รายงานการวิจัย

ผลของสภาวะเครียดต่อการผลิตแอสตาแซนทินของ *Haematococcus* sp.

Influence of stress on astaxanthin production by *Haematococcus* sp.

รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์วีนา ชูโชติ

นางสาวบุปผา จงพัฒน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2551

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัย

ผลของสภาวะเครียดต่อการผลิตแอสตาแซนทินของ *Haematococcus* sp.

Influence of stress on astaxanthin production by *Haematococcus* sp.

รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์วีนา ชูโชติ

นางสาวบุปผา จงพัฒน์

b00267994

RC00125

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2551

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานวิจัย ผลของสภาวะเครียดต่อการผลิตแอสตาแซนทินของ *Haematococcus* sp.

แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน) เงินงบประมาณ

ประจำปีงบประมาณ 2551

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 150,000บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 ถึง กันยายน 2551

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหาร 3 ชนิด คือ BB, BG-11 และ JMในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ พบว่า อาหารสูตร JM ให้ผลการเจริญดีที่สุด จากนั้นได้ศึกษาการเจริญโดยแปรผันปริมาณ วิตามินบี1 บี2 และไบโอติน จากการทดลองพบว่า อาหาร JM ดัดแปลงที่เติมวิตามินบี1 วิตามินบี2และไบโอติน 0.08, 0.08 และ 0.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับให้ปริมาณน้ำหนักแห้งสูงสุด 0.4092 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยง *Haematococcus* sp. ในอาหาร JM ดัดแปลงจนถึงระยะการเจริญคงที่ (12 วัน) จากนั้นจึงชักนำให้เกิดสภาวะเครียดโดยการเติมโซเดียมไนเตรต โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมอะซิเตต ผลการทดลองพบว่าอาหาร JM ดัดแปลงที่ไม่เติมโซเดียมไนเตรต โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมอะซิเตตให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด จากนั้นนำสาหร่าย *Haematococcus* sp. มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะแก่การเจริญในถังหมักแบบอากาศยกตัวและตามด้วยสภาวะเครียด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ผลการทดลองพบว่าในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงในสภาวะเครียดให้ผลผลิตแอสตาแซนทินสูงสุด 137.23 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ 2.8 X10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : *Haematococcus*, สาหร่ายขนาดเล็ก, แอสตาแซนทิน, สภาวะเครียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title Influence of stress on astaxanthin production by *Haematococcus* sp.
Researcher Assoc. Prof. Dr.Nuanphan Naranong
Department of Biology, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Abstract

The growth of *Haematococcus* sp. was studies under autotrophic batch cultivation in three media, BB, BG11 and JM. The JM provided the best condition for the algal growth. It was further studied at different levels of vitamin B1, B2 and biotin. The results showed that the highest yield of 0.4092 g L^{-1} (dry weight) was obtained from the modified JM medium with vitamin B1, B2 and biotin of 0.08, 0.08 and 0.08 gL^{-1}, respectively. Further studies, *Haematococcus* sp. were grown in this modified JM medium in to station phase and switched to astaxanthin induction conditions utilizing sodium nitrate, sodium chloride and sodium acetate. The result showed that the highest carotenoid yield was obtained from the modified JM medium without sodium nitrate, sodium chloride and sodium acetate. In airlift fermenter *Haematococcus* sp. was cultivated in the same condition, following by stress conditions, continuous temperature 25 ^{0}C and light intensity of 3500 luxs. The resulting astaxanthin yield was 137.23 mgL^{-1} and 2.8 X10^{5} cells L^{-1} on day 12.

Keywords : *Haematococcus*, microalgae, astaxanthin, induction condition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย เรื่องผลของสภาวะเครียดต่อการผลิตแอสตาแซนทินของ *Haematococcus* sp. และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาที่ให้ใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือต่าง ๆ ทำให้การทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วีนา ชูโชติ

นางสาวบุปผา จงพัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญรูป ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 1
1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 แอสตาแซนทิน 3
2.2 สาหร่าย *Haematococcus* sp. 4
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* 5
2.3.1 คาร์บอน 5
2.3.2 ไนโตรเจน 6
2.3.3 ฟอตเฟต 6
2.3.4 ความเข้มแสง 7
2.3.5 อุณหภูมิ 7
2.4 ปัจจัยที่กระตุ้นให้สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เกิดการสะสมแอสตาแซนทิน 8
2.4.1 ผลของแหล่งไนโตรเจน 8
2.4.2 ผลของความเค็ม 8
2.4.3 ผลของค่า pH 8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 9
3.1 สาหร่าย 9
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 9
3.3 วิธีการทดลอง 10
3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย *Haematococcus* sp. 10
3.3.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เหมาะสมต่อการเจริญ 10
3.3.3 การศึกษาผลของวิตามินต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp. 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 10
Haematococcus sp. ในสภาวะเครียดที่ขาดธาตุไนโตรเจน
3.3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....11
Haematococcus sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมคลอไรด์
3.3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....11
Haematococcus sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมอะซิเตต
3.3.7 ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.....11
ในถังหมักแบบอากาศยกตัว (air lift)
3.4 การวิเคราะห์.....11
3.4.1 การวัดการเจริญของสาหร่ายโดยการนับจำนวนเซลล์.....11
จากกล้องจุลทรรศน์
3.4.2 การวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....11
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมด.....12
3.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทิน (Trans-astaxanthin).....12
ในสารละลายแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 13
4.1 ผลการศึกษาหาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. 13
ที่เหมาะสมต่อการเจริญ
4.2 ผลการศึกษาผลของวิตามินต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.....14
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. 17
ในสภาวะเครียดที่ขาดธาตุไนโตรเจน
4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....19
Haematococcus sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมคลอไรด์
4.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....20
Haematococcus sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมอะซิเตต
4.6 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp.....21
ในถังหมักแบบอากาศยกตัว (air lift)
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 23
เอกสารอ้างอิง..... 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงโครงสร้างของแอสตาแซนทิน	3
2.2	วงจรชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*	4
4.1	ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร BG-11 JM และ BB ในวันที่ 8 ของการทดลอง	13
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร BG-11 BB และ JM	14
4.3	ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร	14
4.4	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง	15
4.5	ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน	15
4.6	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร	16
4.7	ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร และไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร	16
4.8	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร และไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง	17
4.9	ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 0, 0.08, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร	18
4.10	ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่มีวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมไนเตรท เข้มข้น 0, 0.08, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร	18
4.11	ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 2 4 8 16 และ 32 กรัมต่อลิตร	19
4.12	ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่มีวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 2 4 8 16 และ 32 กรัมต่อลิตร	20
4.13	ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร เติมโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0 2 4 6 8 10 และ 12 กรัมต่อลิตร	20
4.14	ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่มีวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0 2 4 8 และ 16 กรัมต่อลิตร	21
4.15	จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแอสตาแซนทิน และค่าพีเอชจากการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักแบบอากาศยกตัวในอาหาร JM ดัดแปลงที่มีวิตามินบี 1 วิตามินบี2 และไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.08, 0.08 และ 0.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไม่เติมโซเดียมอะซิเตต และโซเดียมคลอไรด์	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แอสตาแซนทิน (3, 3′ - dyhydroxy - β - β - carotene – 4, 4′ dione) เป็นสารพวกคีโตแครีนอยด์ที่ถูกออกซิไดซ์มาจากเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารต้นตอ (precursor) ของวิตามินเอ มีประสิทธิภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ดีกว่าเบต้าแคโรทีนและวิตามินอี (Johnson และ An, 1991) และแอสตาแซนทินเป็นรงควัตถุที่มีสีส้มแดงจึงเป็นสารสีที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีก โดยเติมลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อให้ผิวหนังและกล้ามเนื้อมีสีสวยงาม เช่น ปลาเทราท์ ปลาแซลมอน กุ้งกุลาดำ ปลากระพงแดง ปลานิลสีแดง และปลาสวยงามหลายชนิด เช่น ปลาทอง ปลาคาร์พ และในกลุ่มปลาหมอสี ส่วนในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกนิยมผสมในอาหารเพื่อเร่งสีของไข่แดง (Lorenz และ Cysewski, 2000)

แหล่งของแอสตาแซนทินส่วนใหญ่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมีซึ่งมีข้อเสียคือเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์จะดูดซึมได้ไม่ดีเท่ากับแอสตาแซนทินจากธรรมชาติ และเนื่องจากเป็นสารสังเคราะห์จึงอาจเป็นผลเสียต่อผู้บริโภคได้ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแอสตาแซนทิน ได้ เช่น แบคทีเรีย *Mycobacterium lacticola, Agrobacterium aurantiacum* (Yokoyama และคณะ, 1994) และ *Brevibactrium* sp. รา *Peniophera* sp. ซึ่งให้ผลผลิตได้ในระดับต่ำ (Johnson และ An, 1991) ยีสต์ Phaffia rhodozyma ผลิตได้ 3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Johnson and Schroeder, 1996) สาหร่าย *Chlorococcum* sp. ผลิตได้ 5.8 – 6.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ *Haematococcus* sp. ผลิตได้ 50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Johnson และ An, 1991) ราคาของแอสตาแซนทินสูงถึงกิโลกรัมละ 2500 – 3000 เหรียญสหรัฐ และมีมูลค่าการซื้อขายประมาณ 252 ล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งร้อยละ 95 ของทั้งหมดเป็นแอสตาแซนทินสังเคราะห์ แต่ปริมาณความต้องการแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้นในทุกปี (Lorenz and Cysewski, 2000 ; Marz, 2005)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp.
2. เพื่อศึกษาหาสภาวะเครียดที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *Haematococcus* sp. ผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น
3. เพื่อศึกษาการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในระดับถังหมักแบบ airlift

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. การวิจัยนี้ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.
2. หาสภาวะเครียดที่เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้สาหร่ายสร้างแอสตาแซนทินเพิ่มให้
3. เพิ่มปริมาณการผลิตสาหร่ายและแอสตาแซนทินในระดับถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นที่ 1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะที่เหมาะสม

1.1 การคัดเลือกสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เหมาะสมต่อเจริญและการผลิตแอสตาแซนทิน

นำหัวเชื้อสาหร่าย โดยเพาะเลี้ยงสาหร่าย ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรโบลด์และอาหารสูตรเลี้ยง *Haematococcus* sp. ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ โดยมีช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสง 12 : 12 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 12 วัน วัดการเจริญด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสตาแซนทิน

1.2 ศึกษาผลของวิตามินต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทิน

นำหัวเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 1.1 เปรียบเทียบระหว่างอาหารสูตรอาหารที่เติมวิตามิน B1 , B12 และ biotin ในสภาพการเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 1.1 วัดการเจริญด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทิน

1.2 ศึกษาระดับความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทิน

นำหัวเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรที่ดีที่สุด 1.2 เปรียบเทียบความเข้มแสง 3 ระดับ คือ 3500 5000 และ 8000 ลักซ์ ในสภาพการเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 1.1 วัดการเจริญด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทิน

ขั้นที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาพเครียด เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายโดยการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรอาหารและความเข้มแสงที่ดีที่สุดจากการทดลองขั้นที่ 1 มาเพาะเลี้ยงในสภาพความเครียด

2.1 การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

2.2 เกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ วัดการเจริญด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสตาแซนทิน

ขั้นที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักแบบ air lift ขนาด 2 ลิตร

3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะที่เหมาะสมนำหัวเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในถังหมักด้วยสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองขั้นที่ 1 จนถึงระยะ stationary phase วัดการเจริญนับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแอสตาแซนทิน

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะเครียด

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักจนถึงระยะ stationary phase จากนั้นจึงชักนำให้เกิดความเครียดที่ได้ จากการทดลองขั้นที่ 2 วัดการเจริญด้วยวิธี นับจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทิน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

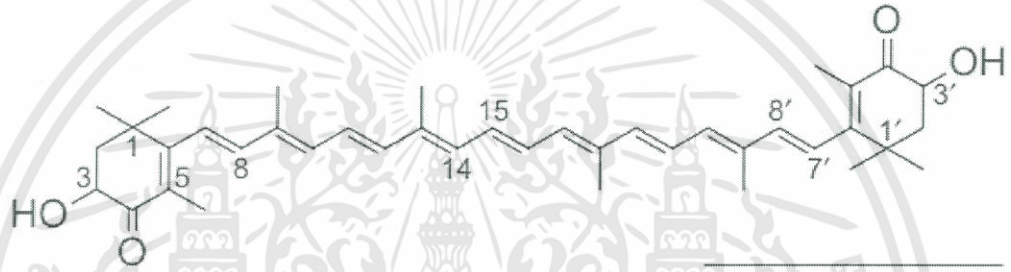
1. ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* sp.
2. ทราบถึงปัจจัยที่อีกนำให้สาหราย *Haematococcus* ผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น
3. ทราบถึงสภาวะการเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus* ในระดับถังหมักแบบ airlift

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอสตาแซนทิน

แอสตาแซนทิน (astaxanthin) หรือ 3,3'- dihydroxy-β-carotene 4-4'-dione เป็นสารพวกคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) ที่ถูกออกซิไดซ์มาจากเบต้าแคโรทีน (β-carotene) มีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากไอโซพีนอยด์ 8 โมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว โดยแต่ละไอโซพีนอยด์เกิดจากคาร์บอนเชื่อมต่อกัน 5 อะตอมด้วยพันธะเดี่ยวสลับคู่และแต่ละปลายทั้งสองข้างมีอะตอมของคาร์บอนมาเกาะเรียกว่า ionone ring และมีการเพิ่มออกซิเจนไฮดรอกซิล (OH) เข้าไปทั้งสองปลาย C-3 และ C-3' ของ ionone ring (chiral enter) (Lorenz และ Cysewski, 2000) ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของแอสตาแซนทิน (Lorenz และ Cysewski, 2000)

ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาแอสตาแซนทินมีการซื้อขายในตลาด ในรูปแบบของสีผสมอาหาร อาหารของสัตว์ปีกและสัตว์น้ำ ในตลาดโลกมีมูลค่าการซื้อขายมากกว่า 250 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี (Nguyen, 2013) ราคาเฉลี่ย 2,500 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม (Lee คณะ, 2015) ในปัจจุบันมีการการนำมาใช้บริโภคในมนุษย์ ในรูปแบบของสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถต้านการเกิดมะเร็ง ลดการอักเสบ ช่วยลดอาการของผู้ป่วยโรคเบาหวาน และประโยชน์ทางด้านสุขภาพต่างๆอีกมาก ด้วยประโยชน์และประสิทธิภาพต่อสุขภาพเหล่านี้จึงได้มีการคาดการณ์ว่า มูลค่าทางการตลาดที่อาจจะเกิดขึ้นในปี 2020 จะมีมูลค่าประมาณ 1.5 พันล้านเหรียญสหรัฐโดยเกิดจากมนุษย์เป็นผู้บริโภคมากกว่าครึ่ง จากเหตุผลข้างต้นความต้องการผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในตลาดที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสาหร่ายและยีสต์จึงได้รับความสนใจ แต่ราคาโดยรวมยังคงสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ด้วยสารเคมี (Guerin และคณะ, 2003)

ปัจจุบันแอสตาแซนทินสังเคราะห์ของบริษัท BASF และ Hoffman-La Roche จากประเทศสวิตเซอร์แลนด์เป็นผู้ผลิตรายใหญ่ (Nguyen, 2013) การผลิตแอสตาแซนทินสังเคราะห์สามารถทำได้หลายวิธี แต่ผลที่ได้จะมีสเตอริโอไอโซเมอร์ที่แตกต่างจากธรรมชาติ กรรมวิธีการสังเคราะห์ได้มีการปรับปรุงและพัฒนา โดยเฉพาะวิธีการที่เก่าแก่ที่สุดและยังคงนิยมใช้อย่างแพร่หลายซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Witting reaction ที่เกิดจากเกลือสองชนิดคือ ฟอสโฟเนียม (C-15) และไดอัลดีไฮด์ (C-10) การใช้ปฏิกิริยา Hydroxylation ในแคนทาแซนทิน (canthaxanthin) หรือการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของลูทีน (lutein) ไปเป็นซีอะแซทิน (zeaxanthin) จากนั้นทำปฏิกริยาออกซิเดชั่นให้กลายเป็นแอสตาแซนทิน แต่แอสตาแซนทินสังเคราะห์และที่เกิดในธรรมชาติมีความแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ปลาที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยให้แอสตาแซนทินแบบสังเคราะห์กับปลาที่จับได้ตามธรรมชาติ เมื่อนำมาวิเคราะห์แอสตาแซนทินพบว่าแตกต่างกัน

การผลิตสารแอสตาแซนทินจากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ได้รับการพัฒนาเป็นระดับอุตสาหกรรมตั้งแต่ปลายปี 1990 (Olaizola, 2003) สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เป็น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายเซลล์เดียว อาศัยอยู่ในน้ำจืดนี้ มีรูปร่างลักษณะ 2 แบบ คือ แบบเซลล์สีเขียวปกติ และแบบซีสต์สีแดง การเกิดซีสต์สีแดงเกิดขึ้นจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอย่างเช่น มีปริมาณธาตุอาหารต่ำ ความเข้มแสงสูง และปัจจัยอื่นๆ ทำให้เซลล์เกิดการสะสมของแอสตาแซนทิน (Kobayashi และคณะ, 1997) ปกติเซลล์จะถูกเพิ่มจำนวนในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากที่ได้ปริมาณมากตามความต้องการ ต่อจากนั้นจะทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะที่ไม่เหมาะสมเพื่อการกระตุ้นให้เกิดการสะสมแอสตาแซนทิน การเลี้ยงแบบนี้เป็นการเลี้ยงแบบสองขั้นตอน (Boussiba และคณะ, 1999)

ในระบบอุตสาหกรรมการกระตุ้นให้สาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจนเปลี่ยนเป็นซีสต์ โดยการลดธาตุอาหาร การใช้รังสี หรืออุณหภูมิที่สูง วิธีนี้จะได้แอสตาแซนทินประมาณร้อยละ 1-3 จากการเก็บเกี่ยวซีตส์ (Olaizola, 2003) ซึ่งการเก็บเกี่ยวทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ตามด้วยการอบแห้งและทำให้เซลล์แตกเพื่อให้แอสตาแซนทินออกมา (Lorenz และ Cysewski, 2000)

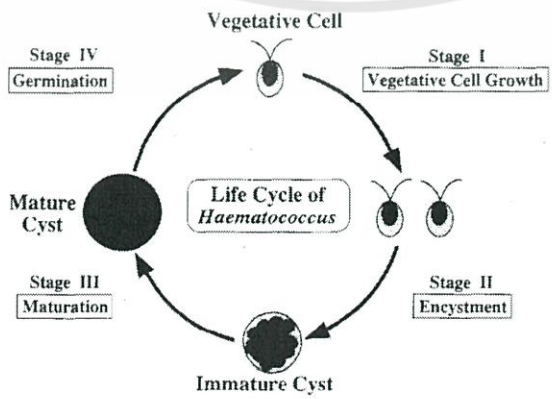
2.2 สาหร่าย *Haematococcus* sp.

สาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวจัดอยู่ใน Division Chlorophyta Class Chlorophyceae Order Volvocales Family Chlamydomonadaceae

สาหร่าย *Haematococcus* sp มีรูปร่างกลมหรือเป็นวงรีเล็กน้อยมีแฟลกเจลล่า 2 เส้น สามารถเคลื่อนที่ได้ ลักษณะพิเศษของสาหร่าย *Haematococcus* sp. คือมีโปรโตพลาสอยู่กลางเซลล์ และเชื่อมโยงกับผนังเซลล์ด้วยสายที่แยกออกมาเป็นรัศมี เมื่อเกิดสภาวะไม่เหมาะสม *Haematococcus* sp. จะสลัดแฟลกเจลล่าทิ้งแล้วเปลี่ยนเป็นอะคินีท (akinete) ที่ไม่เคลื่อนที่ ซึ่งอะคีนีทมีสีแดงส้มหรือแดงอิฐ โดยเกิดจากการสร้างรงค-วัตถุสีแดงที่เรียกว่า ฮีมาโตโครม (haematochrome) ส่วนใหญ่ *Haematococcus* sp. มักมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างซูโอสปอร์ (zoospore) 2- 4 เซลล์ แต่ถ้ามีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะทำการสืบพันธุ์แบบสร้างแกมมีต และมีการรวมตัวกันแบบไอโซแกมมีต (isogamete) (ยุวดี, 2549) สามารถพบได้ตามก้นสระ บ่อซีเมนต์ บ่อหินตื้น

วงจรชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

การศึกษาวงจรชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi และคณะ,1997) โดยเพาะเลี้ยงหัวเชื้อในอาหารสูตร BG11 ดัดแปลง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปวางไว้บนชั้นวางโดยทำการเขย่ามือหลายๆครั้งทุกวัน โดยมีสภาวะการเจริญดังนี้ อุณหภูมิ 22±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 100 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และวงจรสว่างต่อมืด (14 ชม. ต่อ 10 ชม.)



