

คำบักหคสมดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

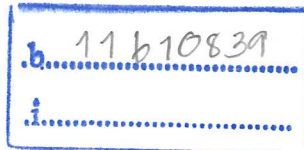
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว



นายณัฐวุฒิ	ปัญญาณะ	รหัส 44050616
นางสาวณัชฐภรณ์	ไม่อ่อนมือ	รหัส 44050617
นายคณพล	เทแก้ว	รหัส 44050618

ปพ.
ธ 3612
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....62184
วัน,เดือน,ปี.....31 ก.ค. 2549



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

Factors affecting for carotenoid production of green algae

Mr. Nuttawoot	Punyana	ID 44050616
Miss. Natthaporn	Maionmue	ID 44050617
Mr. Danupon	Takaew	ID 44050618

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for

The Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

โครงการพิเศษ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว
โดย นายณัฐวุฒิ ปัญญาณะ รหัส 44050616
 นางสาวณัฏฐภรณ์ ไม่อ่อนมือ รหัส 44050617
 นายคนุพล เทแก้ว รหัส 44050618
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.วีณา ชูโชติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
 ลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร. นवलพรรณ ฦ ระนอง กรรมการ ผศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ กรรมการ ผศ. วีณา ชูโชติ	

.....

(รศ.ดร.นवलพรรณ ฦ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ดิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงการพิเศษเรื่อง	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว			
นักศึกษา	นาย ณัฐวุฒิ	ปัญญาชนะ	รหัส	44050616
	นางสาว ณัฏฐภรณ์	ไม่อ่อนมือ	รหัส	44050617
	นาย ดนุพล	เทแก้ว	รหัส	44050618
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์			
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม			
ปีการศึกษา	2547			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. วินาธุโชติ			

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวเพื่อผลิตคาโรทีนอยด์ โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตคาโรทีนอยด์ 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. A2, *Chlorella* sp. A3, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella* sp. B4, *Scenedesmus* sp. A4, *Scenedesmus* sp. A5, *Scenedesmus* sp. B1, *Scenedesmus* sp. B3 และ *Chlorococcum* sp. D2 จากน้ำตกกระทิง จังหวัดจันทบุรีพบว่า *Chlorococcum* sp. D2 และ *Scenedesmus* sp. A5 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร N-8 ผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุด คือ 2.35 และ 2.20 มก.ต่อกรัมหน.แห้ง ตามลำดับ และเมื่อนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร N-8 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างคาโรทีนอยด์ โดยแปรผันความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 5 ระดับ (6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0) ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียม 5 ระดับ (0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00) และไนโตรเจน 5 ระดับ (0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00) จากผลการทดลองพบว่า *Scenedesmus* sp. A5 เป็นสาหร่ายที่สามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดเมื่อนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร N-8 ดัดแปลงที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.5 แมกนีเซียมซัลเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร และโปแตสเซียมไนเตรต 0.25 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้ผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 3.25 มก.ต่อกรัมหน.แห้ง รองลงมาคือ *Chlorococcum* sp. D2 ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร N-8 ดัดแปลงที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0 ความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร และโปแตสเซียมไนเตรต 0.50 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้ผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 3.02 มก.ต่อกรัมหน.แห้ง จากการวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์พบว่าสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

Special Project Title	Factors affecting for carotenoid production of green algae		
Name	Mr. Nuttawoot	Punyana	ID 44050616
	Mrs. Nuttaporn	Maionmue	ID 44050617
	Mr. Danupon	Takaew	ID 44050618
Department	Applied Biology		
Program	Industrial Microbiology		
Academic Year	2004		
Special Project Advisor	Asst. Prof. Weena	Choochote	

Abstract

Factors affecting on growth and carotenoid production of green algae, 10 genera of potent carotenoid, *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. A2, *Chlorella* sp. A3, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella* sp. B4, *Scenedesmus* sp. A4, *Scenedesmus* sp. A5, *Scenedesmus* sp. B1, *Scenedesmus* sp. B3 and *Chlorococcum* sp. D2 were isolated from Ka-ting waterfall, Chantaburi province. It was found that *Chlorococcum* sp. D2 and *Scenedeshmus* sp. A5 were cultivated in N-8 medium, showed high carotenoid production were 2.35 and 2.20 mg/g dry weight, respectively. The optimization of culture medium for growth and carotenoid production by variation on the initial of the pH was five levels (6.0 6.5 7.0 7.5 and 8.0), the magnesium concentration was five levels (0.00 0.05 0.50 0.75 and 1.00), and the nitrogen concentration was five levels (0.00 0.25 0.50 1.00 and 2.00). The maximum carotenoid yield of *Scenemesdus* sp. A5 in modified N-8 medium was 3.25 mg/g dry weight obtained at pH of 7.5, magnesiumsulfate concentration of 0.50 g/l and potassiumnitrate concentration of 0.25 g/l and the maximum carotenoid yield of *Chlorococcum* sp. D2 in modified N-8 medium was 3.02 mg/g dry weight obtained at pH of 7.0, magnesiumsulfate concentration of 0.75 g/l and potassiumnitrate concentration of 0.50 g/l on the day 8 of cultivation.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการ ผศ. วัฒนา ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษและผศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติผู้ให้คำชี้แนะแนวทาง รวมทั้งช่วยแก้ไขปัญหาและเอาใจใส่คณะผู้จัดทำมาตลอดการดำเนินงานโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้ความกรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้ และประสบการณ์ต่างๆ ทั้งในและนอกวิชาเรียนแก่ลูกศิษย์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านทั้งคหิวิทย์เก่าและตึกจุฬารัตน์ฯ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ พี่พงศ์ธร เครือฉวีธรรมและน้องเยาวภา แซ่เตียว ที่ให้คำแนะนำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงได้ดี

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ของคณะผู้จัดทำ ที่ให้การสนับสนุนอย่างเต็มที่ ทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์มาโดยตลอด ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนร่วมให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ณัฐวุฒิ	ปัญญาณะ
ณัษฐภรณ์	ไม้อ่อนมีอ
คนุพล	เทแก้ว

พฤษภาคม 2548

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	3
2.1 คาโรทีนอยด์.....	3
2.2 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียว.....	10
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างคาโรทีนอยด์.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้.....	16
3.2 สารเคมี.....	16
3.3 อุปกรณ์.....	16
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน.....	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	22
4.1 การคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณคาโรทีนอยด์.....	22
4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการผลิตคาโรทีนอยด์.....	22
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตคาโรทีนอยด์.....	26
4.3.1 ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหาร.....	26
4.3.2 แมกนีเซียม.....	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.3 ไนโตรเจน.....	32
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	36
เอกสารอ้างอิง.....	38
ภาคผนวก ก	42
ภาคผนวก ข	43
ภาคผนวก ค	52
ภาคผนวก ง	59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	23
4.2	24
4.3	25

เปรียบเทียบวิธีสกัดคาโรทีนอยด์ 3วิธี ในสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์.....

ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 10สายพันธุ์.....
ตั้งแต่วันที่ 1ถึงวันที่ 14ของการเพาะเลี้ยง

ปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย 10สายพันธุ์.....
ในวันที่ 8 10 12 และ 14ของการเพาะเลี้ยง

สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของ acyclic C ₄₀ H ₅₆ carotene, คาโรทีน (β-carotene) และแซนโทฟิลล์บางชนิด.....	4
2.2 ลักษณะการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ กัน ของคลอโรฟิลล์ a, b และคาโรทีนอยด์.....	5
2.3 antenna system ทำหน้าที่ในการรับพลังงานแสงซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบแสง.....	7
4.1 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญของ <i>Scenedesmus</i> sp. A5.....	27
เป็นระยะเวลา 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง	
4.2 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0.....	27
ต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ <i>Scenedesmus</i> sp. A5 ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง	
4.3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญของ <i>Chlorococcum</i> sp. D2.....	28
เป็นระยะเวลา 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง	
4.4 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0.....	28
ต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ <i>Chlorococcum</i> sp. D2 ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง	
4.5 ผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญของ <i>Scenedesmus</i> sp. A5 ที่ความเข้มข้น.....	30
1.00 0.50 0.25 0.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วันของการเพาะเลี้ยง	
4.6 ผลของแมกนีเซียมต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ <i>Scenedesmus</i> sp. A5 ที่ความเข้มข้น.....	30
1.00 0.50 0.25 0.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง	
4.7 ผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญของ <i>Chlorococcum</i> sp. D2 ที่ความเข้มข้น.....	31
0.75 0.50 0.05 0.00 และ 1.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง	
4.8 ผลของแมกนีเซียมต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ <i>Chlorococcum</i> sp. D2 ที่ความเข้มข้น.....	31
0.75 0.50 0.05 0.00 และ 1.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง	
4.9 ผลของไนโตรเจนต่อการเจริญของ <i>Scenedesmus</i> sp. A5 ที่ความเข้มข้น.....	33
1.00 0.50 0.25 0.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วันของการเพาะเลี้ยง	
4.10 ผลของไนโตรเจนต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ <i>Scenedesmus</i> sp. A5 ที่ความเข้มข้น.....	33
1.00 0.50 0.25 0.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง	
4.11 ผลของไนโตรเจนต่อการเจริญของ <i>Chlorococcum</i> sp. D2 ที่ความเข้มข้น.....	34
1.00 0.50 0.25 0.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วันของการเพาะเลี้ยง	
4.12 ผลของไนโตรเจนต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ <i>Chlorococcum</i> sp. D2 ที่ความเข้มข้น.....	34
1.00 0.50 0.25 0.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

มนุษย์ได้รู้จักสาหร่ายเป็นเวลานานแล้ว แต่ได้มีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์น้อยมาก ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์จึงได้สังเกตเห็นความสำคัญและประโยชน์ของสาหร่ายที่มีต่อมวลมนุษยชาติอยู่มาก เนื่องจากสาหร่ายเป็นแหล่งของสารชีวเคมีที่มีศักยภาพไม่จำกัด สารชีวเคมีที่มีศักยภาพในเชิงการค้าและมีความสำคัญในขณะนี้ ได้แก่ คาโรทีนอยด์ (carotenoid) คาโรทีนอยด์ที่สำคัญและมีมูลค่าสูง ได้แก่ เบต้า-คาโรทีน (β -carotene) ในปัจจุบันมีการผลิตจากสาหร่ายสีเขียวน้ำเค็ม *Dunaliella* และนำออกขายแล้วในรูปของสารสกัด แฉวนลอยในน้ำมันพืช หรือทำเป็นผงสาหร่ายแห้งสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร จากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าการใช้สารเคมีผสมในอาหารเพื่อให้เกิดสีในอาหาร หรือการใช้สารเคมีผสมในอาหารสัตว์เพื่อให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ จึงเป็นปัญหาที่นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยทั่วโลกต่างให้ความสนใจในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาวิธีแก้ไข จนกระทั่งได้ศึกษารงควัตถุหรือเม็ดสีในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สาหร่าย เป็นต้น และนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารทดแทนสารเคมีที่เป็นอันตราย

ตัวอย่างรงควัตถุที่นำมาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นหน่วยย่อยของคาโรทีนอยด์ เช่น เบต้า-คาโรทีน เป็นรงควัตถุสีเหลืองแดงใช้เป็นอาหารเสริมโปรวิตามินเอ สีสผสมอาหาร และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีเหลืองแดงเช่นเดียวกับเบต้า-คาโรทีน ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารหรือผสมในอาหารสัตว์เมื่อสัตว์บริโภค เช่น ในปลาทองจะมีสีจัดขึ้น ในปลาน้ำจืดและกุ้งจะทำให้มีสีสวย ส่วนในการใช้เป็นอาหารสัตว์ปีก เช่น เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีการผสมแอสตาแซนทิน จะทำให้ไข่ไก่ที่ได้มีสีแดงสด นอกจากนี้ยังมีการนำไปเป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับบริโภค เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ บะหมี่ มาการีน และอาหารประเภทอื่นๆ

การเจริญเติบโตของสาหร่ายขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายอาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ได้แก่ แมกนีเซียม โปแตสเซียม ไนโตรเจน อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพบางอย่าง เช่น ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ความเข้มแสง เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาและควบคุมการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจากนักวิทยาศาสตร์หลายหน่วยงาน เพื่อศึกษาสภาวะที่

เหมาะสมที่จะเพิ่มปริมาณสาหร่ายและผลิตคาโรทีนอยด์ให้ได้ปริมาณสูงสุด เพื่อใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณคาโรทีนอยด์
2. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุด
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสมคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียวในห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่มีการผลิตคาโรทีนอยด์ได้ในปริมาณสูงสุด โดยการเปรียบเทียบด้วยวิธีสกัดคาโรทีนอยด์แบบต่างๆ และคัดเลือกปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว เพื่อผลิตคาโรทีนอยด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตหรือสร้างคาโรทีนอยด์ได้ในปริมาณสูงสุดในสภาวะที่ควบคุมปัจจัยทางกายภาพ เพื่อที่จะนำสาหร่ายสายพันธุ์นั้นไปทำการปรับปรุง เพื่อทำการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าต่อไป
2. ทำให้ทราบและเข้าใจในกระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวมากขึ้น
3. เข้าใจถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสมคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว ที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงได้
4. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปทำการปรับปรุงหรือเผยแพร่ในส่วนที่จะเป็นประโยชน์ต่อส่วนรวมได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คาโรทีนอยด์

2.1.1 ชนิดและโครงสร้างของคาโรทีนอยด์

คาโรทีนอยด์ เป็นสารประกอบเทอร์เทอโรพีนส์ (tetraterpenes) ที่มีคาร์บอน 40 อะตอม โครงสร้างของเทอร์เทอโรพีนส์เกิดจากไอโซพรีน (isoprene) ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม มาต่อกัน 8 โมเลกุล เกิดเป็น C_{40} เรียกว่า ไลโคพีน (lycopene) (กนกร, 2543) แล้วปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองปลายที่มีคาร์บอนอะตอมมาต่อกันเป็นวง (ring structure) จึงได้เป็นคาโรทีนอยด์

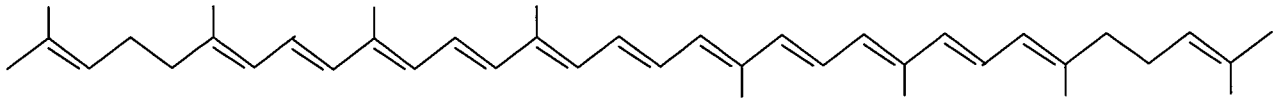
คาโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ คาโรทีนและแซนโทฟิลล์ ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานเกิดจากไอโซพรีน 8 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกันเป็น acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene (ภาพที่ 2.1) หลังจากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นคาโรทีน (carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ในที่สุด (สุดสายชล, 2541)

2.1.1.1 คาโรทีนเป็นโมเลกุลของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene ซึ่งประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่ และที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองปลายจะมีอะตอมของคาร์บอนมาเกาะเป็นวงที่เรียกว่า ionone ring ตัวอย่างของคาโรทีนคือ เบต้า-คาโรทีน (ภาพที่ 2.1)

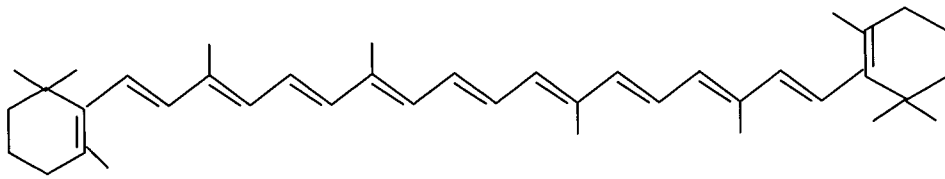
2.1.1.2 แซนโทฟิลล์ เป็นโมเลกุลที่เกิดจากการเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุลของคาโรทีน ชนิดที่พบกระจายตัวอยู่ในธรรมชาติมากที่สุด ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) อีจีนีโนน (echinenone) แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) และแอสตาแซนทิน เป็นต้น (ภาพที่ 2.1)

2.1.2 สมบัติของคาโรทีนอยด์

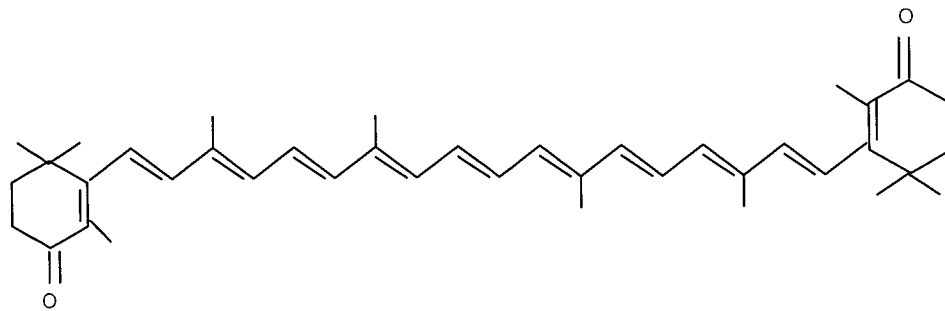
คาโรทีนอยด์เป็นสารประเภทไฮโดรคาร์บอนจึงสามารถละลายในไขมันและตัวทำละลายไขมัน (lipid solvent) เช่น อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ (alcohol) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) นอกจากนี้ยังสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (nonpolar solvents) เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane) ยกเว้นคาโรทีน



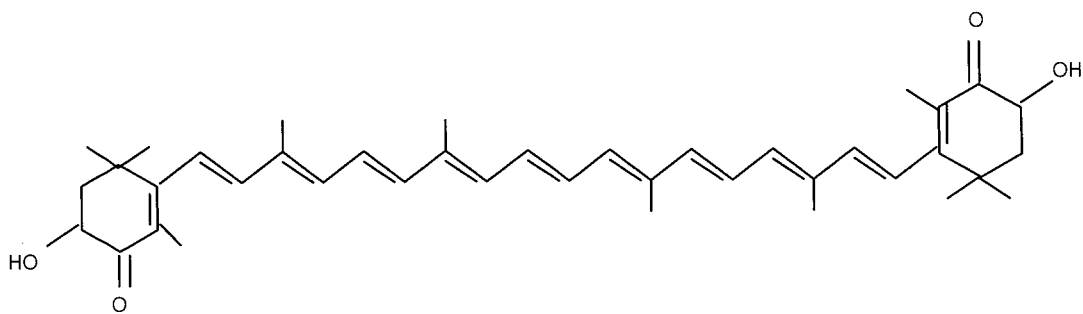
acyclic $C_{40}H_{56}$ structure (lycopene)



