สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

ดวงกมล ท่วมสุข
วราภรณ์ เหลืองจารุ

เลขหมู่ 84003
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ค. 2551
b 11983103
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of carotenoid production of *Chlorella* sp. P47011 M2-2 mutant

Doungkamon Toumsuk

Varaporn Luangjaru

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

นักศึกษา ดวงกมล ท่วมสุข รหัสนักศึกษา 47050678

วราภรณ์ เหลืองจารุ รหัสนักศึกษา 47050690

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. วีนา ชูโชติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ. วีนา ชูโชติ	
กรรมการ ดร. จิดาภา ทิน้อย	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

นักศึกษา ดวงกมล ท่วมสุข รหัสนักศึกษา 47050678

วราภรณ์ เหลืองจารุ รหัสนักศึกษา 47050690

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. วีนา ชูโชติ

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ในสูตรอาหาร N-8 ดัดแปลง พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน คือโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 มีการเจริญสูงสุด โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 9.270 ปริมาณเซลล์ 34.8 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักแห้ง 4.5378 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.8691 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Optimization of carotenoid production of *Chlorella* sp. P47011 M2-2 mutant

Name Doungkamon Toumsuk ID 47050678

Varaporn Luangjaru ID 47050690

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic Year 2550

Special Project Advisor Assist. Prof. Weena Choochote

Abstract

Optimization on growth and carotenoid production of *Chlorella* sp. P47011 M2-2 mutant were studied. The initial of the glucose at 10 g/l , sodium nitrate as a nitrogen source (1000 mg/l) and pH 7.0 were used , the maximum absorbance , cell densities , dry cell weight and total carotenoid content were 9.270 , 34.8 $\times 10^6$ cell/ ml , 4.5378 g/l and 0.8691 mg/g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่านทางคณะผู้จัดทำ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.วีนา ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ รวมทั้งได้กรุณาตรวจแก้ไขด้านภาษาและแนะแนวในด้านต่างๆ ในการทำโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และ ดร.จิดาภา ทิน้อย ที่ให้ความรู้และคำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด รวมทั้งตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ พี่ๆ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่กรุณาให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองโครงงานพิเศษนี้ ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณพี่พงศ์ธร เครือวณิชธรรม สอนเทคนิค และให้คำปรึกษา พี่เทิดศักดิ์ ขจรบุญ ที่คอยให้คำแนะนำ และมีคำพูดที่เป็นกำลังใจเสมอมา ตลอดจนพี่ปริญญาโททุกๆคน ที่คอยซักถามและให้คำแนะนำดีๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ด้วยความเคารพรักยิ่ง ที่เป็นแรงส่งเสริมผลักดัน ทั้งทางกำลังใจและกำลังทรัพย์ ตลอดจนเพื่อนๆ พี่และน้องๆ ที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้มาตลอด รวมถึงมีช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ดวงกมล ท่วมสุข
วราภรณ์ เหลืองจารุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 สาหร่าย *Chlorella* sp.	3
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย	3
2.1.2 การสืบพันธุ์	4
2.2 การชักนำการกลายพันธุ์	4
2.2.1 ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์	4
2.2.2 การกลายพันธุ์คืออะไร	4
2.2.3 ชนิดของการกลายพันธุ์	5
2.2.4. สิ่งที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์	6
2.3 แคโรทีนอยด์	10
2.3.1ชนิดและโครงสร้างของแคโรทีนอยด์	10
2.3.2 สารกลุ่มแคโรทีนอยด์	10
2.4 หน้าที่ของแคโรทีนอยด์	11
2.4.1 การสังเคราะห์แสง	11
2.4.2 การป้องกันแสง	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.3 ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์	13
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างแคโรทีนอยด์	14
2.5.1 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	14
2.5.2 แมกนีเซียม	14
2.5.3 ไนโตรเจน	15
2.5.4 แสง	15
2.6 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย	15
2.6.1 วิธีการทำเซลล์ให้บริสุทธิ์	16
2.6.2 วิธีการเพาะบนจานวุ้น	16
2.7 การเก็บรักษาพันธุ์สาหร่าย	16
2.8 การเจริญของสาหร่าย	17
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	18
3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และสาหร่าย	18
3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย	18
3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	18
3.2.2 การเตรียมเชื้อ	19
3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น	20
3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง	20
3.3.1การศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย	20
3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย	22
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	23
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย	23
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 ผลความเข้มข้นของกลูโคส 26
4.2.2 แหล่งไนโตรเจน 30
4.2.3 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 38
เอกสารอ้างอิง 39
ภาคผนวก ก. 44
ภาคผนวก ข. 52
ภาคผนวก ค. 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp. 3
2.2 แสดงการเกิดไทมีนไดเมอร์ 8
2.3 แสดงโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ 10
2.4 แสดงโครงสร้างของกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ 12
4.1 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 24
4.2 ปริมาณเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011และ สาหร่าย *Chlorella* sp. M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 24
4.3 น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011และ สาหร่าย *Chlorella* sp. M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 25
4.4 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011และ สาหร่าย *Chlorella* sp. M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 25
4.5 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 27
4.6 ปริมาณเซลล์ ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 28
4.7 น้ำหนักแห้ง ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 28
4.8 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 29
4.9 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท และ ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.10 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 32

4.11 น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 32

4.12 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 33

4.13 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 35

4.14 จำนวนเซลล์ ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 35

4.15 น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 36

4.16 ปริมาณแคโรทีนอยด์ ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ 36

ค.1 สไลด์นับเซลล์ (Petroff – Hausser counting chamber) 56

ค.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) 56

ค.3 การสกัดแคโรทีนอยด์ในกรวยแยก 57

ค.4 แคโรทีนอยด์ที่ได้จากการสกัดคลอโรฟิลล์แล้ว 57

ค.5 *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย กำลังขยาย 400 X 58

ค.6 *Chlorella* sp. P47011 กำลังขยาย 400 X 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 แสดงสูตรอาหาร N-8 19

4.1 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ในวันที่ 7 ของการทดลอง 26

4.2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่เลี้ยงในอาหาร N-8 ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 ในวันที่ 7 ของการทดลอง 29

4.3 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่มีแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ในวันที่ 7 ของการทดลอง 33

4.4 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ในวันที่ 7 ของการทดลอง 37

ก.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย 43

ก.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร 45

ก.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 โดยมีแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท 48

ก.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 โดยมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 50

ข.1 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 มีความแตกต่างกับสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05) 52

ข.2 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 มีความแตกต่างของความความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05) 52

ข.3 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05) 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข.4 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 มีความแตกต่างของความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 6.0 6.5 และ 7.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05) 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

มนุษย์ได้รู้จักนำสาหร่ายมารับประทานโดยตรงมานานในหลายภูมิภาคของโลก และในปัจจุบันได้มีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์มากมาย นักวิทยาศาสตร์จึงได้เล็งเห็นความสำคัญและประโยชน์ของสาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายเป็นแหล่งของสารชีวเคมีที่มีศักยภาพไม่จำกัด สารชีวเคมีหลักที่มีศักยภาพในเชิงการค้าและมีความสำคัญในขณะนี้ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ไฟโคบิลิน (phycobilins) กรดไขมัน (fatty acid) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) วิตามิน และ สเตอรอล

รงควัตถุที่นำมาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นหน่วยย่อยของแคโรทีนอยด์ เช่น เบต้า-แคโรทีน เป็นรงควัตถุสีเหลืองแดงสารนี้มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือดหรือโรคที่เกิดจากการเสื่อมของอายุ และแอสตาแซนธิน รงควัตถุมีสีเหลืองเช่นเดียวกับเบต้า-แคโรทีน ใช้เป็นอาหารหรือผสมในอาหารสัตว์ เช่น ปลาแซลมอล ปลาเทราท์และกุ้ง ทำให้เนื้อสัตว์มีสีสันสวยงามและยังทำให้สัตว์ได้รับวิตามิน ส่วนในการใช้เป็นอาหารสัตว์ปีก เช่น เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีการผสมแอสตาแซนธินจะทำให้เนื้อไก่และไข่มีสีสวยงาม จากรายงานวิจัยต่างๆ พบว่า การใช้สารเคมีผสมในอาหารเพื่อให้เกิดสีในอาหารหรือการใช้สารเคมีผสมในอาหารสัตว์เพื่อให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ จึงเป็นปัญหาที่นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยทั่วโลกต่างให้ความสนใจในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาวิธีแก้ไข จนกระทั่งได้ศึกษารงควัตถุหรือเม็ดสีในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สาหร่าย เป็นต้น และนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุสาหกรรมอาหารทดแทนสารเคมีที่เป็นอันตราย ในอดีตพบแอสตาแซนธินในสาหร่ายจำนวนมาก เช่น *Haematococcus pluvialis* (Grunewald และ คณะ, 2001) *Chlorococcum* sp. (Zhang และ Lee, 2001) *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris wimmeri*, *Scenedesmus vacuolatu, Scotiellopsis oocystiformis* และ *Protosiphon botryoides* (Orosa และ คณะ, 2000) แต่พบแคนธาแซนธินในสาหร่ายบางชนิด เช่น *C. zofingiensis* (Pelah และคณะ, 2004) *Chlorococcum* sp. และ *Tetracystis intermedium* (Campo และ คณะ, 2000)

จุลินทรีย์จำนวนมากเป็นแหล่งของแคโรทีนอยด์ สาหร่าย เช่น *Dunaliella* spp. ยีสต์ เช่น *Phaffia rhodozyma* และ *Rhodotorula glutinis* (Nelis และ DeLeenheer, 1991) *R. glutinis* ผลิตแคโรทีนอยด์ โทลูลีน (torulene) โทลูลาโฮดิน (torularhodin) และเบต้า-แคโรทีน (ß-carotene) (Perrier และ คณะ, 1995) แต่ใน *R. glutinis* สายพันธุ์พ่อและแม่ผลิตเบต้า-แคโรทีนต่ำ เนื่องจากผนังเซลล์เป็นอุปสรรค์ต่อกระบวนการผลิตแคโรทีนอยด์ และในสายพันธุ์พ่อและแม่ผลิตแอสตาแซนธินต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schroeder และคณะ (2008) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์รา *Neurospora crassa* UVS-3 โดยใช้รังสี UV มีการผลิตแอสตาแซนธินมากกว่าสายพันธุ์พ่อและแม่

การเจริญของสาหร่ายขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง เช่น ไนโตรเจน แมกนีเซียม โปตัสเซียม และยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ความเข้มแสง อุณหภูมิ เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนา และควบคุมการเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณสาหร่ายและผลิตแคโรทีนอยด์ให้ได้ปริมาณสูงสุด เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงและเป็นแนวทางในการประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และสาหร่าย*Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

2.เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย*Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย โดยใช้ปัจจัยดังนี้ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบระยะการเจริญของสาหร่าย และต้องการผลผลิตแคโรทีนอยด์ให้ได้ปริมาณสูงจากสาหร่ายที่คัดเลือกมาจากธรรมชาติ และคาดว่าถ้าทำการกลายพันธุ์พร้อมกับหาสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมอื่นๆได้

1.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, Anova) โดยการใช้โปรแกรม SPSS/PC version 11 ในการวิเคราะห์ F-test และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 สาหร่าย *Chlorella* sp.

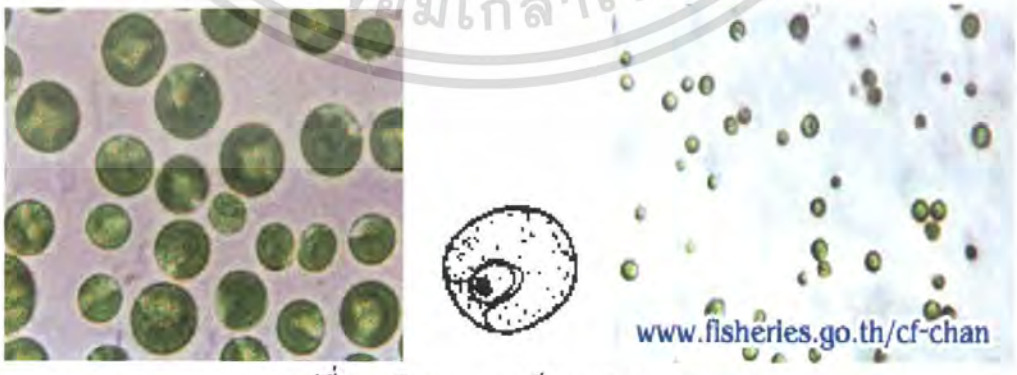
Beyerinck นักวิทยาศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ ได้ค้นพบ *Chlorella* sp เป็นคนแรกในปี พ.ศ. 2433 และสามารถจัดลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (วิสัย, 2536)

Kingdom Protista
Division Chlorophyta
Order Chlorellales
Family Chlorellaceae
Genus *Chlorella*

สาหร่ายกลุ่มนี้พบทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ที่มีสารอาหารจำพวกไนเตรท และฟอสเฟตอุดมสมบูรณ์ และอาจอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆเช่น พารามีเซียม ไฮดรา และฟองน้ำ เช่น สาหร่าย *Chlorella parasitica* อาศัยอยู่ในเซลล์ของพารามีเซียม ไฮดรา แบบพึ่งพาอาศัยกันและกัน (symbiosis) (กาญจนภาชน์, 2527)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นแพลงก์ตอนพืชสีเขียวเซลล์เดียวและกลุ่มเซลล์ที่ไม่เคลื่อนไหว จัดอยู่ในดิวิชัน Chlorophyta เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรีและผนังเซลล์ค่อนข้างบาง ขนาดเล็กประมาณ 2-12 ไมโครเมตร และสติกมา (stigma) (ปาจรีย์ และคณะ, 2540) ดังแสดงในรูป 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp.

ที่มา : http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/phyto-outdoor/chlorella.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนังเซลล์ : โดยทั่วไปแล้วผนังเซลล์มี 2 ชั้น ผนังชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส และผนังชั้นนอกเป็นพวกเพคติน รงควัตถุสังเคราะห์แสงอยู่ในคลอโรพลาสต์ ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แอลฟา เบต้า แกมมาแคโรทีน แซนโทฟิลล์

ลักษณะของคลอโรพลาสต์ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนพบว่าประกอบด้วยไทลาคอยด์ (thylakoid) เรียงซ้อนกันเป็นชั้นเรียก กรานา (grana) แต่ละกรานา มีไทลาคอยด์ตั้งแต่ 2 ถึง 6 อันซึ่งเหมือนกับที่พบในพืชชั้นสูง นอกจากนี้ภายในคลอโรพลาสต์ยังมีไพรีนอย์ (pyrenoid) ซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหาร

Chlorella sp. สะสมอาหารไว้ที่ไพรีนอยด์ในรูปของแป้ง ซึ่งประกอบด้วยอะไมโลส (amylose เป็น unbranched chain ของ glucose residue) และอะไมโลเพคติน (amylopectin เป็น branched chain) (ลัดดา, 2542)

2.1.2 การสืบพันธุ์

Chlorella sp. มีสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอย่างเดียว โดยการสร้างออโตสปอร์ (autospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีรูปร่างเหมือนเซลล์แม่แต่มีขนาดเล็กกว่าจำนวน 4 , 8 หรือ 16 แต่บางชนิด เช่น *Chlorella ellipsoodea* สร้างถึง 32 ออโตสปอร์ (ลัดดา, 2542)

2.2 การชักนำการกลายพันธุ์ (วิธัญญา และคณะ, 2546)

2.2.1 ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์

มีความเชื่อความแปรปรวนทั้งหลายที่เกิดขึ้น กับสิ่งมีชีวิตจนถึงกับได้พวกใหม่หรือพันธุ์ใหม่นั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทีละเล็กละน้อยค่อยเป็นค่อยไป จนกระทั่งถึงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 Hugo De Vries นักพฤกษศาสตร์ชาวเนเธอร์แลนด์ ได้พบความจริงซึ่งแตกต่างจากข้อเสนอของ Darwin ทั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิตอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันทันที และพืชหรือสัตว์สามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ เรียกการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ว่า การกลายพันธุ์

2.2.2 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ฉับพลัน ที่พืชหรือสัตว์สามารถถ่ายถอดการเปลี่ยนแปลงอันนั้นไปยังลูกหลานได้ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอันนี้จะรวมไปถึงการเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม แต่คำว่า การกลายพันธุ์ ในปัจจุบันมักจะหมายความถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกสภาพหนึ่งดังนั้น อาจเรียกการเปลี่ยนแปลงอันนี้ว่า "gene หรือ point mutation" ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอ คือนิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนนิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไป หรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีระหรือทางชีวเคมี หรือลักษณะทางพฤติกรรมทางสปีชีส์ การกลายพันธุ์เป็นสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต และเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแตกต่างแปรผันในพันธุกรรม (genetic variation) อันเป็นพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ

2.2.3 ชนิดของการกลายพันธุ์

ชนิดของการกลายพันธุ์ที่ศึกษากัน มักเป็นพวกที่แสดงออกมาให้เห็นในรูปของลักษณะอย่างชัดเจน ตัวอย่างของการกลายพันธุ์ได้แก่ ลักษณะตาสีขาว ปีกสั้น ฯลฯ ของแมลงหวี่ ดังนั้นเราจึงเรียกการกลายพันธุ์ดังกล่าวว่า เป็นพวก " สังเกตได้ (visible) " ซึ่งมีอยู่ราวร้อยละ 1 ของการกลายพันธุ์ทั้งหมด และไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สิ่งมีชีวิตมากนัก แต่การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ คือ ราวร้อยละ 80 ได้แก่พวก " แสดงผลในทางเสื่อม (detrimental) " ซึ่งไม่อาจตรวจผลได้แน่ชัด แต่เข้าใจว่ากระทบ กระเทือนต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสัตว์ได้อย่างมาก ในการกลายพันธุ์ชนิดนี้ยีนที่เปลี่ยนไปแต่ละยีนก่อผลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อรวมผลของทุกยีนก็จะรุนแรงขึ้น การกลายพันธุ์อีกพวกหนึ่ง คือ พวก " ก่อผลถึงตาย (lethal) " ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 19 ถ้าอยู่ในสภาพ homozygous การกลายพันธุ์ชนิดนี้จะกระทบกระเทือนต่อขบวนการทางสรีระจนพืชหรือสัตว์ไม่อาจมีชีวิตอยู่ได้

2.2.3.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

การกลายพันธุ์ชนิดนี้เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาทอโทเมอริกซิฟท์ (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (ประดิษฐ์, 2543) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราต่ำมาก อัตราโดยเฉลี่ยประมาณ 10^{-5}-10^{-6} จำนวนเซลล์ต่อรุ่นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยแตกต่างออกไปแต่ละตำแหน่งและชนิดของยีนและชนิดของสิ่งมีชีวิต (วัฒนาลัย, 2536) ยีนกลายพันธุ์อาจเกิดในทางไปข้างหน้า (forward mutation : A→a) คือลักษณะปกติเปลี่ยนไปเป็นลักษณะกลาย หรืออาจเกิดขึ้นในทางกลับกัน (back mutation : a→A) คือ จากกลายพันธุ์ยีนเปลี่ยนกลับไปเป็นยีนปกติตามเดิม อย่างไรก็ดี นับว่าการกลายพันธุ์มีความสำคัญและก่อให้เกิดวิวัฒนาการขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนแทบทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ เคยผ่านการเปลี่ยนแปลงโดยการกลายพันธุ์มาแล้วในอดีต จากการคัดเลือกอันเข้มงวดในธรรมชาติยีนซึ่งก่อผลในทางเสื่อมก็ค่อยๆหายไปจากหมู่ประชากรของพืชและสัตว์ เมื่อปราศจากการกลายพันธุ์ธรรมชาติแล้วก็แทบจะกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตไม่อาจดำรงพันธุ์หรือมีวิวัฒนาการมาจนถึงทุกวันนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาอัตราของการกลายพันธุ์ของยีนต่างๆของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนไปยังสภาพอื่น และการเปลี่ยนแปลงกลับสู่สภาพเดิมมีอัตราการเกิดไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยีนของพืช และสัตว์ชั้นสูงมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่ายีนของแบคทีเรียและไวรัส

2.2.3.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการกระตุ้น (induced mutation)

นอกจากจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้วการกลายพันธุ์ก็อาจจะถูกทำให้เกิดได้โดยวิธีการกระตุ้น โดยได้เริ่มใช้รังสีเอ็กซ์ (X-ray) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ พบว่าอัตราของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะสูงกว่าพวกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติถึงราว 150 เท่า ต่อมาได้พบว่ารังสีเอ็กซ์นี้ได้ก่อให้ เกิดการผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยการใช้รังสีเอ็กซ์มักจะก่อผลในทางเสื่อม และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นก็คงมีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม บางยีนอาจถูกทำลายก็ได้หรือบางส่วนของโครโมโซมอาจขาดหายไป

2.2.4 สิ่งที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagens)

2.2.4.1 สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ รังสี ต่างๆ

2.2.4.1.1 อุณหภูมิ จากการทดลองเลี้ยงแมลงหวี่ในอุณหภูมิต่างๆกัน พบว่ายีนด้อยที่ทำให้เกิดการตายบนโครโมโซม X (sex linked recessive lethal gene) และทำให้เกิดการตายในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนี้

อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.87

อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.188

อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เกิดร้อยละ 0.325

2.2.4.1.2 รังสีและแสง เป็นสิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ สามารถแบ่งแสงและรังสีตามช่วงความยาวคลื่นออกเป็นพวกๆดังนี้

10^{-4}-10^{-1} ซม.	คลื่นวิทยุ
10^{-2}-10^{-3} ซม.	แสงอินฟาเรด (infared)
10^{-4} ซม.	แสงที่มองเห็น
10^{-5}-10^{-6} ซม.	แสงอัลตราไวโอเลต
10^{-7}-10^{-8} ซม.	รังสีเอ็กซ์ (X-ray)
10^{-9}-10^{-10} ซม.	รังสีแกรมม่า (gramma rays)
10^{-11} ซม.	รังสีคอสมิก (cosmic rays)

คลื่นวิทยุ แสง และรังสี คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นขนาดต่างๆกัน คลื่นวิทยุมีช่วงคลื่นที่ยาวมาก คือ มีความยาวระหว่าง 10^{-10} ซม. แสงที่เรามองเห็นมีช่วงคลื่น 10 เซนติไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลื่นที่มีช่วงคลื่นสั้นกว่านี้ เช่น แสงอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ จัดว่าเป็นคลื่นที่มีพลังงานสูง เมื่อช่วงคลื่นยิ่งสั้นลงพลังงานก็ยิ่งสูงขึ้น การที่แสงบางอย่าง และรังสีมีพลังงานสูงนี่เองทำให้สามารถแทรกซึมวัตถุ และก่อผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต เราอาจแยกคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าและพลังงานในรูปมวล จากสารที่อาจแผ่รังสี (radioactive isotope) ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

1.รังสี (ionnizaing radiation) คือ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า หรือพลังงานในรูปมวลที่มีพลังงานสูงเมื่อกระทบเป้าแล้ว จะทำให้มีการผลิตอิออน (ions) และรังสีนี้จัดเป็นพวกที่มีแรงแทรกซึมสูง มีอยู่หลายชนิดด้วยกัน แต่ละชนิดอาจมีแหล่งที่เกิดและแรงแทรกซึมต่างกัน รังสีเหล่านี้ ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกรมม่า รังสีคอสมิก รังสีแอลฟา รังสีเบต้า และนิวตรอน รังสีบางชนิดในจำนวนนี้ได้จากการแผ่รังสีของธาตุที่อาจแผ่รังสีได้ (radioactive elements) เช่น รังสีแอลฟา ซึ่งประกอบด้วย โปรตอนและนิวตรอน และรังสีเบต้าซึ่งประกอบด้วยอิเล็คตรอน เป็นต้น

รังสี ทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการที่ทำให้เกิดอิออน ทั้งนี้เมื่อรังสีวิ่งไปกระทบกับอะตอมของวัตถุ ก็จะทำให้อะตอมนั้นยิงอิเล็คตรอนออกไป หลังจากสูญเสียอิเล็คตรอนไปแล้ว อิเล็คตรอนตัวที่ถูกยิงออกไปจะถูกจับไว้โดยอะตอมข้างเคียง จึงทำให้อะตอมนั้นกลายเป็นอิออนที่มีประจุลบโดยเหตุนี้เองอิออนจึงเกิดเป็นคู่ๆเสมอ รังสีอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น เมื่ออิออนนั้นอยู่ในส่วนของยีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดกับอิออนนั้น ก็จะทำให้ยีนเปลี่ยนสภาพไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ รังสีอาจทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ผลิตอิออนของไฮโดรเจน (H^+) และกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) แล้ว H^+ จะรวมตัวกับออกซิเจนได้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ อาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โปรตีน หรือโครโมโซมก็ได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับโครโมโซมก็จะทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมหรือการกลายพันธุ์ของยีนได้

$$H_2O \longrightarrow H^+ + OH^-$$

ในที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนอะตอมที่เกิดจากโมเลกุลของน้ำจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ง่าย ดังปฏิกิริยา

$$H^+ + O_2 \longrightarrow H_2O$$

$$H_2O + H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$2\,H_2O \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

2. แสง (nonionnizing radiation) คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงยาวๆ ไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ทั้งนี้เพราะพลังงานที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเราเรียกคลื่นพวกนี้ว่า แสง แสงที่อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) แสงชนิดนี้มีช่วงคลื่นยาวกว่ารังสีเอ็กซ์ และเนื่องจากมีพลังงานต่ำนี่เอง แสงอัลตราไวโอเลตจึงมีแรงแทรกซึมน้อย และไม่อาจแทรกซึมผ่านส่วนของร่างกายที่มีความหนาแน่นสูงๆ ดังนั้นจึงมักใช้กับส่วนเล็กๆของพืช เช่น อาจใช้กับอับละอองเกสร เป็นต้น หรือใช้กับบางส่วนของไข่แมลงหวี่และมักใช้ได้ผลดีกับเชื้อรา แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไวรัส แสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในส่วนของโพลาร์แคป (polar cap) ของไข่แมลงหวี่ รังสีอัลตราไวโอเลตอาจจะทำให้โครโมโซมผิดปกติ แต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอ็กซ์ (ประดิษฐ์, 2543)

เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตไม่ทำให้มีการผลิตอิออน ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก การที่เซลล์ดูดแสงเข้าไปโดยตรง ส่วนของเซลล์ที่ดูดแสงได้ดีคือ กรดนิวคลิอิก หรืออาจกล่าวลงไปให้แน่ชัดอีกว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไพริมิดีนนั่นเอง เมื่อเบสกระทบกับแสงอัลตราไวโอเลตก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับเกาะของพันธะ (bond) เปลี่ยนไป คือ ทำให้มีการจับเกาะระหว่างเบสชนิดเดียวกัน เบสที่จับเกาะกันนี้ เรียกว่าเป็น ไดเมอร์ (dimer) การจับเกาะที่เกิดขึ้นง่ายที่สุด คือการจับเกาะกันระหว่างไทมีน (thymine) ซึ่งทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) (รูปที่ 2.2)

รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดไทมีนไดเมอร์

ที่มา: Gerald (1973)

ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนในเส้นนิวคลีโอไทด์ ก็จะมีการขัดขวางไม่ให้ดีเอ็นเอแบ่งตัว ถ้ามีการจับเกาะระหว่างไทมีนของเส้นตรงกันข้ามก็จะทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของไทมีนกับอะดีนีน (thymine กับ adenine : T-A) เปลี่ยนไป ดังนั้นทำให้ไทมีนไปจับกับกัวนีน ซึ่งจะยังผลให้ T-A เปลี่ยนไปเป็น C-G ซึ่งจัดเป็นการเปลี่ยนแปลง แบบทรานซิชั่น (transition) ส่วนไดเมอร์ชนิดอื่นที่พบคือ ไซโตซีนไดเมอร์ (cytosine dimer : C-C) ซึ่งเกิดขึ้นน้อยกว่าพวกแรก ไดเมอร์ชนิดนี้ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการที่ NH_2 ถูกขับออกไปจึงทำให้ยูราซิลไดเมอร์ (uracil dimer : U-U) แต่ยูราซิลจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไทมีน ดังนั้นจึงทำให้ G-C เปลี่ยนเป็น A-T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของแสงอัลตราไวโอเลตที่มีต่อสิ่งมีชีวิต ก็คือทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซมและยีน (gene generation) เช่นเดียวกับการใช้รังสีเอ็กซ์ แต่มีรายงานว่าขนาดการใช้ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้เท่ากันนั้น รังสีเอ็กซ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมได้มากกว่า คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลตก็คือ แสงที่มีช่วงคลื่นต่างกันจะมีผลทางการกลายพันธุ์ไม่เท่ากัน ช่วงคลื่นที่มีผลในการกลายพันธุ์ดี คือพวกที่ DNA สามารถดูดซับเอาไว้ได้มาก แสงอัลตราไวโอเลตไม่สามารถผ่านแก้วได้แต่สามารถทำลายสายตาได้ (Gerald, 1973)

ผลของการกลายพันธุ์จากการให้แสงอัลตราไวโอเลต ไม่สอดคล้องกับทฤษฎีการกระทบเป้า (target theory) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ (dosage) และอัตราการกลายพันธุ์จะไม่เป็นแบบเส้นตรง แต่จากการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปรากฏว่าได้กราฟเส้นโค้ง หลายๆแบบเช่นนี้แล้วก็แสดงว่า การกลายพันธุ์ย่อมเกิดจากการกระทบกับเป้าหมาย หลายๆครั้ง ซึ่งการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้กับเชื้อรา ซึ่งความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์จะใกล้เคียงกับการแผ่รังสีอัลตราไวโอเลต ความไวของสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถคำนวณได้จากอัตราการอยู่รอดของจำนวนโคโลนีภายหลังการฉายแสง ถ้าให้แสงอัลตราไวโอเลตสูงขึ้นจะทำให้อัตราการกลายและอัตราการตายเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงให้อัตราการกลายพันธุ์สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายหลังการได้รับแสงอัลตราไวโอเลต (Gerald, 1973)

ผลอันน่าสนใจประการหนึ่งของแสงอัลตราไวโอเลต ก็คือ การเกิด photoreactivation คือผลของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะบรรเทาลงหรือหมดไป เมื่อให้เซลล์ถูกกับแสง (visible light) และได้มีการค้นพบถึงความผิดปกติที่เกิดจากการการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแสงอัลตราไวโอเลต กล่าวคือ แสงอัลตราไวโอเลตที่มองเห็นด้วยตาเปลาสามารถทำให้เซลล์ถูกเปลี่ยนไปจากสภาพเดิมได้ (Gerald, 1973)

2.2.4.2 สิ่งที่ก่อการกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นคว้าเพื่อหาว่าสารเคมีชนิดใดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชหรือสัตว์ จนทราบว่าสารเคมีเป็นจำนวนมากที่เป็นสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น กรดไนตรัส (nitrous acid) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *Asperilus* sp. มีรายงานพบว่าสารไนโตรเจน มัสตาร์ด และซัลเฟอร์มัสตาร์ด สามารถกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ได้ ทั้งนี้สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ไดเอธิลซัลเฟต (diethysulfate) ไดอะโซมีเทน (diazomethane) และสารประกอบอื่นๆ ก็เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมีผลรุนแรงต่อผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมีสารบางชนิดที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

อย่างไรก็ตามสารเคมีบางชนิดอาจจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตหนึ่ง แต่จะไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารเคมีบางชนิดอาจมีผลในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต หรือมีผลเฉพาะในเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น เช่น สารฟอร์มัลดีไฮด์จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่ตัวผู้ระยะที่เป็นตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนอน แต่จะไม่มีผลต่อตัวเมียระยะที่เป็นตัวหนอน นอกจากนี้สารเคมีแต่ละชนิดก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนแต่ละตำแหน่งด้วยความถี่ที่แตกต่างกัน

2.3 แคโรทีนอยด์

2.3.1 ชนิดและโครงสร้างของแคโรทีนอยด์

เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง สีน้ำตาล และสีแดง จัดเป็นสารไอโซพรีนอยด์ ขนาดความยาว C 40 มีพันธะคู่สลับเดี่ยวในโมเลกุล แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

2.3.1.1 แคโรทีน ประกอบด้วยอะตอมของ C และ H เท่านั้น เช่น เบต้า-แคโรทีน ให้สีส้มแดง

2.3.1.2 แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ประกอบด้วยอะตอมของ C H และ O ให้สีเหลือง ทั้งนี้อะตอมออกซิเจนอาจอยู่ในรูปไฮดรอกซิล เช่น ลูทีน (lutein) หรืออยู่ในรูปอีพอกไซด์ เช่น ไวโอแลกแซนทิน (violaxanthin) และนีโอแซนทิน (neoxanthin)

รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ (ที่มา : Britton, 1983)

2.3.2 สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน แอลฟา-แคโรทีนและเบต้า-คริปโทแซนทิน เบต้า-แคโรทีนและแอลฟา-แคโรทีนฯลฯ

2.3.2.1 เบต้า-แคโรทีน สารกลุ่มแคโรทีนอยด์เป็นสารสีส้ม ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเสริมประสิทธิภาพของเซลล์นักฆ่า (natural killer cell) ในการกำจัดเซลล์มะเร็ง กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ซ่อมแซมสารพันธุกรรมได้ เบต้า-แคโรทีนจะคอยกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะไปทำปฏิกิริยากับเซลล์ ทำลายโครงสร้างหน้าที่ของเซลล์จนเซลล์เสื่อมสภาพในที่สุด อันเป็นสาเหตุของโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น การแก่ก่อนวัย การด้อยประสิทธิภาพของกล้ามเนื้อผิวหนัง หลอดเลือดหัวใจอุดตัน ต้อกระจก มะเร็ง แอลฟา-แคโรทีนมีฤทธิ์ต้านมะเร็งสูงกว่าที่พบในเบต้า-แคโรทีน ช่วยกระตุ้นการกำจัดเซลล์มะเร็งของร่างกาย

2.3.2.2 เบต้า-คริปโทแซนทิน เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สำคัญตัวหนึ่ง เป็นสารสำคัญให้สีเหลืองส้ม สารนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อสลายตัวจะให้วิตามินเอ กระตุ้นยืนต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดมะเร็ง ที่เรียก RB gene มีฤทธิ์เสริมสมรรถภาพการทำงานของปอด ผู้ที่กินเบต้า-คริปโทแซนทินเป็นประจำจะลดโอกาสเกิดมะเร็งในปอดและลำไส้ใหญ่ได้

2.3.2.3 ไลโคพีน (lycopene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่ให้สีแดงเข้ม เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการถูกทำลายของสารพันธุกรรมและโปรตีน ไลโคพีนจับกับเส้นใยได้ดี จะออกฤทธิ์ได้ดีถ้าถูกปลดปล่อยจากเส้นใยโดยใช้ความร้อน ไลโคพีนละลายในไขมัน ป้องกันผิวหนังไม่ให้ได้รับอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเลตได้ดีกว่าเบต้า-แคโรทีน พบปริมาณมากในผิวหนัง อัณฑะ ต่อมหมวกไตและต่อมลูกหมาก ป้องกันอวัยวะดังกล่าวจากการเกิดมะเร็ง ลดปริมาณไขมันแอลดีแอลในเลือด

2.3.2.4 แอสตาแซนธิน (astaxanthin) เป็นแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเบต้า-แคโรทีน 10 เท่า สามารถผ่านเข้าไปในสมองทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในสมองได้

2.3.2.5 ฟลาโวนอยด์ เฮสเพอริดิน (hesperidin) และนาริงจิน (naringin) มีฤทธิ์เสริมความแข็งแรงของหลอดเลือดฝอย

2.3.2.6 พิโนสโทรบิน (pinostrobin) เป็นฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ขับสารพิษในตับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการก่อกลายพันธุ์ จึงมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง

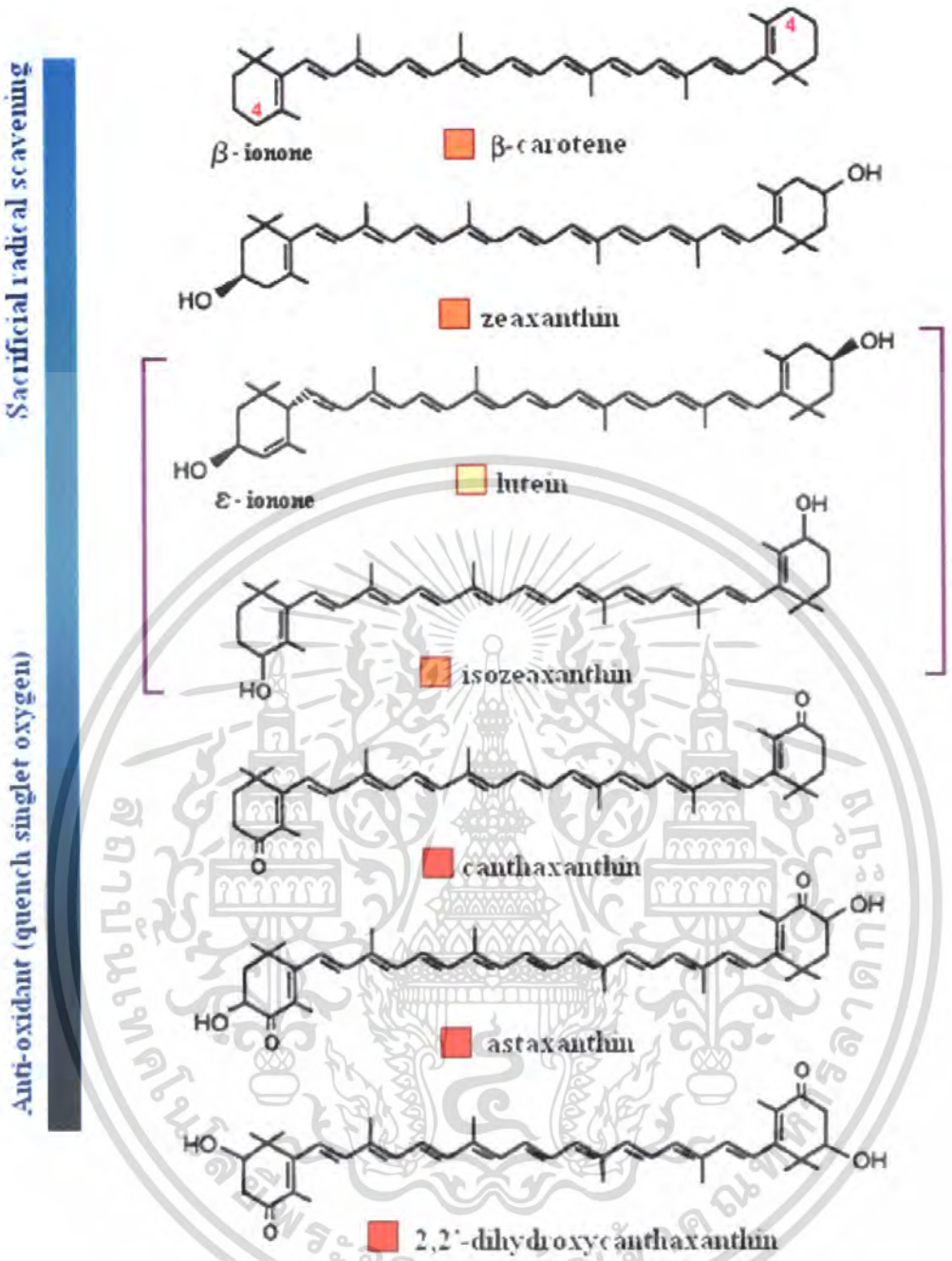
2.3.2.7 มอริน (morin) เป็นฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านไวรัสเริมหรือเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์ 2 (HSV-2) ป้องกันการเกิดมะเร็งจากการได้รับสารก่อมะเร็ง การทดลองระดับเซลล์พบว่า มอรินทำให้ระดับสารเคมีต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านมสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับมอริน โดยลดการขับยาออกจากเซลล์มะเร็ง

2.4 หน้าที่ของแคโรทีนอยด์

2.4.1 การสังเคราะห์แสง (photosynthesis)

แคโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีที่รับพลังงานแสง แล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ ในระบบ photosystem I ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายสมบูรณ์เกือบร้อยละ 100 ในแบคทีเรีย แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ และรงควัตถุอื่นๆ จะรวมอยู่ในโครมาโทฟอร์ (chromatophore) บนเยื่อเซลล์ ส่วนในพืชสีเขียวทั่วไปและสาหร่ายจะเป็นส่วนหนึ่งของคลอโรพลาสต์ โดยรวมเป็นแผ่นเรียก ไทลาคอยด์ (thylakoid disk) แคโรทีนอยด์จะทำหน้าที่ดูดกลืนแสงในช่วงที่คลอโรฟิลล์ไม่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ แสงที่มีความยาวคลื่นสูงกว่า 680 นาโนเมตร (Moor และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของกลุ่มสารแคโรทีนอยด์

ที่มา : http://www.chm.bris.ac.ukmotmcarotenoidscarotenoids.htm

2.4.2 การป้องกันแสง (photoprotection)

เซลล์ของพืชชั้นสูง แบคทีเรีย และรา จะถูกทำลายได้โดยผ่านกระบวนการทำให้โมเลกุลของออกซิเจนถูกกระตุ้น (excited oxygen molecule) แคโรทีนอยด์ทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันซึ่งสามารถระงับโมเลกุลออกซิเจนที่ถูกกระตุ้นเหล่านั้นได้ (กนกอร,2543) แคโรทีนอยด์สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอิเลคตรอนเดี่ยว (single oxygen) และอนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl radical) (Jyonouchi และคณะ, 1995)

2.4.3 ประโยชน์ของคาโรทีนอยด์

2.4.3.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์

ใช้เป็นสีผสมอาหาร โดยเฉพาะเบต้า-คาโรทีน โดยใช้ผสมในอาหารประเภทต่างๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาร์การีน น้ำมันพืช และผลิตภัณฑ์มักกะโลนี เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทน้ำส้มและอาหารประเภทอื่น โดยใช้เบต้า-คาโรทีนที่ถูกปรับปรุงและที่สังเคราะห์ คือ แคนทาแซนทินและแคโรทีนอยด์ ซึ่งสามารถละลายหรือกระจายตัวในน้ำได้ (Britton, 1983)

2.4.3.2 ใช้เป็นอาหารสัตว์

ในการทำเป็นอาหารสัตว์จะใช้ชีวมวลโดยตรง ไม่จำเป็นต้องนำไปสกัดแยกแต่ละชนิดออกมา เช่น ในสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปลาแซลมอน ปลาเทราท์และสัตว์จำพวกคัสตาเซียน (crustaceans) เช่น กุ้ง กั้ง และปูต่างๆ ตามธรรมชาติแล้วสัตว์เหล่านี้จะได้รับรงควัตถุนี้จากอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด ทำให้สีของเนื้อสัตว์มีสีสันเจือจางไม่สวยและขายได้ในราคาต่ำ ดังนั้นผู้เลี้ยงจึงนิยมใช้แคโรทีนอยด์เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อที่จะทำให้สัตว์น้ำดังกล่าวขายได้ในราคาที่สูง และนอกจากทำให้เนื้อหนัง ไข่ มีสีสันสวยงามขึ้นแล้ว สัตว์เหล่านี้ยังได้รับโปรตีนและวิตามินอีกด้วย ในสัตว์ปีกคาโรทีนอยด์มีส่วนในการเพิ่มสีของไข่แดงให้เป็นที่ต้องการของตลาด โดยเป็นส่วนผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยง (Lorenz และ Cysewaki, 2000)

2.4.3.3 เป็นโปรวิตามิน เอ (provitamin A)

เบต้า-คาโรทีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามิน เอ ที่สำคัญที่สุด โดยโมเลกุลของเบต้า-คาโรทีนจะถูกตัดตรงด้วยเอนไซม์ β-carotene 15, 15'-oxygenase กลายเป็น 2 โมเลกุลของเรดินัลดีไฮด์ภายในลำไส้และตับของสัตว์ จากนั้นเปลี่ยนเป็นเรตินอล โดยเอนไซม์เรตินัล รีดักเตส (retinal reductase) (กนกอร, 2543) นอกจากจะเป็นสารประกอบที่ร่างกายใช้เปลี่ยนเป็นวิตามินเอตามปริมาณที่ร่างกายต้องการแล้ว ยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในอาหารจำพวกไขมัน เพราะการออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางอาหารและเกิดกลิ่นที่ไม่ดี (Rawls และ Van Santen, 1970)

2.4.3.4 ใช้ในทางเภสัชกรรม

จากการเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามิน เอ ของเบต้า-คาโรทีน จึงสามารถใช้ในการปรับสภาพและป้องกันการขาดวิตามินเอได้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารป้องกันแสงเพื่อปกป้องผิวหนังจากอาการคัน ไหม้และเป็นผื่น ที่เกิดจากการรับแสงแดดของคนไข้ที่เป็นโรคไวต่อแสง (photosensitity diseases) (Frossberg และคณะ, 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตยาจะใช้แคโรทีนอยด์ เช่น เบต้า-คาโรทีน และแคนทาแซมทินเป็นสีผสมในน้ำตาลที่เคลือบบนเม็ดยา ผสมลงเจลาตินที่ใช้ทำแคปซูล (Munzel และ Fuller, 1969)

จากการศึกษาแอสตาแซนธินช่วยปกป้องผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเลตซึ่งก่อให้เกิดโรงมะเร็งและเพิ่มการต่อต้านการติดเชื้อจากไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต (Lorenz และ Cysewski, 2000)

2.4.3.5 โปรตีนเซลล์เดียว

มนุษย์ได้รู้จักนำสาหร่ายมารับประทานโดยตรงมานาน ในหลายภูมิภาคของโลก และในปัจจุบันก็ได้มีการนำสาหร่ายมาผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) สำหรับ *Chlorella* sp. นั้นมีการนำมาผลิตเป็นอุตสาหกรรมอย่างเป็นล่ำเป็นสันในไต้หวันและญี่ปุ่น (ดุษณี, 2538) โดยนำมาสกัดให้ได้ส่วนที่เรียกว่า chlorella growth factor และมีการพัฒนาการสกัดโดยการหมุนเหวี่ยง และทำให้ขึ้นโดยการหมุนเหวี่ยงในสภาวะสูญญากาศและนำมาทำให้แข็งและแห้งเพื่อให้อยู่ในรูปผงซึ่งมีการทดลองวิจัยในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี และอิสราเอล (กิดานันท์, 2530 : วิสัย, 2536 และดุษณี, 2538)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างแคโรทีนอยด์

2.5.1 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

ค่าความเป็นกรดเป็นด่างมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต เมตาบอลิซึม อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างจะมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ แต่จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับไบคาร์บอเนต (Shirota, 1996; Reid และ Wood, 1976) สาหร่ายแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่างกัน(Lilly และคณะ 1960)

2.5.2 แมกนีเซียม

เนื่องจากแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์ เมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมมากขึ้นเซลล์จะสร้างคลอโรฟิลล์ได้มากขึ้น ทำให้สามารถดูดกลืนพลังงานมาใช้ในการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น จึงเจริญเติบโตได้รวดเร็ว (Fabregas และคณะ, 2000)

ดังนั้นถ้าเซลล์มีปริมาณแมกนีเซียมมากเพียงพอที่นำไปสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง เซลล์ก็จะไม่มีความจำเป็นที่จะสร้างรงควัตถุจำพวกแคโรทีนอยด์มาช่วยรับแสง (กนกอร, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน โคเอนไซม์ กรดนิวคลีอิค และคลอโรฟิลล์ ธาตุไนโตรเจนจึงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญส่วนหนึ่งของน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย รูปแบบของธาตุไนโตรเจนที่สาหร่ายทั่วไปนำมาใช้เป็นสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ ไนเตรท (NO^-_3) ไนไตรต์ (NO_2^-) และแอมโมเนียไอออน (NO^+_4) Withers และ Haxo (1978) รายงานว่าปริมาณเบต้า-แคโรทีนของสาหร่ายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเซื้ออยู่ในระยะสเตชั่นนารี (stationary phase) มากกว่าระยะล็อก (log phase) เนื่องจากเกิดการขาดอาหารโดยเฉพาะไนเตรท จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตได้และผลิตเบต้า-แคโรทีนได้ดีเมื่อระดับไนโตรเจนในอาหารต่ำถึง 1 มิลลิโมลาร์

พบว่าการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนซึ่งสอดคล้องกับ (Rau, 1976) ที่กล่าวว่าในขณะที่ลดลงของปริมาณไนเตรท จะทำให้อัตราการเจริญลดลงและปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น (โฆษิต, 2540)

2.5.4 แสง

แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการเจริญเติบโต ถ้าแสงน้อยเกินไปจะทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตช้า แต่ถ้าแสงมากเกินไปก็อาจจะทำให้สาหร่ายตายได้ (มาวิทย์และธิดา, 2534) เลี้ยง *Chlorella* sp. โดยให้ระดับความเข้มแสงต่างกัน 3 ระดับ คือ 1000 3000 และ 5000 ลักซ์ ทำการให้แสงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 วัน ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์พบว่าระดับความเข้มแสง 5000 ลักซ์ ได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดคือ 18.1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิกรัม

Brow Richardson และ Richardson (1968, อ้างตาม สุนันท์, 2523) รายงานว่าความเข้มแสงมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโตและการหายใจของสาหร่าย ซึ่งถ้าได้รับความเข้มแสงที่ต่ำกว่า 60 ฟุตแรงเทียน (1 ฟุต-แรงเทียน=10.764 ลักซ์) อัตราการเจริญจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มแสง และเมื่อความเข้มแสงสูงกว่า 100 ฟุตแรงเทียน อัตราการเจริญจะไม่ขึ้นกับความเข้มของแสง

2.6 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย

การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ (pure culture) เพื่อที่จะนำไปศึกษาต่อไปด้านอนุกรมวิธาน สัญฐานวิทยา หรือการนำมาเพาะเลี้ยงทางการค้า (สุนีย์, 2524)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 วิธีการทำเซลล์ให้บริสุทธิ์

หลักการของวิธีนี้คือ การล้างเซลล์สาหร่ายหลายๆ ครั้ง ในน้ำบริสุทธิ์จนกระทั่งแบคทีเรียและไวรัสหลุดออกไป โดยใช้หลอดแก้วลนไฟให้แก้วอ่อนตัว แล้วดึงให้เหล็กมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างกว่าเซลล์สาหร่ายเล็กน้อย ใช้ดูดสาหร่ายทีละเซลล์ไปไว้ในภาชนะที่มีน้ำบริสุทธิ์ ทำเช่นนี้ประมาณ 4 ครั้ง แบคทีเรียและไวรัสจะหลุดหมดการทดสอบพบว่าสาหร่ายที่ได้บริสุทธิ์หรือไม่นั้นใช้วิธีเพาะเชื้อในอาหารวุ้นที่มีอาหารสำหรับแบคทีเรียและไวรัส เกลี่ยหยดสาหร่ายให้ทั่วหน้าวุ้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องก็แสดงว่าสาหร่ายที่ทดสอบเป็น pure culture วิธีนี้มักใช้กับสาหร่ายที่มีขนาดโตพอมองด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำได้ซึ่งเป็นวิธีการที่ Pringsheim คิดขึ้นในปี ค.ศ. 1946

2.6.2 วิธีการเพาะบนจานวุ้น

วิธีการนี้เตรียมอาหารวุ้นในจานเพาะเลี้ยงโดยใช้วุ้นผง 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต้มกับอาหารที่เลี้ยงสาหร่าย โดยอาหารที่ผสมนี้ต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 – 20 นาที จึงนำมาเทลงในจานเพาะเชื้อให้หนาประมาณ 3 – 5 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้เย็นจนแข็งจึงหยดน้ำตัวอย่างลงไปใช้แก้วแท่งรูปตัว L ที่ลนไฟแล้ว เกลี่ยให้กระจายทั่ววุ้น (spread plate techinique) ตั้งทิ้งไว้ให้แสงประมาณ 2,000 ลักซ์ 2 สัปดาห์ สาหร่ายจะขึ้นเป็นจุดเขียวให้เห็น ถ้ามีแบคทีเรียในน้ำตัวอย่างแบคทีเรียจะขึ้นปะปนด้วย ให้ใช้ขดลวด (loop) ลนไฟเขี่ยกลุ่มสาหร่ายที่ไม่มีแบคทีเรียไปเขี่ยบนอาหารวุ้นใหม่ (cross streak techinique) เพาะไว้อีกจนเห็นสาหร่ายเจริญเป็นจุดสีเขียวไม่มีกลุ่มแบคทีเรีย ทำอย่างนี้ 3 – 4 ครั้ง จนแน่ใจว่าสาหร่ายที่ได้บริสุทธิ์ จึงนำมาถ่ายเชื้อบนอาหารเอียง (agar slant) เก็บไว้ใช้งานต่อไป วิธีนี้เฉพาะสาหร่ายที่ขึ้นได้บนวุ้นเท่านั้น

2.7 การเก็บรักษาพันธุ์สาหร่าย

สาหร่ายที่คัดพันธุ์แล้ว เลี้ยงไว้แบบ pure culture ต้องดูแลเปลี่ยนอาหารใหม่ (sub culture) ในระยะที่สาหร่ายเจริญเต็มที่ หากปล่อยทิ้งไว้จะค่อยๆตายหมดไป สาหร่ายที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวบางครั้งต้องย้ายลงอาหารใหม่ ทุก 2 สัปดาห์ แต่บางครั้ง 2 สัปดาห์อยู่ได้ถึง 1 – 2 เดือน การเก็บรักษาอาหารวุ้นในหลอดแก้ว (agar slant) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมกันโดยเก็บที่มีอุณหภูมิต่ำประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส พบว่าอยู่ได้นาน 22 เดือน (ผุสดี, 2522) แต่สาหร่ายพวก *Chlamydomonas* sp. และ *Tetraselmis* sp. จะไม่เหมาะกับการเก็บรักษาด้วยการใช้อุณหภูมิต่ำ (สุนีย์, 2524)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.8 การเจริญของสาหร่าย

การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการศึกษาการเจริญเติบโตไม่มีข้อจำกัดในแง่คาร์บอนไดออกไซด์หรือการอาหารต่างๆ และเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิคงที่ จะได้กราฟการเจริญเติบโตเหมือนจุลินทรีย์อื่นๆ David และคณะ (1964 อ้างตาม วีนา, 2542) กล่าวถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต คือ

2.8.1 ความเข้มแสง ถ้าเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* ที่สภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ควรจะได้รับความเข้มแสงอย่างน้อย 100 แรงเทียน และความเข้มแสงสูงสุดประมาณ 400 แรงเทียน

2.8.2 อุณหภูมิสาหร่าย *Chlorella* แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

2.8.3 ความเข้มของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

2.8.4 Autoinhibitor สาหร่ายมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อทิ้งไว้นาน เนื่องจากมีการสะสมของของเสียที่ถูกขับออกมาจากนอกเซลล์ แต่ปัญหานี้พบน้อยเพราะสาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงสูงและมีระดับการขับถ่ายต่อ นอกจากนั้นสาหร่าย *C. vulgaris*สามารถขับสาร chlorellin ออกมานอกเซลล์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายอื่นๆและแบคทีเรีย

2.8.5 ความเป็นกรดเป็นด่าง สภาพความเหมาะสมของความเป็นด่าง คือ 6.0-6.5

2.8.6 สายพันธุ์สาหร่ายเป็นลักษณะเฉพาะของสาหร่าย

84003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และสาหร่าย

1. สาหร่ายที่ใช้คือ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 และสาหร่ายพันธุ์ *Chlorella* sp. P47011
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ N-8
3. ชุดเครื่องแก้ว
4. หลอดเซนติฟิวส์ 10 มิลลิลิตร
5. โถดูดความชื้น (dessicator)
6. เครื่องเขย่า (Shaker: Innova: 2000)
7. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autroclave: HIRAYAMA: HA 300M IV)
8. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope: OLYMPUS: CH-BI45-2)
9. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven: WIB binder: FD 53)
10. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow: FASTER: Bio 48)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge: HERMLE: ZK 380)
12. เครื่องวัดพีเอช (pH meter: Denver Instrument: Model 215)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer: UNICO: UV-2800A)
14. อ่างน้ำร้อน (Water bath: Clifton:NE 2 - 22 D)
15. ชุดให้แสงไฟ
16. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (LIBROR: EB – 400 H)
17. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hacemacytometer: Imporve Neubaure)

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2

3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้เป็นอาหารสังเคราะห์ตามสูตร N-8 มีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงสูตรอาหาร N-8 (Atthasampunna, 1995)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
$Na_2HPO_4.2H_2O$	260.0
KH_2PO_4	740.0
$CaCl_2$	10.0
Fe EDTA	10.0
$MgSO_4.7H_2O$	50.0
KNO_3	1000.0
Trace element mixture 1.0 มิลลิลิตร	
Distilled water 1.0 ลิตร	

ปรับพีเอชเป็น 6.8 จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

Trace element mixture

$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	3.58	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	12.98	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	1.83	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	3.20	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

3.2.2 การเตรียมเชื้อ

นำสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 มาผ่านรังสีแกรมม่าเพื่อทำให้กลายพันธุ์ แล้วนำเชื้อสาหร่ายที่ผ่านรังสีเรียบร้อยแล้ว คือ *Chlorella* sp. P47011 M2-2 เขี่ยเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ ที่มีอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเจริญ ทำการเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ใส่ในหลอดอาหารวุ้นเอียง (slant) เมื่อมีระยะเวลาประมาณ 7-10 วัน แล้วจึงเก็บเข้าตู้เก็บเชื้อไว้ใช้ทำการทดลองต่อไปอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น

ถ่ายเชื้อสาหร่ายจากหลอดอาหารเอียงลงในอาหารเหลว (broth) สูตร N-8 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ใส่ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 180 รอบต่อนาที โดยมีการให้แสงตลอดเวลาความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เมื่อมีการเจริญประมาณ 7-10 วัน จึงนำไปเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.3.1 การศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

นำหัวเชื้อตั้งต้นที่ 7-10 วันของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่วัดค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร) ไม่ต่ำกว่า 0.5 เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ใช้หัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ 10 ใส่ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3.1.1 วัดค่าการเจริญเติบโต

วัดค่าการเจริญเติบโต การวัดนี้จะอยู่ในรูปของการวัดค่าความขุ่นเซลล์ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์มีวิธีการดังนี้

1. หยด formalin 2-3 หยด ลงในตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนับ

2. เจือจางตัวอย่างด้วย 0.85% NaCl ให้มีจำนวนเซลล์ของสาหร่ายประมาณ 1-10 เซลล์บนพื้นที่สี่เหลี่ยมเล็ก (มักเจือจาง 2-5 เท่า)

3. วางกระจกปิดสไลด์บน haemacytometer ตรงบริเวณที่มี chamber

4. ใช้ pasteur pipette ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วหยดไปบน haemacytometer บริเวณ platform ซึ่งเป็นแอ่ง ต้องระวังอย่าให้ตัวอย่างไหลลงไปในร่องที่อยู่รอบ ๆ platform

5. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 400X ต้องลดความเข้มของแสงโดยหรี่ diaphragm และปุ่มปรับความเข้มแสง

6. นับจำนวนเซลล์ในสี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็ก 5 ช่อง เวลานับถ้ามีเซลล์แตะหรือทับเส้นกรอบของสี่เหลี่ยม ให้นับเซลล์ในช่องนั้นเฉพาะเซลล์ที่แตะหรือทับด้านบน และเซลล์ที่แตะหรือทับด้านขวาเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การคำนวณหาจำนวนเซลล์

จำนวนเซลล์ / มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้ง 5 ช่อง x 5 x 10000

3.3.1.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

1. เก็บตัวอย่างสาหร่าย 30 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ที่อบแห้ง 80 องศาเซลเซียส และทราบน้ำหนักหลอดที่แน่นอน

2. นำหลอดเซนติฟิวส์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที

3. รินน้ำส่วนใสทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

4. นำหลอดเซนติฟิวส์ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

5. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 1 ชั่วโมง

6. ชั่งน้ำหนักของหลอดเซนติฟิวส์ที่ได้ไปลบกับน้ำหนักหลอดเซนติฟิวส์แท้จริง

3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ (KMITT, 1996)

หาปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์โดยการนำสาหร่ายที่เลี้ยงในฟลาสก์ เก็บตัวอย่างมาสกัดโดยใช้วิธีการสกัด ดังนี้

1. นำหลอดเซนตริฟิวส์ที่เก็บตัวอย่าง เติมเอทานอล 10 มิลลิลิตร และเติมโปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

2. นำหลอดเซนติฟิวส์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที (ครั้งที่ 1)

3. แล้วนำหลอดเซนติฟิวส์แช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. นำหลอดเซนติฟิวส์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที (ครั้งที่ 2)

5. นำหลอดเซนติฟิวส์มาสกัดโดยเทส่วนใสใส่กรวยแยก (ระมัดระวังไม่ให้มีตะกอน)

6. เติมไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) 20 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 90 พอประมาณ เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

7. เมื่อแยกชั้นจะเกิดชั้นสีเขียว (ข้างล่าง) และชั้นสีเหลือง (ข้างบน) ปล่อยสารละลายข้างล่างทิ้งเหลือชั้นสีเหลือง

8. เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แล้วเขย่า (ทำซ้ำข้อที่ 7) จนกระทั่งชั้นสีเหลืองใส

9. นำสารสีเหลืองที่ได้ไปปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether)

10.วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์จากสูตร

$$\text{ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)} = \frac{\text{Abs.}A_{450} \times 25 \times 1000}{260 \times \text{นน. แห้ง (มก.)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

3.3.2.1 ผลของความเข้มข้นกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง โดยแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้หัวเชื้อตั้งต้นจากข้อ 3.2.3 ที่วัดค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร) ไม่ต่ำกว่า 0.5 เลี้ยงในอาหารปริมาตร 135 มิลลิลิตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ10 ใส่ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เพื่อศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง นับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์

3.3.2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคสที่ดีที่สุดจากข้อ 3.3.2.1 โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนคือ ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้หัวเชื้อตั้งต้น (ข้อ 3.2.3) ที่วัดค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร) ไม่ต่ำกว่า 0.5 ร้อยละ10 ใส่ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตรที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เพื่อศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง นับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์

3.3.2.3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสที่ดีที่สุดจากข้อ 3.3.2.1 และแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดจากข้อ 3.3.2.2 โดยปรับความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ซึ่งใช้หัวเชื้อตั้งต้น (ข้อ 3.2.3) ที่วัดค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร) ไม่ต่ำกว่า 0.5 ร้อยละ10 ใส่ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เพื่อศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง นับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์

3.4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ได้จากทั้ง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC version 11 ในการวิเคราะห์ F-test และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

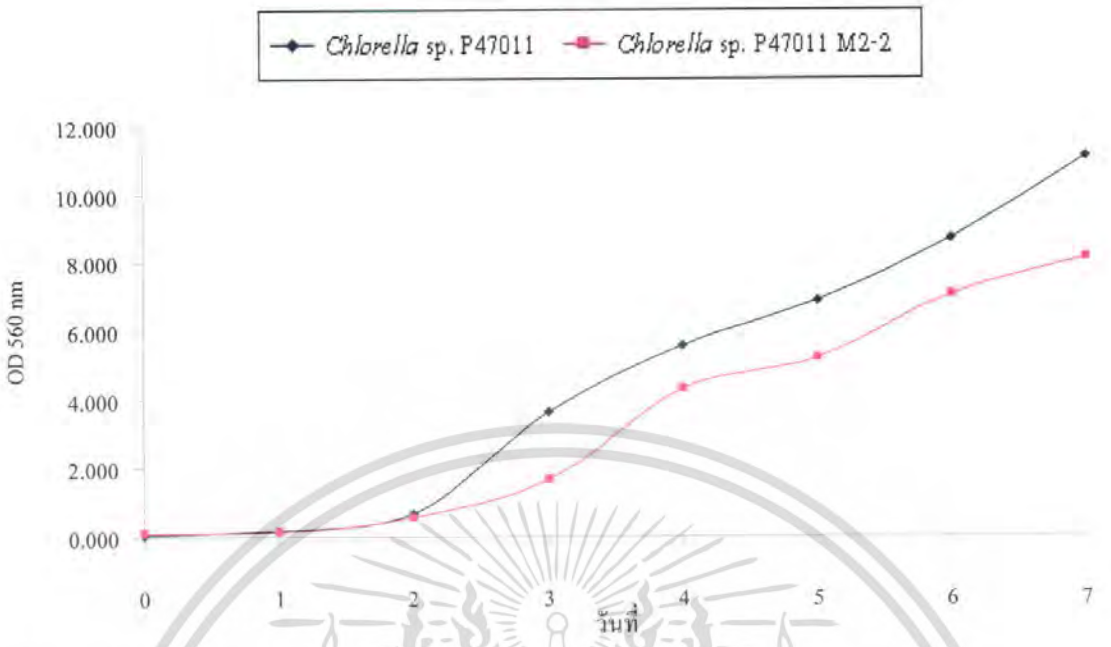
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

