รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris*.

Antioxidant agent production from the green alga *Chlorella vulagaris*.

นางสาวบุปผา จงพัฒน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris.*

Antioxidant agent production from the green alga *Chlorella vulagaris.*

นางสาวบุปผา จงพัฒน์

RCH
ว1639ก
2552

.b 1286223X
.i

สขหมู่ 147849
สขทะเบียน
วัน เดือน ปี 15 ก.ค. 2560

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella Vulgaris*
แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 190,200 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 ถึง กันยายน 2552 .
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ นางสาวบุปผา จงพัฒน์ สังกัด คณะเทคโนโลยีการเกษตร
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารคลอเรลลาสูตรดัดแปลง Bold's basal medium และ Basal medium ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมโดยใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.38 mM โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.11 mM ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2.28±0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 25 mM และการเติมโซเดียมคลอไรด์ 100 mM ในอาหาร เปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรปกติ ในการเพาะเลี้ยงแบบ fed batch ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นสูงสุด ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่ 2.69±0.12 2.29±0.26 และ 1.99±0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบ fed batch สามารถผลิตปริมาณลูทีนและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสามารถผลิตลูทีนได้ที่ 1.30±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.60±0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์สามารถผลิตปริมาณลูทีนได้ที่ 0.52±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.72±0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)

คำสำคัญ : คลอเรลลา แคโรทีนอยด์ ลูทีน สารต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Antioxidant agent production from the green alga *Chlorella vulgaris*
Researcher Miss Buppha Jongput
Faculty of Agricultural Technology
Department of Animal Production Technology and Fishery
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

This is a study of factors affecting growth and carotenoids production of *Chlorella Vulgaris*, using modified Chlorella medium, Bold's basal medium, and Basal medium. It was found that there is no significantly different ($P>0.05$) between growth and carotenoids production. The optimal formula for its cultivation contains 1.38mM Sodium Nitrate, 0.11mM Potassium Dihydrogen Phosphate under continuous light intensity at 60 micro mole per square meter per second. For 10 days cultivation, 2.28$\pm$ 0.12 mg per liter of carotenoids were produced.
On fed batch cultivation, there is no significate difference ($P>0.05$) to induce carotenoid production between adding 25mM Ferrous Sulphate (pH 1.5) , 100mM Sodium Chloride compare with normal formula, under continuous light intensity at 60 micro mole per square meter per second for 10 days period, at level of 2.69$\pm$0.12, 2.29$\pm$0.26 and 1.99$\pm$0.18 mg per liter respectively. On fed batch cultivation, Chlorella are able to produce Lutein with higher carotenoids that batch cultivation at significantly difference ($P<0.05$). After 10 days cultivation, fed batch cultivation produces 1.30$\pm$0.01 mg Lutein/liter (2.60$\pm$0.02 mg Lutein/gram of cell dry weight) whereas batch cultivation does 0.52$\pm$0.01 mg Lutein/liter (1.72$\pm$0.02 mg Lutein/gram of cell dry weight)

Keywords : *chlorella vulgaris*, lutein, carotenoids, antioxidant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี เนื่องด้วยได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 และหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง ที่ส่งเสริมให้บุคลากรได้ทำวิจัย ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณนักศึกษาและบุคลากรของหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง และทุกๆ คนในครอบครัวที่ให้กำลังใจและให้คำปรึกษาที่ดี

กราบขอบคุณบิดามารดา ครู อาจารย์ และ ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้ความรู้ และประสบการณ์ที่ดีในการทำงาน

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

บุปผา จงพัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VI
สารบัญรูป VII
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 สมมุติฐานงานวิจัย 2
1.5 คำสำคัญของการวิจัย 3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 แคโรทีนอยด์ 4
2.1.1 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ 4
2.1.2 ลูทีน 5
2.1.3 ประโยชน์ของลูทีนและแคโรทีนอยด์ 5
2.2 สาหร่ายคลอเรลลา 5
2.2.1 การจัดจำแนก 5
2.2.2 รูปร่างลักษณะ 6
2.2.3 รงควัตถุที่พบในสาหร่าย 6
2.2.4 กระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของสาหร่าย 6
2.2.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 6
2.2.6 ปัจจัยในการเพาะเลี้ยง 7
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 9
3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และสาหร่าย 9
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง 11
3.2.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย 11
3.2.2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 12
3.2.3 การศึกษาชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงต่างกัน 13
3.2.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย 14
3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ 14
3.2.7 การวิเคราะห์ปริมาณลูทีน 15
3.2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ 16
บทที่ 4 ผลการวิจัย 17
4.1 ผลของการปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย 17
4.1.1 ผลของสูตรอาหาร 17
4.1.2 ผลของไนโตรเจน 18
4.1.3 ผลของฟอสฟอรัส 19
4.1.4 ผลของความเข้มแสง 21
4.2 ผลของการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 22
4.2.1 ผลของการขาดไนโตรเจน 22
4.2.2 ผลของการขาดฟอสฟอรัส 23
4.2.3 ผลของการขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 24
4.2.4 ผลของความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต 25
4.2.5 ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 26
4.2.6 ผลของคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ 28
4.2.7 ผลของอาหารที่ใช้และไม่ใช้ปัจจัยกระตุ้น 29
4.3 ผลของการศึกษาชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงต่างกัน 31
4.4 ผลของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร 33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 34
5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ 34
5.2 ปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 35
5.3 ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน 35
5.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร 35
บรรณานุกรม 36
ภาคผนวก 39
ภาคผนวก ก 39
ภาคผนวก ข 41
ภาคผนวก ค 42
ประวัตินักวิจัย 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นเซลล์ ปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน 18

4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นเซลล์ ปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารคลอเรลลาสูตรดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน 19

4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นเซลล์ ปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารคลอเรลลาสูตรดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน 20

4.4 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นเซลล์ ปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสงต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน 22

4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นเซลล์ ปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน 27

4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นเซลล์ ปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน 27

4.7 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณชีวมวล และค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้และไม่ใช้ปัจจัยกระตุ้น 31

4.8 เปรียบเทียบปริมาณลูทีน ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณชีวมวล และค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของสาหร่ายที่ใช้วิธีเพาะเลี้ยงต่างกัน 31

ก 1 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของอาหารสูตร Bold' basal medium 39

ก 2 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของอาหารสูตร Basal medium 40

ก 3 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของอาหารสูตร คลอเรลลาดัดแปลง 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงโครงสร้างของ หน่วยไอโซพริน 4
2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ เบต้า-แคโรทีน แซนโทฟิลล์ แอสตาแซนทิน และลูทีน 5
2.3 แสดงรูปร่างและลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp. 6
4.1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างกัน 17
4.2 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างกัน 18
4.3 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างกัน 19
4.4 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่างกัน 20
4.5 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่างกัน 21
4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารขาดไนโตรเจน 23
4.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารขาดฟอสฟอรัส 24
4.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารไนโตรเจนและขาดฟอสฟอรัส 25
4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต (pH 1.5) ที่ระดับต่างกัน 26
4.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับต่างกัน 28
4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์นาน 1ชั่วโมง 29
4.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารใช้และไม่ใช้ปัจจัยกระตุ้น 30
4.13 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายที่ใช้วิธีเพาะเลี้ยงต่างกัน 32
4.14 แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร 33
ข 1 แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดแก้ว ขนาด 720 มิลลิลิตร 41
ข 2 แสดงสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายคลอเรลลา 41
ค 1 กราฟมาตรฐานความหนาแน่นของเซลล์ 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ค 2 กราฟมาตรฐานลูทีนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	42
ค 2 กราฟมาตรฐานลูทีนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แคโรทีนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับอิเล็คตรอนเดี่ยวจากอนุมูลอิสระไว้ไม่ให้ไปทำลายสารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และดีเอนเอในเซลล์ของร่างกาย ในอาหารและผลิตภัณฑ์ เป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อจาก ไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิต เป็นสารต้นตอ (precursors) ของวิตามินเอ นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่ทำให้เกิดรสชาติกับอาหารและกลิ่นหอมของดอกไม้ มีการใช้แคโรทีนอยด์ในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์โดยใช้เป็นสีผสมในอาหาร และเครื่องดื่ม ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ สัตว์ปีก และ สัตว์บก โดยใช้ผสมกับอาหารเพื่อใช้เร่งสีและเป็นอาหารเสริม เช่น ลูทีน แอสตาแซนทิน เบต้าแคโรทีน และแคนตาแซนทิน ใช้ในอุตสาหกรรมยา เช่น เบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารต้นตอในการสังเคราะห์วิตามินเอ และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์เนื่องจากเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งจะช่วยชะลอความแก่ (Gouveia and Empis, 2003; Spolaoreet al., 2006; Abe et al., 2007)

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม แดง พบในคลอโรพลาสต์ และโครโมพลาสต์ของผลไม้ ดอกไม้ ใบของพืช สัตว์ จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้ และ สาหร่าย แคโรทีนอยด์มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากจะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคหัวใจ สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีความสำคัญต่อการสร้างเสริมสุขภาพของมนุษย์ได้แก่ เบต้าแคโรทีน ลูทีน ซีแซนทิน ไลโคพีน และ แอสตาแซนทิน (วีรศักดิ์, 2549)

สาหร่ายขนาดเล็กมีความสำคัญในเชิงพาณิชย์เนื่องจากเป็นแหล่งของแคโรทีนอยด์และสารอนุพันธ์ที่ทำหน้าที่เป็นอาหารของมนุษย์มีประชากรมากกว่า 10 ล้านคนทั่วโลกที่บริโภคคลอเรลลาเม็ดที่ผลิตจากสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa*เป็นสารเสริมสุขภาพ ใช้สาหร่ายขนาดเล็กผสมในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย เช่น *Chlorella vulgaris*มี โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และลิปิด 51-58, 12-17 และ 14-22 % โดยน้ำหนักแห้ง การใช้คลอเรลลาเป็นสารอาหารของมนุษย์ (human nutrition) ในตลาดการค้าปัจจุบันอยู่ในรูปที่แตกต่างกัน เช่น รูปอัดเม็ด แคปซูล และของเหลว ใช้ผสมในพาสต้า อาหารขบเขี้ยว ลูกอม หมากฝรั่งและเครื่องดื่ม ใช้เป็นสารสีในอาหาร ใช้สารสกัดจากสาหร่ายในผลิตภัณฑ์ดูแลใบหน้าและผิวพรรณ เช่น ครีมชะลอความแก่ (anti-aging cream) ผลิตภัณฑ์ป้องกันแดด และดูแลเส้นผม นอกจากนี้ยังพบว่าผลิตภัณฑ์จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris*จะกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในผิวหนัง ซึ่งช่วยการสร้างเนื้อเยื่อและการลดรอยเหี่ยวย่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่จะทำลายเนื้อเยื่อเลนส์ตาซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต้อกระจกและ age-related macular degeneration (AMD) (Breithaupt and Schlatterer, 2005;Stephen et al., 2006;Spolaore et al., 2006; Reza et al., 2007)

ปัจจุบันมีบริษัทที่ผลิตคลอเรลลามากกว่า 70 บริษัท โดยไต้หวันเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดที่ 400 ตันของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปี โดยมียอดขายทั่วโลกมากกว่า 38 ล้าน ดอลล่าร์สหรัฐ สารอาหารที่สำคัญที่สุดที่พบในคลอเรลลาคือ β-1,3-glucan, ที่ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกัน กำจัดอนุมูลอิสระ และเป็นตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดไขมันในเลือด (Spolaore et al., 2006) นอกจากนี้คลอเรลลาเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่สามารถผลิตลูทีนได้ในระดับสูง เจริญเติบโตเร็ว และได้รับการยอมรับให้เติมลงในอาหารมนุษย์ และอาหารสัตว์ (Bhosale et al., 2006) ลูทีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่พบมากที่สุดในชีรัมของมนุษย์ และอาหาร ในธรรมชาติ ลูทีนส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นโดยพืชชั้นสูง และสาหร่าย แต่เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วการผลิตโดยสาหร่ายจะได้เปรียบกว่าเนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ปริมาณมากในถังเพาะเลี้ยงชีวภาพ (bioreactors) ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่องและได้ผลิตภัณฑ์ที่แน่นอน (Li et al., 2001)*Chlorella vulgaris*เป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตเร็วและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในสภาพอากาศของไทย สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ที่สำคัญเช่น ลูทีน ซีแซนทิน เบต้าแคโรทีน violaxanthin และ cryptoxanthinneoxanthin แต่ข้อมูลและวิธีการในการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายชนิดนี้ยังไม่ชัดเจน

ดังนั้นในการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์พร้อมกับศึกษาชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่ได้ นำมาเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงคลอเรลลาเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์เพื่อลดการนำเข้าแคโรทีนอยด์จากต่างประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน

1.2.3 เพื่อศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

1.2.4 เพื่อทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ ในปริมาณมาก (mass production)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยมุ่งเน้นศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ให้ได้ปริมาณมากโดยเฉพาะ ลูทีน ซีแซนทินและเบต้าแคโรทีน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารสีในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.4 สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดในการวิจัย

สาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella* sp.)เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสัตว์บก โดยผสมกับอาหารสัตว์เพื่อให้เป็นสารเร่งสีในเนื้อ ผิวหนัง และไข่ (feed additive) ใช้เป็นแหล่งแร่ธาตุและสารอาหารที่สำคัญ (feed supplement) ดังนั้นหากมีการศึกษาวิธีการและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจะทำให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ที่มีคุณภาพและปริมาณที่แน่นอนในแต่ละครั้งของการเพาะเลี้ยง สามารถพัฒนาให้เป็นแหล่งผลิตแคโรทีนอยด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของมนุษย์ อุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอางต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 คำสำคัญ (keywords) ของการวิจัย

คลอเรลล่า แคโรทีนอยด์ สาหร่ายสีเขียวการเพาะเลี้ยงสารต้านอนุมูลอิสระ

chlorella, carotenoid , green algae, cultivation, antioxidant , colour agent

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้จะเป็นข้อมูลในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์เพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารสี ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ คือ รงควัตถุที่มี สีเหลือง ส้ม และแดง สามารถพบทั่วไปในพืชและสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ทำงานร่วมกับคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวซึ่งทำหน้าที่ดูดซับพลังงานจากแสงอาทิตย์เพื่อการสังเคราะห์แสงและช่วยการเจริญเติบโตของพืช ในอุตสาหกรรมอาหารถูกใช้เป็นสีผสมอาหารจากธรรมชาติ เพราะเป็นกลุ่มสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายและช่วยต้านอนุมูลอิสระได้ แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่เป็นสารตั้งต้นวิตามินเอ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จึงเป็นที่สนใจที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหาร เนยเทียม และเครื่องสำอาง

2.1.1 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์

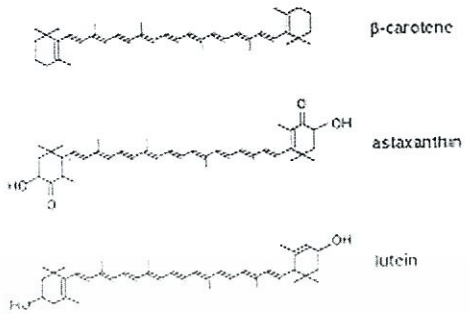
แคโรทีนอยด์เป็นสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอมเป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่หลายตำแหน่งและอนุพันธ์ของไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ โดยแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยหน่วยของไอโซพรีน (isoprene) เชื่อมต่อกัน 8 หน่วย (Gross, 1991) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 แคโรทีนอยด์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ แคโรทีน (carotene) และกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) โดยกลุ่มแคโรทีน จะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีเพียงคาร์บอนและไฮโดรเจน ส่วนกลุ่มแซนโทฟิลล์นอกจากมี คาร์บอนและไฮโดรเจน แล้วยังมีออกซิเจนอยู่ด้วย (Ben-Amotz and Avon, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 แคโรทีนอยด์ในอาหารธรรมชาติมีประมาณ 600 ชนิด(Strati et al, 2012) ที่พบมากมี 6 ชนิดคือแอลฟา-แคโรทีน (α-carotene) เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) ไลโคพีน (Lycopene) ลูทีน (Lutein) เบต้า-คริพโตแซนทิน (β-cryptoxanthin) ซีแซนทีน (Zeaxanthin)

แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายขนาดเล็ก ทำหน้าที่เป็น accessory pigments ในขบวนการสังเคราะห์แสง เป็นองค์ประกอบทางโครงสร้างของส่วนประกอบเชิงซ้อน(light harvesting complex) ที่ทำหน้าที่กักเก็บแสงและเป็นตัวป้องกันแสง (photoprotective agents) และทำหน้าที่ใน photoaxis (Campo et.al, 2004: Hagen et al, 1993; Taylor, 1996; Eskling et al,,1997)

$$CH_2=\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}}-CH=CH_2$$

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ได้แก่ แอสตาแซนทิน (astaxanthin) และ ลูทีน (Lutein) (Campo et.al, 2007)

2.1.2 ลูทีน (Lutein)

ลูทีนเป็น primary carotenoids(Campo et.al, 2004) มีคุณสมบัติแตกต่างจากแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ไม่เป็นสารต้นตอของวิตามินเอ (precursor vitamin A) ลูทีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่พบมากในซีรั่มมนุษย์ (human serum) และอาหาร (foods) ใช้เป็นสารเพิ่มสารสี (pigmentation) ในเนื้อเยื่อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และใช้เป็นสารสีผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง โดยแหล่งผลิตลูทีนได้แก่ ดาวเรือง (marigold) และสาหร่ายขนาดเล็ก(shi et.al, 1997)

2.1.3 ประโยชน์ของลูทีนและแคโรทีนอยด์

ลูทีน (Lutein) และซีแซนทีน (Zeaxanthin) มีคุณสมบัติแตกต่างจากแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น โดยจะไม่เปลี่ยนเป็นวิตามินเอ สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของร่างกายมนุษย์หลายจุดได้แก่ ในเลนส์ตา และจอรับภาพของตา (retina) โดยจะช่วยป้องกันรังสีจากแสงแดดที่เป็นอันตรายต่อดวงตา ปกป้องเซลล์ของจอประสาทตาไม่ให้ถูกทำลายโดยลดอนุมูลอิสระ(Breithaupt and Schlatterer, 2005) และกรองแสงสีน้ำเงินที่จะทำลายดวงตานอกจากนี้ยังพบว่าลูทีนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถลดความเสี่ยงในโรคที่เกิดจากการมีสารอนุมูลอิสระสูงได้ใช้เป็น feed additives ในปลา และฟาร์มสัตว์ปีก(Campo et.al, 2004; Marinova and Ribarova, 2007)

2.2 สาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella* sp.)

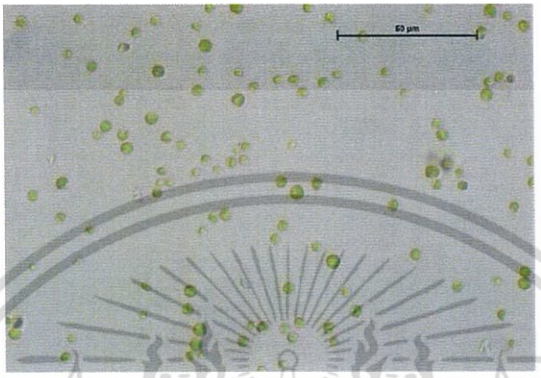
2.2.1 **การจัดจำแนก**คลอเรลลาเป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ซึ่งถูกจัดจำแนกไว้ดังนี้

Division Chlorophyta
Class Chlorophyceae
Order Chloroccocales
Family Oocystaceae
Genus Chlorella

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 รูปร่างและลักษณะ

มีขนาดเล็ก ประมาณ 1-10 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือรวมเป็นกลุ่มก้อน เซลล์มีหลายขนาด คลอเรลลามีคลอโรพลาสต์รูปรีคล้ายระฆัง ไม่มีระยางค์และคอนแทคไทล์แวคิวโอ (contractile vacuole) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงรูปร่างลักษณะของสาหร่าย *Chlorella vulgaris.*

2.2.3 รงควัตถุที่พบในสาหร่าย

จากการทดลองของ Inbaraj และคณะ (2006) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa.* พบว่า มีAll-trans-lutein เป็นส่วนมาก ตามด้วย cis-isomers Lutein , all-trans-α-carotene, zeaxanthin, β-carotene cryptoxanthin, neoxanthin, neochrome, auroxanthinและ violaxanthin

2.2.4 กระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียว (green algae) สังเคราะห์แคโรทีนอยด์ปฐมภูมิ (primary carotenoids) เช่น เบต้า-แคโรทีน ลูทีน และ violaxanthinที่ซึ่งกระจายอยู่ในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว (thylakoid membranes) พร้อมด้วยคลอโรฟิลล์กระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของสาหร่ายถูกกระตุ้นด้วยการขาดสารอาหาร และสภาวะทางสิ่งแวดล้อม เช่น แสง ความเค็ม และสารอาหาร ซึ่งมีผลทำให้เมตาบอลิซึมไม่สมดุลย (metabolic imbalance) ต้องการปรับขบวนการทางชีวเคมีและเมตาบอลิซึม (biochemical and metabolic adjustments) เพื่อเข้าสู่สภาวะสมดุลยใหม่ที่สามารถเจริญอยู่ได้ ส่วนกระบวนสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoids) เช่น canthaxanthinและแอสตาแซนทิน จะสะสมในรูปเม็ดไขมัน (lipid globules) ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ด้านนอกคลอโรพลาสต์ (chloroplastids) เป็นผลทำให้คลอโรฟิลล์ลดลง (Batista et.al, 2013; Vonshak and Torzillo, 2004; Goodwin T. and Britton. 1988)*Chlorellavulgaris*เป็นสาหร่ายสีเขียว ที่สามารถเพาะเลี้ยงในสภาวะเครียดจากแสง การพร่องของสารอาหาร และความเค็มสูง เพื่อสะสมปริมาณแคโรทีนอยด์ความเข้มข้นสูงเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Batista et.al, 2013; Gouveia et.al, 1996;Gouveia, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สาหร่ายคลอเรลลาสามารถผลิตลูทีนได้ทั้งในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ heterotrophic และ photoautotrophic (Shi et al, 1997; Campo et al. ,2000) โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorellazofingiensis*แบบ heterotrophic ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและไม่ให้แสงในสภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจะกระตุ้นให้สาหร่ายสร้างแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิ (secondary carotenoids)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์คลอเรลลาในสภาวะ Heterotrophic เพื่อผลิตลูทีนโดยใช้อาหารBasal mediumและ Kuhlmedium ที่มีกลูโคส จะช่วยการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนในที่มืด เพิ่มความเข้มข้นของชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์(Shi et.al, 1997)

จากการทดลองของ Gouveia et al. (1996) พบว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris*จะผลิตเบต้าแคโรทีนและคลอโรฟิลล์ในช่วงระยะที่มีการเจริญและจะมีปริมาณลดลงเมื่อใช้ปัจจัยในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ นอกจากนี้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella zofingiensis*ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและให้แสง (photoautotrophic)ของ Campo and et al. (2004) พบว่าสาหร่ายจะผลิตลูทีนในช่วงระยะที่มีการเจริญและสูงสุดเมื่อเข้าระยะเริ่มของระยะคงที่ (stationary phase) เช่นเดียวกับ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Muriellopsis* sp. จะผลิตปริมาณลูทีนเพิ่มขึ้นในระยะการที่มีการเจริญแบบ exponential phase และจะมีปริมาณสูงสุดในระยะก่อนเข้าระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) (José et.al, 2000)

2.2.6 ปัจจัยในการเพาะเลี้ยง

2.2.6.1 อาหาร

อาหารสูตร Basal และ Kuhlที่มีกลูโคส ใช้เพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotropic (Shi et.al, 1997) อาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของ $NaNO_3$ 20 mM และ 4 mM K_2HPO_4และเติม CO_2 1% (v/v)เพาะเลี้ยงในสภาวะ photoautotrophic(Campo et al. ,2000)

2.2.6.2 คาร์บอน

การเติมสารละลาย (solvent)เช่นการเติมเอทานอล เมทานอล ไอโซโพรพานอล และเอทิลีนไกลคอลในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์สังเคราะห์แคโรทีนอยด์เนื่องจากจุลินทรีย์จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อผลิตเบต้าแคโรทีนและเพื่อการเติบโต (Bhosale, 2004)

2.2.6.3 ไนโตรเจน

Campo et.al (2004)เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella zofingiensis*ในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ที่ระดับ 5 ถึง 40 mMพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 5 และ 10mM ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณลูทีนต่ำ ในขณะที่ความเข้มข้น30mMให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณลูทีนสูงสุด

2.2.6.4 ฟอสฟอรัส

สาหร่ายใช้ฟอสฟอรัสเพื่อการเจริญเติบโต โดยจะเติมฟอสฟอรัสในรูปของออโธฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดพลังงานของเซลล์ การสร้างเซลล์เมมเบรนและกรดนิวคลีอิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Chen and Chen, 2006) ในสภาวะที่สาหร่ายขาดไนโตรเจนสาหร่ายจะสร้างสารประกอบคาร์บอน ในขณะที่ขาดฟอสฟอรัสจะทำให้การเติบโต ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์ และสารพันธุกรรมลดลง (ลัดดา, 2539)

2.2.6.5 ความเข้มแสง

การใช้แสงสีขาวจะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ ในขณะที่ความเข้มแสงจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์การเพิ่มและลดระยะเวลาในการให้แสง และความเข้มแสงมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยด์ โดยสาหร่าย *Muriellopsis* sp. ผลิตลูทีนได้สูงขึ้นร้อยละ 40 เมื่อเพิ่มความเข้มของแสงจาก 184 เป็น 460 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$(Bhousale, 2004) นอกจากนี้จากการทดลองของ Campo et.al (2004)ยังพบว่า ความเข้มแสงมีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *Chlorella zofingiensis*และยังกระตุ้นให้สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์ โดยที่ความเข้มแสงที่ 920 μmol photon $m^{-2}s^{-1}$ กระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด

2.2.6.6 เฟอรัสซัลเฟต

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Heamatococcus* sp. ในอาหารที่มีเฟอรัสอิออนปริมาณมาก (Fe^{2+}-rich medium) พร้อมกับการให้แสงอย่างต่อเนื่องจะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้สูงขึ้น (Kobayashi และคณะ , 1992)