รูปที่ 2.2 วงจรชีวิตของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi และคณะ, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะที่ 1 : การเจริญของเซลล์ปกติ (vegetative cell growth) : เมื่อถึงวันที่ 5 ของการทดลองทุกๆ ฟลาสก์จะมีเซลล์สีเขียวที่เคลื่อนไหวด้วยแฟลกเจลล่า

ระยะที่ 2 : การเจริญเป็นซีสต์เริ่มแรก (encystment) : นำเซลล์ที่เตรียมถ่ายลงอาหาร BG11 ดัดแปลงที่เพิ่มอาหารเสริมคือ โพแทสเซียมไนเตรท 0.3 กรัมต่อลิตร กับ โซเดียมคลอไรด์ 3.0 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร

ระยะที่ 3 : การเจริญเป็นซีสต์เต็มวัย (maturation) : เมื่อถึงวันที่ 12 ตัวเซลล์จะเริ่มเปลี่ยนเป็นเซลล์เคลื่อนที่สีแดงในอาหารเหลวและบางส่วนที่เป็นซีสสีแดงตกตะกอนที่ก้นฟลาสก์ จนถึงวันที่ 25 เซลล์ทั้งหมดส่วนใหญ่จะเป็นซีสสีแดงจมตกลงไปที่ก้นฟลาสก์ทั้งหมดแล้วเราจึงนำ 3 ฟลาสก์สุดท้ายมาเทสารละลายด้านบนทิ้งแล้วเก็บเซลล์ที่ตกตะกอนโดยเซลล์เครื่อนที่สีแดงมีปริมาณแอสตาแซนทินร้อยละ 1.03 ของน้ำหนักแห้งในขณะที่ซีสต์สีแดงมีปริมาณแอสตาแซนทินสูงถึงร้อยละ 4.5 ของน้ำหนักแห้ง

ระยะที่ 4 : การงอกของซีสต์ (germination)เป็นระยะที่นำซีสต์เต็มวัยไปเลี้ยงในอาหารใหม่จนมีการปลดปล่อยเซลล์ลูกออกจากเซลล์และเจริญต่อไปเป็นเซลล์ปกติ

รงควัตถุที่พบในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

จากผลการทดลองของ Yuan และ Chen (1998) จัดจำแนกไอโซเมอร์ของแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์จากรงควัตถุที่สกัดมาจากสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MCM ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตต 1 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 3.7 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ด้วย HPLC ระบบ reverse phase พบว่าสามารถแยกและจัดจำแนกไอโซเมอร์ของแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินเอสเทอร์ได้ 4 ชนิด คือ (3S,3S')-trans-astaxanthin, (3S,3S')-9-cis-astaxanthin, (3S,3S')-13-cis-astaxanthin, (3R,3R')-trans-astaxanthin และที่อยู่นรูปเอสเทอร์ได้แก่ (3S,3S')-trans-astaxanthin ester, (3S,3S')-13-cis-astaxanthin ester, (3R,3R')-trans-astaxanthin ester และพบว่ามี (3S,3S')-15-cis-astaxanthin ปริมาณเล็กน้อยในสารสกัดที่ผ่านการสปอนนิฟิเคชั่น

นอกจากนี้ Yaun และ Chen (2001) พบว่ารงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยส่วนใหญ่อยู่ในรูปแอสตาแซนทินเอสเทอร์ โดยเป็น astaxanthin monoester สูงถึงร้อยละ 78 ของแอสตาแซนทินทั้งหมด

Dominguez-Bocanegra และคณะ (2004) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis* ในสภาวะเครียด เช่น การขาดสารอาหาร ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงๆ และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ จะส่งผลให้ภายในเซลล์มีปริมาณแอสตาแซนทินมากกว่าร้อยละ 80

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

2.3.1 คาร์บอน

ผลของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารสูตรโบลด์โดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศอย่างต่อเนื่องที่ปริมาณ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ซึ่งทำให้อัตราการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มีปริมาณเซลล์เป็น 3.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Bocanegra และคณะ, 2004)

นอกจากผลของคาร์บอนจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์แล้วยังมีผลต่อการผลิตและสะสมของแอสตาแซนทินภายในเซลล์อีกด้วย โดย Kobayashi และคณะ (1991) พบว่าอะซิเตตมีผลทำให้ผนังเซลล์หนาทำให้ตัวเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นจึงทำให้มีพื้นที่มวลเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้มีการสะสมแคโรทีนอยด์ในเซลล์ได้มากขึ้น อีกทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเติมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 45 มิลลิโมลาร์ ส่งผลต่อการสร้างแอสตาแซนทินมากกว่าเซลล์ปกติ 18 ถึง 52 เท่า เป็นแอสตาแซนทินปริมาณ 6 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ Cordero และคณะ (1996) พบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่เติมโซเดียมอะซิเตต 0.025 และ 0.050 กรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการผลิตแอสตาแซนทิน โดยสามารถผลิตได้ร้อยละ 1.83 และ 1.78 ของน้ำหนักแห้ง

และจากผลการทดลองของ Orosa และคณะ (2001) พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบมิคโซโทรฟิค (mixotrophic) โดยใช้ อะซิเตต (acetate) หรือ มาโลเนต (malonate) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนจะเกิดการส่งเสริมอัตราการเจริญของเซลล์และมีการสะสมแคโรทีนอยด์ทั้งหมดมากกว่าแบบออโต้โทรฟิค (autotrophic) 3 เท่า แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของอะซิเตตและมาโลเนตมากกว่าร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร จะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื่องจากถูกกระตุ้นให้เกิดการเข้าซีสต์แต่จะได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดมากขึ้น

2.3.2 ไนโตรเจน

Borowitzka และคณะ (1991) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรต 0.5 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* สามารถเจริญได้ดีที่สุด

Harker และคณะ (1996b) รายงานว่าปริมาณโซเดียมไนเตรตที่ 3 มิลลิโมลาร์ทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* สูงสุด แต่เมื่อความเข้มข้นของไนเตรต มีปริมาณลดลงจะทำให้อัตราการผลิตแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นโดยสภาวะขาดไนเตรต (ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์) มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (ซึ่งมีแอสตาแซนทินมากกว่า 95%) มากกว่า 300 พิโคกรัมต่อเซลล์

Boussiba และคณะ (1999) รายงานว่าจากการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ในอาหารที่ขาดแคลนไนโตรเจน หรือในอาหารที่ขาดแคลนฟอสเฟต ที่ระดับความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าสาหร่ายมีการสะสมแอสตาแซนทินถึงร้อยละ 4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนในสภาวะที่ขาดไนตรเจนสาหร่ายจะสามารถสะสมแอสตาแซนทินได้เร็วกว่าในสภาวะที่ขาดฟอสเฟต และมีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อเซลล์ลดลงร้อยละ 50 ของปริมาณ เริ่มต้นในสภาวะที่ขาดฟอสเฟต การสะสมแอสตาแซนทินของสาหร่ายเกิดขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อเซลล์

Göksan และคณะ (2011) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนจะมีผลให้ปริมาณของตัวเซลล์สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณโซเดียมไนเตรต 1 กรัมต่อลิตรและโพแทสเซียมไนเตรต 0.5 กรัมต่อลิตร ทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มมากที่สุด แต่ในทางตรงกันข้ามปริมาณของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจน

Sarada และคณะ (2002) รายงานว่าโพแทสเซียมไนเตรตมีส่วนทำให้จำนวนเซลล์สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มากที่สุดที่ 6.2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่เซลล์ที่ได้มีขนาดเล็กกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ส่วนโซเดียมไนเตรตให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและแอสตาแซนทินมากที่สุด โดยความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนคำนวณจากจุดสมมูลของ L-asparagine ในอาหารสูตรโบลด์

จากการทดลองของ Imamoglu และคณะ (2009) พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารสูตร RM ที่ขาดโซเดียมไนเตรตคือ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มแสง 546 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที มีอัตราการสะสมปริมาณแอสตาแซนทินที่ 2.15 มิลลิกรัมต่อกรัมต่อวัน

2.3.3 ฟอสเฟต

สภาวะการเลี้ยงในอาหารที่ขาดฟอสเฟต และอาหารที่ปริมาณฟอสเฟตสูงจะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้สูง และการลดลงของปริมาณฟอสเฟตไม่มีผลต่อการเจริญซึ่งต่างกับสภาวะที่ขาดไนโตรเจน แต่ยังทำให้การผลิตของแอสตาแซนทินสูงขึ้นด้วย (Harker และคณะ, 1995)

จากการทดลองของ Harker และคณะ (1996a) เพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* พบว่าในอาหารเหลวสูตรโบลด์ที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตน้อย (0.26 กรัมต่อลิตร) จะผลิตแอสตาแซนทินได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 175 พิโคกรัมต่อเซลล์ เพราะว่าปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ลดลงไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต แต่จะกระตุ้นให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินมากขึ้น

ในการทดลองของ สุดชายชล (2541) ที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ด้วยอาหารเหลวสูตร MCM ที่มีระดับของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.02 กรัมต่อลิตร) ให้การเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินสูงสุด ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า จะให้การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินได้ต่ำกว่า

นอกจากนี้การทดลองของ นรารมณ์และนัฏฐา (2555) พบว่าอาหารโบลด์ดัดแปลงที่ความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อ ต่อ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.0360 : 0.0840 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์ *Haematococcus pluvialis* CCALA 840 และปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด โดยมีปริมาณเซลล์ 2.70×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงสุด 7.19 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.4 ความเข้มแสง

ที่ความเข้มแสง 75 และ 150 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรวินาที ให้ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* สูงที่สุดเท่ากับ $25.2 \pm 1.3 \times 10^4$ และ $26.4 \pm 0.9 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Göksan และคณะ, 2011) ในขณะที่ความเข้มแสงที่สูงกว่า 1600 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรวินาทีเหมาะสมต่อการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน (Harker และคณะ, 1995)

ความเข้มแสงที่ 1,500 ถึง 2,000 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จากหลอดไฟ PAR ที่ส่องลงมาที่ผิวด้านบนของอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* สูง แต่ความเข้มแสงสูงก็เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดสำหรับการสะสมแอสตาแซนทินในเซลล์ที่ยังรอดชีวิตอยู่ ในขณะที่ความเข้มแสงที่ 40 ถึง 50 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่ายจะสะสมแอสตาแซนทินในระดับที่ลดต่ำลง แต่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สาหร่ายสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Harker และคณะ, 1996a)

การใช้ความเข้มแสงที่ 240 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ร่วมกับการใช้สภาวะความเครียดหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย คือสภาวะการขาดโพแทสเซียมไนเตรต เป็นตัวส่งเสริมให้มีการกระตุ้นให้สาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* สังเคราะห์แอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นร้อยละ 40 หลังจากเข้าสู่สภาวะความเข้มแสงสูง (Fabregas และคณะ, 1998)

การทดลองของ Jaime และคณะ (2010) ได้เพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงโดยใช้ความเข้มแสง 80 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อใช้เพาะเลี้ยงในช่วงการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และใช้ความเข้มแสงที่ 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อใช้ในการกระตุ้นการสร้างและสะสมแอสตาแซนทินในการทดลอง