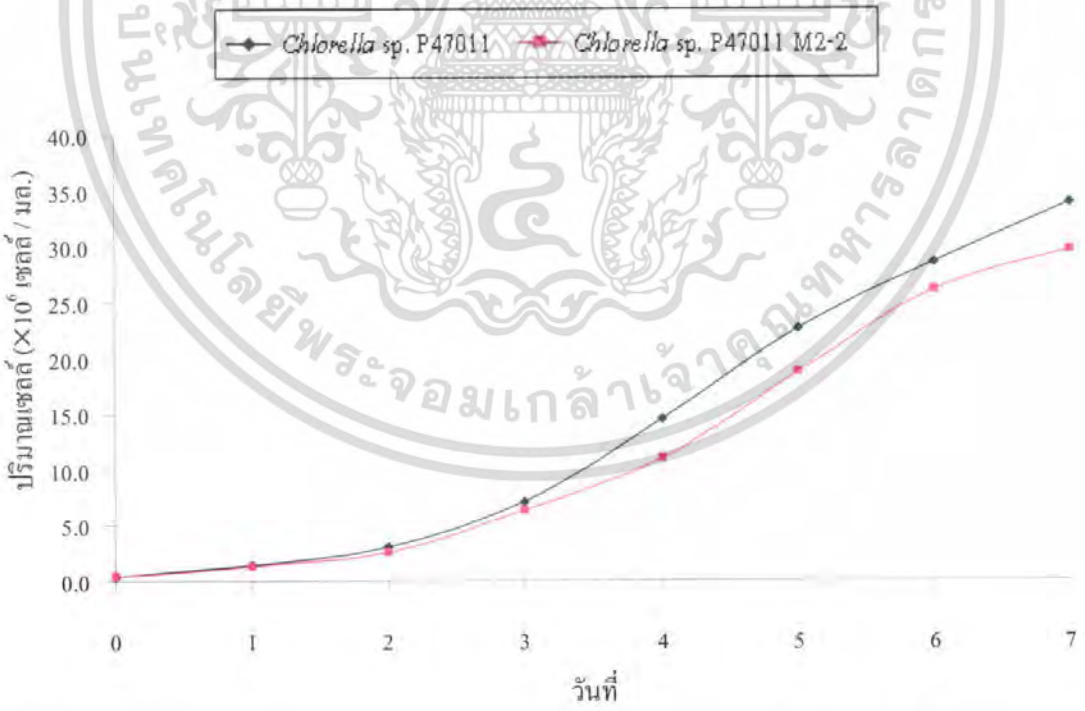
4.1 การศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

นำสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย มาเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 135 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที และมีการให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 มีการเจริญได้ดีที่สุดโดยในวันที่ 7 ของการทดลอง มีค่าการดูดกลืนแสง 11.047 (รูปที่ 4.1) และมีปริมาณเซลล์ 33.8 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.2) คิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 4.7456 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.3) มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.5116 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ (รูปที่ 4.4) ส่วนสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ในวันที่ 7 ของการทดลอง มีค่าการดูดกลืนแสง 8.100 มีปริมาณเซลล์ 29.5 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 4.0333 กรัมต่อลิตร มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.7433 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย มีการเจริญน้อยกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 แต่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.1) จากการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Phaffia rhodozyma* 3A4-8 ที่ทำให้กลายพันธุ์โดยการใช้รังสีแกรมม่าผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 3.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์พ่อและแม่ (Sun และคณะ, 2004) ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* NCIM 3353 ทำให้กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV สายพันธุ์กลายผลิตเบต้า-แคโรทีนได้ 86 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่สายพันธุ์พ่อและแม่ผลิตเบต้า-แคโรทีนได้ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร (Prakash และ Gadre, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

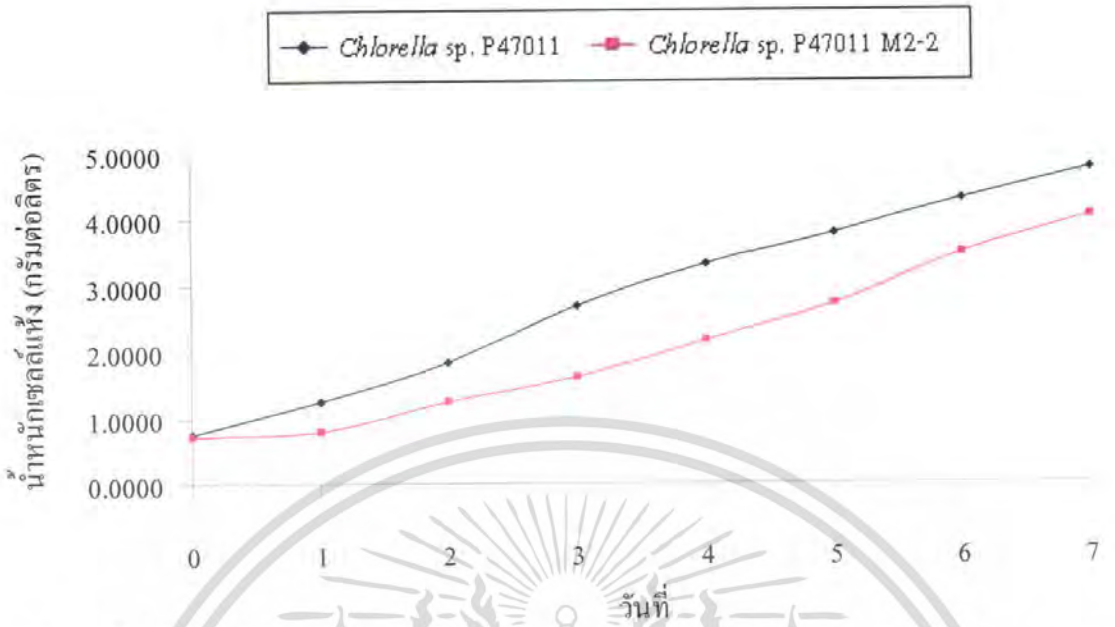


รูปที่ 4.1 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

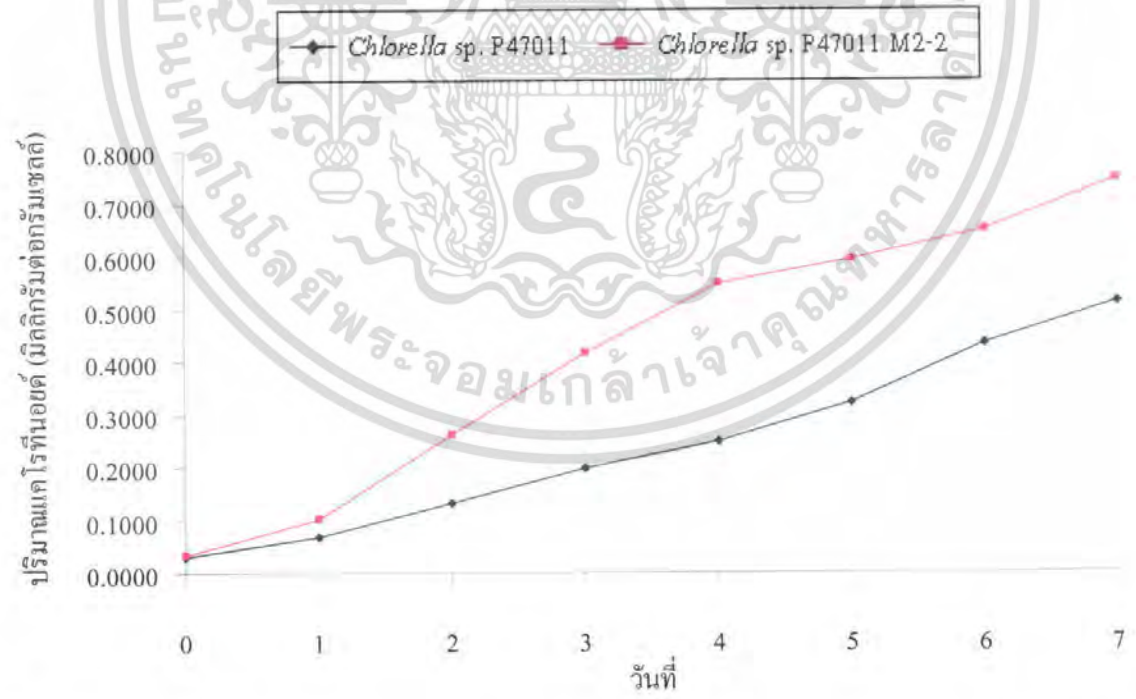


รูปที่ 4.2 ปริมาณเซลล์ ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์



รูปที่ 4.4 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ในวันที่ 7 ของการทดลอง

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)
Chlorella sp. P47011	0.5116[b]
Chlorella sp. P47011 M2-2	0.7433[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับที่ร้อยละ 95

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2

นำสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011M2-2 พันธุ์กลาย เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 โดยการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส แหล่งไนโตรเจน และความเป็นกรดเป็นด่าง ดังนี้

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของกลูโคส

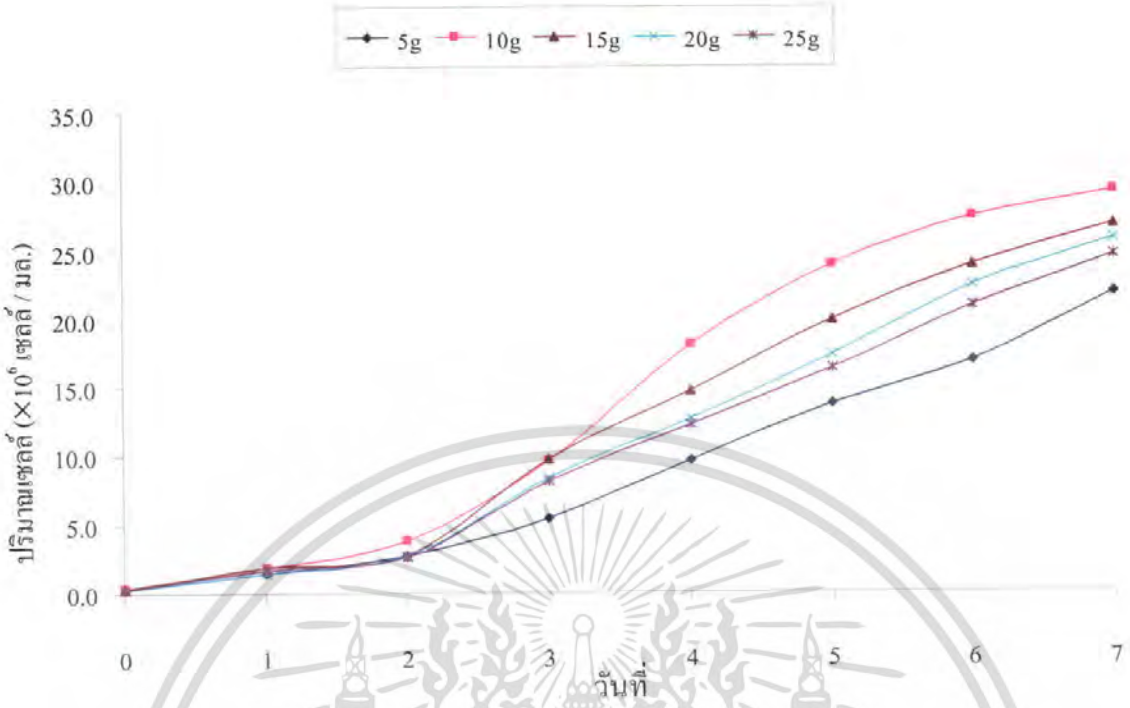
ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยแปรผันกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ใส่หัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ10 ของปริมาณอาหาร 135 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที และมีการให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร มีการเจริญที่ดีสุดคือ มีค่าการดูดกลืนแสง 8.053 (รูปที่ 4.5) มีปริมาณเซลล์ 29.2 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.6) น้ำหนักแห้ง 4.1278 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7) และปริมาณแคโรทีนอยด์ได้ 0.7472 มิลลิกรัมต่อกรัม (รูปที่ 4.8) รองลงมาที่กลูโคสความเข้มข้น 15 20 25 และ 5 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 0.6400 0.6077 0.5846 และ 0.4776 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ สาหร่าย *Chlorella* sp. ใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารลดลงอย่างรวดเร็วและต้องการแหล่งคาร์บอนปริมาณมาก เพื่อใช้ในการเจริญจึงต้องกำหนดความเข้มข้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพราะถ้าไม่เหมาะสมจะยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella protothecoides* CS-41 ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้มวลเซลล์และลูเทอินสูงสุด คือ 4.8 กรัมต่อลิตร และ 20.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Shi และคณะ, 1999) การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* มีอัตราการเจริญสูงสุดและปริมาณแอสตาแซนธิน คือ 0.031 ต่อชั่วโมงและ 10.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chen และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

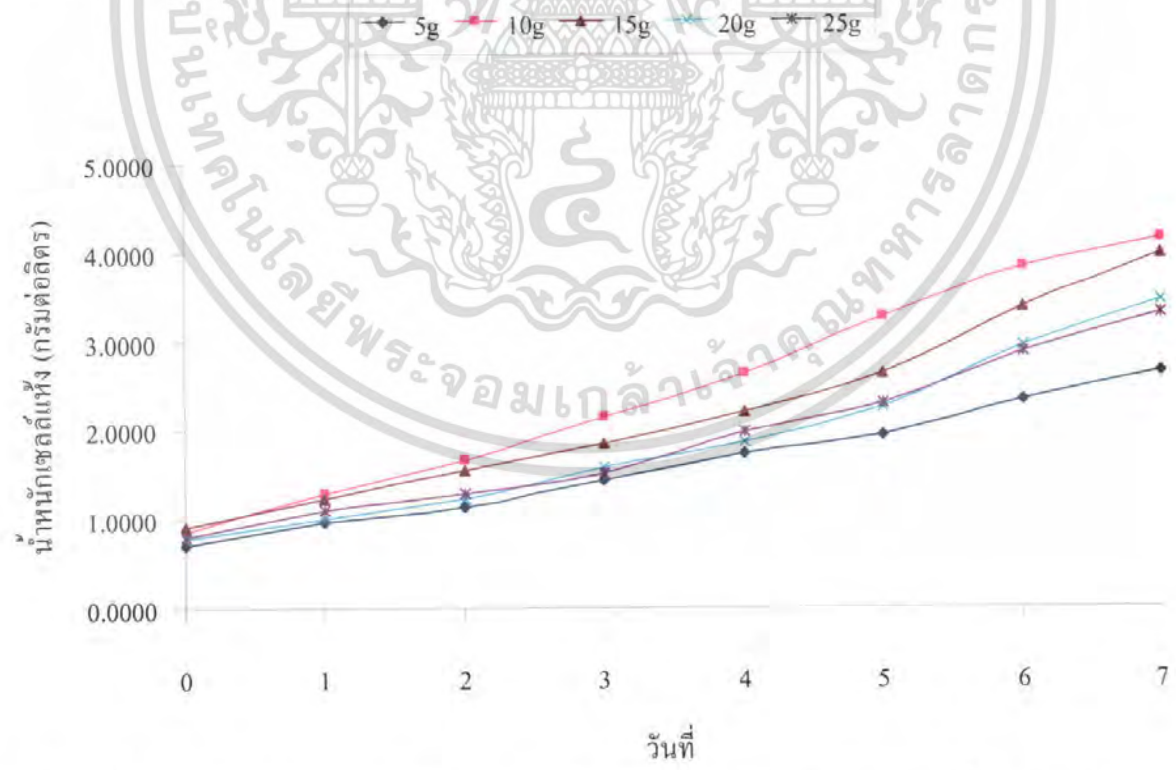
จากการทดลอง สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่เลี้ยงในอาหาร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตรให้ผลการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์มากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.2)