2.2.6.7 โซเดียมคลอไรด์

การเติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.2 M ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงกว่า อาหารที่ไม่ได้เติม แต่ไม่ส่งผลในการเพิ่มปริมาณลูทีน ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงมากเกินจะดีต่อการสะสมแคโรทีนอยด์แต่ส่งผลเสียต่อการอัตราการเจริญและความหนาแน่นของเซลล์(Campo et.al, 2004)

2.2.6.8 อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดต่อการเติบโตและการพัฒนาการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยอุณหภูมิจะทำให้วิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthetic pathways) รวมถึงชีวสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (carotenoid biosynthesis) เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากอุณหภูมิเป็นตัวควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแคโรทีนอยด์ (Bhosale, 2004)

2.2.6.9 สารเคมี

เช่น terpenes , ionones, amines, alkaloids และยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ปัจจัยด้านไอออนของโลหะ และเกลือ เกี่ยวข้องกับการมีชีวิตของจุลินทรีย์ ไอออนบวกเช่น โพแทสเซียม และแมกนีเซียม มีอยู่ปริมาณมากภายในเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ในขณะที่ โซเดียม แคลเซียม สังกะสี และธาตุทรานซิชันเป็นไอออนของโลหะที่จำเป็น (Bhosale, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และสาหร่าย

3.1.1 สายพันธุ์สาหร่าย

Chorella vulgaris จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

3.1.2.1 ขวดแก้วขนาด 750 มิลลิลิตร
3.1.2.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 2000 มิลลิลิตร
3.1.2.3 ชั้นเพาะเลี้ยงสาหร่ายพร้อมหลอดไฟ
3.1.2.4 ปั๊มลม
3.1.2.5 ตัวตั้งเวลาปิดเปิดไฟ(timer)
3.1.2.6 ถังคาร์บอนไดออกไซด์
3.1.2.7 วาล์วปรับการให้คาร์บอนไดออกไซด์

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

3.1.3.1 Haemacytometer (Imroved Neubauer Bright-Line, HBG)
3.1.3.2 เครื่องปั่นตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)
3.1.3.3 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)
3.1.3.4 ชุดกรองแบบสุญญากาศ (filtration unit and vacuum pump)
3.1.3.5 กระดาษกรอง GF/C เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร
3.1.3.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3.1.3.7 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
3.1.3.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
3.1.3.9 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
3.1.3.10 เครื่อง HPLC (High performance Liquid Chromatrography)
3.1.3.11 YMC carotenoids HPLC Column (5 ไมโครเมตร) ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร
3.1.3.12 หม้อนึ่งความไดอัน (Autoclave)
3.1.3.13 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
3.1.3.14 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3.1.3.15 ถังไฟเบอร์เพาะเลี้ยงขนาด 200 ลิตร
3.1.3.16 ไมโครปิเปต
3.1.3.17 กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.18 กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดถ่ายภาพดิจิตอล

3.1.3.19 syringe filters PTFE 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 13มิลลิเมตร และเข็มฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร

3.1.3.20 Vial Clear 12x32 mmขนาด 1.8ml Cap, Black Open Top 8-425 Screw Thread พร้อม septa T/S 40 mil thick for 8-425 Caps

3.1.3.21 ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas)

3.1.3.22 volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

3.1.4.1.1 Sodium nitrate

3.1.4.1.2 Potassium hydrogen phosphate monobasic

3.1.4.1.3 Magnesium sulfate

3.1.4.1.4 Calcium chloride

3.1.4.1.5 EDTA Na_2

3.1.4.1.6 Ferric chloride

3.1.4.1.7 Copper sulfate

3.1.4.1.8 Zinc sulfate

3.1.4.1.9 Cobalt chloride

3.1.4.1.10 Manganese chloride

3.1.4.1.11 Molybdenum trioxide

3.1.4.1.12 Boric acid

3.1.4.1.13 Potassium nitrate

3.1.4.1.14 Ferrous sulfate

3.1.4.1.15 Cobalt nitrate

3.1.4.1.16 Sodium chloride

3.1.4.1.17 Potassium hydrogen phosphate dibasic

3.1.4.1.18 Potassium hydroxide

3.1.4.1.19 Sulfuric acid

3.1.4.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์แคโรทีนอยด์

3.1.4.2.1 อะซิโตน(Acetone) AR grade

3.1.4.2.2 เฮกเซน (Hexane) AR grade

3.1.4.2.3 เอทานอล (Ethanol) AR grade

3.1.4.2.4 เมทานอล (Methanol) AR grade

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.2.5 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide)

3.1.4.2.6 กรดแอซีติก(acetic acid) AR grade

3.1.4.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ชนิดแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC

3.1.4.3.1 Xanthophyll from marigold (Lutein) catalog no. X6250-1MG $C_{40}H_{56}O_2$ FW 568.9 Sigma-Aldrich

3.1.4.3.2 Dichloromethane (HPLC grade)

3.1.4.3.3 Methanol (HPLC grade)

3.1.4.3.4 Acetronitrile (HPLC grade)

3.1.4.3.5 Ethanol (HPLC grade)

3.1.4.3.6 Water (HPLC grade)

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

3.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายจำนวน 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารคลอเรลลาสูตรดัดแปลง (ภาคผนวก) ปริมาตร 180 มิลลิลิตร สภาวะให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60μM m^{-2} s^{-1} ที่มีการให้ เป็นระยะเวลา 6 วัน

3.2.1.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

นำหัวเชื้อจากข้อ 3.2.1.1 จำนวน 50 มิลลิลิตร มาปั่นตกตะกอนเพื่อแยกส่วนอาหารเดิมออก แล้วนำเซลล์สาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 720 มิลลิลิตรที่มีอาหารใหม่ จำนวน 500 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีการเติมอากาศ และให้แสงอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 60μM m^{-2} s^{-1} เป็นระยะเวลา 10 วัน

3.2.1.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.2.1.2 ในสูตรอาหาร 3 สูตร ได้แก่ คลอเรลลาสูตรดัดแปลง Basal medium และ Bold's basal medium (ภาคผนวก) สูตรละ 3 ซ้ำ โดยผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลองที่ 3.2.1.4

3.2.1.4 ศึกษาผลความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรที่เหมาะสม จาก 3.2.1.3 ที่ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 3 ระดับ คือที่ระดับปกติ ระดับต่ำกว่าปกติ 1 เท่า และระดับสูงกว่าปกติ 1 เท่า ระดับละ 3 ซ้ำ ผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลองที่ 3.2.1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.5 ศึกษาผลความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรที่เหมาะสม จาก 3.2.1.4 ที่ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเป็น 3 ระดับ คือที่ระดับปกติ ระดับต่ำกว่าปกติ 1 เท่า และระดับสูงกว่าปกติ 1 เท่า ระดับละ 3 ซ้ำ ผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลองที่ 3.2.1.6

3.2.1.6 ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์

เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1.5 ภายใต้ความเข้มแสงที่ 20 60 และ 100μM m^{-2} s^{-1}ความเข้มแสงละ 3 ซ้ำ ผลการทดลองที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลองที่ 3.2.2 ต่อไป

3.2.2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

3.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.2.1.6 เป็นระยะเวลา10 วัน

3.2.2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

นำหัวเชื้อสาหร่ายจากข้อ 3.2.2.1 จำนวน 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่จำนวน 400 มิลลิลิตรภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.2.1.6 เป็นระยะเวลา 10 วัน

3.2.2.3 ศึกษาผลของการขาดไนโตรเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 ด้วยอาหารที่ขาดไนโตรเจน จำนวน 3 ซ้ำ เป็นระยะเวลาอีก 10 วัน เก็บตัวอย่างสาหร่ายเริ่มต้นและทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์และนำข้อมูลของการเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.2.2.4 ศึกษาผลของการขาดฟอสฟอรัส

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 ด้วยอาหารที่ขาดฟอสฟอรัสจำนวน 3 ซ้ำ เป็นระยะเวลาอีก 10 วัน เก็บตัวอย่างสาหร่ายเริ่มต้นและทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์และนำข้อมูลของการเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.2.2.5 ศึกษาผลของการขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 ด้วยอาหารที่ขาดไนโตรเจนและขาดฟอสฟอรัส จำนวน 3 ซ้ำ เป็นระยะเวลาอีก 10 วัน เก็บตัวอย่างสาหร่ายเริ่มต้นและทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์และนำข้อมูลของการเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.6 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 ด้วยอาหารที่เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต (ที่ปรับพีเอช 1.5 ด้วยกรดซัลฟูริค) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 25 50 และ 100mM ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างสาหร่ายเริ่มต้นและทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ นำข้อมูลของการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.2.2.7 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 ด้วยอาหารใหม่ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมคลอไรด์ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 100 200 และ 300 mM ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างสาหร่ายเริ่มต้นและทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเติบโต วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ นำข้อมูลของการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.2.2.8 ศึกษาผลของอาหารที่ใช้และไม่ใช้ปัจจัยกระตุ้น

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 ด้วยอาหารสูตรปกติ และเปรียบเทียบกับอาหารที่มีปัจจัยกระตุ้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างสาหร่ายเริ่มต้นและทุก 2 วัน เพื่อศึกษาการเติบโต วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ นำข้อมูลของการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.2.3 การศึกษาชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงต่างกัน

3.2.3.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ (batch)

เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม จากข้อ 3.2.1.6 เป็นระยะ 10 วัน เก็บเซลล์ทุก 2 วัน ศึกษาหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ความหนาแน่นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณลูทีนที่ผลิตได้ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

3.2.3.2 เพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบ Fed-batch

เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.2.1.6 นาน 10 วัน และย้ายสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหารใหม่และเพาะเลี้ยงต่อในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 เป็นระยะเวลา 10 วัน เก็บเซลล์สาหร่ายทุก 2 วัน ศึกษาหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ความหนาแน่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณลูทีนที่ผลิตได้ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

3.2.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังไฟเบอร์ ขนาด 200 ลิตร

3.2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.2.2 ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 2 ลิตร ในสภาวะที่มีการเติมอากาศ และให้แสงอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสงที่เหมาะสมเป็นระยะเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.2 การเพาะเลี้ยง

ใช้หัวเชื้อสาหร่ายจากข้อ 3.3.5.1 จำนวน 20 ลิตร ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 200 ลิตร ที่มีอาหารสูตรที่เหมาะสม ปริมาตร 180 ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา10 วัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์

3.2.5 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

3.2.5.1 ความหนาแน่นของเซลล์ (cell density)

โดยการนับจำนวนเซลล์สาหร่ายด้วยสไลด์ Haemacytometerภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X โดยคำนวณหาจำนวนเซลล์ตามสมการ Janet (1973)

3.2.5.2 ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical density (OD))

โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงหาความเข้มข้นของสาหร่ายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาความหนาแน่นของสาหร่าย โดยเปรียบเทียบกับสมการจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความหนาแน่นของเซลล์

3.2.5.3 ปริมาณชีวมวล (biomass)

หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) โดยการกรองเซลล์สาหร่ายจำนวน 10 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง GF/C ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ด้วยชุดกรองสุญญากาศ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Harkerและคณะ,1996a) คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

3.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยดัดแปลงวิธีของ Boussiba และ Vonsak (1992) ดังนี้

3.2.6.1 นำเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสของอาหารทิ้ง

3.2.6.2 นำเซลล์สาหร่ายมาเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 (w/v) ที่ละลายในเมทานอลร้อยละ 30 (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.2.6.3 นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเซลล์

3.2.6.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นตกตะกอน เพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนสารละลายสีเขียวของคลอโรฟิลล์ทิ้ง

3.2.6.5 เติมกรดแอซีติกเข้มข้นจำนวน 5 หยด ลงในตะกอนในข้อ 3.3.7.4 ใส่ Glass bead แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Vortex mixer) ให้เซลล์แตก นาน 30 วินาที

3.2.6.6 เติมอะซิโตน จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบน Vortex Mixer นาน 30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6.7 เติมเฮกเซน จำนวน 4 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบน Vortex Mixer เพื่อสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์จนหมด สังเกตจากสีของตะกอนเซลล์ซีด (หากเซลล์ไม่ซีดให้นำไปปั่นตกตะกอนดูดส่วนสารละลายสีเหลืองใสในขวดปรับปริมาตร และทำการสกัดซ้ำจนเซลล์ซีด ดูดสารละลายแคโรทีนอยด์ที่ได้ครั้งต่อมาใส่ในขวดปรับปริมาตรอันเดิม ปรับปริมาตร และจดปริมาณสารที่ใช้)

3.2.6.8 นำไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเศษเซลล์ ดูดส่วนสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นจาก 400-500 นาโนเมตร (พบว่าที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด)

3.2.6.9 คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรสาหร่าย โดยใช้ค่า extinction coefficients ($E^{1\%}_{1cm}$) = 2150 (Batista et.al, 2013) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{OD_{445} \times \text{ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร)} \times 10{,}000}{2150 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณลูทีนในสารละลายแคโรทีนอยด์ด้วยวิธีทาง HPLC โดยดัดแปลงวิธีของ Yuan และ Chen (1998) และ วิธีวิเคราะห์ด้วยด้วยคอลัมน์ YMC 30 ดังนี้