β -carotene



canthaxanthin



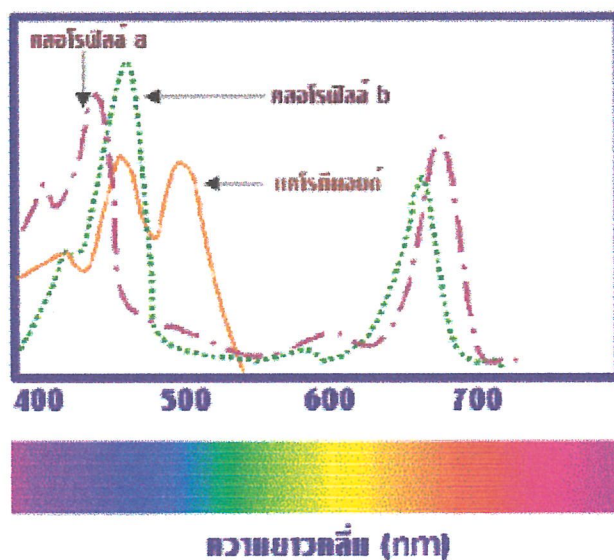
astaxanthin

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของ acyclic $C_{40}H_{56}$ carotene, คาโรทีน (β -carotene) และแซนโทฟิลล์บางชนิด
ที่มา : Jeana (1991)

พวกที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated carotene) เช่น ไฟโตอีน (phytoene) ไฟโตฟลูอีน (phytofluene) และแกมมา-คาโรทีน (δ -carotene) ซึ่งไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Goodwin, 1984) การสกัดคาโรทีนออกมามีชีวิตทำจึงได้โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น อะซีโตน แอลกอฮอล์ และสารละลายผสมของตัวทำละลายผสมทั้งสองชนิด (กนกอร, 2543) คาโรทีนอยด์ทุกชนิดเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง และทำให้เป็นผลึกได้โดยใช้ตัวละลายผสมที่เหมาะสม

คาโรทีนอยด์ มีส่วนในการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยเป็นตัวช่วยในการถ่ายทอดพลังงานรังสีที่รับไปยังคลอโรฟิลล์ คาโรทีนอยด์เป็นสารละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ สำหรับคาโรทีนละลายได้ดีในปิโตรเลียมอีเทอร์ ส่วนแซนโทฟิลล์ละลายได้ดีในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 90 แซนโทฟิลล์จะละลายอยู่ในเมทานอล ส่วนคาโรทีนจะยังคงอยู่ในปิโตรเลียมอีเทอร์ คาโรทีนอยด์สังเคราะห์ทั่วไปส่วนใหญ่เป็นเบต้า-คาโรทีน ซึ่งประกอบด้วย $C_{40}H_{56}$ มีน้ำหนักโมเลกุล 536.9 ให้สีม่วงแดง ถ้าอยู่ในสารละลายพวกไขมันจะให้สีเหลืองอ่อนถึงส้ม ถ้าอยู่ในสารละลายน้ำจะให้สีส้ม (โฆษิต, 2540)

คาโรทีนอยด์พบได้ทั่วไปทั้งในพืชและสัตว์ แต่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ขึ้นมาเองได้ จึงต้องได้รับจากพืชหรือสัตว์ที่เป็นอาหาร โดยตรงและสามารถเก็บเม็ดสีเอาไว้ในตัวของมันหรืออาจเปลี่ยนเป็นรงควัตถุรูปอื่นได้ (ฉรงค์ศักดิ์, 2533) รงควัตถุเหล่านี้อยู่ในพลาสติด (plastid) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ คาโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง-แดง โดยธรรมชาติจะดูดกลืนแสงสีน้ำเงินและเขียวได้ดีที่สุดดังภาพที่ 2.2 และจะปล่อยแสงสีเหลืองและแดงออกมาจึงเห็นเป็นสีเหลือง ส้ม หรือ แดง (วราทิพย์, 2540)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ กัน ของคลอโรฟิลล์ a, b และคาโรทีนอยด์
ที่มา : www.samakkhi.ac.th/DEPART/SCI/BIO/b/PSPgmnt2.htm

2.1.3 แหล่งของคาโรทีนอยด์

คาโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีที่มีการกระจายในธรรมชาติมากที่สุด พบทั่วไปในพืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ แต่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ขึ้นมาเองได้ จึงต้องได้รับจากพืชหรือสัตว์ที่เป็นอาหารโดยตรง

2.1.3.1 สัตว์

คาโรทีนอยด์ทำให้เกิดสีในสัตว์ได้ ยกเว้นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ทำให้เนื้อปลา มีสีส้มสวยงาม ทำให้ขนนกมีสีเหลืองถึงแดง และยังพบในแมลง สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ไม่มีกระดูก สันหลังน้ำเค็มเกือบทุกชั้น รวมทั้งพบในฟองน้ำทะเลด้วย (กนกอร, 2543)

2.1.3.2 พืช

ในคลอโรพลาสต์ของเนื้อเยื่อพืชที่มีสีเขียว จะประกอบด้วยคาโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ นอกจากนั้นยังพบเม็ดสีคาโรทีนอยด์ในโครโมพลาสต์ (chromoplast) ทำให้เกิดสีในดอกไม้ และผลไม้ ตามปกติจะไม่ค่อยพบคาโรทีนอยด์ในรากพืช แต่พบว่า มีเบต้า-คาโรทีน และแอลฟา-คาโรทีนปริมาณมากในหัวแครอท (บัญญัติ, 2532)

2.1.3.3 แบคทีเรีย

คาโรทีนอยด์ที่พบส่วนใหญ่เป็นแซนโทฟิลล์มากกว่าคาโรทีนอยด์ โดยพบอยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่สังเคราะห์ด้วยแสงบางสายพันธุ์ และพบได้มากในแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงเนื่องจากคาโรทีนอยด์มีสารสำคัญในการสังเคราะห์ด้วยแสง

2.1.3.4 รา

ราส่วนใหญ่สังเคราะห์คาโรทีนอยด์ไม่ได้ ยกเว้นราชั้นต่ำ (lower fungi) โดยสังเคราะห์ขึ้นที่ไมซีเลียม (mycelium) สำหรับเห็ดพบคาโรทีนอยด์ในเห็ดชั้นเทอเรล (chanterelle) ส่วนในยีสต์ พบได้ในยีสต์สีแดงสกุล *Rhodotorula* ได้แก่ เบต้า-คาโรทีน แกมมา-คาโรทีน โทรูลิน และ โทลูตาร์โฮดิน และยีสต์ *Phaffia* สังเคราะห์คาโรทีนอยด์ ได้แก่ แอสตาแซนทิน (กนกอร, 2543)

2.1.3.5 สาหร่าย

พบว่าทุกดิวิชันของสาหร่ายจะสร้างเบต้า - คาโรทีน ยกเว้นใน Cryptophyta ที่สร้างแอลฟา - คาโรทีน (บัญญัติ, 2532) สำหรับแซนโทฟิลล์นั้นจะแตกต่างกันออกไป

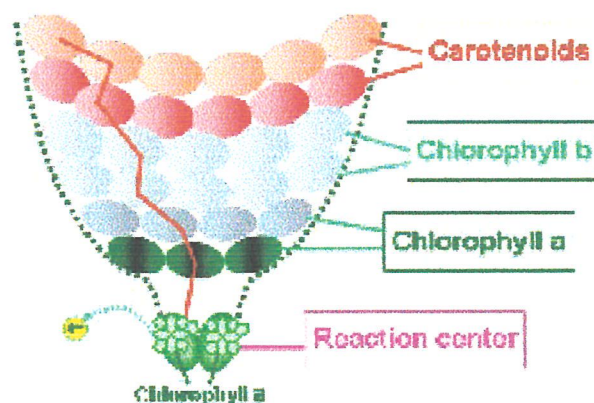
สาหร่ายสีเขียวเป็นสาหร่ายที่สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยมีรงควัตถุที่สำคัญ คือ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) และคาโรทีนอยด์

2.1.4 หน้าที่ของคาโรทีนอยด์

2.1.4.1 การสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis)

คาโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีที่ทำหน้าที่รับพลังงานแสง แล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ ในระบบ photosystem I ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายสมบูรณณ์เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในแบคทีเรีย ส่วนคาโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ และรงควัตถุอื่นๆ จะรวมตัวกันอยู่ในโครมาโตพอร์ (chromatophore) บนเยื่อเซลล์ ส่วนในพืชสีเขียวและสาหร่ายจะเป็นส่วนหนึ่งของคลอโรพลาสต์ โดยรวมกันเป็นแผ่น เรียกว่า แผ่นไทลาคอยด์ (thylakoid disk) คาโรทีนอยด์จะทำหน้าที่ดูดกลืนแสง ในช่วงที่คลอโรฟิลล์ไม่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ความยาวคลื่นสูงกว่า 680 นาโนเมตร (Moore และคณะ, 1982) ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด ทั้งคาโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ เอ ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (reaction center) ซึ่งคือ โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ชนิดพิเศษชนิดหนึ่ง (ภาพที่ 2.3) ซึ่งโมเลกุลคลอโรฟิลล์ เอ นี้เมื่อได้รับพลังงานในช่วงคลื่นที่พอเหมาะ อิเล็กตรอนใน โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ชนิดพิเศษจะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้น พร้อมทั้งจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป

หน่วยสังเคราะห์แสง (antenna system)



ภาพที่ 2.3 antenna system ทำหน้าที่ในการรับพลังงานแสงซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบแสง
ที่มา : www.ipst.ac.th/biology/Bio-Articles/mag-content21.html

2.1.4.2 การป้องกันแสง (photoprotection) เซลล์ของพืชชั้นสูง แบคทีเรีย และรา จะถูกทำลายได้โดยผ่านกระบวนการทำให้โมเลกุลของออกซิเจนถูกกระตุ้น (excited oxygen molecule) คาโรทีนอยด์ทำหน้าที่เป็นตัวป้องกัน ซึ่งสามารถระงับโมเลกุลออกซิเจนที่ถูกกระตุ้นเหล่านั้นได้ (กนกอร, 2543)

2.1.4.3 การรับแสง (photoreception)

กระบวนการมองเห็นภาพขึ้นอยู่กับกลุ่มเม็ดสีที่ไวต่อแสง (photosensitive pigments) คือ โรดอปซิน (rhodopsin) ซึ่งอยู่ที่เรตินาของดวงตา โรดอปซินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างออปซิน (opsin) กับ 11-ซิส-เรตินัลดีไฮด์ (11-cis-retinaldehyde) โดยสารประกอบทั้งสองเป็นไอโซเมอร์ของ วิตามิน เอ ซึ่งได้มาจากเบต้า-คาโรทีน ถ้าขาดวิตามิน เอ ปริมาณโรดอปซินในเรตินาจะลดลง ทำให้เกิดภาวะมองไม่เห็นในที่มืดหรือสลัว (สิรินทร์ และคณะ, 2523)

2.1.4.4 ทำให้เกิดสีในเนื้อเยื่อต่างๆ

คาโรทีนอยด์สามารถทำให้เกิดสีขึ้นในเนื้อเยื่อต่างๆ ทั้งในสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ขึ้นได้เองและที่สังเคราะห์ไม่ได้ เมื่อสัตว์ได้รับคาโรทีนอยด์ปริมาณมากจะเกิดการสะสมที่ผิวหนัง เช่น ปลาเทราท์ จะสะสมลูทีนที่บริเวณผิวหนัง ไข่ และตับ

2.1.5 การเก็บรักษาคาโรทีนอยด์

ในกระบวนการสกัด ทำให้บริสุทธิ์ และการเก็บรักษา จำเป็นต้องรู้ถึงวิธีป้องกันมิให้คาโรทีนอยด์สลายตัวไปจากปฏิกิริยาเคมีต่างๆ โดยเฉพาะการเติมออกซิเจน Bauernfeind (1981) กล่าวถึงวิธีเก็บรักษาคาโรทีนอยด์ไว้ดังนี้

2.1.5.1 ป้องกันคาโรทีนอยด์จากแสงสว่าง ความร้อน และออกซิเจน แสงสว่างมีผลต่อคาโรทีนอยด์ 2 ประการ คือ ประการแรกเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ ซิส-ทรานส์ของพันธะคู่ ทำให้เปลี่ยนช่วงการดูดกลืนแสง ซึ่งมีผลต่อสมบัติการให้สีของคาโรทีนอยด์ ประการที่สองเกี่ยวกับการออกซิไดซ์ของสายคาร์บอนอะตอม ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของโครมาโตฟอร์ ทำให้คาโรทีนอยด์ไม่สามารถแสดงสีได้ สภาพดังกล่าวแก้ไขได้โดยเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น butylated hydroxyanisole (BHA) หรือ butylated hydroxytoluene (BHT) นอกจากการใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตและระหว่างเก็บรักษาจะเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียของคาโรทีนอยด์ได้ การให้คาโรทีนอยด์สัมผัสกับออกซิเจนหรืออะซิโตนก็ทำให้คาโรทีนอยด์เสียสภาพเร็วยิ่งขึ้น พบว่าหากมีการเอาน้ำออกจากอาหารจะทำให้เก็บได้นาน 12 สัปดาห์ และสูญเสียแซนโทฟิลล์ไป 52 - 71 %

หากใช้กระบวนการแช่แข็งจะสูญเสียเพียง 38 % และจากการศึกษานี้พบว่า หากเติมสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด เช่น ethoxyquin และเก็บรักษาภายใต้สภาวะสุญญากาศจะทำให้ลดการสูญเสียของคาโรทีนอยด์ได้มากขึ้น

2.1.5.2 ป้องกันคาโรทีนอยด์จากกรดและด่าง ในสภาพที่เป็นกรดทำให้เกิดการสูญเสียความคงทนระหว่างคาร์บอนอะตอม เป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียคาโรทีนอยด์ทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพ เมื่อคาโรทีนอยด์ถูกกับด่างทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพ หากใส่ด่างลงในคาโรทีนอยด์ที่เดิมมีสีแดง จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน เกิดเป็นสารอีกชนิดหนึ่งคือ violerythrin

2.1.5.3 ป้องกันคาโรทีนอยด์จากเอนไซม์ สีแดงในปลาบางชนิดหายไปในขณะที่เก็บไว้ในตู้เย็นและในที่มืด ทั้งนี้เกิดจากเอนไซม์บางชนิดในตัวปลาถูกปล่อยออกมาและไปมีผลต่อปริมาณคาโรทีนอยด์บางชนิด เช่นทำให้แอสตาแซนทิน ฟูนาแซนทินและเบต้า-คาโรทีน ลดลงจนทำให้สีจางหายไป

2.1.6 ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์

2.1.6.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์

ใช้เป็นสีผสมอาหาร โดยเฉพาะเบต้า-คาโรทีน โดยใช้ผสมในอาหารประเภทไขมันต่างๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาร์การีน น้ำมันพืช และผลิตภัณฑ์มักกะโรนี เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางประเภทน้ำสั้ม และอาหารประเภทอื่น โดยใช้เบต้า-คาโรทีนที่ถูกปรับปรุงและสังเคราะห์คือ แคนทาแซนทิน และอะโปคาโรทีนอยด์ ซึ่งสามารถละลายหรือกระจายตัวในน้ำได้ (Britton, 1983)

2.1.6.2 ใช้เป็นอาหารสัตว์

ในการทำเป็นอาหารสัตว์จะใช้ชีวมวลโดยตรง ไม่จำเป็นต้องนำไปสกัดแยกแต่ละชนิดออกมา เช่น ในสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ และสัตว์จำพวกคัสตาเซียน (crustaceans) เช่น กุ้ง กั้ง และปูต่างๆ ตามธรรมชาติแล้วสัตว์เหล่านี้จะได้รับรงควัตถุนี้จากอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด ทำให้สีของเนื้อสัตว์มีสีจางจืดจางไม่สวยและขายได้ในราคาต่ำ ดังนั้นผู้เลี้ยงจึงนิยมใช้คาโรทีนอยด์เติมลงไปในการเพาะเลี้ยง เพื่อที่จะทำให้สัตว์น้ำดังกล่าวขายได้ในราคาสูง และนอกจากทำให้เนื้อหนัง ไข่ มีสีส้มที่สวยงามขึ้นแล้ว สัตว์เหล่านี้ยังได้รับ โปรตีนและวิตามินอีกด้วย ในสัตว์ปีกคาโรที-

นอยด์มีส่วนในการเพิ่มสีของไข่แดง ให้เป็นที่ต้องการของตลาด โดยเป็นส่วนผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยง (Lorenz and Cysewski, 2000)

2.1.6.3 เป็นโปรวิตามิน เอ

เบต้า-คาโรทีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามิน เอ ที่สำคัญที่สุด โดยโมเลกุลของเบต้า-คาโรทีนจะถูกตัดตรงกลางด้วยเอนไซม์ β -carotene 15, 15'-oxygenase กลายเป็น 2 โมเลกุลของเรตินัลดีไฮด์ ภายในลำไส้และตับของสัตว์ จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นเรตินอลโดยเอนไซม์เรตินัลรีดักเตส (retinal reductase) (กนกอร, 2543)

2.1.6.4 ใช้ในทางเภสัชกรรม

จากการเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามิน เอ ของเบต้า-คาโรทีน จึงสามารถใช้ในการปรับสภาพและป้องกันการขาดวิตามิน เอ ได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารป้องกันแสงเพื่อปกป้องผิวหนังจากอาการคัน ไหม้ และเป็นผื่น ที่เกิดจากการรับแสงแดดของคนไข้ที่เป็นโรคไวต่อแสง (photosensitivity diseases) (Frossberg และคณะ, 1959)