จากการทดลองของ Imamoglu และคณะ (2009) พบว่าที่ความเข้มแสง 546 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เหมาะสมต่อการเกิดการสะสมของสารแอสตาแซนทินใน *Haematococcus pluvialis* โดยสังเกตจากสีแดงภายในเซลล์ซีสต์

2.3.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เป็นอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าอยู่ที่ 25 – 28 องศาเซลเซียส โดยระดับอุณหภูมิที่สูงกว่านี้จะทำให้สาหร่ายไม่มีการแบ่งเซลล์และจะเข้าซีสต์เนื่องจากอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Fan และคณะ, 1994)

Jaime และคณะ (2010) ได้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารสูตรโบลด์ดัดแปลงโดยใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์สีเขียวในระยะเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่กระตุ้นให้สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เกิดการสะสมแอสตาแซนทิน

การเพาะเลี้ยงในสภาวะเครียด กระตุ้นให้ *Haematococcus pluvialis* เกิดการสะสมแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น

2.4.1 ผลของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองของ Sushanta และคณะ(2013) พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในสภาวะที่ไม่มีฟอสฟอรัสและมีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 10 ของอาหารเลี้ยงเชื้อโบลด์ดัดแปลง ภายใต้สภาวะแสงจากหลอดไฟ PAR พบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วงซีสต์

Sarada และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน คือแคลเซียมไนเตรต โพแทสเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรตและโซเดียมไนเตรต พบว่า โพแทสเซียมไนเตรตให้ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มากที่สุดประมาณ $6.2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่โซเดียมไนเตรตให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุดถึงร้อยละ 90

Boussiba และคณะ (1999) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนหรือแหล่งฟอสเฟต ที่ระดับความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าสาหร่ายมีการสะสมแอสตาแซนทินถึงร้อยละ 4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการทดลองของ Harker และคณะ (1996b) พบว่าในขณะที่สภาวะไม่มีการเติมโซเดียมไนเตรตจะทำให้สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ผลิตแอสตาแซนทินได้สูงสุดโดยมีปริมาณ แคโรทีนอยด์ทั้งหมด (ซึ่งมีแอสตาแซนทินมากกว่าร้อยละ 95) มากกว่า 300 พิโคกรัมต่อเซลล์

2.4.2 ผลของความเค็ม

Sarada และคณะ (2002) พบว่าการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* แบบ heterotrophic โดยเติมโซเดียมอะซิเตต 2.2 มิลลิโมลาร์ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร ให้ปริมาณแอสตาแซนทินและแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงสุด เมื่อเทียบจากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วงร้อยละ 0.25 ถึง 2.0 น้ำหนักต่อปริมาตร

Kobayashi และคณะ (1997) พบว่าการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ภายใต้สภาวะที่มีแสงและโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 กระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของซีสต์และเพิ่มปริมาณของแอสตาแซนทินที่ 100 พิโคกรัมต่อเซลล์ หรือ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองของ Harker และคณะ (1995) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 5.85 กรัมต่อลิตร จะมีผลต่อการตายของเซลล์แต่ก็สามารถกระตุ้นให้เซลล์ที่รอดชีวิตเกิดการสะสมแอสตาแซนทินได้

2.4.3 ผลของค่า pH

จากการทดลองของ Sarada และคณะ (2002) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis* ที่ความเป็นกรดด่างระดับ 6, 7 และ 8 พบว่าความเป็นกรดด่างระดับที่ 7 สาหร่ายมีการผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ในปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 10.69 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สาหร่าย

สาหร่ายที่ใช้ศึกษา *Haematococus* sp. เพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเอียงสูตร JM เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 6 เดือน

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

เครื่องวัดพีเอช ของ Denver Instrument รุ่น Model 215
เครื่องเขย่าของ Gallenkamp รุ่น IOI400.XX2C
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Hach รุ่น DR/400y
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิของ Sanyo รุ่น Falcon 6/300
ตู้ถ่ายเชื้อของ Issco รุ่น BVT 123
ตู้อบลมร้อนของ WTB Binder รุ่น ED53
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่งของ Sartorius รุ่น A200S
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Sartorius รุ่น Libror EB-400H
หม้อนึ่งความดันไอของ Hirayama รุ่น HA-300MIV
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิของ Clifton รุ่น NE2-22D
ถังหมักแบบอากาศยกตัวของ B.Braun Biotech International ขนาด 2 ลิตร
ชุดกรองแบบสุญญากาศ
แผ่นนับเม็ดเลือด ของ Boeco รุ่น improved neubauer
ไมโครปิเปตต์ของ Eppendorf รุ่น 500-5000 ไมโครลิตร
เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ของ Pyrex

สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย ดังนี้
  อาหารสูตร BG-11 JM และ BB
  วิตามินบี 1 (thiamine) ของ Fulka
  วิตามินบี 12 (cobalamin) ของ Fulka
  ไบโอตินของ (B7) Fulka
- สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดและวิเคราะห์แคโรทีนอยด์
- สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์แอสตาแซนทินด้วย HPLC
  แอสตาแซนทินของ Sigma
  เมทานอล
  ไดคลอโรมีเทน
  อะซีโตไนไตรล์
  น้ำกลั่นบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เลี้ยงเชื้อสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสูตรอาหาร BB ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวกที่...) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะมีแสง 3500 ลักซ์ เป็นเวลา 10 วัน ปรับค่าความขุ่นของเชื้อสาหร่ายเป็น 0.3 สาหร่ายที่ได้ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาต่อไป

3.3.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร คือ BB BG11 และ JM (ภาคผนวกที่ ก) นำอาหารแต่ละสูตรปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่ออาหารเย็นเติมหัวเชื้อสาหร่ายจากข้อ 3.3.1 ลงในอาหารแต่ละชนิด 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แต่ละสูตรอาหารทำ 3 ซ้ำ นำฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง เลือกสูตรอาหารที่ให้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์ *Haematococcus* sp. สูงสุด ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การศึกษาผลของวิตามินต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

เตรียมอาหารสูตรที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดจากข้อ 3.3.2 เติมวิตามินบี 1 โดยใช้ความเข้มข้น 0.05 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตรทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 3.3.2 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ เลือกสูตรอาหารที่ให้เซลล์สูงสุดไปศึกษาหาปริมาณวิตามิน 12 ที่เหมาะสมต่อไป

เตรียมอาหารสูตรที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดจากอาหารที่เติมวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้นที่ดีที่สุดเติมวิตามินบี 12 ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ 0.05 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 3.3.2 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ของแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เลือกความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ที่ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุดไปศึกษาปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมต่อไป

เตรียมอาหารสูตรที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดจากอาหารที่เติมวิตามินบี 1 และบี 12 มาเติมไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.05 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะ เดียวกับข้อ 3.3.2 เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อหาปริมาณเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง เลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะเครียดที่ขาดธาตุไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารและสภาวะที่ดีที่สุดจากข้อ 3.3.3 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์แสงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วันจากนั้นเติมธาตุไนโตรเจนโซเดียมไนเตรท ที่แปรผันความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0 0.08 0.125 0.25 0.5 1 และ 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเพาะลี้ยงในสภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 12 วัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์เลือกความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตเซลล์และแคโรทีนอยด์สูงสุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมคลอไรด์

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารและสภาวะเดียวกับข้อ 3.3.3 เป็นเวลา 12 วัน เมื่อเซลล์สาหร่ายเจริญเต็มที่ จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ 0 2 4 8 16 และ 32 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 12 วัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วันเพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ ปริมาณแคโรทีนอยด์ เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ให้จำนวนเซลล์และแคโรทีนอยด์สูงสุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมอะซิเตต

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารและสภาวะเดียวกับข้อ 3.3.3 เป็นเวลา 12 วัน จนเซลล์เจริญเต็มที่ หลังจากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0 1 2 4 8 และ 16 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ต่อในสภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 12 วัน แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุก 2 วันเพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์และปริมาณแคโรทีนอยด์ เลือกความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตตที่ให้จำนวนเซลล์และแคโรทีนอยด์สูงสุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.7 ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักแบบอากาศยกตัว (air lift)

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมในถังหมักแบบอากาศยกตัวความจุ 2 ลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 1500 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมหัวเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พ่นอากาศและให้แสงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา

ทำการเลี้ยงเชื้อสาหร่ายจนเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จากนั้นทำให้เกิดสภาวะเครียดที่ให้ผลการผลิตแคโรทีนอยด์ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.4 – 3.3.6 ทำการเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักแบบอากาศตัวเป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ และปริมาณแอสตาแซนทิน

3.4 การวิเคราะห์

3.4.1 การวัดการเจริญของสาหร่ายโดยการนับจำนวนเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์

นำตัวอย่างสาหร่ายมาทำความเจือจางให้เหมาะสม จากนั้นนำมานับเซลล์สไลด์สำหรับนับเซลล์ชนิด Improved Neubauer (Haemacytometer) คำนวณจำนวนเซลล์ตามสูตร

จำนวนเซลล์ (เซลล์ / มิลลิลิตร) = $25A \times 10^4 \times$ ความเจือจาง

A = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ต่อ 1 ช่อง

3.4.2 การวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบปริมาตรแน่นอนกรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ซึ่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น แล้วคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินในรูปแคโรทีนอยด์ทั้งหมดโดยใช้วิธีดัดแปลงของ Boussiba และ Vonsak (1992) ดังนี้

3.4.3.1 นำเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทน้ำส่วนใสทิ้ง

3.4.3.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เปอร์เซ็นต์ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ละลายในสารละลายเมทานอลเปอร์เซ็นต์ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 5 มล. จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายที่เป็นสีเขียวของคลอโรฟิลล์ทิ้ง

3.4.3.3 ใส่เม็ดแก้วขนาดเล็ก (ประมาณ 30 เม็ด) ลงในหลอดที่มีเซลล์สาหร่ายจากข้อ 3.4.3.2 จากนั้นหยดกรดอะซิติกเข้มข้นจำนวน 5 หยด นำไปปั่นให้เซลล์แตกเป็นเวลา 30 วินาที

3.4.3.4 เติมสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีแยกส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรคำนวณหาปริมาตรแคโรทีนอยด์ด้วยสูตร

$$\text{ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{ABS_{480} \times \text{ปริมาณอะซิโตนที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}{0.224 \times \text{ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

3.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทิน (Trans-astaxanthin) ในสารละลายแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC (Yuan และ Chen, 1998)

เครื่อง HPLC ของ Shimudzu รุ่น LC-10 ADVP

คอลัมภ์ที่ใช้คือ HiQ sil C18V ขนาด 4.6 x 250 มม. ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mofile phase) ประกอบด้วย

สารละลาย A ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : อะซิโรไนไตรล์ : น้ำ ในอัตรา
5.0 :85.0 : 55 : 4.5 (ปริมาตร / ปริมาตร)