3.3.7.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง

คอลัมน์ที่ใช้ YMC Carotenoids (5μm)ขนาด 4.6x250 mm.
อุณหภูมิคอลัมน์ 27 องศาเซลเซียส
Injection volume 20μl
อัตราการไหล (Flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ความยาวคลื่นในการตรวจวัด 450 นาโนเมตร
Run time 40 นาที
ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase)
สารละลาย A ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : อะซิโตไนไตรล์ : น้ำ, 5.0: 85.0: 5.5: 4.5, v/v)
สารละลาย B ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : อะซิโตไนไตรล์ : น้ำ, 22: 28.0: 45.5: 4.5, v/v)

โดยการทำ gradient (step run) ดังนี้ 100% สารละลาย A 10 นาที 0-100% สารละลาย B นาน 30 นาที 100% สารละลาย A 0 นาที

3.3.7.2 การเตรียมสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย

3.3.7.2.1 นำตัวอย่างสาหร่าย จำนวน 10 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นตกตะกอน ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสของอาหารทิ้ง

3.3.7.2.2 นำตะกอนเซลล์เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 5 (w/v) ที่ละลายในเมทานอลร้อยละ 30 (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7.2.3 นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเซลล์

3.3.7.2.4 นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนสีเขียวของคลอโรฟิลล์ทิ้ง

3.3.7.2.5 เติมกรดแอซีติกเข้มข้นจำนวน 5 หยด ลงในตะกอนในข้อ 3.3.8.2.4 ใส่ Glass bead แล้วนำไปเขย่าเพื่อทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) นาน 30 วินาที

3.3.7.2.6 เติมอะซิโตนต่อเฮกเซนอัตราส่วน 1:4 จำนวน10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วย Vortex mixer เพื่อสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์จนสีเศษเซลล์ซีด จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอน

3.3.7.2.7 ดูดสารละลายสีเหลืองของแคโรทีนอยด์ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มล. ระเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.7.3 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทาง HPLC

3.3.7.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานลูทีน

ละลายและปรับปริมาตรสารละลายมาตรฐานลูทีนด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางต่อที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0 1 2 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐานลูทีน

3.3.7.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างแคโรทีนอยด์ จากข้อ 3.3.8.2.7 มาละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตรแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลของจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแคโรทีนอยด์ ในแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ การวางวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC version 16.0 ในการวิเคราะห์ และตรวจสอบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

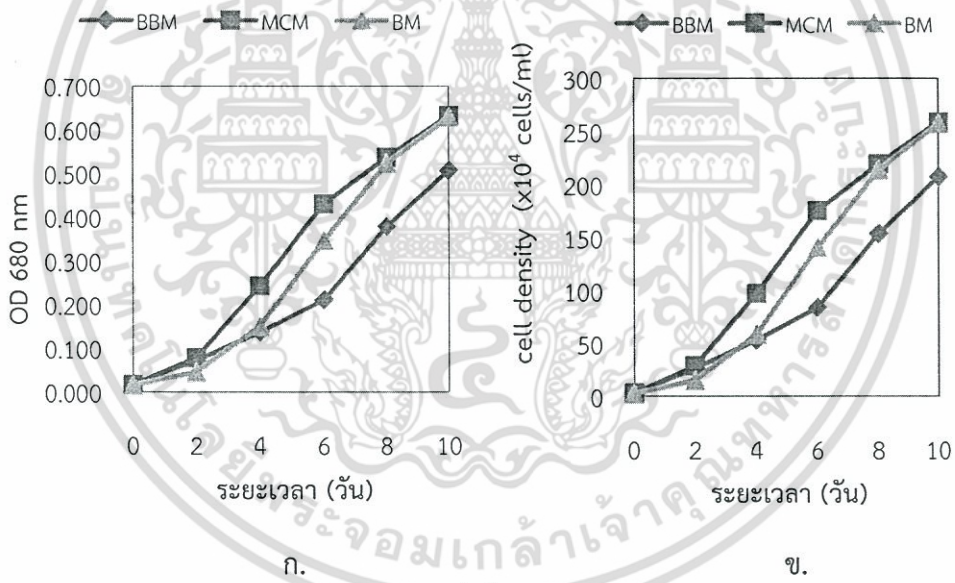
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลของการศึกษาปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*.

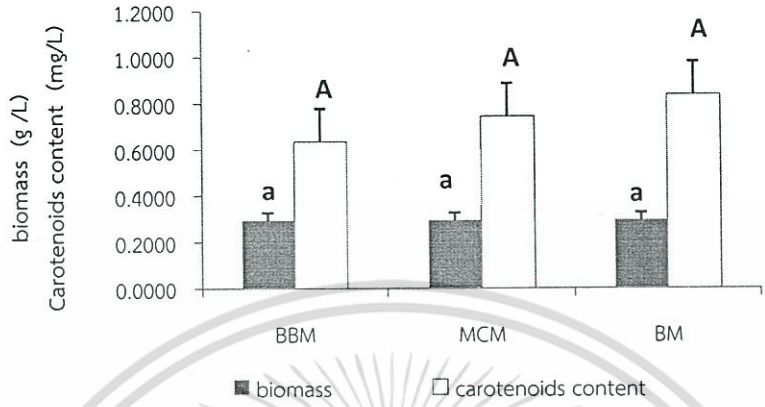
4.1.1 ผลของสูตรอาหาร

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ สูตรคลอเรลลาดัดแปลง (MCM) Bold's basal medium (BBM) และ Basal medium (BM) ในสภาวะให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดง ในรูปที่ 4.1 4.2 และ ตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน อาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง (MCM), Bold basal Medium (BBM) และ Basal Medium (BM)
ก. ค่าการดูดกลืนแสงของจำนวนเซลล์ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร
ข. ความหนาแน่นของเซลล์ (cell density)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารต่างกัน อาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง (MCM) Bold basal Medium (BBM) และ Basal Medium (BM) เป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) ปริมาณชีวมวล (biomass) และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกันเป็นระยะเวลา 10 วัน

สูตรอาหาร	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 680 นาโนเมตร	ความหนาแน่นของเซลล์ ($x10^4$ cells/ml)	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
BBM	0.508±0.059a	207.15±24.32a	0.2940±0.0328a	0.64±0.09a
MCM	0.632±0.063a	258.84±26.18a	0.2940±0.0328a	0.74±0.13a
BM	0.629±0.149a	257.51±61.62a	0.2940±0.0328a	0.84±0.14a

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

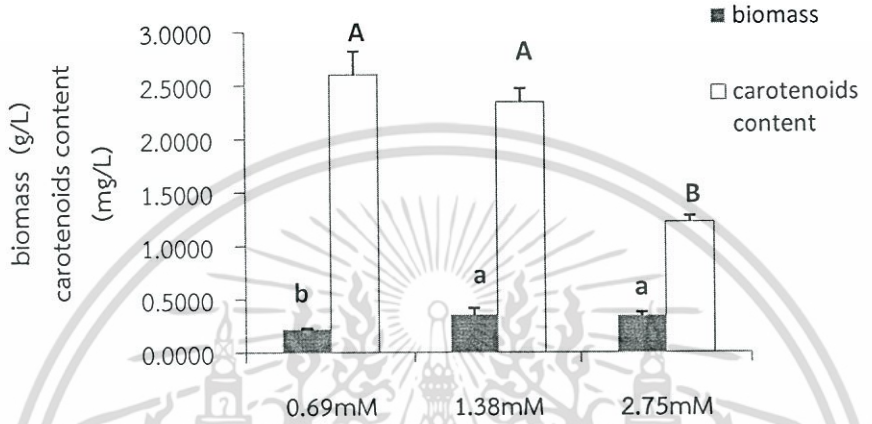
4.1.2 ผลของไนโตรเจน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *chlorella vulgaris* ในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง ที่มีการปรับระดับความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 3 ระดับ ได้แก่ 0.69 , 1.38 และ 2.75 mM ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.38 mM สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณสูงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ความเข้มข้น 0.69 mM ($P>0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นที่ 2.75 mM ($P<0.05$) ในขณะที่มีปริมาณชีวมวลสูง (biomass) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถิติกับที่ความเข้มข้นที่ 2.75 mM แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0.69 mM ดังแสดง ในรูปที่ 4.3 และ ตารางที่ 4.2

ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่ 1.38 mM เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องจากสามารถผลิตแคโรทีนอยด์และปริมาณชีวมวลได้สูงไปพร้อมกัน



หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) ปริมาณชีวมวล (biomass) และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกันเป็นระยะเวลา 10 วัน

ความเข้มข้น ($NaNO_3$)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 680 นาโนเมตร	ความหนาแน่นของเซลล์ ($x10^4$ cells/ml)	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0.69mM	0.513±0.012b	209.31±4.98b	0.2235±0.0054b	2.60±0.22a
1.38mM	0.806±0.107a	330.85±44.25a	0.3550±0.047a	2.34±0.13a
2.75mM	0.784±0.057a	321.72±23.51a	0.3451±0.0330a	1.23±0.06b

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมนเดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

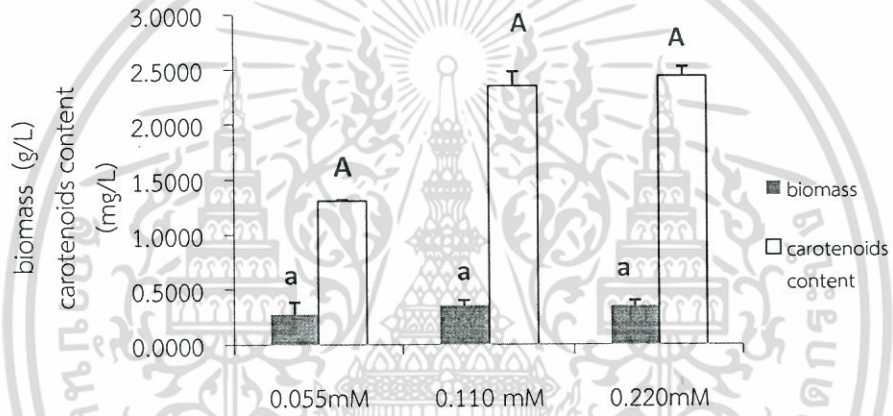
4.1.3 ผลของฟอสฟอรัส

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *chlorella vulgaris* ในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง ที่มีการปรับระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 ระดับ ได้แก่ 0.055 , 0.110 และ 0.220 mM ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.110 mM สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ความเข้มข้น 0.220 mM ($P>0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นที่ 0.055 mM ($P<0.05$) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไฮโดรเจนทั้ง 3 ระดับ ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร (OD680nm) ความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) และปริมาณชีวมวล (biomass) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงใน ในรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.3

ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.110 mM เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องจากสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณที่สูง เทียบเท่ากับการใช้ที่ความเข้มข้น 0.220 mM



หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟตต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการดูดกลืน ความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) ปริมาณชีวมวล (biomass) และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน

ความเข้มข้น (KH_2PO_4)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 680 นาโนเมตร	ความหนาแน่นของเซลล์ ($x10^4$ cells/ml)	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0.055mM	0.637±0.235a	260.75±97.34a	0.2792±0.1053a	1.31±0.001b
0.110mM	0.806±0.107a	330.85±44.25a	0.3550±0.0479a	2.34±0.13a
0.220mM	0.804±0.100a	330.72±41.48a	0.3341±0.0449a	2.43±0.09a

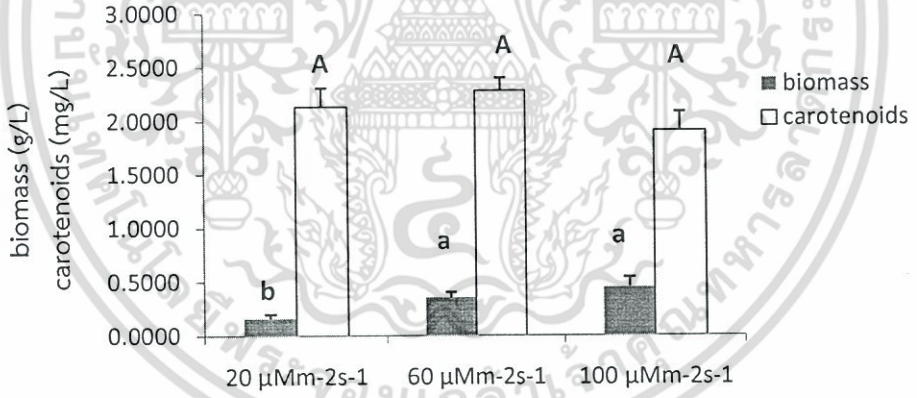
หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมนุเดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ผลของความเข้มแสง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *chlorella vulgaris* ในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 3 ระดับ คือ 20 60 และ 100 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงทั้ง 3 ระดับ ผลิตปริมาณแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณที่ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 60 และ 100 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่ายมีค่าการดูดกลืนแสง ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณชีวมวลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ($P<0.05$) ดังแสดงใน ในรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.4

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เพราะให้การเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณไม่แตกต่างจาก การเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่ 100 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่วนการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ถึงแม้จะผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณไม่แตกต่างกับ 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่พบว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายต่ำกว่าที่ระดับความเข้มแสง 60 และ 100 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที



หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในพารามิเตอร์เดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลและปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 20 60 และ 100 $\mu Mm^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าการดูดกลืน ความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) ปริมาณชีวมวล (biomass) และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสงต่างกันเป็นระยะเวลา 10 วัน