ในการผลิตยาจะใช้คาโรทีนอยด์ เช่น เบต้า-คาโรทีน และแคนทาแซนทิน เป็นส่วนผสมในน้ำตาลที่เคลือบบนเม็ดยา ผสมลงเจลาตินที่ใช้ทำแคปซูล (Munzel และ Fuller, 1961)

จากการศึกษา แอสตาแซนทินช่วยปกป้องผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตซึ่งก่อให้เกิดโรคมะเร็งและเพิ่มการต่อต้านการติดเชื้อจากไวรัส แบคทีเรีย และพาราสิต (Lorenz and Cysewski, 2000)

2.2 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียว

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

ลัดดา (2544) กล่าวถึงลักษณะของสาหร่ายสีเขียวไว้ดังนี้คือ คลอโรพลาสต์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ และ บี สารสีประกอบ ได้แก่ คาโรทีน เช่น เบต้า-คาโรทีน แอลฟา-คาโรทีน และแซนโทฟิลล์ เช่น ลูทีน ไดอะโตแซนทิน (diatoxanthin) และ นีโอแซนทิน (neoxanthin) สารสีรวมอยู่ในคลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีมากกว่า 1 อัน สาหร่ายสีเขียวมีหรือไม่มีผนังเซลล์ ถ้าไม่มีจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ pellicle, periplast หรือเป็นแบบ scale หนวด (flagella) มีจำนวน 1 2 4 8 และ 16 เส้น ลักษณะของหนวดมีหลายแบบ เช่น หนวดที่มีลักษณะคล้ายเส้น (acronematic) หรือหนวดแบบมีเกล็ด (antonematic) จุดตั้งต้นของหนวดอยู่ที่ apical cell หรือ subapical cell ความยาวอาจเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้ อาหารสะสม (starch) ได้แก่ true starch หรือแป้งที่พบในพืช

ชั้นสูง (paramylon) อยู่ในไซโทพลาสซึมหรือคลอโรพลาสต์ รูปร่างของเซลล์มีหลายแบบ เช่น กลม รี กระสวย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โคลโลนี บางชนิดเป็นเส้นสาย (filament)

2.2.2 การจำแนกหมวดหมู่

ยูวดี (2546, อ้างจาก Bold และ Wynne, 1978) ได้แบ่ง Division Chlorophyta ออกเป็น 1 คลาส 15 ออร์เดอร์

2.2.2.1 Class Chlorophyceae

ลักษณะสำคัญประจำคลาส

คลาสนี้เป็นกลุ่มของสาหร่ายสีเขียว (green algae) มีสารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ และ บี ส่วนคาโรทีน ได้แก่ แอลฟา-คาโรทีน เบต้า-คาโรทีน และแกมมา-คาโรทีน ส่วน แซนโทฟิลล์ ได้แก่ ลูทีน นีโอแซนทิน และ วิโอลาแซนทิน (violaxanthin) สารสีอยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งมีหลายแบบเช่น รูปถ้วย (cup-shape) รูปเกือกม้า (girdle-shape) เป็นตาข่าย (reticulate) ขดเป็นเกลียว (spiral) แฉกรูปดาว (stellate) และ เป็นแถบ (band-shape) พืชเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ชั้นในเป็นพวกเซลล์ลูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพกตินบางชนิด เช่น *Volvox* เป็นโคลโลนี ไม่มีเซลล์ลูโลส มีแต่เพกติน *Desmids* สามารถผลิตสารเมือก (mucilaginous substances) มาห่อหุ้มเซลล์ หนวดพบเฉพาะพวกที่เคลื่อนไหวได้มีจำนวน 1 2 4 และ 8 เส้น หรือเป็นวงรอบเซลล์ มีลักษณะคล้ายเส้น ถ้ามีหนวดมากกว่า 2 เส้น ความยาวหนวดจะเท่ากัน ตำแหน่งของหนวดมี 2 ตำแหน่งคือ apical และ subapical cell อาหารสะสม ส่วนใหญ่คือแป้ง amylose และ amylopectin สะสมอยู่ในไพเรโนอิด (pyrenoid) ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ ที่เหลือจะสะสมอาหารอยู่ในรูปน้ำมัน และกลีเซอรอล

รูปร่างลักษณะ

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งเซลล์เดี่ยว โคลโลนี และเส้นสาย พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคลโลนีมีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 พวกที่มีหนวดจะมีออร์แกนที่มีสีเรียกว่าตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด

วัฏจักรชีวิต (life cycle)

วัฏจักรชีวิตมี 2 แบบคือ แบบ แฮพลอนติก (haplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะไซโกตแบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ พบใน Order Volvocales และแบบ

ดิพลอนติก (diplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะสร้างแกมีตพบในบางสกุลของ Order Chlorococcales

การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศกล่าวคือแบบอาศัยเพศ โดยการรวมกันของแกมีต ซึ่งมีทั้งแบบ ไอโซแกมีต (isogamete) แอนไอโซแกมีต (anisogamete) และ โอโอแกมีต (oogamete) ส่วนแบบไม่อาศัยเพศ มีทั้งการแบ่งเซลล์ สร้างสปอร์ และสร้างอะคีนีต (akinetes)

แบ่งออกเป็น 15 Order ดังนี้

1. Order Volvocales
2. Order Tetrasporales
3. Order Chlorococcales
4. Order Chlorosarcinales
5. Order Chlorellales
6. Order Ulotrichales
7. Order Chaetophorales
8. Order Oedogoniales
9. Order Ulvales
10. Order Cladophorales
11. Order Acrosiphoniales
12. Order Caularpaceae
13. Order Siphonocladales
14. Order Dasycladaceae
15. Order Zygnematales

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างคาร์ทีนอยด์

2.3.1 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

ค่าความเป็นกรดเป็นด่างมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต เมตาบอลิซึม อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างจะมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ แต่จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณไบคาร์บอเนต (Shirota, 1996; Reid และ Wood, 1976) สาหร่ายแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่างกัน Lilly และคณะ (1960) พบว่าเชื้อรา *Choanephora cucurbitarum* สังเคราะห์คาร์ทีนอยด์ได้ดีที่ระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารใกล้ๆ 7 ซึ่งสอดคล้องกับออร์พรรณ (2532) ที่ทดลองเลี้ยง *Chlorella* sp. พบว่าในอาหารเลี้ยงที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 7.5 จะผลิตคาร์ทีนสูงสุด และที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0 ผลิตแซนโทฟิลล์ดีที่สุด สรวิศและคณะ (2538) ได้ทดลองเลี้ยง *D. salina* ที่ระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างแตกต่างกันพบว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *D. salina* มีค่าเท่ากับ 7.36 ถ้าทำการเพิ่มหรือลดค่าความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารเลี้ยงจะทำให้อัตราการเจริญลดลง ดังนั้น ค่าความเป็นกรดเป็นด่างมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต แต่ไม่มีผลต่อปริมาณคาร์ทีนอยด์ของ *D. salina* (สรวิศ, 2536) Proctor (1957) รายงานว่า ในสาหร่ายสีเขียวเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.5 และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 4 และไม่เป็นบัฟเฟอร์ในอาหารสูตรที่มีแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าการเจริญของสาหร่ายจะถูกยับยั้ง Wegmann และ Metzner (1971) กล่าวว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ด้วยแสง ส่วนใหญ่จะมีค่าต่ำ เช่น ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6 จะเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Dunaliella tertiolecta*

2.3.2 แมกนีเซียม

เนื่องจากแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์ เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมมากขึ้นเซลล์จะสร้างคลอโรฟิลล์ได้มากขึ้น ทำให้สามารถดูดกลืนพลังงานมาใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงได้มากขึ้น จึงเจริญเติบโตได้รวดเร็ว Fabregas และคณะ (1999) ได้ทำการวิจัยหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *H. pluvialis* พบว่าแมกนีเซียมที่ระดับความเข้มข้น 100 เท่า ได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด นอกจากนั้นซัลเฟอร์ซึ่งอยู่ในรูปของซัลเฟตในอาหารยังจำเป็นต่อการเจริญ ดังนั้นเมื่อเพิ่มซัลเฟตลงในอาหารเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียจึงจะนำซัลเฟตไปใช้ในการเจริญเพิ่มขึ้นด้วย (กนกอร, 2543) ดังนั้นถ้าเซลล์มีปริมาณแมกนีเซียมมากเพียงพอที่

นำไปสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง เซลล์ก็ไม่มี ความจำเป็นที่จะสร้างรงควัตถุจำพวกคาโรทีนอยด์มาช่วยรับแสง (กนกอร, 2543) อรพรรณ (2532) พบว่า *Chlorella* sp. มีการผลิตคาโรทีนและแซนโทฟิลล์ได้สูงสุดเมื่อลดแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงลงครึ่งเท่า และผลิตได้น้อยลงเมื่อเติมแมกนีเซียมลงในอาหาร 1 2 และ 3 เท่า

2.3.3 ไนโตรเจน

ธาตุไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน โคอเอ็นไซม์ กรดนิวคลีอิก และคลอโรฟิลล์ ธาตุไนโตรเจนจึงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญส่วนหนึ่งของน้ำหมักแห้งของเซลล์สาหร่าย รูปแบบของธาตุอาหารไนโตรเจนที่สาหร่ายทั่วไปนำมาใช้เป็นสารประกอบอินทรีย์ได้แก่ รูปไนเตรต (NO_3^-) ไนไตรต์ (NO_2^-) และแอมโมเนียมไอออน (NO_4^+) แต่ถ้ามีการใช้ไนเตรตในรูปแอมโมเนียมไอออน มากกว่า 1 มิลลิโมล เป็นอาหารสำหรับสาหร่าย จะทำให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายลดลงอย่างรวดเร็วและสาหร่ายจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโต และความเข้มข้นของไนไตรต์ควรต่ำกว่า 1 มิลลิโมล เพราะถ้ามีความเข้มข้นของไนไตรต์มากกว่า 1 มิลลิโมล อาจมีผลยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเช่นกัน (จันทนา, 2546) Withers และ Haxo (1978) รายงานว่าปริมาณเบต้า-คาโรทีนของสาหร่ายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้ออยู่ในระยะสแตชันนารี (stationary phase) มากกว่าระยะล็อก (log phase) เนื่องจากเกิดการขาดอาหาร โดยเฉพาะไนเตรต โดยเซลล์จะเจริญเติบโตได้ และผลิตเบต้า-คาโรทีนได้ดีเมื่อระดับไนโตรเจนในอาหารต่ำถึง 1 มิลลิโมลาร์ เมื่อลดความเข้มข้นของไนโตรเจนจาก 5 มิลลิโมล เป็น 0.5 มิลลิโมล จะทำให้ความเข้มข้นของเบต้า-คาโรทีนเพิ่มขึ้นจาก 0.5% เป็น 5% (โฆษิต, 2540)

Ray (1976) พบว่าการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์จะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับ โฆษิต (2540) ที่กล่าวว่าในขณะที่การลดลงของปริมาณไนเตรต จะทำให้อัตราการเจริญลดลงและปริมาณคาโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น เพราะฉะนั้นประโยชน์ในการจำกัดการเจริญเติบโตโดยการจำกัดความต้องการไนโตรเจนจะทำให้ผลผลิตเบตาคาโรทีนสูงสุด (Ben-Amotz และ Avron, 1983; Shaish และคณะ, 1991)

ความสัมพันธ์ของคลอโรฟิลล์กับคาโรทีนอยด์ เมื่อจำกัดฟอสฟอรัสจะมีคลอโรฟิลล์มากกว่าคาโรทีนอยด์ แต่เมื่อจำกัดไนโตรเจนจะมีคาโรทีนอยด์มากกว่าคลอโรฟิลล์ (Ketchum และคณะ, 1985) โดยที่การเปลี่ยนแปลงแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนสามารถปรับได้ด้วยการปรับความเข้มของฟอสฟอรัส เพื่อรักษาอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสให้มีความคงที่ เพราะถ้ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส จะส่งผลกระทบต่อการเจริญของสาหร่ายเป็น

อย่างมาก โดยเป็นมากกว่าเกิดความแปรปรวนของความเข้มข้นของไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (วราทิพย์, 2540) ในการปรับอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส จะปรับให้เป็น 1 ต่อ 50 ส่วน ตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้

ทำการคัดเลือกสาหร่าย 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. A2, *Chlorella* sp. A3, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella* sp. B4, *Scenedesmus* sp. A4, *Scenedesmus* sp. A5, *Scenedesmus* sp. B1, *Scenedesmus* sp. B3, และ *Chlorococcum* sp. D2 จากน้ำตกกระทิง จังหวัดจันทบุรี

3.2 สารเคมี

1. อะซิโตนเข้มข้น 90%
2. แมกนีเซียมคาร์บอเนต
3. บีโตรีเลียม อีเทอร์
4. เอทานอล 90%
5. โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 45%
6. ไดเอทิลอีเทอร์
7. โซเดียมคลอไรด์

3.2 อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว เช่น หลอดทดลอง ฟลาสก์ กระบอกตวง ปิเปต ฯลฯ
2. หลอดเพาะเลี้ยง (culture tube) เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 ซม. สูง 30 ซม. มีช่องให้อากาศ เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.
3. หลอดฟลูออเรสเซนต์ FL 18 W/T8/D Daylight 1090Lm 61 Lm/W ของ TOSHIBA
4. ปั่นลมรุ่น Heavy duty industrial ของ Puma Taiwan
5. วาล์วปรับแรงลมแบบสแตนเลส
6. สายยางขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
7. สายยางซิลิโคน เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
8. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar airflow) (ABS 1200)
9. เครื่องเขย่า (shaker) (innova 2000)
10. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) (Falcon 6/300 : Sanyo)

11. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) 15 มล.
12. ตู้อบ (oven) (Memmert)
13. โถดูดความชื้น (desiccator) (Glaswerk wertheim GL32)
14. กรวยแยก (separatory funnel) 250 มล. (Witeg Preciso)
15. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ของ HACH
16. กล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus
17. อ่างน้ำร้อน (water bath) ของ Clifton
18. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) (Hirayama : HA 300 M IV)
19. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Sartorius : A200 S)
20. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) (TOA : HA-7E)

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณคาโรทีนอยด์

1.1 การหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด

นำสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากน้ำตกกระทิง จังหวัดจันทบุรี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. B4 และ *Scenedesmus* sp. A4 มาเพาะเลี้ยงเพื่อหาวิธีการสกัดคาโรทีนอยด์ที่เหมาะสม

1.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในพลาสติก

เจ็ยเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. B4 และ *Scenedesmus* sp. A4 แต่ละสายพันธุ์มาใส่พลาสติกที่มีอาหารสูตร N-8 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาเขย่าที่ความเร็วรอบ 185 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้นี้มาสกัดเพื่อหาปริมาณคาโรทีนอยด์ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

1.1.2 วิธีหาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด

หาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด 3 วิธี ดังนี้ วิธีที่ 1 วิธีของ Strickland และ Parson (1968) วิธีที่ 2 วิธีของสุดสายชล (2541) และวิธีที่ 3 วิธีของ KMITT (1996)

1.1.2.1 วิธีการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ทั้งหมด (total carotenoid) (Strickland และ Parson, 1968)

1.1.2.1.1 นำน้ำเลี้ยงสาหร่ายที่ทราบปริมาณแน่นอน (5 มิลลิลิตร)

1.1.2.1.2 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

1.1.2.1.3 เติมสารละลายอะซิโตนที่เข้มข้น (เข้มข้น 90%) 10 มิลลิลิตร พร้อมกับเติม โซเดียมคาร์บอเนต 1 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดให้สนิท

1.1.2.1.4 นำสารละลายที่ได้ในอะซิโตนไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

1.1.2.1.5 รินสารละลายที่ใส่ไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร

1.1.2.1.6 คำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด} = \text{ABS}_{452} \times 3.86 \times \frac{\text{ปริมาตรสารหยาบทั้งหมด}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างสารหยาบ}}$$

1.1.2.2 การสกัดและตรวจวัดหาปริมาณคาโรทีนอยด์ (สุคสายชล, 2541)

1.1.2.2.1 เก็บตัวอย่างสารหยาบมา 10 มิลลิลิตร

1.1.2.2.2 ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างใน centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเซลล์ออกมาเพื่อใช้ต่อไป

1.1.2.2.3 เติมอะซิโตน (เข้มข้น 90%) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่บรรจุเซลล์อยู่ จากนั้นหุ้มหลอดทดลองดังกล่าวด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บในที่มืดและเย็นเป็นเวลา 1 คืน เพื่อป้องกันการสลายตัวด้วยแสงและความร้อน

1.1.2.2.4 สกัดสารละลายที่กรองได้นั้นด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์อีกครั้ง ในกรวยแยก สารที่อยู่ในกรวยแยกจะประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนบนจะเป็นชั้นของคาโรทีนอยด์ที่ละลายใน อะซิโตนและปิโตรเลียมอีเทอร์ ส่วนล่างจะเป็นชั้นของน้ำ

1.1.2.2.5 ปล่อยให้ชั้นที่เป็นน้ำออกไปและเก็บสารละลายส่วนบนมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์

1.1.2.2.6 นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่ปรับปริมาตรแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และใช้ค่า absorption coefficient A1% เท่ากับ 2500 โดยจะนำค่าที่ได้ไปคำนวณดังสูตร จะได้ค่าความเข้มข้นของคาโรทีนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$\text{ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด} = \frac{\text{ABS}_{470} \times 100 \text{ (ปริมาตรของ petroleum ether)} \times 10^3}{2500 \times 100 \times \text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}}$$

1.1.2.3. การวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ดัดแปลงจาก (KMUTT, 1996)

1.1.2.3.1 ปั่นเหวี่ยงเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนน้ำทิ้ง

1.1.2.3.2 เติมนีออนอล (เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์) 2 มิลลิลิตร และ โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ (45%KOH) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.1.2.3.3 สกัดในอ่างน้ำร้อนที่ 50 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

