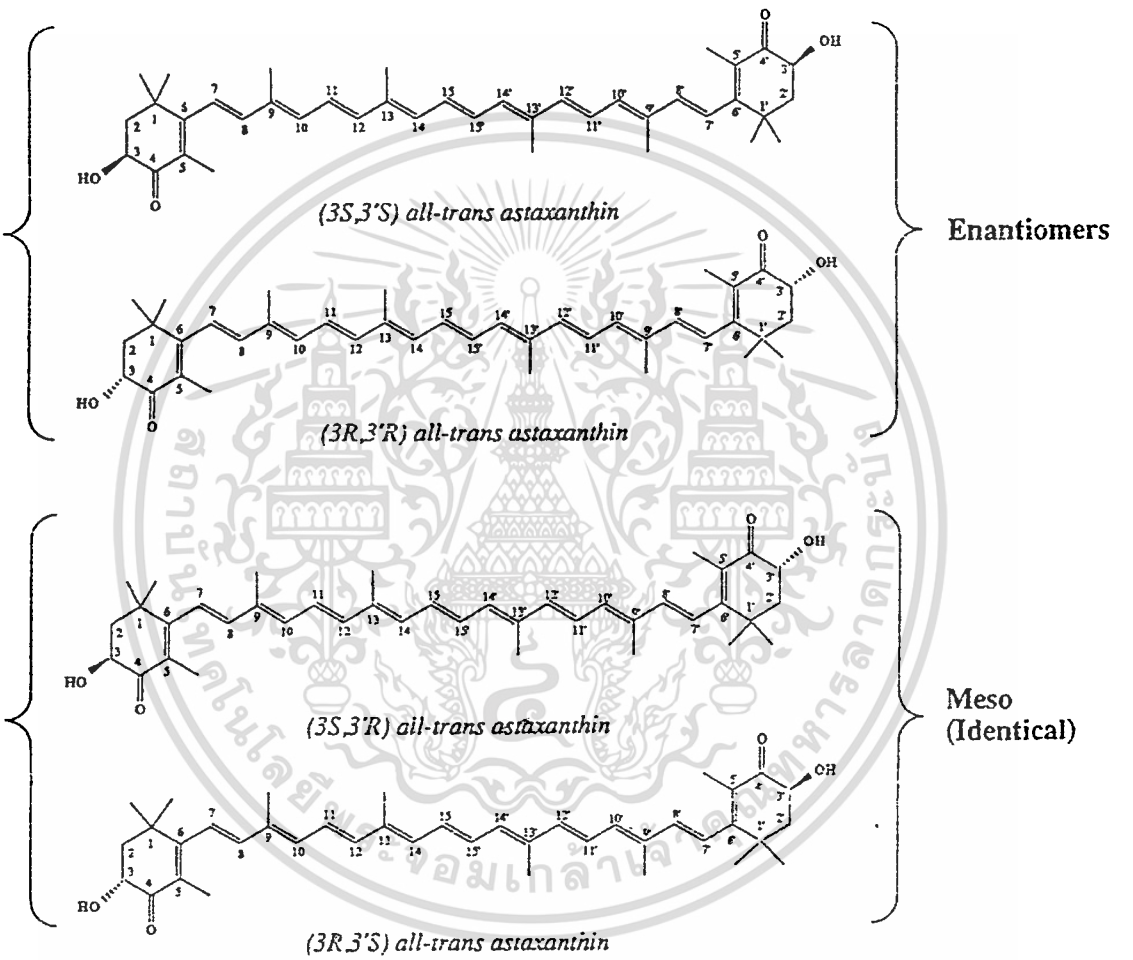

**รูปที่ 2.2** แสดงโครงสร้างของแอสตาแซนทิน ( Lorenz และ Cysewski, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.2 ไอโซเมอร์ของแอสตาแซนทิน

#### 2.1.2.1 คอนฟิกูเรชั่นไอโซเมอร์ (configuration isomers)

เกิดจากการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิล ($OH^-$) บริเวณ chiral centers (C-3 และ C-3') ของแอสตาแซนทิน (All-*trans* astxanthin) ซึ่งประกอบด้วย 2 enatiomers form (3R,3R' และ 3S,3S') และ Meso form (3R,3S') ดังรูปที่ 2.3

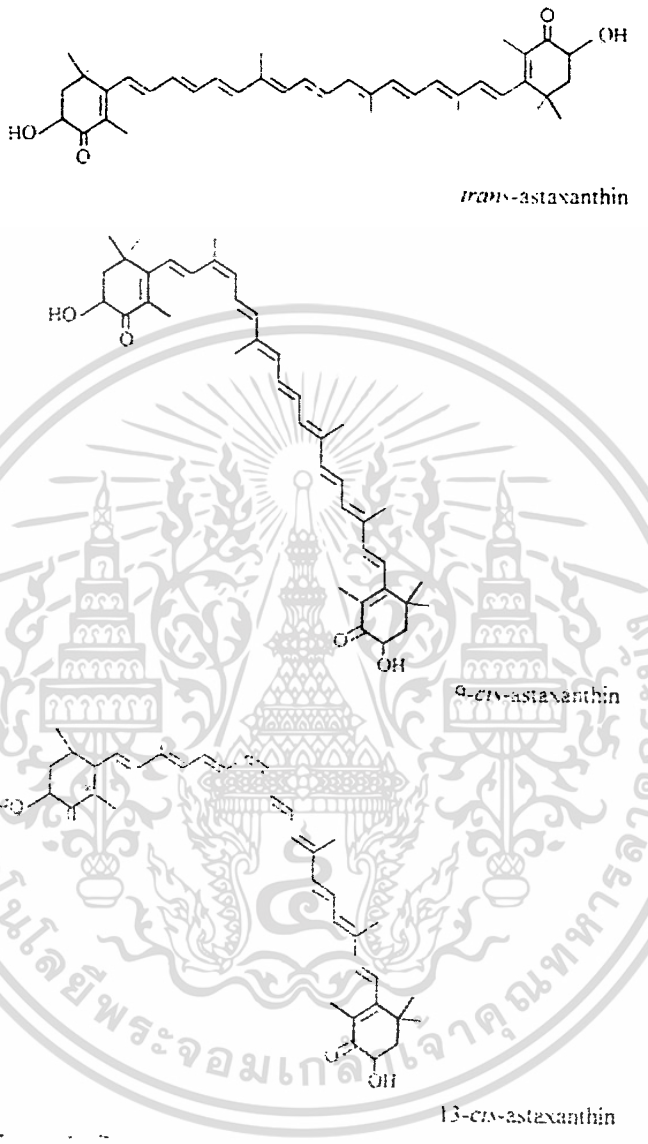



**รูปที่ 2.3** แสดง คอนฟิกูเรชั่นไอโซเมอร์ (configuration isomers) ของแอสตาแซนทิน (Turujman และคณะ, 1997)

#### 2.1.2.2 ซิส-ทรานซ์ไอโซเมอร์ *(cis-trans* isomer)

เกิดจากการไอโซเมอไรเซชันแอสตาแซนทินที่มีโครงสร้างแบบทรานซ์ไอโซเมอร์ (*trans*-astaxanthin) ไปเป็นโครงสร้างแบบซิส ไอโซเมอร์ (*cis*-astaxanthin) ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ถูกแสง หรือในสภาวะที่มีความเป็นกรด ดังรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

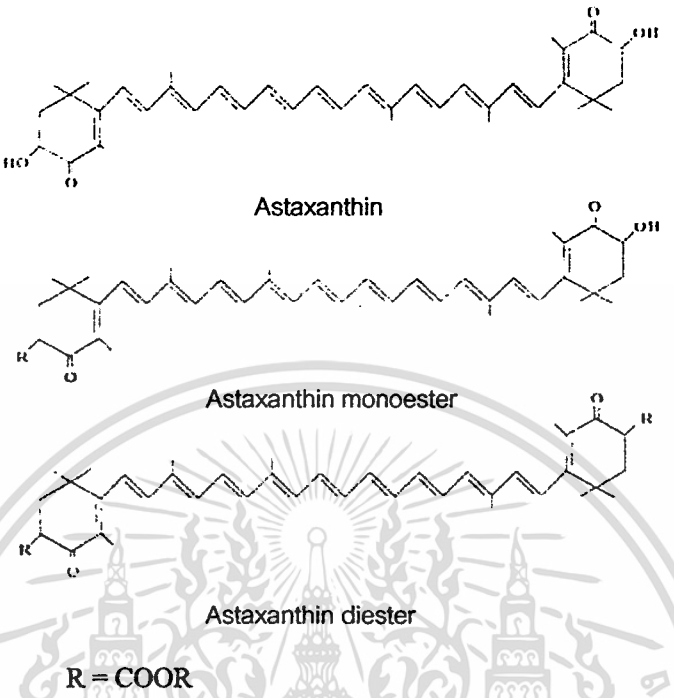



**รูปที่ 2.4** แสดงซิส-ทรานซ์ไอโซเมอร์ (*cis-trans* isomers) ของแอสตาแซนทิน (Yuan และ Chen, 1999)

### 2.1.3 แอสตาแซนทินแอสเทอร์ (esterified astaxanthin)

เกิดจากการเติมหมู่เอสเทอร์ (COOR) หรือกรดไขมัน (fatty acid) เข้าไปแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล ($OH^-$) ของแอสตาแซนทินที่ตำแหน่ง C-3 หรือ C-3' ข้างใดข้างหนึ่ง เรียกว่า astaxanthin monoester หรือทั้งสองข้าง เรียกว่า astaxanthin diesters ดังรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.5** แสดงโครงสร้างของแอสตาแซนและแอสตาแซนทินเอสเทอร์ (Kobayashi และ Sakamoto, 1999)

**2.1.4 ประโยชน์ของแอสตาแซนทิน**

2.1.4.1 **ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีก** โดยการเติมลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ กุ้ง ปลากะพงแดง ปลาสวยงาม และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เพื่อให้สีชมพูกับเนื้อ เร่งสีแดงในปลาสวยงาม และให้สีของไข่แดง (Lorenz และ Cysewski, 2000)

2.1.4.2 **ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง** เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิเดนท์ สามารถป้องกันรังสีอัลตร้าไวโอเลตและกำจัดอนุมูลอิสระ (Lorenz และ Cysewski, 2000)

2.1.4.3. **ใช้ในอุตสาหกรรมยา** เนื่องจากแอสตาแซนทินมีผลในการป้องกันอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งได้ (aflatoxin B1 carcinogenicity) (Yuan และ Chen, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 สาหร่าย *Haematococcus* sp.

### 2.2.1 การจัดจำแนก

สาหร่าย *Haematococcus* sp. (รูปที่ 2.6) เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวเซลล์เดียวซึ่ง Prescott(1970) ได้จัดจำแนกไว้ดังนี้

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

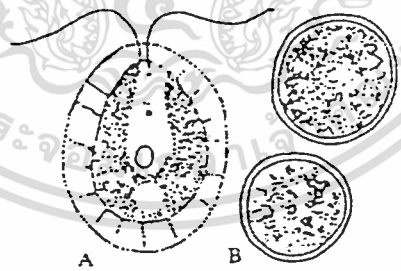
Order Volvocales

Family Chlamydomonadaceae

Genus *Haematococcus*

### 2.2.2 รูปร่างและลักษณะ

เป็นสาหร่ายที่สามารถเคลื่อนที่ได้ มักจะพบสาหร่ายชนิดนี้ในลักษณะเป็นเกราะสีแดง เกาะอยู่ตามก้นสระ หินตื้นๆ และบ่อซีเมนต์ อาจพบได้ในบ่อน้ำสวนนก ระยะที่ว่ายน้ำได้จะพบแส้ 2 เส้นยื่นออกมาจากโปรโทพลาสต์ ผนังเซลล์ชุ่มชื้น มีเมือกลื่น ถ้าสังเกตไม่เห็น haematochrome ก็จะพบคลอโรพลาสต์เรียงอยู่ด้านข้างเซลล์และมีไพรีนอยด์ (pyrenoid) จำนวนมาก (รูปที่ 2.6)




**รูปที่ 2.6** แสดงลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (A) แสดงรูปร่างของเซลล์ที่สามารถว่ายน้ำได้ (B) แสดงรูปร่างของเซลล์ที่มีซิสต์ (cyst) สีแดงอิฐเนื่องจาก haematochrome (Prescott, 1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2.3 วงชีวิตของสาหร่าย**

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะและรูปร่างของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ทำให้ทราบถึงวงชีวิต และสรุปเป็นรูปแบบวงชีวิตของสาหร่าย (รูปที่ 2.7) โดย Kobayashi และคณะ (1997a) ศึกษาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ดังนี้

**ขั้นตอนที่ 1**

นำเซลล์สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารสูตร Basal Medium ซึ่งมีอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ระดับความเข้มแสง 25 μmol quanta $m^{-2}s^{-1}$ ช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง ไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน (เซลล์อยู่ในระยะการเจริญ)

**ระยะที่ 1 การเจริญของเซลล์ปกติ (Vegetative Cell Growth)** การเจริญของเซลล์สาหร่ายในระยะที่มีการเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา

**ขั้นตอนที่ 2**

เติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 2.25 M (pH 4) จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 45 mM เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

**ระยะที่ 2 การเจริญเป็นซิสต์เริ่มแรก (Encystment)** การเจริญของเซลล์ปกติไปเป็นซิสต์วัยอ่อน มีรูปร่างค่อนข้างกลม ไม่เคลื่อนที่ หรืออะพลาโนสปอร์ (aplanospore)

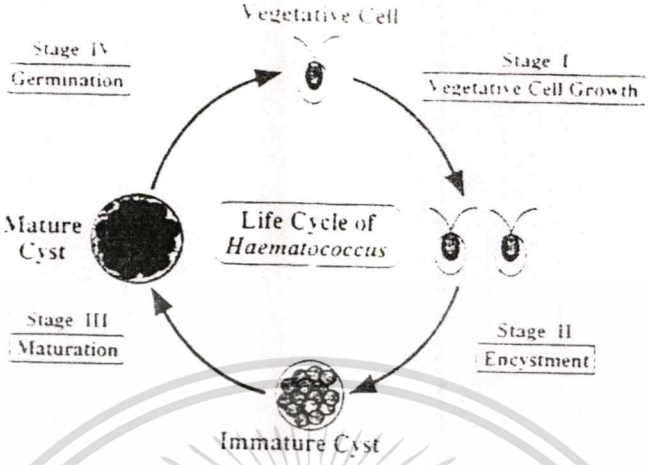
เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตความเข้มข้น 22.5 mM (pH 1.5) ลงไปจนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้าย 450 μM พร้อมกับเพิ่มความเข้มแสงเป็น 125 μmol quanta $m^{-2}s^{-1}$ และให้แสงตลอดเวลา เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

**ระยะที่ 3 การเจริญเป็นซิสต์เต็มวัย (Maturation)** เป็นระยะที่ซิสต์วัยอ่อนเจริญเป็นซิสต์เต็มวัย เนื่องจากถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นด้วยเฟอรัสซัลเฟต หรืออะพลาโนสปอร์ระยะที่สร้างแอสตาแซนทิน ( red aplanospore)

ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ล้างเซลล์ให้สะอาด แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal Medium ใหม่ แล้วเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับขั้นตอนที่ 1 เป็นเวลา 5 วัน

**ระยะที่ 4 การงอกของซิสต์ (Germination)** เป็นระยะที่นำซิสต์เต็มวัยไปเลี้ยงในอาหารใหม่จนมีการปลดปล่อยเซลล์ลูกออกจากเซลล์และเซลล์ลูกเจริญต่อไปเป็นเซลล์ปกติอีกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.7** แสดงรูปแบบวงชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi และคณะ, 1997a)

### 2.2.4 รงควัตถุที่พบในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

จากผลการทดลองของ Yuan และ Chen (1998) แยกและจัดจำแนกไอโซเมอร์ของแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์จากรงควัตถุที่สกัดมาจากสาหร่าย *H. pluvialis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MCM ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 3.7 ลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ด้วย HPLC ระบบ reverse phase พบว่าสามารถแยกและจัดจำแนกไอโซเมอร์ของแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์ได้ 4 ชนิดคือ (3S,3S)-*trans*-astaxanthin, (3S,3S')-9-*cis*-astaxanthin, (3S,3S)-13-*cis*-astaxanthin, (3R,3R)-*trans*-astaxanthin และรูปที่เป็นเอสเทอร์ได้แก่ (3S,3S')-*trans*-astaxanthin ester, (3S,3S')-9-*cis*-astaxanthin ester, (3S,3S)-13-*cis*-astaxanthin ester, (3R,3R)-*trans*-astaxanthin และยังพบว่ามี (3S,3S)-15-*cis*-astaxanthin ปริมาณเล็กน้อยในสารสกัดที่ผ่านการสปอนนิฟิเคชัน และสรุปผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 2.1

นอกจากนี้ Yuan และ Chen (2000) พบว่ารงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่าย H. *pluvialis* ส่วนใหญ่ในรูปแอสตาแซนทินเอสเทอร์ ซึ่ง Yuan และคณะ (1996) รายงานว่าเป็น astaxanthin monoester สูงถึงร้อยละ 79 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

Domínguez-Bocanegra และคณะ (2004) รายงานว่าการเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ในสภาวะเครียด เช่น สภาวะการขาดสารอาหาร ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงๆ และการแปรเปลี่ยนอุณหภูมิ จะพบแอสตาแซนทินภายในเซลล์สาหร่ายมากกว่าร้อยละ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.1** ผลของการวิเคราะห์แคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *H. pluvialis* (มิลลิกรัมต่อลิตร)

| สารสีหรือรงควัตถุ | สารสกัดที่ไม่ผ่านสปอนนิฟิเคชั่น | สารสกัดที่ผ่านสปอนนิฟิเคชั่น | ปริมาณเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง | %ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด |
|---|---|---|---|---|
| *trans*-astaxanthin | 0.66 | 17.31 | 6.84 | 69.1 |
| 9-*cis* -astaxanthin | 0.04 | 1.83 | 0.72 | 7.3 |
| 13-*cis* -astaxanthin | 0.03 | 0.85 | 0.34 | 3.4 |
| (3R,3R')-*trans*-astaxanthin | 0.08 | 1.66 | 0.66 | 6.6 |
| *β*-carotene | 0.25 | 0.28 | 0.1 | 1.0 |
| echinenone | | 0.11 | 0.04 | 0.4 |
| adonirubin | 0.24 | 1.27 | 0.50 | 5.1 |
| canthaxanthin | 0.27 | 0.26 | 0.10 | 1.0 |
| lutein | 1.50 | 1.54 | 0.60 | 6.1 |
| Chlorophyll *a* | 2.90 | 0 | 1.14 | - |
| Chlorophyll *b* | 1.72 | 0 | 0.68 | - |
| Chlorophyll *b'* | 0.32 | 0 | 0.13 | - |

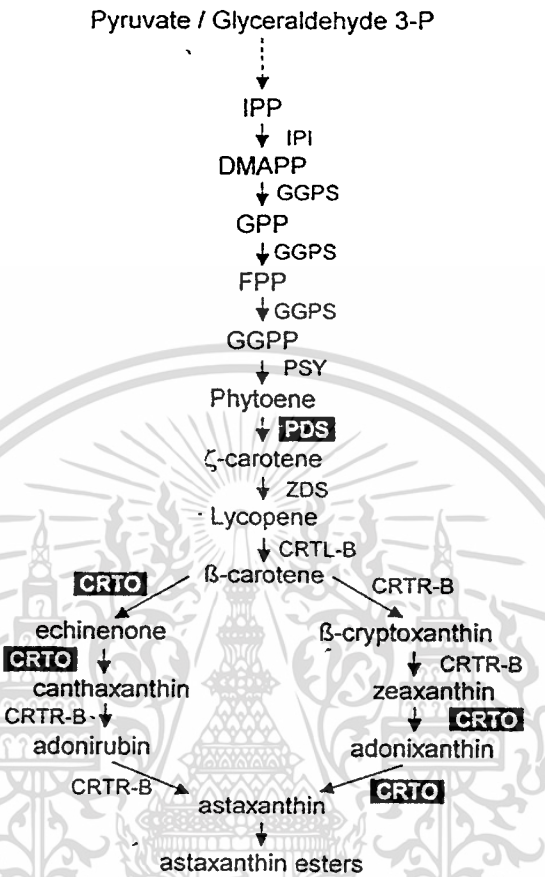
**ที่มา** Yuan และ Chen (1998)

### 2.2.5 การสังเคราะห์แอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในสาหร่ายและพืชจะเกิดในพลาสติด (plastids) โดยจะพบอยู่ในรูปอิสระหรือเชื่อมต่อกับโปรตีน ในสภาวะเครียด สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* จะสะสม แอสตาแซนทินเอสเทอร์ ซึ่งเป็น secondary carotenoid ส่วนใหญ่ ภายใน cytoplasmic lipid vesicles สูงถึงร้อยละ 4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Grünewald และคณะ , 2001)

**2.2.5.1 วิถีการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน** (pathway of astaxanthin biosynthesis) ของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ดังแสดงในรูปที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.8** แสดงวิถีสังเคราะห์แอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์ของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

CRTL-B (lycopene $\beta$-cyclase) , CRTO ($\beta$-carotene oxygenase), CRTR-B ($\beta$-ring hydroxylase), GGPS (geranylgeranyl diphosphate synthase), IPI (isopentenyl diphosphate isomerase), PDS (phytoene desaturase), PSY (phytoene synthease), ZDS ($\zeta$- carotene desaturase) (Grünewald และคณะ., 2000)

**2.2.5.2 กลไกการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน มีขั้นตอนดังนี้**

**2.2.5.2.1 การสังเคราะห์ isopentenyl pyrophosphate (IPP) โดยใช้** DOXP pathway **ที่มีสารต้นตอคือ** pyruvate **หรือ** glyceraldehyde-3-P **และได้สารมัธยันต์** (intermediate) **ตัวแรกคือ** 1-Deoxy -D-xylulose-5-P (DOXP) **ดังรูปที่** 2.9

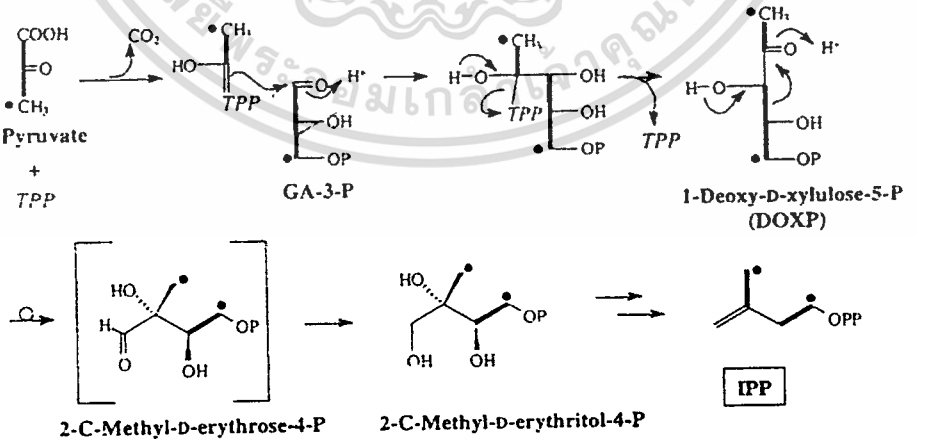
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2.5.2.2 การสังเคราะห์ไฟโตอีน (phytoene)** ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอน 40 อะตอม (เททระเทอร์พีนส์ตัวแรก) โดยการรวมตัว (condensation) แบบหัวท้าย (head-to- tial) ของไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต (isopentenyl pyrophosphate,IPP) และไดเมทิลแอลลิล-ไพโรฟอสเฟต (dimethyl allyl pyrophosphate, DMAPP) ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม เพื่อเกิดเป็นเจอรานีลเจอรานีลไพโรฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 20 อะตอม ($C_{20}$ terpenoid geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) จากนั้นจึงมีการรวมตัวกันของ GGPP จำนวน 2 โมเลกุลแบบท้ายต่อท้าย (tail-to-tail) เกิดเป็น prephytoenepyrophosphate (PPPP) และเปลี่ยนต่อไปเป็นไฟโตอีนด้วยเอนไซม์ phytoene synthease (PSY) (บุษบา, 2540; Cunningham และ Gantt., 1998) ดังรูปที่ 2.10

**2.2.5.2.3 การเกิดปฏิกิริยา desaturation หรือปฏิกิริยาdehydrogenation** เป็นปฏิกิริยาการกำจัดไฮโดรเจนเพื่อเพิ่มพันธะคู่เข้าไปในสายของไฟโตอีน เกิดเป็นไลโคปีน (lycopene) ดังรูปที่ 2.11

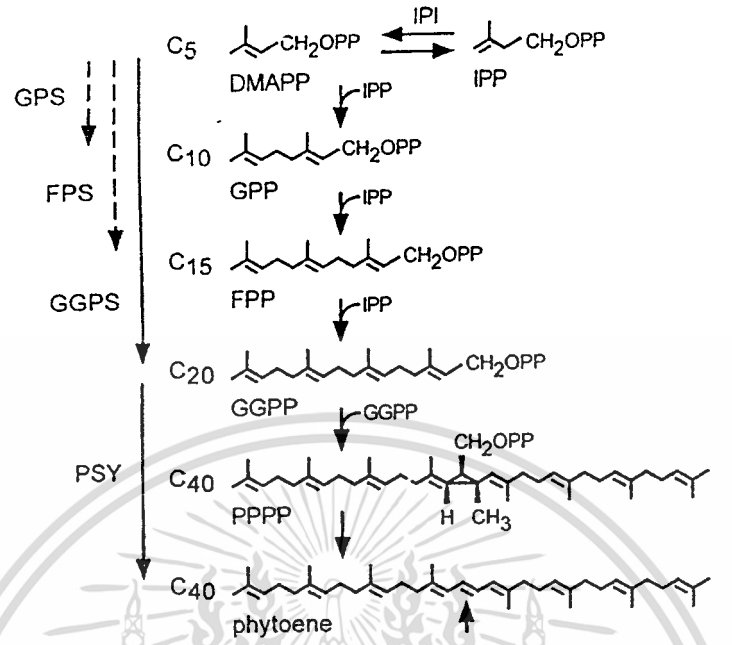
**2.2.5.2.4 การเกิดปฏิกิริยาไซไคลเซชั่นของไลโคพีน (cyclization of lycopene)** หรือปฏิกิริยาการเกิดวง เป็นปฏิกิริยาการสร้าง $\beta$-ring ที่ปลายทั้งสองข้างของไลโคพีน เกิดเป็นเบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารต้นตอในการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน ดังรูปที่ 2.12

**2.2.5.2.5 การสังเคราะห์แอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์** โดย มีเบต้าแคโรทีน เป็นสารต้นตอ ดังรูปที่ 2.13 และ 2.14

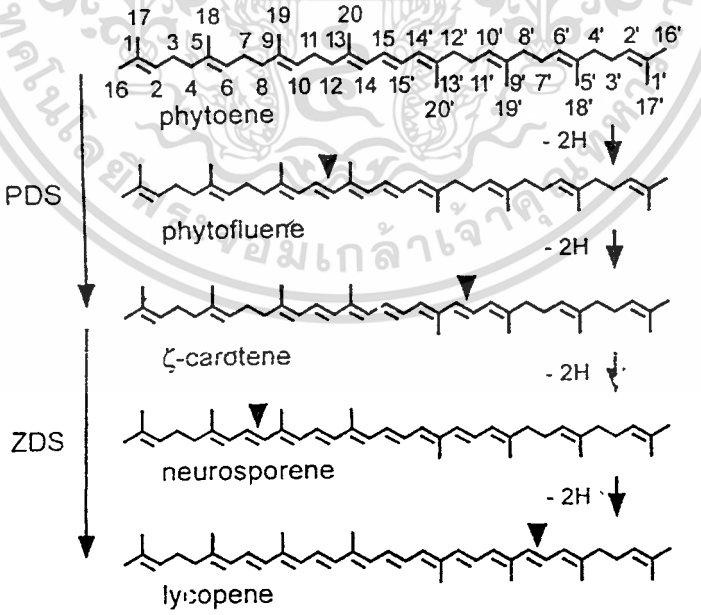



**รูปที่ 2.9** แสดง การสังเคราะห์ isopentenyl pyrophosphate (IPP) โดยใช้ DOXP pathway (non-mevalonate pathway, MVA pathway) (Lichtenthaler, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

