การเพิ่มผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. TISTR 8266

น.ส.โยษิตา สวนแก้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Enhancement of Lutein Production in Green Microalga *Chlorococcum* sp. TISTR 8266

Miss Yosita Suankaew

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
FACULTY OF ENGINEERING
Chulalongkorn University
Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. TISTR 8266
โดย	น.ส.โยษิตา สวนแก้ว
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

---------- คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

---------- ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพร คิม)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข)

---------- กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.อาทิวรรณ โชติพฤกษ์)

---------- กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โยษิตา สวนแก้ว : การเพิ่มผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. TISTR 8266. (Enhancement of Lutein Production in Green Microalga *Chlorococcum* sp. TISTR 8266) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.กษิดิศ หนูทอง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 แบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ให้มีผลผลิตลูทีนมากที่สุด โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อผลผลิตลูทีน ได้แก่ ความเข้มข้นของไนโตรเจนและแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 25% (62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) เป็นสภาวะที่ให้ความเข้มข้นของลูทีนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองอื่น จากนั้นศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่สามารถเพิ่มผลผลิตลูทีน โดยในแต่ละชุดทดลองใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับผลการทดลองที่ได้รับก่อนหน้า ผลการศึกษาพบว่าจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตลูทีนได้มากที่สุด เมื่อได้สภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้วจึงดำเนินการศึกษาในเรื่องของการให้แสง จากผลการศึกษาพบว่าการให้แสงสีขาวจากหลอดไฟแอลอีดีที่ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที เป็นสภาวะที่ได้รับความเข้มข้นของลูทีนสูงที่สุด ในส่วนสุดท้ายของงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยในการทดลองจะใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดที่ได้รับจากผลการทดลองตามที่ได้กล่าวไปข้างต้น อีกทั้งยังมีการเพิ่มชุดทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ เพื่อลดข้อจำกัดเรื่องธาตุอาหารไนโตรเจน จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3% โดยปริมาตร ให้ความเข้มข้นของลูทีนสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอากาศที่ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร และยังพบว่าชุดทดลองที่มีการจำกัดไนโตรเจน (25% $NaNO_3$) มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสะสมของลูทีนในชีวมวล แต่สภาวะดังกล่าวได้รับความเข้มข้นของลูทีนที่ต่ำกว่าชุดทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ ดังนั้นสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติร่วมกับการให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3% โดยปริมาตร จึงเป็นสภาวะที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพให้กับภาพรวมของระบบ โดยสภาวะนี้ให้ความเข้มข้นลูทีนมากกว่าชุดควบคุมสูงถึง 3 เท่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2565 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

6470403321 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORD: Lutein production, Chlorococcum sp., Carotenoids production, Photobioreactor

Yosita Suankaew : Enhancement of Lutein Production in Green Microalga *Chlorococcum* sp. TISTR 8266. Advisor: Assoc. Prof. KASIDIT NOOTONG, Ph.D. Co-advisor: Sorawit Powtongsook, Ph.D.

This research optimized the batch cultivation of *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 in a 1-L stirred tank photobioreactor to maximum lutein production. Nitrogen concentration and nitrogen source in culture medium, light intensity, light wavelength, and carbon dioxide were studied in this research. The results showed that microalgae culture with 25% $NaNO_3$ in BG-11 medium (62 mg-N/L) received the highest lutein concentration. Then study the nitrogen sources to increase lutein concentration by using nitrogen concentrations equal to the previous experiments. The results showed that microalgae cultured in a medium containing $NaNO_3$ as a nitrogen source produced the highest lutein. The suitable condition of the culture medium was obtained, then a study on the lighting. The results showed that the white light from the LED at 201 μmol photons/ m^2/s obtained the highest lutein concentration. The last part of this research was studied the effect of carbon dioxide. The suitable conditions obtained from the studies mentioned above were used in this part. Furthermore, the experiments were also added using BG-11 to reduce nitrogen nutrient deficiency. The results indicated that the culture with air mixed with carbon dioxide 0.3% v/v received a lutein concentration than the air mixed with carbon dioxide 2.5% v/v. The nitrogen-limited (25% $NaNO_3$) played an important role in lutein content but lutein concentration was lower than the BG-11 experimental. Therefore, culturing in BG-11 medium with air mixed with carbon dioxide 0.3% v/v is a condition that can enhance the overall system performance, the concentration of lutein was 3 times higher than the control.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Chemical Engineering	Student's Signature .....
Academic Year:	2022	Advisor's Signature .....
		Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับการให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการดำเนินงานวิจัย ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ รวมถึงตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่นนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพร คิม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.อาทิวรรณ โชติพฤกษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาให้ข้อเสนอแนะและแนวคิดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์สำหรับวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งสถานที่ และเครื่องมือในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณพี่ๆ ที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์จุลสาหร่าย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ซึ่งคอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนคอยช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหาในทุกๆ ด้านและคอยชี้แนะแนวทางที่ถูกต้อง ทำให้การดำเนินงานวิจัยเรื่องนี้มีความราบรื่นไปได้ด้วยดี

โยษิตา สวนแก้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตงานวิจัย 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* 7