1.1.2.3.4 นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3600 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

1.1.2.3.5 ใส่น้ำสกัดลงในกรวยแยก

1.1.2.3.6 เติมนิโอดีทิลอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร และ โซเดียมคลอไรด์ (90 กรัมต่อลิตร) จำนวน 4 มิลลิลิตร

1.1.2.3.7 เขย่า ปล่อยให้ตั้งไว้จนแยกชั้น

1.1.2.3.8 ไขชั้นสีเขียวออกช้าๆ

1.1.2.3.9 เติมนิโอดีทิลอีเทอร์ (90 กรัมต่อลิตร) 2 มิลลิลิตร ลงในชั้นเหลือง ทำซ้ำขั้นตอนที่ 1.1.2.3.7. – 1.1.2.3.9. จนกระทั่งสารละลายแยกเป็นชั้นใสไม่มีสี กับสีเหลือง

1.1.2.3.10 ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยนิโอดีทิลอีเทอร์

1.1.2.3.11 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์จากสูตร

$$\text{ปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด} = \frac{\text{ABS}_{450} \times 5 \times 1000}{260 \times \text{นน.แห้ง (มก.)}}$$

2. การคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุด

นำสาหร่ายที่แยกได้จากน้ำตกกระทิง จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. A2, *Chlorella* sp. A3, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella* sp. B4, *Scenedesmus* sp. A4, *Scenedesmus* sp. A5, *Scenedesmus* sp. B1, *Scenedesmus* sp. B3, และ *Chlorococcum* sp. D2 นำมาเลี้ยงเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายที่สร้างคาโรทีนอยด์ได้สูงสุด

2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในหลอดเพาะเลี้ยง

ขั้นแรกทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ในฟลาสก์เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 1.1.1 จากนั้นถ่ายเชื้อสาหร่ายที่ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร N-8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาวความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และเมื่อสาหร่ายเริ่มเข้าระยะสแตชันนารีจนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงจะเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณคาโรทีนอยด์ด้วยวิธีที่เหมาะสมซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 1 และวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้ง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นจึงคัดเลือกสาหร่าย 2 สายพันธุ์ที่ผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดเพื่อนำมาใช้ในการทดลองข้อ 3

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย

3.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย

นำสาหร่าย 2 สายพันธุ์ ที่ผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดที่ได้จากข้อ 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่างกัน 5 ระดับ คือ 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 โดยทำการเพาะเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณคาโรทีนอยด์และน้ำหนักแห้งตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2 การศึกษาค่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย

นำสาหร่าย 2 สายพันธุ์ที่ผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นให้เหมาะสม ซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 3.1 และเติมแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00 โดยทำการเพาะเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณคาโรทีนอยด์และน้ำหนักแห้งตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 การศึกษาค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย

นำสาหร่าย 2 สายพันธุ์ที่ผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นและความเข้มข้นของแมกนีเซียมให้เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 3.1 และเติมไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 โดยทำการเพาะเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณคาโรทีนอยด์และน้ำหนักแห้งตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 1 2 และ 3 ทั้ง 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ทางสถิติซึ่งแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC version 11 ในการวิเคราะห์ F-test และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัดและหาปริมาณคาโรทีนอยด์

ทำการทดลองหาวิธีสกัดคาโรทีนอยด์ 3 วิธี โดยใช้สาหร่ายตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. B4 และ *Scenedesmus* sp. A4 ใช้วิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 วิธีของ Strickland และ Parson (1968) วิธีที่ 2 วิธีของสุดสายชล (2541) และวิธีที่ 3 วิธีของ KMITT (1996) ซึ่งการใช้วิธีการสกัดวิธีที่ 3 ได้ปริมาณคาโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 วิธี ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 0.72 1.17 และ 1.04 มก.ต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ ซึ่งวิธีที่ 3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์กับอีก 2 วิธี ได้ผลดังตารางที่ 4.1 จึงใช้วิธีที่ 3 ในการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีศักยภาพสูงในการผลิตคาโรทีนอยด์ ซึ่งใช้วิธีเดียวกันกับประภาศิริ (2547) ที่ทำการสกัดคาโรทีนอยด์ จากสาหร่าย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Chlorella* sp. TISTR8261, *Dunaliella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Spirulina* sp. TISTR8250

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการผลิตคาโรทีนอยด์

ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตคาโรทีนอยด์จาก 10 สายพันธุ์ซึ่งแยกได้จากน้ำตกกระทิง คือ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. A2, *Chlorella* sp. A3, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella* sp. B4, *Scenedesmus* sp. A4, *Scenedesmus* sp. A5, *Scenedesmus* sp. B1, *Scenedesmus* sp. B3, และ *Chlorococcum* sp. D2 ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อากาศและแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 14 วัน ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะสเตชันนารีในวันที่ 8 ของการทดลอง วัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร วัดปริมาณคาโรทีนอยด์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดคือ *Scenedesmus* sp. A5 และ *Chlorococcum* sp. D2 ซึ่งมีปริมาณคาโรทีนอยด์ 2.20 และ 2.35 มก.ต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการทดลอง ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ ข2)

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบวิธีสกัดคาโรทีนอยด์ 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 วิธีของ Strickland และ Parson (1968) วิธีที่ 2 วิธีของสุคสายชล (2541) และวิธีที่ 3 วิธีของ KMITT (1996) ในสาหร่าย ทั้ง 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์สาหร่าย	วิธีที่	ปริมาณคาโรทีนอยด์ (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)
<i>Chlorella</i> sp. A1	1	0.002 ^b
	2	0.006 ^b
	3	0.720 ^a
<i>Chlorella</i> sp. B4	1	0.008 ^b
	2	0.009 ^b
	3	1.036 ^a
<i>Scenedesmus</i> sp. A4	1	0.017 ^b
	2	0.021 ^b
	3	1.170 ^a

กำหนดให้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	วันที่ของการเพาะเลี้ยง													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Chlorella</i> sp. A1	0.140	0.185	0.210	0.223	0.231	0.238	0.256	0.263	0.261	0.258	0.261	0.260	0.262	0.259
<i>Chlorella</i> sp. A2	0.170	0.180	0.195	0.222	0.226	0.228	0.235	0.255	0.258	0.255	0.257	0.255	0.254	0.256
<i>Chlorella</i> sp. A3	0.135	0.175	0.195	0.21	0.222	0.225	0.24	0.245	0.245	0.248	0.247	0.244	0.245	0.245
<i>Chlorella</i> sp. B2	0.150	0.165	0.172	0.185	0.214	0.220	0.240	0.250	0.248	0.251	0.252	0.250	0.249	0.251
<i>Chlorella</i> sp. B4	0.137	0.170	0.170	0.175	0.213	0.220	0.230	0.242	0.243	0.250	0.247	0.249	0.251	0.250
<i>Scenedesmus</i> sp. A4	0.120	0.155	0.180	0.191	0.203	0.205	0.218	0.240	0.243	0.245	0.246	0.244	0.245	0.244
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	0.115	0.125	0.155	0.175	0.200	0.225	0.235	0.250	0.245	0.250	0.251	0.249	0.248	0.249
<i>Scenedesmus</i> sp. B1	0.120	0.170	0.185	0.2	0.215	0.220	0.240	0.250	0.246	0.251	0.250	0.248	0.250	0.251
<i>Scenedesmus</i> sp. B3	0.115	0.150	0.165	0.175	0.195	0.198	0.210	0.230	0.235	0.232	0.233	0.235	0.233	0.234
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	0.045	0.050	0.050	0.065	0.082	0.091	0.110	0.134	0.140	0.139	0.141	0.142	0.140	0.141

ตารางที่ 4.3 ปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณคาโรทีนอยด์ (มก.ต่อกรัมบนแห้ง)			
	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14
<i>Chlorella</i> sp. A1	0.86	0.81	0.68	0.61
<i>Chlorella</i> sp. A2	1.34	1.32	1.15	1.07
<i>Chlorella</i> sp. A3	0.81	0.79	0.73	0.68±
<i>Chlorella</i> sp. B2	0.66	0.63	0.53	0.48
<i>Chlorella</i> sp. B4	0.68	0.47	0.34	0.29
<i>Scenedesmus</i> sp. A4	1.13	1.12	0.97	0.87
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	2.20	2.08	1.78	1.68
<i>Scenedesmus</i> sp. B1	1.00	0.85	0.78	0.77
<i>Scenedesmus</i> sp. B3	1.65	1.47	1.29	1.27
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	2.35	2.16	1.93	1.82

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตคาร์ทีนอยด์

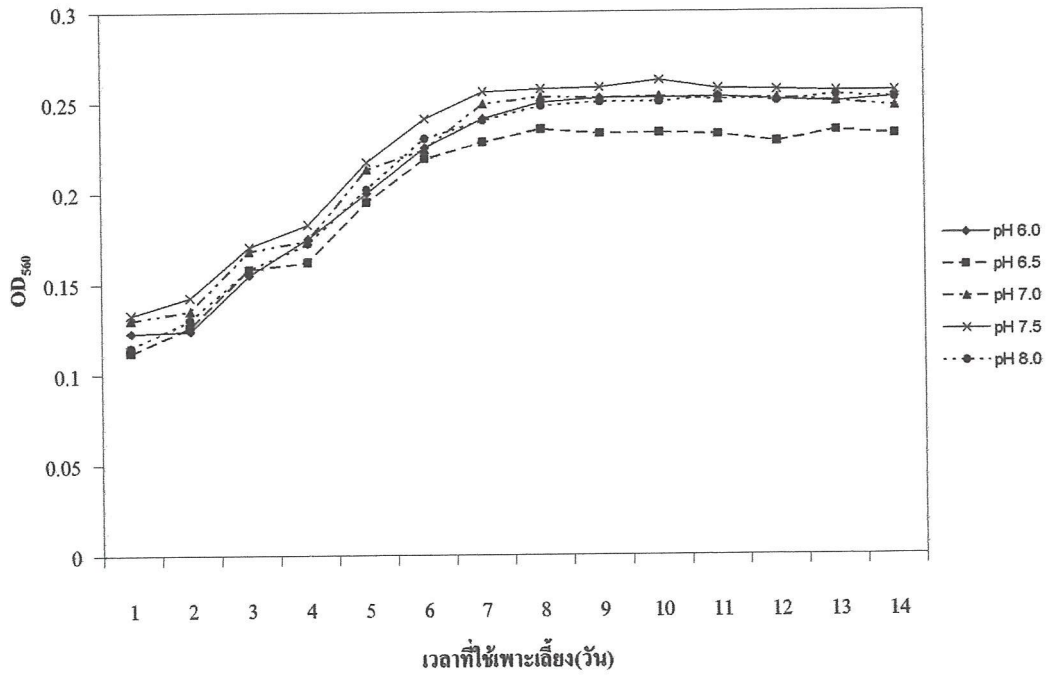
นำสาหร่าย 2 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. A5 และ *Chlorococcum* sp. D2 เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 คัดแปลง โดยแปรผันความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น ความเข้มข้นของแมกนีเซียมและไนโตรเจน ดังนี้

4.3.1 ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหาร

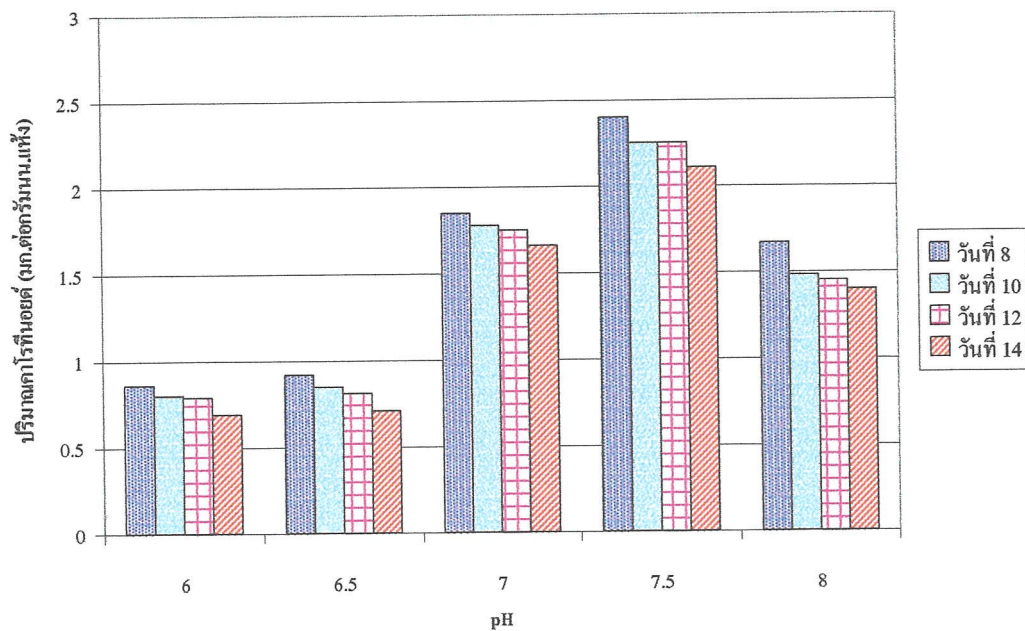
เมื่อทดลองแปรผันความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหาร โดยให้ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารสูตร N-8 คัดแปลงเป็น 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 พบว่าสาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญและผลิตคาร์ทีนอยด์ได้ทุกค่าของความเป็นกรดเป็นด่าง และสามารถผลิตคาร์ทีนอยด์ได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

Scenedesmus sp. A5 มีการเจริญสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 สามารถผลิตปริมาณคาร์ทีนอยด์ได้ 2.40 มก.ต่อกรัมบน.แห้ง รองลงมาคือความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 8.0 6.5 และ 6.0 ซึ่งผลิตคาร์ทีนอยด์ได้ 1.85 1.67 0.92 และ 0.86 มก.ต่อกรัมบน.แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.1 และ 4.2) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้ง 5 ชุดการทดลอง พบว่าที่ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 เจริญได้ดีที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นอื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ ข4)

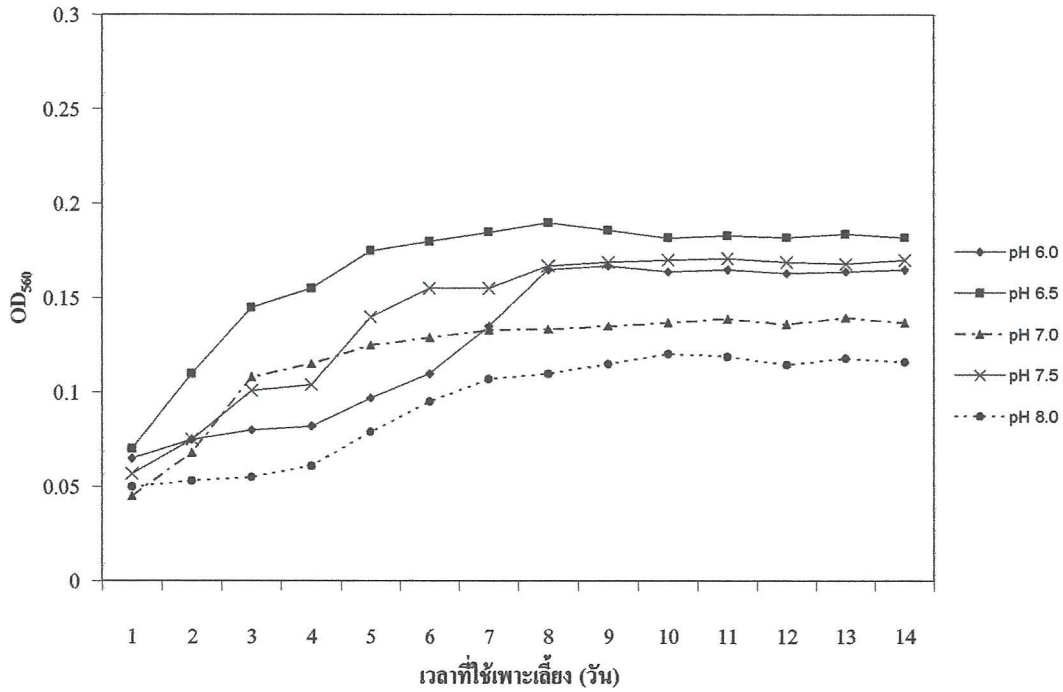
Chlorococcum sp. D2 มีการเจริญสูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ผลิตปริมาณคาร์ทีนอยด์ได้ 2.45 มก.ต่อกรัมบน.แห้ง รองลงมาคือความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 7.5 6.5 และ 8.0 ซึ่งผลิตคาร์ทีนอยด์ได้ 1.65 1.44 1.18 และ 1.11 มก.ต่อกรัมบน.แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.3 และ 4.4) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้ง 5 ชุดการทดลอง พบว่าที่ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นอื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ ข4) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Sarada และคณะ (2002) พบว่าอัตราการเจริญและการผลิตคาร์ทีนอยด์ของ *Dunaliella* sp. จะมีมากในช่วงของความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0 – 8.0 และมีอัตราการเจริญต่ำที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0 สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในช่วง 6.5 – 8.0 ถ้าความเป็นกรดเป็นด่างสูงเกิน 8.0 หรือต่ำกว่า 6.45 อัตราการเจริญจะลดลง (Behrens และคณะ, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับ McLachlan และ Craigie (1965) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.5 และ 5.0 พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.5 สาหร่ายจะมีการเจริญที่สูงกว่าในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 ซึ่งอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 นี้การเจริญของสาหร่ายจะถูกยับยั้ง



