ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

T099440

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ปริมาณสารอาหารและความเป็นกรด-ด่างที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

Effect of nutrients and pH on growth and pigments composition of *Chlorococcum* sp.

โดย

นางสาวชลิดา ตีระพงษ์ศักดิ์

วพ. 582121 2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 99440
วัน,เดือน,ปี.....

b 11885476
i.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

ปริมาณสารอาหารและความเป็นกรด-ด่างที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

Effect of nutrients and pH on growth and pigments composition of *Chlorococcum* sp.

ชื่อนักศึกษา นางสาวชลิดา ตีระพงษ์ศักดิ์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. อัจฉรี เรืองเดช
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ. ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....
(ดร. อัจฉรี เรืองเดช)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราอาจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 29 เดือน มี.ค. พ.ศ. 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ปริมาณสารอาหารและความเป็นกรด-ด่างที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

Effect of nutrients and pH on growth and pigments composition of *Chlorococcum* sp.

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากสารสีแดงโดยเฉพาะ astaxanthin ในทางการประมงอย่างกว้างขวาง ซึ่งสารสีแดงที่นำมาใช้จะได้จากสาหร่ายขนาดเล็กชนิดต่างๆ ซึ่งสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ก็เป็นสาหร่ายชนิดหนึ่งที่สร้างสารสีแดงได้ ดังนั้นในปัญหาพิเศษฉบับนี้จึงได้ศึกษาผลกระทบของ pH การให้โอโซนและการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสารสีแดงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงปลาสวยงามต่อไป โดยเบื้องต้นได้ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหาร 2 สูตรที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. คืออาหารสูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium พบว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร BG-11 medium และเมื่อทำการศึกษาผลกระทบของ pH ที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 การให้โอโซนที่ 0, 10, 20 และ 30 นาที และการทำให้ขาดธาตุอาหารต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. พบว่าสาหร่ายจะสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นตั้งแต่ 4.0-8.0 และเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 7.0-8.0 ในขณะที่การปรับ pH ให้คงที่ที่ 4.0 จะทำให้สาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียวและมีอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์สูงที่สุด แต่การให้โอโซนพบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ส่วนการทำให้ขาดธาตุอาหารพบว่าเมื่อลดสารอาหารสูตร BG-11 medium ลงครึ่งหนึ่งในสาหร่ายที่ทำให้ขาดไนโตรเจนและขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีสีเหลืองและสีเหลืองอมเขียวในขณะที่กลุ่มที่ทำให้ขาดฟอสฟอรัสจะมีสีเขียวขุ่น แต่เมื่อนำสาหร่ายมาดูภายใต้กล้องจะพบว่าสาหร่ายทั้งที่ขาดไนโตรเจนและที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีการสะสมสารสีแดงภายในเซลล์ และเมื่อนำมาหาอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์จะพบว่าในกลุ่มที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดไนโตรเจนจะมีค่าสูงที่สุด

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร BG-11 medium และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 7.0-8.0 ซึ่งการลดสารอาหารในสูตร BG-11 medium ลงครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดไนโตรเจนจะทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. สะสมสารสีแดงหรือแคโรทีนอยด์ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.อัจฉรี เรืองเดช เป็นอย่างสูงที่ให้ความกรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำดีๆ ความช่วยเหลือ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ต่างๆ จนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในระหว่างการทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความสะดวกในการยืมและใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในระหว่างการทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณ เพื่อนๆในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกคน ที่ร่วมเรียนและร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมาตลอดระยะเวลา 4 ปี

ท้ายสุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ครอบครัวข้าพเจ้าที่ให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมาจนสามารถสำเร็จการศึกษาได้

นางสาวชลิดา ตีระพงษ์ศักดิ์

มีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	21
สรุปและข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	37

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ช่วงเวลาที่ใช้ การดูดกลืนสูงสุด และการระบุชนิดของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ในเซลล์สาหร่าย*Chlorococcum* sp.	6
2	ส่วนประกอบของแคโรทีนอยด์ (% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด) ของเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน	13
3	ความเข้มข้นของ *trans* - astaxanthin อิสระและ astaxanthin ทั้งหมดในสาหร่าย*Chlorococcum* sp.	14
4	องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp.	22
5	อัตราการเจริญเติบโต (x10^4 เซลล์/ซีซี/วัน) ของสาหร่าย*Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นต่างกัน	23
6	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (µg/L) ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (µg/L) และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ปรับ pH ให้คงที่ต่างกัน	25
7	อัตราการเจริญเติบโต (x10^4 เซลล์/ซีซี/วัน) ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการทำให้ขาดธาตุอาหารต่างกัน	28
8	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ ในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุต่างกัน	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
1	สมการอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 680 nm (abs ที่ 0.01-0.09)	37
2	สมการอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 680 nm (abs ที่ 0.1-0.9)	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

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

ซึ่งสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ก็เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถเปลี่ยนสารสีเขียวในเซลล์ให้เป็นสารสีแดงได้ในสภาวะที่ทำให้เกิดความเครียด มีอัตราการเจริญเติบโตดี เลี้ยงง่ายในระบบกลางแจ้ง และมีความทนสูงทั้งในที่ที่มี pH รุนแรงและอุณหภูมิสูงๆ ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการสร้างสารสีแดงในสาหร่ายชนิดนี้เป็นจำนวนมาก

ในปัญหาพิเศษฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบสูตรอาหาร 2 สูตรที่จะทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. มีการเจริญเติบโตดีที่สุดและศึกษาผลกระทบของ pH ของอาหารที่ใช้เลี้ยง การให้โอโซนและการทำให้ขาดสารอาหารต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีเพื่อนำไปใช้ในการหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสะสมสารสีแดงในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อนำสารสีแดงนั้นไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและใช้เร่งสีในปลาสวยงามต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสูตรอาหารที่ทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่สุด
2. ศึกษาผลกระทบของ pH ของอาหารที่ใช้เลี้ยง การให้โอโซนและการทำให้ขาดสารอาหารต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสูตรอาหารที่ทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเพื่อนำมาใช้เลี้ยงในการเพิ่มจำนวน
2. ทราบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อนำสารสีแดงนั้นไปใช้ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและเร่งสีในปลาสวยงามต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ประโยชน์ของสารสีแดงที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ใช้ผสมอาหารสัตว์

astaxanthin เป็นรงควัตถุพื้นฐานที่พบได้ในเนื้อสัตว์จำพวก salmonids ได้แก่ ปลาแซลมอนและปลาเทราท์และสัตว์จำพวก crustaceans เช่นกุ้ง กั้ง และปูต่างๆ ซึ่งตามธรรมชาติแล้วสัตว์เหล่านี้จะได้รับรงควัตถุนี้จากอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดทำให้สีของเนื้อสัตว์มีสีสันจืดจางไม่สวยและขายได้ในราคาต่ำ(Lorenz and Cysewski, 2000)ดังนั้นผู้เลี้ยงจึงนิยมใช้ astaxanthin เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อที่จะทำให้สัตว์น้ำดังกล่าวมีสีสันสวยงามและขายได้ราคาสูง ซึ่งมีคำแนะนำให้ใช้ astaxanthin ประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงปลาแซลมอนเป็นระยะเวลาประมาณ 2-4 เดือน ก็จะทำให้ปลามีสีสันสวยงาม(Johnson et al., 1980)นอกจากจะช่วยในการสร้างสีแล้ว astaxanthin ยังช่วยให้ไข่ของ salmonids มีอัตราการรอดสูง ฟักตัวดีและยังกระตุ้นให้ปลามีการเจริญเติบโตได้ดี

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

2. ใช้ผสมในอาหารมนุษย์

ใช้ astaxanthin ผสมในปูอัดทำให้ปูอัดมีสีแดงน่ารับประทานยิ่งขึ้น (สุดสายชล, 2541)

3. ใช้ในทางการแพทย์

Jyonouchi et al. (1996) รายงานว่า astaxanthin สามารถเพิ่มทีเซลล์ผู้ป่วย (T-helper) ในหนูได้สูงกว่าคาโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ โดยการเพิ่มของทีเซลล์ผู้ป่วยนี้ทำให้หนูมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่ม T-dependent immunogloblulin ใน human peripheral bood mononuclear cell นอกจากนี้ astaxanthin ยังมีสมบัติเป็น strong antioxidant ที่สูงกว่าแคโรทีนอยด์อื่นๆ ทำให้ชื่อว่าสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งและเนื้องอกนั้นมีอนุมูลอิสระเป็นจุดเริ่มต้นและส่งเสริมการเกิดเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการที่ astaxanthin มีสมบัติเป็น antioxidant ที่สูงจึงมีส่วนช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีทำให้สามารถป้องกันการเกิดโรคดังกล่าวได้