สารละลาย B ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : อะซิโตไนไตรล์ : น้ำ ในอัตรา
22.0 : 28.0 : 45.5 : 4.5

วิธีการทำ gradient ดังนี้ ใช้สารละลาย A นาน 10 นาที จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย B จาก 0 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 6 นาที และใช้ตัวทำละลาย B 14 นาที

3.4.4.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทิน

นำเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มล. ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้ไปแช่ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส นำเซลล์สาหร่ายมาสกัดตามวิธีในข้อ 3.4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

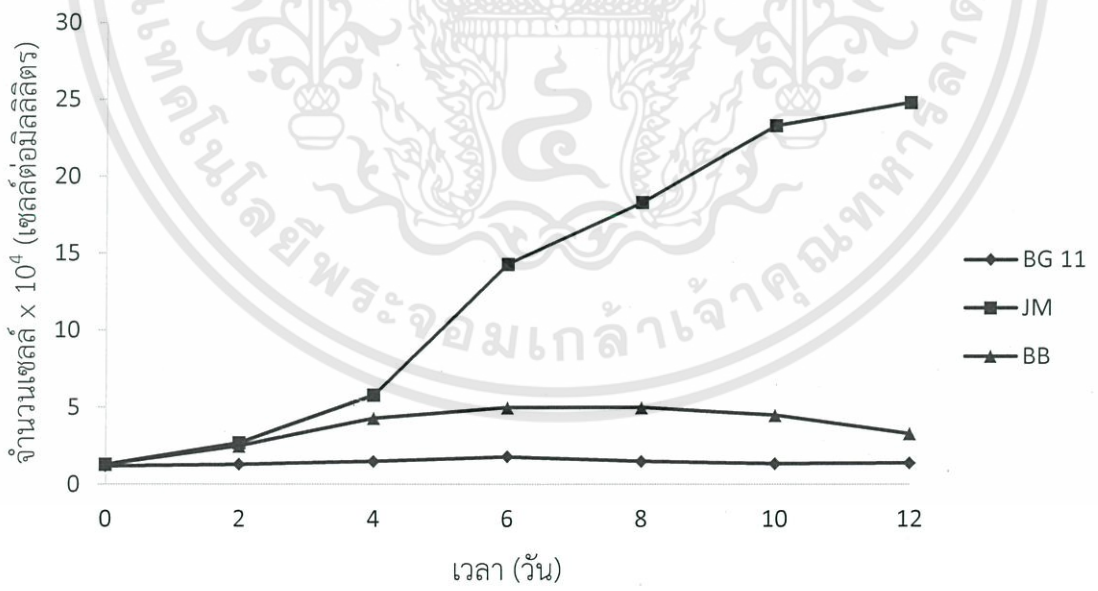
4.1 ผลการศึกษาหาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตร BB BG-11 และ JM บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ เป็นเวลา 12 วัน พบว่าอาหาร BG-11 สาหร่ายมีน้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.1519 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลล์ 1.3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเซลล์สาหร่ายจะเพิ่มขึ้น และพบว่ามีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.8×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.2333 กรัมต่อลิตรในวันที่ ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2

สำหรับอาหารสูตร JM สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนช้าในระยะสองวันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.3889 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณเซลล์เท่ากับ 24.8×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2

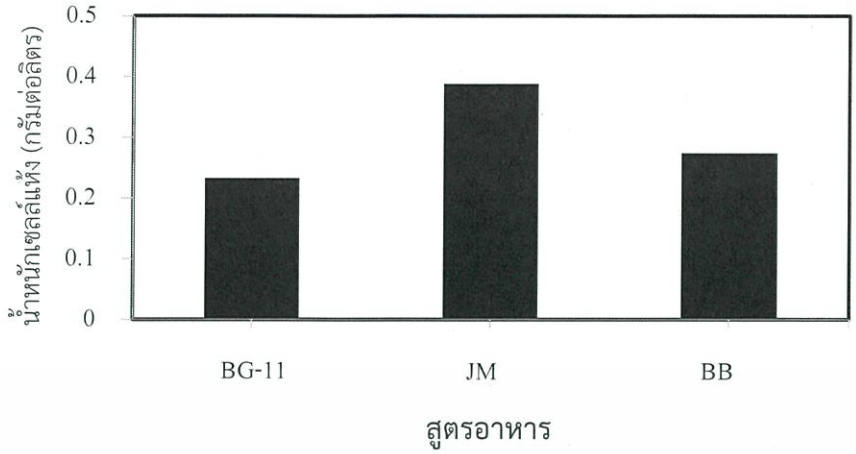
เมื่อพิจารณาการเจริญของสาหร่ายในอาหารสูตร BB พบว่าการเจริญของสาหร่ายจะช้าในระยะ 2 วันแรก ปริมาณเซลล์สูงสุดพบในวันที่ 6-8 ของการเพาะเลี้ยง คือมีค่า 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจำนวนเซลล์เริ่มลดลง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.2741 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1 และ 4.2)

จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและให้จำนวนเซลล์สูงที่สุดคืออาหารสูตร JM สาหร่ายปรับตัวอยู่ในระยะ lag phase เป็นเวลา 2 วัน



รูปที่ 4.1 ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร BG-11 JM และ BB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

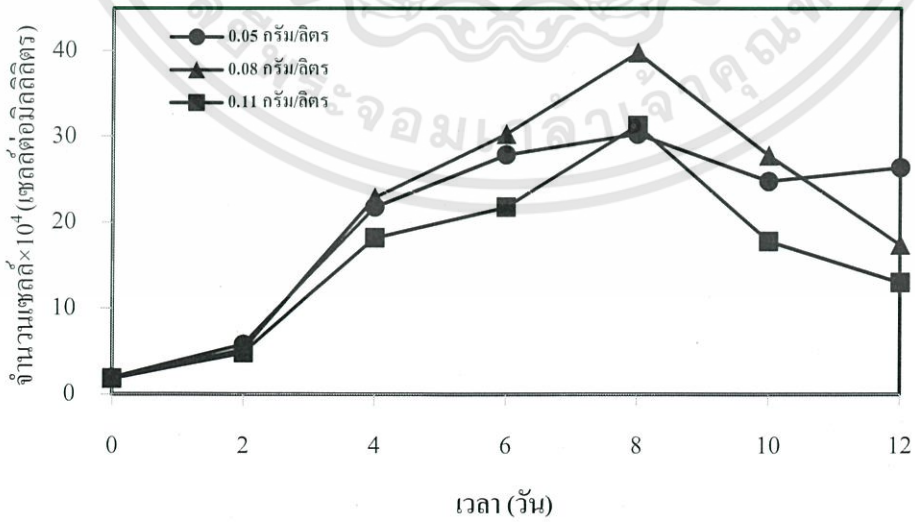


รูปที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร BG-11 BB และ JM ในวันที่ 8 ของการทดลอง

ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ ผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต นอกจากจะขึ้นกับสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ พีเอช และกวนให้อากาศ ยังขึ้นกับองค์ประกอบของสารอาหารในสูตรอาหารด้วย (Gong และ Chen, 1998)

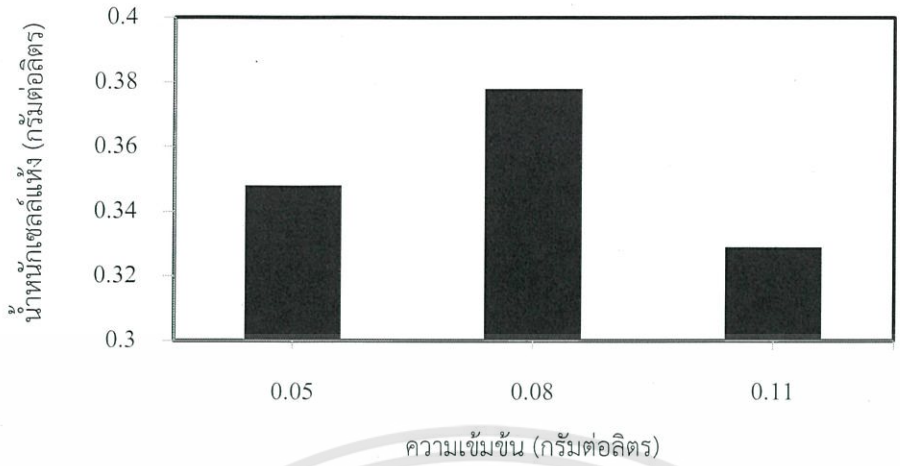
4.2 ผลการศึกษาผลของวิตามินต่อการเจริญของสาหร่าย *Haematococcus* sp.

จากการศึกษาการเจริญของสาหร่ายในอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามีบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.05 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตรทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ เป็นเวลา 12 วัน พบว่าอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.05 และ 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตรสาหร่ายเจริญโดยมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันคือ 30.3×10^4 และ 31.3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงใน รูปที่ 4.3 เมื่อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.3482 และ 0.3296 กรัมต่อลิตรตามลำดับ รูปที่ 4.4 สำหรับอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณเซลล์สูงสุดคือ 39.8×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.3778 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง



รูปที่ 4.3 ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร

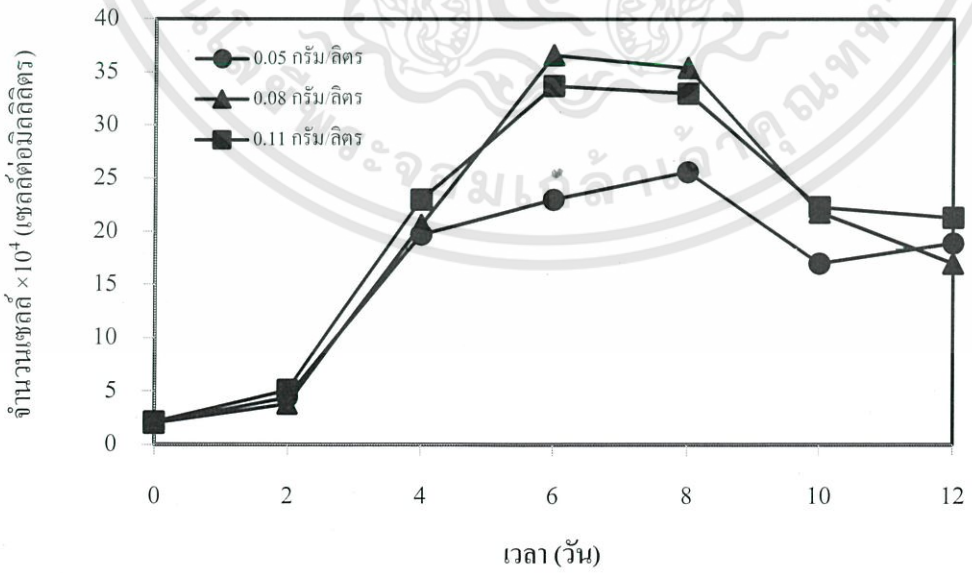
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง

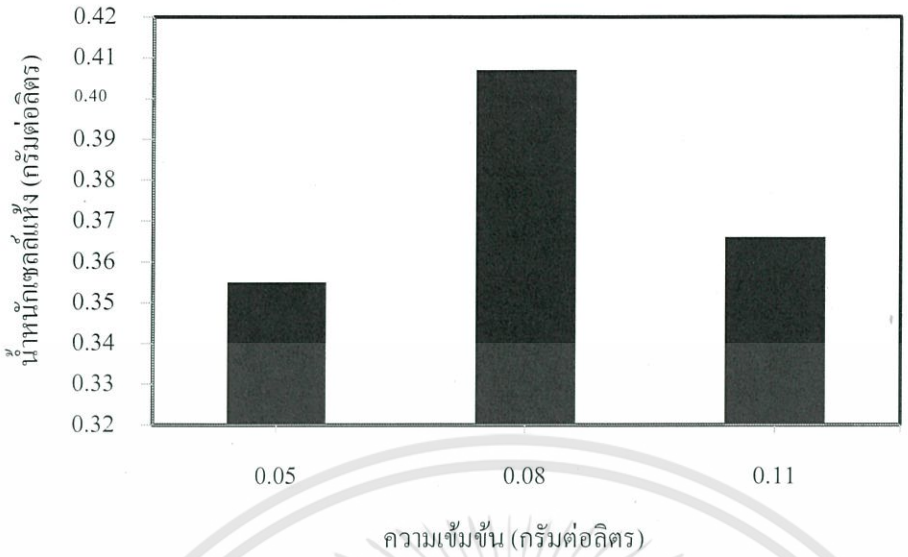
สำหรับการศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Haematococccus* sp. ในอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ 0.05 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีให้แสงต่อเนื่องที่ ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารที่เติมวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์สูงสุด 36.6×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.4077 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เติมวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.11 และ 0.05 กรัมต่อลิตรมีจำนวนเซลล์ 32.5×10^4 และ 24.7×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.3667 และ 0.3556 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.5 และ 4.6)

ดังนั้นจึงเลือกอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตรและวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.5 ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

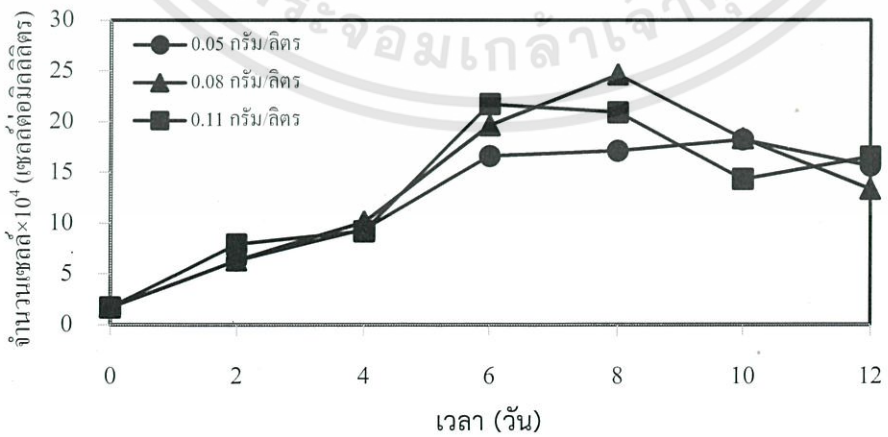
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร

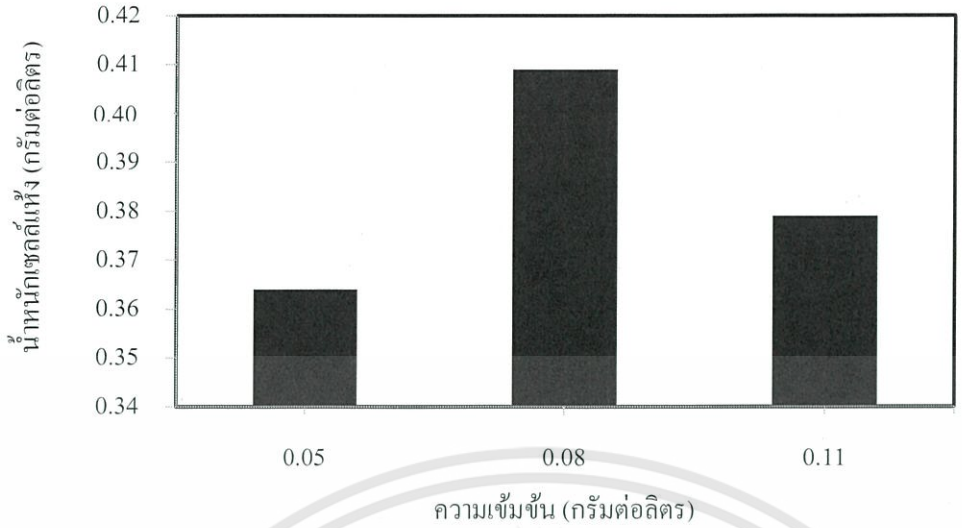
ผลการศึกษาการเจริญของสาหร่ายในอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 และ บี 12 ที่ความเข้มข้นชนิดละ 0.08 กรัมต่อลิตร มาเติมไบโอตินที่ระดับเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เติมไบโอตินเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 24.6×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.4092 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.11 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 18.2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.3646 กรัมต่อลิตร) และ 21.7×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง 0.3796 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8

ดังนั้นจึงเลือกอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร และไบโอตินความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Haematococcus* sp. เพื่อผลิตแอสตาแซนทินในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.7 ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร และไบโอติน ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

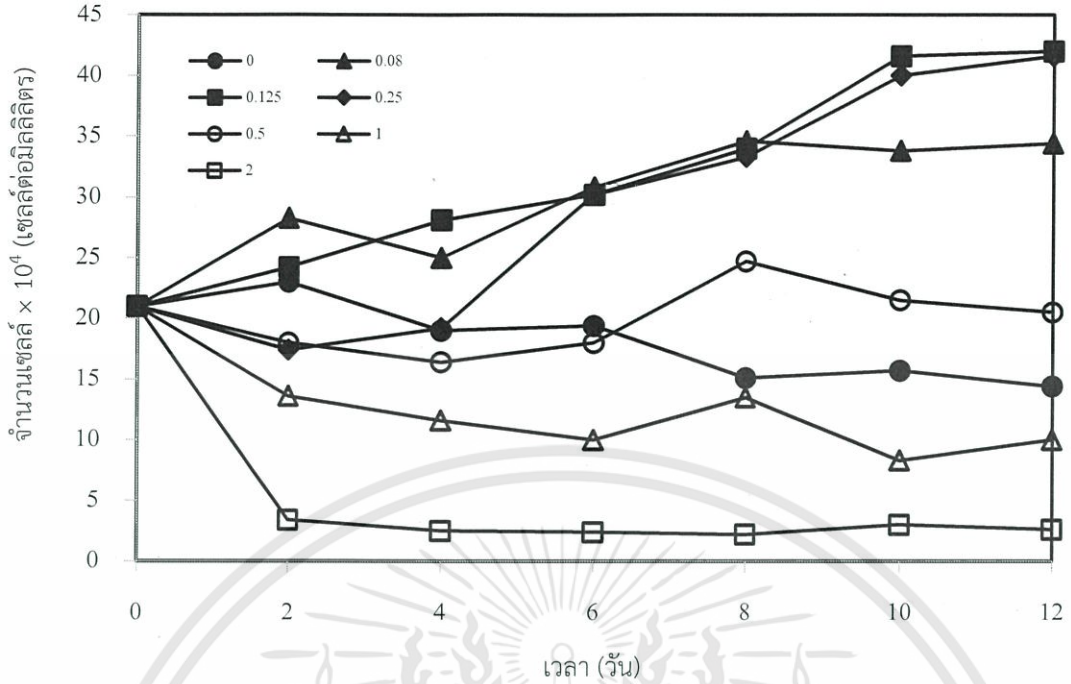


รูปที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และวิตามินบี 12 ที่ความเข้มข้น 0.08 กรัมต่อลิตร และไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.5, 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง

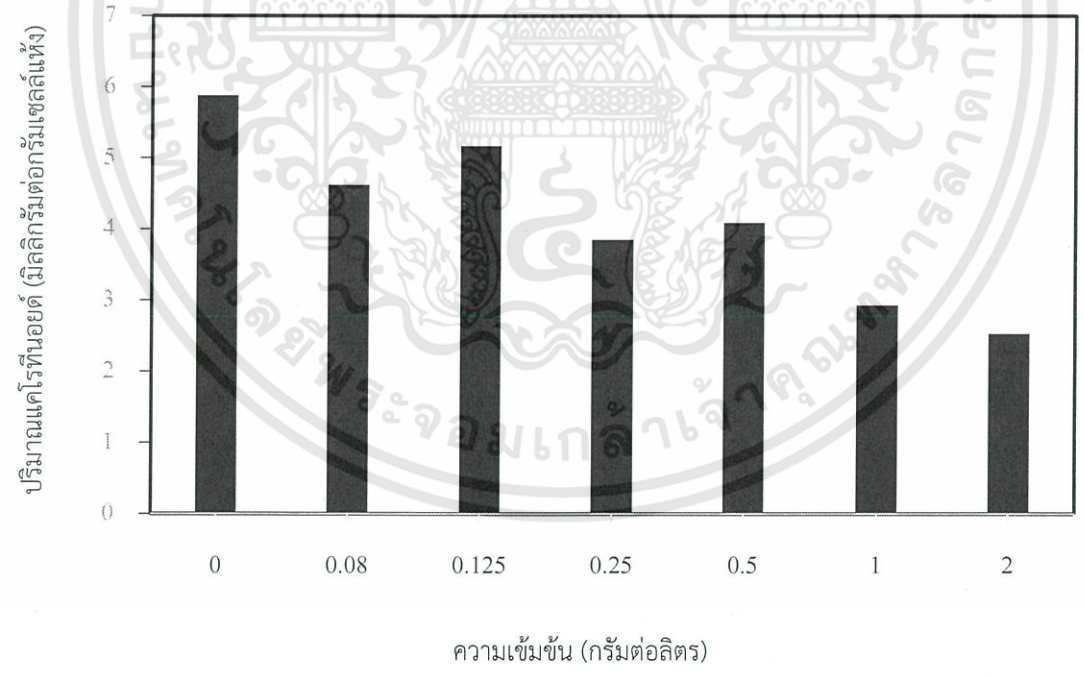
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะเครียดที่ขาดธาตุไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 วิตามินบี 12 และไบโอตินที่ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.08 และ 0.08 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 12 วัน ในสภาวะเดียวกับข้อ 4.2 จากนั้นชักนำให้เกิดสภาวะเครียดโดยเติมโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 0.08 0.125 0.25 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 12 วัน ที่สภาวะเดียวกัน แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ผลการศึกษาพบว่าการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่ไม่เติมเกลือโซเดียมไนเตรทให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด 5.88 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 21×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 14.4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการเติมโซเดียมไนเตรทที่ระดับ 0.125 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 5.17 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 24.2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อสาหร่ายครบ 12 วัน มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 41.6×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมเกลือโซเดียมไนเตรท 0.08 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 4.62 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นเป็น 41.6×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมไนเตรทระหว่าง 0.5-2 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลงมีค่า 4.09 3.85 2.95 และ 2.53 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10) เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมไนเตรทให้มากขึ้นปริมาณเซลล์จะมีจำนวนลดลงเช่นเดียวกัน จึงส่งผลให้การผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 0, 0.08, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร

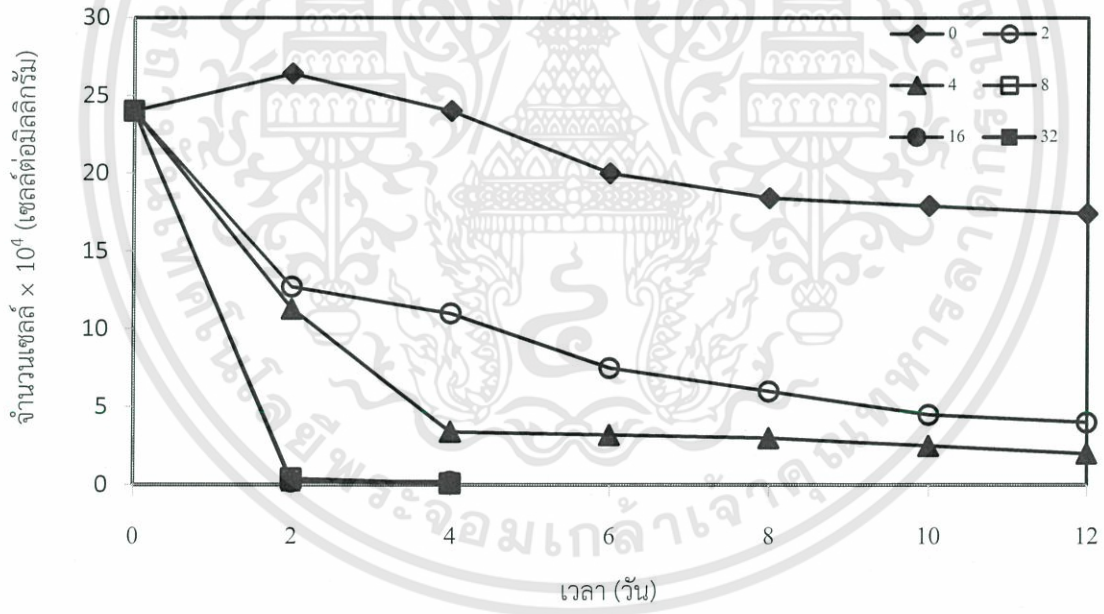


รูปที่ 4.10 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่มีวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมไนเตรทเข้มข้น 0, 0.08, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

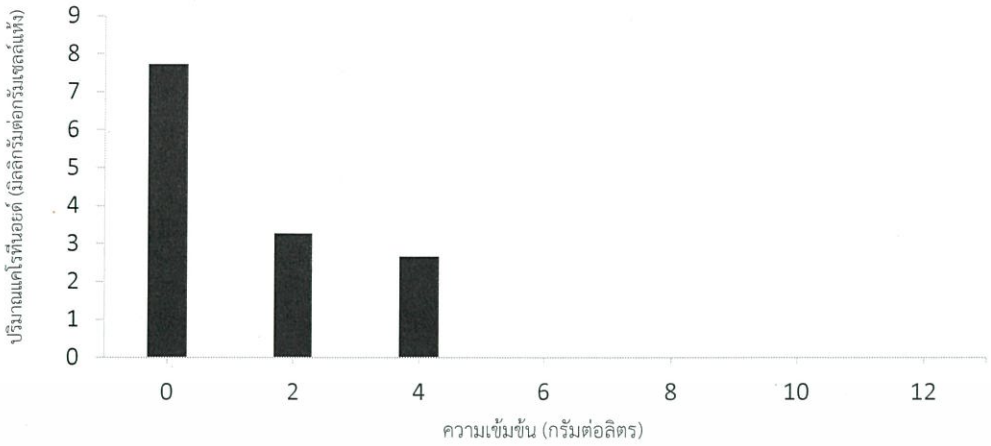
4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมคลอไรด์

ทำการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 วิตามินบี 12 และไบโอติน ตามความเข้มข้นเดียวกันในข้อ 4.3 เมื่อเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 12 วัน ในสภาวะที่ให้แสงและมีการเขย่าอย่างต่อเนื่องเมื่อสาหร่ายเจริญเต็มที่ทำการชักนำให้ผลิตแคโรทีนอยด์ในสภาวะเครียดโดยเติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหารที่สาหร่าย เจริญที่ระดับความเข้มข้น 0 2 4 6 8 16 และ 32 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 12 วัน แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ จากผลการศึกษาพบว่า อาหารที่ไม่ได้เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 7.73 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง จำนวนเซลล์สาหร่ายจะมีค่าคงที่คืออยู่ระหว่าง 26.4×10^4 – 17.4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร มีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 3.27 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และปริมาณเซลล์ลดลงเหลือ 4×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันสุดท้ายของการเจริญ เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลล์วันสุดท้ายเหลือเพียง 2×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 2.66 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง สำหรับเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ความเข้มข้น 6-32 กรัมต่อลิตร พบว่าจะมีผลทำให้เซลล์ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและไม่พบเซลล์เหลืออยู่เลย ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง จากการทดลองพบว่าถ้าเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 2 กรัมต่อลิตร เซลล์สาหร่ายจะมีการลดจำนวนอย่างรวดเร็วและตายในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.11 และ 4.12)



รูปที่ 4.11 ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 2 4 8 16 และ 32 กรัมต่อลิตร

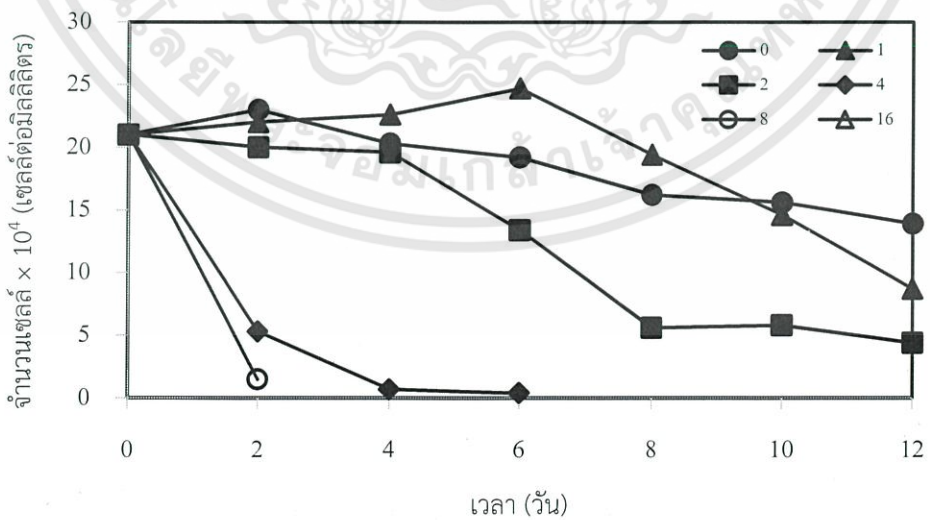
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่มีวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 2 4 8 16 และ 32 กรัมต่อลิตร

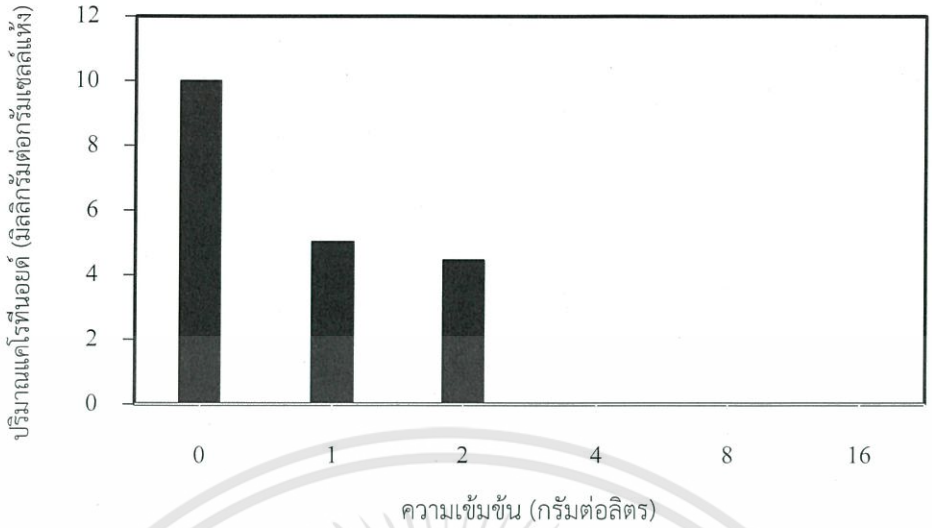
4.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในสภาวะเครียดที่เติมโซเดียมอะซิเตต

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารสูตร JM ที่เติมวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และไบโอติน ตามความเข้มข้นเดียวกับข้อ 4.3 จากนั้นเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่ให้แสงและมีการเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 วัน เพื่อให้สาหร่ายเจริญเต็มที่ ทำการชักนำให้ผลิตแคโรทีนอยด์ในสภาวะเครียดโดยเติมโซเดียมอะซิเตตในอาหารที่เพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 4 8 และ 16 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเดิมอีก 12 วัน ทำการตรวจหาปริมาณแคโรทีนอยด์และจำนวนเซลล์ทั้งหมด แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ จากการศึกษาพบว่า ถ้าเติมโซเดียมอะซิเตตเพิ่มขึ้นปริมาณเซลล์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด สำหรับอาหารที่ไม่ได้เติมเกลือโซเดียมอะซิเตตจะให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 21×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวันสุดท้ายจะเหลือเซลล์เท่ากับ 13.9×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.13 และ 4.14)



รูปที่ 4.13 ปริมาณเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร และเติมวิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร เติมโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0 1 2 4 8 และ 16 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร JM ที่มีวิตามินบี 1 0.08 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร ไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0 2 4 8 และ 16 กรัมต่อลิตร