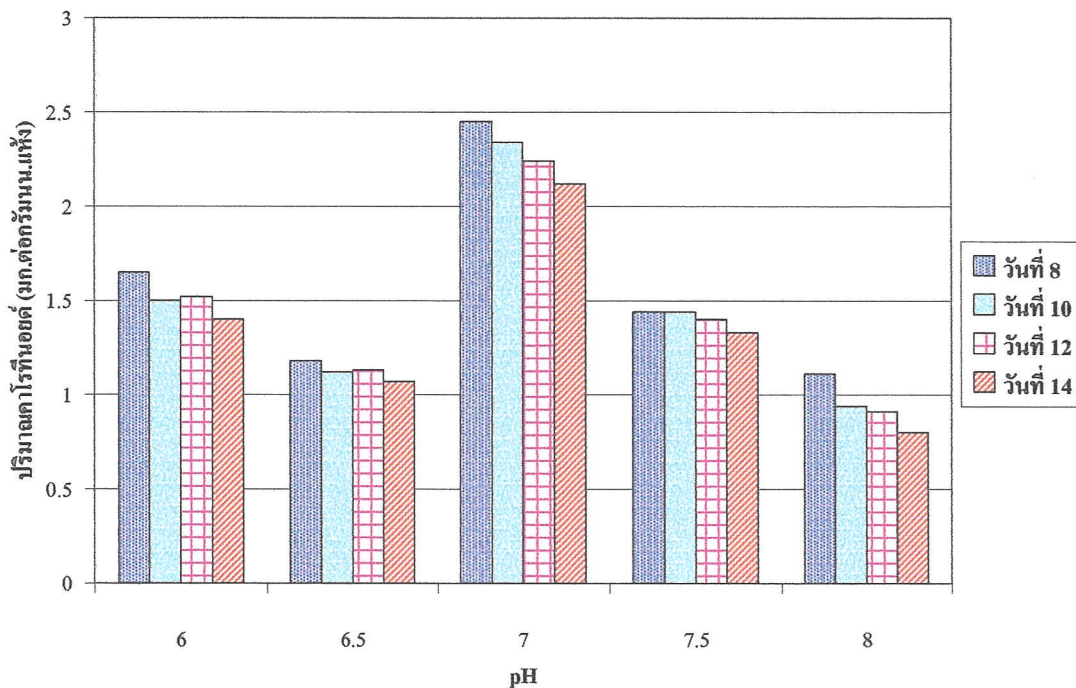
ภาพที่ 4.1 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญของ *Scenedesmus* sp. A5 เป็นระยะเวลา 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.2 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ของ *Scenedesmus* sp. A5 ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 ต่อการเจริญของ *Chlorococcum* sp. D2 เป็นระยะเวลา 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.4 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ *Chlorococcum* sp. D2 ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง

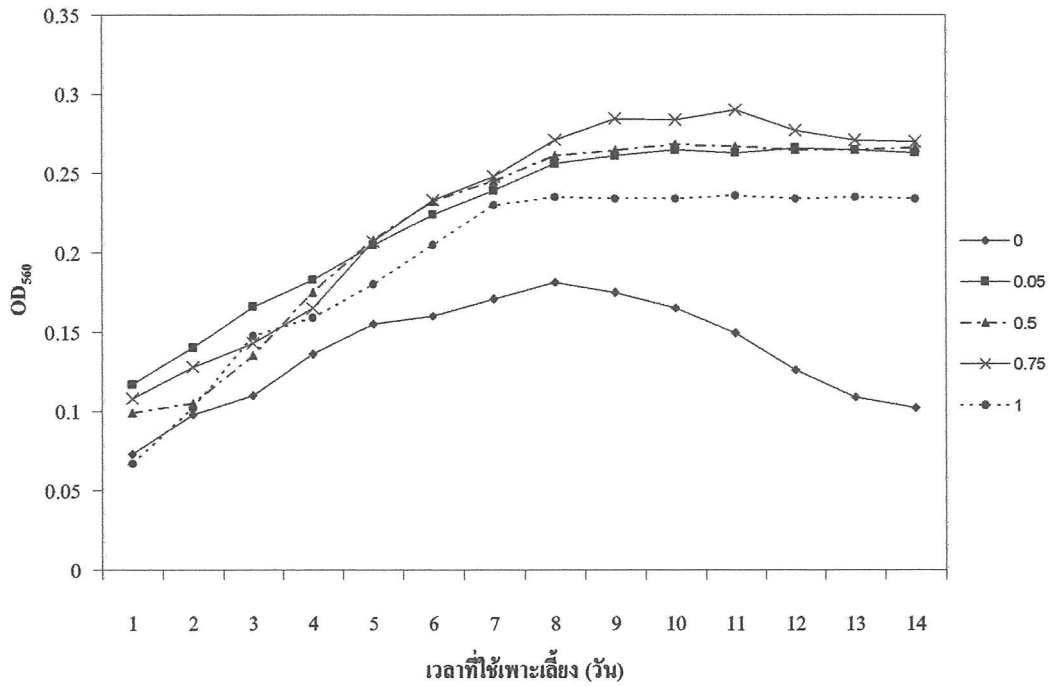
4.3.2 แมกนีเซียม

เมื่อทดลองแปรผันแมกนีเซียมที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายโดยเตรียมปริมาณแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) เท่ากับ 0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตรในแต่ละสูตรอาหาร พบว่าสามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

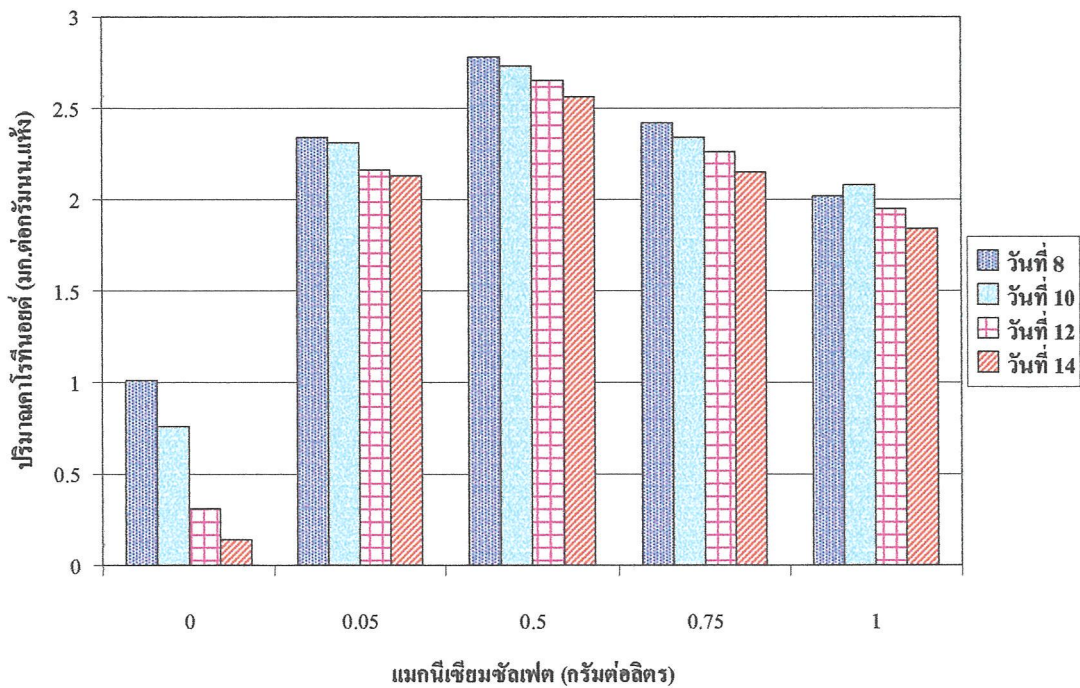
การผลิตคาโรทีนอยด์ของ *Scenedesmus* sp. A5 ที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการผลิตคาโรทีนอยด์มากที่สุดคือ 2.78 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 0.75 0.05 1.00 และ 0.00 กรัมต่อลิตร โดยผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 2.72 2.34 2.02 และ 1.01 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.5 และ 4.6) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้ง 5 ชุดการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมค่าอื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ ข6)

ส่วนการผลิตคาโรทีนอยด์ของ *Chlorococcum* sp. D2 ที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการผลิตคาโรทีนอยด์มากที่สุดคือ 2.59 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 1.00 0.50 0.00 และ 0.05 กรัมต่อลิตร โดยผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 2.49 2.18 1.29 และ 1.28 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.7 และ 4.8) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้ง 5 ชุดการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมค่าอื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ ข6)

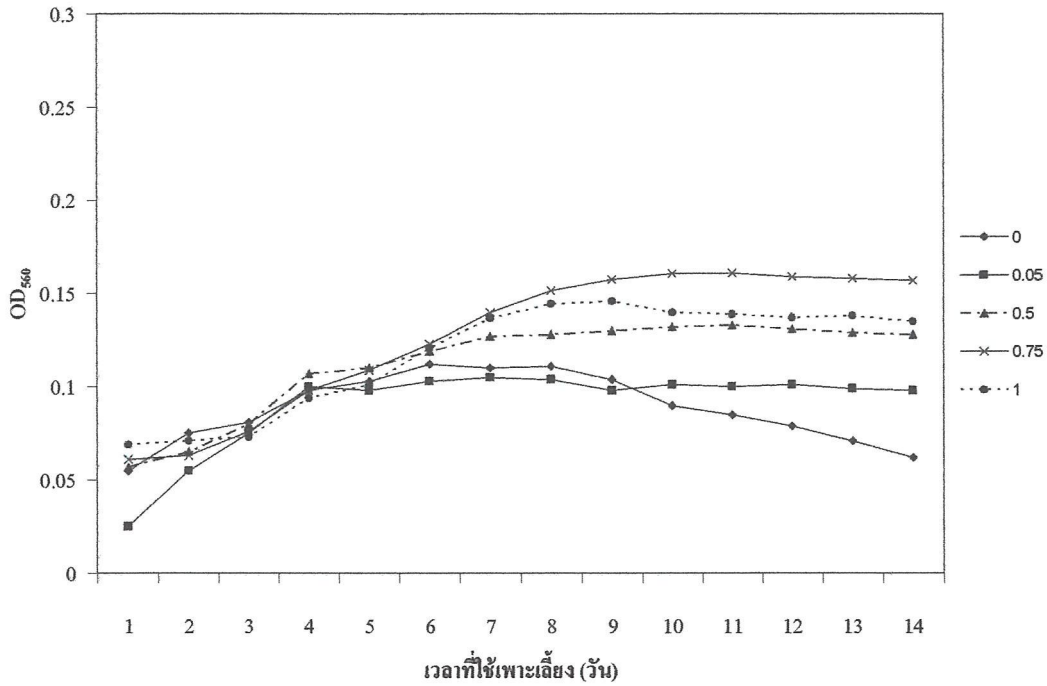
จากผลการทดลอง พบว่าระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่สามารถชักนำให้ *Scenedesmus* sp. A5 และ *Chlorococcum* sp. D2 ผลิตคาโรทีนอยด์ได้มาก เป็นเพราะซัลเฟตซึ่งอยู่ในรูปของซัลเฟตในอาหารยังจำเป็นต่อการเจริญ โดยเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของวิตามินและกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น เมไทโอนีน (methionine) ซีสเทอีน (cysteine) ซีสทีน (cystine) (เชาว์และพรณี, 2528) Phadwal และ Singh (2003) ได้ทำการทดลองเลี้ยง *Dunaliella* sp. (D2) ในสูตรอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 5 และ 0.1 มิลลิโมล โดยผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 0.5 และ 2.35 พิกोगรามต่อเซลล์ แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.1 มิลลิโมล สร้างคาโรทีนอยด์มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียม 5 มิลลิโมล



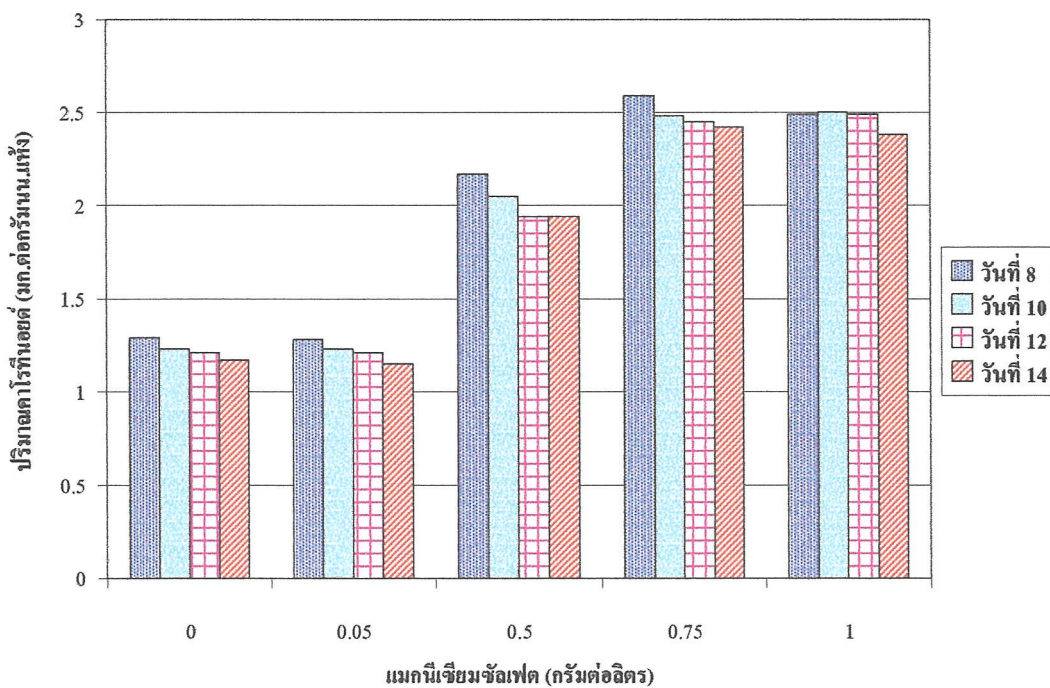
ภาพที่ 4.5 ผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญของ *Scenedesmus* sp. A5 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วันของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.6 ผลของแมกนีเซียมต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ *Scenedesmus* sp. A5 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.7 ผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญของ *Chlorococcum* sp. D2 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.8 ผลของแมกนีเซียมต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ *Chlorococcum* sp. D2 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง

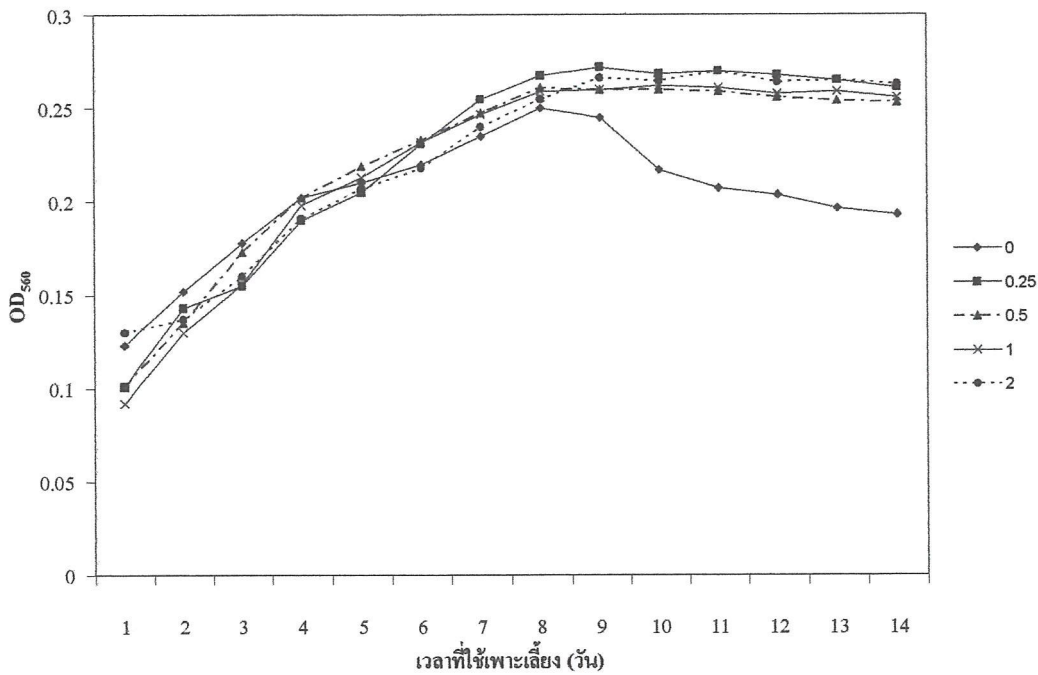
4.3.3 ไนโตรเจน

เมื่อทดลองแปรผันไนโตรเจนที่ใช้ในสาหร่ายโดยเตรียมปริมาณไนเตรตในรูปของโปแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) ในอาหารสูตร N-8 เท่ากับ 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรในแต่ละอาหารสูตร พบว่าสามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

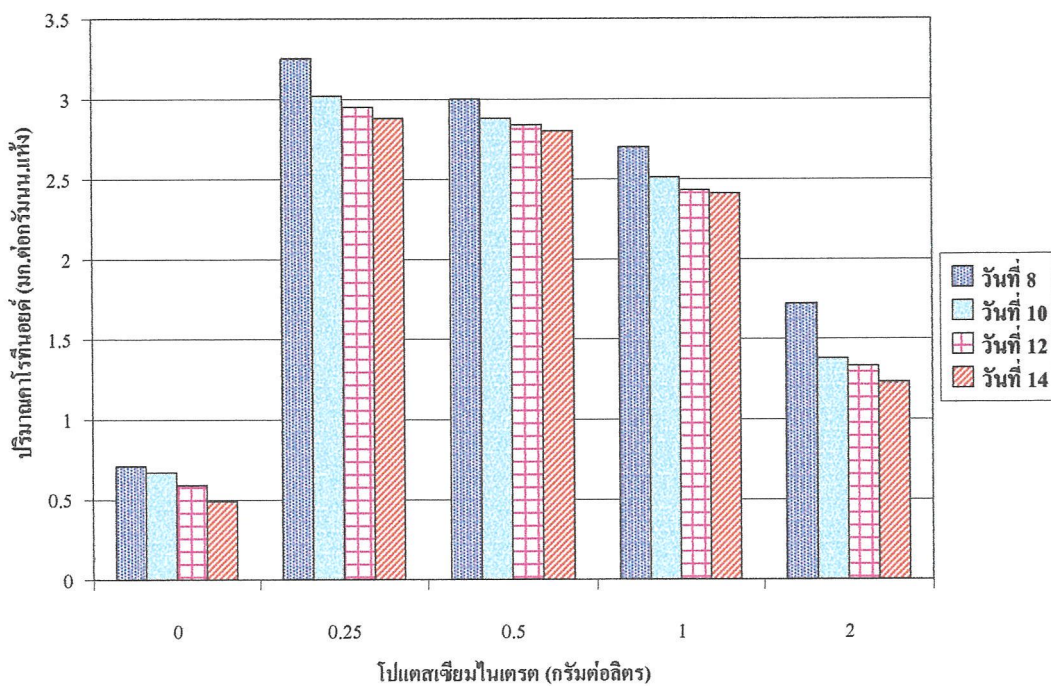
การผลิตคาโรทีนอยด์ของ *Scenedesmus* sp. A5 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.25 และ 0.50 กรัมต่อลิตร ผลิตคาโรทีนอยด์มากที่สุดคือ 3.25 และ 3.00 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือ 1.00 2.00 และ 0.00 กรัมต่อลิตร ผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 2.70 1.72 และ 0.71 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 และ 4.10) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้ง 5 ชุดการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.25 และ 0.50 กรัมต่อลิตร ผลิตคาโรทีนอยด์มีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างกันค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเดียวกัน (ตารางที่ ข8)