แหล่งของ astaxanthin

จากที่กล่าวมาพบว่า astaxanthin เป็นสารสีแดงที่มีประโยชน์มาก ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต astaxanthin เป็นจำนวนมาก ซึ่งแหล่งของ astaxanthin จะประกอบไปด้วย

1. การสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีการทางเคมี

2. การสังเคราะห์ขึ้นโดยธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. แหล่งจากพืชและสัตว์

4. แหล่งจากจุลินทรีย์

ราและยีสต์ มีการพบ astaxanthin ในเชื้อราสกุล *Peniophora* (Hymenomycetes) เพียงสกุลเดียวเท่านั้นและยีสต์เพียงชนิดเดียวคือ *Phaffia rhodozyme* ที่สามารถสร้าง astaxanthin ได้

แบคทีเรีย พบว่า *Halobacterium salinarium* สามารถสร้าง astaxanthin ได้ 265 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

สาหร่าย ซึ่งในส่วนของสาหร่ายที่สามารถสร้าง astaxanthin ได้มีดังนี้ *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguiana*, *Euglena rubina*, *Chlorella fusa*, *Chlorella zofingiensis*, *Chamydomonas nivalos*, *Neospongiococcum* sp., *Neochloris wimmeri*, *Spongiochoris typical*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus* sp. และ *Chlorococcum* sp.

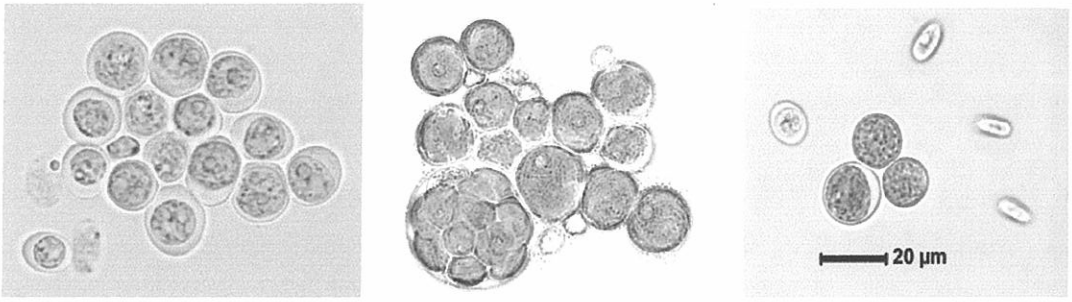
ซึ่งในส่วนของสาหร่ายก็เป็นแหล่งของการผลิต astaxanthin ที่น่าสนใจและถูกนำมาใช้ทางการประมงโดยเฉพาะการนำไปใช้ในการเร่งสีในปลาสวยงาม โดยแหล่งผลิต astaxanthin ที่สำคัญคือสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* และจากการที่ astaxanthin สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายจึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิต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

ลักษณะของสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

Chlorococcum sp. ในสภาพปกติจะเป็นเซลล์เดียวแต่บางครั้งอาจจะเห็นเป็นกลุ่มโคโลนีเล็กๆประกอบด้วย 2-4 เซลล์ มีสารพวกเจลาตินหุ้มเซลล์ เซลล์จะมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือป้นรูปไข่ ขนาดเซลล์ไม่คงที่ บางครั้งมีลักษณะเป็นฝ้าเมื่อเปียกชื้นหรือมีน้ำท่วมหรือแช่บริเวณผิวหน้าเมือกจะมีลักษณะบางและเห็นไม่เด่นชัด เซลล์เดียวๆแต่ละเซลล์จะมีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยเกือบเต็มเซลล์หรือบางชนิดจะอยู่ด้านข้างเซลล์และถูกหุ้มด้วยไพรีนอยด์(ยุวดี, 2549)โครงสร้างเซลล์ที่เห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง และข้อมูลที่แสดงรายละเอียดของโมเลกุลจะแสดงให้เห็นว่า *Chlorococcum* sp. มีหลายสายพันธุ์

การสืบพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศ แหล่งกำเนิดของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสจะถูกแบ่งในระหว่างที่ zoospores ถูกปล่อยออกจากแหล่งกำเนิดที่ผนังเซลล์ หนวดทั้งสองเส้นจะทำหน้าที่กั้น zoospores และในระยะแรกจะมีอายสปอตและคอนแทรกไทล์แวคิวโอลก่อนจะมีการพัฒนาใหญ่ขึ้น เป็น vegetative cells หลังจากผ่านไปหลายวัน ถ้าอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดน้ำจะพบเซลล์ในรูป aplanospore มากว่า zoospores ส่วนไซโกตที่มีผนังหนาหรือ hypnospore จะมีการพัฒนาเข้าสู่ vegetative cells ในระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

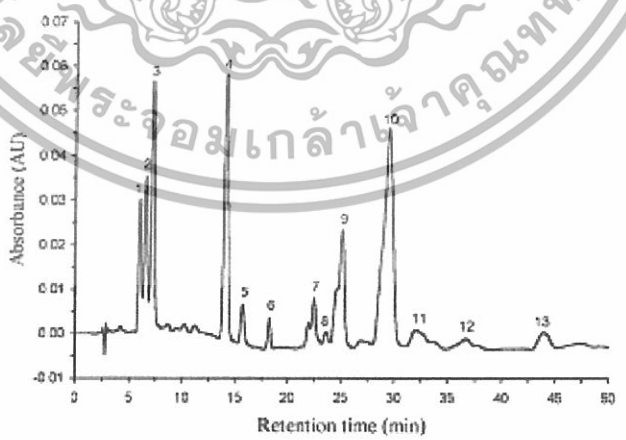


ภาพที่ 1 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ที่มา : http://silicasecchidish.conncoll edu/

รูปแบบของสารสีที่พบในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

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



ภาพที่ 2 Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของเม็ดสีที่สกัดจากเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. สำหรับการระบุชนิดของจุดสูงสุดจะแสดงในตารางที่ 1

ที่มา : Jian-Ping Yuan et al. (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ช่วงเวลาที่ใช้ การดูดกลืนสูงสุด และการระบุชนิดของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ในเซลล์สาหร่าย*Chlorococcum* sp.

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

ที่มา : Jian-Ping Yuan et al. (2002)

นอกจากนี้ Liu and Lee (1999) ได้ทำการวิเคราะห์หาส่วนประกอบของ secondary carotenoid ในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เช่นเดียวกันโดยเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ด้วยอาหารสูตร A9 medium ในถังหมักที่ทำการให้แสง 22 μmol photon/m^2s และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 30 °C จากนั้นทำการสกัดแคโรทีนอยด์แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค spectroscopic techniques และวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์จะพบว่าในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่มี canthaxanthin, 3'hydroxyechinenone, adonirubin และ adonixanthin เป็นองค์ประกอบหลักคิดเป็น 32%, 23%, 12% และ 9% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การได้มาของ astaxanthin ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

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

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

ที่มา : Jian-Ping Yuan et al. (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

ที่มา : Jian-Ping Yuan et al. (2002)

ในการผลิตสารสีแดงจากสาหร่ายขนาดเล็กจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการคือกระบวนการเพื่อเพิ่มมวลสาหร่ายและกระบวนการชักนำให้สาหร่ายผลิตสารสีแดง ซึ่งในการศึกษาการสร้างสารสีแดงในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ก็ใช้วิธีการเดียวกันคือทำการเพิ่มมวลสาหร่ายจากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงนำไปทำการชักนำให้สร้างสารสีแดง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารสีแดงมีดังนี้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเพิ่มมวลสาหร่ายให้ได้จำนวนมากจะต้องทราบปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะคล้ายกับการเลี้ยงสาหร่ายชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นปัจจัยหลักๆ ได้ดังนี้

1. ธาตุอาหาร

การเจริญเติบโตของสาหร่ายขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย ซึ่งอาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

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

1.1.1. คาร์บอน ที่พืชนำไปใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคืออนินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายใช้คาร์บอนประเภทอนินทรีย์ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งละลายได้ในน้ำหรือในรูปของเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต ส่วนคาร์บอนประเภทอินทรีย์จะอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตเช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งความต้องการชนิดรวมทั้งปริมาณของสารประกอบคาร์บอนจะแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย Zhang and Lee (2001) ได้ทำการทดลองผลกระทบของสารประกอบคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงแบบ heterotrophic ใน flask ด้วยอาหารสูตร medium A ที่ถูกเขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 24 ชั่วโมงโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันและที่ระดับต่างๆ ผลที่ได้พบว่า *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีใน monosaccharides แต่จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน polysaccharides ซึ่งในส่วนของแหล่งคาร์บอนที่ดีสุดสำหรับการเจริญเติบโตแบบ heterotrophic ของ *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 คือ กลูโคสที่ความเข้มข้น 20 – 40 mM ซึ่งจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มกลูโคสอย่างพอเหมาะลงไปในการเลี้ยงจะทำให้ผลผลิตมวลรวมของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 เพิ่มขึ้น