ความเข้มแสง ($\mu Mm^{-2} s^{-1}$)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 680 นาโนเมตร	ความหนาแน่นของเซลล์ ($x10^4$ cells/ml)	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
20	0.377±0.085b	152.90±35.12b	0.1625±0.0380b	2.13±0.17a
60	0.806±0.107a	330.85±44.25a	0.3550±0.0479a	2.34±0.13a
100	1.025±0.147a	421.69±60.84a	0.4533±0.0868a	1.91±0.17a

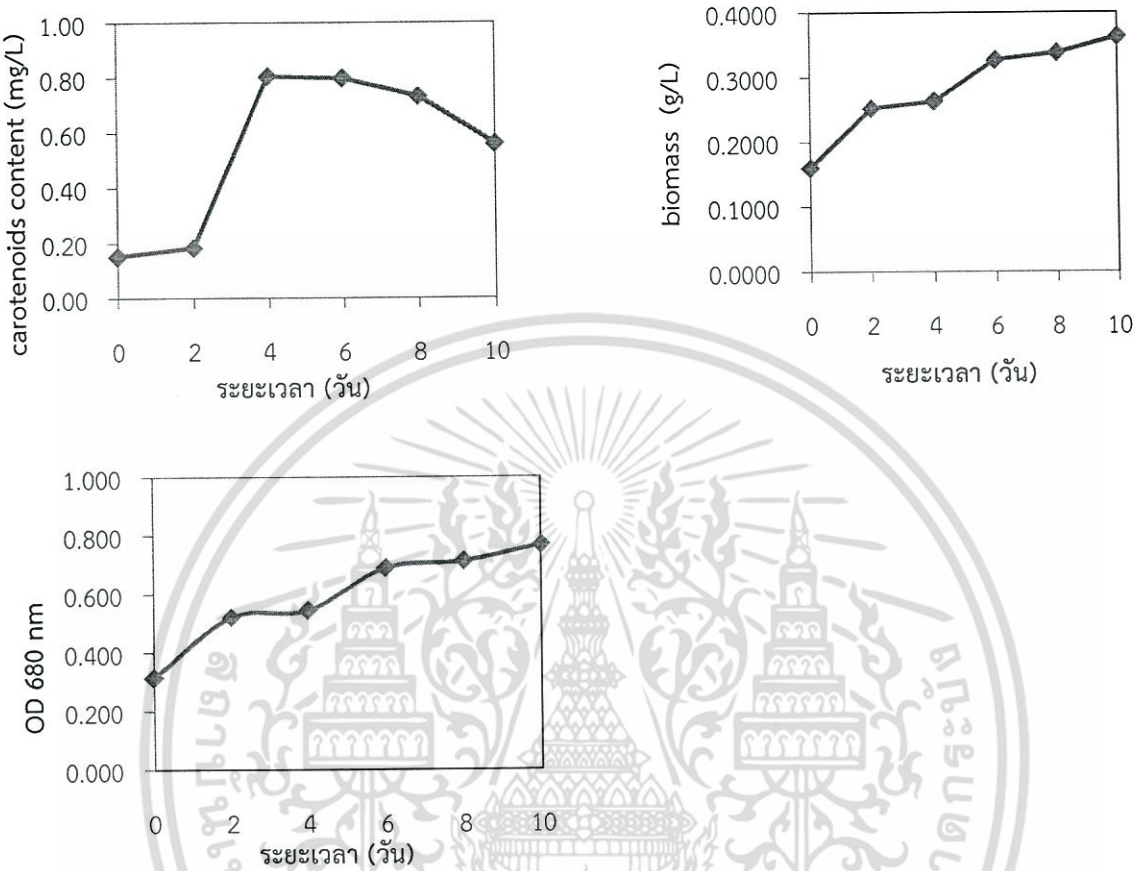
หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมนเดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4.2 ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

4.2.1 ผลของการขาดไนโตรเจน

จากการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ไม่เติมโซเดียมไนเตรท ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลาอีก 10 วัน พบว่า สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และสูงสุดในวันที่ 4 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง ที่ 0.80±0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถกระตุ้นสาหร่ายให้ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 0.65±0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณแคโรทีนอยด์จะค่อยๆ ลดลงหลังจากวันที่ 6 ถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ที่ 0.59±0.56 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะการกระตุ้นด้วยอาหารที่ขาดไนโตรเจน เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง โดยมีปริมาณชีวมวลที่ 0.3626±0.0087 กรัมต่อลิตร และมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.768 ดังแสดงในรูปที่ 4.6 นั่นแสดงว่าสภาวะที่ขาดไนโตรเจน สาหร่ายมีการสร้างแคโรทีนอยด์สูงขึ้น และเมื่อเซลล์สาหร่ายสามารถปรับสมดุลยได้ก็ทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลงพร้อมกับยังมีการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

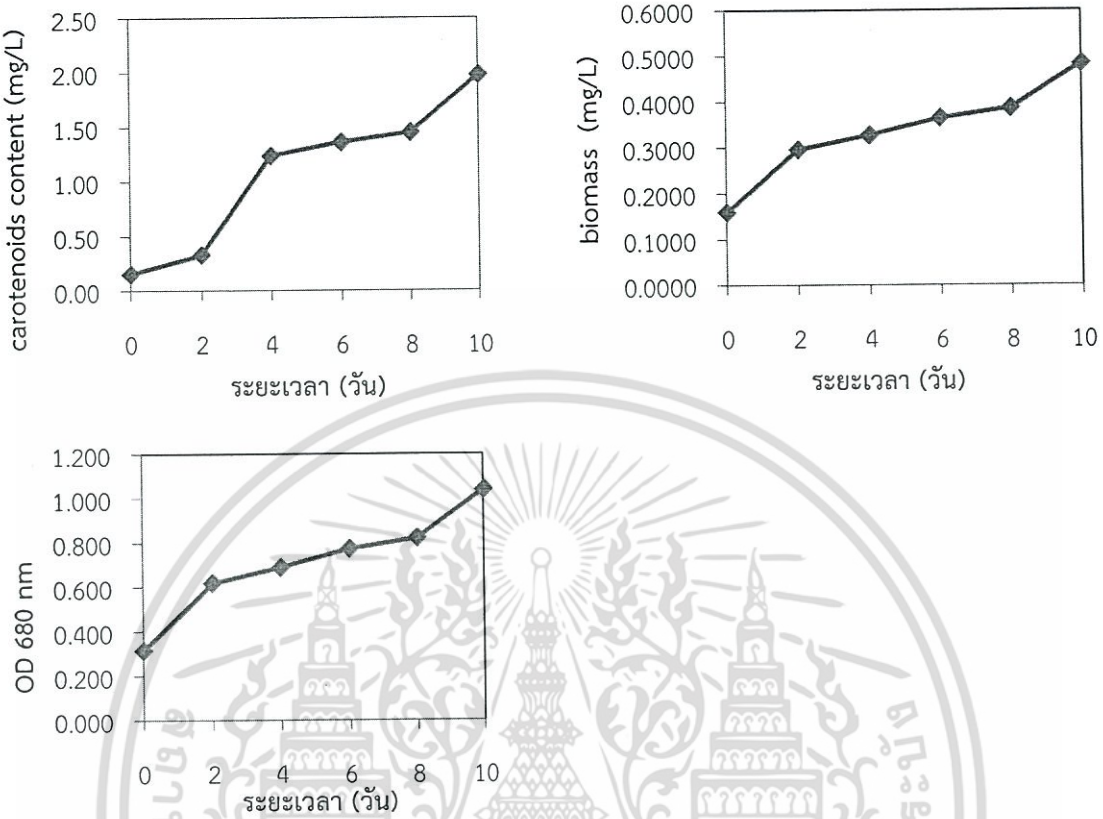


รูปที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจนเป็นระยะเวลา 10 วัน

4.2.2 ผลของการขาดฟอสฟอรัส

จากการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลาอีก 10 วัน พบว่า สาหร่ายเริ่มผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และค่อยผลิตเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ที่ 1.97±0.49 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณชีวมวล 0.4836±0.0456 กรัมต่อลิตร และความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 1.038±0.102 เพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.7 แสดงว่าสาหร่ายสามารถเจริญในอาหารที่ขาดฟอสฟอรัส โดยจะผลิตแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มขึ้นสูงในขณะที่เริ่มขาด และเมื่อเซลล์ปรับสมดุลยได้ปริมาณแคโรทีนอยด์จะค่อยๆ ลดลงพร้อมกับยังคงมีการเจริญของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



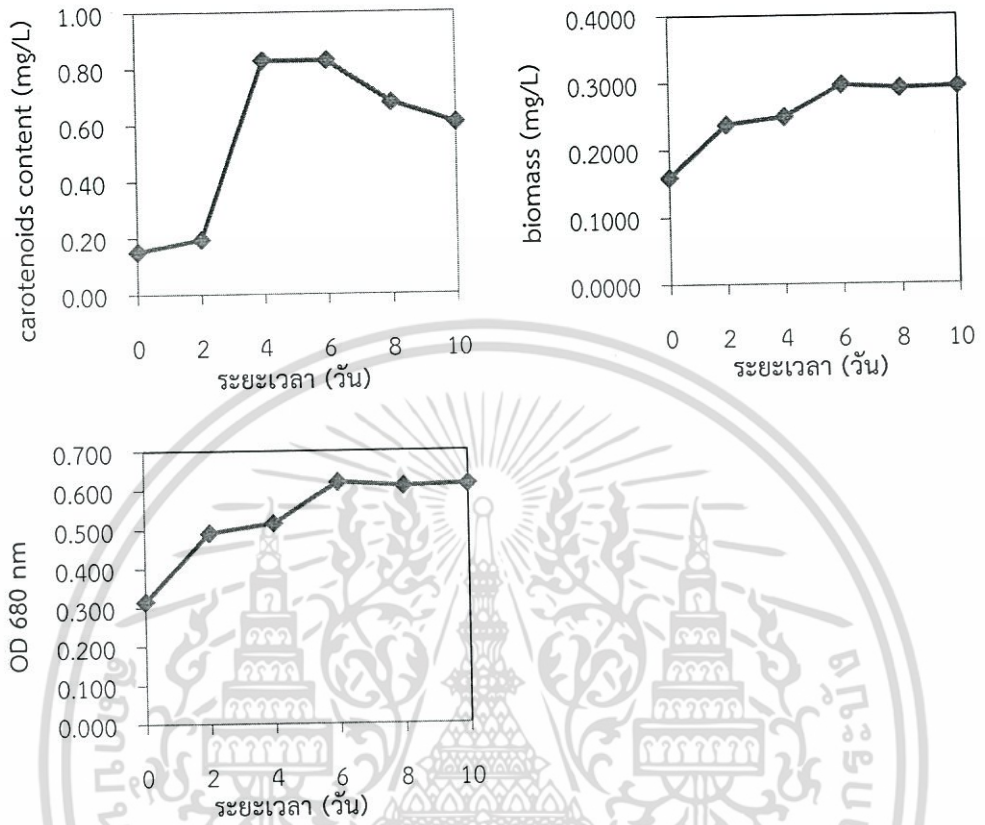
รูปที่ 4.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่ขาดฟอสฟอรัสเป็นระยะเวลา 10 วัน

4.2.3 ผลของการขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

จากการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ไม่เติมโซเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลาอีก 10 วัน พบว่า สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และสูงสุดในวันที่ 4 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง ที่ 0.83±0.03 และ 0.83±0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถกระตุ้นสาหร่ายให้ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 0.68±0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณแคโรทีนอยด์จะค่อยๆ ลดลงหลังวันที่ 6 ถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เหลือที่ 0.61±0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะการกระตุ้นด้วยอาหารที่ขาดไนโตรเจนและฟอสเฟต เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตอได้ในช่วง 6 วัน หลังจากวันที่ 6 สาหร่าย มีปริมาณชีวมวลค่อยๆ ลดลงจาก 0.2963±0.0064 เป็น 0.2936±0.0076 กรัมต่อลิตร และมีความหนาแน่นของเซลล์ลดลงจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.620±0.014 เป็น 0.614±0.017 ดังแสดงในรูปที่ 4.8

จากการผลการทดลองแสดงว่าสภาวะที่ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสาหร่ายยังสามารถเจริญอยู่ได้ช่วงระยะเวลา 0-6 วัน พร้อมกับสามารถผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้น และจะเริ่มหยุดการเจริญเติบโต พร้อมกับการลดลงของปริมาณแคโรทีนอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