2.2 การเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย 7

2.2.1 กราฟการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย 7

2.2.2 การสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่าย 8

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* 9

2.3 รงควัตถุ 10

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลูทีนในจุลสาหร่าย 14

2.4.1 ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง 14

2.4.2 ความเข้มข้นและแหล่งของไนโตรเจน 14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.3 อุณหภูมิ....15
2.4.4 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์....16
2.5 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีน....17
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย....24
3.1 แผนผังสรุปการดำเนินการวิจัย....24
3.2 การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อจุลสาหร่าย....25
3.3 การศึกษาผลของการปรับความเข้มข้นไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลผลิตลูทีน....26
3.4 การศึกษาผลของการปรับแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลผลิตลูทีน....27
3.5 การศึกษาผลของการปรับความเข้มแสงต่อผลผลิตลูทีน....29
3.6 การศึกษาผลของการปรับความยาวคลื่นแสงต่อผลผลิตลูทีน....30
3.7 การศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตลูทีน....32
3.8 การวิเคราะห์ผล....34
3.8.1 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง....34
3.8.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์....34
3.8.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์....35
3.8.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของลูทีน....36
3.8.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ....36
3.8.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ....37
3.8.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน....38
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง....39
4.1 การปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ....39
4.2 การปรับแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ....44
4.3 การปรับความเข้มแสง....50
4.4 การปรับความยาวคลื่นแสง....56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.5 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตลูทีน 62
4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 71
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....72
5.1 สรุปผลการทดลอง 72
5.2 ข้อเสนอแนะ 79
บรรณานุกรม 80
ภาคผนวก 87
ประวัติผู้เขียน..... 114

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง.....17

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้แหล่งของไนโตรเจนต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง.....19

ตารางที่ 2.3 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความเข้มแสงต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง.....20

ตารางที่ 2.4 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความยาวคลื่นแสงต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง.....21

ตารางที่ 2.5 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง.....23

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 25

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3.....27

ตารางที่ 3.3 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.4.....28

ตารางที่ 3.4 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.5.....30

ตารางที่ 3.5 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.6.....31

ตารางที่ 3.6 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.7.....33

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของลูทีน ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีน จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน.....44

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของลูทีน ลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีน จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร.....50

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของลูทีน ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีน จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมล/ตารางเมตร วินาที 55

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของลูทีน ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีน จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็น แสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน.....62

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นของลูทีน ลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีน จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C) 68

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยง.....69

ตารางที่ 5.1 สรุปผลการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 และอัตราการผลิตชีวมวล.....75

ตารางที่ 5.2 สรุปผลการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง 77

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 กราฟการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย 8

รูปที่ 2.2 แคโรทีนอยด์หลักที่ตรวจพบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum*.....12

รูปที่ 2.3 แผนภาพของการสังเคราะห์ลูทีนในจุลสาหร่าย 13

รูปที่ 4.1 (a) น้ำหนักแห้ง (b) น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน.....41

รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum sp.* TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน.....42

รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง จุลสาหร่าย *Chlorococcum sp.* TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน 42

รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน.....43

รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน.....43

รูปที่ 4.6 (a) น้ำหนักแห้ง (b) น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร.....47

รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร....48

รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นของลูทีน และปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง จุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร....48

รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร....49

รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร....49

รูปที่ 4.11 น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที....53

รูปที่ 4.12 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที....53

รูปที่ 4.13 ความเข้มข้นของลูทีน และปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง จุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที....54

รูปที่ 4.14 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที....54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.15 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที 55

รูปที่ 4.16 (a) น้ำหนักแห้ง (b) น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน.....59

รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน.....60

รูปที่ 4.18 ความเข้มข้นของลูทีน และปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง จุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน.....60

รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และ แสงสีน้ำเงิน.....61

รูปที่ 4.20 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และ แสงสีน้ำเงิน.....61

รูปที่ 4.21 น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C).....65

รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C) 66

รูปที่ 4.23 ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง จุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหาร BG-11 สูตรปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหาร BG-11 สูตรปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C).....66

รูปที่ 4.24 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum sp.* TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C) 67

รูปที่ 4.25 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C) 67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของงานวิจัย

ลูทีน (Lutein) เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์สีเหลืองที่มีศักยภาพการใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย เช่น เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาเพื่อปกป้องเยื่อหุ้มจอประสาทตาจากแสงสีฟ้า ช่วยปรับปรุงการมองเห็น ป้องกันการเป็นต้อกระจก [1] ช่วยต้านมะเร็ง [2] ช่วยบรรเทาอาการโรคหัวใจและหลอดเลือด [3] และยังเป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์น้ำหรือเพิ่มสีสันให้แก่ปลาสวยงาม [4] ลูทีนพบได้มากในกลีบของดอกดาวเรืองและมีการนำไปสกัดเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ โดยกลีบของดอกดาวเรืองมีลูทีนประมาณ 0.03% ของน้ำหนักแห้ง [5] อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของการผลิตลูทีนจากดอกดาวเรืองคือการเก็บเกี่ยวและแยกกลีบดอกที่มีต้นทุนสูง และการใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อพื้นที่สำหรับเพาะปลูกพืชเพื่อผลิตอาหาร [6]

จุลสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่ประกอบด้วยสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ตามธรรมชาติ ลูทีนเป็นหนึ่งในสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่พบในจุลสาหร่ายหลายชนิด โดยมีหน้าที่เก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงและปกป้องเซลล์จุลสาหร่ายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงสูง [7] ดังนั้นลูทีนจึงเป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการปรับตัวของจุลสาหร่ายให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงของความเข้มแสง จุลสาหร่ายมีศักยภาพในการนำมาผลิตลูทีนเชิงพาณิชย์เนื่องจากมีจุดแข็งหลายประการ เช่น (1) มีปริมาณลูทีนประมาณ 0.4% – 1.0% ของน้ำหนักแห้ง [8] ซึ่งมากกว่าปริมาณที่พบในดอกดาวเรือง (2) จุลสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าพืชบกซึ่งทำให้ได้รับผลผลิตต่อพื้นที่สูง [2] การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายไม่ต้องคำนึงถึงความอุดมสมบูรณ์ของดิน (4) การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสามารถดำเนินการได้ในระบบปิดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง (Photobioreactor) ซึ่งลดความต้องการน้ำอย่างมีนัยสำคัญ และ (5) การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสามารถนำของเสียจากกระบวนการผลิตอื่นๆ เช่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งมาใช้ประโยชน์ จากการค้นคว้าพบว่าจุลสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตลูทีน ได้แก่ *Muriellopsis* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. [8, 9] อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของ Powtongsook และ Nootong [10] รายงานการสะสมของลูทีนในจุลสาหร่าย*Chlorococcum* ที่ร้อยละ 25% – 40% ของปริมาณแคโรทีนอยด์ที่จุลสาหร่ายผลิตได้ จุดเด่นอื่นๆ ของจุลสาหร่ายชนิดนี้คือความสามารถในการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิและพีเอชค่อนข้างกว้างซึ่งทำให้เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง [11] อีกทั้งมีขนาดเซลล์ค่อนข้างใหญ่และมีแนวโน้มจับกันเป็นกลุ่มเซลล์ ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ด้วยวิธีการกรองหรือตกตะกอนซึ่งดำเนินการง่ายและค่าใช้จ่ายต่ำ [12]

กลยุทธ์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายและการสะสมของลูทีนในชีวมวลมีความสำคัญต่อความสำเร็จของการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อผลิตลูทีนเชิงพาณิชย์ การปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนมีรายงานว่ามีผลต่อการสะสมของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์จุลสาหร่าย แม้ว่ารายงานส่วนใหญ่จะเน้นการสะสมของแอสตาแซนทิน (Astaxanthin) ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ทุติยภูมิเป็นหลัก [13] การปรับปริมาณไนโตรเจนจำเป็นต้องพิจารณาถึงอัตราการเจริญเติบโตควบคู่กันไป เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่จุลสาหร่ายใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากไนโตรเจนพบว่าความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์จุลสาหร่ายเช่นกัน ผลการศึกษาของ Vaquero และคณะ [14] ซึ่งเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Coccomyxa onubensis* ที่ความเข้มแสงแตกต่างกันพบว่าการเพิ่มความเข้มแสงในช่วง 50 – 400 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร•วินาที ทำให้ลูทีนในชีวมวลลดลง 18% แต่เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตถึง 250% ผลการศึกษาดังกล่าวมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ซึ่งพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์และชีวมวลของจุลสาหร่ายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มแสงจาก 47 เป็น 1,000 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร•วินาที [12] ต่อมาผลการศึกษาของ Powtongsook และ Nootong [10] ซึ่งเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ความยาวคลื่นแสงที่ต่างกัน ได้แก่ แสงสีขาว (422 – 665 นาโนเมตร) แสงสีแดง (639 นาโนเมตร) และแสงสีน้ำเงิน (430 นาโนเมตร) พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวและแสงสีแดงได้รับชีวมวลในช่วงระยะการเติบโตคงที่ (Stationary Growth Phase) ใกล้เคียงกันคือ 566 ± 10 และ 579 ± 6 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีน้ำเงินมีระยะปรับตัว (Lag phase) ประมาณ 6 วัน และได้รับชีวมวลต่ำที่ 402 ± 6 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวและแสงสีแดง แต่ในทางกลับกันการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีน้ำเงินสามารถกระตุ้นการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นถึง 53% ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวและแสงสีแดงมีแคโรทีนอยด์ในชีวมวลเพิ่มขึ้นเพียง 14% และ 16% ตามลำดับ อีกทั้งพบว่าการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แก่จุลสาหร่ายสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายเช่นกัน [15, 16] อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษาถึงผลกระทบของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง รวมถึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ยังมีอยู่จำกัด ดังนั้นการศึกษาถึงผลกระทบจากปัจจัยในข้างต้นจึงมีความจำเป็นสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งานเชิงพาณิชย์ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- ศึกษาผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนและแหล่งของไนโตรเจนต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266
- ศึกษาผลของความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสงต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266
- ศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 การปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่ปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนในช่วง 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสงที่ 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และให้อากาศที่อัตรา 0.8 ลิตร/นาที (0.8 วีวีเอ็ม) ติดตามผลการทดลองโดยตรวจวัดน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.2 การปรับแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ความเข้มข้นตามผลการศึกษาในหัวข้อ 1.3.1 ควบคุมความเข้มแสงที่ 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ให้อากาศที่อัตรา 0.8 ลิตร/นาที ติดตามผลการทดลองโดยตรวจวัดน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.3.3 การปรับความเข้มแสง

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ความเข้มข้นและแหล่งของไนโตรเจนตามผลการศึกษาในหัวข้อ 1.3.1 และ

1.3.2 ปรับความเข้มแสงที่ใช้เพาะเลี้ยงในช่วง 134 - 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ให้อากาศที่อัตรา 0.8 ลิตร/นาที ติดตามผลการทดลองโดยตรวจวัดน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.4 การปรับความยาวคลื่นแสง