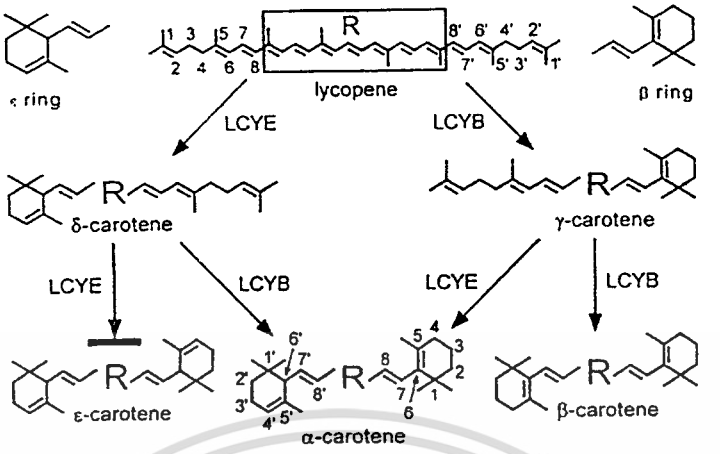



**รูปที่ 2.10** แสดงการสังเคราะห์ไฟโตอีนโดยปฏิกิริยาการรวมตัว (condensation)
(Cunningham และ Gantt, 1998)

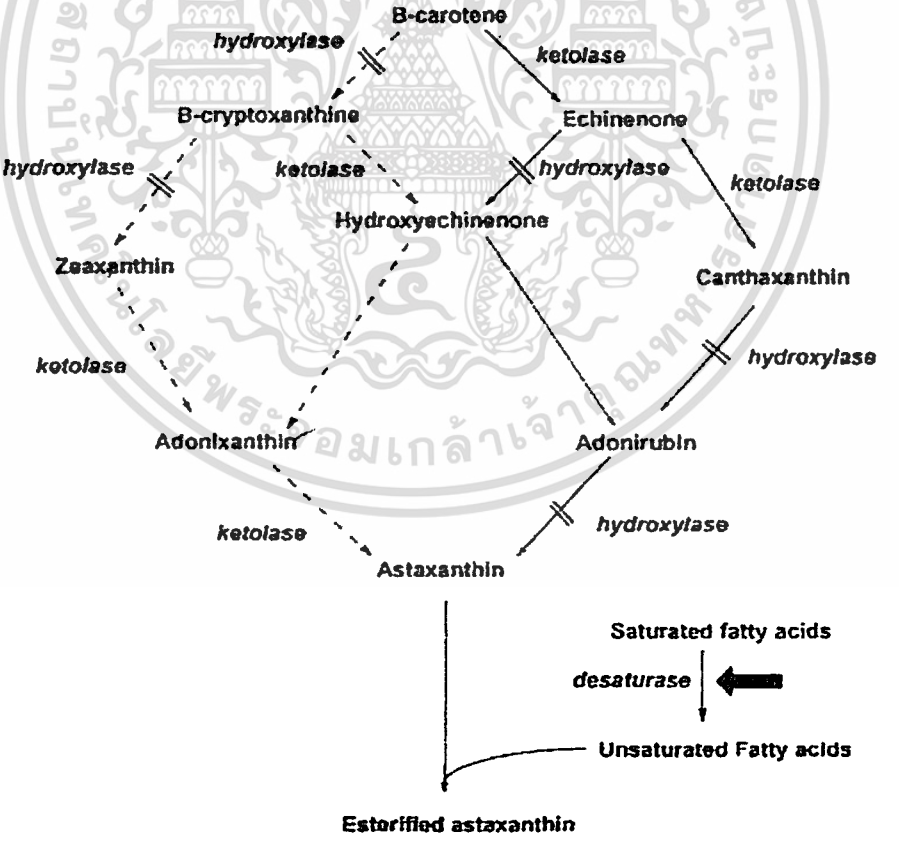



**รูปที่ 2.11** แสดงการสังเคราะห์ไลโคปีนโดยปฏิกิริยา desaturation หรือ dehydrogenation
(Cunningham และ Gantt, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

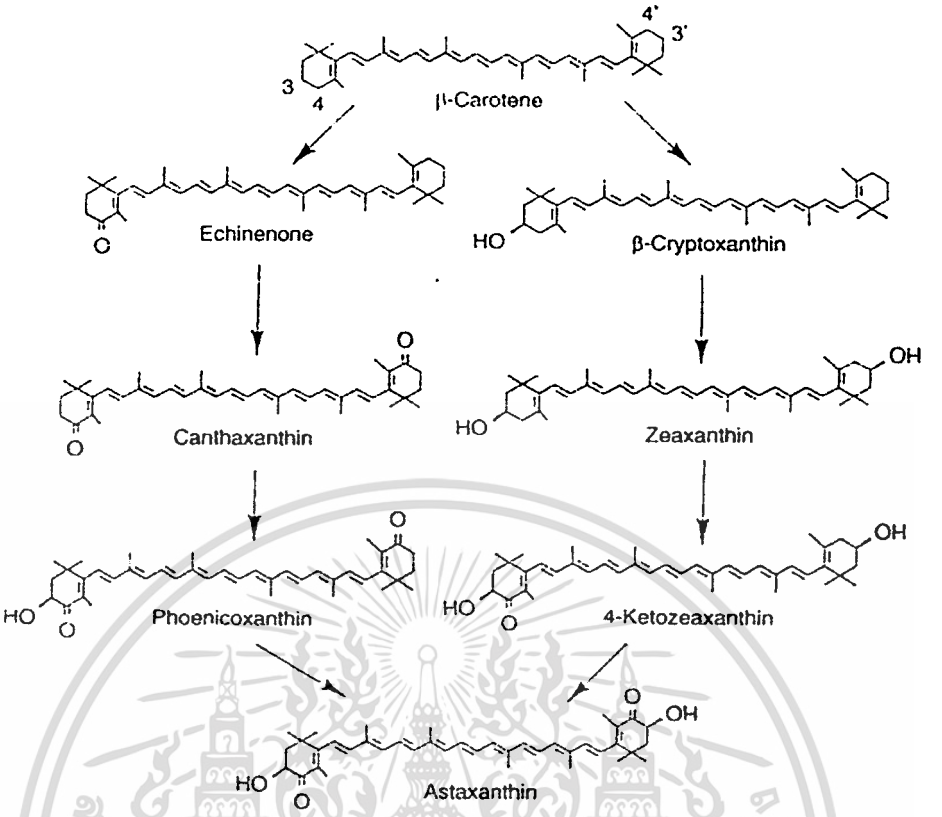



**รูปที่ 2.12** แสดงการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนจากปฏิกิริยาการเกิดวงหรือปฏิกิริยาไซไคลเซชั่นของไลโคปีน (Cunningham และ Gantt, 1998)




**รูปที่ 2.13** แสดงการสังเคราะห์แอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์จากเบต้าแคโรทีน (Schoefs และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.14** แสดงการสังเคราะห์แอสตาแซนทินจากเบต้าแคโรทีน ทางด้านลักษณะโครงสร้างของโมเลกุล (Margalith, 1999)

## 2.3 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

**2.3.1 วิธีการเพาะเลี้ยง** แบ่งออกเป็น 2 แบบคือ

2.3.1.1 **การเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว** คือการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้อุณหภูมิ ความเข้มแสง คงที่ตลอดเวลาจนกระทั่งได้เซลล์สาหร่ายที่อยู่ในระยะที่สะสมแอสตาแซนทิน ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายมีความเครียดจากการขาดสารอาหารเนื่องจากสารอาหารถูกใช้หมดไป (สุดสายชล, 2541)

2.3.1.2 **การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน** โดยขั้นตอนแรกทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้อยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโต (growth curve) ซึ่งเซลล์ที่อยู่ในระยะนี้เป็นเซลล์ที่มีสีเขียวจนกระทั่งได้จำนวนเซลล์สูงสุด แล้วจึงใช้ปัจจัยต่างๆ มากระตุ้นให้เซลล์เกิดความเครียดเพื่อเปลี่ยนจากเซลล์ปกติ (vegetative cell) ไปเป็นซิสต์ (cyst cell) และเริ่มสะสมคีโตแคโรทีนอยด์หรือแอสตาแซนทิน ปัจจัยต่างๆ ที่นำมาใช้ได้แก่ ความเค็มโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มแสงโดยการเพิ่มระดับความเข้มของแสง อุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณสารอาหารโดยการย้ายสาหร่ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ขาดฟอสฟอรัส เป็นต้น (Harker และคณะ, 1996b; Boussiba และคณะ, 1999 )

### 2.3.2 สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอะซิเตต ทั้งในสภาวะที่ไม่ใช้แสง (heterotrophic condition) สภาวะที่ใช้แสง (mixotrophic condition) และในอาหารที่ไม่มีอะซิเตตแต่ใช้แสง (autotrophic condition) ได้ โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงมีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ดีกว่าในสภาวะที่ไม่ให้แสง และในสภาวะอาหารที่ไม่มีอะซิเตตแต่ใช้แสง (Kobayashi และคณะ, 1992a)

### 2.3.3 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย

สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย มีหลายชนิดได้แก่ อาหารสูตร Basal Medium (Kakizono และคณะ, 1992) , Bristol medium (Chaumont และ Thèpenier, 1995), Bold's basal medium (Harker และคณะ, 1996a) , MCM (Yuan และคณะ, 1996) , BG-11 (Fan และคณะ, 1994; Bousshiba และคณะ, 1999) , Z8, A9 ( Tripathi และคณะ, 1999), และ OHM (Optimal *Haematococcus* medium) ( Fàbregas และคณะ, 2000) modified Bold's basal medium (Orosa และคณะ, 2001) เป็นต้น

## 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย

### 2.4.1 คาร์บอน

การเติมอะซิเตตลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus lacustris* ในสภาวะที่ใช้แสงพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Eduard และคณะ, 1993)

ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตที่เหมาะสมสำหรับผลิตชีวมวล การผลิตแอสตา-แซนทิน (astaxanthin production) และปริมาณแอสตาแซนทิน (astaxanthin content) คือ 1.64 กรัมต่อลิตร โดยเซลล์สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ 13.96 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ปริมาณแอสตา-แซนทินในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่ 20.72 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Gong และ Chen, 1997; Gong และ Chen, 1998) ในขณะที่ Cordero และคณะ (1996) พบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีการเติมโซเดียมอะซิเตต 0.025 และ 0.050 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิตแอสตาแซนทิน โดยผลิตได้ร้อยละ 1.83 และ 1.78 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58532

### 2.4.2 ไนโตรเจน

Borowitzka และคณะ (1991) รายงานว่าที่ระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรท 0.5 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตรสาหร่ายสามารถเจริญได้ดีที่สุด

Gong และ Chen (1997) รายงานว่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรทที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 0.25 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลคือ 0.37 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Gong และ Chen (1998) รายงานว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอสตาแซนทินคือ 0.03 กรัมต่อลิตร

Harker และคณะ (1996b) รายงานว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรทในระดับต่ำหรือในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนสาหร่ายจะหยุดการเจริญเติบโตแต่จะมีการสะสมแอสตาแซนทินในเซลล์ที่รอดชีวิตในระดับที่สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 3.0 มิลลิโมลาร์ให้การเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุด ในขณะที่ในสภาวะที่ขาดไนเตรทจะทำให้เซลล์สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน (astaxanthin formation) ได้สูงสุด โดยมีระดับของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (ซึ่งมีแอสตาแซนทินอยู่มากกว่า 95%) มากกว่า 300 พิโคกรัมต่อเซลล์

Boussiba และคณะ (1999) รายงานว่าจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารที่ขาดไนโตรเจน หรือในอาหารที่ขาดฟอสเฟต ที่ระดับความเข้มแสง 200 μmol photon $m^{-2}$ $s^{-1}$ พบว่าสาหร่ายมีการสะสมแอสตาแซนทินสูงถึงร้อยละ 4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (2.6 กรัมต่อลิตร) ส่วนในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนสาหร่ายจะสะสมแอสตาแซนทินได้เร็วกว่าในสภาวะที่ขาดฟอสเฟต และมีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อเซลล์ลดลงร้อยละ 50 ของปริมาณเริ่มต้น ในขณะที่สภาวะการขาดฟอสเฟต การสะสมแอสตาแซนทินของสาหร่ายเกิดขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อเซลล์

### 2.4.3 ฟอสเฟต

สภาวะการเลี้ยงในอาหารที่ขาดฟอสเฟตและอาหารที่มีปริมาณฟอสเฟตสูง จะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้สูง และการลดลงของปริมาณฟอสเฟตไม่มีต่อผลต่อการเจริญของสาหร่ายซึ่งต่างกันกับสภาวะที่ขาดไนโตรเจน แต่ยังทำให้การผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่ายสูงขึ้นด้วย (Harker และคณะ, 1996b)

### 2.4.4 โซเดียมคลอไรด์

สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร Bold's basal medium ที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่การเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ทำให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินสูงสุดโดยคิดในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ 500 พิโคกรัมต่อเซลล์ (Harker และคณะ,1996b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารจะชักนำให้เซลล์สาหร่ายสังเคราะห์แอสตาแซนทิน (Borowitzka และคณะ, 1991)

นอกจากนี้ Cordero และคณะ (1996) รายงานว่าที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ร้อยละ 0.2 เหมาะสำหรับการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

**2.4.5 เฟอรัสซัลเฟต**

ความเข้มข้นของเฟอรัสอิออนที่มีความเข้มข้นสูงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตแอสตาแซนทิน ในขณะที่ความเข้มข้นของเฟอรัสอิออนต่ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตแอสตาแซนทินเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระดับควบคุม (control level) โดยที่ระดับความเข้มข้นของเฟอรัสอิออนสูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของสาหร่ายคือ 72 ไมโครโมลาร์ (Harker และคณะ,1996b) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสูตรอาหารที่มีเฟอรัสอิออนปริมาณมาก ($Fe^{2+}$-rich medium) พร้อมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่องจะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้สูงขึ้น (Kobayashi และคณะ ,1992b)

**2.4.6 ความเข้มแสง**

ความเข้มแสงมีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะทั้งภายใต้สภาวะออโตโทรฟิค (autotrophic condition) และสภาวะ mixotrophic (Eduard และคณะ, 1993)

ความเข้มแสงที่ 50-60 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในขณะที่ความเข้มแสงที่สูงกว่า 1600 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน ( Harker และคณะ, 1995)

ความเข้มแสงในระดับสูงมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์สูง แต่ความเข้มแสงสูงก็เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดสำหรับการสะสมแอสตาแซนทินภายในเซลล์ที่รอดชีวิต ในขณะที่ความเข้มแสงระดับต่ำสาหร่ายจะสะสมปริมาณแอสตาแซนทินในระดับต่ำ แต่อัตราการรอดชีวิตของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( Harker และคณะ, 1996b)

การใช้ความเข้มแสงสูงๆ ร่วมกับการใช้สภาวะเครียด (stress condition) หรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เป็นตัวส่งเสริมให้มีการกระตุ้นให้สาหร่ายสังเคราะห์แอสตาแซนทิน (Fàbregas และคณะ, 1998) นอกจากนี้การเติมโซเดียมคลอไรด์ 25-30 มิลลิโมลาร์พร้อมกับการใช้แสงจะกระตุ้นให้สาหร่ายสังเคราะห์แอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น (Harker และคณะ, 1995)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.4.7 อุณหภูมิ**

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสาหร่ายอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส โดยที่ระดับอุณหภูมิที่สูงกว่านี้สาหร่ายจะไม่มีการแบ่งเซลล์และขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้นจาก 5 ไมโครเมตร ไปเป็น 25 ไมโครเมตร (Fan และคณะ, 1994)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการ

## 3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และสาหร่าย

1. สาหร่าย *Haematococcus* sp.จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.)
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย
   - 2.1 หลอดเพาะเลี้ยงสาหร่าย ขนาด 300 มล.
   - 2.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
   - 2.3 แผงไฟฟลูออเรสเซนต์
   - 2.4 ปั๊มให้อากาศ
   - 2.5 ตัวตั้งเวลาปิดเปิดไฟ (timer)
   - 2.6 ตัวกรองอากาศขนาด 0.2 ไมโครเมตร
   - 2.7 หลอดทดลองขนาดกลางฝาเกลียว
3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล
   - 3.1 Haemacytometer ( Improved Neubauer Bright-Line,HBG)
   - 3.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Hettich : Universal 16 R)
   - 3.3 ตู้อบไอร้อน (hot air owen) (SHELL LAB : 1350 FX)
   - 3.4 ชุดกรองแบบสุญญากาศ (suction pump)
   - 3.5 กระดาษกรอง GF/C ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มม.
   - 3.6 เครื่องผสมสาร (vortex mixer) พร้อม glass bead
   - 3.7 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ( Minton-roy : spectronic 401)
   - 3.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert : WB-14)
   - 3.9 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Hanna : HI 9025)
   - 3.10 เครื่อง HPLC ( Shimudzu : LC-10ADvp)
   - 3.11 คอลัมน์ HiQ sil C18V ของ KYA TECH Corporation
   - 3.12 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) ชนิด Bio Carbinet Safety Class II
   - 3.13 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอสูง (autoclave) (Hirayama : HV-50)
   - 3.14 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler : AG204)
   - 3.15 เครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศ (freeze dry)
   - 3.16 ตู้แช่แบบเยือกแข็ง (-60 องศาเซลเซียส)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.17 ถังหมัก Biostat ®B (B. Braun Biotech international, Germany) ขนาด 2 ลิตร

3.18 ไมโครปิเปตต์ ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร (Brand และ Pipetman)

3.19 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

3.20 กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดถ่ายภาพ (Olympus : DP12)

3.21 กระดาษกรอง Cellulose acetate 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 47 มม.

3.22 Nylon 66 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 47 มม. syringe filter 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 22 มม. และเข็มฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

4.1.1 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)

4.1.2 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

4.1.3 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

4.1.4 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$)

4.1.5 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)

4.1.6 ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)

4.1.7 แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)

4.1.8 โมลิบดินัมไตรออกไซด์ ($MoO_3$)

4.1.9 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)

4.1.10 โคบอลท์ไนเตรท ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)

4.1.11 บอริคแอซิด (boric acid)

4.1.12 อีดีทีเอ ($EDTANa_2$)

4.1.13 เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)

4.1.14 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)

4.1.15 โซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa.3H_2O$)

4.2 สารเคมีที่ใช้สกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

4.2.1 อะซิโตน (acetone,AR grade)

4.2.2 เมทานอล (methanol, AR grade)

4.2.3 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)

4.2.4 กรดแอซีติก (acetic acid)

4.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์โดย HPLC

4.3.1 แอสตาแซนทิน (astaxanthin, Sigma)

4.3.2 เมทานอล (methanol, HPLC grade)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 น้ำสำหรับใช้กับเครื่อง HPLC หรือ deionize water

4.3.4 ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, HPLC grade)

4.3.5 อะซิโตไนไตรล์ (acetronitrile, HPLC grade)

## 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.

### 3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้เป็นอาหารสูตรโบลด์ (Bold 's basal medium) มีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโบลด์

| ส่วนประกอบ | ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) | Stock (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| $NaNO_3$ | 0.25 | 50 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.075 | 15 |
| NaCl | 0.025 | 5 |
| $K_2HPO_4$ | 0.075 | 15 |
| $KH_2PO_4$ | 0.175 | 35 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.025 | 5 |
| $H_3BO_3$ | 0.0114 | 2.28 |
| EDTA-KOH solution | | |
| $EDTANa_2$ | 0.05 | 10 |
| KOH | 0.031 | 6.2 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 0.00498 | 0.996 |
| conc $H_2SO_4$ | 0.001 มิลลิลิตร | 0.2 |
| Trace elements solution | 1 มิลลิลิตร | |
| น้ำกลั่น | 1 ลิตร | |
| Trace elements solution | มิลลิกรัม/ลิตร | |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 8.82 | 8.82 |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 1.44 | 1.44 |
| $MoO_3$ | 0.71 | 0.71 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 1.57 | 1.57 |
| $Co(NO_3)_2.6H_2O$ | 0.49 | 0.49 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเตรียมธาตุอาหารหลักจะเตรียมเป็น stock ของแต่ละสารให้มีความเข้มข้น 200 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิด ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ส่วนธาตุอาหารรองชั่งสารทุกชนิดรวมกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ละลายทีละชนิด) การนำไปใช้เตรียมอาหารเหลวสูตรโบลด์ ปริมาตร 1 ลิตร ทำได้โดยดูด stock ของธาตุอาหารหลัก 5 มิลลิลิตร และธาตุอาหารรอง 1 มิลลิลิตรจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรและปรับพีเอชที่ 7.00 (ด้วย HCl 1 N และ NaOH 1 N) แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## 3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

### 3.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

**3.3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย** เพาะเลี้ยงสาหร่าย ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารโบลด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้งๆ ละ 10 รอบ จนกระทั่งสาหร่ายสร้างแอสตาแซนทินหรือเป็นระยะที่มีสีแดงเต็มเซลล์

**3.3.1.2 วิธีการศึกษาการเจริญ** โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากข้อ 3.3.1.1 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตรโบลด์ และสูตรโบลด์ดัดแปลงที่เติมโซเดียมอะซิเตตจำนวน 1 กรัมต่อลิตร โดยใช้หัวเชื้อ 25 มิลลิลิตร และอาหารสูตรโบลด์ทั้งสองสูตรๆ ละ 225 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 3.3.1.1 เก็บตัวอย่างทุก 2 วันๆ ละ 12 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์

### 3.3.2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เตรียมหัวเชื้อสาหร่าย โดยเพาะเลี้ยงสาหร่าย ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้งๆ ละ 10 รอบ เป็นเวลา 7 วัน

จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในหลอดเลี้ยงสาหร่ายที่ให้อากาศด้านล่างของหลอด ด้วยอาหารสูตรโบลด์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีการปรับความเข้มข้นของสารอาหารตามปัจจัยที่ต้องการศึกษาในข้อ 3.3.2.1-3.3.2.5 โดยปรับค่าความขุ่นของหัวเชื้อเริ่มต้น ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.03 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มแสง 1500 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง (รูปที่ 3.1) เพาะเลี้ยงนาน 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัน เก็บตัวอย่างสาหร่าย ทุก 2 วันๆ ละ 10 มิลลิลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์ และหาปริมาณแคโรทีนอยด์ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

**3.3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตต**

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโบลด์ โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตต่างกันดังนี้ คือ 0 0.25 และ 0.50 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 10 วัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้งในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

**3.3.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท**

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโบลด์ ที่เติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.1 และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่ 0.25 0.50 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 10 วัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

**3.3.2.3. ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์**

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโบลด์ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.2 และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 0.025 และ 0.050 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 10 วัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

**3.3.2.4 ศึกษาความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต**

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโบลด์ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.3 และแปรผันความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตที่ 0.005 0.01 และ 0.02 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 10 วัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

**3.3.2.5 ศึกษาความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต**

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรโบลด์ ที่ความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.4 และแปรผันความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.075 0.15 และ 0.30 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 10 วัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.2.6 ศึกษาระดับความเข้มของแสง**

เตรียมอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.5 นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสงต่างกัน คือ 1500 3000 และ 5000 ลักซ์ ความเข้มแสงละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จนครบ 10 วัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

**3.3.3. การศึกษาการเจริญของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลงและสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเติมและไม่เติมอากาศ**

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายโดยเพาะเลี้ยงสาหร่าย ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.6 โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้งๆ ละ 10 รอบ เป็นเวลา 7 วัน

**3.3.3.1 การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เติมอากาศ**

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์ อาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.2.5 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยปรับค่าความขุ่นของหัวเชื้อเริ่มต้น ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เท่ากับ 0.03 อย่างละ 3 ซ้ำ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มแสงจากข้อ 3.3.2.6 โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้งๆ ละ 10 รอบ เพาะเลี้ยงจนกระทั่งสาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินจนเต็มเซลล์ เก็บตัวอย่างสาหร่าย ทุก 4 วันๆ ละ 15 มิลลิลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์

**3.3.3.2 การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เติมอากาศ**

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดที่มีการเติมอากาศ ขนาด 1 ลิตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์ อาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.2.5 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร โดยปรับค่าความขุ่นของหัวเชื้อเริ่มต้น ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.03 อย่างละ 3 ซ้ำ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มแสงจากข้อ 3.3.2.6 โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงโดยใช้ระยะเวลาเท่ากันกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมอากาศ (รูปที่ 3.2) เก็บตัวอย่างสาหร่าย ทุก 4 วันๆ ละ 20 มิลลิลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 3.1** ลักษณะของหลอดเลี้ยงสาหร่ายที่ให้อากาศด้านล่างของหลอด ขนาด 300 มิลลิลิตร

**รูปที่ 3.2** ลักษณะของขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีการเติมอากาศขนาด 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.4 การศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน**

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสูตรอาหารโบลด์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.5 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยมือวันละ 3 ครั้งๆ ละ 10 รอบ เป็นเวลา 10 วัน นำเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ทั้งหมดมารวมกันในบีกเกอร์ขนาด 5 ลิตร เพื่อปรับค่าความขุ่นของสาหร่ายเริ่มต้นให้เท่ากันที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร จากนั้นตวงตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีท่อให้อากาศด้านล่าง การทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อภายใต้สภาวะในข้อ 3.3.4.1 และ 3.3.4.2

**3.3.4.1 ปัจจัยทางด้านแสง**

เพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่อง ที่ระดับความเข้มแสงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.6 และที่ระดับความเข้มแสงสูงกว่าข้อ 3.3.2.6 เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.6 ที่มีช่วงให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง) การทดลองละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณแอสตาแซนทิน

**3.3.4.2 ปัจจัยทางด้านแสงร่วมกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟต**

นำมาเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต (pH 1.5) ที่ระดับความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ (วิธีตามภาคผนวก ข) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงโดยให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ระดับความเข้มแสงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 เปรียบเทียบกับสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องเพียงอย่างเดียวจากข้อ 3.3.4.1 และสภาวะปกติ การทดลองละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณแอสตาแซนทิน

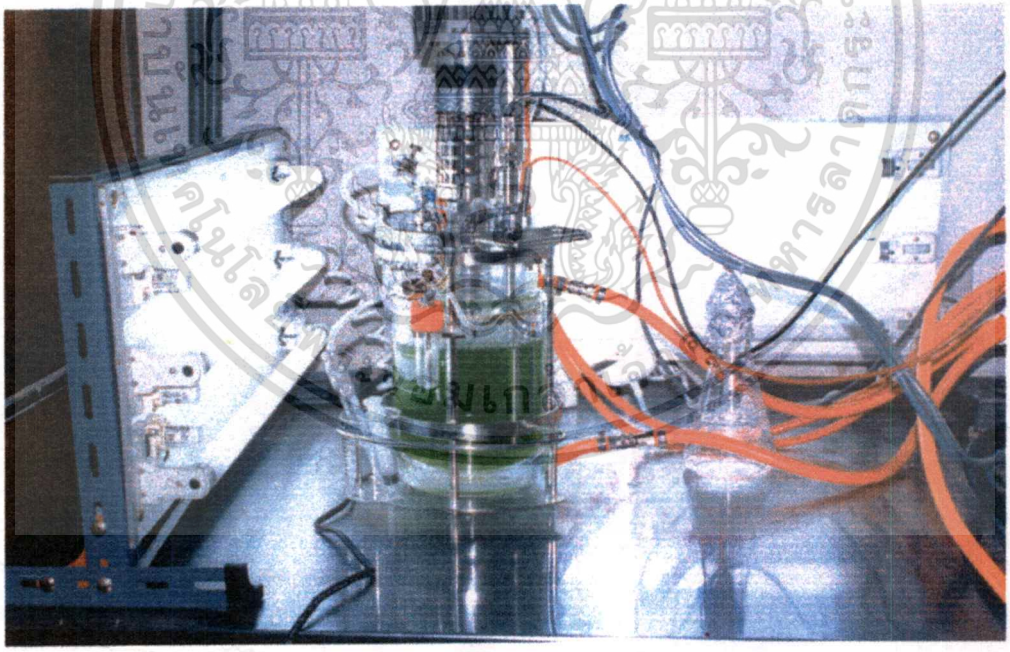
**3.3.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร**

การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารโบลด์ดัดแปลง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.3.2.6 โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้งๆ ละ 10 รอบ เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักขนาด 2 ลิตร (รูปที่ 3.3) ที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิโดยใช้น้ำหล่อเย็นบริเวณรอบๆถัง (jacket) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของถังหมัก 13 เซนติเมตร มีระบบการกวนโดยใช้ใบพัดแบบ 6-blade disc จำนวน 2 อันซึ่งมีระยะห่างกัน 10.5 เซนติเมตร โดยใบพัดอันล่างสุดอยู่สูงจากฐานภายในถังหมัก 4 เซนติเมตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม (จากการทดลองในข้อ 3.3.2.5) ปริมาตร 1.6 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากอาหารเย็นแล้วจึงเติมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยมีค่าความขุ่นของหัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นที่ 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.03 อัตราการให้อากาศ 0.8 วีวีเอ็ม อัตราเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที ที่ระดับความเข้มแสงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2.6 โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน จำนวน 40 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณแอสตาแซนทิน จำนวน 3 ซ้ำ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และร้อยละของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารที่ใช้เลี้ยง

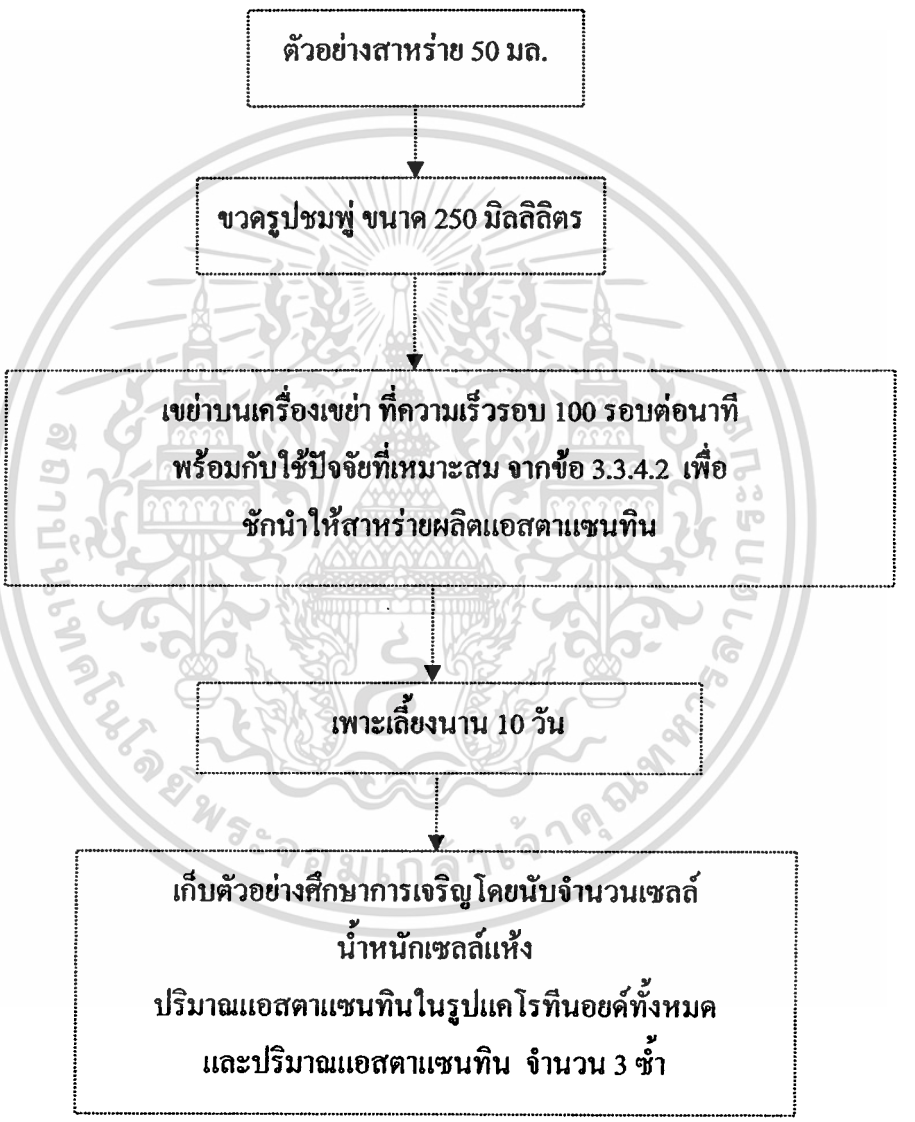


**รูปที่ 3.3** ลักษณะของถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.5.2 การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย (culture age) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ปัจจัยที่เหมาะสมกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทิน**

เพาะเลี้ยงสาหร่าย ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.3.5.1 แล้วทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย ปริมาตร 50 มล. ในช่วงปลายระยะ log phase เป็นวันแรก และเก็บตัวอย่างต่อไปอีก 2 4 และ 6 วัน ตามลำดับ ตัวอย่างที่เก็บแต่ละวันจะนำไปกระตุ้นโดยใช้ปัจจัยที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 3.3.4.2 ตามแผนผังต่อไปนี้




**3.3.5.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน**

โดยขั้นตอนแรกเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สภาวะเดียวกันกับข้อ 3.3.5.2 จนกระทั่งสาหร่ายมีช่วงอายุการเจริญที่เหมาะสม ขั้นตอนที่ 2 ใช้ปัจจัยที่เหมาะสมตามผลการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองที่ได้จากข้อ 3.3.4 ชักนำให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน เก็บสาหร่ายทุก 2 วัน (จนกระทั่งสาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีแดงจนเต็มเซลล์) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณแอสตาแซนทิน จำนวน 3 ซ้ำ การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างและร้อยละของออกซิเจนที่ละลายในอาหารที่ใช้เลี้ยง

**3.3.6 การวัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย**

3.3.6.1 การนับจำนวนเซลล์สาหร่ายโดยใช้สไลด์สำหรับสาหร่าย (Haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20X คำนวณหาจำนวนเซลล์ตามสมการของ Janet (1973)

3.3.6.2 การวัดค่าความขุ่น โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

3.3.6.3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการกรองเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงผ่านกระดาษกรอง GF/C ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องกรองสุญญากาศแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Harker และคณะ, 1996a)

**3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมด** โดยดัดแปลงวิธีของ Boussiba และ Vonsak (1992) ดังนี้

3.3.7.1 นำเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติฟิวก์ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วรินส่วนใสทิ้ง

3.3.7.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 (w/v) ที่ละลายในเมทานอลร้อยละ 30 (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีเพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเซลล์ และนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินส่วนสีเขียวของคลอโรฟิลล์ทิ้ง

3.3.7.3 เติมกรดแอซีติกเข้มข้นจำนวน 5 หยด ลงในตะกอนในข้อ 3.3.7.2 ใส่ Glass bead แล้วนำไปปั่นให้เซลล์แตก นาน 30 วินาที

3.3.7.4 เติมอะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 90 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วแช่นาน 24 ชั่วโมง (หากสกัดไม่หมดจะทำการสกัดซ้ำและนำสารสกัดที่ได้ไปเทรวมกันในขวดปรับปริมาตร) แล้วนำส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ดังสมการ

$$\text{ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{OD_{480} \times \text{ปริมาตรอะซิโตนที่ใช้สกัด(ml)}}{0.2204 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (ml)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทิน (*trans*-astaxanthin) ในสารละลายแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC** ตามวิธีของ Yuan และ Chen (1998)

3.3.8.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC

คอลัมน์ที่ใช้ HiQ sil C18V (5 μm) ขนาด 4.6 x 250 mm.