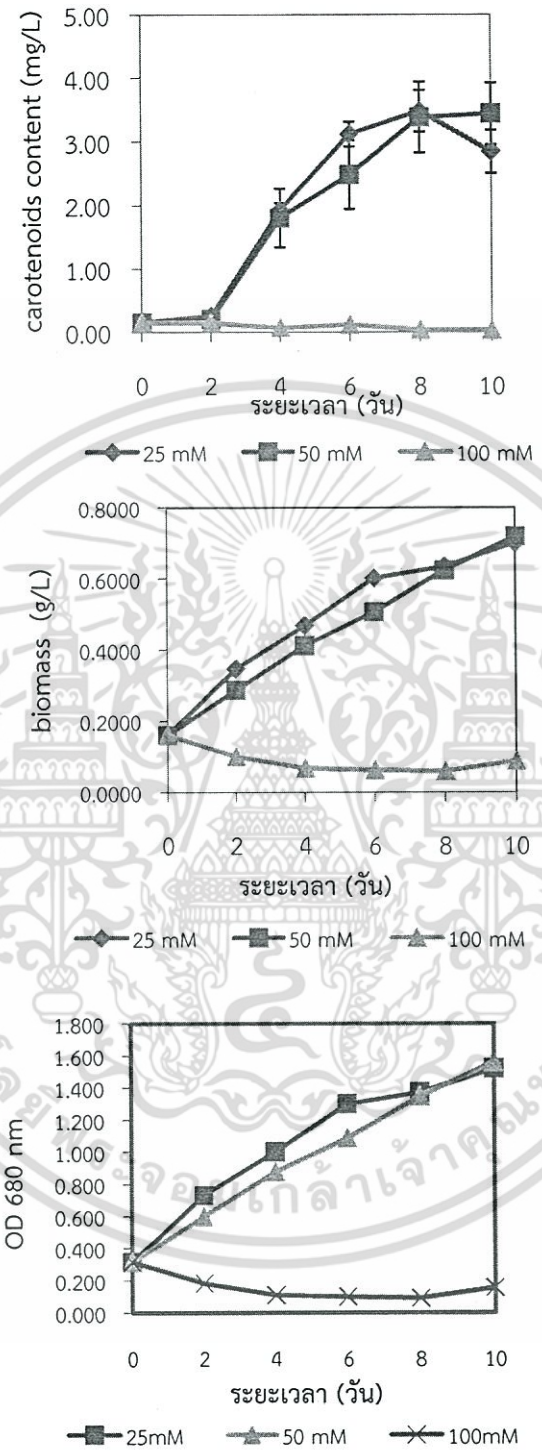
รูปที่ 4.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นระยะเวลา 10 วัน

4.2.4 ผลของความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต

จากการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ที่เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100mM ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายเฟอรัสซัลเฟตความเข้มข้น 25 และ 50 mM มีปริมาณแคโรทีนอยด์ ชีวมวล และความหนาแน่นของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ ชีวมวล และความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 mM แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.5

ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 25 mM ในการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ เนื่องจากให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ ชีวมวล และความหนาแน่นของเซลล์ไม่ต่างจากการใช้สารที่ความเข้มข้น 50 mM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต (พีเอช 1.5) ที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืน ปริมาณชีวมวล (biomass) และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตต่างกันต่างกันเป็นระยะเวลา 10 วัน

ความเข้มข้น ($FeSO_4$)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 680 นาโนเมตร	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
25 mM	1.520±0.082a	0.7002±0.0366a	2.84±0.34a
50 mM	1.561±0.162a	0.7186±0.0726a	3.44±0.48a
100 mM	0.156±0.019b	0.0879±0.0084b	0.03±0.04b

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมนเดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4.2.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

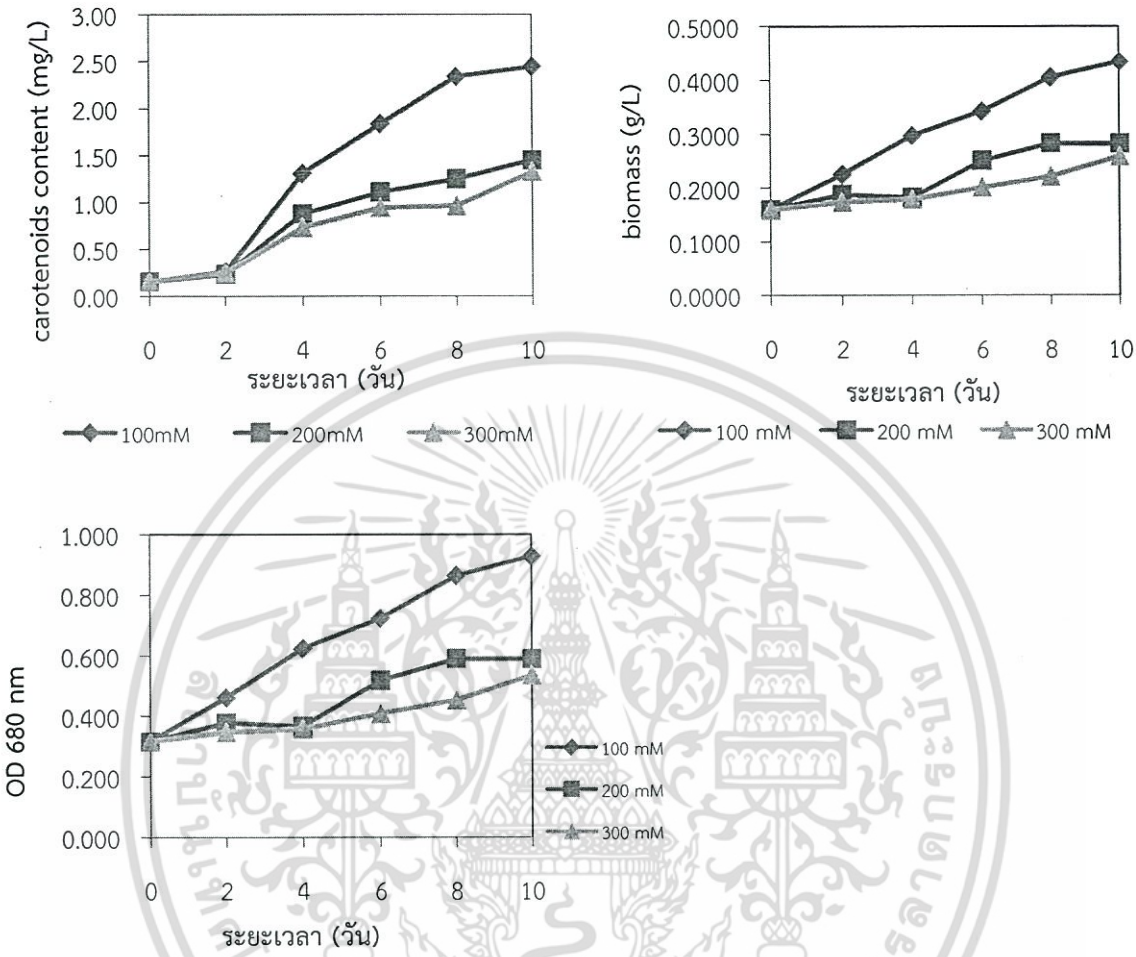
จากการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 10 วัน มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ที่เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 300mM ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 mM มีปริมาณแคโรทีนอยด์ ชีวมวล และความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.6 ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 100 mM ในการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้การเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืน ปริมาณชีวมวล (biomass) และปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกันต่างกันเป็นระยะเวลา 10 วัน

ความเข้มข้น (NaCl)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 680 นาโนเมตร	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
100 mM	0.929±0.036a	0.4347±0.0163a	2.45±0.34a
200 mM	0.589±0.028b	0.2824±0.0128b	1.45±0.29b
300 mM	0.536±0.008b	0.2581±0.0037b	1.54±0.16b

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมนเดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

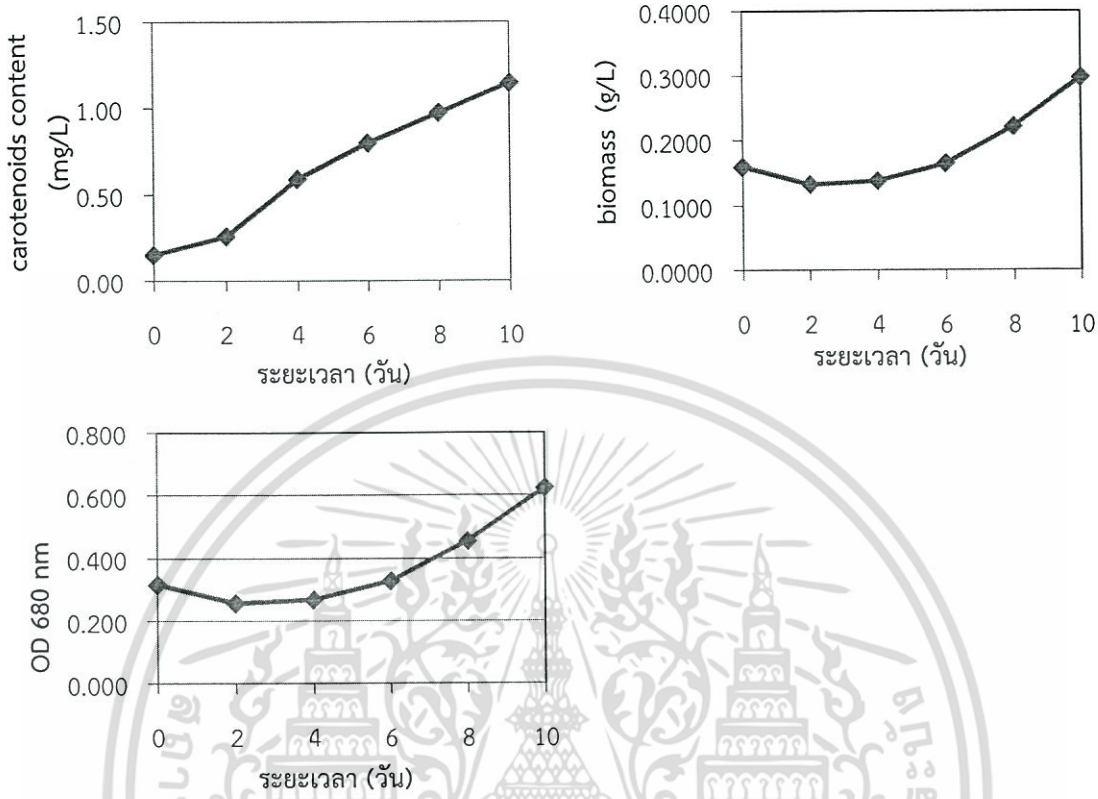


รูปที่ 4.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณชีวมวลของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน

4.2.6 ผลของคาร์บอนไดซ์ออกไซด์

จากการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 10 วัน มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่ที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนาน 1 ชั่วโมง ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าสาหร่ายมีปริมาณชีวมวล และความหนาแน่นของเซลล์ลดลงใน 2 วันแรก ของการเพาะเลี้ยง และค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่การเจริญเติบโตลดลงแต่พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 10 วัน สาหร่ายสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 1.15±0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณชีวมวลที่ 0.2978±0.0078 กรัมต่อลิตร และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.624±0.016 ดังแสดงในรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



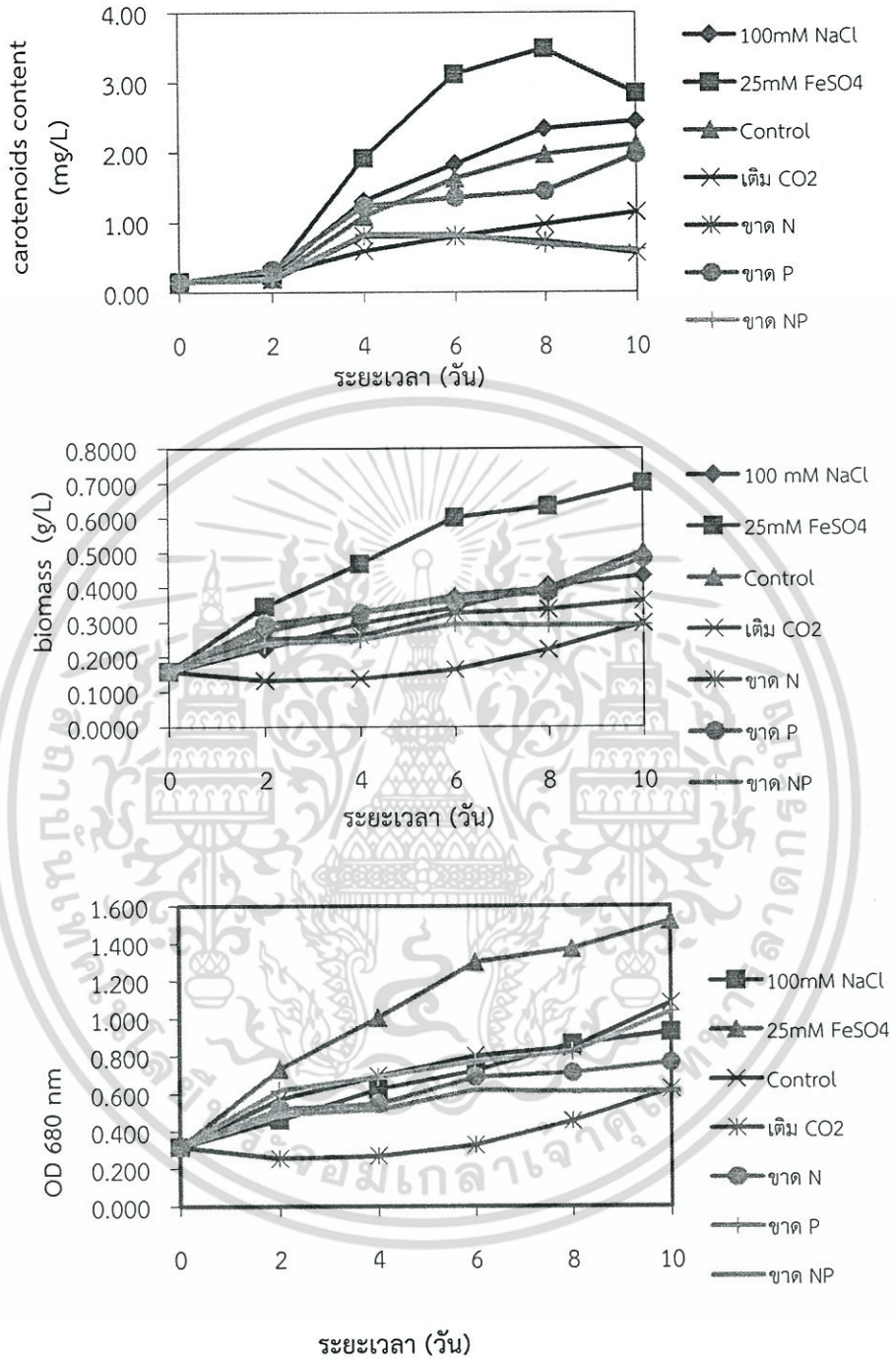
รูปที่ 4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณชีวมวล และค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์นาน 1 ชั่วโมง