การผลิตคาโรทีนอยด์ของ *Chlorococcum* sp. D2 ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร ผลิตคาโรทีนอยด์มากที่สุดคือ 3.02 มก.ต่อกรัมบนแห้ง รองลงมาคือ 1.00 0.25 2.00 และ 0.00 กรัมต่อลิตร ผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 2.54 2.45 1.60 และ 0.60 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.11 และ 4.12) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้ง 5 ชุดการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนค่าอื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ ข8)

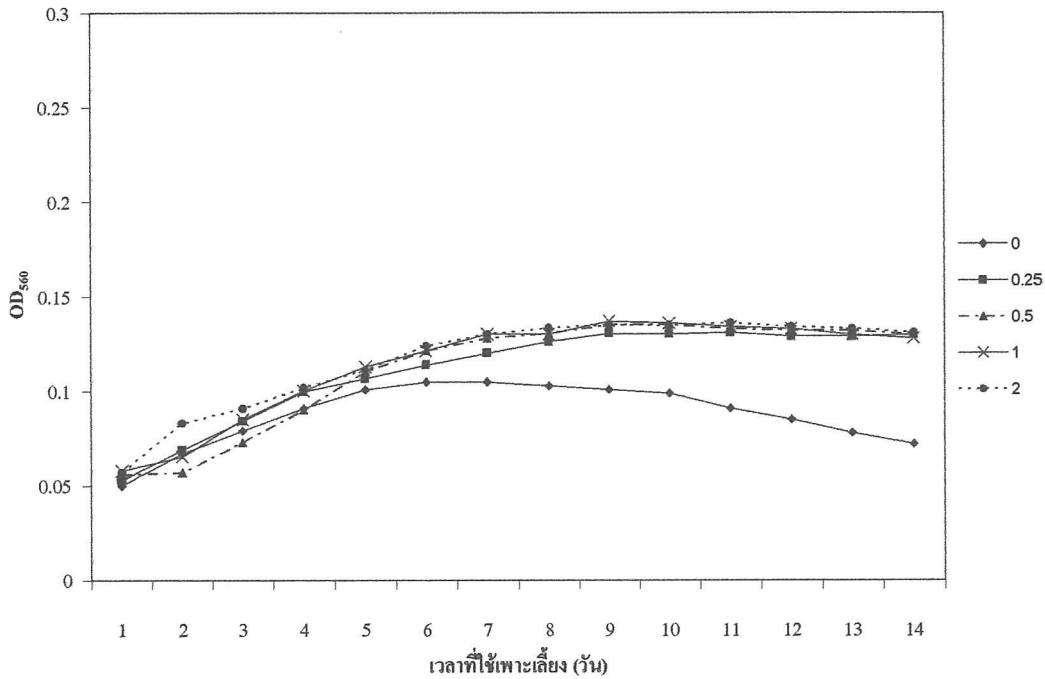
Phadwal และ Singh (2003) พบว่าในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน จะทำให้อัตราการเจริญของ *Dunaliella* sp. (D2) ลดลง แต่การสังเคราะห์เบต้า-คาโรทีนและกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Ray (1976) และ โหมยิต (2540) ที่พบว่าการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์จะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการลดลงของไนเตรต เมื่อจำกัดฟอสฟอรัสจะมีคลอโรฟิลล์มากกว่าคาโรทีนอยด์ (Ketchum และคณะ, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับ Phadwal และ Singh (2003) พบว่าปริมาณเบต้า-คาโรทีนของ *Dunaliella* sp. จะลดลงเมื่อมีการลดปริมาณของแหล่งฟอสฟอรัสในสูตรอาหาร Harker และคณะ (1996) กล่าวว่า ที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตต่ำ สาหร่ายจะมีอัตราการเจริญที่ต่ำแต่จะมีอัตราการสร้างแอสตาแซนทินสะสมไว้ในเซลล์จำนวนมาก Orosa และคณะ, 2005 ทำการเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.15 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงและในสูตรอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้เลย



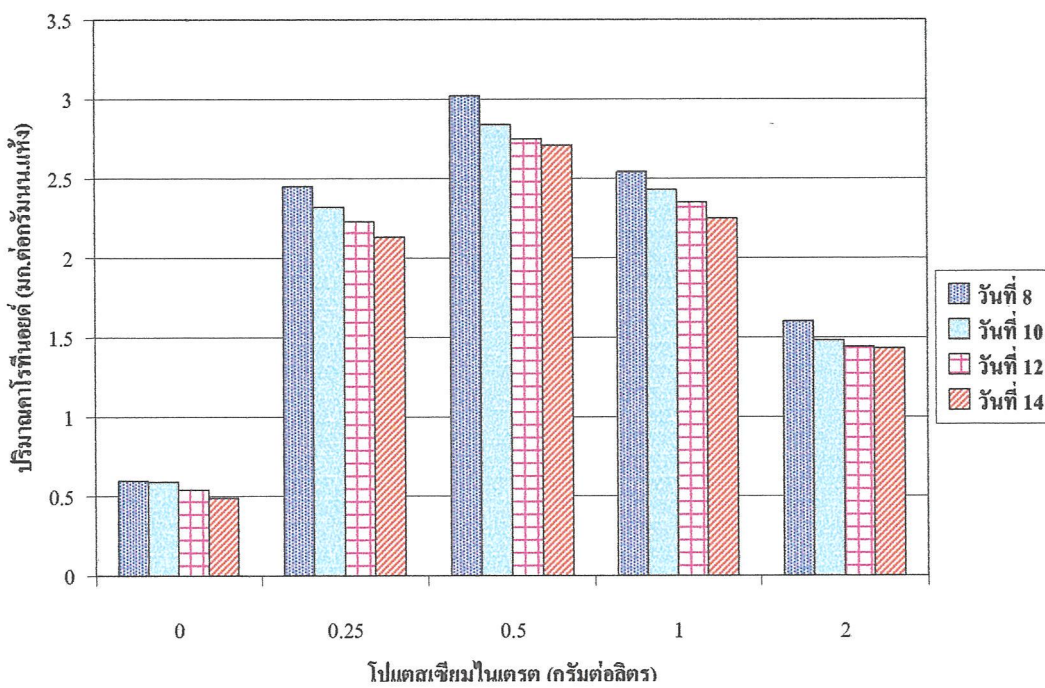
ภาพที่ 4.9 ผลของไนโตรเจนต่อการเจริญของ *Scenedesmus* sp. A5 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วันของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.10 ผลของไนโตรเจนต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ *Scenedesmus* sp. A5 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.11 ผลของไนโตรเจนต่อการเจริญของ *Chlorococcum* sp. D2 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 14 วันของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 4.12 ผลของไนโตรเจนต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของ *Chlorococcum* sp. D2 ที่ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

การเจริญเติบโตของสาหร่ายขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายอาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ในการทดลองได้ทำการตัดแปลงเฉพาะในส่วน of ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ แมกนีเซียม โบแทสเซียม และได้ทำการตัดแปลงปัจจัยทางกายภาพด้านของความเป็นกรดเป็นด่างด้วย

การผลิตคาโรทีนอยด์ของ ของ *Scenedesmus* sp. A5 และ *Chlorococcum* sp. D2 ในสูตรอาหารปกติสามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 2.20 และ 2.35 มก.ต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ ต่อมาได้ทำการแปรผันความเข้มข้นแมกนีเซียม ไนโตรเจน และความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นในสูตรอาหาร N-8 ตัดแปลง พบว่า *Scenedesmus* sp. A5 และ *Chlorococcum* sp. D2 สามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้สูงขึ้นคือ 3.25 และ 3.02 มก.ต่อกรัมแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ประภาศิริ (2547) พบว่าในการเลี้ยง *Chlorella* sp.TISTR8261 ในสูตรอาหารปกติสามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้ 3.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมาได้ทำการแปรผันไนเตรต ฟอสเฟต แมกนีเซียม ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารและความเข้มแสงในสูตรอาหาร N-8 ตัดแปลง พบว่า *Chlorella* sp.TISTR8261 สามารถผลิตคาโรทีนอยด์สูงสุดคือ 4.78 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การคัดเลือกวิธีการสกัดคาโรทีนอยด์

จากการทดลองนำสาหร่ายตัวอย่าง 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. B4 และ *Scenedesmus* sp. A4 เลี้ยงในสูตรอาหาร N-8 ในพลาสติกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 185 รอบต่อนาที ให้แสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ มาทำการสกัดหาปริมาณคาโรทีนอยด์ทั้งหมด 3 วิธี ซึ่งวิธีที่ 3 ได้ปริมาณคาโรทีนอยด์สูงสุด ซึ่งได้ 0.720 1.170 และ 1.036 มก.ต่อกรัมบนแห้งในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ตามลำดับ

5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการผลิตคาโรทีนอยด์

จากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตคาโรทีนอยด์ 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A1, *Chlorella* sp. A2, *Chlorella* sp. A3, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella* sp. B4, *Scenedesmus* sp. A4, *Scenedesmus* sp. A5, *Scenedesmus* sp. B1, *Scenedesmus* sp. B3, และ *Chlorococcum* sp. D2 ซึ่งแยกได้จากน้ำตกกระทิง เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ได้สาหร่ายสีเขียวที่ผลิตคาโรทีนอยด์สูงสุด 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Scenedesmus* sp. A5 และ *Chlorococcum* sp. D2 ซึ่งมีปริมาณคาโรทีนอยด์เท่ากับ 2.20 และ 2.35 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการทดลอง

5.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตคาโรทีนอยด์

สภาพการเลี้ยงสาหร่าย 2 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. A5 และ *Chlorococcum* sp. D2 เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 โดยแปรผันความเป็นกรดเป็นด่าง (6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0) ความเข้มข้นของแมกนีเซียม (0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00) และไนโตรเจน (0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00) ให้แสงต่อเนื่อง พบว่า *Scenedesmus* sp. A5 สามารถผลิตคาโรทีนอยด์สูงสุดคือ 3.25 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ในวันที่ 8 ของการทดลอง โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงคือ ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.5 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปแตสเซียมไนเตรดเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร

Chlorococcum sp. D2 สามารถผลิตคาโรทีนอยด์สูงสุดคือ 3.02 มก.ต่อกรัมบนแห้ง ในวันที่ 8 ของการทดลอง โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงคือ ความ

เป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณโปแตสเซียมไนเตรตเท่ากับ 0.50 กรัมต่อลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองพบว่าประสบปัญหาเกิดการจับกลุ่มของเชื้อในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มความเร็วรอบให้สูงขึ้น
2. ควรหาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพ เช่น การทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อการทำการสกัดจะได้เป็นไปอย่างสมบูรณ์
3. ควรศึกษาปริมาณคาโรทีนอยด์เทียบกับระยะต่างๆ ของการเจริญ

เอกสารอ้างอิง

- กนกอร จารุจารีต. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตคาโรทีนอยด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- โหมยิต ศรีภูธร. 2540. การศึกษาการเจริญเติบโตและการสะสม β -carotene ของ *Dunaliella salina* 1197 โดยเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในบ่อกลางแจ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จันทนา ไพโรบูรณ์. 2546. การเลี้ยงสาหร่ายทะเล *Dunaliella salina* 1197 ที่ผลิตเบต้าแคโรทีนในบ่อกลางแจ้งเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์เซลล์เบต้าแคโรทีนแห้งโดยวิธีฟลูอิดไอซ์เบด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เชาวน์ ชีโนรัักษ์ และพรณี ชีโนรัักษ์. 2528. ชีววิทยา เล่ม 3. อมรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ. 2533. การใช้สาหร่ายสีไปรูลิโนนา (*Spirulina* sp.) เป็นแหล่งของรงควัตถุคาโรทีนอยด์สำหรับผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2532. จุลชีววิทยา เล่ม 2. โอ.เอส. พรินติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.
- ประกาศิรี ศรีบุญเรือง. 2547. การคัดเลือกสาหร่ายเพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. อ้างจาก Bold, H.C. and Wynne, M.J. 1978. Introduction to the Algae. Structure and Reproduction Prentice Hall of India Private Limited, New Delhi.
- รวมทรัพย์ ชำนาญธนา. 2540. การเลี้ยง *Dunaliella salina* ในช่วงระยะเวลาให้แสงที่แตกต่างกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วราทิพย์ วงศ์พินทุ. 2540. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเบตาแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella* sp. (CHLOROPHYCEAE). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- สรวิศ เผ่าทองสุข. 2536. การคัดเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* เพื่อผลิต เบตา-คาโรทีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สรวิศ เผ่าทองสุข, สุชนา วิเศษสังข์ และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต. 2538. ผลของความเข้มแสง ปริมาณไนเตรต ฟอสเฟต และ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ต่ออัตราการเจริญและปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Dunaliella salina*. วารสารวาริชศาสตร์ 1(2): 179-184.
- สิรินทร์ วิโมกษ์สันต์, เจมส์ เอ โอลสัน, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, สุวิทย์ เพียรกิจกรรม, สกล พันธุ์ยิ้ม และ มนตรี จุฬวัฒน์ทล. 2523. ชีวเคมี ฉบับปรับปรุงใหม่. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- สุดสายชล หอมทอง. 2541. การผลิต *Haematococcus* sp.. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุนันท์ เทศเพ็ญ. 2522. อิทธิพลของคุณภาพแสงต่อปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และคลอโรฟิลล์ ในสาหร่ายสีเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อรพรรณ ทองประสงค์. 2532. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายคลอเรลลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะพลังงานและวัสดุ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.
- Atthasampunna, P. 1995. TISTR Cultures collection fifth edition. Bangkok MIRCEN. Thailand Institute of Scientific and Technological Research Bangkok, Thailand.
- Baurenfeind, J.C. 1981. Carotenoids as colorants and vitamin a precursor. Academic Press, New York. 938 p.
- Behrens, P.W., Sicotte, V.J. and Delente, J. 1994. Microalgae as a source of stable isotopically labeled compounds. Journal of Appl. Phycol.. 6 : 113-121.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1983. On the factor which determine massive β -carotene accumulation in halotolerant algae *Dunaliella badawil*. Pl. Physiol. 72 : 593-597.
- Britton, G. 1983. Carotenoids. 61-68. In : Miller, L.P. The Biochemistry of Natural Pigments. Van Nastrand : Reinhold Company.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. and Otero, A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(5):530-535.

- Frossberg, A., Lingen, C., Ernster, L. and Linberg, O. 1959. Modification of X-irradiation syndrome for lycopene. *Exp. Cell Res.* 16 : 7.
- Goodwin, T.W. 1984. *The Biochemistry of the Carotenoids*. Chapman and Hall, London.
- Harker, M., Tsavalos, A.J. and Young, A.J..1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Biores. Technol.* 55 : 207-214.
- Jeana, G. 1991. *Pigments in vegetables : chlorophylls and carotenoids*. Van Nostrand Reinhold, New York. 80-83 p.
- KMITT. 1996. Laboratory document : A regional workshop on mass cultivation of microalgae. Bangkok : King Mongkut's Institute of Technology Thonburi.
- Ketchum, H.B., Ryther, J.H., Yentsch, C.S. and Corwin, N. 1985. Productivity in relation to nutrients. *Rep. et Proc. Verb., Cons. Int. Explor. Mer.* 144 : 132-140.
- Lilly, V.G., Barnett, H.L. and Krause, R.F. 1960. The production of carotene by *Choanephora cucurbitarum*. *W. Va. Agric. Expt. Sta. Bull.* 441T.
- Lorenz, R.T. and Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Tibtech.* 18 : 160-167.
- McLachlan, J. and Craigie, J.S. 1965. Effects of carboxylic acids on growth and photosynthesis of *Haematococcus pluvialis*. *Canadian J. Botany.* 43 : 1449-1456.
- Moore, A. L., Joy, A., Tom, R., Gust, D. and Moore, T. A.. 1982. Photoprotection by carotenoids during photosynthesis : Motional dependence of intramolecular energy transfer. *Science.* 216 : 982-984.
- Munzel, K. and Fuller, W. 1969. Coloration of fatty suppositories with carotenoid-dyes. *Pharm. Acta. Helv.* 44(4) : 208-237.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. and Abalde, J. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Biores. Technol.* 96 : 373-378.
- Phadwal, K. and Singh, P.K. 2003. Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp.. *Biores. Technol.* 90 : 55-58.
- Proctor, V.W. 1957. Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. *Ecol.* 44 : 141-143.