สภาวะการทำงานของเครื่อง

อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ความยาวคลื่นที่ใช้วัด 480 นาโนเมตร

ตัวทำลายเคลื่อนที่ (mobile phase)

สารละลาย A (ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : อะซิโตไนไตรล์ : น้ำ, 5.0 : 85.0 : 5.5 : 4.5,v/v)

สารละลาย B (ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : อะซิโตไนไตรล์ : น้ำ, 5.0 : 85.0 : 5.5: 4.5,v/v)

โดยใช้วิธีการทำ gradient ดังนี้

ใช้สารละลาย A นาน 10 นาที แล้วเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย B จาก 0 ไปเป็น 100 %ในเวลา 6 นาที และใช้ตัวทำละลาย B 14 นาที

3.3.8.2 การเตรียมตัวอย่างสาหร่าย

นำเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติฟิวก์ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รินส่วนใสทิ้ง นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.8.3 การเตรียมสารสกัดในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

นำสาหร่ายในข้อ 3.3.8.2 มาสกัดตามวิธีการข้อ 3.3.7 นำไปวิเคราะห์ตามวิธี 3.3.8.1

**3.3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ**

นำข้อมูลของจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ และแอสตาแซนทิน ในแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC version 9.0 ในการวิเคราะห์ F-test และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Least sinificant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($LSD_{0.05}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

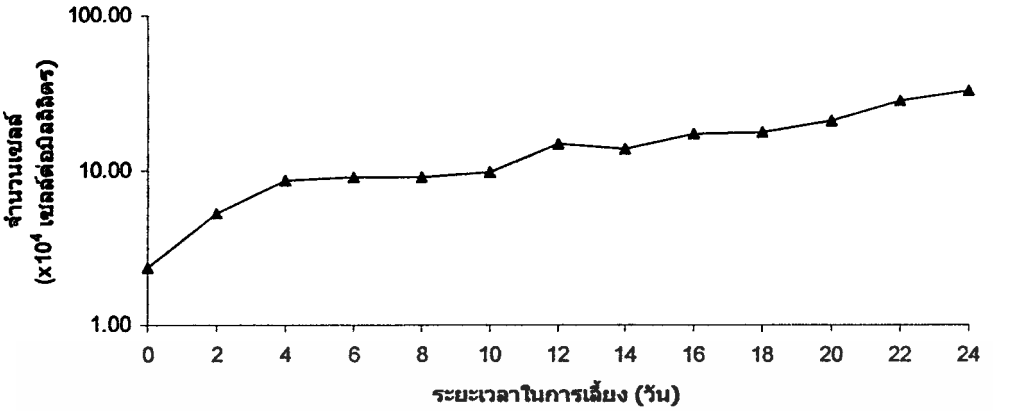
# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 4.1 ผลของการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

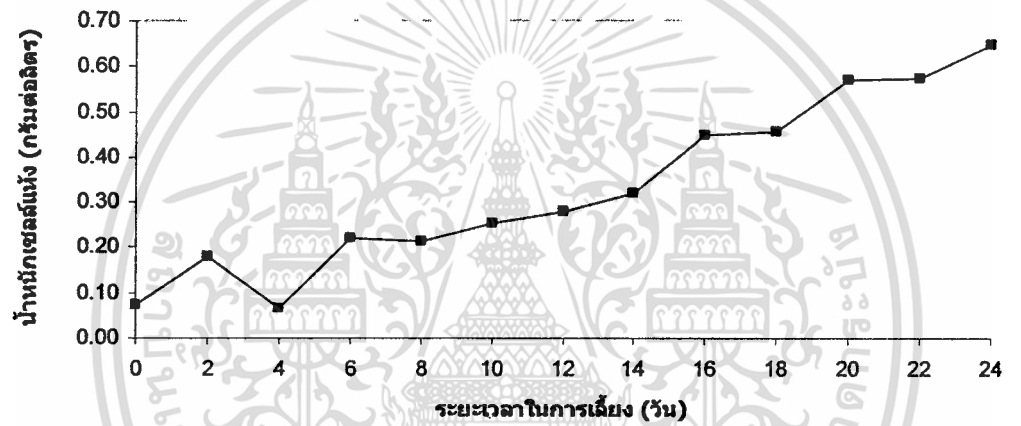
จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Heamatococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์เปรียบเทียบกับอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีการเขย่าวันละ 2 ครั้งๆ ละ 10 รอบ ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้หัวเชื้อสาหร่ายซิสต์สีแดง (red cyst cell) หรือสร้างแอสตาแซนทินเต็มเซลล์ เพื่อศึกษาหาอายุการเจริญหรือระยะการเจริญของสาหร่ายที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเชื้อตั้งต้น เพื่อใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ และการเจริญของสาหร่าย (growth curve) จนกระทั่งผลิตแอสตาแซนทิน

จากการทดลองเมื่อนำซิสต์สีแดงของสาหร่ายลงไปเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ พบว่าสาหร่ายเปลี่ยนจากซิสต์สีแดงเป็นเซลล์ปกติสีเขียวจนหมดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.1 ก. และ ข., ตารางที่ 4.1) พบว่าสาหร่ายที่เจริญอยู่ในระยะซิสต์จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าในระยะเซลล์ปกติเนื่องจาก สาหร่ายที่เจริญในวันที่ 4 มีจำนวนเซลล์ที่สูงกว่าในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง แต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่า แสดงว่าสาหร่ายที่เจริญในวันที่ 4 มีขนาดเล็กกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lee และ Ding (1994) ที่นำ akinetes (ซิสต์สีแดง) ไปเลี้ยงในอาหารใหม่พร้อมกับเพิ่มความเข้มแสงในการเลี้ยงมากขึ้น พบว่าจะมีการปล่อย zoospore (เซลล์ปกติ) หรือมีการงอกของ zoospore ออกจากเซลล์ akinetes ในชั่วโมงที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง โดยเซลล์ที่ได้มีขนาดเล็กลง และหลังจากวันที่ 6 จนถึงวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีการเจริญโดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $9.00 \times 10^4$ เป็น $17 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งจาก 0.22 เป็น 0.45 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์จาก 1.55 เป็น 2.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 ค, ตารางที่ 4.1) โดยแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ระยะนี้มีสีเหลืองไม่ใช่สีส้มแดงของแอสตาแซนทิน หรือเป็นแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตขึ้นในระยะที่เหมาะสมต่อการเจริญจึงไม่ใช่แอสตาแซนทิน และหลังจากวันที่ 16 จนถึงวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าสาหร่ายยังคงมีการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $17.00 \times 10^4$ เป็น $32.67 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 0.45 เป็น 0.65 กรัมต่อลิตร สังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นจาก 2.02 เป็น 6.11 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์สีเขียวเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมน้ำตาล และแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีสีส้มจางๆ แสดงว่าแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ระยะนี้คือแอสตาแซนทิน ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตขึ้นเนื่องจากเริ่มมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญหรือเริ่มขาดสารอาหาร

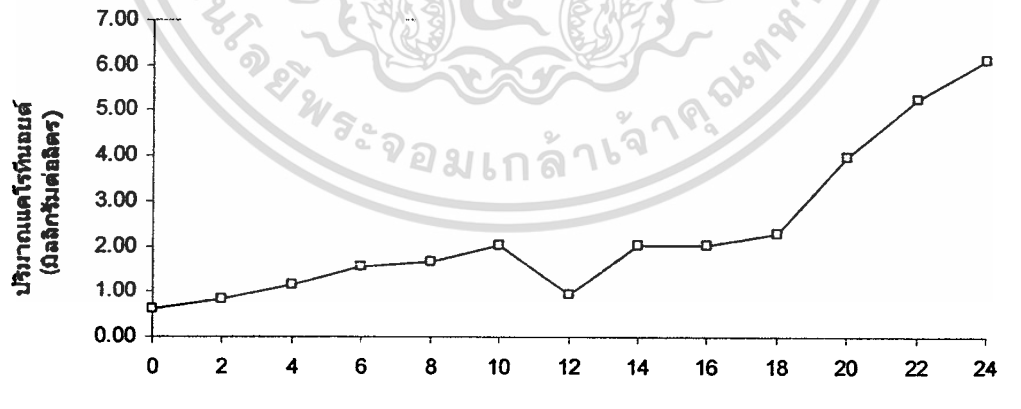
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ก.




ข.




ค.

**รูปที่ 4.1** แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** ผลของการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0 | 2.33±0.33 | 0.07±0.03 | 0.61±0.01 |
| 2 | 5.33±0.88 | 0.18±0.03 | 0.83±0.06 |
| 4 | 8.67±0.33 | 0.07±0.01 | 1.16±0.05 |
| 6 | 9.00±0.88 | 0.22±0.01 | 1.55±0.09 |
| 8 | 9.00±0.33 | 0.21±0.02 | 1.65±0.04 |
| 10 | 9.67±0.88 | 0.25±0.02 | 2.02±0.04 |
| 12 | 14.67±0.67 | 0.28±0.03 | 0.95±0.05 |
| 14 | 13.67±1.76 | 0.32±0.03 | 2.04±0.09 |
| 16 | 17.00±2.65 | 0.45±0.01 | 2.02±0.19 |
| 18 | 17.67±2.33 | 0.45±0.04 | 2.26±0.29 |
| 20 | 20.67±1.45 | 0.56±0.05 | 3.97±0.25 |
| 22 | 27.67±1.76 | 0.57±0.06 | 5.23±0.23 |
| 24 | 32.67±0.33 | 0.65±0.03 | 6.11±0.28 |

นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงมีการลดลงของปริมาณแคโรทีนอยด์เป็น 0.95 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากพบว่าเซลล์ในระยะนี้มีสีซีดลงก่อนที่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสีของเซลล์สาหร่ายไปเป็นสีเขียวอมน้ำตาลในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการทดลองของ Kobayashi และคณะ (1991) ที่พบว่าการที่เซลล์ซีดจางลง (colorless cells) เป็นระยะที่สาหร่ายอยู่ในระยะพักตัว ก่อนมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์สาหร่าย (physiological changes) ไปเป็นซิสต์

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อนำสาหร่ายระยะซิสต์สีแดงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์สาหร่ายจะเปลี่ยนจากซิสต์สีแดงเป็นเซลล์ปกติสีเขียวจนเต็มเซลล์โดยใช้ระยะเวลา 6 วัน และสาหร่ายจะเริ่มผลิตแอสตาแซนทินอีกครั้งในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากสาหร่ายเริ่มเปลี่ยนจากเซลล์สีเขียวเป็นสีเขียวอมน้ำตาลและเซลล์สีแดงในที่สุดซึ่งอาจเป็นผลมาจากการขาดสารอาหาร โดยตลอดการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรโบลด์สาหร่ายมีการเจริญโดยมีจำนวนเซลล์สูงสุด $32.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.65 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ (มีสีส้มแดงของแอสตาแซนทิน) 6.11 มิลลิกรัมต่อลิตร

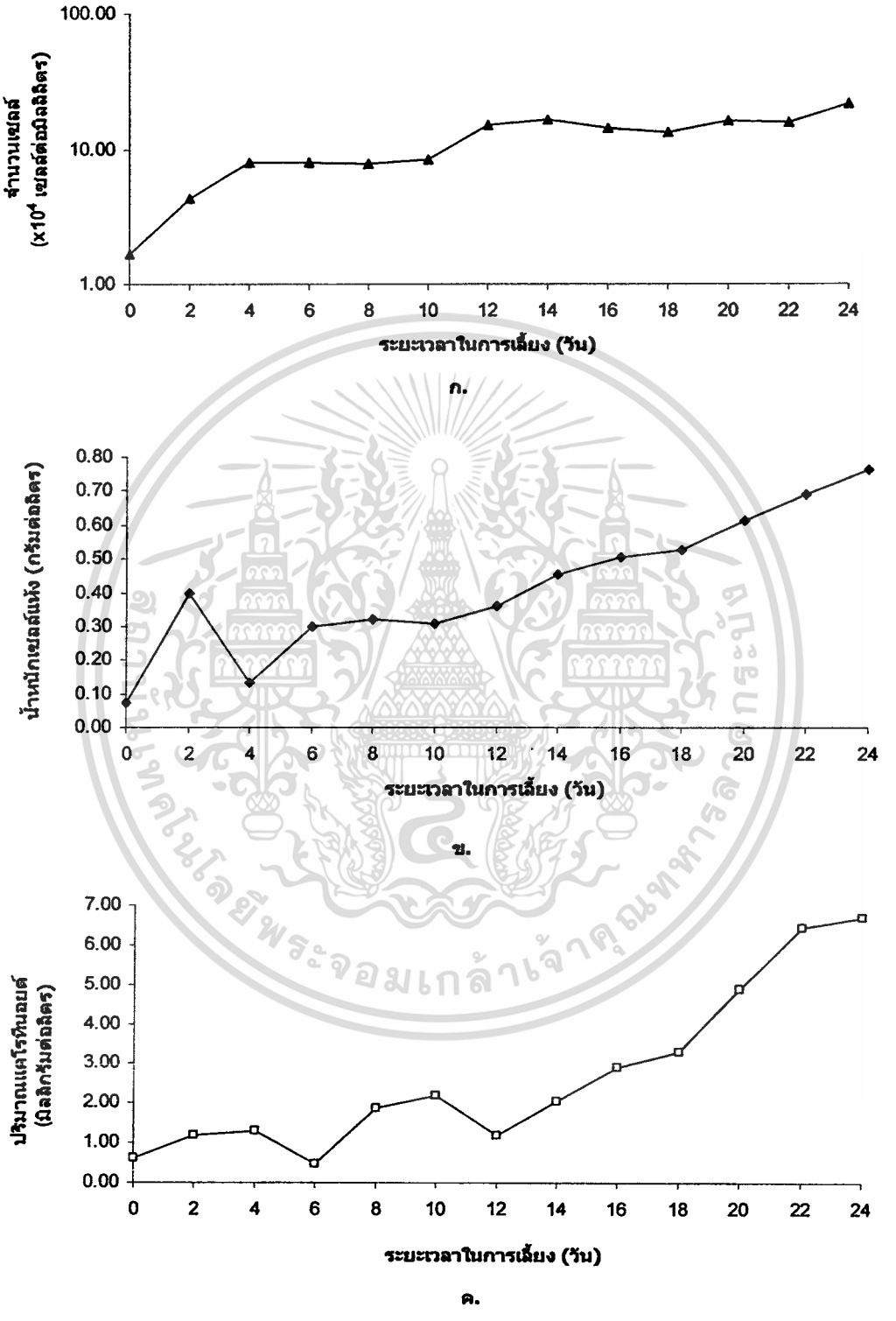
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากการทดลองนำซิสต์สีแดงของสาหร่ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง พบว่าสาหร่ายเปลี่ยนจากซิสต์สีแดงเป็นเซลล์ปกติสีเขียวทั้งหมดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.2 ก. และ ข., ตารางที่ 4.2) พบว่าสาหร่ายที่เจริญอยู่ในระยะซิสต์จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าในระยะเซลล์ปกติ เนื่องจากสาหร่ายที่เจริญในวันที่ 4 มีจำนวนเซลล์ที่สูงกว่าในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงแต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ต่ำกว่า และตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายมีการเจริญโดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจาก $8.00x10^4$ เป็น $14.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง จาก 0.30 เป็น 0.51 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์จาก 0.45 เป็น 2.91 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2 ค, ตารางที่ 4.2) โดยแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ระยะนี้มีสีเหลืองไม่ใช่สีส้มแดงของแอสตาแซนทิน หรือเป็นแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตขึ้นในระยะที่เหมาะสมต่อการเจริญจึงไม่ใช่แอสตาแซนทิน และหลังจากวันที่ 16 จนถึงวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าสาหร่ายเจริญอยู่ในระยะการเจริญแบบคงที่ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 0.51 เป็น 0.76 กรัมต่อลิตร และมีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นจาก 2.91 เป็น 6.67 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมกับเปลี่ยนจากเซลล์สีเขียวเป็นสีเขียวอมน้ำตาลแดง และแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้มีสีส้มแดง แสดงว่าแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ระยะนี้คือแอสตาแซนทิน ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตขึ้นเนื่องจากเริ่มมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญหรือเริ่มขาดสารอาหาร

นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงมีการลดลงของปริมาณแคโรทีนอยด์เป็น 1.18 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากพบว่าเซลล์ในระยะนี้มีสีซีดลงก่อนที่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสีของเซลล์สาหร่ายไปเป็นสีเขียวอมน้ำตาลในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการทดลองของ Kobayashi และคณะ (1991) ที่พบว่าการที่เซลล์ซีดจางลง (colorless cells) เป็นระยะที่สาหร่ายอยู่ในระยะพักตัว ก่อนมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์สาหร่าย (physiological changes) ไปเป็นซิสต์

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เมื่อนำสาหร่ายระยะซิสต์สีแดงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง สาหร่ายจะเปลี่ยนจากซิสต์สีแดงเป็นเซลล์ปกติสีเขียวจนเต็มเซลล์โดยใช้ระยะเวลา 6 วัน และสาหร่ายจะเริ่มผลิตแอสตาแซนทินอีกครั้งในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากสาหร่ายเริ่มเปลี่ยนจากเซลล์สีเขียวเป็นสีเขียวอมน้ำตาลและเซลล์สีแดงในที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการขาดสารอาหาร โดยตลอดการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงสาหร่ายมีการเจริญโดยมีจำนวนเซลล์สูงสุด $21.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.76 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ (มีสีส้มแดงของแอสตาแซนทิน) 6.67 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.2** แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

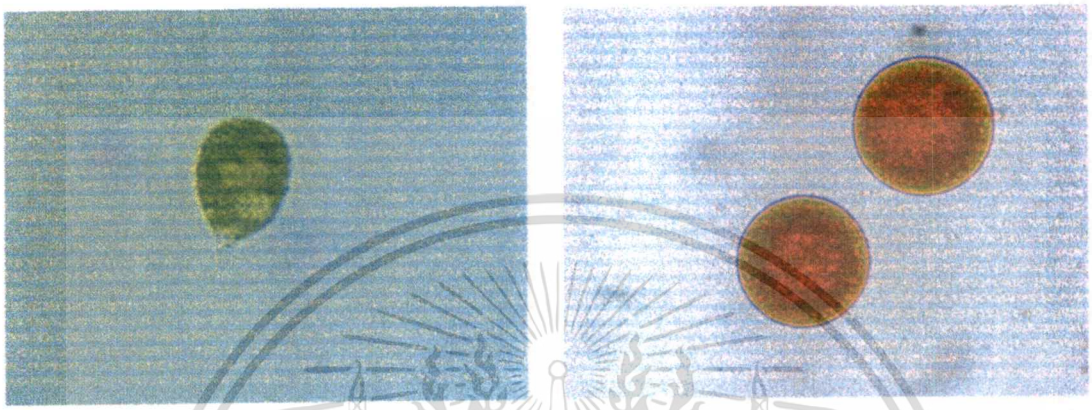
**ตารางที่ 4.2** ผลของการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0 | 2.33±0.33 | 0.07±0.03 | 0.61±0.01 |
| 2 | 4.33±0.88 | 0.40±0.16 | 1.17±0.20 |
| 4 | 8.00±0.00 | 0.13±0.02 | 1.28±0.05 |
| 6 | 8.00±0.00 | 0.30±0.02 | 0.45±0.05 |
| 8 | 7.67±0.33 | 0.32±0.02 | 1.87±0.02 |
| 10 | 8.33±0.33 | 0.31±0.06 | 2.20±0.15 |
| 12 | 15.00±0.00 | 0.36±0.00 | 1.18±0.13 |
| 14 | 16.33±1.45 | 0.45±0.05 | 2.06±0.20 |
| 16 | 14.33±0.33 | 0.51±0.03 | 2.91±0.49 |
| 18 | 13.33±0.88 | 0.53±0.05 | 3.31±0.32 |
| 20 | 16.00±2.52 | 0.61±0.04 | 4.88±0.44 |
| 22 | 15.67±0.88 | 0.69±0.02 | 6.41±0.38 |
| 24 | 21.33±2.33 | 0.76±0.11 | 6.67±0.52 |

และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.ในอาหารสูตรโบลด์ และสูตรโบลด์ดัดแปลง จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน พบว่าสาหร่ายที่เจริญอาหารสูตรโบลด์มีจำนวนเซลล์มากกว่าอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง ในขณะที่สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง มีน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่มากกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญคือให้การเจริญของจำนวนเซลล์ที่สูงจะไม่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย ซึ่งสอดคล้องกับ Fan และคณะ (1994) ที่อธิบายว่า สภาวะการเจริญของสาหร่ายจะมีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่ออัตราการเจริญ (growth rate) วงชีวิต (cell cycle) และการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *H. pluvialis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้สาหร่ายที่เจริญในอาหารทั้งสองสูตร มีช่วงระยะเวลาการเจริญไม่แตกต่างกัน โดยหากต้องการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจนกระทั่งผลิตแอสตาแซนทินจนเต็มเซลล์อีกครั้ง ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่า 24 วัน รูปร่าง ลักษณะของเซลล์ปกติ และซิสต์ระยะสร้างแอสตา-แซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ดังแสดงในรูปที่ 4.3



ก. ข.

**รูปที่ 4.3** ลักษณะของเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ใช้ในการทดลอง (กำลังขยาย 40X)
ก. เซลล์ปกติ
ข. ซิสต์ระยะที่มีการสร้างแอสตาแซนทิน

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ สอดคล้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในวงชีวิตของสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus* sp. ของ Kobayashi และคณะ (1997a) ที่นำซิสต์ระยะเจริญเต็มวัย (mature cysts cell) หรือระยะซิสต์สีแดง ไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่จะมีการปลดปล่อยเซลล์ลูกที่อยู่ภายในซิสต์ที่เจริญเต็มวัย (intracellular daughter cells) ออกไปยังอาหารนั้น จากนั้นเซลล์ก็จะเจริญเป็นเซลล์ปกติพร้อมที่จะสืบพันธุ์ต่อไป ตลอดวงชีวิตของสาหร่าย พบว่าเซลล์ปกติจะมีระดับของคลอโรฟิลล์และโปรตีนสูงแต่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่ำ ในขณะที่ระยะการเจริญเป็นซิสต์เริ่มแรก (encystment) เซลล์จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์และโปรตีนลดลง ระยะการเจริญจากซิสต์ไปเป็นซิสต์เต็มวัย (maturation) จะเป็นระยะที่เซลล์มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นแต่ปริมาณโปรตีนจะลดลงอย่างรวดเร็ว และระยะที่มีการงอกของเซลล์ (germination) จะเป็นระยะที่เซลล์สังเคราะห์คลอโรฟิลล์พร้อมกับการสังเคราะห์โปรตีน แต่กลับมีการลดลงของปริมาณแคโรที-นอยด์ ซึ่งสาหร่ายในระยะซิสต์เริ่มแรก (encystment) ระยะซิสต์เต็มวัย (maturation) และระยะการงอกของเซลล์ (germination) สามารถสังเกตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ จากการทดลองยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง เมื่อเจริญอยู่ในระยะที่มีการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) สาหร่ายมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น แสดงว่าเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fan และคณะ (1994) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารสูตร BG-11 ด้วยคอลัมน์แก้วและเติมอากาศที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ประกอบอยู่ร้อยละ 1.5 ที่ระดับความเข้มแสง 130 μmol quanta·$m^{-2}$·$s^{-1}$ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสาหร่ายอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ $0.054^{h-1}$ และที่อุณหภูมิสูงสาหร่ายไม่มีการแบ่งเซลล์ (cell division) แต่กลับมีเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ (cell diameter) เพิ่มขึ้น จาก 5 เป็น 20 ไมโครเมตร

และจากการศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารทั้งสองสูตรสอดคล้องกับผลการศึกษาวงชีวิตของสาหร่าย *H. lacustris* subsp. *siamensis* ของสุดสายชล (2541) ที่พบว่า เมื่อนำเซลล์อะพลาโนสปอร์ระยะสร้างแอสตาแซนทิน (ซิสต์สีแดง) ไปเลี้ยงในอาหารสูตร MCM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 141 μmol. $m^{-2}$.$s^{-1}$ (8000 ลักซ์) โดยมีช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 2-3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรอากาศเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอะพลาโนสปอร์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและจะมีการพัฒนารูปร่างโดยมีการแบ่งโปรโตพลาสซึมออกเป็น 4 และ 8 zoospore ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่ง zoospore นี้จะอยู่ในผนังหุ้มเดียวกัน (pamella stage) หลังจากนั้นผนังหุ้มจะแตกออกแล้วปล่อย zoospore ออกมา และจะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ปกติในวันที่ 4-5 ของการเพาะเลี้ยง และหลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลง 2 แบบ คือ เซลล์ปกติจะมีการสลัดแฟลกเจลลาทิ้งแล้วเปลี่ยนเป็นอะพลาโนสปอร์ หรือเกิดการรวมตัวกันของเซลล์ปกติ 2 หรือ 4 เซลล์ ได้เป็นอะพลาโนสปอร์เช่นกัน หลังจากนั้นอะพลาโนสปอร์จะมีการแบ่งโปรโตพลาสซึมออกเป็น 8 16 และ 32 อะพลาโนสปอร์อยู่ภายในผนังหุ้มเดียวกัน และจะหลุดออกจากผนังหุ้มได้เป็นอะพลาโนสปอร์สีเขียว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนกระทั่งปริมาณไนโตรเจนและฟอสเฟตหมดอะพลาโนสปอร์จะเริ่มสร้างแอสตาแซนทินขึ้นซึ่งสังเกตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยจะมีจุดแดงเล็กๆ เกิดขึ้นบริเวณกลางเซลล์และมีการขยายขนาดของจุดแดงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาจนเต็มเซลล์ประมาณวันที่ 10-11 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