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ความเข้มข้นและแหล่งของไนโตรเจนตามผลการศึกษาในหัวข้อ 1.3.1 และ 1.3.2 ให้แสงจากหลอดไฟแอลอีดีโดยใช้แสงสีขาว แสงสีน้ำเงิน และแสงสีแดง ที่ความเข้มแสงตามผลการศึกษาในหัวข้อ 1.3.3 ให้อากาศที่อัตรา 0.8 ลิตร/นาที ติดตามผลการทดลองโดยตรวจวัดน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.5 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในสภาวะที่ได้รับจากผลการทดลองในหัวข้อ 1.3.1 – 1.3.4 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง ให้อากาศที่อัตรา 0.8 ลิตร/นาที และปรับระดับความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ติดตามผลการทดลองโดยตรวจวัดน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลผลิตจากงานวิจัยคือข้อมูลของความเข้มข้นไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 เพื่อผลิตลูทีน ซึ่งมีจุดแข็งมากกว่าการเพาะเลี้ยงพืชบกอาทิเช่น จุลสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าพืชบกทำให้ได้รับผลผลิตต่อพื้นที่สูง ต้องการน้ำในระหว่างการเพาะเลี้ยงต่ำ และสามารถนำของเสียจากกระบวนการผลิตอื่นๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ จากที่ได้กล่าวมานี้หากสามารถนำจุลสาหร่ายมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตลูทีน จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตและสามารถตอบสนองต่อโมเดลเศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียน และเศรษฐกิจสีเขียว (Bio-Circular-Green Economy) ในเรื่องของการบริหารจัดการอย่างยั่งยืนและการใช้ของเสียในกระบวนการผลิตให้เกิดประโยชน์ โดยผลการทดลองจากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 และจุลสาหร่ายชนิดอื่นในเชิงพาณิชย์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่าย *Chlorococcum*

จุลสาหร่าย *Chlorococcum* เป็นจุลสาหร่ายน้ำจืดที่ไม่เคลื่อนที่ มีลักษณะเซลล์เป็นทรงกลม ขนาดเซลล์ประมาณ 10 - 20 ไมโครเมตร มักพบเป็นกลุ่มโคโลนีประมาณ 2 - 4 เซลล์ จุลสาหร่ายสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิได้เป็นช่วงกว้าง (pH 6.1 - 9 และอุณหภูมิ 25 - 45 องศาเซลเซียส) เพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเติบโตเร็ว สามารถเพาะเลี้ยงกลางแจ้งได้ [11] จุดเด่นอีกประการของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* คือมีน้ำหนักเซลล์มากและเซลล์มีขนาดใหญ่ทำให้สามารถใช้วิธีการกรองหรือตกตะกอนในการเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ซึ่งดำเนินการง่ายและค่าใช้จ่ายต่ำ [12] การจัดเรียงลำดับอนุกรมวิธานของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* แสดงได้ดังด้านล่างนี้ [17]

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlorococcales

Family Chlorococcaceae

Genus Chlorococcum

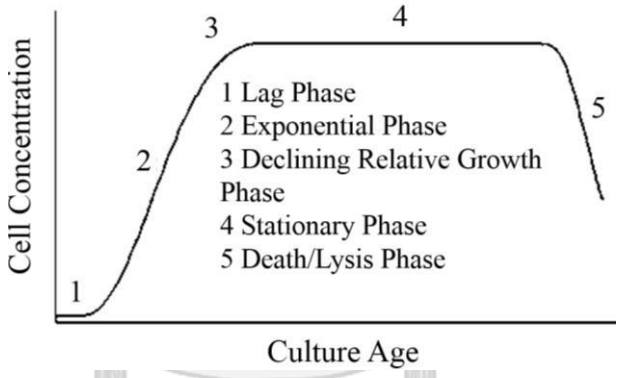
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 การเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย

2.2.1 กราฟการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย

กราฟทั่วไปของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบแบตช์ (Batch) จะเป็นไปตามกราฟรูปตัว S โดยแบ่งได้ 5 ระยะ (รูปที่ 2.1) ระยะแรก คือ ระยะปรับตัว (Lag phase) เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวเพื่อให้เข้ากับ

สิ่งแวดล้อมซึ่งเซลล์ที่ไม่สามารถปรับตัวได้จะตายลง ในระยะนี้ยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ระยะที่สอง คือ ระยะทวีคูณ (Exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว กราฟในระยะนี้มีลักษณะที่ชันมาก ระยะที่สาม คือ ระยะเฉื่อย (Phase of declining relative growth) เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตช้าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะทวีคูณ เนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่นมากเกินไปทำให้เกิดการบดบังกันเอง (Auto-Shading) หรือการขาดแคลนอาหารภายในระบบ ระยะที่สี่ คือ ระยะคงที่ (Stationary phase) เป็นระยะที่การเจริญเติบโตคงที่อันเนื่องมาจากธาตุอาหารในระบบลดน้อยลงหรืออาจมีการสะสมสารพิษบางอย่างในระบบ และระยะสุดท้าย คือ ระยะตาย (Death phase) เป็นระยะที่หยุดการเจริญเติบโตและเริ่มตายในที่สุด ซึ่งเป็นเหตุมาจากธาตุอาหารในระบบหมด



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2.1 กราฟการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย [18]