1.1.2. ไนโตรเจน มีความสำคัญรองจากคาร์บอนในแง่ของปริมาณ โดยปริมาณไนโตรเจนของพืชมีปริมาณร้อยละ 7-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ยกเว้นไดอะตอม ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่นเนื่องจากซิลิกาเป็นธาตุที่สำคัญของผนังเซลล์ไดอะตอม หรือในสาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้งมาทดแทน สาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปอนินทรีย์และอินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแกสได้อีกด้วยแต่มีสาหร่ายบางชนิดเท่านั้นคือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ได้แก่เกลือ 3 ชนิด คือ ไนเตรต ไนไตรท์ และแอมโมเนีย ถ้าแหล่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวจะทำให้ระดับของ pH ของอาหารลดต่ำอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นอันตรายต่อสาหร่าย ไนไตรท์เป็นสารละลายอนินทรีย์ซึ่งพืชหลายชนิดต้องการใช้ในปริมาณไม่เกิน 1 มิลลิโมล ถ้ามากกว่านี้จะทำให้เกิดอันตราย ส่วนสารประกอบอินทรีย์ไนโตเจนที่พืชนำเข้าไปใช้ได้แก่ ยูเรีย เอไมด์ (amide) กลูทามีน (glutamine) และเอสพาราจีน (asparagines) ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดดี ส่วนสารอินทรีย์ชนิดอื่น ได้แก่ กรดอะมิโน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไกลซีน เซรีนอะลามีน) กรดกลูทามิคและกรดแอสพาร์ติคนั้น สาหร่ายต้องการใช้เพื่อการเติบโตซึ่งแตกต่างกันตามชนิด ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุ หรือสารสี (pigments) ของเซลล์ รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย (ลัดดา, 2539)

1.1.3. ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชเพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลเสียต่อการเจริญเติบโต คือ ปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์-เอ RNA และ DNA จะลดลงแต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ได้มีการทำการทดลองผลกระทบของโซเดียมฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตโดยใช้สารฟอสเฟต 5 ชนิด คือ Na_2HPO_4, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, K_2HPO_4 และ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ แทนฟอสเฟตในสูตรอาหารที่ความเข้มข้น 25 ppm โดยเริ่มเลี้ยงสาหร่ายที่ความหนาแน่น 1.67×10^4 เซลล์/มล. ให้แสงที่ความเข้มข้น 10000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน และให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3% ผลที่ได้พบว่า $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ จะทำให้ได้เซลล์จำนวนสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากฟอสเฟตชนิดอื่นๆ (วิไลลักษณ์และคณะ, 2549)

1.1.4 ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ ได้แก่ เกลือของโลหะ คือซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์

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

1.1.6 โซเดียม เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดที่ต้องการซึ่งในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการโซเดียมในปริมาณมากกว่ากลุ่มอื่นที่อยู่ในน้ำจืด โซเดียมเป็นธาตุอาหารที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด และพืชสามารถใช้โซเดียมทดแทนโปแตสเซียมในกรณีที่แหล่งน้ำขาดโลหะชนิดนี้

1.1.7. โปแตสเซียม เป็นธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิด อัตราส่วนของโซเดียมและโปแตสเซียมจะมีผลต่อการใช้คลอรีนของสาหร่าย

1.1.8. แมกนีเซียม เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์

1.2. กลุ่มธาตุอาหารรอง (micronutrient) ได้แก่ธาตุอาหารซึ่งสาหร่ายต้องการน้อย มักมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม ธาตุอาหารรองเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็นเช่น เอนไซม์ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตหรือเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของเอนไซม์ที่สำคัญบางชนิด ลัดดา (2539) กล่าวว่ามี 2 ประเภทคือ ธาตุอาหารรองอินทรีย์และธาตุอาหารรองอนินทรีย์ ได้แก่ เหล็ก โบรอน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โมลิบดีนัม วานาเดียม โคบอลท์ นิคเกิล ซิลิกา และเซเลเนียม

2. แสง

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

3. อุณหภูมิ

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

4. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ความเค็ม

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

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ปัจจัยที่นำมาใช้ในการส่งเสริมการสร้างสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะมีอยู่หลายปัจจัยด้วยกันแบ่งเป็น

1. แสง

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

2. ออกซิเจน

จะเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการเปลี่ยนรูปของสารสีแดง Liu and Lee (2001) กล่าวว่าการเปลี่ยนรูปของ β-carotene ไปเป็นสารสีตัวอื่นจะต้องอาศัยออกซิเจน ซึ่งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน β-carotene จะเปลี่ยนไปเป็น monohydroxylated (3′-hydroxyechinenone และ adonirubin) และ monoketolated product (echinenone, 3′-hydroxyechinenone และ adonixanthin) เป็นจำนวนมากเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการเปลี่ยนไปอยู่ในรูป dihydroxylated (adonixanthin) และ dioxygenated product (cantaxanthin, adonirubin และ adonixanthin)

3. กลูโคสหรือแหล่งคาร์บอน

จะเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดย Jian-Ping Yuan et al. (2002) ได้ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. 2 แบบโดยแบบที่ 1 ให้เจริญเติบโตแบบ autotrophic ใน Erlenmeyer flask ที่บรรจุอาหารสูตร basal medium แกว่งที่ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C และให้แสงที่ 90 μmol/m^{2}s จากหลอดไฟฟลูออเรส-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซนต์และแบบที่ 2 ให้เจริญเติบโตแบบ heterotrophic โดยเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่จะทำการเพิ่มกลูโคสลงไปในอาหารสูตร basal medium 0.3 % หลังจากนั้นนำสาหร่ายไปสกัดและทำการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้จากการวิเคราะห์จะชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยการเติมกลูโคสลงไป 0.3 % จะทำให้องค์ประกอบของ β-carotene, lutein และ astaxanthin ลดลงแต่ในส่วนของ adonixanthin และ canthaxanthin จะเพิ่มสูงขึ้น

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

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

ที่มา : Jian-Ping Yuan et al. (2002)

4. hydrogen peroxide

จัดเป็น reactive oxygen species (ROS) ที่ใช้กันมากในการชักนำให้เกิดการสร้างสารสีแดง Ma and Chen (2001) รายงานว่าการสร้าง *trans*-astaxanthin อิสระในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะถูกทำให้เพิ่มขึ้นจาก 3.664 เป็น 5.724 mg / g ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (มี astaxanthin ทั้งหมด 80.8 %) ในการเลี้ยงที่เติม hydrogen peroxide 0.1 mM ภายใต้การให้แสง ที่ 22 $\mu E/m^2s$ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ *trans*-astaxanthin อิสระจะแสดงให้เห็นว่า hydrogen peroxide 0.1 mM มีผลต่อการส่งเสริมการสร้าง *trans*-astaxanthin อิสระ และองค์ประกอบของ *trans*–astaxanthin อิสระจะต่ำที่สุดในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีทั้งการให้แสง และ hydrogen peroxide 0.1 mM ซึ่งจะได้ *trans*–astaxanthin อิสระภายใต้สภาวะนี้เป็น 0.260 mg / g ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งผลที่ได้สนับสนุนให้เห็นถึงความสำคัญของ hydrogen peroxide ต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp. นอกจากนี้ Zhang and Lee (2001) ก็ได้ทำการทดลองผลกระทบของ hydrogen peroxide (H_2O_2) ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบของ astaxanthin ในเซลล์สาหร่าย *Chlorococcum* sp.เช่นเดียวกัน แต่ทำการเหนี่ยว นำในที่มืดโดยการเพิ่มสารเคมีที่ทำให้เกิดความเครียดซึ่งประกอบด้วย 10 μM H_2O_2 , 80 mM acetone และ 1 mM Fe^{2+} ลงไปในการเพาะเลี้ยง *Chlorococcum* sp. Strain MA-1 เพื่อให้สาหร่ายสร้าง astaxanthin และ ketocarotenoid ผลที่ได้พบว่า ketocarotenoid ทั้งหมดและ astaxanthin จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 32.5 mg/l และ 9.8 mg/l ตามลำดับในวันที่ 10 ของการเหนี่ยวนำ และ astaxanthin ที่ได้จะคิดเป็น 30 % ของ ketocarotenoid ทั้งหมด