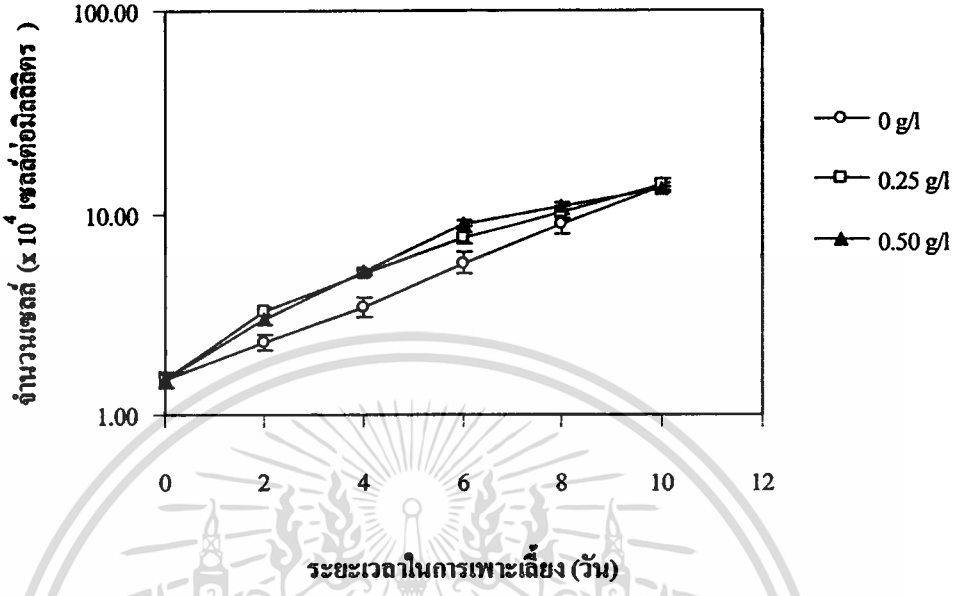
## 4.2 ผลของการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

### 4.2.1 ผลของโซเดียมอะซิเตต

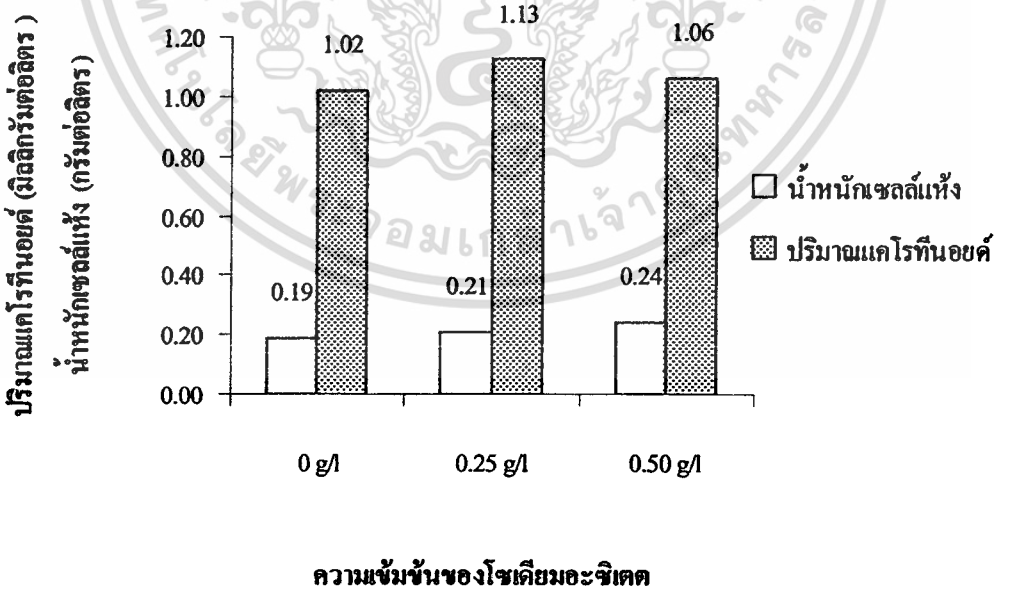
เมื่อทดลองเติมโซเดียมอะซิเตตลงไปในอาหารสูตรโบลด์ที่ความเข้มข้น 0 0.25 และ 0.50 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายมีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิต ($P>0.05$) (รูปที่ 4.4, 4.5) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงไม่มีการเติมโซเดียมอะซิเตตลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยอาหารสูตรโบลด์ที่ไม่เติมโซเดียมอะซิเตตมีการเจริญของเซลล์ $13.51x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.19 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.02 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรโบลด์ที่เติมโซเดียมอะซิเตต 0.25 กรัมต่อลิตร มีการเจริญของเซลล์ $14.00x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.21 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.13 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรโบลด์ที่เติมอะซิเตต 0.50 กรัมต่อลิตร มีการเจริญของเซลล์ $13.16x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.24 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.06 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้จากกราฟการเจริญของสาหร่าย (รูปที่ 4.4) พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่เติมโซเดียมอะซิเตต 0.25 และ 0.50 กรัมต่อลิตร จะช่วยให้สาหร่ายมีการเจริญที่สูงกว่าอาหารสูตรโบลด์ที่ไม่เติมโซเดียมอะซิเตต ในช่วงระยะเวลา 6 วันแรกของการเพาะเลี้ยง โดยมีจำนวนเซลล์ในอาหารสูตรโบลด์เท่ากับ $5.69x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในสูตรโบลด์เติมโซเดียมอะซิเตต 0.25 กรัมต่อลิตร เท่ากับ $7.58x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และในสูตรโบลด์ที่เติมโซเดียมอะซิเตต 0.50 กรัมต่อลิตรเท่ากับ $7.58x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Eduard และคณะ (1993) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่ไม่เติมอากาศ พบว่าการเติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำจะทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญจำเพาะที่สูงขึ้น และนอกจากนี้ Borowitzka และคณะ (1991) พบว่าการเติมโซเดียมอะซิเตตจะช่วยส่งเสริมอัตราการเจริญของเซลล์ และผลผลิตของเซลล์ พร้อมกับช่วยกระตุ้นการสร้างแอสตาแซนทินในเซลล์อะพลาโนสปอร์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในขณะที่การทดลองของ Domínguez-Bocanegra และคณะ (2004) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีการเติมอากาศ ด้วยอาหารสูตรโบลด์ที่ไม่มีการเติมโซเดียมอะซิเตตให้การเจริญของเซลล์สูงสุด ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมอากาศด้วยอาหารสูตร BAR ที่มีโซเดียมอะซิเตตจะทำให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.4** การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่เติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้นต่างกัน




**รูปที่ 4.5** ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่เติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

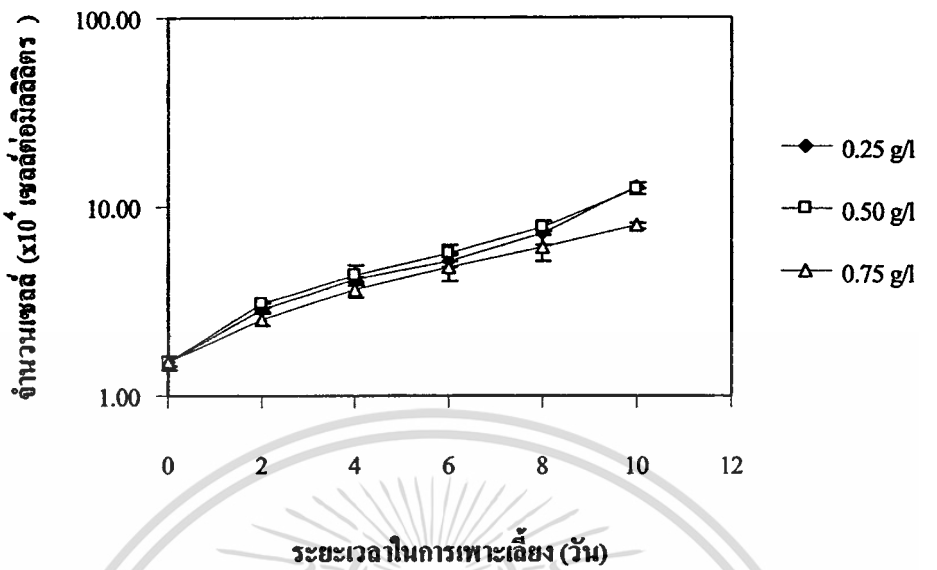
**4.2.2 ผลของโซเดียมไนเตรท**

จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ ที่ปรับความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเป็น 0.25 0.50 และ 0.75 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0.25 และ 0.50 กรัมต่อลิตร แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0.25 มีจำนวนเซลล์ $12.84x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.19 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0.50 กรัม มีจำนวนเซลล์ $12.44x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 และ 4.7)

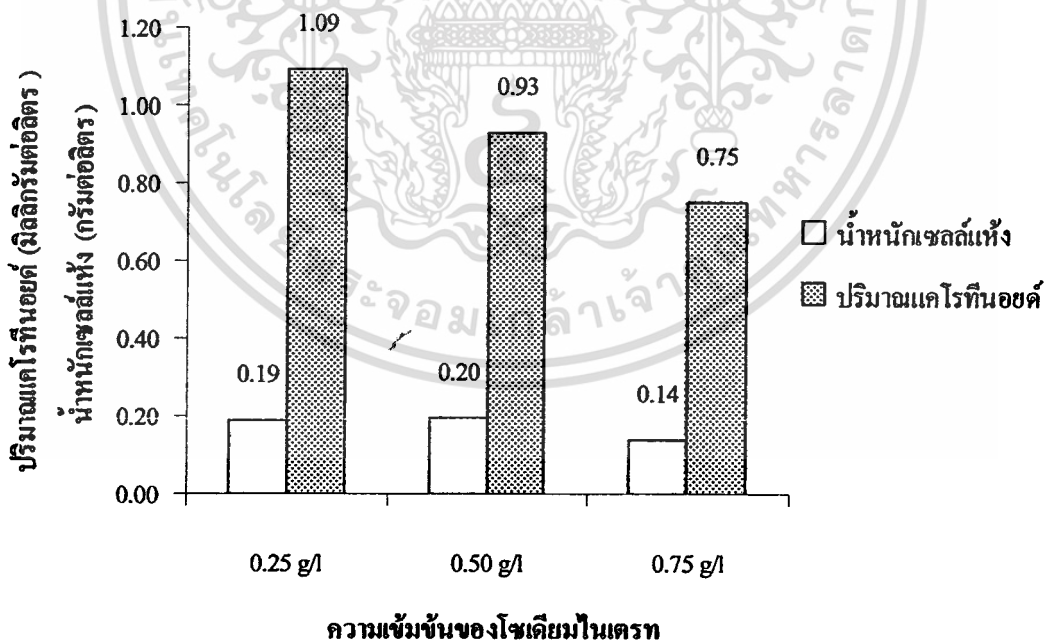
นอกจากนี้จากการปรับความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทในสูตรอาหารเป็น 0.75 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายโดยทำให้การเจริญลดลง (รูปที่ 4.6 และ 4.7) โดยมีจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ ต่ำสุดที่ $7.98 x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร 0.14 กรัมต่อลิตร และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ซึ่งผลการทดลองที่ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Harker และคณะ (1995) ที่พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 3.0 mM (0.25 กรัมต่อลิตร) จะมีการเจริญสูงสุด ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า คือที่ 0 0.75 และ 1.50 mM (0 0.06 และ 0.13 กรัมต่อลิตร) การเจริญของสาหร่ายถูกจำกัดแต่สามารถผลิตแอสตาแซนทินในระดับสูงในเซลล์ที่รอดชีวิตโดยจะให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมากกว่า 300 พิโคกรัมต่อเซลล์ (ซึ่งมีปริมาณแอสตาแซนทินมากกว่าร้อยละ 95) ในเวลา 30 วัน และแตกต่างจาก Borowitzka และคณะ (1991) ที่พบว่าสาหร่าย *Haematococcus* sp. จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของไนเตรทสูง ๆ ($KNO_3$ 0.5-1.0 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นต่ำจะชักนำให้สาหร่ายเจริญไปเป็นเซลล์สีแดงของอะพลาโนสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.6** แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน




**รูปที่ 4.7** ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

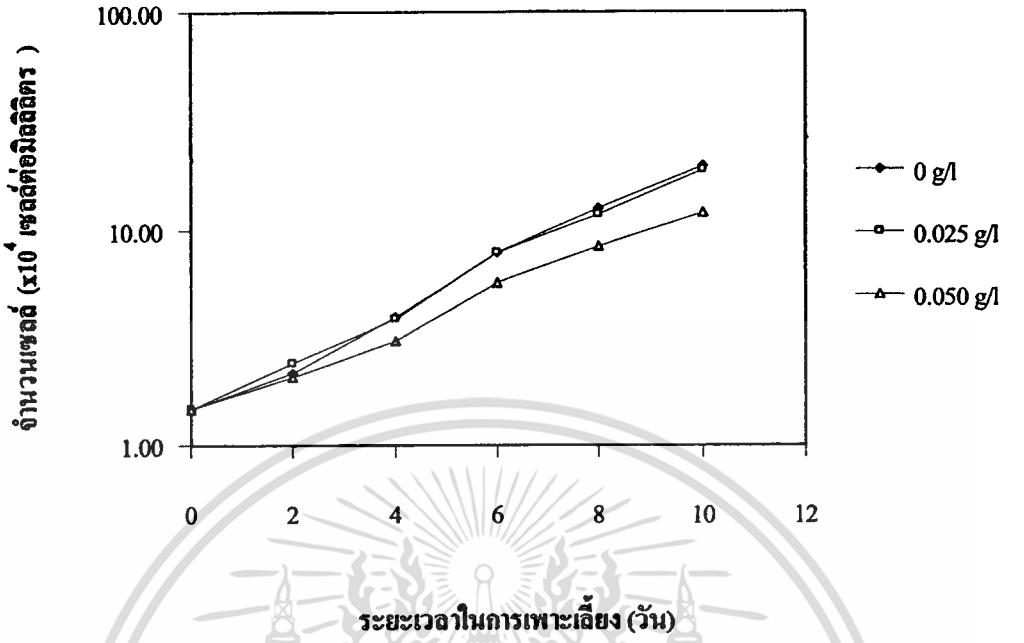
**4.2.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์**

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ ที่ปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0 0.025 และ 0.050 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดในอาหารสูตรโบลด์ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ และอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.025 กรัมต่อลิตร แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยอาหารสูตรโบลด์ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์มีจำนวนเซลล์ $19.53x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.19 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.025 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์ $18.64x10^4$ มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.18 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 และ 4.9) ดังนั้น จึงเลือกที่จะใช้สูตรอาหารโบลด์ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Harker และคณะ (1995) ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 30 วัน จะให้การเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุด ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสูตรอาหารเพิ่มขึ้นเป็น 100 mM (5.85 กรัมต่อลิตร) จะมีผลต่อการตายของเซลล์ แต่ก็สามารถกระตุ้นให้เซลล์ที่รอดชีวิตผลิตแอสตาแซนทินในระดับสูง (500 พิโคกรัมแคโรทีนอยด์ต่อเซลล์)

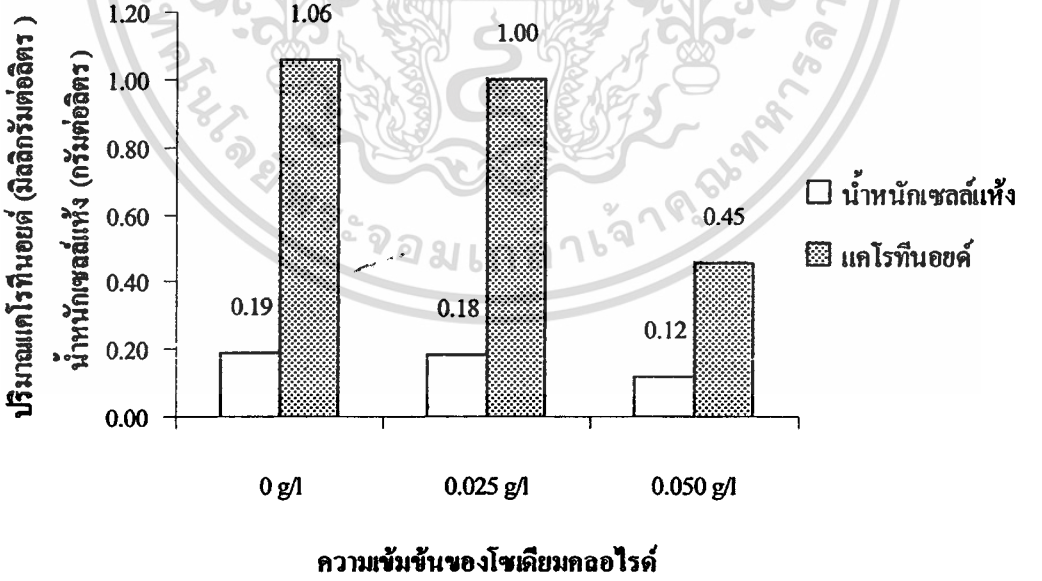
นอกจากนี้เมื่อปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในสูตรอาหารเป็น 0.050 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีการเจริญของเซลล์ต่ำสุด โดยมีจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ $12.04x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร 0.12 กรัมต่อลิตร และ 0.45 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในขณะที่การทดลองของ Sarada และคณะ (2002) ก็พบว่าเซลล์ปกติซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโต จะมีความไว (sensitive) ต่อโซเดียมคลอไรด์ และที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงกว่าร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (1 กรัมต่อลิตร) จะมีผลทำให้เซลล์แตกและผลผลิตชีวมวลระดับต่ำ ในขณะที่เซลล์ในระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) เริ่มต้นเข้าสู่ระยะ encystment จะทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในระดับที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.8** การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน




**รูปที่ 4.9** ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.2.4 ผลของเฟอรัสซัลเฟต**

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ ที่ปรับความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตเป็น 0.005 0.01 และ 0.02 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายมีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต 0.005 และ 0.01 กรัมต่อลิตร แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต 0.005 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์ $18.07x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.24 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตที่ 0.01 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์ $20.87x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.25 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.24 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.10 และ 4.11) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตในสูตรอาหารโบลด์ที่ระดับ 0.005 กรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Harker และคณะ (1995) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารโบลด์ที่มีเฟอรัสไอออนในระดับต่ำจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตแอสตา-แซนทินเพียงเล็กน้อย โดยระดับความเข้มข้นของเฟอรัสไอออนที่จะยับยั้งการเจริญของสาหร่ายคือ 72 μM (0.02 กรัมต่อลิตร) และผลผลิตแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ได้น้อยกว่าวิธีการปรับระดับความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

**4.2.5 ผลของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต**

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ ที่มีการปรับความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.075 0.15 และ 0.30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายเจริญได้จำนวนเซลล์สูงสุด ในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของไดโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.075 และ 0.15 กรัมต่อลิตร แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.075 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์เท่ากับ $27.9x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์ $31.29x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ 0.46 กรัมต่อลิตร และ 2.06 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12 และ 4.13) ดังนั้นจึงเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตในสูตรอาหารเป็น 0.15 กรัมต่อลิตร ในการทดลองขั้นต่อไป

ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Borowitzka และคณะ (1991) ที่พบว่า สาหร่ายจะเจริญได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตปานกลาง คือที่ระดับความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ประมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และแตกต่างกับการทดลองของ สุดชายชล (2541) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร MCM ที่มีระดับของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.02 กรัมต่อลิตร) ให้การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินสูงสุด ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า จะให้การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินได้ต่ำกว่า

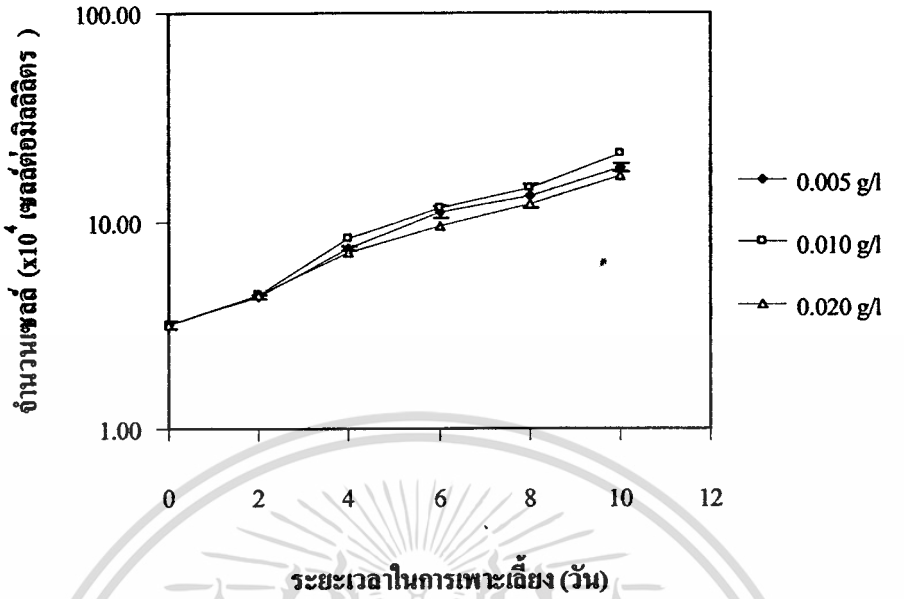
**4.2.6 ผลของความเข้มแสง**

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ ที่ปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็น 0 และ 0.15 กรัมต่อลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 1500 3000 และ 5000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยมีผลผลิตของจำนวนเซลล์ $31.60x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.36 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.14 และ 4.15

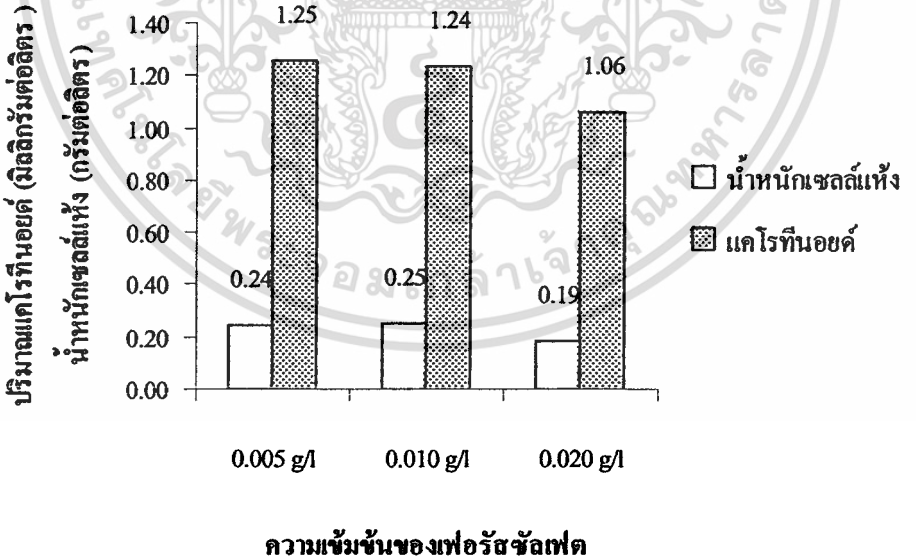
ซึ่งผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากการทดลองของ สุดสายชล (2541) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. lacustris* subsp. *siamensis* ด้วยอาหารสูตร MCM ในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงต่างกันที่ระดับ 3500 ลักซ์ (61 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) 5000 ลักซ์ (88 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) และ 8000 ลักซ์ (141$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) โดยมีช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง มีก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ร้อยละ 2-3 โดยปริมาตรอากาศเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 12 วัน พบว่า สาหร่ายจะมีการเจริญสูงสุดภายใต้ความเข้มแสง 8000 ลักซ์ และแตกต่างกับการทดลองของ Fan และคณะ (1994) ที่พบว่าความเข้มแสงที่ระดับไม่เกิน 90 $\mu mol\ quanta \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *H. pluvialis* ซึ่งผลที่แตกต่างกันนี้อาจจะเป็นผลมาจากความแตกต่างของสูตรอาหารที่ใช้ วิธีการเพาะเลี้ยง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ ช่วงเวลาให้การให้แสง วิธีการวัดระดับความเข้มแสง เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Harker และคณะ (1995) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ เป็นเวลา 30 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 37 $\mu mol\ photon \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$(PAR) จะให้การเจริญของเซลล์สูงสุด แต่ผลิตแอสตาแซนทินได้ในระดับต่ำ ในขณะที่ระดับความเข้มแสง 89 $\mu mol\ photon \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ สาหร่ายจะมีอัตราการตายสูงแต่เซลล์ที่รอดชีวิตก็จะผลิตแอสตาแซนทินภายในเซลล์ปริมาณมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

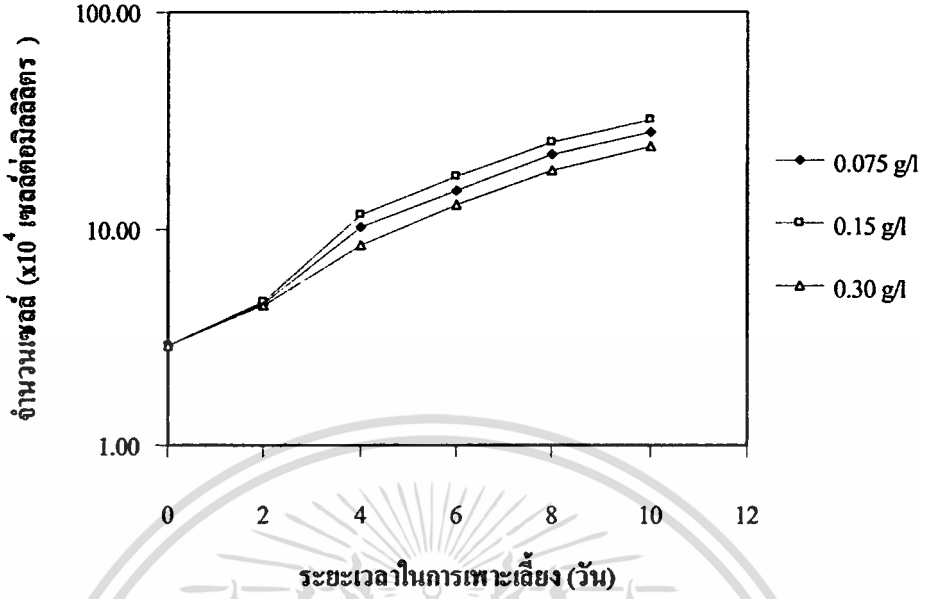



**รูปที่ 4.10** การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตต่างกัน

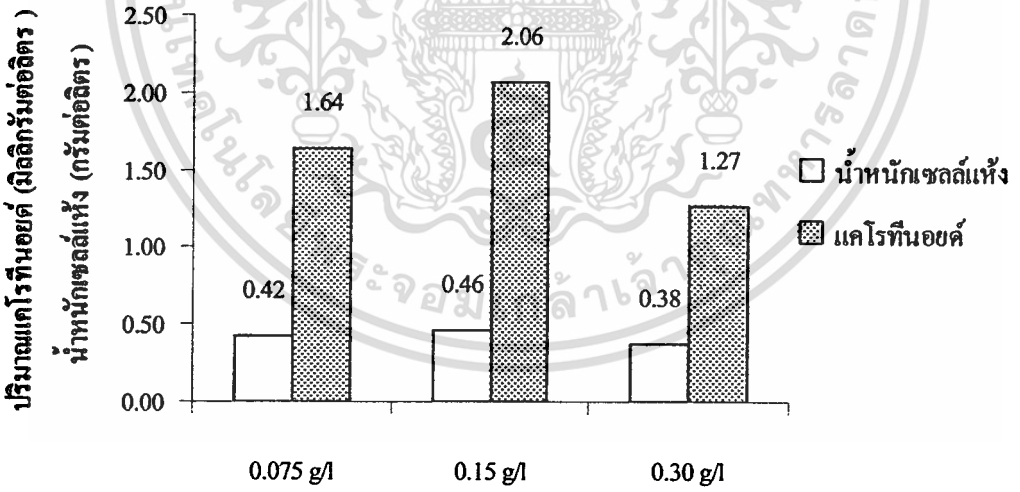



**รูปที่ 4.11** ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

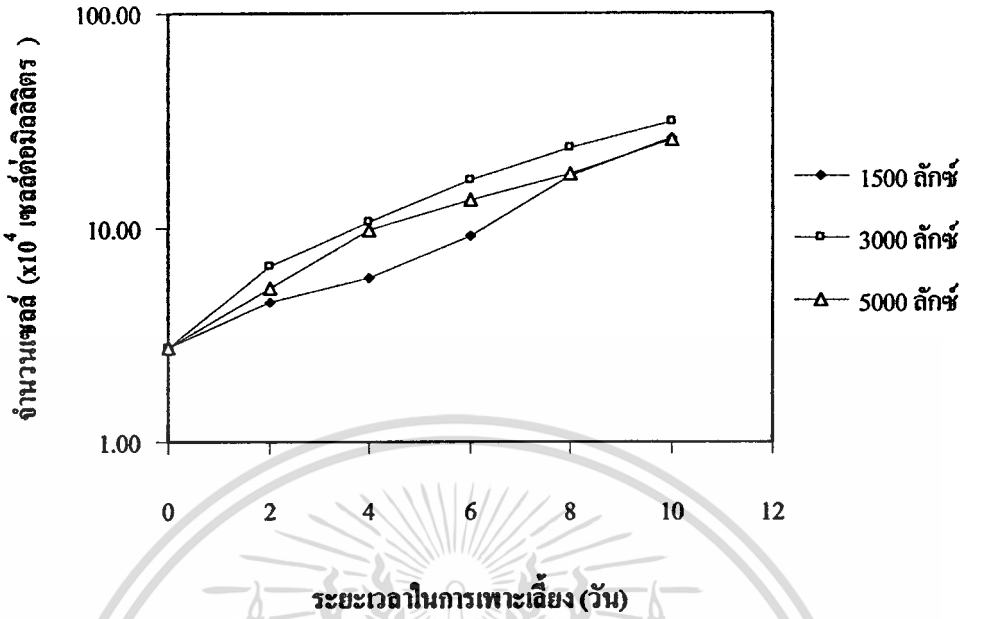



**รูปที่ 4.12** การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่างกัน

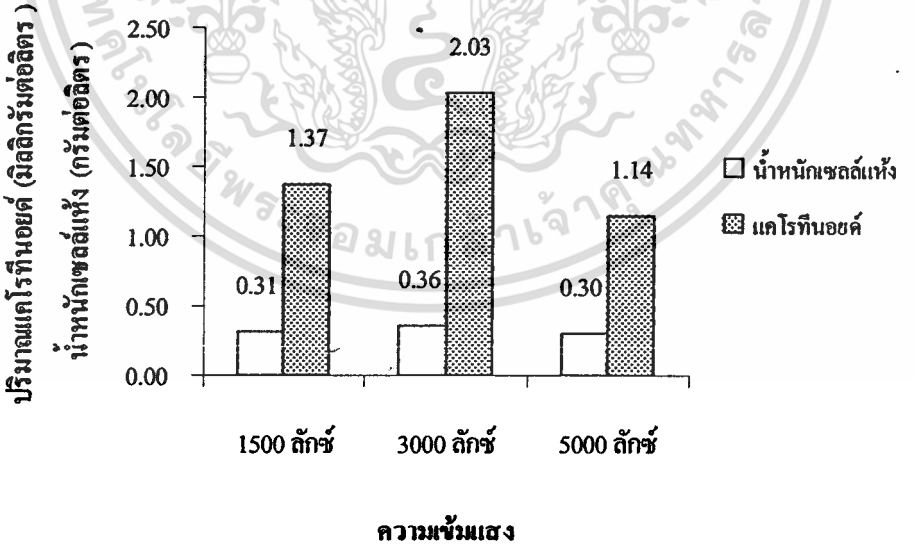



**รูปที่ 4.13** ปริมาณแคโรทีนอยด์และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่มีความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.14** การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ภายใต้ความเข้มแสงต่างกัน