2.2.2 การสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่าย

จุลสาหร่ายใช้พลังงานแสงในช่วงคลื่น Photosynthetically Active Radiation (PAR) ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งมีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 400 - 700 นาโนเมตร ในกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างสารสีในจุลสาหร่ายกับโปรตีนในเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์เพื่อสร้างสารประกอบเชิงซ้อนในการกักเก็บพลังงานแสงหรือระบบแสง ซึ่งระบบแสงมี 2 ชนิด ได้แก่ ระบบแสง 1 (PS I) ซึ่งระบบแสงนี้จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และระบบแสง 2 (PS II) ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ทั้ง 2 ระบบ

แสงนี้จะทำงานร่วมกันเพื่อรีดิวซ์ NADP และ ADP ไปเป็น NADPH และ ATP ตามลำดับ พลังงานแสงที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) เพื่อออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสแล้วใช้ในกระบวนการหายใจและเก็บสะสมไว้เป็นอาหาร [19, 20]

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum*

แสง

แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่ายนั้นแสงจะทำหน้าที่เปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายมี 2 แหล่ง ได้แก่ แสงจากธรรมชาติ เช่น แสงจากดวงอาทิตย์ และแสงสังเคราะห์ เช่น หลอดไฟ โดยหลอดไฟที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงจะเป็นหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากแสงที่ปล่อยออกมาจากหลอดไฟชนิดนี้จะทำให้อุณหภูมิไม่เพิ่มสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดไฟชนิดอื่นๆ [17] ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ตามผลการศึกษาของภูไพรำ ภูไพบูลย์ [21] คือ 442 – 655 นาโนเมตร (แสงสีขาว) และ 639 นาโนเมตร (แสงสีแดง) และผลการศึกษาของ Cassidy [22] ได้รายงานว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* อยู่ในช่วง 13.41 - 134.07 ไมโครโมล-โฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดภายในเซลล์ และการทำงานของเอนไซม์ในโครงสร้างของจุลสาหร่าย ซึ่งส่งผลโดยตรงกับการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย [23] จากผลการศึกษาของ Ota และคณะ [24] ได้รายงานว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum*

ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรดเป็นด่างจะส่งผลต่อคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงจะทำให้จุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ไม่เหมาะสมจะเกิดความเป็นพิษต่อจุลสาหร่าย จากผลการศึกษาของ Karemore และคณะ [25] ได้รายงานค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* อยู่ในช่วง 6.1 - 9

ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย ถ้าจุลสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งปริมาณไนโตรเจนต่ำสุดที่จุลสาหร่ายต้องการคือร้อยละ 3 - 4 ของน้ำหนักแห้ง จากผลการศึกษาของ Feng และคณะ [26] ได้รายงานปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0 – 0.247 กรัม/ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.3 รงควัตถุ

รงควัตถุเป็นสารสีที่ถูกสะสมไว้ในคลอโรพลาสต์สำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยมีหน้าที่ดูดกลืนแสงเพื่อเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมี รงควัตถุหลักในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) [27, 28]

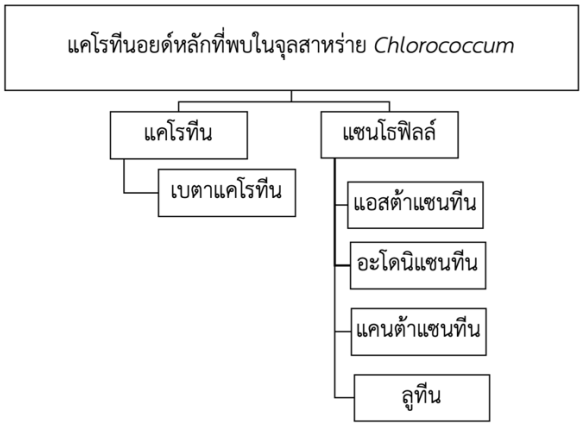
2.3.1 คลอโรฟิลล์

เป็นรงควัตถุหลักในคลอโรพลาสต์ที่มีสีเขียว เป็นสารจำพวกโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารอินทรีย์ มีคุณสมบัติในการดูดกลืนความยาวคลื่นแสงสีแดงและสีน้ำเงินได้ดีกว่าความยาวคลื่นแสงอื่น และดูดกลืนคลื่นแสงสีเขียวน้อยสุดจึงทำให้เห็นคลอโรฟิลล์เป็นสีเขียว คลอโรฟิลล์สามารถเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานเคมีได้โดยตรงในกระบวนการสังเคราะห์แสง [29]

2.3.2 แคโรทีนอยด์

เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง มีหน้าที่ช่วยเก็บพลังงานจากแสงในช่วงความยาวคลื่นที่รงควัตถุหลัก เช่น คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) และคลอโรฟิลล์บี (chlorophyll b) ไม่สามารถดูดกลืนได้ รวมไปถึงช่วยปกป้องส่วนประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic apparatus) จากความเสียหายและอันตรายจากแสง [30] อีกทั้งยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ภายในเซลล์อีกด้วย [31] แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่ม โดยโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ทุกชนิดจะมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยคาร์บอน 40 อะตอม และภายในโมเลกุลจะมีพันธะคู่ (double bond) อยู่มาก โดยรูปแบบของการเชื่อมต่อกันระหว่างอะตอมของคาร์บอนด้วยพันธะคู่ภายในสายโครงสร้างโพลีอีนแบคโบน (polyene backbone) ของแคโรทีนอยด์นี้เองที่เป็นตัวกำหนดความสามารถของแคโรทีนอยด์ในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิด [32] อีกทั้งยังเป็นบริเวณที่ส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์ [33] นอกจากนี้แคโรทีนอยด์ในหลายชนิดจะพบโครงสร้างที่เป็นวงแหวนที่บริเวณส่วนปลายของโมเลกุล ซึ่งบริเวณนี้จะเป็นตำแหน่งที่สามารถเติมหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่มีออกซิเจนได้ สามารถจัดกลุ่มของแคโรทีนอยด์ได้เป็นสองกลุ่ม ได้แก่ แคโรทีน (carotene) ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีเพียงคาร์บอนและไฮโดรเจนอยู่ในโมเลกุลเท่านั้น และกลุ่มที่สองคือ แซนโธฟิลล์ (xanthophyll) ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีทั้งคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน อยู่ในโมเลกุล แคโรทีนอยด์หลักที่พบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* แสดงดังรูปที่ 2.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 2.2 แคโรทีนอยด์หลักที่ตรวจพบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* [21]