รูปที่ 4.5 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

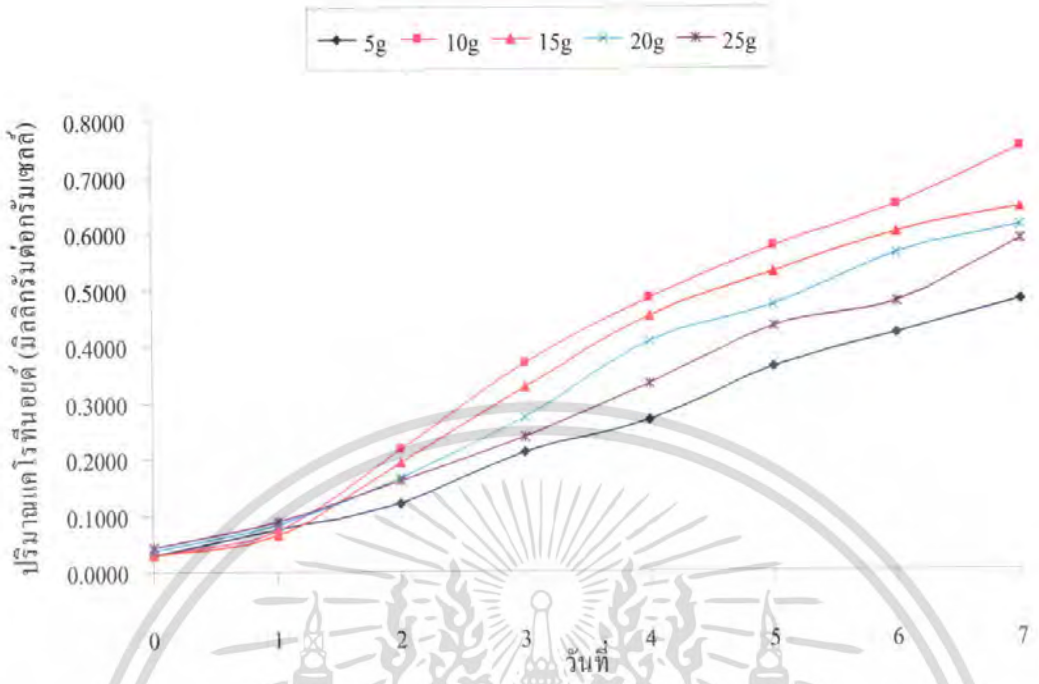


รูปที่ 4.6 ปริมาณเซลล์ ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์



รูปที่ 4.7 น้ำหนักแห้ง ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่เลี้ยงในอาหาร N-8 ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 ในวันที่ 7 ของการทดลอง

ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)
5	0.4776[c]
10	0.7472[a]
15	0.6400[b]
20	0.6077[b]
25	0.5846[b]

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับที่ร้อยละ 95

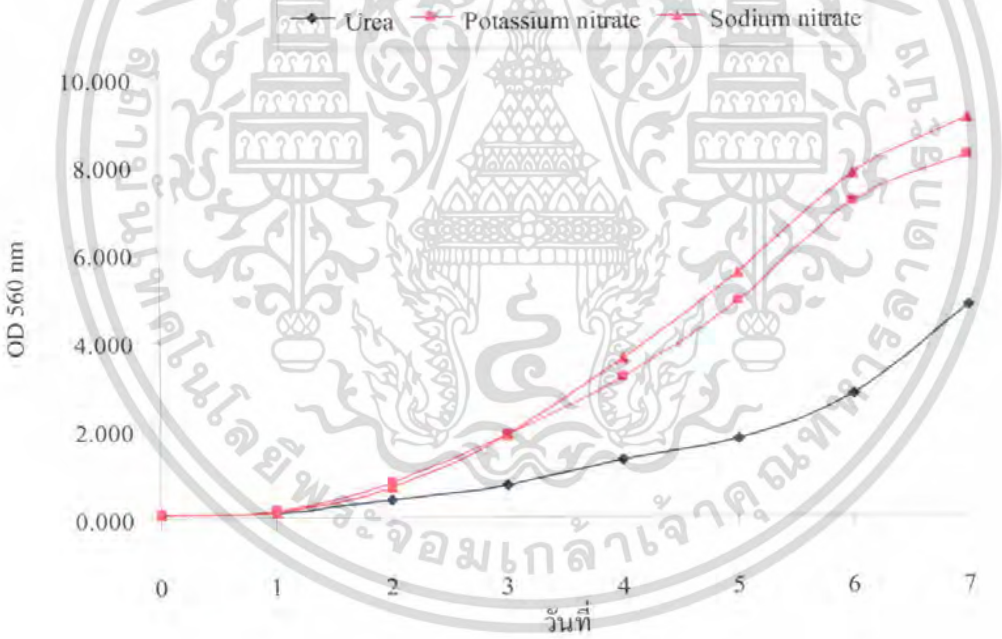
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 แหล่งไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ใส่เชื้อสาหร่ายตั้งต้นร้อยละ 10 ของปริมาณอาหาร 135 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที และมีการให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ เพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน โดยทดลองแปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย (urea) โปตัสเซียมไนเตรท (potassium nitrate) และ โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate) 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า โซเดียมไนเตรท มีการเจริญที่ดีสุดคือ มีค่าการดูดกลืนแสง 9.010 (รูปที่ 4.9) มีปริมาณเซลล์ 31.2 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.10) น้ำหนักแห้ง 4.3433 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11) รองลงมาโปตัสเซียมไนเตรท มีค่าการดูดกลืนแสง 8.137 มีปริมาณเซลล์ 29.2 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักแห้ง 4.0478 กรัมต่อลิตร และอันดับสุดท้ายคือ ยูเรีย มีค่าการดูดกลืนแสง 4.767 มีปริมาณเซลล์ 13.7 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักแห้ง 2.1311 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย เจริญในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรท และ โปตัสเซียมไนเตรท มีค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกันมาก โดยสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรท มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง คือ 0.7900 มิลลิกรัมต่อกรัม (รูปที่ 4.12) รองลงมา คือ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลายที่เลี้ยงในอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรทและยูเรีย ซึ่งผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 0.7211 และ 0.5054 ตามลำดับ ซึ่งจากการปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทมีปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุด ซึ่งแตกต่างกับอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรท และยูเรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย สามารถใช้โซเดียมไนเตรทได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเลือกโซเดียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนเนื่องจากมีการเจริญและปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด การที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่ต่ำในยูเรียนั้น เป็นเพราะว่าสาหร่ายเจริญในสภาวะที่เหมาะสมจึงสร้างเอมไซม์ยูเรียอะมิโดไลเอส (urea amidolyase) มาย่อยสลายยูเรียให้เป็นแอมโมเนียทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น (Chin และคณะ, 2007) สาหร่ายสามารถใช้ยูเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่ก็มีขีดจำกัด เพราะยูเรียที่มากเกินไปเมื่อสลายตัวเป็นแอมโมเนียมากๆ ก็จะเป็นภัยต่อสาหร่ายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายนั้นๆ ว่าเหมาะสมกับปริมาณความเข้มข้นยูเรียเท่าใด (Alberto และคณะ, 2008) Shi และคณะ, 1999 ได้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella protothecoides* มีการผลิตลูทีน โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ โปตัสเซียมไนเตรท แอมโมเนียม และยูเรีย พบว่าสาหร่าย *Chlorella protothecoides* สามารถเจริญได้ตามปกติและให้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 18.4 18.7 และ19.6 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณลูทีนสูงสุดเป็น 77.43 68.42 และ 83.81 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในการเพาะเลี้ยงนั้นต้องมีการจำกัดสภาวะของค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วย โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน

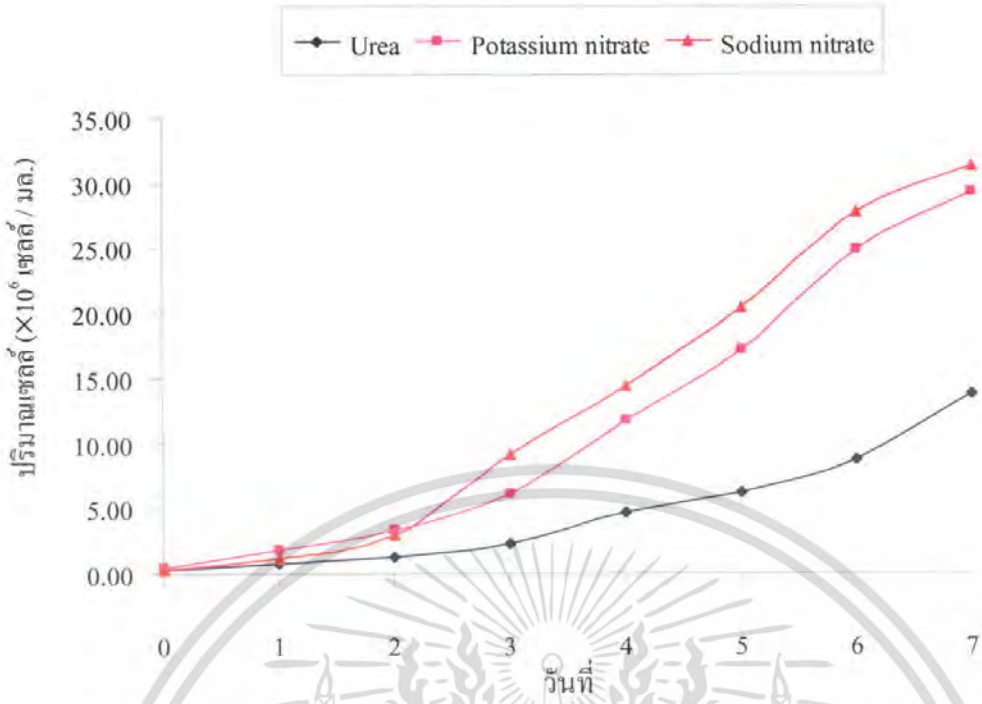
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่มีการเติมยูเรียจำเป็นต้องปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างด้วย ต้องปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้มีค่าน้อยกว่า 4.0 จึงจะมีน้ำหนักแห้งและปริมาณลูทีนสูงสุดเป็น 19.6 กรัมต่อลิตร และ 83.81 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่มีการเติมแอมโมเนียมต้องมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างมากกว่า 9.0 จึงมีนำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลูทีนสูงสุดเป็น 18.9 กรัมต่อลิตร และ 68.42 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในอาหารที่มีไนเตรทสามารถเพาะเลี้ยงได้โดยไม่จำกัดสภาวะของค่าความเป็นกรดเป็นด่างจึงจะส่งผลมีนำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลูทีนสูงสุดเป็น18.4 กรัมต่อลิตร และ 77.43 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าสาหร่าย *Chlorella protothecoides* สามารถเจริญได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของไนเตรทหรือยูเรียเป็น 2.0 กรัมต่อลิตร Abe และคณะ (2007) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Coelastrella striolata* var. *multistriata* พบว่าใช้แหล่งไนโตรเจนคือโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สาหร่ายมีการเจริญดีที่สุด และผลิตแคโรทีนอยด์ แอสตาแซนธิน และเบต้า-แคโรทีน ได้ 47.5 1.5 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ

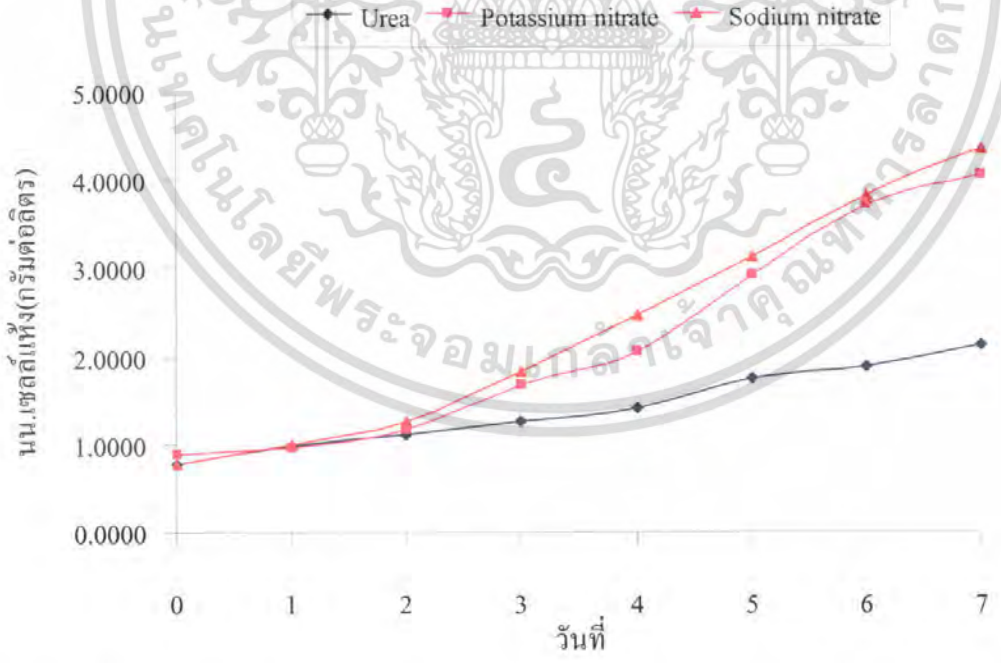


รูปที่ 4.9 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน(1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท และ ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

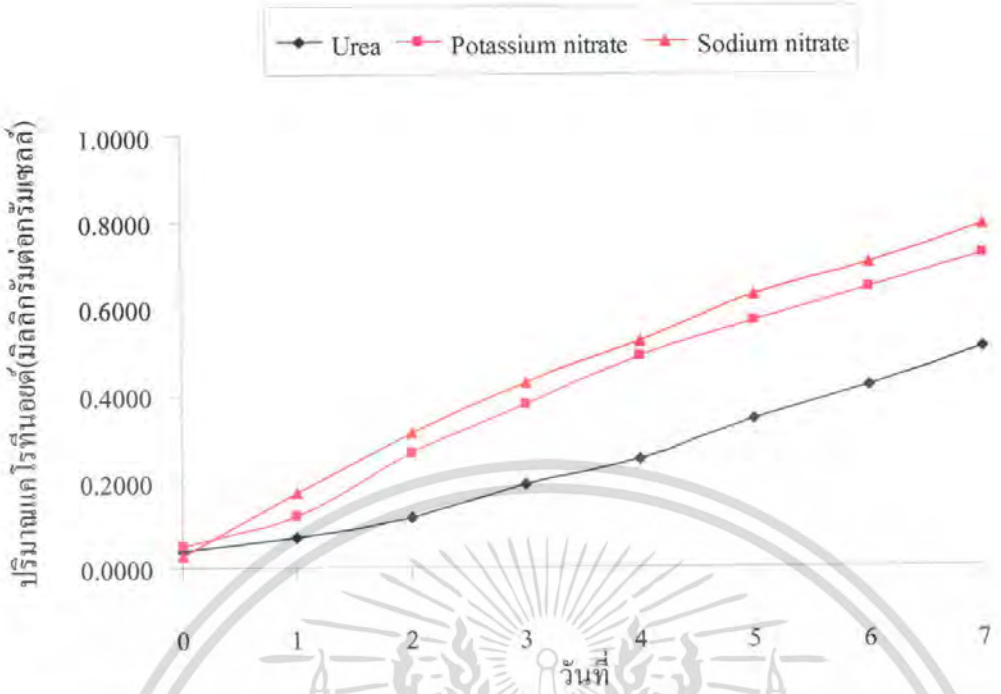


รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์



รูปที่ 4.11 น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสซียมไนเตรท ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้แก่ โซเดียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท ยูเรีย ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลายที่มีแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ในวันที่ 7 ของการทดลอง

แหล่งไนโตรเจน (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)
ยูเรีย	0.5054^{c}
โปตัสเซียมไนเตรท	0.7211^{b}
โซเดียมไนเตรท	0.7900^{a}

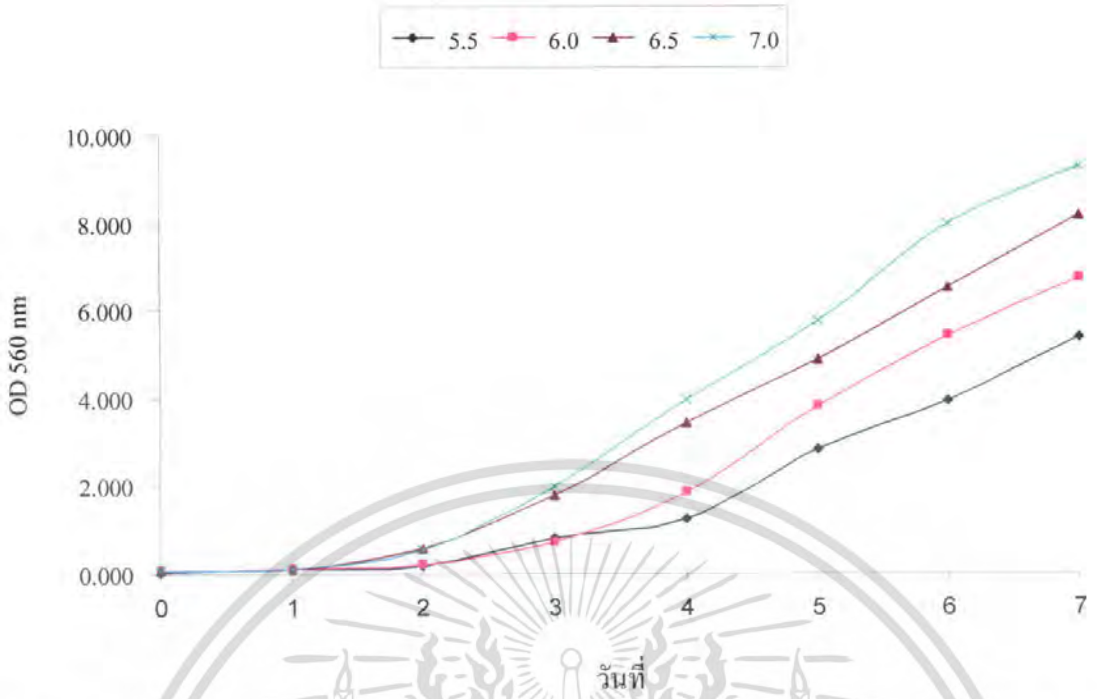
หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับที่ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