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

การเพาะเลี้ยง	*trans*–astaxanthin อิสระ (mg/lของนน.แห้งเซลล์)	astaxanthin ทั้งหมด (mg/lของนน.แห้งเซลล์)	*trans*–astaxanthin อิสระ (% astaxanthin ทั้งหมด)
ให้แสง , เพิ่ม H_2O_2	5.724 ± 0.33	7.086 ± 0.35	80.8 %
ให้แสง , ไม่เพิ่ม H_2O_2	3.664 ± 0.32	5.464 ± 0.47	67.1 %
ไม่ให้แสง , เพิ่ม H_2O_2	0.521 ± 0.042	1.782 ± 0.12	29.2 %
ไม่ให้แสง , ไม่เพิ่ม H_2O_2	0.260 ± 0.034	1.034 ± 0.08	25.1 %

ที่มา : Ma and Chen (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สาหร่าย *Chlorococcum* sp. รหัส 8438
2. ปุ๋ยสูตร BG-11 medium
3. ปุ๋ยสูตร Chlorella medium
4. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
5. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. ตู้อบ (Oven)
7. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
8. เครื่องวัดความยาวคลื่น (Spectrophotometer)
9. เครื่องแกว่งเหวี่ยง (Centrifuged)
10. เครื่องเขย่า (Shaker)
11. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
12. เครื่องให้โอโซนจากหลอด UV 20 W
13. ชุดเครื่องกรองน้ำ (Suction)
14. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
15. เครื่อง Magnetic stirer
16. pH meter
17. กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์
18. สำลี
19. กล้องจุลทรรศน์
20. counter
21. สไลด์นับเม็ดเลือด
22. ตะเกียงแอลกอฮอล์
23. กระดาษกรอง GF/C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องแก้ว

1. หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร
2. ขวดรูปชมพูขนาด 250, 1000 มิลลิลิตร
3. ขวดน้ำเกลือขนาด 1000 มิลลิลิตร
4. บีกเกอร์ขนาด 25, 50, 500, 1000, 5000 มิลลิลิตร
5. กระบอกตวงขนาด 10, 50, 100 มิลลิลิตร
6. ขวดเก็บสาร
7. ช้อนตักสาร
8. แท่งแก้วคนสาร
9. หลอด centrifuged
10. กรวย
11. Plate
12. กระบอก Plate
13. กระบอกน้ำกลั่น
14. Loop
15. แท่งแก้ว Spread
16. Forcep
17. Dropper Dropper
18. ปิเปตขนาด 1, 10 มิลลิลิตร
19. จุกยาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. แอลกอฮอล์ 95 %
3. เฮกเซน
4. อะซีโตน
5. $NaNO_3$
6. KH_2PO_4
7. $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
8. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
9. $CaCl_2$
10. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
11. EDTA
12. ไดโซเดียมแมกนีเซียม EDTA
13. $C_6H_8O_{10}$
14. Ferric ammonium citrate
15. Na_2CO_3
16. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
17. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
18. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
19. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
20. $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
21. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
22. MoO_3
23. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
24. H_3BO_3
25. Vitamin B12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

99440

วิธีการทดลอง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยมี 4 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหาร 2 สูตร คือสูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium

ชุดการทดลองที่ 2 ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ชุดการทดลองที่ 3 ศึกษาผลกระทบของการโอให้โซนต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ชุดการทดลองที่ 4 ศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

วิธีการทดลอง

1. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหาร 2 สูตรคือสูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium ทำการทดลองกลุ่มละ 5 ซ้ำ โดยการวัดค่าความยาวคลื่นเทียบกับจำนวนเซลล์ทุกวัน

1.1. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. รหัส C8438 จากห้องเพาะเลี้ยงแพงก์ตอน ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงมาเลี้ยงในอาหาร 2 สูตรคือสูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium โดยนำมาเลี้ยงใส่หลอดทดลองจากนั้นนำมาขยายต่อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สาหร่ายเริ่มต้น 1.68×10^5 เซลล์/ซีซี ทำการให้อากาศพร้อมทั้งให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 20 $\mu E/m^2 s^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง นาน 36 วัน เพื่อเปรียบเทียบว่าอาหารสูตรใดทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. เจริญเติบโตดีที่สุด

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

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

2.2. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. มาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH ให้คงที่ตลอดการทดลองที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 ด้วย HCl 1 N และ NaOH 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

N นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บสาหร่ายด้วยการกรองโดยใช้กระดาษกรอง GF/C แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด พร้อมทั้งทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในระดับ pH ที่ต่างกัน

3. ศึกษาผลกระทบของการให้โอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยทำการทดลองกลุ่มละ 5 ซ้ำ

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

4. ศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยทำการทดลองกลุ่มละ 5 ซ้ำ

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

4.1.1. ทำการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในอาหารสูตร BG-11 medium นาน 10 วันเพื่อทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ จานั้นย้ายสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ไปเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน (ไม่ใส่ $NaNO_3$), ขาดฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $NaNO_3$ และ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) โดยให้แสงที่ความเข้มแสง 20 $\mu E/m^2s^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการความยาวคลื่นแสงทุกวันเพื่อเทียบจำนวนเซลล์หาความแตกต่างของการเจริญเติบโตนาน 30 วัน

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

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

4.2.2. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ล้างจนสะอาดที่คิดว่าไม่มีธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเหลืออยู่มาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ลดลงสารอาหารลงเหลือเพียงครึ่งเดียวและทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน (ไม่ใส่ $NaNO_3$), ขาดฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $NaNO_3$ และ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) โดยให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงที่ความเข้มแสง 20 $\mu E/m^2s^{-1}$ ตลอดเวลา ทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีพร้อมสังเกตลักษณะของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 10 วัน ทำการทดลองเป็นเวลา 30 วันจากนั้นทำการเก็บสาหร่ายไปทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

การบันทึกข้อมูล

1. วัดค่าความยาวคลื่น (Spectrophotometer) เทียบกับจำนวนเซลล์
2. วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี Spectrophotometry
3. สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและสังเกตลักษณะของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายในโปรแกรม Microsoft Office Excel
2. วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองแบบ CRD ด้วยโปรแกรม SPSS

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

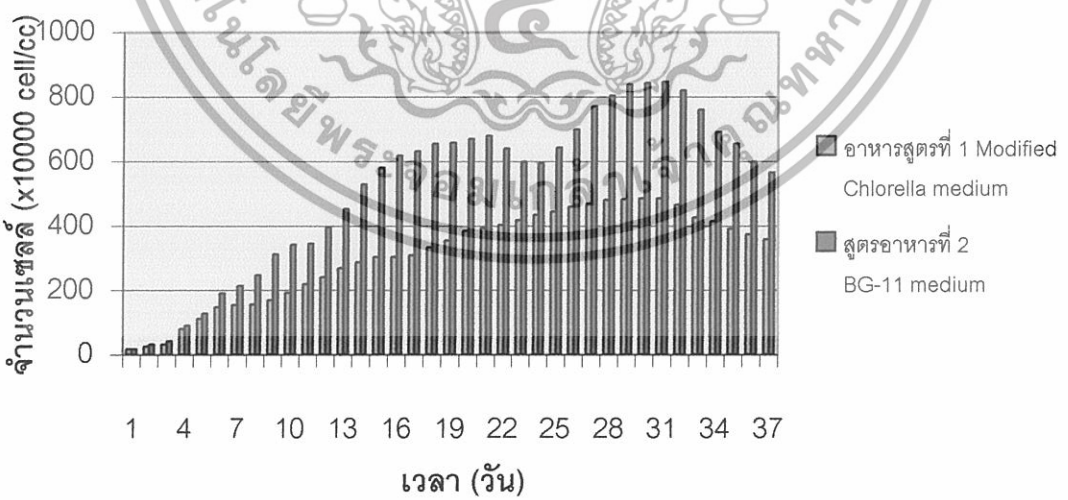
เดือนกรกฎาคม 2549 – มีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