- Ray, W. 1976. Photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Pure & Appl. Chem.* 57(5):777-784
- Reid, G.K. and Wood, R.D. 1976. *Ecology of inland water and estuarine* 2d ed., D. Van Nostrand Co., New York. 485 p.
- Sarada, R., Tripathi, U. and Ravishankar, G.A. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Proc Biochem.* 37 : 623-627.
- Schiff, J.A. 1980. The Blue light syndrome. In Senger, H.S.. Berlin : Springer. 495 p.
- Shaish, A., Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1991. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella badawil* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 27(5) : 652-656.
- Shirota, A. 1966. *The Plankton of South Viet-Nam. freshwater and marine plankton.* Japan, overseas technical cooperation agency. 426 p.
- Strickland, J.D.H. and Parson, T.R. 1968. *A practical of seawater analysis.* Fisheries Research Board of Canada, New York. 311 p.
- Wegmann, K. and Metzner, H. 1971. Synchronization of *Dunaliella* culture *Arch. Microbiol.* 78 : 360-367.
- Withers, N. W. and Haxo, F. T. 1978. Isolation and characterization of caretenoid-rich lipid globules from *Peridinium foliaceum*. *Plant physiol.* 62 : 36-39.
- www.ipst.ac.th/biology/Bio-Articles/mag-content21.html
- www.samakkhi.ac.th/DEPART/SCI/BIO/b/PSPgmt2.htm

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย

สูตรอาหาร N-8 (Atthasampunna, 1995)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	260.0 มิลลิกรัม
KH_2PO_4	740.0 มิลลิกรัม
CaCl_2	10.0 มิลลิกรัม
Fe EDTA	10.0 มิลลิกรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50.0 มิลลิกรัม
KNO_3	1000.0 มิลลิกรัม
Trace element mixture	1.0 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร โดยเติมน้ำไม่มีประจุ (deionized water) ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH หรือ HCl สำหรับอาหารแข็งเติมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi 15 นาที

* Trace element mixture สำหรับอาหาร N-8

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	3.58 กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	12.98 กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.83 กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.20 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ภาคผนวก ข

ตาราง

ตารางที่ ๗1 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ ค่าการดูดกลืนแสงของคาร์โบไฮเดรต น้ำหนักแห้งเซลล์ และปริมาตรคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออโรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	วันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง			
	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	น้ำหนักแห้ง (มก/ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก/ลิตร)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	น้ำหนักแห้ง (มก/ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก/ลิตร)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	น้ำหนักแห้ง (มก/ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก/ลิตร)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	น้ำหนักแห้ง (มก/ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก/ลิตร)
<i>Chlorella</i> sp. A1	0.263	0.116	2.6	0.86	0.258	0.100	2.6	0.81	0.260	0.096	2.7	0.68	0.259	0.086	2.7	0.61
<i>Chlorella</i> sp. A2	0.255	0.167	2.4	1.34	0.255	0.165	2.4	1.32	0.255	0.143	2.4	1.15	0.256	0.139	2.5	1.07
<i>Chlorella</i> sp. A3	0.245	0.101	2.4	0.81	0.248	0.099	2.4	0.79	0.244	0.091	2.4	0.73	0.245	0.088	2.5	0.68
<i>Chlorella</i> sp. B2	0.250	0.089	2.6	0.66	0.251	0.085	2.6	0.63	0.250	0.072	2.6	0.53	0.251	0.065	2.6	0.48
<i>Chlorella</i> sp. B4	0.242	0.085	2.4	0.68	0.25	0.061	2.5	0.47	0.249	0.044	2.5	0.34	0.250	0.039	2.6	0.29
<i>Scenedesmus</i> sp. A4	0.240	0.141	2.4	1.13	0.245	0.140	2.4	1.12	0.244	0.126	2.5	0.97	0.244	0.113	2.5	0.87
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	0.250	0.274	2.4	2.20	0.250	0.260	2.4	2.08	0.249	0.232	2.5	1.78	0.249	0.219	2.5	1.68
<i>Scenedesmus</i> sp. B1	0.250	0.135	2.6	1.00	0.251	0.110	2.5	0.85	0.248	0.102	2.5	0.78	0.251	0.100	2.5	0.77
<i>Scenedesmus</i> sp. B3	0.230	0.198	2.3	1.65	0.232	0.176	2.3	1.47	0.235	0.161	2.4	1.29	0.234	0.159	2.4	1.27
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	0.134	0.257	2.1	2.35	0.139	0.236	2.1	2.16	0.142	0.221	2.2	1.93	0.141	0.208	2.2	1.82

ตารางที่ ข2 สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตคาโรทีนอยด์ได้ในปริมาณสูงสุด ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณคาโรทีนอยด์ (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)
<i>Chlorella</i> sp. A1	0.86 ^{de}
<i>Chlorella</i> sp. A2	1.34 ^{bc}
<i>Chlorella</i> sp. A3	0.81 ^{de}
<i>Chlorella</i> sp. B2	0.66 ^e
<i>Chlorella</i> sp. B4	0.68 ^{de}
<i>Scenedesmus</i> sp. A4	1.13 ^{cd}
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	2.20 ^a
<i>Scenedesmus</i> sp. B1	1.00 ^{cde}
<i>Scenedesmus</i> sp. B3	1.65 ^b
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	2.35 ^a

กำหนดให้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ ข3 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ ค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรพลาสต์ และปริมาณคลอโรพลาสต์ของสาหร่าย 2 สายพันธุ์ ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	พีเอช	วันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง			
		OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	6.0	0.250	0.107	2.4	0.86	0.252	0.100	2.4	0.80	0.251	0.098	2.4	0.79	0.252	0.085	2.4	0.69
	6.5	0.235	0.110	2.3	0.92	0.233	0.102	2.3	0.85	0.228	0.101	2.4	0.81	0.232	0.092	2.5	0.71
	7.0	0.253	0.231	2.4	1.85	0.253	0.222	2.4	1.78	0.252	0.218	2.4	1.75	0.247	0.207	2.4	1.66
	7.5	0.257	0.299	2.4	2.40	0.262	0.281	2.4	2.25	0.257	0.270	2.3	2.25	0.256	0.263	2.4	2.11
	8.0	0.248	0.200	2.3	1.67	0.250	0.185	2.4	1.48	0.250	0.181	2.4	1.45	0.252	0.177	2.4	1.42
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	6.0	0.165	0.189	2.2	1.65	0.164	0.172	2.2	1.50	0.163	0.167	2.1	1.52	0.165	0.153	2.1	1.40
	6.5	0.190	0.141	2.3	1.18	0.182	0.134	2.3	1.12	0.182	0.130	2.2	1.13	0.182	0.122	2.2	1.07
	7.0	0.133	0.268	2.1	2.45	0.137	0.255	2.1	2.34	0.136	0.245	2.1	2.24	0.137	0.232	2.1	2.12
	7.5	0.167	0.172	2.3	1.44	0.170	0.172	2.3	1.44	0.169	0.167	2.3	1.40	0.170	0.159	2.2	1.33
	8.0	0.110	0.115	2.0	1.11	0.120	0.103	2.1	0.94	0.115	0.099	2.1	0.91	0.116	0.087	2.1	0.80

ตารางที่ ข4 ปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย 2 สายพันธุ์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	พีเอช	ปริมาณคาโรทีนอยด์ (มก.ต่อกรัมบน.แห้ง)
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	6.0	0.86 ^c
	6.5	0.92 ^c
	7.0	1.85 ^b
	7.5	2.40 ^a
	8.0	1.67 ^b
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	6.0	1.65 ^b
	6.5	1.18 ^b
	7.0	2.45 ^a
	7.5	1.44 ^b
	8.0	1.11 ^b

กำหนดให้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์มีความแตกต่างกันทางสถิติ
 หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ ข5 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ ค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรพลาสต์ และปริมาตรของสาหร่าย 2 สายพันธุ์ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่ปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมเป็น 0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งเลี้ยงในอาหาร สูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	MgSO ₄ (ก.ต่อลิตร)	วันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง			
		OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์โบไฮเดรต (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	0.00	0.181	0.095	1.8	1.01	0.165	0.063	1.6	0.76	0.126	0.021	1.3	0.31	0.102	0.009	1.2	0.14
	0.05	0.256	0.292	2.4	2.34	0.265	0.288	2.4	2.31	0.266	0.280	2.5	2.16	0.263	0.277	2.5	2.13
	0.50	0.261	0.362	2.5	2.48	0.268	0.355	2.5	2.73	0.265	0.345	2.5	2.65	0.266	0.333	2.5	2.56
	0.75	0.271	0.327	2.6	2.42	0.284	0.317	2.6	2.34	0.277	0.306	2.6	2.26	0.270	0.291	2.6	2.15
	1.00	0.235	0.242	2.3	2.02	0.234	0.239	2.2	2.08	0.234	0.223	2.2	1.95	0.234	0.210	2.2	1.84
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	0.00	0.111	0.121	1.8	1.29	0.09	0.102	1.6	1.23	0.079	0.088	1.4	1.21	0.062	0.073	1.2	1.17
	0.05	0.104	0.120	1.8	1.28	0.101	0.109	1.4	1.23	0.101	0.101	1.6	1.21	0.098	0.090	1.5	1.15
	0.50	0.128	0.214	1.9	2.17	0.132	0.203	1.9	2.05	0.131	0.192	1.9	1.94	0.128	0.182	1.8	1.94
	0.75	0.152	0.283	2.1	2.59	0.161	0.271	2.1	2.48	0.159	0.268	2.1	2.45	0.157	0.252	2.0	2.42
	1.00	0.144	0.272	2.1	2.49	0.14	0.260	2.0	2.50	0.137	0.259	2.0	2.49	0.135	0.248	2.0	2.38

ตารางที่ ข6 ปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย 2 สายพันธุ์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ที่มี ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 0.00 0.05 0.50 0.75 และ 1.00 ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอด ฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	MgSO ₄	คาโรทีนอยด์ (มก.ต่อกรัมบน.แห้ง)
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	0.00	1.01 ^d
	0.05	2.34 ^b
	0.50	2.78 ^a
	0.75	2.42 ^b
	1.00	2.02 ^c
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	0.00	1.29 ^d
	0.05	1.28 ^d
	0.50	2.17 ^c
	0.75	2.59 ^a
	1.00	2.49 ^b

กำหนดให้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์มีความแตกต่างกันทางสถิติ

หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ ข7 ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ ค่าการดูดกลืนแสงของคาร์บอนยอค น้ำหนักแห้งเซลล์ และปริมาตรคาร์บอนยอคของสาหร่าย 2 สายพันธุ์ในวันที่ 8 10 12 และ 14 ของการเพาะเลี้ยงที่ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

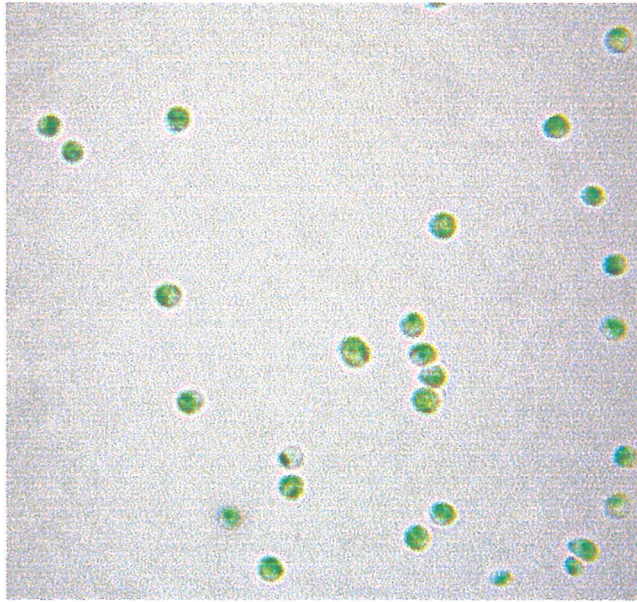
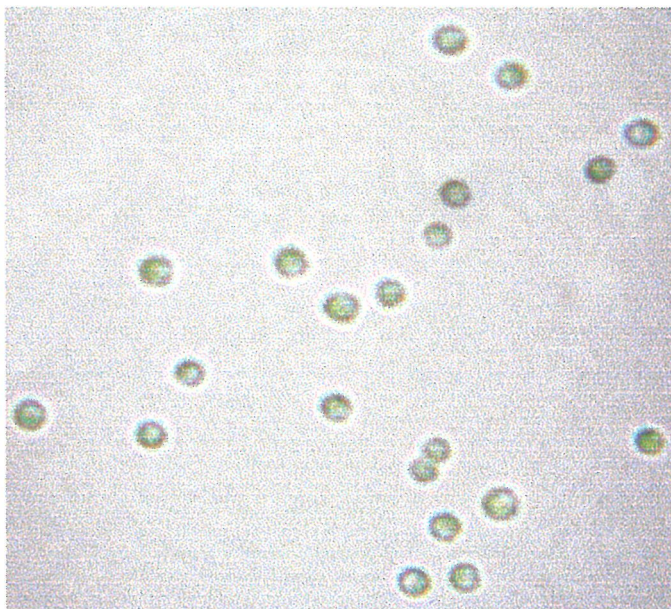
สายพันธุ์สาหร่าย	KNO ₃ (ก.ต่อลิตร)	วันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง				วันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง			
		OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์บอนยอค (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์บอนยอค (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์บอนยอค (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)	OD ₅₆₀	OD ₄₅₀	หน.แห้ง (มก./ลิตร)	คาร์บอนยอค (มก.ต่อกรัมหน.แห้ง)
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	0.00	0.250	0.081	2.2	0.71	0.217	0.070	2.0	0.67	0.204	0.058	1.9	0.59	0.193	0.041	1.6	0.49
	0.25	0.268	0.389	2.3	3.25	0.268	0.377	2.4	3.02	0.68	0.368	2.4	2.95	0.261	0.360	2.4	2.88
	0.50	0.261	0.359	2.3	3.00	0.260	0.344	2.3	2.88	0.256	0.340	2.3	2.84	0.253	0.335	2.3	2.80
	1.00	0.259	0.309	2.2	2.70	0.262	0.300	2.3	2.51	2.58	0.291	2.3	2.43	0.256	0.288	2.3	2.41
	2.00	0.255	0.188	2.1	1.72	0.248	0.165	2.3	1.38	2.64	0.159	2.3	1.33	0.263	0.148	2.3	1.23
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	0.00	0.103	0.056	1.8	0.60	0.099	0.049	1.6	0.59	0.085	0.042	1.5	0.54	0.072	0.036	1.4	0.49
	0.25	0.126	0.229	1.8	2.45	0.130	0.217	1.8	2.32	0.129	0.209	1.8	2.23	0.130	0.199	1.8	2.13
	0.50	0.131	0.314	2.0	3.02	0.135	0.281	1.9	2.84	0.132	0.272	1.9	2.75	0.130	0.254	1.8	2.71
	1.00	0.130	0.264	2.0	2.54	0.136	0.253	2.0	2.43	0.133	0.244	2.0	2.35	0.128	0.223	1.9	2.25
	2.00	0.134	0.175	2.1	1.60	0.135	0.162	2.1	1.48	0.134	0.157	2.1	1.44	0.131	0.149	2.0	1.43

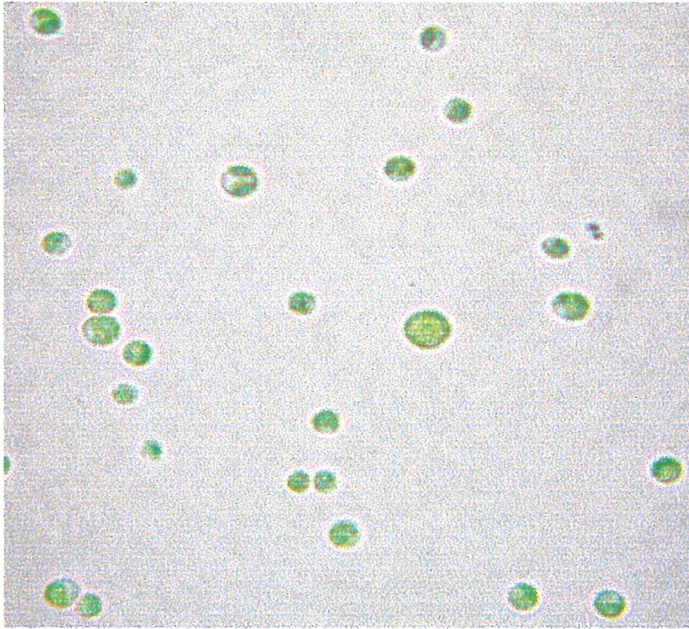
ตารางที่ ข8 ปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย 2 สายพันธุ์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ที่มีปริมาณโปแตสเซียมไนเตรต 0.00 0.25 0.50 1.00 และ 2.00 ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ในหลอดเพาะเลี้ยงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ อากาศและแสงสว่างต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ความเข้มแสง 2000 ลักซ์

สายพันธุ์สาหร่าย	KNO ₃	คาโรทีนอยด์ (มก.ต่อกรัมหนน.แห้ง)
<i>Scenedesmus</i> sp. A5	0.00	0.71 ^d
	0.25	3.25 ^a
	0.50	3.00 ^a
	1.00	2.70 ^b
	2.00	1.72 ^c
<i>Chlorococcum</i> sp. D2	0.00	0.60 ^d
	0.25	2.45 ^b
	0.50	3.02 ^a
	1.00	2.54 ^b
	2.00	1.60 ^c

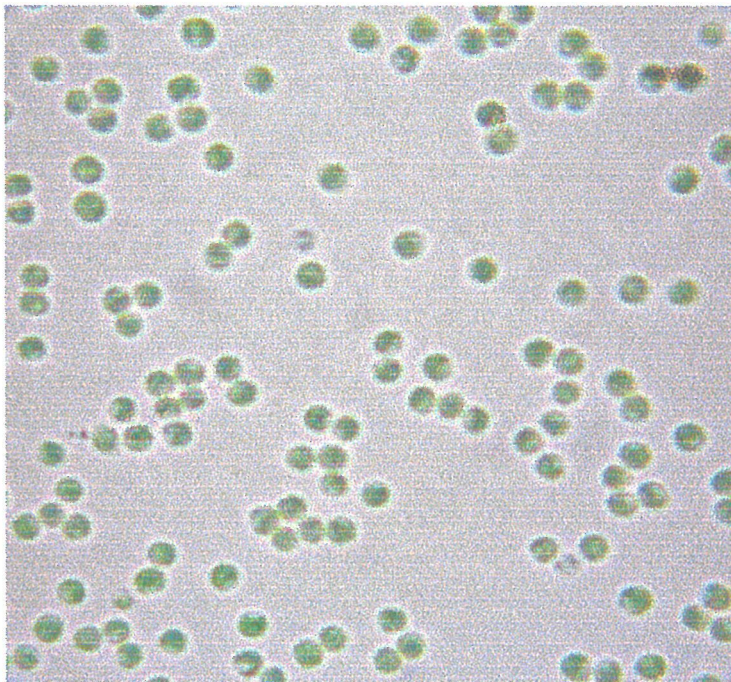
กำหนดให้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ปริมาณคาโรทีนอยด์มีความแตกต่างกันทางสถิติ
 หมายเหตุ : เปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ภาคผนวก ค