**รูปที่ 4.15** ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ที่ความเข้มแสงต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

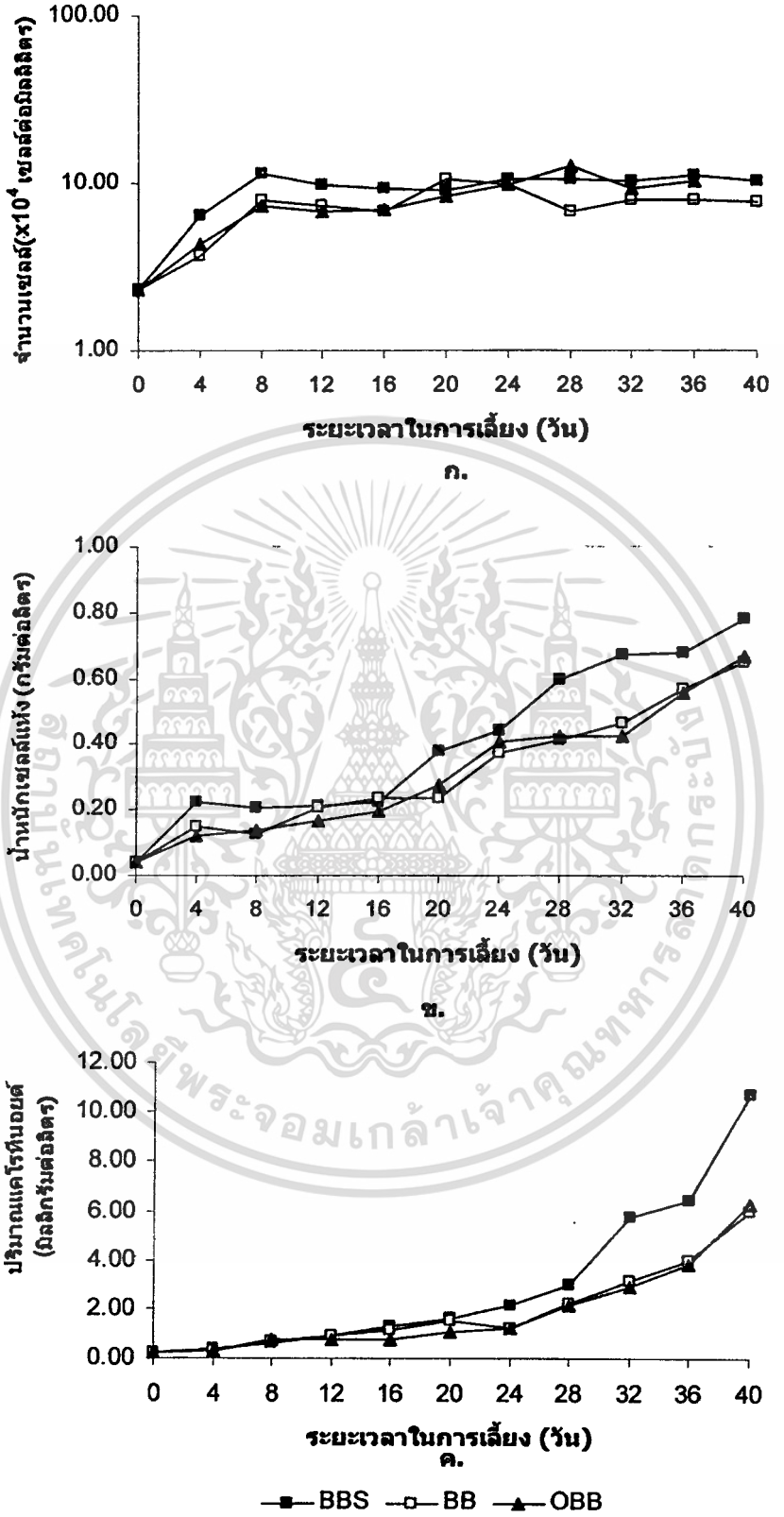
## 4.3 ผลของการศึกษาการเจริญของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเติมและไม่เติมอากาศ

### 4.3.1 การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เติมอากาศ

จากการเพาะเลี้ยงหัวเชื้ออายุ 7 วัน ในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้งๆ ละ 10 รอบ เพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะซิสต์สีแดง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 40 วัน สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง มีการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.78 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 10.69 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม มีการเจริญของเซลล์ ที่ $11.33x10^4$ และ $9.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (รูปที่ 4.16 และ 4.17)

นอกจากนี้ จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารทั้ง 3 สูตร เป็นเวลา 40 วัน (รูปที่ 4.16) พบว่าช่วงระยะเวลา 0-8 วัน ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเจริญอยู่ในระยะที่มีการเจริญ (exponential phase) โดยเซลล์สาหร่ายที่พบในระยะนี้เป็นเซลล์ปกติสีเขียว และมีการเปลี่ยนแปลงของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม คือสาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงมีจำนวนเซลล์สูงสุดที่ $11.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์และสูตรโบลด์ที่เหมาะสมให้การเจริญของเซลล์ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่ $8.00x10^4$ และ $7.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.67 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงมีปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.58 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมมีปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวันที่ 8 ถึงวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายที่เจริญในอาหารทั้ง 3 สูตร จะเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ ซึ่งเซลล์ที่พบในระยะนี้ยังคงเป็นเซลล์ปกติสีเขียว โดยมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์น้อยมากหรือไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง แต่เซลล์สาหร่ายมีน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น โดยสาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์มีจำนวนเซลล์ในช่วง $8.00x10^4$-$9.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.13-0.37 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.67-1.19 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงมีจำนวนเซลล์ในช่วง $10.67x10^4$-$11.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.21-0.44 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.58-2.13 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมมีจำนวนเซลล์ในช่วง $7.33x10^4$-$9.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.14-0.41 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.75-1.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.16** เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ ของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ (BB) สูตรโบลด์ดัดแปลง (BBS) และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม (OBB) ในสภาวะที่ไม่เติมอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากวันที่ 28 ถึง 40 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 สูตร เจริญเข้าสู่ระยะที่มีการตายของเซลล์ (death phase) เนื่องจากเป็นสภาวะที่ขาดสารอาหาร ทำให้เซลล์ปกติมีการเจริญเป็นซิสต์สีเขียวเข้ม และสีเขียวอมน้ำตาล จนกระทั่งสีแดงจนเต็มเซลล์หรือซิสต์เต็มวัย และจากการเปลี่ยนจากเซลล์ปกติไปเป็นซิสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงพบว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายไม่ลดลง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น พร้อมกับเซลล์สาหร่ายเริ่มผลิตแอสตาแซนทิน โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์มีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง $6.67x10^4$-$8.00x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.41-0.65 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.20-5.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง $10.67x10^4$-$11.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.60-0.78 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.96-10.69 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง $9.33x10^4$-$12.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.43-0.67 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.12-6.24 มิลลิกรัมต่อลิตร

**รูปที่ 4.17** ผลของการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ด้วยอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง (ก.) อาหารสูตรโบลด์ (ข.) และอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม (ค.) ในสภาวะที่ไม่เติมอากาศเป็นเวลา 40 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.3.2 การเพาะเลี้ยงในสภาวะเติมอากาศ**

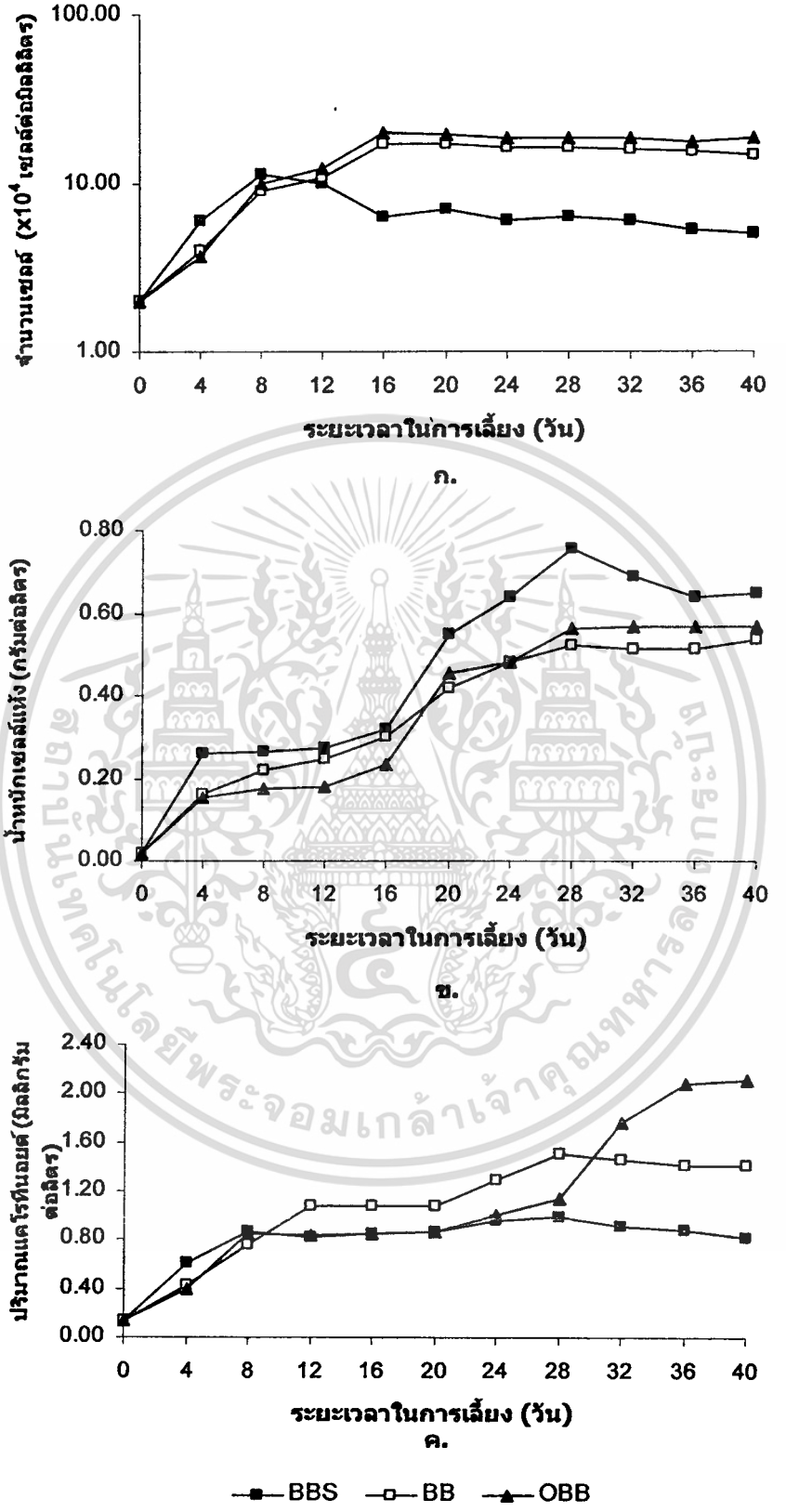
จากการเพาะเลี้ยงหัวเชื้ออายุ 7 วัน ในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 1 ลิตร ที่มีการเติมอากาศเป็นเวลา 40 วัน พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม มีการเจริญของเซลล์และให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์ $18.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.12 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดังรูปที่ 4.18)

นอกจากนี้สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง จะมีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงที่ $11.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ และสูตรโบลด์ที่เหมาะสมมีการเจริญของเซลล์สูงสุดในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงที่ $17.33x10^4$ และ $20.00x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจากวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์และสูตรโบลด์ที่เหมาะสมจะเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตแบบคงที่ ในขณะที่สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงจะเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง พร้อมกับมีจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ $6.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสาหร่ายที่เจริญในอาหารทั้ง 3 สูตรเริ่มมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.18 ก. และ ข.) หลังจากวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม เริ่มมีการผลิตแอสตาแซนทิน ในขณะเดียวกันกับพบว่าสาหร่ายมีน้ำหนักเซลล์แห้งค่อนข้างคงที่ แสดงว่าเป็นสภาวะที่สาหร่ายจะค่อย ๆ ผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นภายในเซลล์ ในขณะสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ และสูตรโบลด์ดัดแปลง หลังจากวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง กลับมีจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเกิดการตายของเซลล์สาหร่าย ในขณะเดียวกันก็มีการสังเคราะห์แอสตาแซนทินในเซลล์ที่รอดชีวิต เนื่องจากการทดลองพบว่าเซลล์สาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มออกน้ำตาลซึ่งเป็นลักษณะเซลล์ที่เริ่มสะสมแอสตาแซนทิน

นอกจากนี้หลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 40 วัน ในอาหารสูตรโบลด์ และสูตรโบลด์ที่เหมาะสมยังพบว่าสาหร่ายยังคงมีสีเขียวเข้มและยังไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีแดง

และผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เติมอากาศและไม่เติมอากาศ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Domínguez-Bocanegra และคณะ (2004) ที่มีการวิเคราะห์ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความเข้มแสง (light intensity) การเติมอากาศและอาหารต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์สามารถให้การเจริญของเซลล์สูงสุดที่ $3.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 177 μmol photon $m^{-2}$ $s^{-1}$ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ด้วยการเติมอากาศอย่างต่อเนื่องที่ 1.5 วีวีเอ็ม ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BAR ที่เติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.18** เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ ของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ (BB) สูตรโบลด์ดัดแปลง (BBS) และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม (OBB) ในสภาวะเติมอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตร จะผลิตแอสตาแซนทินสูงสุดที่ 98 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 345 μmol photon $m^{-2}$ $s^{-1}$ ในสภาวะเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมอากาศ

จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของสุดสายชล (2541) ที่ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *H. pluvialis* NIES 144 และ *H. lacustris* subsp. *siamensis* ด้วยอาหารสูตร basal medium ที่มีโซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์สกัด (yeast extract) เป็นแหล่งไนโตรเจนและวิตามิน ในถังหมักขนาด 1 ลิตรที่มีการกวนและไม่มีการกวน ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน พบว่าสภาวะที่มีการกวน ในขณะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 4 วัน สาหร่ายทั้งสองชนิดจะมีการเจริญสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการกวน แต่เมื่อทำการเลี้ยงต่อไปจะเกิดการตายของสาหร่ายขึ้นจึงทำให้จำนวนเซลล์ลดลง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงโดยไม่มีการกวนจะเจริญได้ดีกว่าและมีการสร้างแอสตาแซนทินที่สูงกว่า โดยสาหร่าย *H. lacustris* subsp. *siamensis* จะมีการเจริญโดยให้จำนวนเซลล์เท่ากับ $2.13 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการสร้างแอสตาแซนทินได้ 5.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน *H. pluvialis* NIES 144 จะมีปริมาณเซลล์ $1.18 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีการสร้างแอสตาแซนทินได้ 8.51 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. lacustris* subsp. *siamensis* ในอาหารสูตร MCM ดัดแปลง (modified MCM) ในหลอดเติมอากาศ โดยเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ 2-3% โดยปริมาตรอากาศเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มแสง 141 μmol photon $m^{-2}$ $s^{-1}$ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสง 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน สามารถให้จำนวนเซลล์ที่ $11.9 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.41 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอสตาแซนทิน 55 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีการทดลองของการทดลองนี้ กับการทดลองของ Dominguez-Bocanegra และคณะ (2004) และสุดสายชล (2541) พบว่ามีความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจนระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเติมและไม่เติมอากาศก็คือแหล่งของคาร์บอนในอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยพบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมอากาศสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงหากมีการเติมแหล่งคาร์บอนคือโซเดียมอะซิเตตจะช่วยให้สาหร่ายมีการเจริญ และการผลิตแอสตาแซนทินได้มากกว่าในอาหารที่ไม่เติมโซเดียมอะซิเตต ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมอากาศสาหร่ายจะได้รับแหล่งคาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์จากอากาศ ซึ่งมีอยู่ประมาณ 0.03 % ในขณะที่การทดลองของสุดสายชล (2541) มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ที่ 2-3 % เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบมีการเติมอากาศสาหร่ายจึงมีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้โดยไม่ต้องใช้โซเดียมอะซิเตต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.4 ผลของการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน

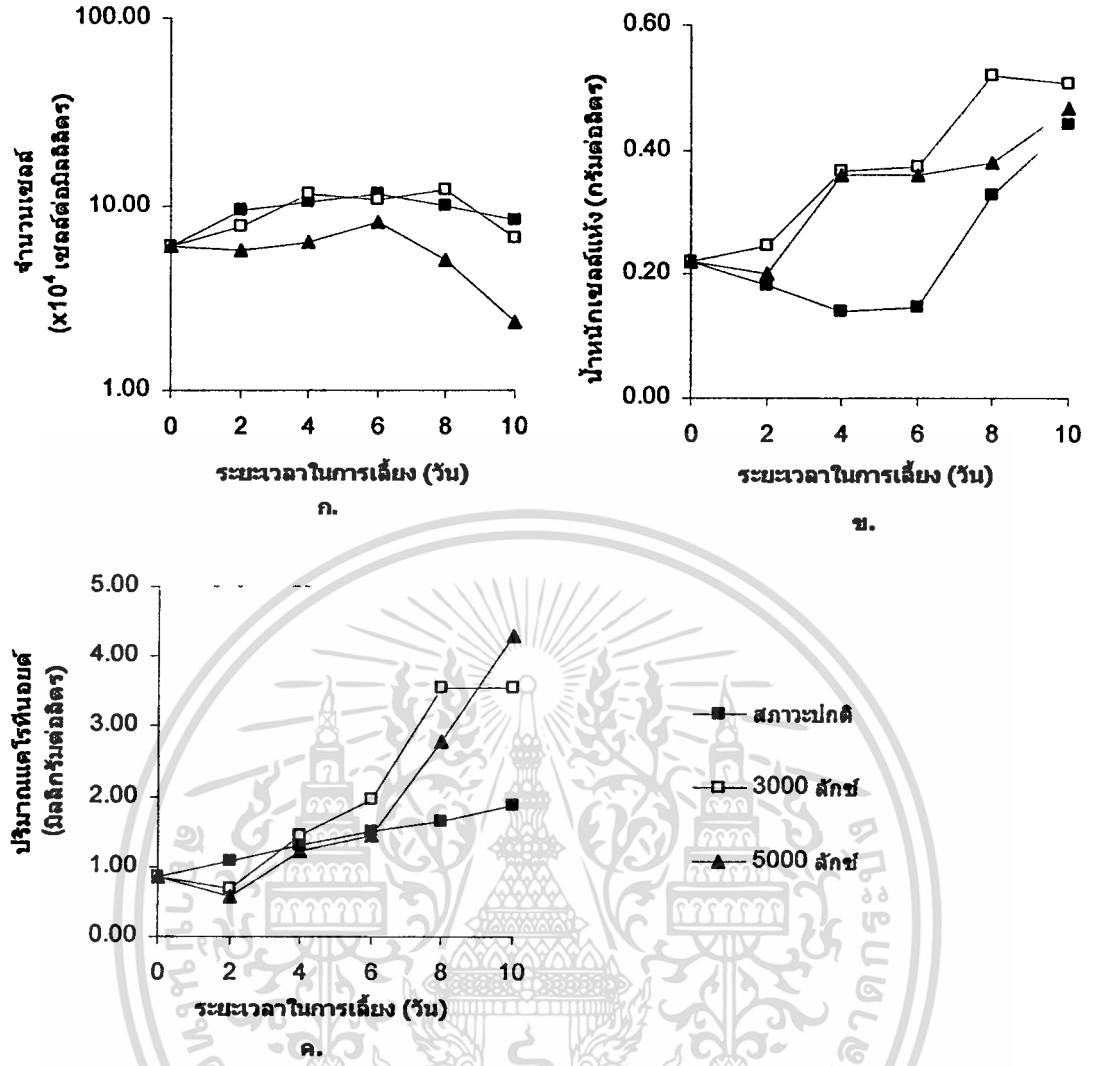
### 4.4.1 ปัจจัยทางด้านแสง

จากการทดลองนำสาหร่ายที่มีอายุการเจริญ 10 วัน มาเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีท่อให้อากาศด้านล่าง ในสภาวะที่มีการให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ และ 5000 ลักซ์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าการให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3000 และ 5000 ลักซ์ กระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสตาแซนทินแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยการให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 3000 ลักซ์ จะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ที่ 3.56 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.51 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอสตาแซนทินที่ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และการให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ 5000 ลักซ์ จะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ที่ 4.28 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.47 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอสตาแซนทินที่ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติผลิตแคโรทีนอยด์ได้ที่ 1.87 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.44 กรัมต่อลิตร และยังไม่พบว่ามีการผลิตแอสตาแซนทิน (รูปที่ 4.19 และ 4.20)

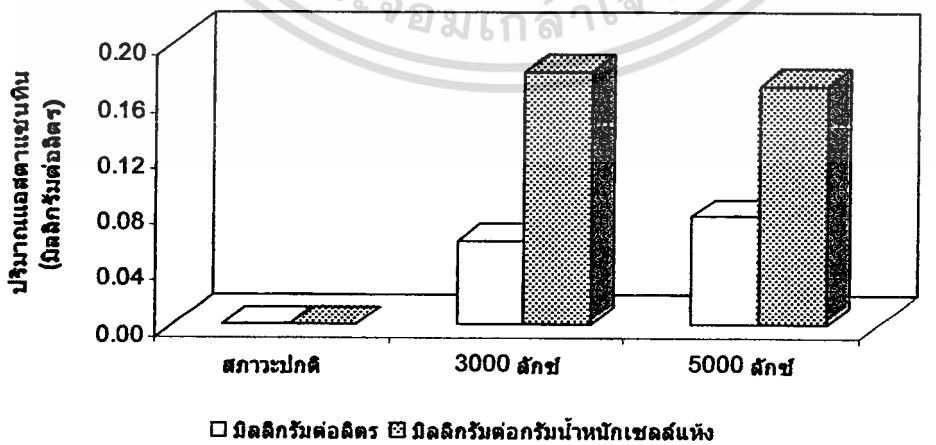
นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่า การเพิ่มความเข้มแสงและระยะเวลาในการให้แสงมีผลทำให้จำนวนเซลล์สาหร่ายลดลง ในขณะที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.19 ) และการให้แสงที่ความเข้ม 5000 ลักซ์ อย่างต่อเนื่องมีความรุนแรงต่อเซลล์สาหร่ายสูงกว่าที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เนื่องจากมีผลทำให้จำนวนเซลล์ของสาหร่ายลดลงมากกว่าที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยสภาวะที่ใช้ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ กระตุ้น สาหร่ายจะเริ่มสร้างแอสตาแซนทินในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์สาหร่ายเริ่มมีการสะสมรงควัตถุสีแดงภายในเซลล์ และสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้เริ่มมีสีส้มแดงของแอสตาแซนทิน โดยสาหร่ายมีการสังเคราะห์แอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 1.22 เป็น 1.46 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ของสาหร่ายลดลงแต่กลับมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้น มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น แสดงว่าสาหร่ายมีการสะสมแอสตาแซนทินในเซลล์เพิ่มขึ้น

จากการเปรียบเทียบผลของการใช้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ แบบต่อเนื่องกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน กับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติพบว่าไม่ทำให้จำนวนเซลล์สาหร่ายลดลง แต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น สังเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น และผลิตแอสตาแซนทินได้เร็วขึ้น โดยสาหร่ายจะเริ่มสร้างแอสตาแซนทินในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้เริ่มมีสีส้มแดงของแอสตาแซนทิน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.19** ผลของการใช้ปัจจัยทางด้านแสงต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.




**รูปที่ 4.20** ผลของการใช้ปัจจัยทางด้านแสงต่อการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปกติเซลล์สาหร่ายยังไม่มีการสะสมแอสตาแซนทิน เพราะสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้ยังคงมีสีเหลืองไม่ใช่สีส้มแดง และเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 10 วัน พบว่าสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปกติยังคงมีสีเหลือง ในขณะที่สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสง 3000 และ 5000 ลักซ์ อย่างต่อเนื่อง สารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายมีสีส้มแดงของแอสตาแซนทิน (รูปที่ 4.23)

ซึ่งผลการทดลองที่ได้แตกต่างจาก ของ Fan และคณะ (1994) ที่พบว่าการให้ความเข้มแสงแบบต่อเนื่องที่สูงกว่า 400 μmol quanta·$m^{-2}$·$s^{-1}$ (ประมาณ 30000 ลักซ์) จะชักนำให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบวิธีการทดลองพบว่ามีความแตกต่างกัน โดยในการทดลองนี้นำเซลล์ที่เจริญในระยะการเจริญแบบคงที่มาเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่างกันแบบต่อเนื่องโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่ ดังนั้นการใช้ความเข้มแสงที่ต่ำกว่าจึงสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้เช่นกัน

ในขณะที่ผลการศึกษาบทบาทของแอสตาแซนทินต่อการป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลต-บี ในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ของ Kobayashi และ Okada (2000) พบว่าซิสต์ของสาหร่ายจะสร้างแอสตาแซนทินพร้อมกับการเจริญเป็นซิสต์เต็มวัย และเมื่อนำซิสต์วัยอ่อน (มีปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์น้อย) ซิสต์เต็มวัย (มีปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์มาก) ไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตเอ หรือแสงอัลตร้าไวโอเลตบี แล้วศึกษาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์ พบว่าแสงอัลตร้าไวโอเลตบีมีผลต่อการตายและการลดลงของปริมาณแอสตาแซนทินรุนแรงกว่าแสงอัลตร้าไวโอเลตเอ และซิสต์เต็มวัยจะทนต่อการทำลายของรังสีอัลตร้าไวโอเลตบีสูงกว่าซิสต์วัยอ่อน 6 เท่า จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าแอสตาแซนทินในซิสต์มีหน้าที่เป็นสารป้องกันผลการทำลายจากสีอัลตร้าไวโอเลตบี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Zlotnik และคณะ (1993) ที่อธิบายว่าแอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุที่ดูดกลืนแสงสีน้ำเงินได้มากทำให้ระดับของแสงที่มากเกินพอไปถึงส่วนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง (photosynthetic apparatus) ลดลง เซลล์จึงได้รับปริมาณแสงต่ำลง ดังนั้นอะพลาโนสปอร์ในระยะที่สะสมแอสตาแซนทิน และเริ่มเปลี่ยนจากอะพลาโนสปอร์สีเขียวเป็นสีแดงจึงมีอัตราการสังเคราะห์แสงที่ต่ำ แต่ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์คงที่ เนื่องจากเซลล์อะพลาโนสปอร์ยังคงมีความสามารถสังเคราะห์แสงได้อยู่แต่มีอัตราที่ต่ำ ซึ่งกลไกการตอบสนองต่อแสงของแอสตาแซนทินสามารถอธิบายได้ด้วยผลการทดลองของ Wang และคณะ (2003) ที่ศึกษาบทบาทและหน้าที่ของแอสตา-แซนทินต่อการป้องกันแสง(photoprotection)ในเซลล์สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ด้วยการชักนำสาหร่ายที่เจริญในระยะ logalithum ด้วยความเข้มแสงสูงๆ พบว่าในขณะที่สาหร่ายเปลี่ยนจากเซลล์สีเขียวไปเป็นเซลล์สีแดงจะมีปริมาณเม็ดไขมัน (lipid globules) ที่มีแอสตาแซนทิน-เอสเทอร์มากขึ้นที่รอบๆคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ซึ่งในช่วงระยะที่มีการชักนำนี้สาหร่ายมีอัตราสังเคราะห์แสงที่สูงแต่ปริมาณ D1 protein ของ Photosystem II (PSII) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

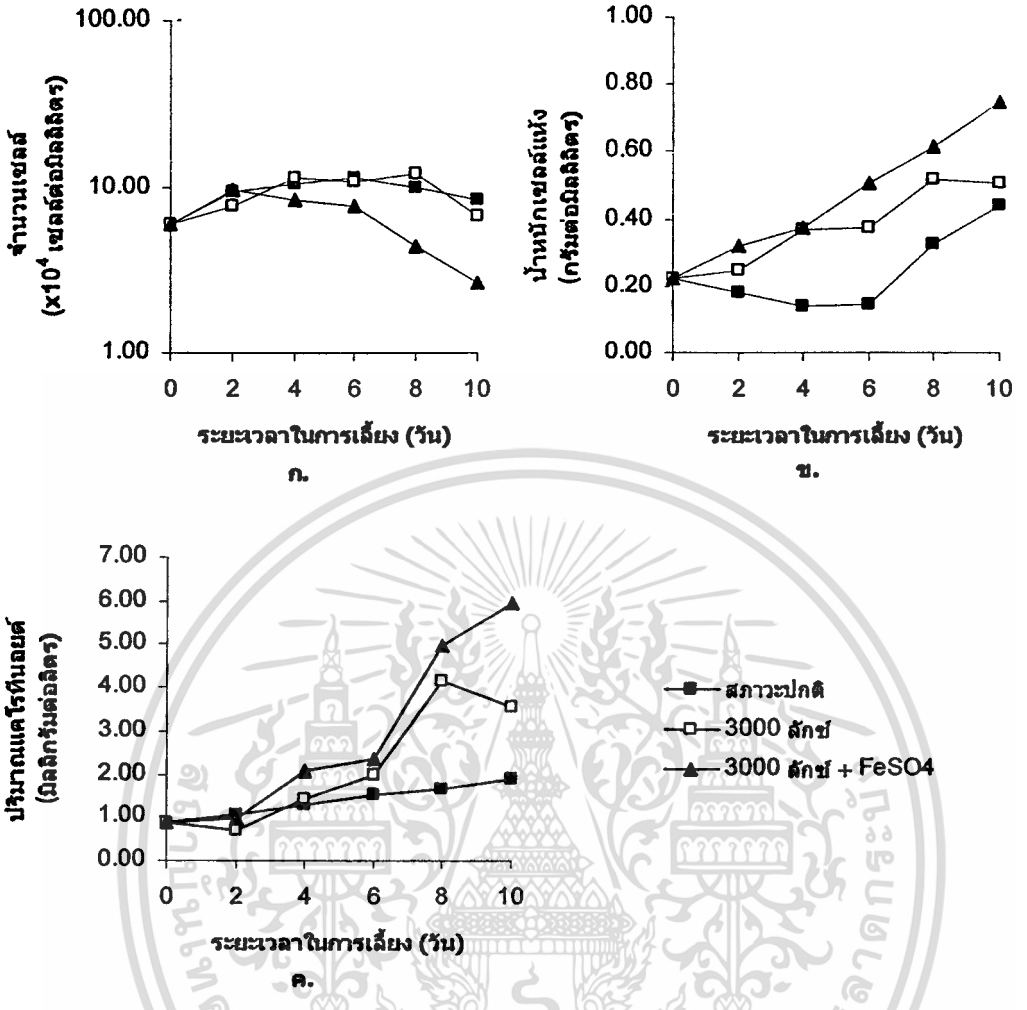
การลดลงของ D1 protein จะหยุดลงภายใน 1 วัน แล้วจะเพิ่มขึ้นและกลับสู่สภาวะปกติหลังจากวันที่ 5 ของการกระตุ้น การตอบสนองของ D1 protein (response of the D1 protein) แสดงถึงการปรับเปลี่ยนสภาวะของสาหร่ายให้ทนทานต่อระดับความเข้มแสงสูง ดังนั้นการสร้างและการสะสมแอสตาแซนทินจึงเกิดขึ้นเพื่อป้องกันการลดลงของระดับ D1 protein ภายในเซลล์ ด้วยเหตุนี้ทำให้เซลล์สามารถรักษาหน้าที่ของ Photosystem II (PSII ฟังก์ชั่น) และความสมบูรณ์ของเซลล์ (structural integrity) ได้ และผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าแอสตาแซนทินมีหน้าที่ป้องกันแสงต่อส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของเซลล์ (photosynthetic apparatus) โดยการดูดกลืนแสงในช่วงสีน้ำเงิน (blue region) และเมื่อนำเซลล์ที่เจริญในสภาวะที่มีความเครียดจากความเข้มแสงสูงๆ มาศึกษาจะพบว่ามีเม็ดสีของแอสตาแซนทิน (astaxanthin globules) จำนวนมากรอบๆ นิวเคลียส ชี้ให้เห็นว่าสารสีย้งทำหน้าที่เป็นตัวกีดขวางทางฟิสิกส์เคมี (physicochemical barrier) โดยป้องกันการจำลองตัวของ DNA (DNA replicating DNA) จากปฏิกิริยาออกซิเดชันในขณะที่มีการแบ่งเซลล์อีกด้วย โดย D1 protein เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่และโครงสร้างที่สำคัญมากที่สุดใน reaction center ของ PSII เป็นโปรตีนที่มีความไว (sensitive) ต่อความเข้มแสงที่มากเกินพอซึ่งมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง (degradation) เป็นผลให้แอกติวิตีของ PSII ต่ำลง (down-regulation of PSII activity) หรือเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า photoinhibition การลดลงของ D1 protein เป็นผลทำให้การลดลงของ plastoquinone ใน PSII ที่มากเกินไป และทำให้เกิด triplet chl และ singlet oxygen เพิ่มขึ้นใน reaction center ของ PSII.