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

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยใช้สาหร่ายรหัส C8438 คือ *Chlorococcum humicola Naegeli* ในสูตรอาหาร 2 สูตรคือ สูตร Modified Chlorella medium และสูตร BG-11 medium (ตารางที่ 4) ที่ทำการเลี้ยงแบบให้อากาศและให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ 20 $\mu E/m^2s^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง ระหว่างเดือนสิงหาคม 2549 ถึง พฤศจิกายน 2549 พบว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสูตรอาหาร BG-11 medium ทั้งนี้เป็นเพราะสูตรอาหาร BG-11 medium มีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าและสูตรอาหาร BG-11 medium มี $C_6H_8O_{10}$ และ Na_2CO_3 ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สาหร่าย *Chlorococcum* sp.สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ จึงทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 medium เจริญได้ดีกว่าที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร Modified Chlorella medium (ภาพที่ 5) ซึ่งจากผลครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. เจริญเติบโตในสูตรอาหาร BG-11 medium ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงสาหร่ายแกมน้ำเงินได้ดีกว่าสูตรอาหาร Modified Chlorella medium ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่เป็นสาหร่ายสีเขียวเหมือนกันทำให้เห็นว่าสาหร่ายชนิดนี้ต้องการสารอาหารปริมาณค่อนข้างสูงและสามารถเพิ่มจำนวนได้มากถึง $8x10^6$ เซลล์/ซีซี ได้นานกว่า 30 วัน



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

ส่วนประกอบ	BG-11 medium (g/L)	Modified Chlorella medium (g/L)
$NaNO_3$	1.5	0.117
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	-
KH_2PO_4	-	0.015
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075	0.0087
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036	-
$CaCl_2$	-	0.0017
EDTA	-	0.005
ไดโซเดียมแมกนีเซียม EDTA	0.001	-
$C_6H_8O_{10}$	0.006	-
Ferric ammonium citrate	0.006	-
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	-	0.0004
Na_2CO_3	0.02	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079	0.0002
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.222	0.0009
H_3BO_3	0.00286	0.00114
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.00181	0.00014
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.000035	-
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	-	0.000049
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.00039	-
MoO_3	-	0.00007
Vitamin B12	-	0.000005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

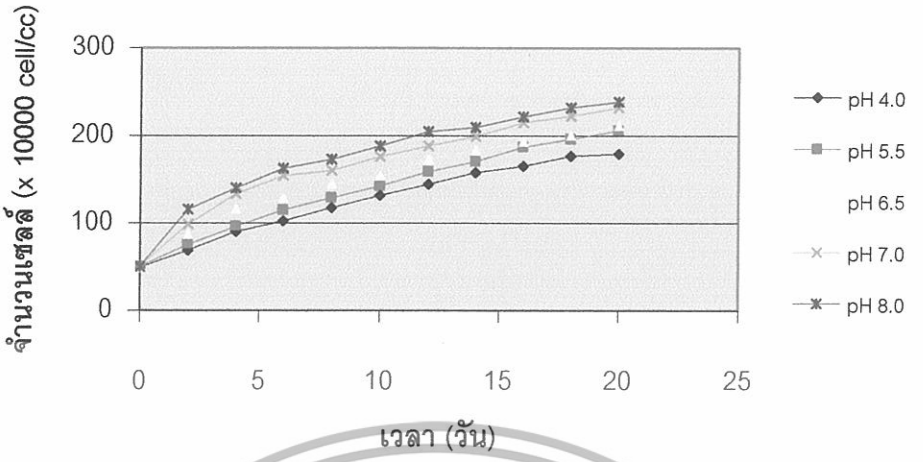
2. ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

2.1. นำสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 4.99±0.32x10^5 เซลล์/ซีซี มาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำการปรับ pH อาหารเริ่มต้นเป็น 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 โดยให้แสงที่ความเข้มแสง 20 $\mu E/m^2s^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทำการวัด pH ในวันสุดท้ายของการทดลองพบว่า pH ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นทุกกลุ่มทดลองจาก pH ของอาหารเริ่มต้นที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0 และ 8.0 จะมีค่าที่วัดในวันที่ 21 ของการทดลองเป็น 7.68, 8.15, 8.56, 9.13 และ 9.57 ตามลำดับ และเมื่อเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ระดับ pH เริ่มต้นตั้งแต่ 4.0-8.0 (ภาพที่ 6) โดยจะมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันดีที่สุดในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 8.0 ส่วนอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันต่ำที่สุดจะพบในกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4.0 (ตารางที่ 5) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Zhang et al. (1997) ที่ทำการศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่แยกมาจากผนังกำแพงในสูตรอาหารปรับปรุง A9 ที่ทำการปรับ pH เริ่มต้นที่ 4.0, 5.5, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0 และ10.0 ในถัง stirred tank fermentors โดยใช้เซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 0.1-0.15 กรัม/ลิตร ภายใต้การให้แสงที่ 200 mol photon/m^2s ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 ^oC พบว่าสาหร่ายชนิดนี้จะสามารถเจริญเติบโตได้ระหว่าง pH 5.5-9.0 และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ประมาณ 7.0-8.0 โดยมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH เริ่มต้น 8.0 ซึ่งคิดเป็น 0.066 ต่อชั่วโมง ส่วน pH เริ่มต้นที่ 4.0 และ 10.0 สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตได้ถึงวันที่ 4 และ 7 ของการทดลองเท่านั้นแต่จากการทดลองนี้ที่ pH 4.0 สาหร่ายสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็นระยะเวลานานกว่า 20วัน

ตารางที่ 5 อัตราการเจริญเติบโต (x10^4 เซลล์/ซีซี/วัน) ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นต่างกัน

pH	อัตราการเจริญเติบโต (x10^4 เซลล์/ซีซี/วัน)
4.0	6.61±0.29 ^{a}
5.5	7.69±0.32 ^{ab}
6.5	7.92±0.33 ^{ab}
7.0	8.61±0.27 ^{ab}
8.0	8.97±0.24 ^{b}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (μg/L) ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (μg/L) และอัตราส่วนระหว่างแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ปรับ pH ให้คงที่ต่างกัน

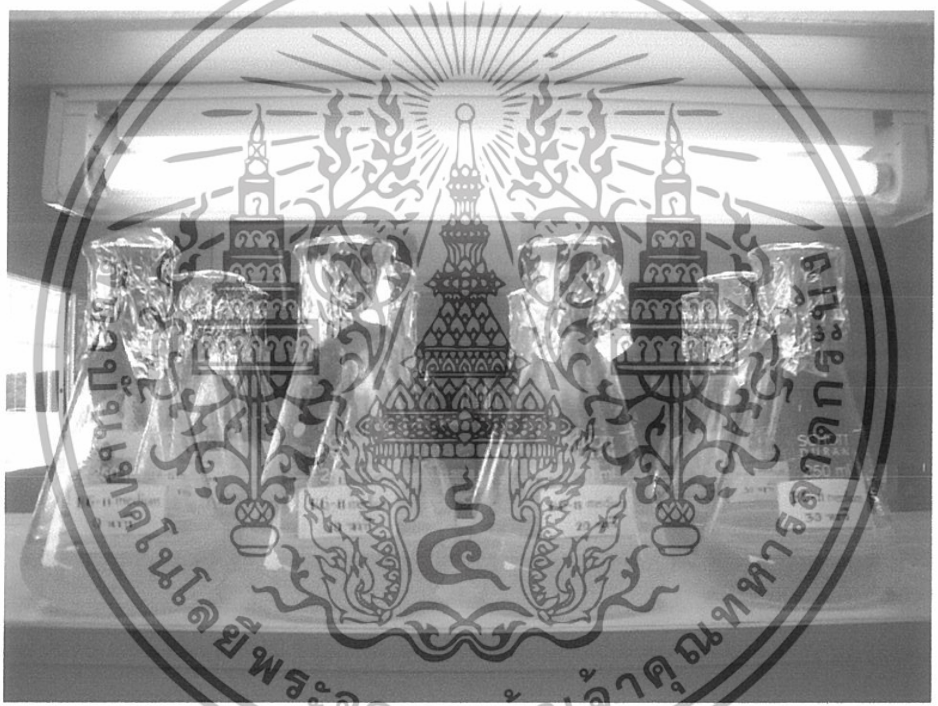
pH	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (μg/L)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (μg/L)	แคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์
4.0	1609.36±166.46 [a]	5892.48±158.68 [a]	3.66
5.5	2445.84±201.03 [b]	4582.80±173.78 [b]	1.87
6.5	3798.07±218.54 [c]	6539.63±156.37 [c]	1.72
7.0	5619.39±122.80 [d]	6855.15±257.05 [c]	1.22
8.0	6081.09±199.85 [e]	5739.39±162.25 [a]	0.94