4.2.7 ผลของอาหารที่ใช้และไม่ใช้ปัจจัยกระตุ้น

จากการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.1 เป็นระยะเวลา 10 วัน มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่สูตรปกติ (ชุดควบคุม) อาหารใหม่ที่ขาดไนโตรเจน ขาดฟอสฟอรัส ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 25 mM เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 100 mM และการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่อง ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า

สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 25 mM อาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ และอาหารสูตรปกติ สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นในปริมาณที่ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2.69±0.27, 2.29±0.26, และ 1.99±0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่มีปริมาณชีวมวลและความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ 0.5404±0.0480 กรัมต่อลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงของความหนาแน่นเซลล์ที่ 1.204±0.060 ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และในรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณชีวมวล และค่าการดูดกลืนแสง ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้และไม่ใช้ปัจจัยกระตุ้น เป็นระยะเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณชีวมวล และค่าการดูดกลืนแสง ที่เพิ่มขึ้น หลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ใช้และไม่ใช้ปัจจัยกระตุ้น เป็นระยะเวลา 10 วัน

อาหาร	ปริมาณชีวมวล (g/L)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 nm
สูตรปกติ	0.3445±0.0146b	1.99±0.18ab	0.767±0.019b
เติม 25 mM $FeSO_4$	0.5404±0.0480a	2.69±0.27a	1.204±0.060a
เติม 100 mM NaCl	0.2748±0.0123c	2.29±0.26ab	0.612±0.027c
ขาดฟอสเฟต	0.3237±0.059bc	1.82±0.40b	0.721±0.076bc
เติมก๊าซคาร์บอนไดซ์ออกไซด์	0.1379±0.0088e	0.99±0.03c	0.307±0.011e
ขาดไนเตรท	0.2027±0.0138d	0.41±0.01c	0.452±0.017d
ขาดไนเตรทและฟอสเฟต	0.1337±0.0128e	0.46±0.08c	0.298±0.028e

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมนเดียวกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4.3 ผลของการศึกษาชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายที่ใช้วิธีเพาะเลี้ยงต่างกัน

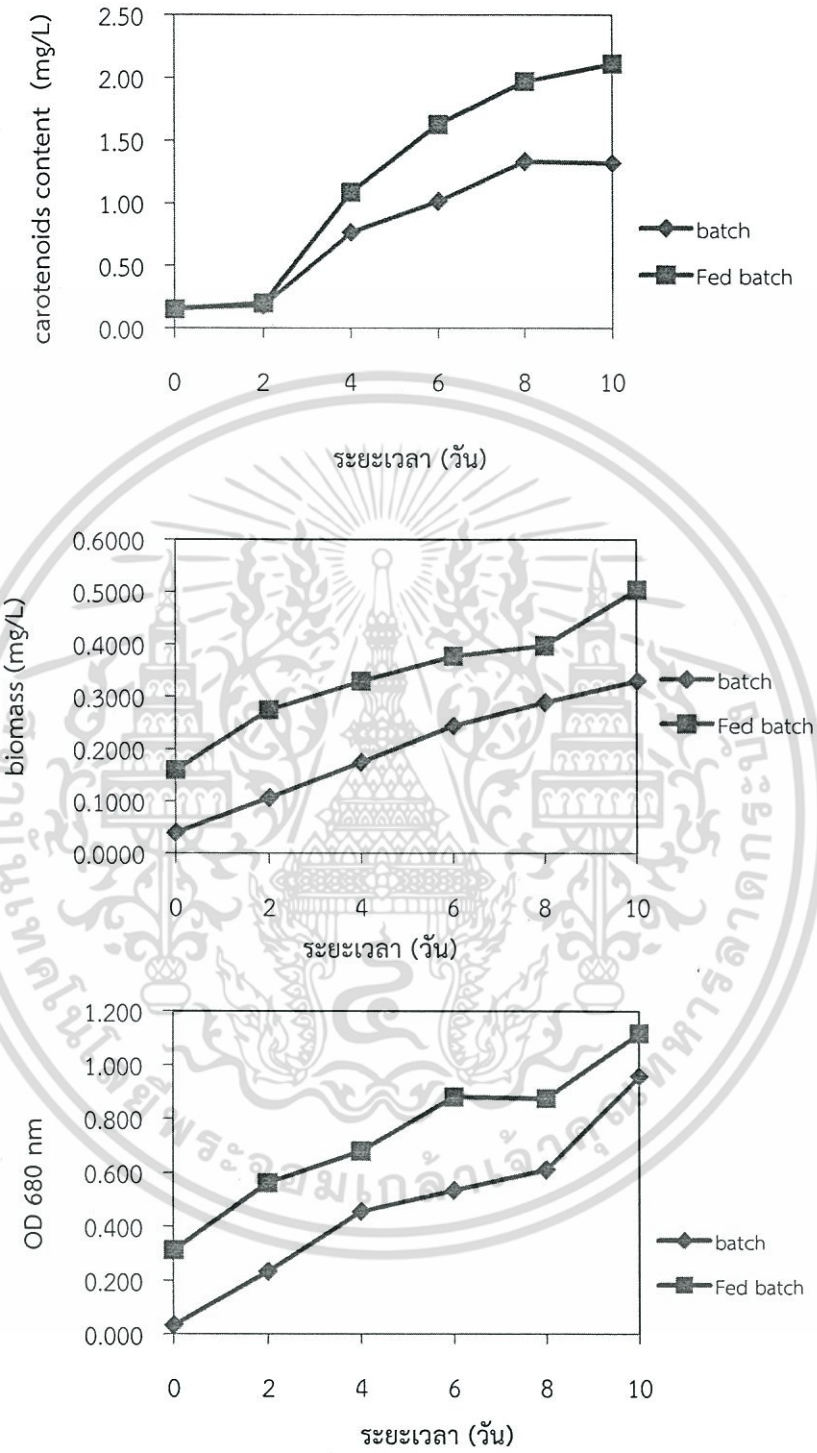
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง ในสภาวะที่ให้แสงอย่างต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 10 วัน (batch cultivation) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่มีการย้ายสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 10 วัน ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารใหม่เป็นระยะเวลาอีก 10 วัน (Fed batch cultivation) พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบ fed batch ให้ปริมาณลูทีน ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบ batch แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการเพาะเลี้ยงแบบ fed batch สาหร่ายสามารถผลิตลูทีนได้ที่ 1.3±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.60±0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบ batch สามารถผลิตลูทีนได้ 0.52±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.72±0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และในรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบปริมาณลูทีน ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณชีวมวล และค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นของสาหร่ายที่ใช้วิธีเพาะเลี้ยงต่างกัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	ปริมาณชีวมวลที่เพิ่มขึ้น (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น (OD 680 nm)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น(mg/L)	ปริมาณลูทีน (mg/L)	ปริมาณลูทีน (mg/g cell DW)
Batch	0.3067±0.0251a	0.607±0.034b	1.10±0.18b	0.52±0.01b	1.72±0.02b
Fed Batch	0.3445±0.0080a	0.768±0.018a	1.99±0.18a	1.3±0.01a	2.60±0.02a

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณชีวมวล และค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายที่ใช้วิธีเพาะเลี้ยงต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังเพาะเลี้ยง ขนาด 200 ลิตร

จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังเพาะเลี้ยง ขนาด 200 ลิตร ดังรูปที่ 4.14 ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม ในสภาวะธรรมชาติ ยังไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ปริมาณเท่ากับที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยสาหร่ายดรอปในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพียง 4 วัน

การเพาะเลี้ยงคลอเรลลาในระดับ mass scale ภายใต้สภาวะการให้แสงตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีสารอินทรีย์ร่วมด้วย เช่น อามิ กากน้ำตาล ยูเรีย จึงจะให้ผลดี แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถควบคุมให้ได้ความเข้มข้นของวัตถุดิบได้สม่ำเสมอทุกครั้ง ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงระดับ mass scale ควรมีการปรับเปลี่ยนสูตรและความเข้มข้นของสารอาหารให้เหมาะสม อีกทั้งบริเวณที่เพาะเลี้ยงจะต้องมีความสะอาด ป้องกันการปนเปื้อนจากโปรโตซัว หรือต้องสร้างระบบเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม ลดการปนเปื้อนจากโปรโตซัว และมีการให้แสงอย่างทั่วถึงต่อไป

รูปที่ 4.14 แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 ปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*.

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *chlorella vulgaris* ในอาหารสูตร Bold's basal medium คลอเรลลาสูตรดัดแปลง และ basal medium ภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ระยะเวลา 10 วัน สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์หรือสารต้านอนุมูลอิสระได้ในปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่ระดับ 0.64±0.09, 0.74±0.13 และ 0.84±0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นเลือกทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลงเนื่องจากในสูตรอาหารมีความเข้มข้นของสารอาหารภายในสูตรต่ำกว่าสูตร Bold's basal medium และ Basal medium

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง ที่ปรับระดับความเข้มข้นของ โซเดียมไนเตรทเป็น 3 ระดับ ที่ความเข้มข้น 0.69, 1.38 และ 2.75 mM พบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0.69 และ 1.38 mM สาหร่ายสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 1.38 mM มีความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณชีวมวลสูงกว่าความเข้มข้น 0.69 mM แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 2.75mM สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 0.69 และ 1.38 mM แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่มีความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณชีวมวลสูงเท่ากับที่ระดับ 1.38mM ดังนั้นจึงเลือกอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่ 1.38mM ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อไป

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลง ที่ปรับระดับความเข้มข้นของ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.055, 0.110 และ 0.220 mM พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.110 และ 0.220 mM สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูงสุด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในสูตรอาหารที่ 0.110 mM

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสง 30 60 และ 100 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่า สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มแสง 60 และ 100 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที มีความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณชีวมวลสูงสุด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณ 2.34±0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณชีวมวล (biomass) 0.3550±0.0479 กรัมต่อลิตร และความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) 3.30×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 เท่ากับ 0.806)

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์หรือสารต้านอนุมูลอิสระ คือการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในอาหารสูตรคลอเรลลาดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.38mM และความเข้มข้นของโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.110mM ในสภาวะให้แสงอย่างต่อเนื่องภายใต้ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น

การเพาะเลี้ยงแบบ fed batch โดยมีการย้ายสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมนาน 10 วัน มาเพาะเลี้ยงต่อ ในอาหารสูตรปกติ สูตรที่เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต 25mM และสูตรที่เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 100 mM พบว่าสาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 1.99±0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟตผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 2.69±0.27 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น 2.29±0.26 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.3 ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน

จากการเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สาหร่ายผลิตได้เพิ่มขึ้นในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงแบบ batch และ fed batch พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบ fed batch สามารถผลิตลูทีน และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดระดับสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบ batch แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบ fed batch ผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้เพิ่มขึ้น 1.99±0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีปริมาณลูทีนที่ 1.3±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.60±0.02 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในขณะที่ สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบ batch ผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้เพิ่มขึ้น 1.10±0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณลูทีน 0.52±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.72±0.02 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงแบบ fed batch มีความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้น และปริมาณชีวมวลที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch

5.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในไฟเบอร์ ขนาด 200 ลิตร

การเพาะเลี้ยงในระดับ mass scale ภายใต้การให้แสงตามธรรมชาติ ไม่สามารถใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 200 ลิตร การเจริญเติบโตไม่เท่ากับการเพาะเลี้ยงขวดเพาะเลี้ยงแก้วภายใต้แสงจากหลอดไฟ โดยสาหร่ายหยุดการเจริญในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงยังประสบปัญหาการปนเปื้อนจากโปรโตซัว เช่น โรติเฟอร์ ดังนั้นควรมีการปรับปรุงระบบเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นของสูตรอาหาร และชนิดของสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบธรรมชาติต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

วีระศักดิ์ สามี. 2549. แคโรทีนอยด์: โครงสร้างทางเคมีและกลไกที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของร่างกาย. ศรีนครินทรวโรฒเภสัชสาร. 10(1):58-66.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2539. คู่มือเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

สมชาย หวังวิบูลย์กิจ อัจฉรี เรืองเดช และบุปผา จงพัฒน์. 2548. ผลของวิตามินบี 1 และบี 12 ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์และการเจริญเติบโตของคลอเรลลา. หน้า 260-266. ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

Batista A.P. Gouveia L. Bandarra N.M. Franco J.M. Raymundo A. 2013. Comparison of microalgae biomass profiles as novel functional ingredient for food products. Agal Research. 2: 164-173.

Bhosale P. 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 63:351-361.

Bhosale P., B. Serban and P.S. Bernstein. 2006. Production of deuterated lutein by *Chlorella prothecoides* and its detection by mass spectrometric methods. Biotechnol Lett. 28:1371-1375.