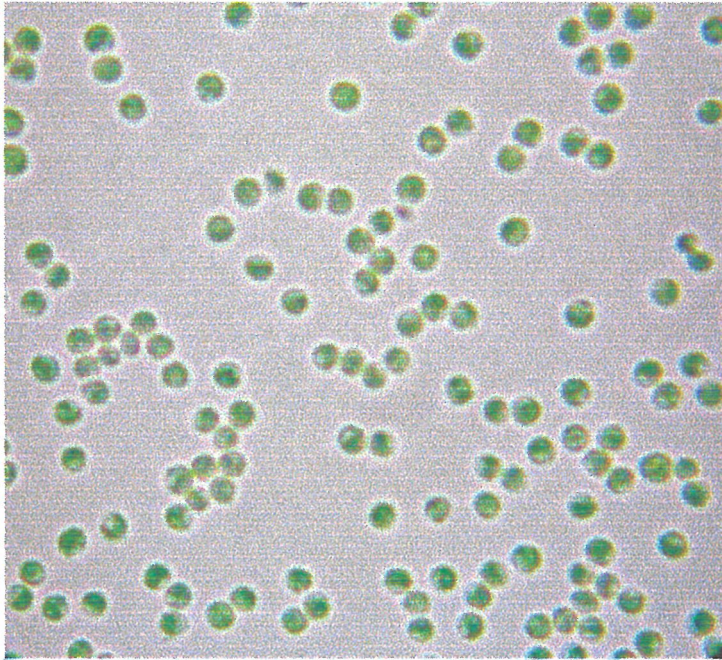
ภาพที่ ค1 *Chlorella* sp. A1 (400x)ภาพที่ ค2 *Chlorella* sp. A2 (400x)



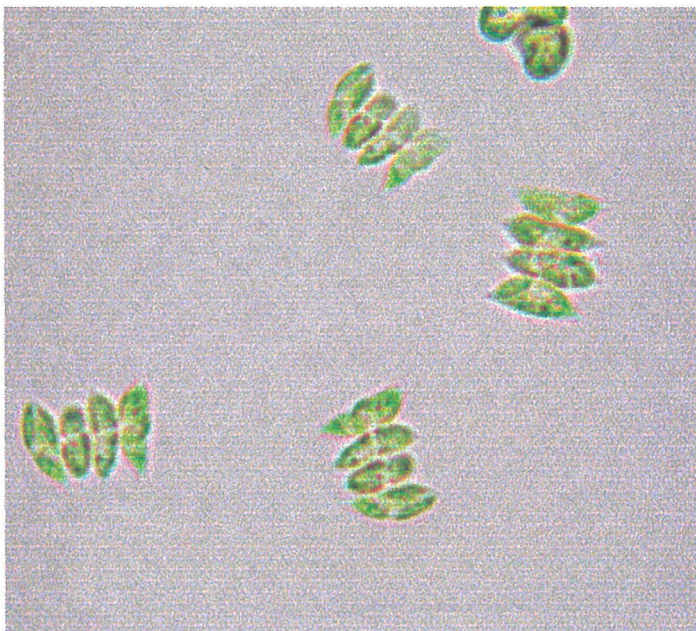
ภาพที่ ค3 *Chlorella* sp. A3 (400x)



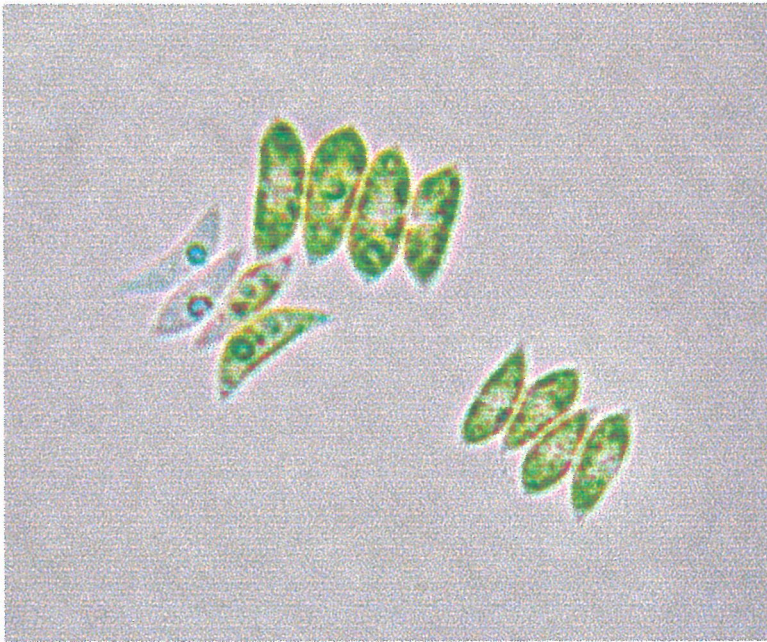
ภาพที่ ค4 *Chlorella* sp. B2 (400x)



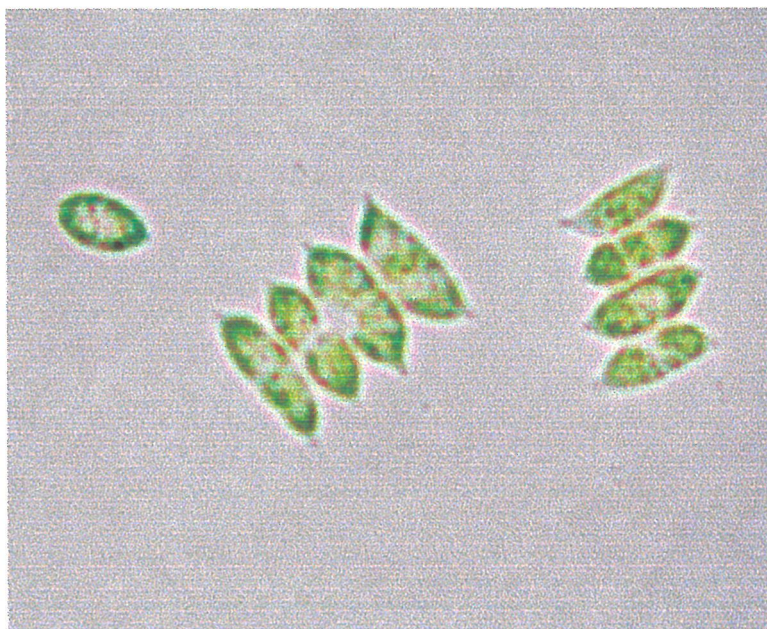
ภาพที่ ๕ *Chlorella* sp. B4 (400x)



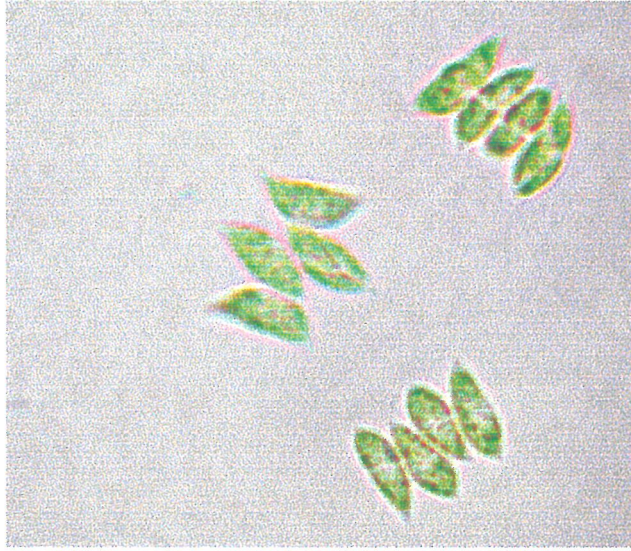
ภาพที่ ๖ *Scenedesmus* sp. A4 (400x)



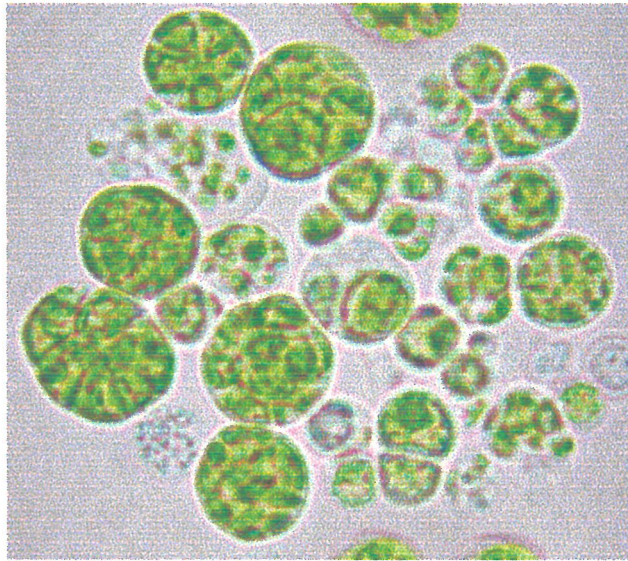
ภาพที่ ค7 *Scenedesmus* sp. A5 (400x)



ภาพที่ ค8 *Scenedesmus* sp. B1 (400x)



ภาพที่ ก9 *Scenedesmus* sp. B3 (400x)

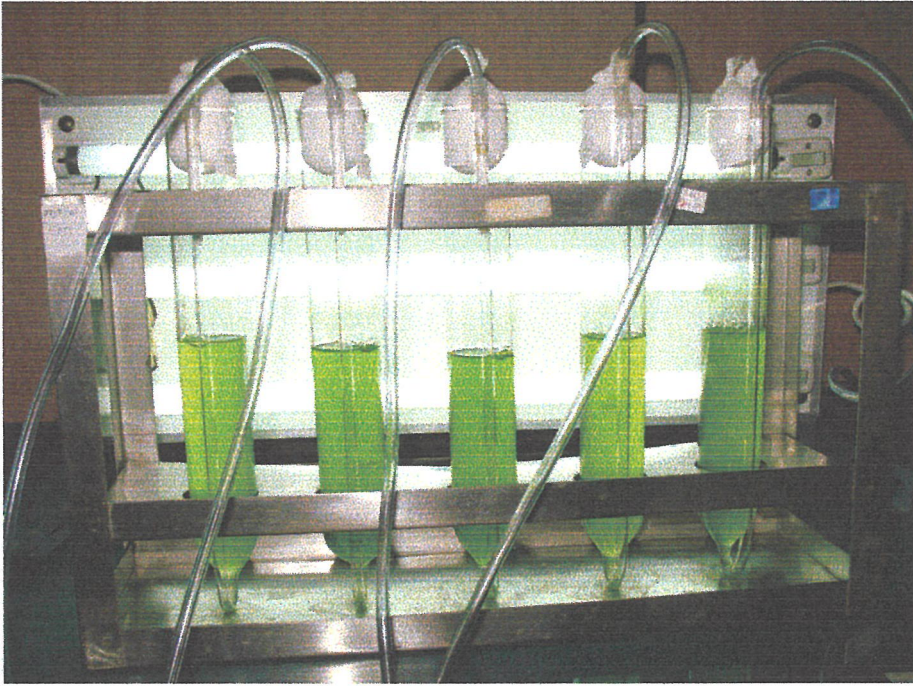


ภาพที่ ก10 *Chlorococcum* sp. D2 (400x)

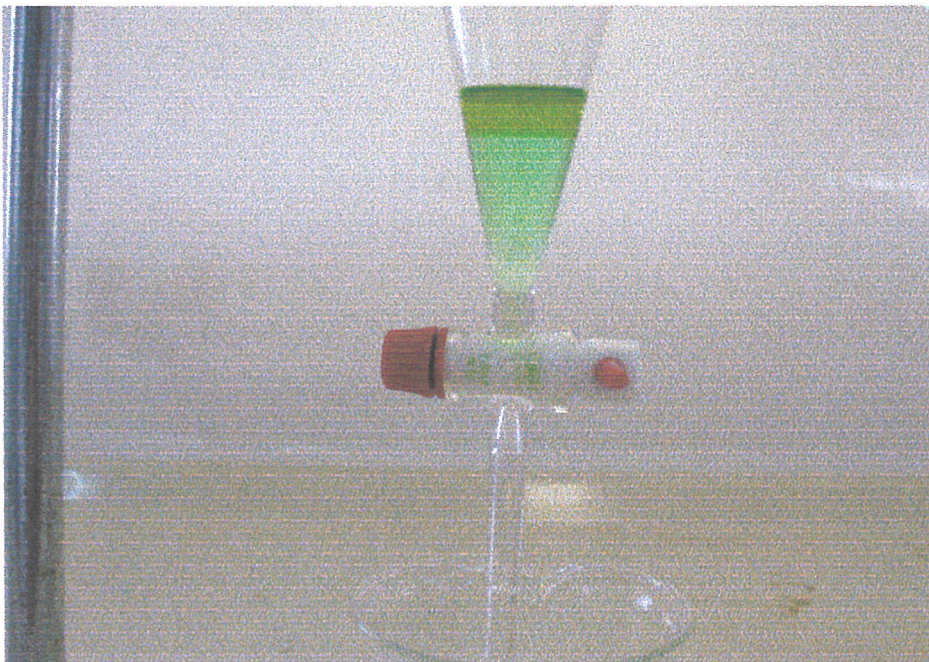
หมายเหตุ : A1 A2 A3 A4 และ A5 เป็นสาหร่ายที่พบในบริเวณชั้นที่ 1 ของน้ำตกกระทิง

: B1 B2 B3 และ B4 เป็นสาหร่ายที่พบในบริเวณชั้น 2 ของน้ำตกกระทิง

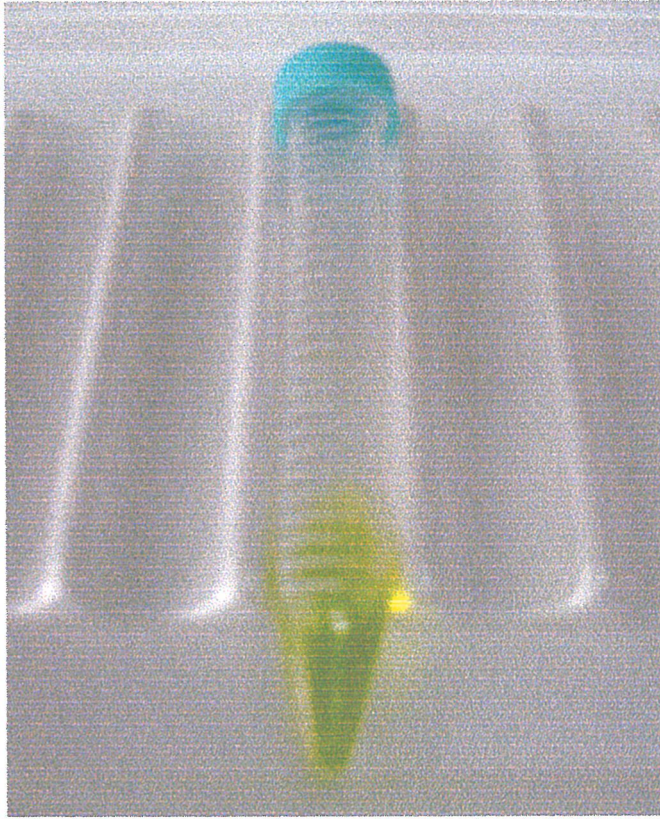
: D2 เป็นสาหร่ายที่พบในบริเวณชั้นที่ 8 ของน้ำตกกระทิง



ภาพที่ ค11 การเลี้ยงสาหร่ายในหลอดเพาะเลี้ยง



ภาพที่ ค12 การแยกคลอโรพิลล์ออกจากคาโรทีนอยด์



ภาพที่ ๑๓ คาโรทีนอยด์ที่ได้จากการสกัด

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ ง1 ผลของวิธีสกัดต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. A1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.025	2	0.513	106.791	0.000
Within Groups	0.029	6	0.005		
Total	1.054	8			

ตารางที่ ง2 ผลของวิธีสกัดต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. B4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.113	2	1.056	3293.377	0.000
Within Groups	0.002	6	0.000		
Total	2.115	8			

ตารางที่ ง3 ผลของวิธีสกัดต่อปริมาณคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. A4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.650	2	1.325	808.306	0.000
Within Groups	0.010	6	0.002		
Total	2.659	8			

ตารางที่ ๓4 การคัดเลือกสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตคาร์ทีนอยด์สูงสุดจากสาหร่ายทั้งหมด 10 สายพันธุ์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.142	9	1.127	19.460	0.000
Within Groups	1.158	20	0.058		
Total	11.300	29			

ตารางที่ ๓5 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการผลิตคาร์ทีนอยด์ของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. A5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.098	4	1.275	41.954	0.000
Within Groups	0.304	10	0.030		
Total	5.402	14			

ตารางที่ ๓6 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการผลิตคาร์ทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. D2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.486	4	0.871	4.970	0.018
Within Groups	1.753	10	0.175		
Total	5.239	14			

ตารางที่ ๗ ผลของแมกนีเซียมต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. A5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.462	4	1.366	232.643	0.000
Within Groups	0.059	10	0.006		
Total	5.521	14			

ตารางที่ ๘ ผลของแมกนีเซียมต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. D2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.867	4	1.217	938.023	0.000
Within Groups	0.013	10	0.001		
Total	4.880	14			

ตารางที่ ๙ ผลของไนโตรเจนต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. A5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.208	4	3.302	157.844	0.000
Within Groups	0.209	10	0.021		
Total	13.418	14			

ตารางที่ 10 ผลของไนโตรเจนต่อการผลิตกาโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. D2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.926	4	2.731	47.034	0.000
Within Groups	0.581	10	0.058		
Total	11.506	14			