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

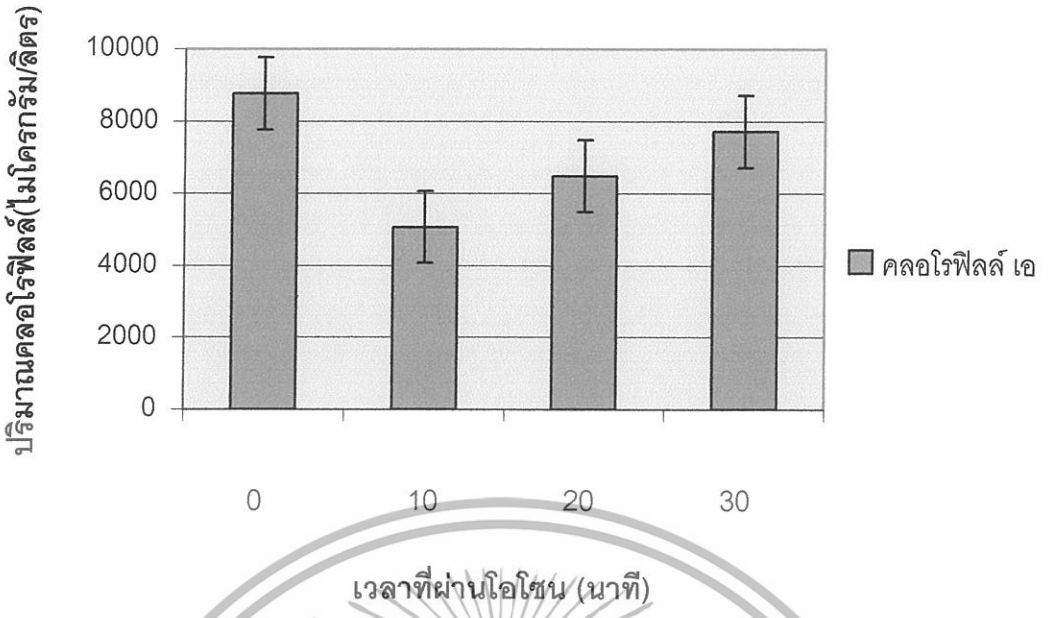
3. ศึกษาผลกระทบของการให้โอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

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



ภาพที่ 8 สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ผ่านการให้โอโซนที่เวลาต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ผ่านการให้โอโซนที่เวลาต่างกัน

4. ศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

4.1. เลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดธาตุไนโตรเจน (ไม่ใส่ $NaNO_3$) ขาดฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ไม่ใส่ $NaNO_3$ และ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) ที่ทำการให้แสงที่ความเข้มแสง 20 $\mu E/m^2s^{-1}$ ตลอด 24 ชั่วโมง นาน 30 วัน พบว่าในกลุ่มที่เลี้ยงโดยทำให้ขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดและกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium จะมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยเป็น 6.03±0.49 และ 8.92±0.64 ($x10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน) ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ส่วนสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ทำให้ขาดไนโตรเจนและทำให้ขาดฟอสฟอรัสจะมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 10) แม้ว่าผลที่ได้จะแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน ขาดฟอสฟอรัส และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสยังสามารถเจริญเติบโตได้แต่จะมีการเจริญเติบโตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 medium แต่ในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ชัดเจนเพราะมีการใช้สาหร่ายเริ่มต้นที่มีอาหารเดิมอยู่ด้วย 10% จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายยังสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารโดยใช้อาหารที่มาพร้อมสาหร่ายในตอนเริ่มต้นในการเจริญเติบโตจึงทำให้ผลของการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp.ในการทดลองนี้ไม่ใช่การขาดธาตุอาหารอย่างสิ้นเชิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 อัตราการเจริญเติบโต ($x10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน) ของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่มีการทำให้ขาดธาตุอาหารต่างกัน

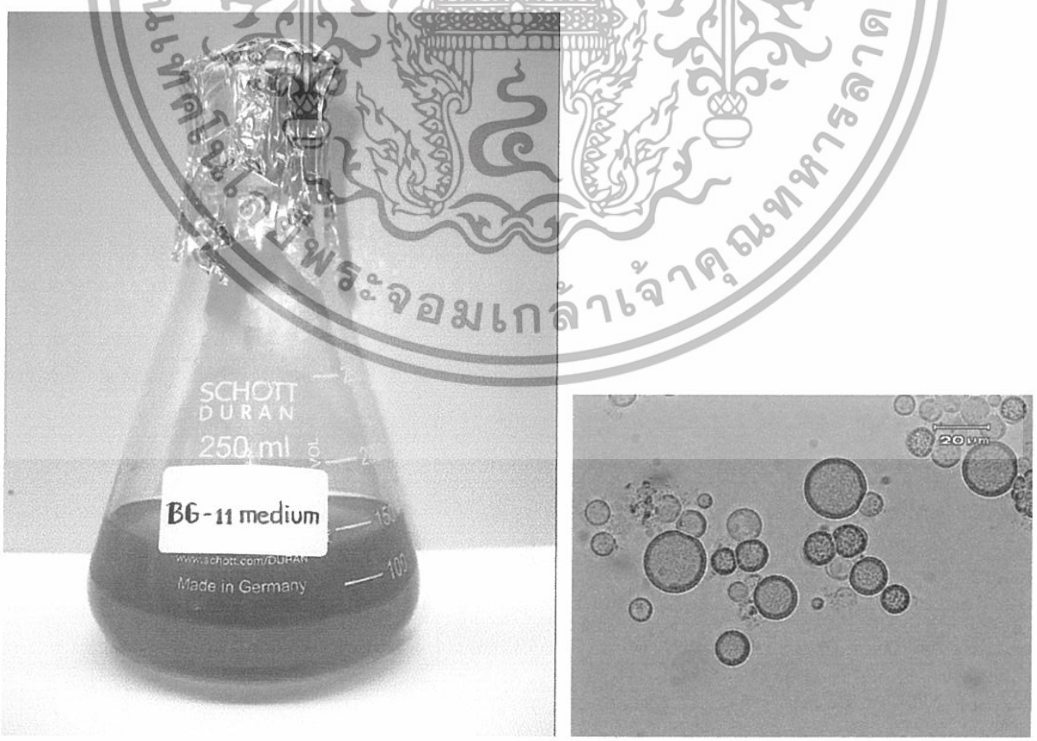
อาหารเลี้ยง	อัตราการเจริญเติบโต ($x10^4$ เซลล์/ซีซี/วัน)
กลุ่มควบคุม	8.92±0.64 [a]
ขาดฟอสฟอรัส	7.13±0.44 [b]
ขาดไนโตรเจน	7.10±0.36 [b]
ขาดไนโตรเจน+ฟอสฟอรัส	6.03±0.49 [c]

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

4.2. สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ทำการลดสารอาหารลงเหลือเพียงครึ่งเดียวและทำให้ขาดไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยเลี้ยงแบบให้แสงตลอด 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 วัน ทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและลักษณะสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสาหร่ายที่ทำการลดสารอาหารเหลือเพียงครึ่งหนึ่งมีสีเขียวเข้ม ลักษณะเซลล์ที่เห็นใต้กล้องจุลทรรศน์มีขนาดใหญ่ ผนังเซลล์หนา เซลล์แยกกันอยู่เป็นเซลล์เดียวๆ ไม่เกาะกลุ่มกัน (ภาพที่ 11) สาหร่ายที่ทำการลดอาหารลงเหลือ