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

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

Breithaupt D.E. and J. Schlatterer. 2005. Lutein and Zeaxanthin in new dietary supplements-analysis and quantification. Eur Food Res Technol. 220:648-652.

Gross J. 1991. Pigment in vegatables: chlorophyll and carotenoids. Chapman and Hall.USA. 350pp.Y

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Campo J.A.D., J. Moreno, H. Rodriguez, M.A. Vargas, J. Rivas and M.G. Guerrero. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determing lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). Journal of Biotechnology. 76: 51-59.

Campo J.A.D. , H. Rodriguez, J. Moreno. M.A. Vargas, J. Rivas and M.G. Guerrero. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Appl Microbiol Biotechnol. 64:848-854.

Campo J.A.D., Garcia-Gonzalez ., Guerrero M.G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production : current state and perspectives. App microbial Biotechnol. 74:1163-1174.

Chen G.Q. and F. Chen. 2006. Growing phototrophic cells without light. Biotechnol. Lett. 28:607-616.

Gouveia L. and J. Empis. 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed:effect of storage conditions. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 4:227-233.

Gouveia L., V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Novais and J. Empis. 1996. Evolution of pigment composition in Chlorella vulgaris. Biores. Technol. 57:157-163.

Inbaraj B.S. Chien J.T. and Chen B.H. 2006. Improved high performance liquidchromatographic method for determination of carotenoids in the microalga Chlorella pyrenoidosa. Journal of Chromatography A.1102: 193-199.

Ip P.F. and F. Chen. 2005. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. Process Biochemistry. 40:3491-3496.

José A Dc, José M., Herminia R., M. Angeles Vargas, Joaquin R. and Guerrero M.G. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp. (Chlorophyta). Journal of Biotechnology. 76:51-59.

Li H.B., F. Chen, T.Y. Zhang, F.Q. Yang and G.Q. Xu. 2001. Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A. 905:151-155.

Marinova D. Ribarova F. 2007. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. Journal of Food composition and Analysis 20 (2007) 370-374.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Qu C.B., Wu Z.Y. and Shi X.M. 2008. Phosphate assimilation by Chlorella and adjustment of phosphate concentration in basal medium for its cultivation. Biotechnol. Lett. 30: 1735-1740.

Reza M., L. schäfer, C. Lambert, D.E. Breithaupt, H.K. Biesalski and J. Frank. 2007. Solubility, uptake and biocompatibility of lutein and zeaxanthin delivered to cultured human retinal pigment epithelial cells in tween 40 micelles. Eur J Nutr. 46:79-86.

Shi X.M., F. Chen, J.P. Yuan and H. Chen. 1997. Heterotrophic production of lutein by selected Chlorella strains. Journal of Applied Phycology. 9:445-450.

Spolaore P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert. 2006. Commercial Applications of Microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101(2):87-96.

Stephen I. B., J.T. Chien and B.H. Chen. 2006. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Chromatography A. 1102:193-199.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของอาหารคลอเรลลาสูตร Bold's basal medium (ลัดดา, 2539)

ส่วนประกอบทางเคมี	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	0.25
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.025
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.175
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.075
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.075
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.025
บอริคแอซิค (H_3BO_3)	0.0114
EDTA-KOH solution	
อีดีทีเอ (EDTA.Na_2)	0.05
โพแทสเซียมไอดรอกไซด์ (KOH)	0.031
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.00498
กรดซัลฟูริคเข้มข้น (conc H2SO4)	0.001 มิลลิลิตร
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.0088
โคบอลต์ไนเตรท ($Co(NO_{3)2}.6H_2O$)	0.0005
แมงกานิสคลอไรด์ ($MnCl_2.\ 4H_2O$)	0.0014
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.0016
โมลิบดินัมไตรออกไซด์ (MoO_3)	0.0007
พีเอช (pH)	7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของอาหารคลอเรลลาสูตร basal medium (Qu , Wu and Shi, 2008)

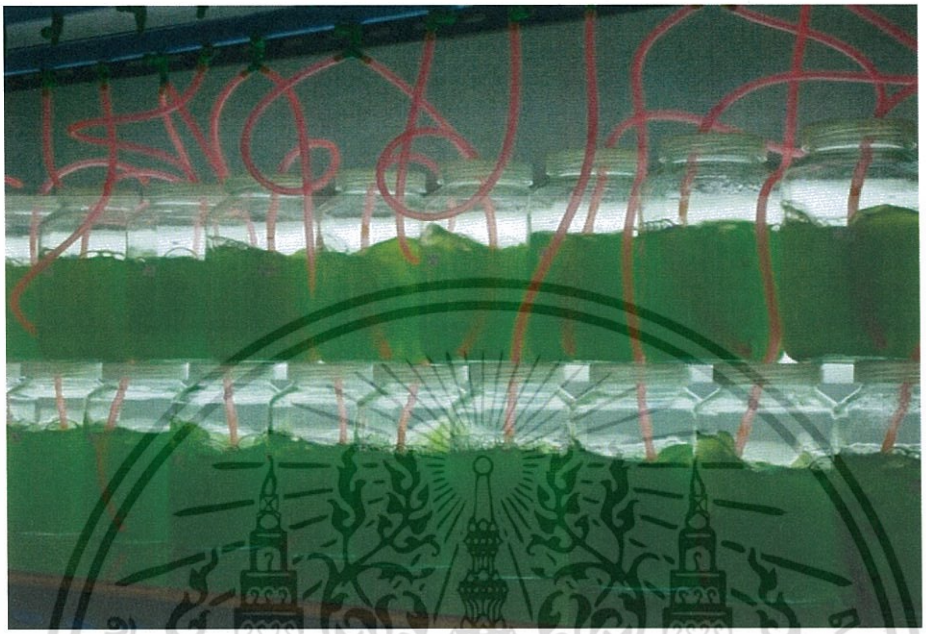
ส่วนประกอบทางเคมี	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	1.25
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.25
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.111
อีดีทีเอ ($EDTA.Na_2$)	0.5
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.049
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.0157
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.0882
โคบอลต์ไนเตรท ($Co(NO_{3)2}.6H_2O$)	0.0049
แมงกานิสคลอไรด์ ($MnCl_2.\ 4H_2O$)	0.0142
โมลิบดินัมไตรออกไซด์ (MoO_3)	0.0071
บอริคแอซิค (H_3BO_3)	0.1142
พีเอช (pH)	6.8

ตารางที่ ก 3 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของอาหารคลอเรลลาสูตรดัดแปลง (สมชาย และคณะ, 2542)

รายการสารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	117
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	15
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	8.75
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	1.67
อีดีทีเอ ($EDTA.Na_2$)	5
เฟอร์ริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)	0.41
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.16
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.88
โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	0.035
แมงกานิสคลอไรด์ ($MnCl_2.\ 4H_2O$)	0.14
โมลิบดินัมไตรออกไซด์ (MoO_3)	0.07
บอริคแอซิค (H_3BO_3)	1.14
พีเอช (pH)	6.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

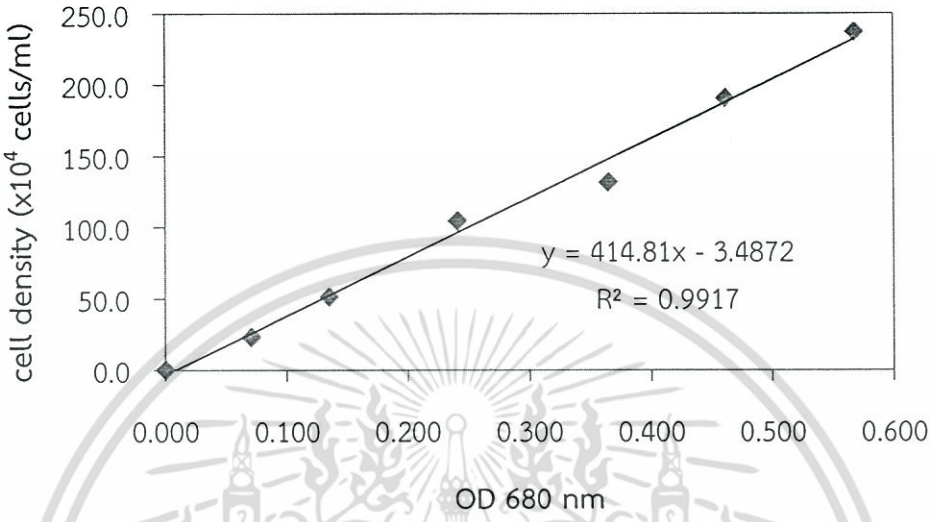


รูปที่ ข 1 แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 720 มิลลิลิตร

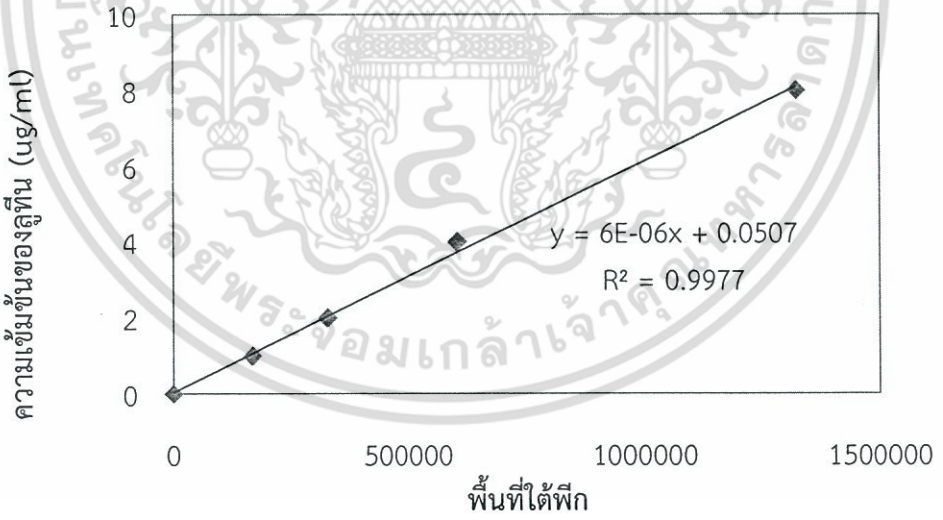
รูปที่ ข 2 แสดงสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายคลอเรลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

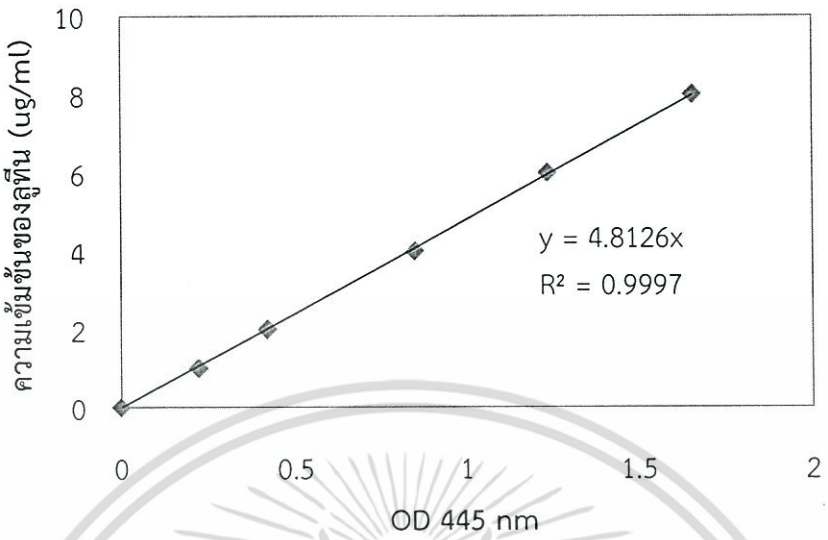


รูปที่ ค 1 กราฟมาตรฐานความหนาแน่นเซลล์ (cell desity)



รูปที่ ค2 แสดงกราฟมาตรฐานลูทีน (Lutien) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค3 แสดงกราฟมาตรฐานลูทีน (Lutien) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 445 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวบุปผา จงพัฒน์

Miss Buppha Jongput

2. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

โทรศัพท์ 0 23298517 โทรสาร 0 23298517 E-mail: buppha.jo@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	คุณวุฒิ	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2538	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)	สถาบันราชภัฏสวนสุนันทา	ไทย
2547	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

การเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

สมชาย หวังวิบูลย์กิจ อัจฉรี เรืองเดช และบุปผา จงพัฒน์. 2548. ผลของวิตามิน B_1 และ B_{12} ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์และการเจริญเติบโตของคลอเรลล่า. หน้า 260-266. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร\

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ บุปผา จงพัฒน์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ และปวีณา ทวีกิจการ. 2548. คุณค่าทางโภชนาการของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc commune* Vaucher ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

สมชาย หวังวิบูลย์กิจ และบุปผา จงพัฒน์. 2549. การประเมินคุณภาพน้ำและการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลออสซิลาทอเรีย (*Oscillatoria* sp.) ในน้ำที่มีอาหารกุ้งตกค้าง. หน้า 651-662. ในการประชุมวิชาการ "สิ่งแวดล้อมนเรศวร" ครั้งที่ 2. สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมและวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jongput B., N. Laohavisuti and M. Mitnoi. 2007. Effect of ammonium-nitrogen concentration and electrical conductivity on the growth of African Swordplant (*Echinodorus africanus*) in hydroponics culture. Proceedings of The International Conference on Intergration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST) "Biological Diversity, Food and Agricultural Technology" Bangkok, Thailand. 26-27 April, 504-502.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้