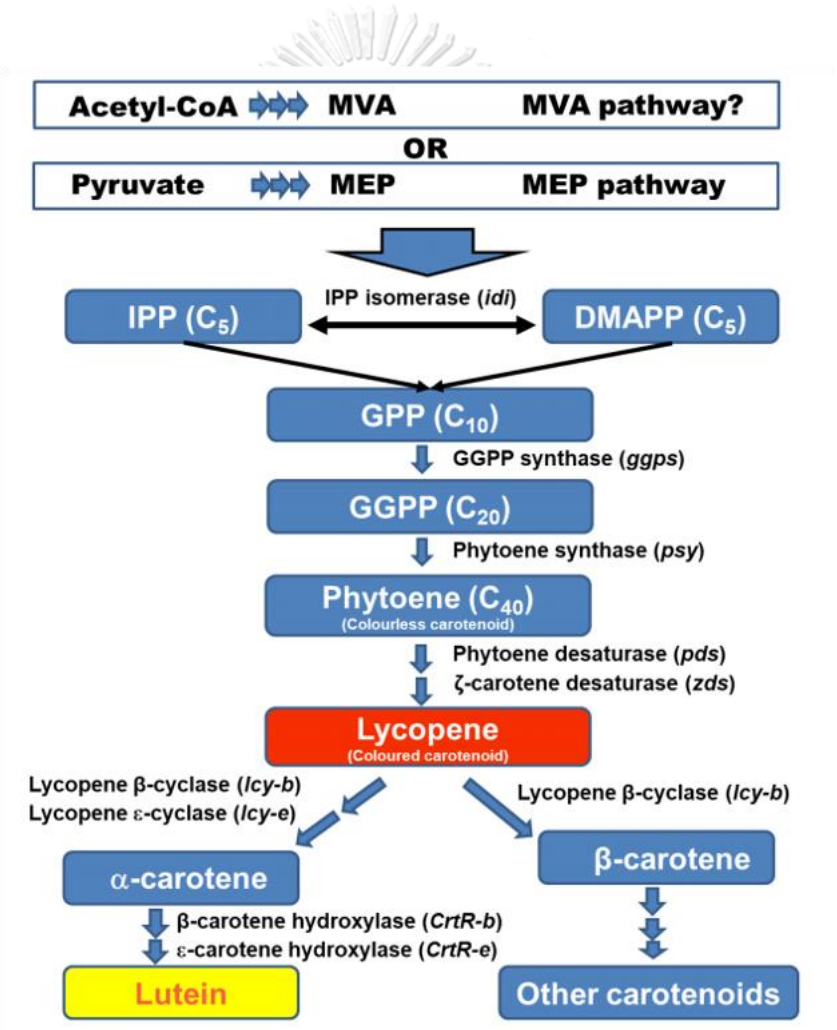
2.3.3 ลูทีน

ลูทีน เป็นรงควัตถุหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีสีเหลือง ลูทีนทำหน้าที่เป็นเม็ดสีเสริมและช่วยเก็บเกี่ยวพลังงานแสงสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ลูทีนยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ ซึ่งช่วยปกป้องส่วนประกอบต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงจากความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในสภาวะความเครียด [34] ลูทีนมีความสามารถในการรักษาโรคจอประสาทตาเสื่อมตามวัย (AMD) และใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมยา อาหาร เครื่องสำอาง และอาหารสัตว์ [35]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

กระบวนการสังเคราะห์ลูทีนทางชีวภาพของจุลสาหร่ายเริ่มจากการสังเคราะห์ isopentenyl diphosphate (IPP) และ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งสารทั้งสองนี้ได้มาจากกระบวนการ MVA โดยมี Acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้น หรือกระบวนการ MEP ที่มี pyruvate เป็นสารตั้งต้น IPP และ DMAPP จะรวมโมเลกุลกันเป็น geranyl pyrophosphate (GPP) ที่มี 10 โมเลกุลคาร์บอน หลังจากนั้นจะเกิดการสังเคราะห์ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) ด้วยเอนไซม์ GGPP synthase เมื่อ GGPP 2 โมเลกุลรวมกันผ่านการทำงานของเอนไซม์ phytoene synthase (PSY) จะเกิดเป็น phytoene ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์โมเลกุลแรกในกระบวนการสังเคราะห์ลูทีนที่มีคาร์บอน 40 อะตอม ถัดไปเป็นการสังเคราะห์ lycopene ซึ่งเป็นสารที่มีสีโดยผ่าน