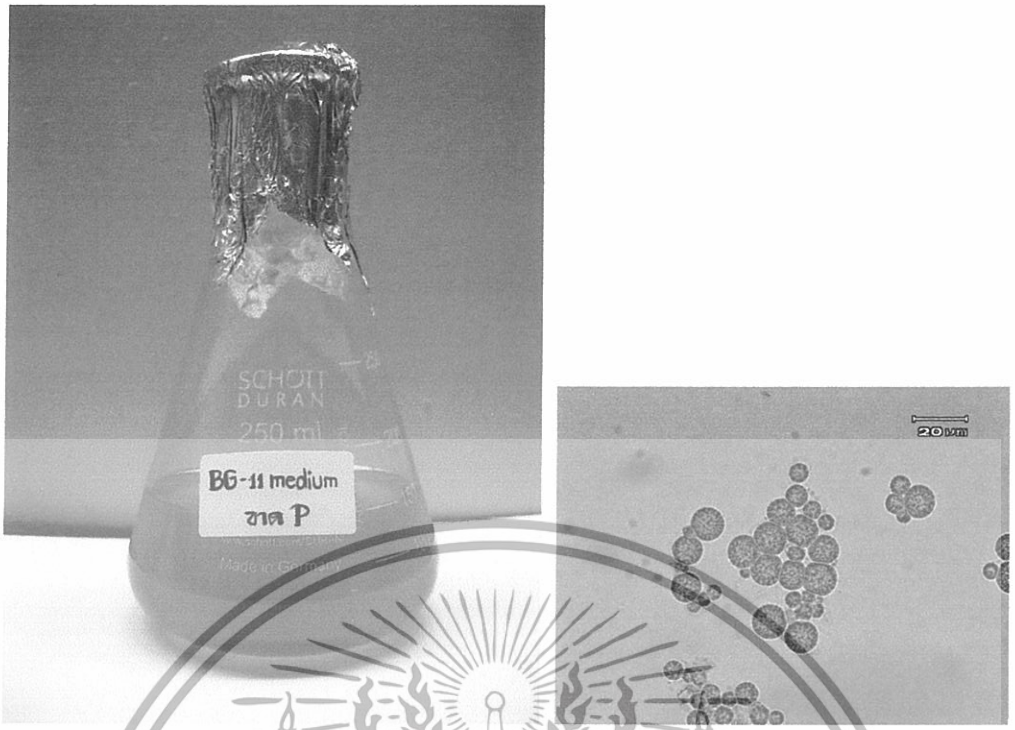
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดฟอสฟอรัสมีสีเขียวเข้มขุ่น ขนาดเซลล์เล็กและผนังเซลล์บางกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่ามีการอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและสังเกตเห็นสารสีแดงเป็นจุดสีแดงเล็กๆอยู่ภายในเซลล์ (ภาพที่12) สาหร่ายที่ทำการลดอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดไนโตรเจนจะมีสีเหลืองเมื่อนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเซลล์สาหร่ายบางเซลล์มีการสะสมสารสีแดงซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดเจน ขนาดเซลล์เล็กกว่ากลุ่มอื่นและเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน (ภาพที่ 13) ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงโดยทำให้ขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีสีเหลืองเขียว ขนาดเซลล์เล็กกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ขาดฟอสฟอรัส เซลล์อยู่รวมเป็นกลุ่มแต่ยังเห็นเป็นเซลล์เดียวๆเช่นเดียวกับกลุ่มขาดฟอสฟอรัสและมีการสะสมสารสีแดงเช่นเดียวกับกลุ่มขาดไนโตรเจนโดยเห็นเป็นจุดสีแดงเล็กๆอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้อง Boussiba et al. (1999) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารสีในสาหร่ายสีเขียว *Haematococus pluvialis* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 medium ที่ทำให้ขาดฟอสฟอรัสและทำให้ขาดไนโตรเจน และให้แสงที่ 100 μmol photon/m^2s จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และวิเคราะห์ astaxanthin ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้พบว่าการเลี้ยงสาหร่ายที่ทำให้ขาดไนโตรเจนและที่ทำให้ขาดฟอสฟอรัสจะทำให้สาหร่าย *Haematococus pluvialis* มีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้นและมีการสะสม astaxanthin เพิ่มขึ้น 4% ของน้ำหนักแห้ง แต่อัตราการสะสม astaxanthin ภายใต้สภาวะที่ทำให้ขาดไนโตรเจนจะเกิดขึ้นเร็วกว่า

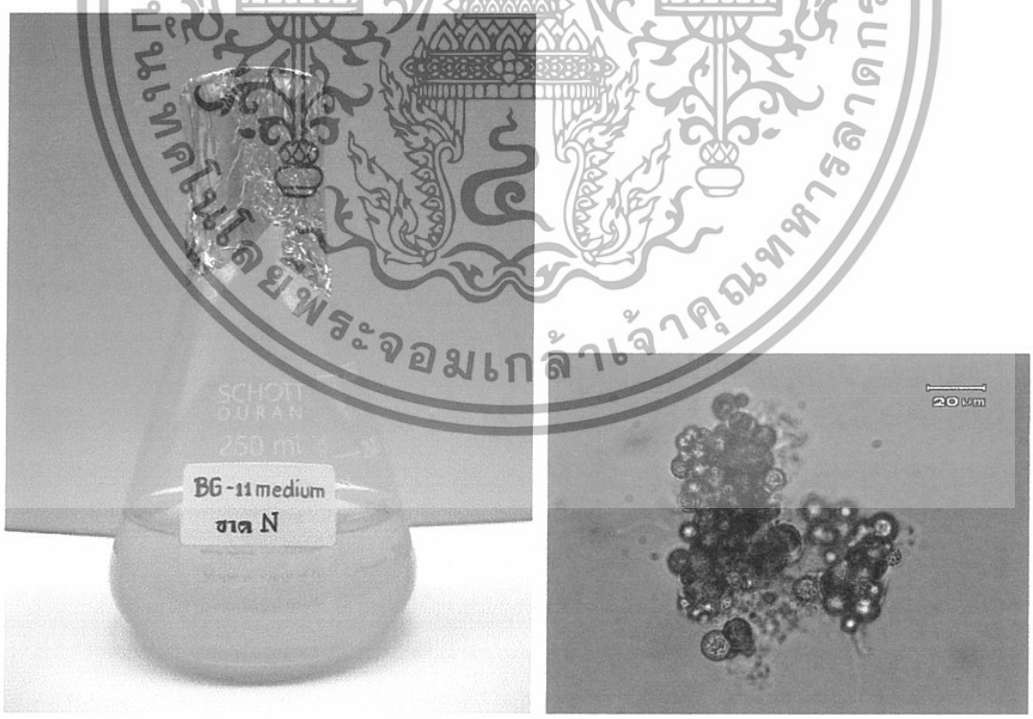


ภาพที่ 11 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

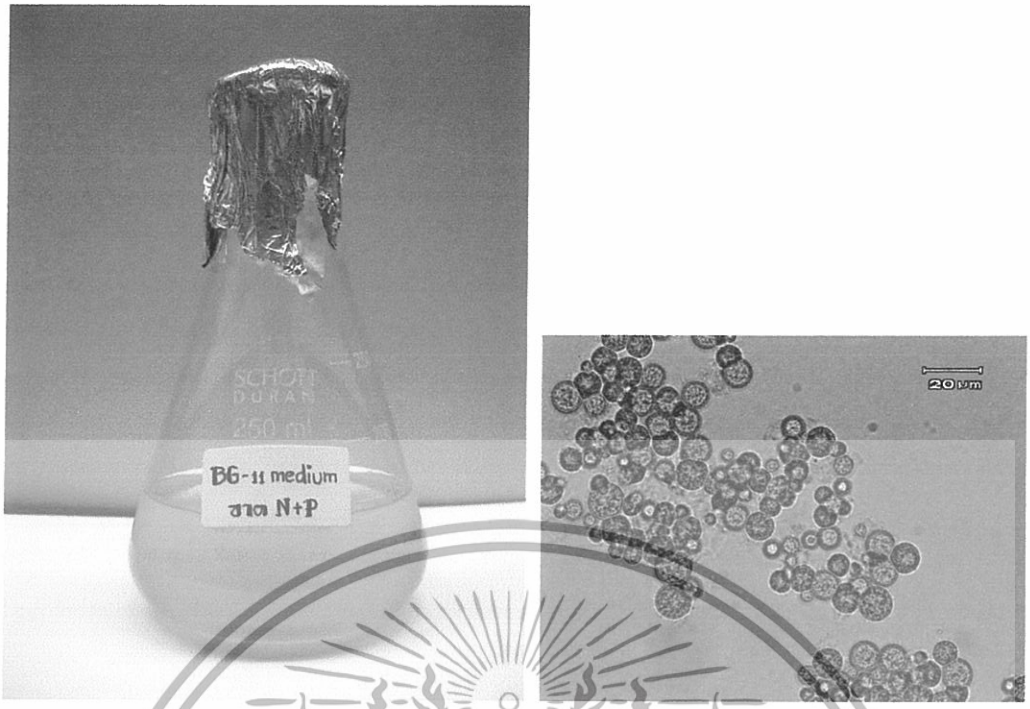


ภาพที่ 12 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่ง และทำให้ขาดธาตุฟอสฟอรัส (คือไม่ใส่ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ลงในอาหารเลี้ยง)



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 medium ที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (คือไม่ใส่ $NaNO_3$ และ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ลงในอาหารเลี้ยง)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สูตรอาหาร	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (μg/L)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ ทั้งหมด (μg/L)	แคโรทีนอยด์/ คลอโรฟิลล์
กลุ่มควบคุม	4232.68±230.94 [a]	6053.75±183.69 [a]	1.43
ขาดฟอสฟอรัส	3082.22±375.64 [b]	5110.54±162.37 [b]	1.66
ขาดไนโตรเจน	1636.71±251.11 [c]	3540.22±209.28 [c]	2.16
ขาดไนโตรเจน+ฟอสฟอรัส	1994.10±239.63 [c]	3740.45±223.56 [c]	1.88