### 4.4.2 ปัจจัยทางด้านแสงร่วมกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟต

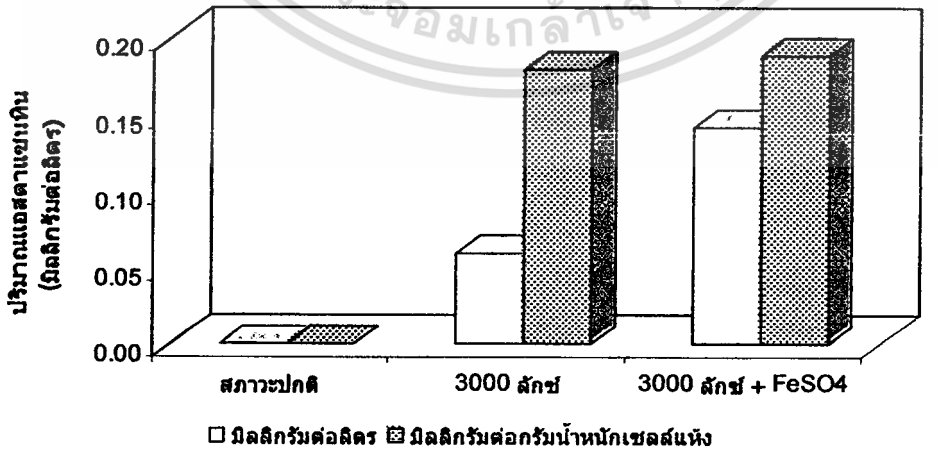
จากการทดลองนำสาหร่ายที่มีอายุการเจริญ 10 วัน มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต (pH 1.5) 450 ไมโครโมลาร์ร่วมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ และสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เพียงอย่างเดียวเป็นเวลา 10 วัน พบว่าการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตร่วมกับให้แสงอย่างต่อเนื่อง มีผลกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุด 5.92 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.75 กรัมต่อลิตร และ 0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.21 และ 4.22)

และเมื่อเปรียบเทียบผลของการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต (pH 1.5) ที่ความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ก่อนแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง กับการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องเพียงอย่างเดียวพบว่า การเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตลงไปมีผลทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นในขณะที่จำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ในระยะ 6 วันแรก และหลังจากวันที่ 6 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายลดลงจาก $7.67 \times 10^4$ เป็น $2.67 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง แต่เซลล์ยังคงมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.21** ผลของการใช้ปัจจัยทางด้านแสงร่วมกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.




**รูปที่ 4.22** ผลของการใช้ปัจจัยทางด้านแสงร่วมกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟตต่อการผลิตแอสตา-แซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อเนื่องเพียงอย่างเดียวจำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่แต่น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.21 ก. และ ข.) สาหร่ายเริ่มผลิตแอสตาแซนทินในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้เริ่มมีสีส้มแดง และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์สาหร่ายเริ่มผลิตแอสตาแซนทินขึ้นในเซลล์ โดยมีการสังเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 2.05 เป็น 5.92 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องเพียงอย่างเดียวสาหร่ายมีการสังเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 1.45 เป็น 3.56 มิลลิกรัมต่อลิตร (สารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงแสดงในรูปที่ 4.23) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตลงไปในเซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะคงที่พร้อมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบให้แสงอย่างต่อเนื่องเพียงอย่างเดียว

การเติมเฟอรัสซัลเฟต ($Fe^{2+}$) ลงไปในอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระยะเซลล์ปกติ พบว่าสาหร่ายยังคงเจริญอยู่ในระยะเซลล์ปกติจนกระทั่งเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ เซลล์ยังคงมีสีเขียวเนื่องจากยังมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ต่ำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง metabolic ของสาหร่ายหลังจากเติมเฟอรัสซัลเฟต ในขณะที่การเติมอะซิเตตร่วมกับเฟอรัสอิออนเซลล์ปกติจะเจริญไปเป็นซิสต์ พร้อมกับการลดลงของโปรตีนภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าเฟอรัสอิออนมีหน้าที่เป็น HO·generator (ตัวที่ทำให้เกิด hydroxyl radical) ใน fenton reaction ดังสมการ

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH^- + Fe^{3+}$$

ซึ่ง hydroxyl radical ($OH^-$) จะไปกระตุ้นสาหร่ายให้มีการสร้างแอสตาแซนทินสูงขึ้น (Kobayashi และคณะ, 1993)

Kobayashi และคณะ (1992b) พบว่าที่ความเข้มแสงสูงและมีการให้แสงอย่างต่อเนื่องจะกระตุ้นให้สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ที่เจริญใน $Fe^{2+}$ rich medium (0.216 mM $FeSO_4.7H_2O$) ผลิตแอสตาแซนทินได้มากที่สุด

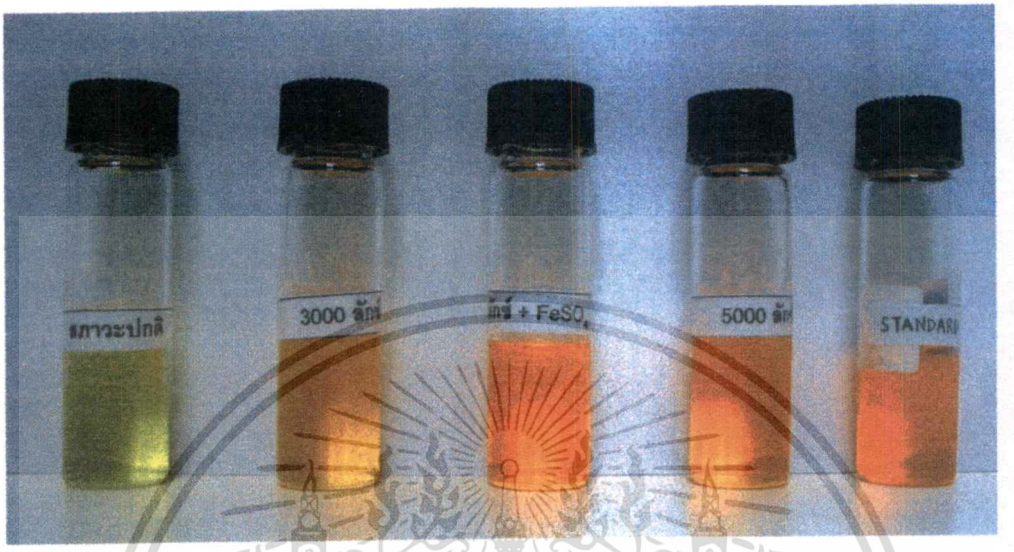
นอกจากนี้ Kobayashi และคณะ (1997a) ยังพบว่าแสงมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และการเปลี่ยนแปลงลักษณะและรูปร่างของเซลล์สาหร่าย (cell differentiation) และการเติม $Fe^{2+}$ ลงไปยังสาหร่ายระยะเจริญไปเป็นซิสต์เต็มวัยจะทำให้สาหร่ายสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ Schoefs และคณะ (2001) รายงานว่าในการสังเคราะห์แอสตาแซนทินเอนไซม์ cytochrome P450 hydroxylase ต้องใช้ปริมาณออกซิเจน NADPH และ $Fe^{2+}$ ในการเปลี่ยนเบต้าแคโรทีนไปเป็นแอสตาแซนทิน (transformation)

Kobayashi และคณะ (2001) การเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตร่วมกับการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงจะทำให้ซิสต์ของสาหร่าย *H. pluvialis* มีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่ขึ้นโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 30 ไมโครเมตร ในขณะที่การเติมโซเดียมอะซิเตตเพียงอย่างเดียวจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยเพียง 20 ไมโครเมตร




ก. ข. ค. ง. จ.

**รูปที่ 4.23** สารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อถูกกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทินด้วยการให้แสงแบบต่อเนื่อง และการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับการให้แสงแบบต่อเนื่อง เป็นเวลา 10 วัน

ก. สภาวะปกติ (Control) ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ มีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง

ข. กระตุ้นด้วยการให้แสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์

ค. กระตุ้นด้วยการให้แสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ พร้อมเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์

ง. กระตุ้นด้วยการให้แสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 5000 ลักซ์

จ. สารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 ผลของการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

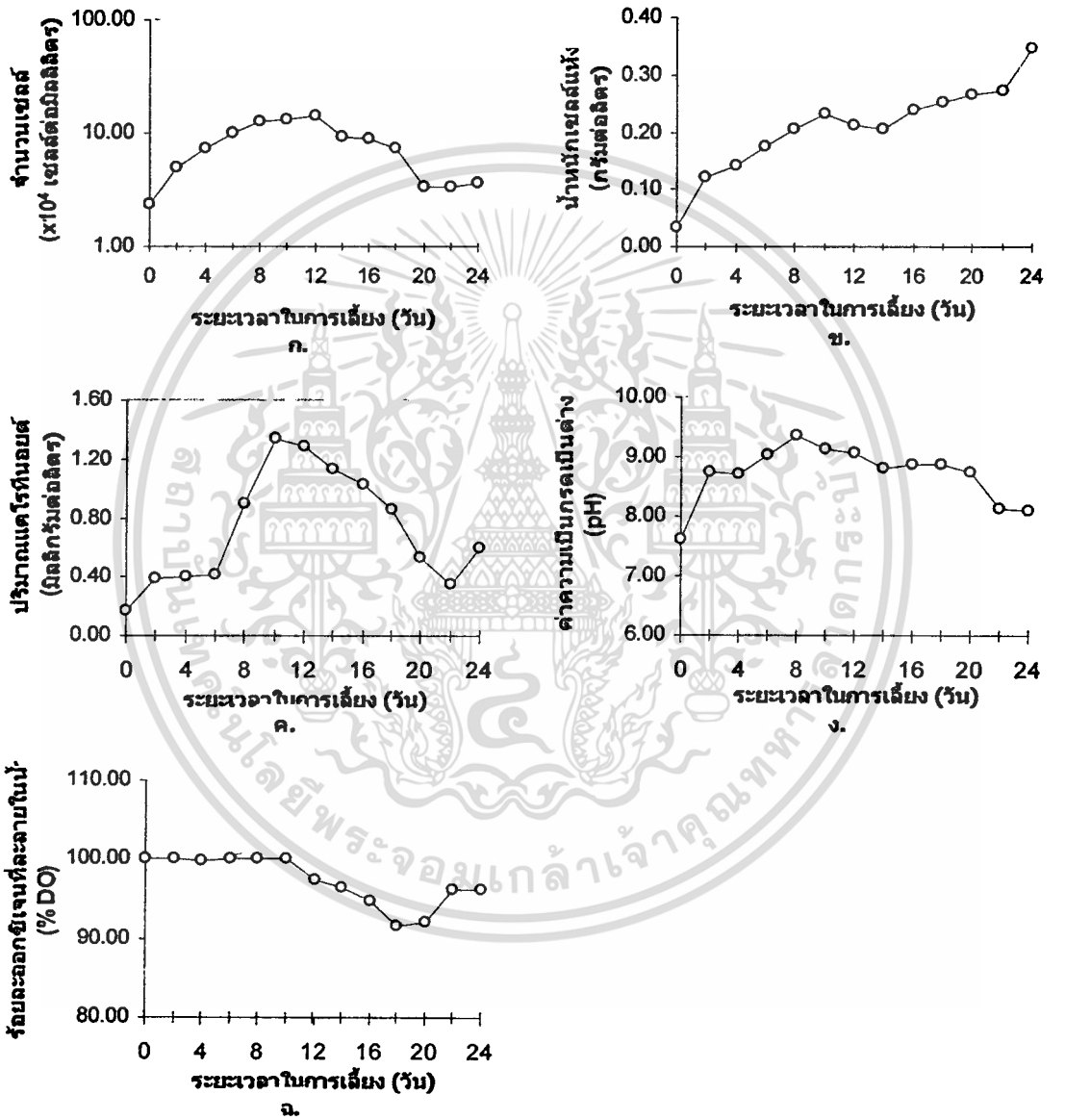
### 4.5.1 ผลของการศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.8 วีวีเอ็ม ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง พบว่ามีผลของการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง และค่าการละลายได้ของออกซิเจนในอาหารที่ใช้เลี้ยงดังแสดงในรูปที่ 4.24 และตารางที่ 4.3

จากกราฟแสดงการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (รูปที่ 4.24 ก.- ค.) พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 0-8 วัน สาหร่ายเจริญอยู่ในระยะที่มีการเจริญมีจำนวนเซลล์ที่ $12.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.21 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.89 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8-12 วัน ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายเจริญอยู่ในระยะการเจริญแบบคงที่ โดยมีจำนวนเซลล์ในช่วง $12.67x10^4$-$14.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.21-0.23 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.29-1.34 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 12-24 วัน สาหร่ายเจริญอยู่ในระยะที่มีการตายของเซลล์ (death phase) หรือระยะที่มีการขาดสารอาหาร โดยในระยะนี้พบว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายลดลงจนมีระดับคงที่ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยงที่ $3.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พร้อมกับมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งจาก 0.21 เป็น 0.27 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.24 ก. และ ข.) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นระยะที่สาหร่ายเจริญเข้าสู่ระยะซิสต์และเริ่มมีการสะสมอาหาร จึงทำให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันกับพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลงต่ำสุดในวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยงที่ 0.36 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายเริ่มผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นจาก 0.36 เป็น 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 24 ของการเลี้ยง โดยสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้เริ่มมีสีส้มอ่อน ๆ (รูปที่ 4.25 ) ซึ่งสรุปได้ว่าในระยะนี้เป็นระยะที่สาหร่ายเริ่มสังเคราะห์แอสตาแซนทิน แต่จากการนำสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC กลับไม่สามารถตรวจพบแอสตาแซนทินในสารสกัดแคโรทีนอยด์ดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าปริมาณแอสตาแซนทินที่สังเคราะห์ได้น้อยมาก หรือผลิตอยู่ในรูปไอโซเมอร์อื่นที่ไม่ใช่ไอโซเมอร์เดียวกันกับสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทินที่มีอยู่ จึงไม่สามารถรายงานปริมาณของแอสตาแซนทินได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบขั้นตอนเดียว เป็นเวลา 24 วัน พบว่ามีผลผลิตสาหร่ายโดยน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีสีส้มอ่อนๆ ของแอสตาแซนทิน) โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง และค่าร้อยละของการละลายได้ของออกซิเจนในอาหารที่ใช้เลี้ยงในช่วง 7.60-9.34 และ 91.6-100 (รูปที่ 4.24 ง. และ จ.)




**รูปที่ 4.24** แสดงการเจริญ การผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ค่าความเป็นกรดด่าง และร้อยละของออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 24 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** ผลของการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบขั้นตอนเดียว (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0 | 2.33±0.33 | 0.03±0.01 | 0.17±0.02 |
| 2 | 5.00±0.58 | 0.12±0.01 | 0.39±0.03 |
| 4 | 7.33±0.33 | 0.14±0.01 | 0.41±0.03 |
| 6 | 10.00±1.15 | 0.17±0.01 | 0.41±0.03 |
| 8 | 12.67±0.33 | 0.21±0.01 | 0.89±0.03 |
| 10 | 13.33±0.03 | 0.23±0.01 | 1.34±0.03 |
| 12 | 14.33±0.67 | 0.21±0.01 | 1.29±0.05 |
| 14 | 9.33±0.02 | 0.21±0.02 | 1.13±0.02 |
| 16 | 9.00±0.02 | 0.24±0.02 | 1.03±0.01 |
| 18 | 7.33±0.08 | 0.25±0.02 | 0.86±0.02 |
| 20 | 3.33±0.02 | 0.27±0.01 | 0.53±0.01 |
| 22 | 3.33±0.05 | 0.27±0.02 | 0.36±0.01 |
| 24 | 3.67±0.05 | 0.35±0.01 | 0.60±0.03 |

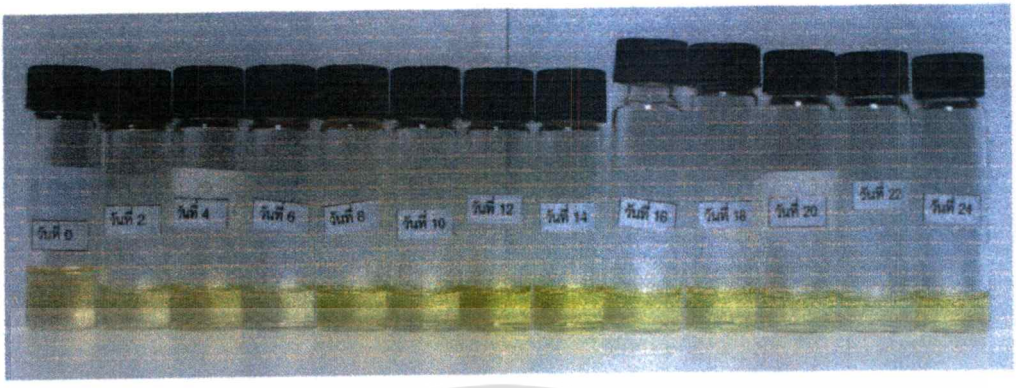
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร กับการเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีท่อให้อากาศด้านล่าง เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีการเจริญของเซลล์เพียง $13.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.23 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.34 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีท่อให้อากาศด้านล่างมีการเจริญของเซลล์ $31.60x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.36 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.03 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีท่อให้อากาศด้านล่างให้การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักมีระบบการกวนด้วยใบพัดซึ่งมีความรุนแรงต่อเซลล์ของสาหร่ายในระยะเซลล์ปกติทำให้มีการเจริญต่ำ ประกอบกับถังหมักมีระบบควบคุมอุณหภูมิโดยใช้น้ำหล่อเย็นรอบนอกของถังหมัก อาจมีผลต่อการส่องผ่านของแสงไปยังเซลล์สาหร่ายภายในถังหมักได้น้อยลงทำให้ปริมาณแสงที่สาหร่ายได้รับไม่เพียงพอต่อการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และผลของการทดลองที่ได้พบว่าปริมาณเซลล์ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่ำกว่าผลการทดลองของสุดสายชล (2541) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. lacustris* subsp.*siamensis* ในอาหารสูตร MCM ดัดแปลง (modified MCM) ในหลอดเติมอากาศขนาด 200 มิลลิลิตร ความเข้มแสง 141 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ 2-3 % โดยปริมาตรอากาศเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 16 วัน พบว่าสาหร่ายมีปริมาณเซลล์ $11.9x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.41 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอสตาแซนทิน 55 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลผลิตที่น้อยกว่าอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างทางด้านสายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ เนื่องจากสาหร่ายสายพันธุ์ *H. lacustris* subsp. *siamensis* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่สาหร่ายสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิดังกล่าว อาหารที่ใช้เลี้ยงโดยอาหารสูตร MCM ดัดแปลงมีการเติมไบโอติน 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมไม่มีการเติมไบโอติน และแหล่งคาร์บอนมาจากการเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ 2-3 % โดยปริมาตรอากาศ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในการทดลองนี้ใช้แหล่งคาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ที่อยู่ในอากาศเท่านั้นคือประมาณ 0.03 % และลักษณะอุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงโดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีขนาดใหญ่กว่า ดังนั้นการส่องผ่านของแสงไปยังศูนย์กลางของถังหมักจึงอาจมีปริมาณน้อยกว่า สาหร่ายจึงสามารถสังเคราะห์แสงได้น้อยกว่าส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินต่ำกว่า ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 200 มิลลิลิตร การส่องผ่านของแสงในหลอดเพาะเลี้ยงจะทั่วถึงกว่า ประกอบกับการเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงมีการเติมอากาศเพียงอย่างเดียว ไม่มีการกวนร่วมด้วยจึงไม่มีแรงเฉือนที่ส่งผลต่อการตายของเซลล์ปกติ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักมีการกวน 100 รอบต่อนาที จึงมีแรงเฉือนที่สูงกว่าจึงมีผลต่อเซลล์สาหร่ายที่อยู่ในระยะการเจริญคือเซลล์ปกติ ซึ่งมีความอ่อนไหวต่อแรงเฉือนมากกว่าเซลล์อะพลาโนสปอร์ จึงอาจส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์หลังจากวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง

นอกจากนี้ผลการเพาะเลี้ยงที่ได้ในการทดลองนี้ให้ปริมาณแอสตาแซนทินต่ำกว่าการทดลองของ Yuan และ Chen (1998) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังหมักขนาด 3.7 ลิตร ด้วยอาหาร MCM ที่เติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ 3.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะนี้มีแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอต่อความต้องการของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.25** สารสกัดแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

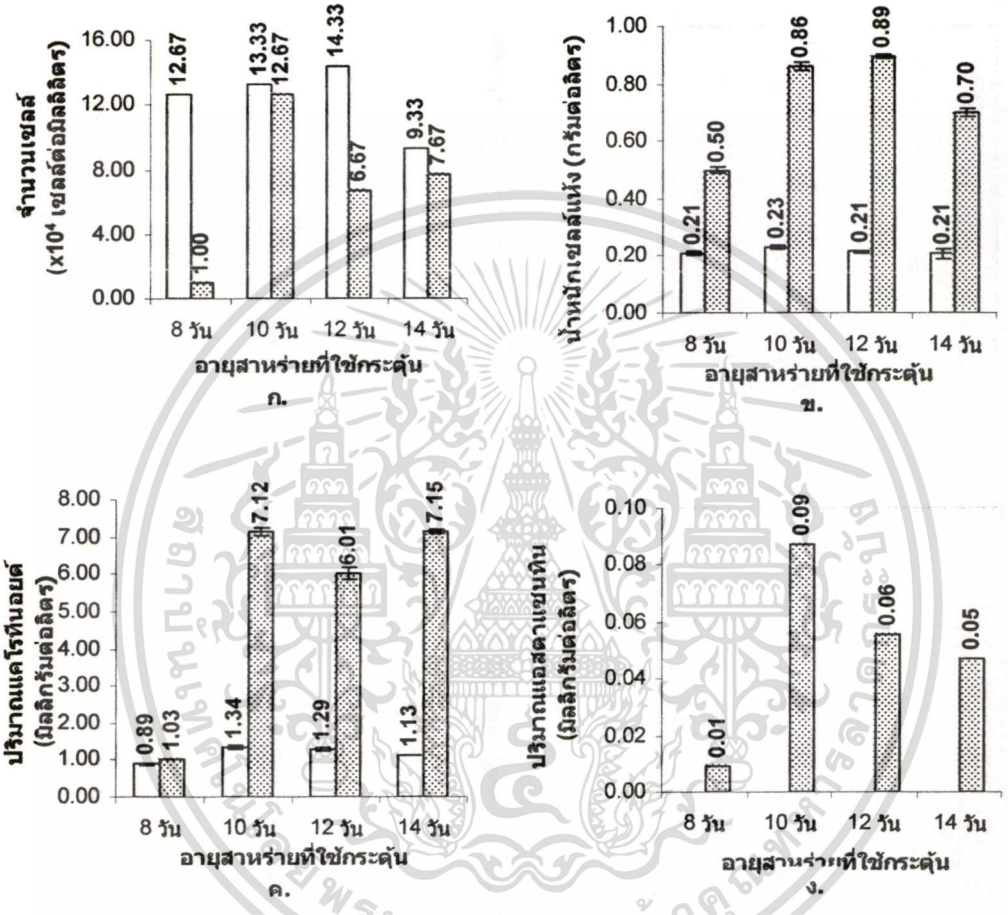
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.5.2 ผลของการศึกษาหาระยะเวลาการเจริญ (culture age) ที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ผลิตแอสตาแซนทิน**

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมัก 2 ลิตร ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 8 วันสาหร่ายเจริญอยู่ในช่วงปลายระยะที่มีการเจริญ ดังนั้นจึงเลือกเก็บตัวอย่างสาหร่าย จำนวน 50 มิลลิลิตร ออกจากถังหมักในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง มากระตุ้นโดยการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ระดับความเข้ม 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเมื่อนำเซลล์สาหร่ายอายุ 10 วัน ไปกระตุ้นพบว่าสามารถผลิตแอสตาแซนทินสูงสุดที่ 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.26 ง.) เนื่องจากการกระตุ้นเซลล์อายุ 10 วันทำให้จำนวนเซลล์ลดลงหรือมีผลต่อการตายของเซลล์ต่ำเพียง $0.67x10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น 0.63 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 5.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์สาหร่ายอายุ 12 และ 14 วัน สาหร่ายสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่ 0.06 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเมื่อกระตุ้นสาหร่ายอายุ 12 วัน ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง $6.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรเหลือ $6.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น 0.68 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 4.72 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และการกระตุ้นเซลล์สาหร่ายอายุ 14 วันทำให้จำนวนเซลล์ลดลงเพียง $1.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหลือ $7.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พร้อมกับน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น 0.49 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 6.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์สาหร่ายอายุ 8 วันมีผลทำให้เซลล์สาหร่ายลดลงมากที่สุดที่ $11.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรเหลือ $1.00x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกระตุ้นให้ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นต่ำสุดที่ 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.26, 4.27) แสดงว่าเซลล์สาหร่ายอายุ 8 วันมีความทนทานต่อการกระตุ้นต่ำที่สุด ดังนั้นจึงไม่ควรกระตุ้นเซลล์สาหร่ายอายุ 8 วัน เนื่องจากทำให้เซลล์มีจำนวนลดลงและมีการสังเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์และแอสตาแซนทินในเซลล์ที่รอดชีวิตต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบการการกระตุ้นเซลล์สาหร่ายอายุ 10 12 และ 14 วัน พบว่าการกระตุ้นเซลล์สาหร่ายอายุ 10 วัน สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้สูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเซลล์สาหร่ายอายุ 12 และ 14 วัน เจริญอยู่ในสภาวะที่เริ่มมีการตายของเซลล์หรือเริ่มขาดสารอาหาร ซึ่งอาจเป็นปัจจัยร่วมที่ทำให้เซลล์ทนต่อการใช้ปัจจัยกระตุ้นได้ต่ำกว่าสาหร่ายอายุ 10 วัน ดังนั้นจึงเลือกที่จะใช้ปัจจัยในการกระตุ้นให้เซลล์ที่มีการเจริญอายุ 10 วัน ผลิตแอสตาแซนทิน ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ 2 ขั้นตอนต่อไป ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Sarada และคณะ (2002b) ที่ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดความเครียดต่อการผลิตแอสตาแซนทินในสาหร่าย *H. pluvialis* ที่เจริญในสภาวะต่างกันและพบว่าความเข้มข้นที่สูงของโซเดียมคลอไรด์ (มากกว่า 1.0 %) จะมีผลต่อการตายของเซลล์ และอายุของสาหร่าย (age of the culture) มีความสำคัญสำหรับการใช้ความเครียดชักนำให้สาหร่ายผลิต