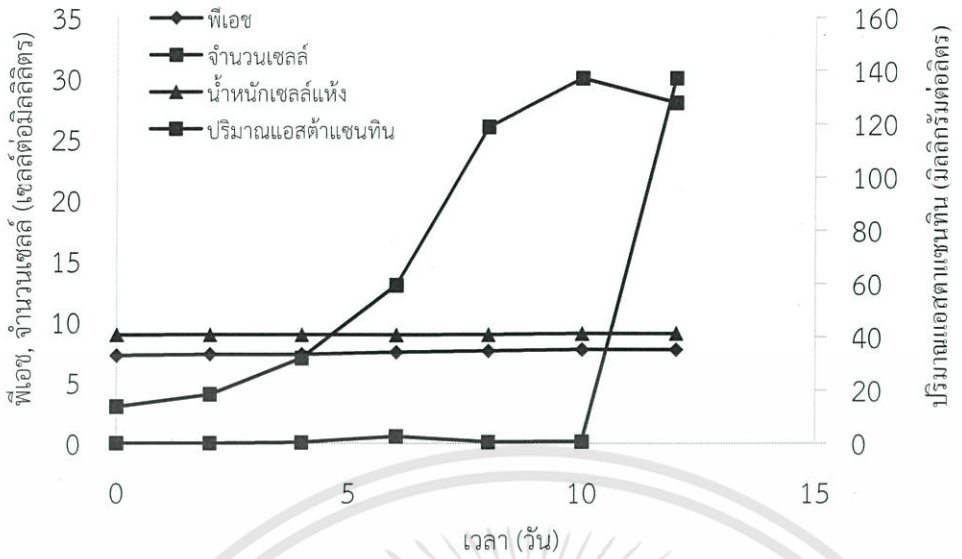
อาหารที่เติมโซเดียมอะซิเตต 1 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์เท่ากับ 5.03 และ 4.46 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ปริมาณเซลล์จะลดลงเหลือ 8.7×10^4 และ 4.4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และพบว่าอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เติมเกลือโซเดียมอะซิเตตตั้งแต่ 4-16 กรัมต่อลิตร เซลล์สาหร่ายเริ่มลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 ของการเจริญ เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 12 วัน เซลล์สาหร่ายตายหมด

Orasa และคณะ (2001) รายงานว่าการชักนำ *H. pluvialis* ให้มีปริมาณแอสตาแซนทินสูงที่สุดเท่ากับ 22.7 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BBM ที่ไม่มีไนโตรเจนและมีโซเดียมอะซิเตต 100 มิลลิโมลา ที่ความเข้มแสงสูง 350 โมโคโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที

4.6 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักแบบอากาศยกตัว (air lift)

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังหมักที่มีอาหาร 1500 มิลลิลิตรในสภาวะให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และพ่นอากาศอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 วัน สาหร่ายเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 วัน ในสภาวะเครียดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.3 – 4.5 จากนั้นตรวจผลการเจริญโดยตรวจนับจำนวนเซลล์ ปริมาณแอสตาแซนทินที่สาหร่ายผลิตได้ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์วันสุดท้ายมีค่า 2.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินได้ 137.23 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของสาหร่ายมีลักษณะจับตัวเป็นกลุ่มตกอยู่ก้นของถังหมัก เซลล์สาหร่ายส่วนมากมีสีแดงอยู่ภายในเซลล์ คือมีการสะสมของแอสตาแซนทิน เนื่องจากสภาวะการเลี้ยงมีการขาดแคลนอาหารในระยะสุดท้าย เซลล์จึงมีการปรับตัวและสะสมแอสตาแซนทินมากขึ้น ลักษณะของเซลล์แสดงในรูปที่ 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณแอสตาแซนทิน และค่าพีเอชจากการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในถังหมักแบบอากาศยกตัวในอาหาร JM ดัดแปลงที่มีวิตามินบี 1 วิตามินบี 12 และไบโอตินที่ความเข้มข้น 0.08, 0.08 และ 0.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไม่เติมโซเดียมอะซิเตต และโซเดียมคลอไรด์

แต่อย่างไรก็ตามการสะสมแอสตาแซนทินจาก *H. pluvialis* จะต้องมีปริมาณ 15 – 30 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง จึงจะใช้เป็นแหล่งผลิตแอสตาแซนทินทางการค้าได้ (Sarada และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ศึกษาการเจริญของ *Haematococcus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ BB BG-11 และ JM พบว่าอาหาร JM เป็นอาหารที่ให้การเจริญของสาหร่ายสูงสุด 24.8 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.3889 กรัมต่อลิตร จากนั้นศึกษาผลของวิตามินบี 1 บี 12 และไบโอติน ที่เติมในอาหารที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.05 0.08 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที และให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ พบว่าอาหาร JM ที่เติมวิตามิน บี 1 0.08 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 0.08 กรัมต่อลิตร และไบโอติน 0.08 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.4092 กรัมต่อลิตร

เมื่อศึกษาสภาวะในการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหาร JM ที่เติมวิตามินบี 1 บี 12 และไบโอติน ที่ความเข้มข้นชนิดละ 0.08 กรัมต่อลิตร โดยไม่เติมแหล่งไนโตรเจนและโซเดียมคลอไรด์ในถังหมักแบบอากาศยกตัวที่เติมอาหาร 1500 มิลลิลิตร ที่มีการให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีการเติมอากาศอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 วัน ได้ผลผลิตเซลล์ 2.8 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณแอสตาสูงสุด 137.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเจริญ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทินได้ปริมาณสูง

2. ควรหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญให้ได้เซลล์มากที่สุด เช่น การแปรผันธาตุอาหาร ความเข้มแสง และอุณหภูมิก่อนการชักนำให้เกิดสภาวะเครียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นรารมณ์ เรืองแก้ว และ นัฏฐา ทับนิล. 2555. ผลของเกลือฟอสเฟตและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* CCAL 840. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 2, โชตนาพริ้นท์, เชียงใหม่.

สุดสายชล หอมทอง. 2541. การผลิตแอสตาแซนทินจากสาหร่าย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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

Boussiba, S. and Vonshak,A. 1991. Astaxanthin Accumulation in the Green
Alga *Haematococcus pluvialis. Plant and Cell Physiology,* 32 (7), 1077–1082.

Cordero, B., Otero, A., Patiño, B., Arredondo,B.O., Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. Biotechnology Letters. 18 (2), 213-218.

Dominguez-Bocanegra, A.R., Legarreta, I.G., Jeronimo, F.M. and Campocosio, A.T. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 92 (2), 209-214.

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

Fan, L., Vonshak, A. and Boussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis*. Journal of Phycology, 30 (5), 829-833.

Gong X. and Chen F. 1998. Influence of medium component on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. Process Biochemistry. 33 : 385 – 391.

Goksan, T., Ak, I. and Kılı, C. 2011. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11, 377-383.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Guerin, M., Huntley, M.E., and Olaizola, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends in Biotechnology, 21(5), 210-216.

Harker, M., Tsavalos, A.J. and Yong, A.J. 1995. Use of response surface methodology to optimize carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. Journal of Applied Phycology. 7(4):399-40.

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

Harker, M., Tsavalos, A.J. and Young, A.J. 1996b. Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 55 (3), 207–214.

Imamoglu, E., Dalay, M.C. and Sukan, F.V. 2009. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. New Biotechnology, 26 (3-4), 199-204.

Jaime, L., Rodríguez-Meizosob, I., Cifuentesb, A., Santoyoa, S., Suarezc, S., Ibáñezb, E. and Señorans, F.J. 2010. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. LWT - Food Science and Technology, 43 (1), 105-112.

Johnson, E.A. and An, G-H. 1991. Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Biotecnology, 11 (4), 297-326.

Kobayashi, M., Toshide, K. and Nagai, S. 1991. Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in aceticmedia. Journal Fermentation Bioengineer. 75, 335–339.

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

Lee, H-S., Seo, M-W., Kim, Z-H. and Lee, C.-G. 2015. Determining the best specific light uptake rates for the lumostatic cultures in bubble column photobioreactors. Enzyme and Microbial Technology, 39, 447-452.

Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F. and Hu, Q. 2010. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). Journal of Applied Phycology, 22 (3), 253–263.

Lorenz, R.T. and Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology, 18 (4), 160-167.

Marz, U. 2005. The global market for carotenoid. Business Communications Co. Inc. Report GA. 110R 130 pp.

Nguyen, K. 2013. Astaxanthin: a comparative case of synthetic VS. natural production. Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works. http://trace.tennessee.edu/utk_chembiopubs/94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomolecular Engineering, 20 (4-6), 459-466.

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

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

Tripathi, U. Sarada, Ramachandra Rao,R.S., Ravishankar,G.A. 1999. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. Bioresource Technology, 197-199.

Sushanta, S.K., Edward, M.H., Jeremiah, H., Siobhan, M., Daniel, W. and Patrick, M. 2013. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology 128:118–124.

Yokoyama, A., Izumida, H. and Miki, W. 1994. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxan thin by the marine bacterium *Agrobacterium aurantiacu*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 58 : 1842 – 1844.

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

Yuan, P.J. and Chen, F. 2001. Kinetics for the reversible isomerization reaction of *trans* – astaxanthin. Food Chemistry. 73 : 131 – 137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สูตรอาหาร

ก-1 สูตรอาหาร Bold's Basal Medium (BBM)

โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	10	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	15	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	175	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	4	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	25	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.513	กรัมต่อลิตร
ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	4.976	กรัมต่อลิตร
Trace element	1	มิลลิลิตร
Trace element		
โซเดียมเอทิลีนไดอะมีน เตตระอะซิติก (EDTA)	49.34	กรัมต่อลิตร
กรดบอริค (H_3BO_3)	10.948	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสตลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	1.445	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	8.827	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	1.572	กรัมต่อลิตร
โคบอลท์(II)ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)	0.389	กรัมต่อลิตร

ชั่งสารเคมีตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้น้ำกลั่นละลายสารเคมีแต่ละชนิด แล้วนำมาผสมให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.8 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก-2 สูตรอาหาร Jaworski' Medium (JM)

(1) Ca(NO3)2.4H2O	12.00	กรัมต่อลิตร
(2) KH2PO4	12.40	กรัมต่อลิตร
(3) MgSO4.7H2O 10.0 g	50.00	กรัมต่อลิตร
(4) NaHCO3 3.18 g	15.90	กรัมต่อลิตร
(5) EDTAFeNa 0.45 g	2.25	กรัมต่อลิตร
EDTANa2 0.45g	2.25	กรัมต่อลิตร
(6) H3BO3 0.496 g	2.48	กรัมต่อลิตร
MnCl2.4H2O 0.278 g	1.39	กรัมต่อลิตร
(NH4)6Mo7O24.4H2O 0.20 g	1.00	กรัมต่อลิตร
(7) Cyanocobalamin 0.008 g	0.04	กรัมต่อลิตร
Thiamine HCl 0.008 g	0.04	กรัมต่อลิตร
Biotin 0.008 g	0.04	กรัมต่อลิตร
(8) NaNO3 16.0 g	64.00	กรัมต่อลิตร
(9) Na2HPO4.12H2O 7.2 g	36.00	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งสารเคมีตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้น้ำกลั่นละลายสารเคมีแต่ละชนิด แล้วนำมาผสมให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.8 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้