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสูตรอาหารที่ทำให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. รหัส 8438 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดและการศึกษาผลกระทบของ pH การให้โอโซนและขาดสารอาหาร ต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2549 ถึงเดือนมีนาคม 2549

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

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

3. การศึกษาผลกระทบของการให้โอโซนต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. โดยทำการให้โอโซนที่เวลาต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 10, 20 และ 30 นาที เมื่อจบการทดลองพบว่าสีในสาหร่ายทุกกลุ่มไม่ต่างกันโดยในแต่ละกลุ่มจะมีสีเขียวเข้มแต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์จะพบว่าสาหร่ายในกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำการผ่านโอโซนจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงที่สุด และเมื่อทำการให้โอโซนปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดลง โดยการให้โอโซนที่ 10 นาทีจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ให้อาหารที่ทำให้ขาดไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่าสาหร่ายเมื่อขาดธาตุอาหารก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้แต่ผลการทดลองไม่น่าเชื่อถือเพราะมีการใช้อาหาร 10% จากตอนเริ่มต้นจึงทำให้ผลของการขาดธาตุอาหารไม่ชัดเจน ส่วนการศึกษาผลกระทบของการขาดธาตุอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ที่ทำการลดสารอาหารลดเหลือครึ่งหนึ่งแล้วทำให้ขาดธาตุอาหารต่างกัน พบสาหร่ายที่เลี้ยงแบบขาดไนโตรเจนและขาดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะมีสีเหลืองและสีเหลืองเขียว ในขณะที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีสีเขียวขุ่น ส่วนกลุ่มควบคุมที่ลดสารอาหารลงเหลือครึ่งหนึ่งจะมีสีเขียวเข้ม นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่าย *Chlorococcum* sp. จะมีการสะสมสารสีแดงทั้งในสภาวะการเลี้ยงที่ทำให้ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส แต่จะมีการสะสมสารสีแดงมากที่สุดเมื่อลดสารอาหารในสูตร BG-11 medium ลงเหลือครึ่งหนึ่งและทำให้ขาดไนโตรเจน

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

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีและปริมาณสารสีตัวอื่นๆ อีก

2. ควรศึกษาปัจจัยที่นำมาใช้ร่วมกับการทำให้ขาดธาตุไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมให้สาหร่าย *Chlorococcum* sp. มีการสร้างสารสีแดงเพิ่มมากขึ้น

3. ควรศึกษาผลกระทบของสารสีแดงที่สร้างในสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ในสภาวะที่ทำให้ขาดไนโตรเจนต่อการเร่งสีและเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาสวยงามต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, เชียงใหม่. 546 น.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2539. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 131 น.

วิไลลักษณ์ จำรูณ สาธิต โกวิทวที และขนิษฐา ใช่เจริญ. 2549. ผลของโซเดียมฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของ *Chlorococcum* sp.. โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, กรุงเทพฯ.

สุดสายชล หอมทอง. 2541. การผลิต astaxanthin จากสาหร่าย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

Boussiba, S., W. Bing, J.P. Yuan, A. Zarka and F. Chen. 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. 21: 601-604.

Brown, T.E., F.L. Richardson, M.L. Vaughn. 1967. Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales). Phycologia. 6:167-184.

Hu, Q. 2004. Environmental effects on cell composition. pp. 83-88. *In* Richmond, A. editor. Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publ. co., USA.

Johnson, E.A., T.G. Villa and M.J. Lewis. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. Aquaculture. 20: 123-134.

Jyonouchi, H., S. Sun, M. Mizokami and M.D. Gross. 1996. Effect of various carotenoid on clone, effector-stage T-helper cell activity. Nutrition and Cancer. 26: 313-324.

Liu, B.H. and Y.K. Lee. 1999. Composition and biosynthetic pathways of carotenoid in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp.. Biotechnology Letters. 21: 1007-1010.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Liu, B.H. and Y.K. Lee. 2001. *In vitro* biosynthesis of xanthophylls by cell extracts of a green alga *Chlorococcum*. Plant Physiol Biochem. 39: 147-154.

Liu, B.H. and Y.K. Lee. 2003. Effect of total secondary carotenoid extracts from *Chlorococcum* sp. on *Helicobacter pylori* – infected BALB/c mice. International Immunopharmacology. 3: 979-986.

Lorenz, R.T. and G.R. Cysewski. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Tibtech. 18: 160-166.

Ma, R. Y.-N. and F. Chen. 2001. Enhanced production of free *trans* - astaxanthin by oxidative stress in the culture of the green microalga *Chlorococcum* sp.. Process Biochemistry. 36:1175-1179.

Maursich, W.L. and S.C. Bauernfeind. 1989. Oxycarotenoids in poultry feeds. pp. 319-462. *In* Bauernfeind, S.C. editor. Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors. Food Science and Technology a series of Monograph. Academic Press. Inc., London.

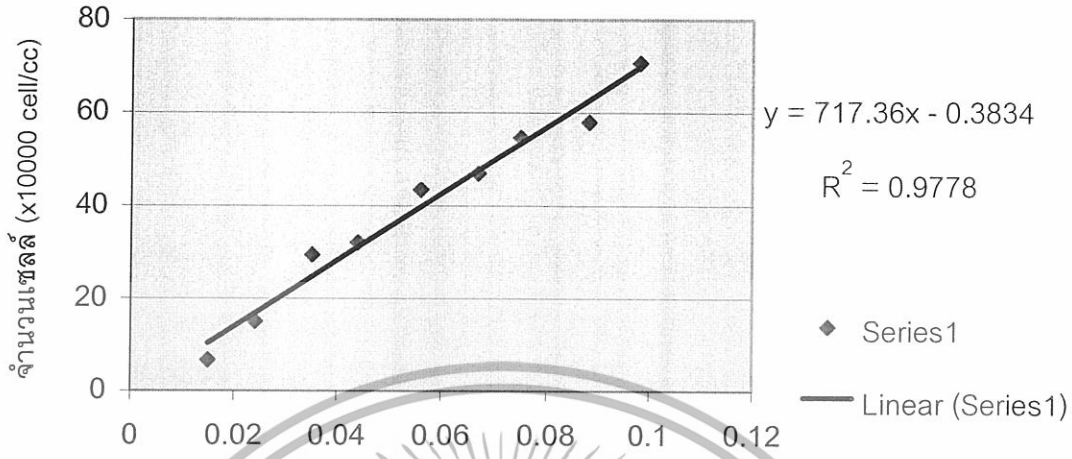
Yuan, J.P., F. Chen, X. Liu and X.-Z. Li. 2002. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. Food Chemistry. 76: 319-325.

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

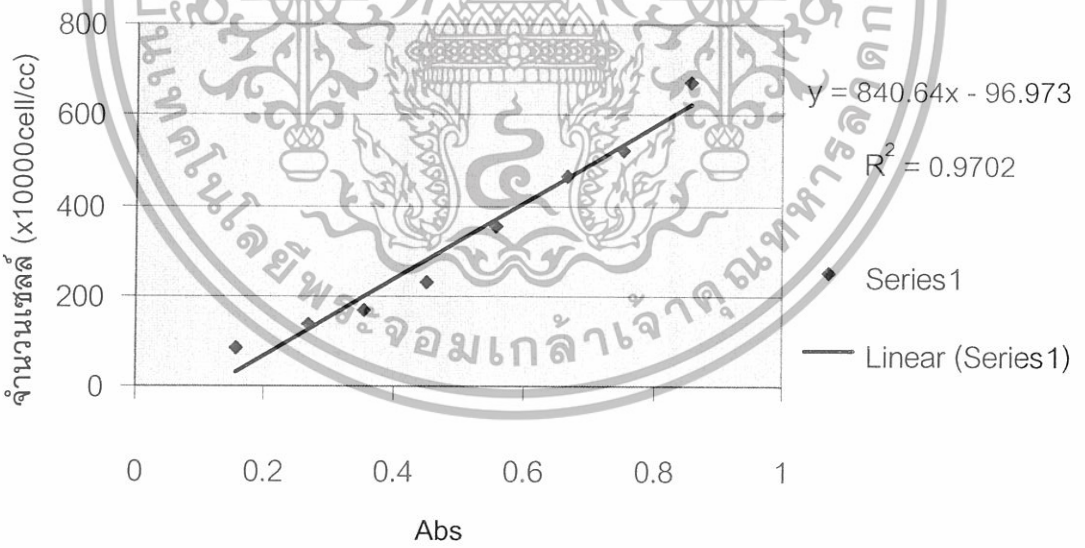
Zhang, D.H. and Y.K. Lee. 2001. Two – step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. Strain MA-1. Appl Microbiol Biotechnol. 55: 537-540.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก



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



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้