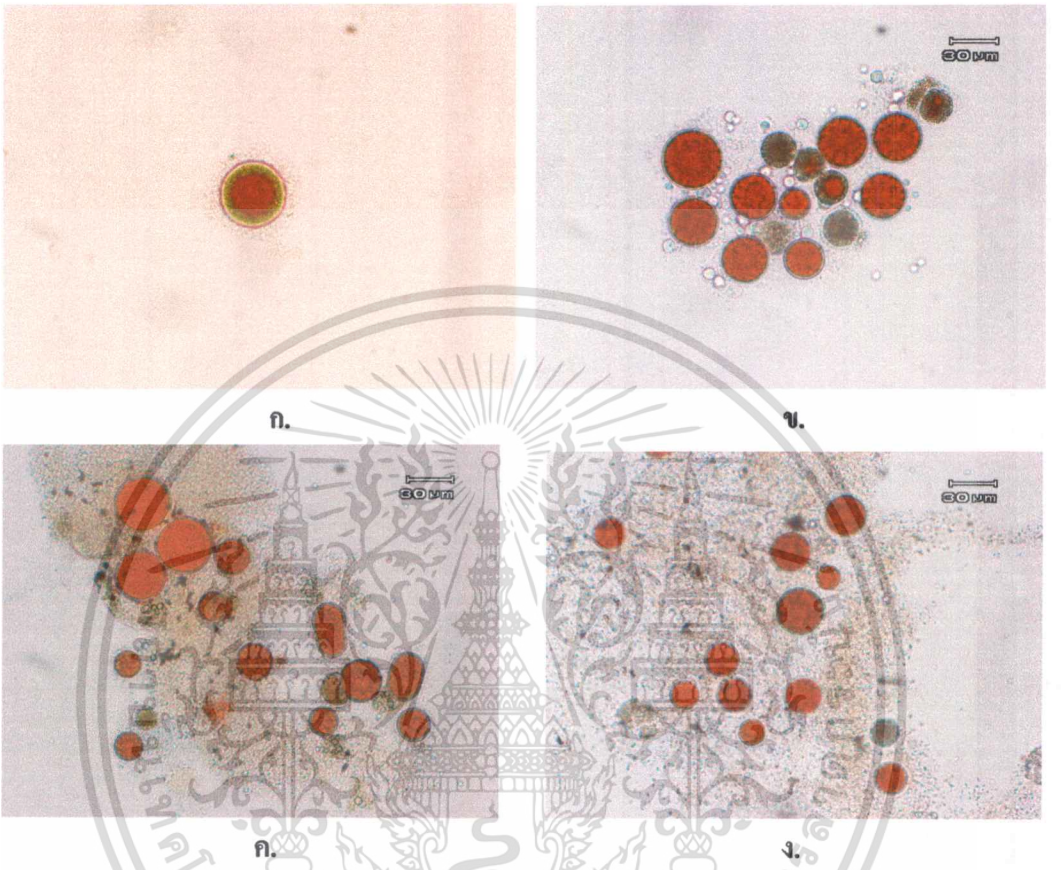
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอสตาแซนทิน โดยสาหร่ายอายุ 4-8 วันจะมีความทนทาน (sensitive) ต่อการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์น้อยกว่าเซลล์อายุ 12-16 วัน โดยเซลล์อายุ 12-16 วัน จะสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ 8.3-10.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์อายุ 4-8 วัน ผลิตแอสตาแซนทินได้ 0.95-8.10 มิลลิกรัมต่อลิตร




**รูปที่ 4.26** ผลของการหาระยะเวลาการเจริญ (culture age) ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เหมาะสมสำหรับใช้ปัจจัยกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทิน เมื่อ □ ก่อนการกระตุ้น และ ▨ หลังการกระตุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ก. ข.

ค. ง.

**รูปที่ 4.27** ลักษณะเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างแอสตาแซนทินโดยการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ร่วมกับให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ระดับความเข้มแสง 3000 ลักซ์

ก. เซลล์สาหร่ายอายุ 8 วันหลังถูกกระตุ้นเป็นเวลา 10 วัน

ข. เซลล์สาหร่ายอายุ 10 วันหลังถูกกระตุ้นเป็นเวลา 10 วัน

ค. เซลล์สาหร่ายอายุ 12 วันหลังถูกกระตุ้นเป็นเวลา 10 วัน

ง. เซลล์สาหร่ายอายุ 14 วันหลังถูกกระตุ้นเป็นเวลา 10 วัน

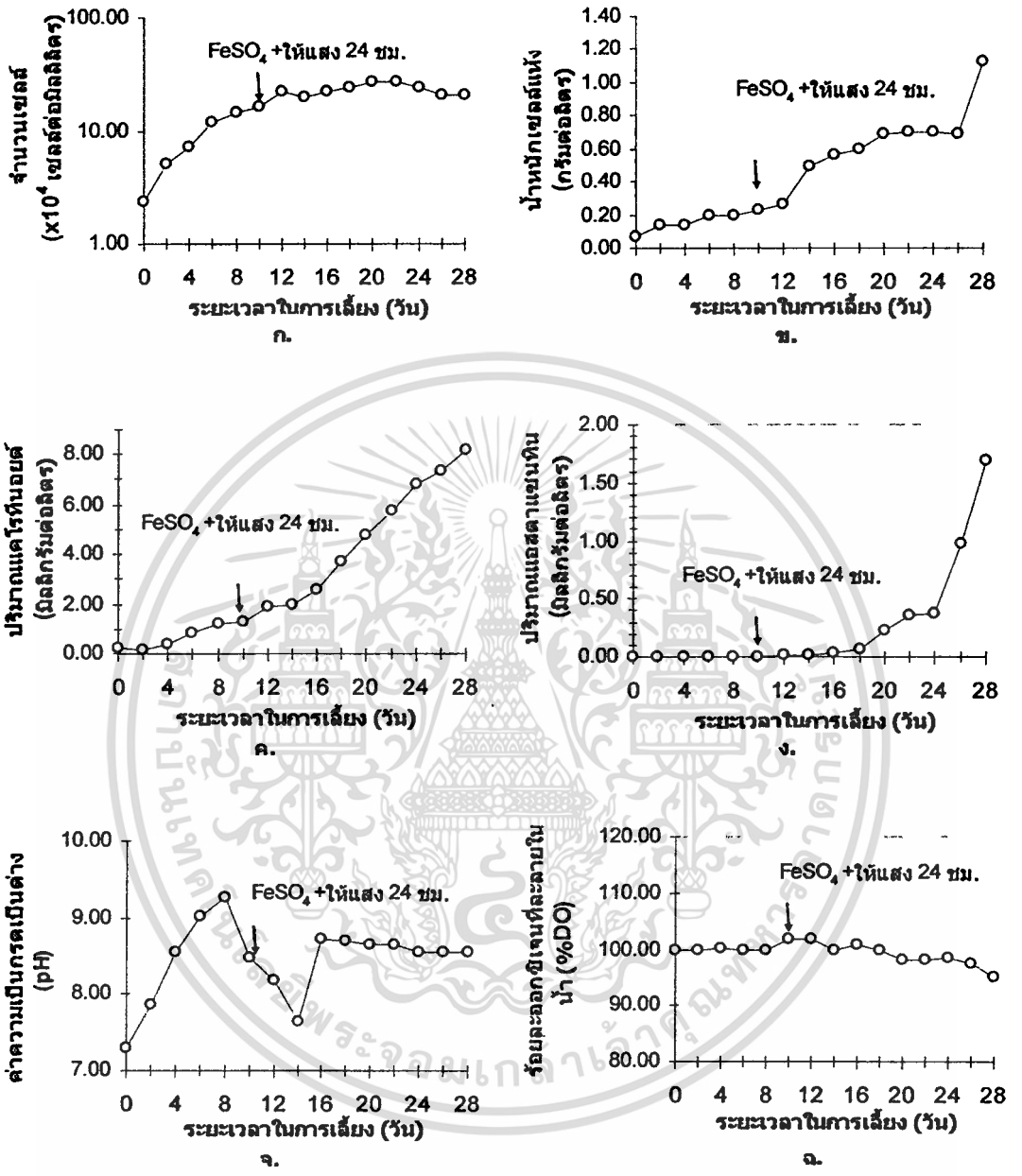
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.5.3 ผลของการศึกษาการเจริญเติบโต และแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน**

จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน หรือการเพาะเลี้ยงแบบที่มีการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทิน โดยขั้นตอนแรกทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.8 วีวีเอ็ม ภายใต้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นจึงเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับเปลี่ยนช่วงเวลาให้แสงต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง ที่ 3000 ลักซ์ ในขั้นตอนที่สอง พบว่าในการเพาะเลี้ยงขั้นตอนแรก เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 10 วัน สามารถผลิตจำนวนเซลล์สูงสุดที่ $16.33 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.23 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทินด้วยเครื่อง HPLC ไม่สามารถตรวจพบแอสตาแซนทินในสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสาหร่ายในระยะนี้ยังไม่สร้างแอสตาแซนทิน หรือไม่ก็มีปริมาณน้อยมากจนกระทั่งไม่สามารถวิเคราะห์ได้ และหลังจากเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับปรับเปลี่ยนระยะเวลาให้แสงเป็นตลอด 24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างสาหร่ายในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นขั้นตอนการเพาะเลี้ยงขั้นตอนที่สอง พบว่า สาหร่ายเริ่มผลิตแอสตาแซนทินในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.4) และค่อยๆ เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยงที่ 1.70 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 8.13 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในช่วง 7-9 และค่าร้อยละของปริมาณออกซิเจนในน้ำในช่วง 90-100 (รูปที่ 4.28-4.31 และตารางที่ 4.4)

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบ 2 ขั้นตอน กับการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบขั้นตอนเดียว เป็นเวลา 24 วัน พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักแบบ 2 ขั้นตอนมีการเจริญของเซลล์ $23.67 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.70 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 6.80 และปริมาณแอสตาแซนทิน 0.37 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบขั้นตอนเดียวมีการเจริญของเซลล์ $3.67 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.35 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณแอสตาแซนทินน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี HPLC ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ระดับ 3000 ลักซ์ มีผลให้เซลล์สาหร่ายมีการเจริญ ผลิตแคโรทีนอยด์และแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของแอสตาแซนทินภายในเซลล์สาหร่ายมีผลให้เซลล์สาหร่ายมีความทนทานต่อการกวนและสภาวะเครียดต่างๆ เนื่องจากหลังจากการเพาะเลี้ยง 12 วัน ยังคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.28** แสดงการเจริญ การผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และค่าร้อยละการละลายได้ของออกซิเจนในอาหารที่ใช้เลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** ผลของการเจริญ และการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ 2 ขั้นตอน (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | แอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 2.33±0.33 | 0.07±0.01 | 0.25±0.01 | -* |
| 2 | 5.00±0.58 | 0.14±0.01 | 0.17±0.01 | -* |
| 4 | 7.33±0.33 | 0.14±0.01 | 0.41±0.03 | -* |
| 6 | 12.00±1.15 | 0.20±0.04 | 0.83±0.03 | -* |
| 8 | 14.33±0.67 | 0.19±0.02 | 1.21±0.01 | -* |
| 10 | 16.33±1.20 | 0.23±0.01 | 1.25±0.02 | -* |
| 12 | 22.00±0.00 | 0.27±0.04 | 1.87±0.04 | 0.02 |
| 14 | 20.00±1.15 | 0.49±0.02 | 1.96±0.02 | 0.02 |
| 16 | 22.00±0.58 | 0.57±0.05 | 2.60±0.13 | 0.03 |
| 18 | 24.33±0.33 | 0.59±0.05 | 3.67±0.07 | 0.07 |
| 20 | 26.67±1.76 | 0.69±0.01 | 4.74±0.12 | 0.23 |
| 22 | 26.67±0.67 | 0.70±0.03 | 5.71±0.34 | 0.36 |
| 24 | 23.67±0.33 | 0.70±0.07 | 6.80±0.11 | 0.37 |
| 26 | 20.33±1.33 | 0.70±0.03 | 7.34±0.05 | 0.97 |
| 28 | 20.67±0.67 | 1.13±0.03 | 8.13±0.91 | 1.70 |

หมายเหตุ * หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

พบว่า จำนวนเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้นจาก $16.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น $26.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระหว่างวันที่ 10-22 ของการเพาะเลี้ยง มีน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์นี้อาจเป็นผลจากการเพิ่มระยะเวลาในการให้แสงเป็น 24 ชั่วโมง ทำให้สาหร่ายได้รับปริมาณแสงที่เพียงพอส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญเพิ่มขึ้น พร้อมกับมีการผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น และเมื่อสารอาหารหมดสาหร่ายเริ่มลดจำนวนเซลล์ลงในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง แต่ยังคงมีการผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นในเซลล์ที่รอดชีวิตจึงมีผลทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบขั้นตอนเดียว มีการลดลงของจำนวนเซลล์สาหร่ายเนื่องจาก เซลล์สาหร่ายยังไม่มีการผลิตแอสตาแซนทินในเซลล์จึงมีความทนทานต่อความเครียดได้ต่ำกว่า มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ และมีเพียงเซลล์ที่รอดชีวิตที่มีการเจริญไปเป็นซิสต์พร้อมกับการผลิตแอสตาแซนทิน จึงทำให้มีการเจริญของเซลล์ ปริมาณแคโรทีนอยด์ ในปริมาณต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Harker และคณะ (1996a) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* ใน air-lift photobioreactor ขนาด 30 ลิตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7 ที่ความเข้มแสง 50 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ (PAR) ในระบบที่มีการเติมอากาศ และก๊าซคาร์บอนไดซ์-ออกไซด์ 1.5-3.0 ลิตรต่อนาที โดยอัตราการเติมอากาศขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเลี้ยงหรืออายุสาหร่าย โดยจะมีการเติมอากาศเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์สาหร่ายเริ่มเจริญเป็นเซลล์อะพลาโนสปอร์สีเขียว และอะพลาโนสปอร์สีแดงเพื่อไม่ให้เซลล์ตกตะกอน และเมื่อสาหร่ายเจริญอยู่ในระยะการเจริญแบบคงที่ จะทำการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในวันที่ 30 35 และ 40 ของการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิโมลาร์ ในถังหมักในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง พร้อมกับการเพิ่มความเข้มแสง และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้ 2.7 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งได้ปริมาณแอสตาแซนทินถึง 5.5 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง อาจเป็นผลมาจากสัดส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของ air-lift bioreactor ต่อปริมาตรที่ใช้เพาะเลี้ยง (reactor volume) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแสงมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย โดยที่ความเข้มแสงต่ำ (ประมาณ 40-50 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ (PAR)) เซลล์ปกติสีเขียวจะมีอัตราการเจริญสูง ในขณะที่ความเข้มแสงที่สูง (ประมาณ 1,500-2,000 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ (PAR)) จะกระตุ้นให้อะพลาโนสปอร์มีอัตราสังเคราะห์แอสตาแซนทินได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณแสงต่อเซลล์ (light per cell) จะพบว่าการเพาะเลี้ยงระดับ large-scale เหมาะสำหรับการผลิตชีวมวล เนื่องจากที่ความเข้มแสงต่ำจะผลิตจำนวนเซลล์ได้ปริมาณสูง แต่จะไม่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์เนื่องจากต้องใช้ความเข้มแสงสูง นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติที่เจริญในระยะที่มีการเจริญต้องการการไหลเวียนของอาหารต่ำ เนื่องจากเซลล์มีความอ่อนแอ (fragility) ซึ่งมีผลทำให้การเจริญที่ต่ำหากมีการกวนหรือระบบการผสมที่ทำให้อาหารไหลเวียนสูง ในขณะที่เซลล์อะพลาโนสปอร์มีความทนทานมากกว่าเซลล์ปกติเนื่องจากมีผนังเซลล์ที่หนากว่า และต้องการการกวนที่มีการไหลเวียนของอาหารมากกว่าเพื่อป้องกันการตกตะกอน

จากการทดลองของ Fàbregas และคณะ (2001) ที่มีการใช้ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haeamátococcus pluvialis* แบบ 2 ขั้นตอน (two-stage culture system) เพื่อผลิตแอสตาแซนทิน โดยขั้นตอนแรกทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์สาหร่ายระยะเซลล์ปกติแบบกึ่งต่อเนื่อง (semicontinuous) สามารถผลิตจำนวนเซลล์ได้สูงถึง $64x10^6$ เซลล์ต่อลิตรต่อวัน และในระยะที่สองจะทำการเก็บเซลล์และนำไปเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ที่ความเข้มแสง 240 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 15 วัน เพื่อทำการกระตุ้นให้สาหร่ายเปลี่ยนระยะการเจริญไปเป็นอะพลาโนสปอร์และเริ่มสะสมแอสตาแซนทิน โดยตลอดระยะเวลาที่มีการชักนำไม่ทำให้จำนวนเซลล์สาหร่ายลดลง และไม่พบว่ามีการสร้างแอสตาแซนทินภายในเซลล์จนกระทั่งปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนในอาหารถูกใช้หมดไป ปริมาณแอสตาแซนทินที่ได้รับจะแปรผกผันกับการเจริญของสาหร่ายที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงขั้นตอนแรก และหลังจากการกระตุ้นเป็นเวลา 12 วัน จะได้ปริมาณแอสตาแซนทินที่ 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะเพิ่มเป็น 9.6 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง

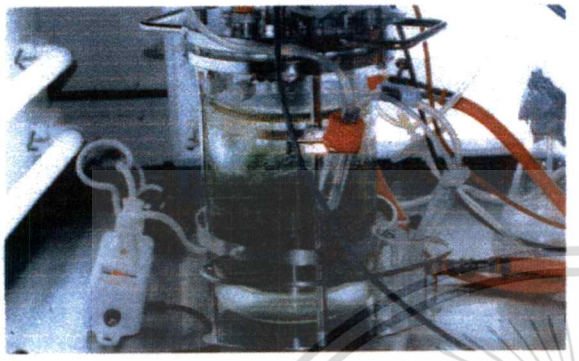
และจากการทดลองของ Hata และคณะ (2001) ที่ศึกษาบทบาทการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ในสภาวะที่ไม่ใช้แสง (heterotrophic) และสภาวะที่ใช้แสง (photoautotrophic) โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะไม่ใช้แสงให้ได้จำนวนเซลล์สูงก่อนแล้วตามด้วยการให้แสงในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สาหร่ายเริ่มสะสมแอสตาแซนทิน โดยในสภาวะที่ไม่ใช้แสงจะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร basal medium ที่มีโซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตชีวมวล (biomass production) คือ 8 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตในอาหารระหว่าง 10-30 มิลลิโมลาร์ มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และหากความเข้มข้นของอะซิเตตที่สูงกว่าความเข้มข้นดังกล่าวจะไปยับยั้งการเจริญของสาหร่าย ดังนั้นจึงใช้การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed batch) โดยมีการควบคุมระดับของความเป็นกรดด่างในอาหารที่ใช้เลี้ยง และใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตจำนวนเซลล์ได้ 7 กรัมต่อลิตร และไม่สามารถผลิตจำนวนเซลล์ได้มากกว่านี้เนื่องจากสาหร่ายเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์ปกติไปเป็นซิสต์ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะใหม่อีกครั้ง ซิสต์เจริญกลับมาเป็นเซลล์ปกติอีกครั้งและให้การเจริญของจำนวนเซลล์มากกว่าเดิม 2 เท่า และเมื่อย้ายเซลล์ปกติไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง พบว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายลดลงอย่างรวดเร็ว มีส่วนน้อยที่เกิดเป็นซิสต์และสะสมแอสตาแซนทิน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเมื่อเปลี่ยนการเพาะเลี้ยงจากสภาวะที่ไม่ใช้แสงไปเป็นสภาวะที่ใช้แสงเซลล์ปกติเจริญเป็นซิสต์ และยังคงมีการสดลงของจำนวนเซลล์แต่มีการสะสมแอสตาแซนทินที่สูง โดยสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้สูงถึง 114 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตแอสตาแซนทิน 4.4 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน

และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของเซลล์โดยจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ และปริมาณแอสตาแซนทินที่ได้จากการทดลองครั้งนี้กับการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้น พบว่าให้ผลการทดลองที่ต่ำกว่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ วิธีการเพาะเลี้ยง สูตรอาหารที่ใช้ ชนิดของอุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย โดยถังหมักที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายควรเป็นแบบ air-lift photobioreactor ที่มีการเติมอากาศด้านล่าง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในระยะเซลล์ปกติเพื่อให้เพิ่มจำนวนเซลล์ไม่ทนทานต่อการกวนที่มีความเร็วสูง ในขณะที่หากต้องการให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินสูงๆ ควรย้ายสาหร่ายไปเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูง และสามารถให้แสงอย่างทั่วถึงจะทำให้สาหร่ายสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้

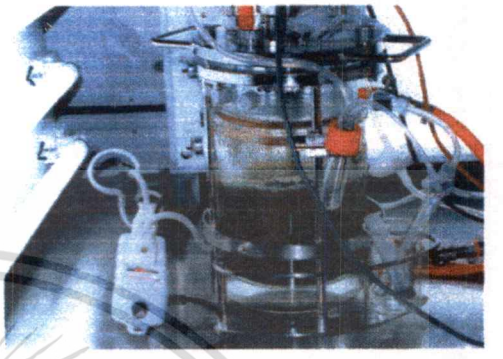
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงขึ้น นอกจากนี้จากการเพาะเลี้ยง สูตรอาหารที่ใช้ไม่มีแหล่งคาร์บอน โดยสาหร่ายจะได้รับจากคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ที่อยู่ในอากาศเท่านั้น ซึ่งมีปริมาณน้อยไม่พอเพียงต่อความต้องการของสาหร่าย ดังนั้นหากมีเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์เข้าไป พร้อมกับมีการควบคุมระดับของความเป็นกรดด่างให้คงที่ และการเติมสารส่งเสริมการเจริญเช่นไบโอติน วิตามินบี 1 และวิตามินบี 12 เข้าไปในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม อาจจะช่วยส่งเสริมให้ได้การเจริญเติบโตของสาหร่ายที่สูงขึ้น โดย Fàbregas และคณะ (2000) พบว่าการเติมไบโอตินที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อลิตร วิตามินบี 1 ความเข้มข้น 17.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ วิตามินบี 12 ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อลิตรลงในอาหาร OHM (optimal *Haematococcus* medium) ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semicontinuous) สามารถผลิตจำนวนเซลล์ได้สูงถึง $3.77x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ถึง 3 เท่า โดยอาหารสูตรโบลด์ให้การเจริญของจำนวนเซลล์ที่ $1.20x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักแบบ 2 ขั้นตอน เมื่อพิจารณาจากปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตได้คือ 8.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณแอสตาแซนทินในรูป *trans-astaxanthin* ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี HPLC มีเพียง 1.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 20.91 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Yuan และ Chen (1998) ที่พบว่าสารสกัดแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ผ่านการสปอนนิฟิเคชันจะมีปริมาณแอสตาแซนทินไม่น้อยกว่าร้อยละ 86.4 ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยจะอยู่ในรูป *trans*-astaxanthin ร้อยละ 69.1 , 9-*cis* astaxanthin ร้อยละ 7.3, 13-*cis* astaxanthin ร้อยละ 3.4 และ (3R, 3'R)-*trans*-astaxanthin ร้อยละ 6.6 ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินที่น้อยกว่าอาจเป็นเพราะว่าวิธีที่ใช้ในการสกัดมีการสปอนนิฟิเคชันไม่สมบูรณ์ ยังคงมีแอสตาแซนทินเอสเทอร์เหลืออยู่ในสารสกัดแคโรทีนอยด์ ทำให้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินซึ่งอยู่ในรูป *trans-astaxanthin* (รูปเดียวกันกับสารละลายมาตรฐานที่ใช้) จึงมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งในการทดลองนี้เป็นเพียงการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทิน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตแอสตาแซนทิน ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จึงเป็นวิธีที่ใช้ทดสอบเพื่อแสดงว่าแคโรทีนอยด์ที่ผลิตในระยะนั้นๆ เป็นแอสตาแซนทินหรือไม่ นอกจากนี้หากต้องการวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ได้ถูกต้องแน่นอนมากขึ้น จะต้องศึกษาถึงวิธีการสปอนนิฟิเคชันสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายให้สมบูรณ์ นอกจากนี้ควรมีวิเคราะห์เปรียบเทียบสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่ายที่ใช้ทดลองกับสารสกัดแอสตาแซนทินจากสาหร่าย *Haematococcus* sp. สายพันธุ์อื่นๆ และสารสกัดแอสตาแซนทินจากเปลือกกุ้ง ปูบด ร่วมกับการใช้สารละลายมาตรฐานของแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ ที่สามารถพบในสาหร่าย *Haematococcus* sp. เช่น เบต้าแคโรทีน แคนตาแซนทิน และลูทีน ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จะช่วยให้สามารถแยกโครมาโตรแกรมของแอสตาแซนทินได้ชัดเจนขึ้นและวิเคราะห์ได้ปริมาณมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.



ข.

ค.

**รูปที่ 4.29** ผลของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักแบบสองขั้นตอน

ก. ลักษณะสีของสาหร่ายหลังจากเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต พร้อมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน

ข. ลักษณะสีของสาหร่ายหลังการกระตุ้นเป็นเวลา 6 วัน

ค. ลักษณะสีของสาหร่ายหลังการกระตุ้นเป็นเวลา 18 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 4.30** สารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบ 2 ขั้นตอน ตลอดระยะเวลา 28 วัน

ก. ข. ค. ง.

**รูปที่ 4.31** ลักษณะเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างกัน

ก. เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบขั้นตอนเดียว

ข. เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบสองขั้นตอน

ค. เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ด้วยอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงในสภาวะปกติ

ง. แอสตาแซนทินสังเคราะห์ที่ผลิตเพื่อการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เมื่อนำสาหร่ายในระยะซิสต์สีแดงไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ (fresh medium) สูตรโบลด์และสูตรโบลด์ดัดแปลง สาหร่ายจะมีการเจริญไปเป็นเซลล์ปกติสีเขียวทันทีในวันที่ 2 และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ซิสต์สีแดงจะเจริญไปเป็นเซลล์ปกติสีเขียวทั้งหมดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงเลือกที่จะเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่ายอายุ 7 วัน เพื่อที่จะเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายในระยะเซลล์ปกติ และตลอดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารทั้งสองสูตรเป็นเวลา 24 วัน พบว่าสาหร่ายเริ่มสร้างแอสตาแซนทินในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 วัน สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์จะให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าในขณะที่สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า แสดงว่าโซเดียมอะซิเตตมีผลต่อการเพิ่มขนาดและเพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์ของเซลล์ ดังนั้นจึงเลือกเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง เนื่องจากมีแหล่งอาหารที่สมบูรณ์กว่าคือมีแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเตรียมหัวเชื้อในสภาวะที่ไม่เติมอากาศ และเลือกอาหารสูตรโบลด์ ในการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายในการเพาะเลี้ยงแบบเติมอากาศ เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงแล้วให้จำนวนเซลล์ที่สูงกว่า โดยใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน เนื่องจากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายพบว่าเซลล์ปกติจะเจริญเปลี่ยนเป็นซิสต์ และเริ่มสะสมแอสตาแซนทินใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 10 วัน

## 5.2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในหลอดเติมอากาศ พบว่าอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. คืออาหารสูตรโบลด์ที่ไม่ต้องเติมโซเดียมอะซิเตต และปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0 และ 0.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยสามารถให้การเจริญของจำนวนเซลล์ที่ $31.60 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.36 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.3 การศึกษาการเจริญของสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่เติมและไม่เติมอากาศ

5.3.1 การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่ายคือ อาหารสูตรโบลด์-ดัดแปลง เนื่องจากเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะ 40 วันพบว่า สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงมีน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด ที่ 0.78 กรัมต่อลิตร และ 10.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์สาหร่ายที่เจริญในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมกับอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่ $9.67x\ 10^4$ และ $11.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.3.2 การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เติมอากาศ สูตรที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคืออาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสม เพราะเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 40 วัน พบว่าให้จำนวนเซลล์สาหร่าย และปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด ที่ $18.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 2.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และหากต้องการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีการเติมอากาศจนกระทั่งสาหร่ายมีการผลิตแอสตาแซนทินจนเต็มเซลล์จะต้องใช้เวลาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมากกว่า 40 วัน ในขณะการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมอากาศสาหร่ายเริ่มมีการสร้างแอสตาแซนทินในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง และสามารถผลิตแอสตาแซนทินจนเต็มเซลล์ในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง

## 5.4 ปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน

การเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต (pH 1.5) ที่ระดับความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ จะชักนำให้สาหร่ายผลิตแอสตา-แซนทินได้สูงกว่าการชักนำด้วยการให้แสงต่อเนื่องที่ระดับแสง 3000 และ 5000 ลักซ์ เพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.5 การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

5.5.1 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์แบบขั้นตอนเดียว เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้มีการผลิตแอสตาแซนทิน โดยไม่ใช้ปัจจัยในการชักนำมากระตุ้น พบว่าสาหร่ายมีการเจริญของเซลล์สูงสุดที่ $12.67x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.21 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.89 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน และสาหร่ายเริ่มมีการสังเคราะห์แอสตาแซนทินในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง

5.5.2 จากการศึกษาระยะการเจริญของสาหร่าย (culture age) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เหมาะสมสำหรับใช้ปัจจัยชักนำให้ผลิตแอสตาแซนทิน พบว่าเซลล์สาหร่ายที่มีอายุการเจริญ 10 วัน เหมาะสมสำหรับการใช้ปัจจัยกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทิน

5.5.3 การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์แบบ 2 ขั้นตอน เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีการใช้ปัจจัยชักนำมากระตุ้นให้สาหร่ายที่มีระยะการเจริญที่เหมาะสมผลิตแอสตาแซนทิน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 10 วัน จะให้จำนวนเซลล์สูงสุดที่ $16.33x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.23 กรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งระยะนี้ยังไม่พบว่ามีการผลิตแอสตาแซนทิน และเมื่อเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตพร้อมกับให้แสงต่อเนื่องสาหร่ายจะเริ่มผลิตแอสตาแซนทินในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงและเพิ่มสูงสุดในวันที่ 28 ที่ 1.70 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 8.13 มิลลิกรัมต่อลิตร

**ข้อเสนอแนะ**

1. ในการเพาะเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียว ควรเลือกเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลง และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศ
2. การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ควรจะทำตามขั้นตอนดังนี้
   2.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรโบลด์ที่เหมาะสมในสภาวะที่มีการเติมอากาศจนกระทั่งได้การเจริญของเซลล์สูงๆ คือมีจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ระดับสูง
   2.2 นำเซลล์ที่ได้ในข้อ 2.1 มาเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง จะชักนำให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้เร็วขึ้น
3. ควรมีการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบขั้นตอนเดียวแต่มีการให้แสงอย่างต่อเนื่อง โดยไม่ต้องมีระยะเวลาการปิดเปิดแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม


บุษบา ยงสมิทซ์. 2540. จุลชีววิทยาของการหมักวิตามินและสารสี. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลธิชา โชติสิทธิพงษ์. 2541. ผลของแอสตาแซนทินต่อสี การเจริญเติบโต อัตรารอดและความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ของปลานิลสีแดง (*Tilapia nilotica* Linn) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดสายชล หอมทอง. 2541. การผลิตแอสตาแซนทินจากสาหร่าย *Haematococcus* sp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aquasearch. 2000. Astaxanthin. [Online]. Avaible: http://www.aquasearch.com/astax-3.htm.