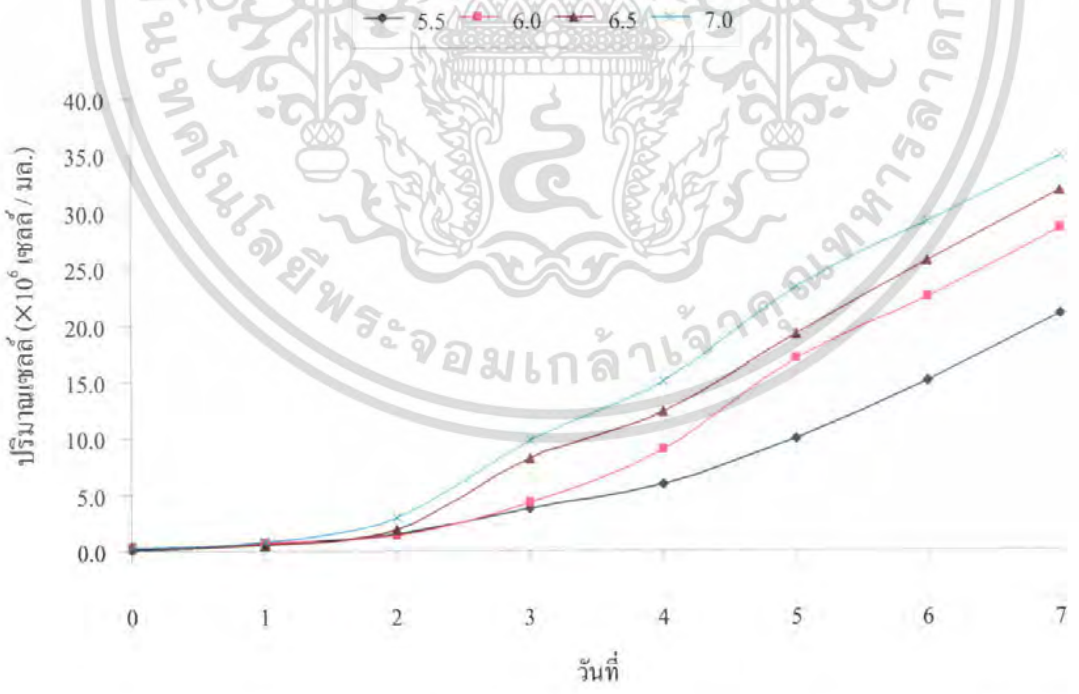
4.2.3 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย ทำการเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่หัวเชื้อตั้งต้นร้อยละ10 ของปริมาณอาหาร 135 มิลลิลิตรโดยแปรผันความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที และมีการให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย มีการเจริญสูงที่สุด และสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 มีค่าการดูดกลืนแสง 9.270 (รูปที่ 4.13) มีปริมาณเซลล์ 34.8 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.14) น้ำหนักแห้ง 4.5378 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.15) และปริมาณแคโรทีนอยด์ได้ 0.8691 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ (รูปที่ 4.16) รองลงมาคือความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเป็น 6.5 6.0 และ 5.5 ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 0.7512 0.6862 และ 0.5558 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.4) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ (Sarada และคณะ, 2002) พบว่าอัตราการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Dunaliella* sp. จะมีมากในช่วงของความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0-8.0 และมีอัตราการเจริญต่ำที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.0 สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 6.5-8.0 ถ้าค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงเกิน 8.0 หรือต่ำกว่า 6.45 อัตราการเจริญจะลดลง (Liu และคณะ, 2006) ศึกษายีสต์ *Phaffia rhodozyma.* พบว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนธิน คือ 6.9 และ *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202 มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนธินคือ 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

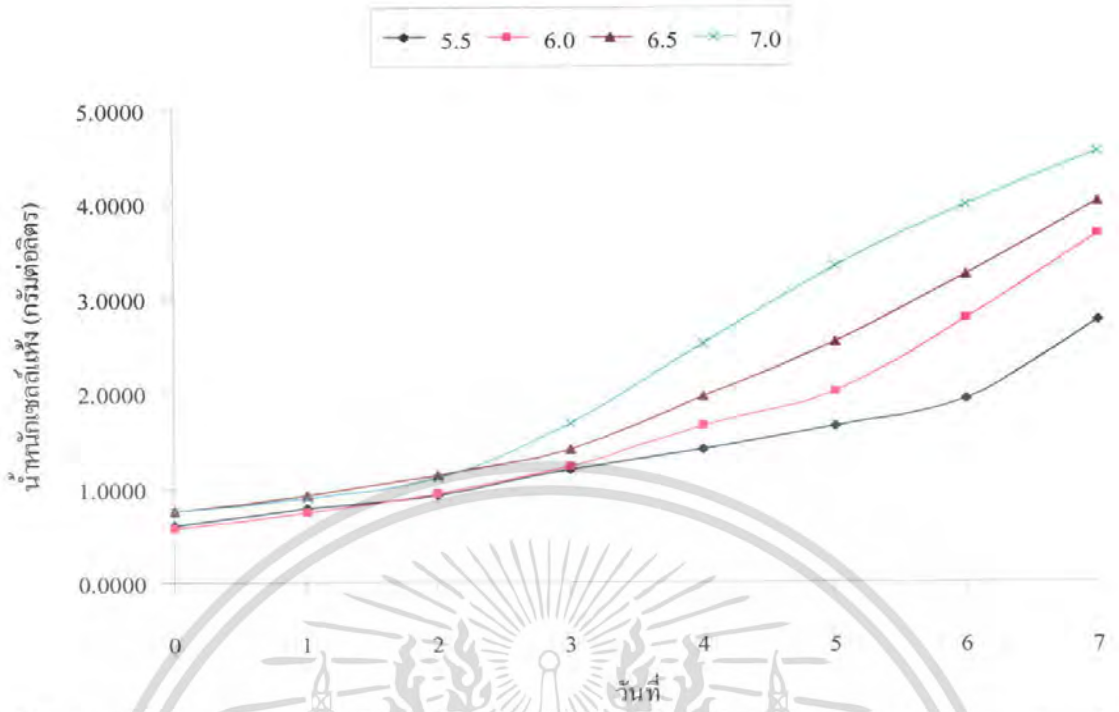


รูปที่ 4.13 การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

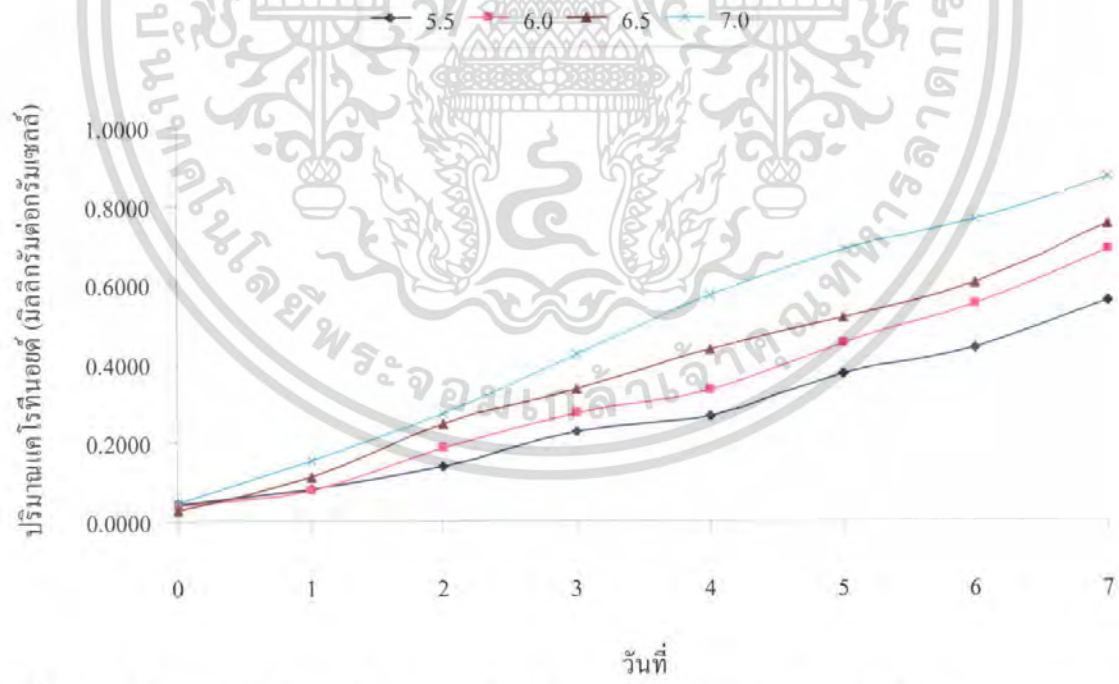


รูปที่ 4.14 จำนวนเซลล์ ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์



รูปที่ 4.16 ปริมาณแคโรทีนอยด์ ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ความเข้มแสง 3500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ผลิตได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ในวันที่ 7 ของการทดลอง

ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)
5.5	0.5558^{c}
6.0	0.6882^{b}
6.5	0.7512^{b}
7.0	0.8691^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย พบว่า สาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีที่สุดในวันที่ 7 ของทดลองโดย *Chlorella* sp. P47011 เจริญได้ดีที่สุด มีปริมาณเซลล์ 33.8 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งได้ 4.7456 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแคโรทีนอยด์ 0.5116 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และสาหร่าย สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย มีปริมาณเซลล์ 29.5 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.0333 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.7433 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์ของ *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย มากกว่า *Chlorella* sp. P47011 การทดลองจึงเลือก *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย มาทดลองต่อไป

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ในสูตรอาหาร N-8 ดัดแปลง ที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร พบว่า มีปริมาณเซลล์ 29.2 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.1278 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.7472 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ แหล่งไนโตรเจน คือโซเดียมไนเตรท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรมีปริมาณเซลล์ 31.2 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.3433 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.7900 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0 พบว่า มีการเจริญดีที่สุดคือ ปริมาณเซลล์ 34.8 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.5378 กรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.8691 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาให้นานประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อหาค่าการการเจริญสูงสุดของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย และเพื่อให้ทราบวันที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด
2. จากศึกษาการเปรียบเทียบ แหล่งไนโตรเจน พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย มีการเจริญที่แตกต่างกัน จึงควรศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆเพิ่มเติมเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกอร จารุจารีต. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า คุณทหารลาดกระบัง.

กาญจนกาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 101-102.

กิดานันท์ มลิทอง. 2530. คลอเรลลา พืชธรรมชาติที่ทรงคุณค่าทางยา. เพชรสยามการพิมพ์

โฆษิต ศรีภูธร. การศึกษาการเจริญเติบโตและการสะสม β-Carotenoid *Dunaliella salina* 1197 เลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในบ่อกลางแจ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2538. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 407 น.

ธิดา เพรชมณี มาวิทย์ อัศวอารีย์ และ สุจินต์ บุญช่วย. 2536. ความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงไรแดงด้วย *Chlorella* ในภาคใต้. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2536 กรมประมง : 491-496.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. น. 237-260.

ปาจารีย์ อินทองคำ พงศ์อนันต์ คงดารา และวนิดา พนายิ่งไพศาล. 2540. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Chlorella* sp. โครงงานพิเศษระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ผุสดี ศรีพยัตต์. 2522. การเลี้ยงและเก็บรักษาแพลงก์ตอนพืชทะเลที่อุณหภูมิต่ำ. รายงานวิชาการที่ สจ/22/6. สถานีวิจัยประมงทะเล กรมประมง. 8 น.

ลัดดา วงต์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 53-54.

มาวิทย์ อัศวอารีย์ และธิดา เพชรมณี. 2534. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของคลอเรลลาในห้องปฏิบัติการ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2534. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งกรมประมง. 14 น.

วิสัย วงศ์สายปิ่น. 2536. สาหร่ายเซลล์เดียวอาหารจากแสงตะวัน. สำนักพิมพ์รวมทรรศน์ กรุงเทพมหานคร.

วีนา ชูโชติ. 2542. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มสาหร่าย *Chlorella* sp. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ 31 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธัญญา ชวเจริญพันธ์ เสาวภา อาศน์ศิลารัตน์ อารยา วงศ์นโรดม. 2546. การชักนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อ *Aspergillus fumigatus* เพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. โครงงานพิเศษระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. 2536. เล่มที่ 1 น. 20-33. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

สุนันท์ เทศเพ็ญ. 2523. อิทธิพลของคุณภาพแสงต่อปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus acutus* c76-3a. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 68 น.

สุนีย์ สุวภีพันะ. 2524. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว. วารสารการประมง, 34 (3), 309-324.

Abe, K., Hattori, H. and Hirano, M. 2007. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. Food Chemistry, 100, 656–661.

Alberto, S.C., Thomas, H.M., Augusto, A., Juan, I.M., Jose, A.D. and Antonio V. 2008. An inhibitor of urease activity effectively reduces ammonia emissions from soil treated with urea under Mediterranean conditions. Agriculture. Ecosystems and Environment , 126, 243–249.

Atthasampunna, P. 1995. TISTR Cultures collection fifth edition. Bangkok MIRCEN. Thailand institute of scientific and technological research Bangkok. Thailand.

Bindu, S., Somashekar, D. and Joseph, R. 1998 .A comparative study on permeabilization treatments for in situ determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. Letters in Applied Microbiology, 27, 336-340.

Britton, G. 1983.Carotenoids. 61-68. in Miller, L. P. 1982. The biochemistry of Natural Pigments. Van Nastrand : Reinhold Company.

Campo, J.A.D., Moreno, J., Rodguez, H., Vergas, M.A., Rivas, J., and Guerrero, M.G. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. Journal of Biotechnology, 76, 51-59.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chin, S.S., Lim, M.T., Ken, C. and Fane, G.A. 2007. Factors affecting the performance of a low-pressure submerged membrane photocatalytic reactor. Chemical Engineering Journal, 130, 53–63.

Fábregas, J., Domingue, Z.A. and Regueiro, M.A. 2000. Opimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalgae *Haematococcus pluvialis* Appiled Microbiology. Biotechnology, 53 (5), 530-535.

Frossberg, A., Lingen, C., Ernster, L. and Linberg, O. 1959. Modification of X-irriation syndrome for lycopene. Experimental Cell Research. 6 : 7

Gerald, J.S. 1973. Labolatory Exercise in Genetics. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. pp. 424-427.

Grü newald, K., Hirschberg, J. and Hagen, C. 2001. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. Journal of Biological Chemistry, 276, 6023-6029.

Jyonouchi, H., Sun, S. and Gross, M. 1995. Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, enhances in vitro immunoglobulin production in response to a T-dependent stimulant and antigen. Nutrition and Cancer, 23, 171-183.

KMITT. 1996. Labolatory document: A regional workshop on mass cultivation of microalgae. Bangkok: King Mongkut's Institute of Technology.

Lilly, V.G., Barnett, H.L. and Krause, R.F. 1960. The production of carotene by *Choanephora cucurbitarum*. W. Va. Agricultural Experimcnt Station General Series Bull. 441 T.

Liu, Y.S., Wu, J.Y. and Ho, K.p. 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. Biochemical Engineering Journal ,27, 331–335.

Lorenz, R.T., and Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology, 18, 160-167.

Moore, A.L., Joy, A., Tom, R., Gust, D. and Moore, T.A. 1982. Photoprotection by carotenoids during photosynthesis : Motional dependence of intramolecular energy transfer. Science, 216 , 982-984.

Munzel, K. and Fuller, W. 1969. Coloration of fatty suppositories with carotenoid-dyes. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 44(4), 208-237.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nelis, HJ. and DeLeenheer, AP. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in food and feeds. Journal of Applied Bacteriology, 70, 181-191.

Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., and Abalde, J. 2000. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. Journal of Applied Phycology, 12, 553-556.

Pelah, D., Sintov, A., and Cohen, E. 2004. The effect of saltstress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofringiensis* grown under limited light intensity. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 483-486.

Perrier, V., Dubreucq, E. and Galzy, P. 1995. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. Archives of Microbiology, 164, 173-179.

Prakash, B. and Gadre, R.V. 2001. Production of β-carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. Bioresource Technology, 76, 53-55.

Rau, W. 1976. Photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. Pure and Applied Chemistry, 57(5) , 77-784.

Rawls, H. R., and Van Santen, P. J. 1970. Possible role for singlet oxygen he initiation of fatty acid autooxidation. Journal of the American Oil Chemists Society, 47, 121-125.

Reid, G. K. and Wood, R. A. 1976. Ecology of inland water and estuarine 2d ed., D. Van Nostrand Co., New York. 485p.

Sarada, R., Tripathi U. and Ravishanker, G.A. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry, 37, 623–627.

Schroeder, H., Michiyoshi, W. and Hirokazu, I. 2008. The *Neurospora crassa* UVS-3 epistasis group encodes homologues of the ATR/ATRIP checkpoint control system. DNA repair 7. 213–229.

Shi, X.M., Liu, H.J., Zhang, X.W. and Chen, F. 1999. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* of various glucose concentrations in heterotrophic cultures. Process Biochemistry , 34, 341-347.

Shirota, A. 1996. The Plankton of South Viet - Nam. Freshwater and marine plankton. Japan, overseas technical cooperation agency. 426 p.

Sun, N., Lee, S. and Song, K.B. 2004. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation International Journal of Food Microbiology, 94, 263– 267.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Surai, A. P., Surai, P. F., Steinberg, W., Wakeman, W. G., Speake, B. K. and Sparks, N. H. C. 2003. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. British Poultry Science, 44, 612-619.

Wither, N.W. and Hexo, F.T. 1978. Isolation and characterization of carotenoid-rich lipid globuies from *Peridinium foliaceun*. Plant physiology, 62 , 36-39.

Zhang, D.H. and Lee, Y.K. 2001. Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. strain MA-1. Applied Microbiology and Biotechnology, 55, 537-540.

http://www.chm.bris.ac.ukmotmcarotenoidscarotenoids.htm

http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/phyto-outdoor/chlorella.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ตารางแสดงข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ก.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย

วันที่	*Chlorella* sp. P47011				*Chlorella* sp. P47011 M2-2			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแค-โรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแค-โรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)
0	0.057	0.3	0.7533	0.0311	0.069	0.3	0.7111	0.0331
1	0.146	1.4	1.2433	0.0692	0.120	1.3	0.7878	0.1014
2	0.637	3.0	1.8267	0.1314	0.516	2.6	1.2500	0.2620
3	3.610	7.1	2.6956	0.1984	1.641	6.3	1.6067	0.4162
4	5.567	14.0	3.3144	0.2469	4.282	11.0	2.1489	0.5465
5	6.860	22.7	3.7822	0.3219	5.190	18.7	2.7178	0.5922
6	8.677	28.5	4.3011	0.4334	7.022	26.0	3.4811	0.6470
7	11.047	33.8	4.7456	0.5116	8.100	29.5	4.0333	0.7433

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

วันที่	5 กรัม				10 กรัม			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)
0	0.075	0.2	0.6989	0.0303	0.055	0.3	0.8522	0.0298
1	0.091	1.4	0.9756	0.0752	0.186	1.9	1.2744	0.0719
2	0.251	2.7	1.1389	0.1195	0.936	3.7	1.6500	0.2173
3	0.740	5.4	1.4322	0.2112	2.997	9.6	2.1311	0.3680
4	1.620	9.7	1.7244	0.2676	4.736	18.0	2.6244	0.4829
5	2.517	13.7	1.9356	0.3589	5.903	23.8	3.2478	0.5722
6	3.547	16.8	2.3144	0.4180	7.280	27.3	3.8056	0.6460
7	4.567	21.8	2.6311	0.4776	8.053	29.2	4.1278	0.7472

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 (ต่อ) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

วันที่	15 กรัม				20 กรัม			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)
0	0.078	0.3	0.9156	0.0288	0.064	0.2	0.7778	0.0370
1	0.165	1.8	1.2278	0.0642	0.150	1.4	1.0122	0.0828
2	0.668	2.7	1.5456	0.1912	0.795	2.7	1.2344	0.1648
3	2.793	9.7	1.8367	0.3248	2.323	8.4	1.5822	0.2716
4	4.190	14.7	2.1889	0.4517	3.740	12.7	1.8544	0.4042
5	5.240	19.8	2.6289	0.5270	5.010	17.3	2.2578	0.4695
6	6.430	23.8	3.3567	0.5976	6.173	22.3	2.9300	0.5602
7	7.627	26.8	3.9567	0.6400	7.157	25.7	3.4478	0.6077

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 (ต่อ) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

วันที่	25 กรัม			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อกรัมเซลล์)
0	0.074	0.2	0.7967	0.0419
1	0.178	1.6	1.1056	0.0871
2	0.699	2.6	1.2744	0.1593
3	1.950	8.1	1.5067	0.2362
4	3.510	12.2	1.9678	0.3314
5	4.408	16.3	2.2800	0.4310
6	5.520	20.8	2.8556	0.4757
7	6.800	24.5	3.2944	0.5846

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 โดยมีแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท

วันที่	ยูเรีย				โปตัสเซียมไนเตรท			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)
0	0.063	0.3	0.7767	0.0371	0.064	0.4	0.8756	0.0490
1	0.119	0.7	0.9700	0.0694	0.145	1.8	0.9611	0.1192
2	0.403	1.3	1.1111	0.1136	0.801	3.3	1.1700	0.2657
3	0.707	2.2	1.2611	0.1910	1.843	6.0	1.6800	0.3762
4	1.297	4.7	1.4100	0.2479	3.137	11.7	2.0422	0.4848
5	1.740	6.2	1.7567	0.3411	4.860	17.2	2.9167	0.5681
6	2.750	8.7	1.8833	0.4183	7.108	24.8	3.7078	0.6435
7	4.767	13.7	2.1311	0.5054	8.137	29.2	4.0478	0.7211

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 (ต่อ) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 โดยมีแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท

วันที่	โซเดียมไนเตรท			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อกรัมเซลล์)
0	0.063	0.2	0.7711	0.0250
1	0.116	1.2	0.9900	0.1720
2	0.688	2.9	1.2522	0.3114
3	1.874	9.1	1. 8144	0.4240
4	3.563	14.3	2.4644	0.5229
5	5.500	20.3	3.1233	0.6267
6	7.750	27.7	3.8244	0.6993
7	9.010	31.2	4.3433	0.7900

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 โดยมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0

วันที่	pH 5.5				pH 6.0			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อกรัมเซลล์)	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อกรัมเซลล์)
0	0.036	0.2	0.6056	0.0423	0.055	0.3	0.5733	0.0369
1	0.084	0.5	0.7856	0.0801	0.103	0.6	0.7333	0.0753
2	0.184	1.5	0.9222	0.1366	0.186	1.3	0.9378	0.1821
3	0.797	3.7	1.1911	0.2267	0.699	4.3	1.2189	0.2709
4	1.253	5.9	1.4067	0.2637	1.857	9.0	1.6422	0.3309
5	2.827	9.8	1.6433	0.3704	3.783	17.0	2.0100	0.4481
6	3.910	15.0	1.9267	0.4362	5.417	22.3	2.7756	0.5487
7	5.363	20.8	2.7622	0.5558	6.707	28.3	3.6633	0.6862

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 (ต่อ) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 โดยมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 6.0 6.5 และ 7.0

วันที่	pH 6.5				pH 7.0			
	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)	OD_{560}	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ เซลล์ต่อ มล.)	นน.แห้ง (กรัม ต่อ ลิตร)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มก. ต่อ กรัมเซลล์)
0	0.063	0.2	0.7478	0.0266	0.064	0.3	0.7600	0.0450
1	0.116	0.5	0.9256	0.1098	0.101	0.8	0.8867	0.1530
2	0.562	1.9	1.1322	0.2441	0.530	2.9	1.1056	0.2733
3	1.773	3.1	1.3989	0.3337	1.983	9.8	1.6778	0.4215
4	3.430	7.3	1.9511	0.4327	3.963	15.0	2.5089	0.5724
5	4.873	16.8	2.5322	0.5131	5.733	23.3	3.330	0.6868
6	6.497	25.5	3.2411	0.6004	7.967	29.0	3.9689	0.7614
7	8.163	32.8	4.0044	0.7512	9.270	34.8	4.5378	0.8691

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 มีความแตกต่างกับ สาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05)

ANOVA

mg/g cell

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.122	1	.122	242.256	.000
Within Groups	.002	4	.001		
Total	.124	5			

ตารางที่ ข.2 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 มีความแตกต่างของความความเข้มข้นของกลูโคส 5 10 15 20 และ 25 กรัม ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05)

ANOVA

mg/g cell

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.114	4	.028	26.940	.000
Within Groups	.011	10	.001		
Total	.124	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: mg/g cell

	(I) 1=5 g,2=10 g,3 g,4=20 g,5=25	(J) 1=5 g,2=10 g, g,4=20 g,5=25	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.2696000*	0265183	.000	-.328687	-.210513
		3	-.1624000*	0265183	.000	-.221487	-.103313
		4	-.1301333*	0265183	.001	-.189220	-.071047
		5	-.1070667*	0265183	.002	-.166153	-.047980
	2	1	.2696000*	0265183	.000	.210513	.328687
		3	.1072000*	0265183	.002	.048113	.166287
		4	.1394667*	0265183	.000	.080380	.198553
		5	.1625333*	0265183	.000	.103447	.221620
	3	1	.1624000*	0265183	.000	.103313	.221487
		2	-.1072000*	0265183	.002	-.166287	-.048113
		4	.0322667	0265183	.252	-.026820	.091353
		5	.0553333	0265183	.063	-.003753	.114420
	4	1	.1301333*	0265183	.001	.071047	.189220
		2	-.1394667*	0265183	.000	-.198553	-.080380
		3	-.0322667	0265183	.252	-.091353	.026820
		5	.0230667	0265183	.405	-.036020	.082153
	5	1	.1070667*	0265183	.002	.047980	.166153
		2	-.1625333*	0265183	.000	-.221620	-.103447
		3	-.0553333	0265183	.063	-.114420	.003753
		4	-.0230667	0265183	.405	-.082153	.036020

*.The mean difference is significant at the .05 level.

DMRT

mg/g cell

	1=5 g,2=10 g,3=15 g,4=20 g,5=25	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan[a]	1	3	.477567		
	5	3		.584633	
	4	3		.607700	
	3	3		.639967	
	2	3			.747167
	Sig.		1.000	.074	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย โปตัสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05)

ANOVA

mg/g cell

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.132	2	.066	154.926	.000
Within Groups	.003	6	.000		
Total	.135	8			

LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: mg/g cell

	(I) 1 = Urea,2 = K,3	(J) 1 = Urea,2 = K,3	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.215667*	.016869	.000	-.25694	-.17439
		3	-.284600*	.016869	.000	-.32588	-.24332
	2	1	.215667*	.016869	.000	.17439	.25694
		3	-.068933*	.016869	.006	-.11021	-.02766
	3	1	.284600*	.016869	.000	.24332	.32588
		2	.068933*	.016869	.006	.02766	.11021

*.The mean difference is significant at the .05 level.

DMRT

mg/g cell

	1 = Urea,2 = K,3 = Na	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Duncan[a]	1	3	.50543		
	2	3		.72110	
	3	3			.79003
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 แสดงปริมาณของแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. P47011 M2-2 มีความแตกต่างของความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 6.0 6.5 และ 7.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05)

ANOVA

mg/g cell

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.154	3	.051	61.875	.000
Within Groups	.007	8	.001		
Total	.160	11			

LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: mg/g cell

	(I) 1=5.5,2=6.0,3=6.5,4=7.0	(J) 1=5.5,2=6.0,3=6.5,4=7.0	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.1303667*	.0234974	.001	-.184552	-.076182
		3	-.1954333*	.0234974	.000	-.249618	-.141248
		4	-.3133333*	.0234974	.000	-.367518	-.259148
	2	1	.1303667*	.0234974	.001	.076182	.184552
		3	-.0650667*	.0234974	.024	-.119252	-.010882
		4	-.1829667*	.0234974	.000	-.237152	-.128782
	3	1	.1954333*	.0234974	.000	.141248	.249618
		2	.0650667*	.0234974	.024	.010882	.119252
		4	-.1179000*	.0234974	.001	-.172085	-.063715
	4	1	.3133333*	.0234974	.000	.259148	.367518
		2	.1829667*	.0234974	.000	.128782	.237152
		3	.1179000*	.0234974	.001	.063715	.172085

*. The mean difference is significant at the .05 level.

DMRT

mg/g cell

	1=5.5,2=6.0,3=6.5,4=7.0	N	Subset for alpha = .05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	1	3	.555767			
	2	3		.686133		
	3	3			.751200	
	4	3				.869100
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

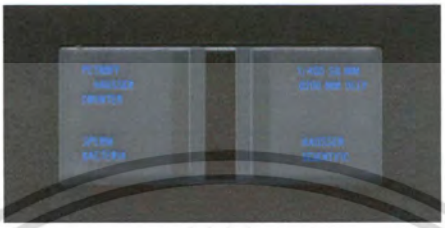
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

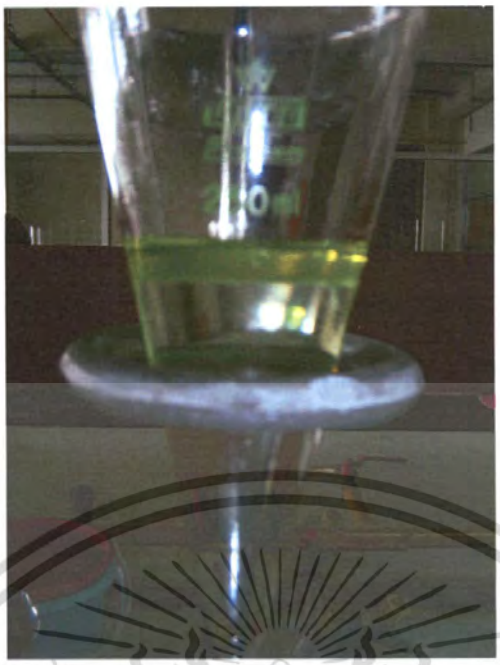
ภาพประกอบในการทดลอง



รูปที่ ค.1 สไลด์นับเซลล์ (Petroff – Hausser counting chamber)

รูปที่ ค.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

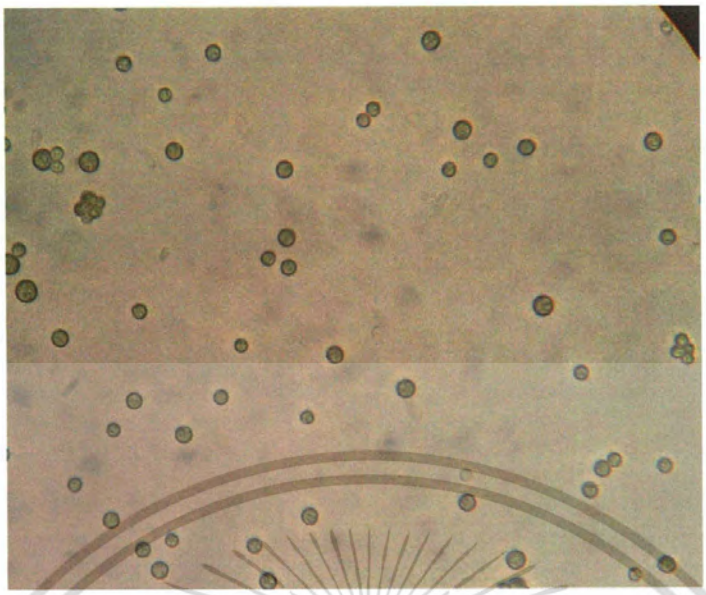
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.3 การสกัดแคโรทีนอยด์ในกรวยแยก

รูปที่ ค.4 แคโรทีนอยด์ที่ได้จากการสกัดคลอโรฟิลล์แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค. 5 *Chlorella* sp. P47011 M2-2 พันธุ์กลาย กำลังขยาย 400 X

รูปที่ ค.6 *Chlorella* sp. P47011 กำลังขยาย 400 X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้