Borowitzka M.A., Huisman J.M. and Osborn A.. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* : 1. Effect of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*. 3(4): 295-304.

Boussiba S. and Vonsak A.1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods in Enzymology*. 213:386-391.

Boussiba S., Bing W., Yaun J.P., Zarka A. and Chen F. 1999. Changes in pigment profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stress. *Biotechnology Letters*. 21(7): 601-604.

Chaumont D. and Thèpenier C. 1995. Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. *Journal of Applied Phycology*. 7(6):529-537.

Cordero B., Otero A., Patino M., Arredondo B.O. and Fàbregas J.. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with stress conditions. *Biotechnology Letters*. 18(2):213-218.

Cunningham Jr. F.X., and Gantt E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in Plants. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 49:557-583.

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

Eduard B., Tomas X., Moya M.J., Ibanez A. and Molins M.B. 1993. Significance tests in the study of the specific growth rate of *Haematococcus lacustris* : Influence of Carbon Source and Light Intensity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 76(5): 403-405.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fan L., Vonshak A., and Boussiba S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) *Journal Phycology*. 30: 829-433.

Fàbregas J., Domínguez A., Alvarez D.G., Lamela T. and Otero A. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 20(6):623-626.

Fàbregas J., Domínguez A., Regueiro M., Maseda A. And Otero A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 53:530-535.

Fàbregas J., Otero A., Maseda A. and Domguez A. 2001. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematoccus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*. 89:65-71.

Gildberg A. and Stenberg E. 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Procees Biochemistry*. 36(8-9): 809-812.

Gong X. and Chen F. 1997. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*. 9(5):437-444.

Gong X. and Chen F. 1998. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochemistry*. 33(4) : 385-391.

Gross J. 1991. Pigments in vegetables: chlorophyll and carotenoids. Chapman and Hall. USA. 350 pp.

Grünewald K., Eckert M., Hirschberg J. and Christoph H. 2000. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiology*. 122(4):1261-1268.

Grünewald K., Hirschberg J. and Hagen C. 2001. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvislis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(8):6023-6029.

Harker M., Tsavalos A.J., and Yong A.J. 1995. Use of response surface methology to optimize carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*. 7(4):399-406.

Harker M., Tsavalos A.J. and Yong A.J. 1996a. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82(2) : 113-118.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Harker, M., Tsavalos A.J. and Yong A.J. 1996b. Factors resposible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. 55 : 207-214.

Hata N., Ogbona J.C., Hasegawa Y., Tarada H. and Tanaka H. 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*. 13(5):395-402.

Janet R. Stein. 1973. Handbook of Phycological methods : Culture method and growth measurements. London:Acedemic Press. 448 pp.

Johnson E.A. and An G.H. 1991. Astaxanthin from microbial Sources. *Critical Reviews in Biotechnology*. 11(4):297-326.

Johnson E.A. and Schroeder W.A. 1996. Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma* in biotechnology for improved foods and flavors. American Chemical Society, Washington, DC.

Kakizono T., Kobayashi M., and Nagai S. 1992. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 74(6):403-405.

Kobayashi M., Kakizono T., Yamaguchi K., Nishio N. and Nagai S. 1992a. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 74(1):17-20.

Kobayashi M., Kakizono T., Nishio N. and Shiro N. 1992b. Effect of light intensity, light quanlity and illumination cycle on astaxanthin formation in green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 74(1):61-63.

Kobayashi M., Kakizono T. and Nagai S. 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(3):867-873.

Kobayashi M., Kurimura Y.,and Kakizono T. 1997a. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84(1):94-97.

Kobayashi M., Kurimura Y.,and Tsuji Y. 1997b. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters*. 19(5) : 507-509.

Kobayashi M. and Sakamoto Y. 1999. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 21(4): 265-269.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kobayashi M. and Okada T. 2000. Protective role of astaxanthin against u.v.-B irradiation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 22(3):177-181.

Kobayashi M., Katsuragi T. and Tani Y. 2001. Enlarged and astaxanthin-accumulating cyst cells of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(6):565-568.

Lee Y.K. and Ding S.Y. 1994. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *Journal Phycology*. 30: 445-449.

Lichtenthaler H.K..1999. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 50:47-65.

Lorenz R.T. and Cysewski G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin.*Trends in Biotechnology*.18(4): 160-166.

Margalith P.Z. 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51(4): 431-438.

Orosa M., Franqueira D., Cid A. and Abalde J. 2001. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnology Letters*. 23(5):373-378.

Prescott, G.W. 1970. How to know fresh water algae. Lowa:Wm.C.Brown Company Publisher.

Schoefs B., Rmiki N.E., Rachadi J. and Lemoine Y. 2001. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letters*. 500 : 125-128.

Sarada R., Sila B., Suvendu B. and Ravishankar G.A. 2002a. A Response surface approach for the production of natural pigment astaxanthin from green alga, *Haematococcus pluvialis* :Effect of sodium acetate, culture age, and sodium chloride. *Food Biotechnology*. 16(2):107-120.

Sarada R., Tripathi U. and Ravishankar. 2002b. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*. 37(6):623-627.

Tripathi U., Sarada R., Ramachandra R. and Ravishankar G.A. 1999. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*. 68(2):197-199.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Turujman S.A., Wamer W.G., Wei R.R. and Albert R.H. 1997. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. *Journal of AOAC International*. 80(3):622-632.

Wang B., Zarka A., Trebst A. and Boussiba S. 2003. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *Journal of Phycology*. 39(6) : 1116-1124.

Yin-Nin Ma R. and Chen F. 2001. Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnology Letters*. 23(7):519-523.

Yuan J.P., Gong X.D. and Chen F. 1996. Separation and identification of astaxanthin esters and chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by HPLC. *Biotechnology Techniques*. 10(9): 655-660.

Yuan J.P. and Chen F. 1998. Chromatographic separation and purification of *trans*-Astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvislis*. *Journal of Agricultural and Foood Chemistry*. 46(8):3371-3375.

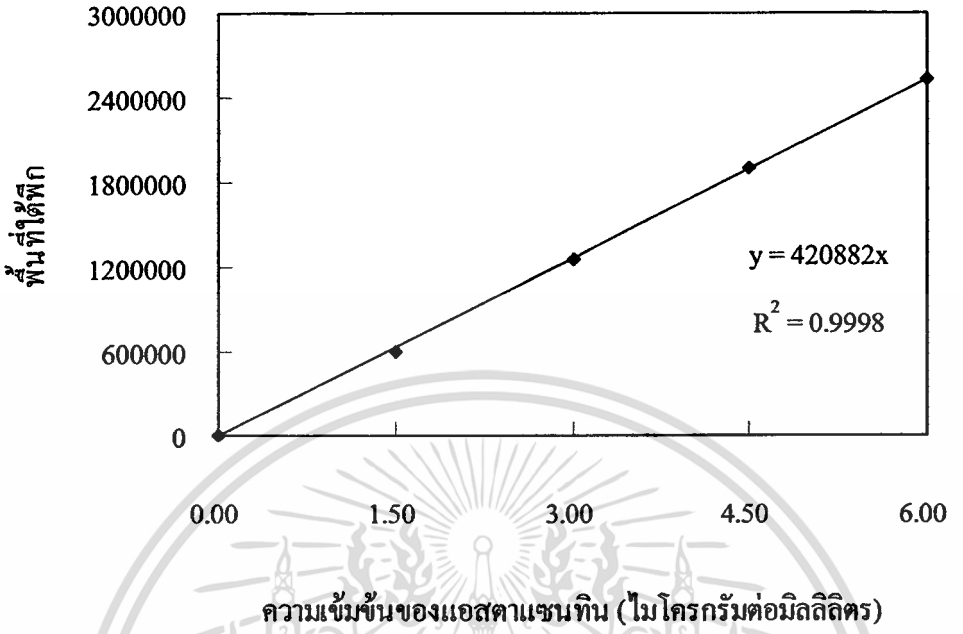
Yuan J.P. and Chen F. 1999. Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-isomers in organic solvents . *Journal of Agricultural and Foood Chemistry*. 47 (9):3656-3660.

Yuan J.P. and Chen F. 2000. Purification of *trans*-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*. 68:443-448.

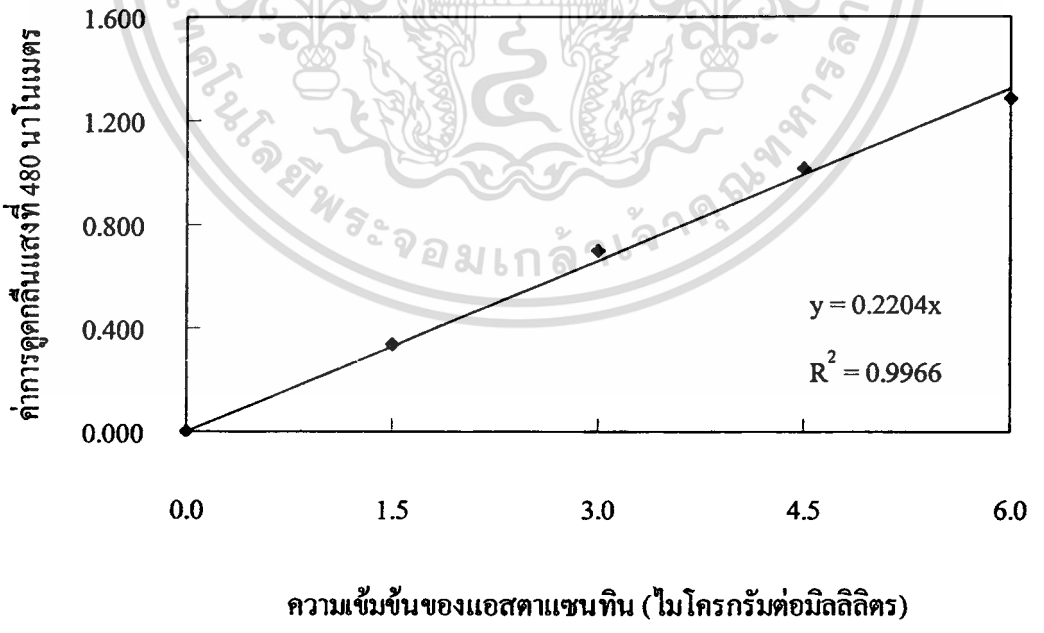
Zlotnik I., Sukenik A., and Dubinsky Z. 1993. Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Phycology*. 29:463-469.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก.




**รูปที่ ก1** กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทิน จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC




**รูปที่ ก2** กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแอสตาแซนทิน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข.

## การคำนวณการเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) และการนำไปใช้ของสารละลายเฟอรัสซัลเฟต

โดยกำหนดให้ปริมาณของเฟอรัสซัลเฟตในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นศูนย์ เนื่องจากเป็นการเติมสารเพื่อกระตุ้นสาหร่ายในระยะการเจริญแบบคงที่ ซึ่งเป็นระยะที่มีสารอาหารจำกัด

จากสูตร

$$N_1V_1=N_2V_2$$

เมื่อ $N_1$= ความเข้มข้นของสารละลายเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต

$V_1$= ปริมาตรของสารละลายเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตที่เติมลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (5 มิลลิลิตร)

$N_2$= ความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีสาหร่ายจำนวน 250 มิลลิลิตร (450 μM)

$V_2$= ปริมาตรสาหร่ายในหลอดเพาะเลี้ยง (250 มิลลิลิตร)

แทนค่า $N_1$ = 450 μM x 250 ml/5 ml = 22,500 μM = 22.5 mM

**การเตรียมสารละลายเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ 22.5 mM (pH 1.5)**

Stock solution $FeSO_4.7H_2O$ = 22.5 mM

= $22.5 \times 10^{-3}$ mole/l

= $22.5 \times 10^{-3} \times 278.02$ g/l

= 6.2554 g/l

ชั่งเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) จำนวน 6.2554 กรัมละลายและปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชด้วยสารละลายเข้มข้นของกรดซัลฟูริคจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค.

## การศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

1. ผลของโซเดียมอะซิเตตต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

| ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตต (กรัมต่อลิตร) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0 | 13.51±0.08[a] | 0.19±0.03[a] | 1.02±0.12[a] |
| 0.25 | 14.00±0.98[a] | 0.21±0.00[a] | 1.13±0.04[a] |
| 0.50 | 13.16±0.38[a] | 0.24±0.00[a] | 1.06±0.04[a] |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

2. ผลของโซเดียมไนเตรทต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

| ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท (กรัมต่อลิตร) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0.25 | 12.84±0.42[a] | 0.19±0.01[ab] | 1.09±0.02[a] |
| 0.50 | 12.44±0.89[a] | 0.20±0.02[a] | 0.93±0.08[a] |
| 0.75 | 7.98±0.30[b] | 0.14±0.01[b] | 0.75±0.02[b] |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

| ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (กรัมต่อลิตร) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0 | $19.53\pm2.13^a$ | $0.19\pm0.02^a$ | $1.06\pm0.22^a$ |
| 0.025 | $18.64\pm1.30^a$ | $0.18\pm0.01^a$ | $1.00\pm0.09^a$ |
| 0.05 | $12.04\pm0.82^b$ | $0.12\pm0.01^b$ | $0.45\pm0.06^b$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4. ผลของเฟอรัสซัลเฟตต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของ สาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

| ความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต (กรัมต่อลิตร) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0.005 | $18.07\pm0.80^{ab}$ | $0.24\pm0.01^a$ | $1.25\pm0.02^a$ |
| 0.010 | $20.87\pm1.83^a$ | $0.25\pm0.00^a$ | $1.24\pm0.00^a$ |
| 0.020 | $16.51\pm0.56^b$ | $0.19\pm0.00^b$ | $1.06\pm0.015^b$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญ และผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

| ความเข้มข้นของไดโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 0.075 | $27.91\pm1.48^{ab}$ | $0.42\pm0.01^{b}$ | $1.64\pm0.06^{b}$ |
| 0.15 | $31.29\pm1.47^{a}$ | $0.46\pm0.01^{a}$ | $2.06\pm0.13^{a}$ |
| 0.30 | $23.78\pm1.16^{b}$ | $0.38\pm0.00^{c}$ | $1.27\pm0.10^{c}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

6. ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของ สาหร่าย *Haematococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

| ความเข้มแสง (ลักซ์) | จำนวนเซลล์ ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|
| 1500 | $26.18\pm1.72^{b}$ | $0.31\pm0.01^{b}$ | $1.37\pm0.01^{b}$ |
| 3000 | $31.60\pm1.16^{a}$ | $0.36\pm0.00^{a}$ | $2.03\pm0.11^{a}$ |
| 5000 | $25.62\pm0.24^{b}$ | $0.30\pm0.00^{b}$ | $1.14\pm0.06^{b}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การศึกษาการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรโบลด์ สูตรโบลด์ดัดแปลง และสูตรโบลด์ที่เหมาะสม ในสภาวะไม่เติมอากาศ**

1. ผลของการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| โบลด์ | $2.33^{a}$ | $3.67^{b}$ | $8.00^{b}$ | $7.33^{b}$ | $6.67^{b}$ | $10.67^{a}$ | $9.67^{a}$ | $6.67^{b}$ | $8.00^{b}$ | $8.00^{b}$ | $7.67^{b}$ |
| โบลด์ดัดแปลง | $2.33^{a}$ | $6.33^{a}$ | $11.33^{a}$ | $9.67^{a}$ | $9.33^{a}$ | $9.00^{ab}$ | $10.67^{a}$ | $10.67^{a}$ | $10.33^{ab}$ | $11.00^{a}$ | $11.33^{a}$ |
| โบลด์ที่เหมาะสม | $2.33^{a}$ | $4.33^{b}$ | $7.33^{b}$ | $6.67^{b}$ | $7.00^{b}$ | $8.33^{b}$ | $9.67^{a}$ | $12.67^{a}$ | $9.33^{a}$ | $10.33^{a}$ | $9.67^{a}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

2. ผลของน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| โบลด์ | $0.04^{a}$ | $0.15^{b}$ | $0.13^{b}$ | $0.21^{a}$ | $0.23^{a}$ | $0.23^{b}$ | $0.37^{b}$ | $0.41^{b}$ | $0.47^{b}$ | $0.57^{b}$ | $0.65^{b}$ |
| โบลด์ดัดแปลง | $0.04^{a}$ | $0.25^{a}$ | $0.21^{a}$ | $0.21^{a}$ | $0.23^{a}$ | $0.38^{a}$ | $0.44^{a}$ | $0.60^{a}$ | $0.67^{a}$ | $0.68^{a}$ | $0.78^{a}$ |
| โบลด์ที่เหมาะสม | $0.04^{a}$ | $0.12^{b}$ | $0.14^{ab}$ | $0.17^{a}$ | $0.19^{a}$ | $0.27^{b}$ | $0.41^{ab}$ | $0.43^{b}$ | $0.43^{b}$ | $0.56^{b}$ | $0.67^{b}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลของน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| โบลด์ | 0.02$^{a}$ | 0.16$^{b}$ | 0.22$^{b}$ | 0.25$^{ab}$ | 0.30$^{a}$ | 0.42$^{a}$ | 0.48$^{a}$ | 0.52$^{b}$ | 0.51$^{b}$ | 0.51$^{a}$ | 0.53$^{b}$ |
| โบลด์ดัดแปลง | 0.02$^{a}$ | 0.26$^{a}$ | 0.27$^{a}$ | 0.27$^{a}$ | 0.32$^{a}$ | 0.55$^{a}$ | 0.64$^{a}$ | 0.75$^{a}$ | 0.69$^{a}$ | 0.64$^{a}$ | 0.65$^{a}$ |
| โบลด์ที่เหมาะสม | 0.02$^{a}$ | 0.15$^{b}$ | 0.17$^{c}$ | 0.18$^{b}$ | 0.23$^{a}$ | 0.45$^{a}$ | 0.48$^{a}$ | 0.56$^{b}$ | 0.57$^{b}$ | 0.57$^{a}$ | 0.57$^{ab}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

3. ผลของการผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

| สูตรอาหาร | ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| โบลด์ | 0.13$^{a}$ | 0.43$^{b}$ | 0.76$^{a}$ | 1.08$^{a}$ | 1.08$^{a}$ | 1.08$^{a}$ | 1.29$^{a}$ | 1.50$^{a}$ | 1.46$^{a}$ | 1.41$^{b}$ | 1.42$^{b}$ |
| โบลด์ดัดแปลง | 0.13$^{a}$ | 0.61$^{a}$ | 0.87$^{a}$ | 0.82$^{a}$ | 0.85$^{a}$ | 0.87$^{a}$ | 0.96$^{a}$ | 0.98$^{a}$ | 0.91$^{b}$ | 0.88$^{b}$ | 0.82$^{c}$ |
| โบลด์ที่เหมาะสม | 0.13$^{a}$ | 0.40$^{b}$ | 0.85$^{a}$ | 0.84$^{a}$ | 0.85$^{a}$ | 0.86$^{a}$ | 1.00$^{a}$ | 1.14$^{a}$ | 1.77$^{a}$ | 2.08$^{a}$ | 2.12$^{a}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทิน

1. ผลของการให้แสงอย่างต่อเนื่องต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ความเข้มแสง | ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (ลักซ์) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| สภาวะปกติ | 6.00±1.53[a] | 9.33±0.33[a] | 10.33±0.33[a] | 11.33±1.76[a] | 10.00±0.58[a] | 8.33±1.45[a] |
| 3000 | 6.00±1.53[a] | 7.67±1.20[a] | 11.33±1.33[a] | 10.67±2.60[a] | 12.00±2.89[a] | 6.67±0.88[a] |
| 5000 | 6.00±1.53[a] | 5.67±0.67[a] | 6.33±1.33[b] | 8.00±1.53[a] | 5.00±0.58[b] | 2.33±0.33[b] |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

2. ผลของการให้แสงแบบต่อเนื่องต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ความเข้มแสง | ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (ลักซ์) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| สภาวะปกติ | 0.22±0.04[a] | 0.18±0.02[a] | 0.14±0.04[b] | 0.15±0.06[b] | 0.33±0.03[b] | 0.44±0.02[a] |
| 3000 | 0.22±0.04[a] | 0.25±0.07[a] | 0.37±0.13[a] | 0.37±0.04[a] | 0.52±0.10[a] | 0.51±0.02[a] |
| 5000 | 0.22±0.04[a] | 0.20±0.02[a] | 0.36±0.03[a] | 0.36±0.09[a] | 0.38±0.06[b] | 0.47±0.03[a] |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของการให้แสงแบบต่อเนื่องต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (มิลลิกรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ความเข้มแสง | ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (ลักซ์) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| สภาวะปกติ | 0.86±0.04$^{a}$ | 1.07±0.19$^{a}$ | 1.30±0.17$^{a}$ | 1.50±0.08$^{a}$ | 1.64±0.03$^{b}$ | 1.87±0.09$^{b}$ |
| 3000 | 0.86±0.04$^{a}$ | 0.69±0.06$^{b}$ | 1.45±0.13$^{a}$ | 1.96±0.64$^{a}$ | 3.55±0.72$^{a}$ | 3.56±0.37$^{a}$ |
| 5000 | 0.86±0.04$^{a}$ | 0.56±0.03$^{b}$ | 1.22±0.26$^{a}$ | 1.46±0.27$^{a}$ | 2.78±0.23$^{b}$ | 4.28±0.59$^{a}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4. ผลของการให้แสงแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน ต่อการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

| ความเข้มแสง (ลักซ์) | ปริมาณแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ปริมาณแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) |
|---|---|---|
| สภาวะปกติ | ไม่พบในการวิเคราะห์ | - |
| 3000 | 0.06$^{a}$ | 0.18 |
| 5000 | 0.08$^{a}$ | 0.17 |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลของการให้แสงแบบต่อเนื่องร่วมกับการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ ต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (x$10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ความเข้มแสง | ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (ลักซ์) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| สภาวะปกติ | 6.00±1.53$^a$ | 9.33±0.33$^a$ | 10.33±0.33$^a$ | 11.33±1.76$^a$ | 10.00±0.58$^a$ | 8.33±1.45$^a$ |
| 3000 | 6.00±1.53$^a$ | 7.67±1.20$^a$ | 11.33±1.33$^a$ | 10.67±2.60$^a$ | 12.00±2.89$^a$ | 6.67±0.88$^a$ |
| 3000 + $FeSO_4$ | 6.00±0.53$^a$ | 9.67±1.20$^a$ | 8.33±0.88$^a$ | 7.67±0.67$^a$ | 4.33±0.88$^b$ | 2.67±0.67$^b$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

6. ผลของการให้แสงแบบต่อเนื่องร่วมกับการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสาหร่าย *Haematococcus* sp. (กรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ความเข้มแสง | ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (ลักซ์) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| สภาวะปกติ | 0.22±0.04$^a$ | 0.18±0.02$^b$ | 0.14±0.04$^b$ | 0.15±0.06$^c$ | 0.33±0.03$^b$ | 0.44±0.02$^b$ |
| 3000 | 0.22±0.04$^a$ | 0.25±0.07$^{ab}$ | 0.37±0.13$^a$ | 0.37±0.04$^b$ | 0.52±0.10$^a$ | 0.51±0.02$^b$ |
| 3000 + $FeSO_4$ | 0.22±0.04$^a$ | 0.32±0.00$^a$ | 0.37±0.05$^a$ | 0.51±0.01$^a$ | 0.61±0.01$^a$ | 0.75±0.10$^a$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ผลของการให้แสงแบบต่อเนื่องร่วมกับการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Haematococcus* sp. (มิลลิกรัมต่อลิตร) (ค่าเฉลี่ย±SE)

| ความเข้มแสง | ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| (ลักซ์) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| สภาวะปกติ | 0.86±0.04$^{a}$ | 1.07±0.19$^{a}$ | 1.30±0.17$^{a}$ | 1.50±0.08$^{a}$ | 1.64±0.03$^{c}$ | 1.87±0.09$^{c}$ |
| 3000 | 0.86±0.04$^{a}$ | 0.69±0.06$^{b}$ | 1.45±0.13$^{a}$ | 1.96±0.64$^{a}$ | 3.55±0.72$^{b}$ | 3.56±0.37$^{b}$ |
| 3000 + $FeSO_4$ | 0.86±0.04$^{a}$ | 0.98±0.02$^{a}$ | 2.05±0.31$^{a}$ | 2.34±0.39$^{a}$ | 4.96±0.01$^{a}$ | 5.92±0.31$^{a}$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

8. ผลของการให้แสงแบบต่อเนื่องร่วมกับการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 10 วัน ต่อการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

| ความเข้มแสง (ลักซ์) | ปริมาณแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ปริมาณแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) |
|---|---|---|
| เพาะเลี้ยงสภาวะปกติ | ไม่พบในการวิเคราะห์ | - |
| 3000 | 0.06$^{b}$ | 0.18 |
| 3000+$FeSO_4$ | 0.14$^{a}$ | 0.19 |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การศึกษาระยะการเจริญ (culture age) ของสาหร่ายที่เหมาะสมในถังหมัก 2 ลิตร สำหรับใช้สภาวะกระตุ้นให้ผลิตแอสตาแซนทิน**

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรที-นอยด์ และปริมาณแอสตาแซนทิน ก่อนและหลังจากถูกกระตุ้น ด้วยการเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตพร้อมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่อง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 วัน

| ปัจจัยที่ต้องการศึกษา | อายุสาหร่ายที่ใช้กระตุ้น (วัน) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 8 | 10 | 12 | 14 |
| **1. จำนวนเซลล์** ($x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | | | | |
| ก่อนการกระตุ้น | 12.67±0.33 | 13.33±0.67 | 14.33±0.67 | 9.33±0.33 |
| หลังการกระตุ้น | 1.00±0.00 | 12.67±0.33 | 6.67±0.33 | 7.67±0.33 |
| จำนวนที่ลดลง | 11.67±0.33$^a$ | 0.67±0.88$^c$ | 7.67±0.88$^b$ | 1.67±0.33$^c$ |
| **2. น้ำหนักเซลล์แห้ง** (กรัมต่อลิตร) | | | | |
| ก่อนการกระตุ้น | 0.21±0.01 | 0.23±0.01 | 0.21±0.01 | 0.21±0.01 |
| หลังการกระตุ้น | 0.50±0.01 | 0.86±0.01 | 0.89±0.01 | 0.70±0.01 |
| จำนวนที่เพิ่มขึ้น | 0.29±0.02$^d$ | 0.63±0.02$^b$ | 0.68±0.01$^a$ | 0.49±0.01$^c$ |
| **3. ปริมาณแคโรทีนอยด์** (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
| ก่อนการกระตุ้น | 0.89±0.03 | 1.34±0.03 | 1.29±0.05 | 1.13±0.02 |
| หลังการกระตุ้น | 1.03±0.00 | 7.12±0.12 | 6.01±0.18 | 6.09±0.01 |
| จำนวนที่เพิ่มขึ้น | 0.13±0.03$^c$ | 5.78±0.13$^a$ | 4.72±0.21$^b$ | 6.02±0.06$^a$ |
| **4. ปริมาณแอสตาแซนทิน** (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
| ก่อนการกระตุ้น | -* | -* | -* | -* |
| หลังการกระตุ้น | 0.01 | 0.09 | 0.06 | 0.05 |
| จำนวนที่เพิ่มขึ้น | 0.01$^c$ | 0.09$^a$ | 0.06$^b$ | 0.05$^b$ |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

* หมายถึง ไม่พบว่ามีแอสตาแซนทินในสารสกัดแคโรทีนอยด์จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้เขียน

นางสาวบุปผา จงพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 13 กรกฎาคม 2515 ที่จังหวัดสระบุรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) ปีการศึกษา 2538 จากสถาบันราชภัฏสวนสุนันทา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้