การทำงานของเอนไซม์ phytoene desaturase (PDS) และ zeta-carotene desaturase (ZDS) โดย lycopene เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง α-carotene และ β-carotene เอนไซม์ lycopene β-cyclase (lcy-b) จะเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายทั้งสองข้างของ lycopene เพื่อสร้างเป็น β-carotene แล้วเปลี่ยนเป็นแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ ต่อไป ในขณะเดียวกันเอนไซม์ lycopene β-cyclase (lcy-b) และ lycopene ε-cyclase (lcy-e) จะเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายทั้งสองข้างของ lycopene เพื่อสร้าง α-carotene และในขั้นตอนสุดท้ายเอนไซม์ β-carotene hydroxylase (CrtR-b) และ ε-carotene hydroxylase (CrtR-e) จะเปลี่ยน α-carotene ให้เป็นลูทีน



รูปที่ 2.3 แผนภาพของการสังเคราะห์ลูทีนในจุลสาหร่าย [36]

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลูทีนในจุลสาหร่าย

2.4.1 ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง

ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสงเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงและการสะสมชีวมวลในจุลสาหร่าย ความเข้มแสงถือเป็นปัจจัยความเครียดที่สำคัญสำหรับการกระตุ้นการสะสมของแคโรทีนอยด์ในเซลล์จุลสาหร่าย ความเข้มแสงมีอิทธิพลต่อกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงภายใต้เงื่อนไขที่แตกต่างกันสามประการ (1) การให้แสงที่จำกัด ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ (2) การให้แสงที่เหมาะสม ช่วยทำให้อัตราการใช้แสงและอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงมีความสมดุลกัน และ (3) การให้แสงที่มากเกิน ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์แสง [37] ลูทีนมีความสัมพันธ์ทางโครงสร้างกับส่วนประกอบต่างๆ ที่ซับซ้อนในการเก็บเกี่ยวแสง (light harvesting complex antennas) ภายใต้ความเข้มแสงสูงจะเกิดการกระตุ้นให้มีการสะสมลูทีน ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อความเครียดจากแสงในเซลล์จุลสาหร่าย [14, 38] ในบางครั้งความเข้มแสงที่สูงอาจสร้างความเสียหายอย่างถาวรต่อเซลล์จุลสาหร่ายส่งผลให้ชีวมวลลดลง ชี้ให้เห็นว่าการปรับความเข้มแสงให้เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการสะสมลูทีนในเซลล์ของจุลสาหร่าย จากการสืบค้นงานวิจัยในอดีตพบว่ามีการศึกษาผลของความยาวคลื่นแสงที่แตกต่างกันโดยใช้หลอดไฟ LED ที่ความยาวคลื่นแสงในช่วงแสงสีน้ำเงิน สีแดง สีเขียว และสีขาว เป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งได้รายงานว่าจุลสาหร่ายสามารถสะสมปริมาณลูทีนสูงขึ้นเมื่อใช้แสงสีน้ำเงินเป็นแหล่งกำเนิดแสง เนื่องจากลูทีนจะดูดซับแสงสีน้ำเงินได้มากกว่าแสงสีอื่น [39-42] ดังในผลการศึกษาของ Ho และคณะ [40] ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* โดยใช้แสงสีแดงได้รับการสะสมลูทีนต่ำที่สุด (ประมาณ 3 - 4 มิลลิกรัม/กรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับแสงสีน้ำเงิน สีเขียว และสีขาว (ประมาณ 3.18 - 4.84 มิลลิกรัม/กรัม) อีกทั้งความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมสำหรับการสะสมลูทีนในจุลสาหร่ายนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ด้วย

2.4.2 ความเข้มข้นและแหล่งของไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย ซึ่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีน กรดนิวคลีอิก และคลอโรฟิลล์ ที่มีอิทธิพลต่อปริมาณ

สารชีวเคมีของจุลสาหร่าย โดยปกติการสังเคราะห์ลูทีนในจุลสาหร่ายจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นภายใต้แหล่งของแสงที่เหมาะสม [38] แต่ก็มีรายงานว่าการจำกัดไนโตรเจนทำให้เกิดการสะสมของลูทีนในจุลสาหร่ายบางชนิด [43, 44] นอกจากนี้ความเข้มข้นของลูทีนจะลดลงเมื่อไนโตรเจนหมดลง เป็นผลมาจากการขาดไนโตรเจนสร้างความไม่สมดุลของเอนไซม์ในเซลล์จุลสาหร่าย [45, 46] อย่างไรก็ตามแหล่งของไนโตรเจนต่อการสะสมลูทีนในจุลสาหร่ายนั้นยังมีการศึกษาที่ไม่มากนักโดย Ho และคณะ [47] ได้ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* FSP-3 เพื่อศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 3 แหล่ง ได้แก่ $(Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และ CH_4N_2O (ยูเรีย) ด้วยความเข้มข้นเท่ากันที่ 8.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าการใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้การผลิตชีวมวลสูงกว่าการใช้ NH_4 และยูเรียประมาณ 2 - 3 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย*S. obliquus* FSP-3 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Neochloris oleoabundans* ที่ใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีการเจริญเติบโตมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ NH_4 และยูเรีย [48] อย่างไรก็ตามยังมีจุลสาหร่ายบางชนิด เช่น *Ellipsoidion* sp. ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน [49] ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายขึ้นกับสายพันธุ์เช่นเดียวกับความเข้มแสง [50]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยความเครียดทางชีวภาพที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่กระตุ้นให้เกิดการสะสมของลูทีนในเซลล์จุลสาหร่าย เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึงขีดจำกัดที่จุลสาหร่ายสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้จะช่วยเพิ่มการผลิตลูทีน แต่ถ้าเพิ่มสูงเกินกว่าขีดจำกัดจะส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดความเครียดจากปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชัน [44] ในทางกลับกันอุณหภูมิที่ต่ำจะทำให้จุลสาหร่ายมีอัตราการผลิตชีวมวลลดลงส่งผลให้มีปริมาณลูทีนต่ำ จากผลการศึกษาของ Sánchez และคณะ [8] ได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Scenedesmus almeriensis* ที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าจุลสาหร่ายนี้ให้ปริมาณลูทีนสูงสุดที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด 0.56 วัน$^{-1}$ ในทางกลับกันทั้งปริมาณลูทีนและชีวมวลจะลดลงอย่างมากเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 10 องศาเซลเซียส ส่วนปริมาณลูทีนของ

จุลสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* FZU60 ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28, 33, 38 และ 43 องศาเซลเซียส เท่ากับ 8.12, 9.81, 9.70 และ 6.16 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ ซึ่งที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสายพันธุ์นี้ [7] และจุลสาหร่าย *Desmodesmus* sp. F51 เป็นจุลสาหร่ายที่ทนต่อความร้อน ซึ่งอุณหภูมิในการเจริญเติบโตที่เหมาะสมอยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งและอัตราการผลิตลูทีนเท่ากับ 5.05 มิลลิกรัม/กรัม และ 3.56 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ตามลำดับ ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 600 ไมโครโมล-โฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้น 8.8 มิลลิโมลาร์ [16] จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาทำให้สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มการผลิตลูทีนเนื่องจากความเครียดจากปฏิกิริยาโฟโตออกซิเดชัน ในขณะที่อุณหภูมิต่ำจะลดทั้งอัตราการผลิตชีวมวลและการผลิตลูทีน

2.4.4 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แก่จุลสาหร่ายสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ และส่งเสริมการสะสมลูทีน [15, 16] จากผลการทดลองของ Molino และคณะ [51] ที่เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Scenedesmus almeriensis* เพื่อศึกษาผลของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 0.5, 1.5 และ 3 % โดยปริมาตร ต่อการผลิตชีวมวลและลูทีน พบว่าการให้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 3 % โดยปริมาตร จะได้รับอัตราการผลิตชีวมวลและปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 360 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน และ 5.71 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ และผลการทดลองในงานวิจัยของ Ren และคณะ [52] ได้ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chromochloris zofingiensis* เพื่อศึกษาปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มผลผลิตลูทีน ซึ่งศึกษาที่ 2.5, 4 และ 5 % โดยปริมาตร ได้รับปริมาณลูทีนเท่ากับ 5.70 ± 0.20, 7.73 ± 0.52 และ 3.06 ± 0.19 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายลดลง อาจเป็นผลมาจากการที่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลง

2.5 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีน

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Chlorella sorokiniana	- เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.16 กรัม/ลิตร และเติมโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร - เพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิค (mixotrophic cultivation) - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - ควบคุมอุณหภูมิที่ 26 - 28 องศาเซลเซียส - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.2 วีวีเอ็ม	4.6	[53]
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.17 กรัม/ลิตร - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	3.63 ± 0.12	[40]

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Chlorella sorokiniana	- เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนและโซเดียมอะซิเตทเป็น 0.12 และ 1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.15 วีวีเอ็ม - อัตราการกวน 400 รอบ/นาที	9.81	[7]
Desmodesmus sp.	- เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Modified Bristol ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 4.3 มิลิโมลาร์ - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร	3.76	[54]

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้แหล่งของไนโตรเจนต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer ที่มีแคลเซียมไนเตรท ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน - ความเข้มแสง 300 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	4.61 ± 0.11	[47]
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer ที่มียูเรียความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน - ความเข้มแสง 300 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	2.18 ± 0.13	
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน - ความเข้มแสง 300 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	1.58 ± 0.08	

ตารางที่ 2.3 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความเข้มแสงต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Chlorella sorokiniana	- ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตและโซเดียมอะซิเตทเป็น 0.75 และ 1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ - ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.15 วีวีเอ็ม - อัตราการกวน 400 รอบ/นาที	9.81	[7]
Chlorella sorokiniana	- ความเข้มแสง 350 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต ฟอสเฟต และโซเดียมอะซิเตทเป็น 0.75, 0.06 และ 1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ - เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Bubble column photobioreactor) ขนาด 50 ลิตร - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.02 วีวีเอ็ม - ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส	10.96 ± 0.35	[55]

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความเข้มแสงต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Parachlorella sp.	- ความเข้มแสง 1,000 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 - เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบท่อ (tubular photobioreactor) - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยปริมาตร ที่อัตรา 0.5 วีวีเอ็ม - ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส	11.8	[56]

ตารางที่ 2.4 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความยาวคลื่นแสงต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีแดง (600 – 690 นาโนเมตร) - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	4.13 ± 0.09	[40]

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ความยาวคลื่นแสงต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีน้ำเงิน (435 - 515 นาโนเมตร) - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	4.57 ± 0.13	[40]
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีเขียว (480 – 580 นาโนเมตร) - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	4.72 ± 0.15	
Scenedesmus obliquus	- เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาว (410 – 610 นาโนเมตร) - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Detmer - เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 0.4 วีวีเอ็ม	4.84 ± 0.23	

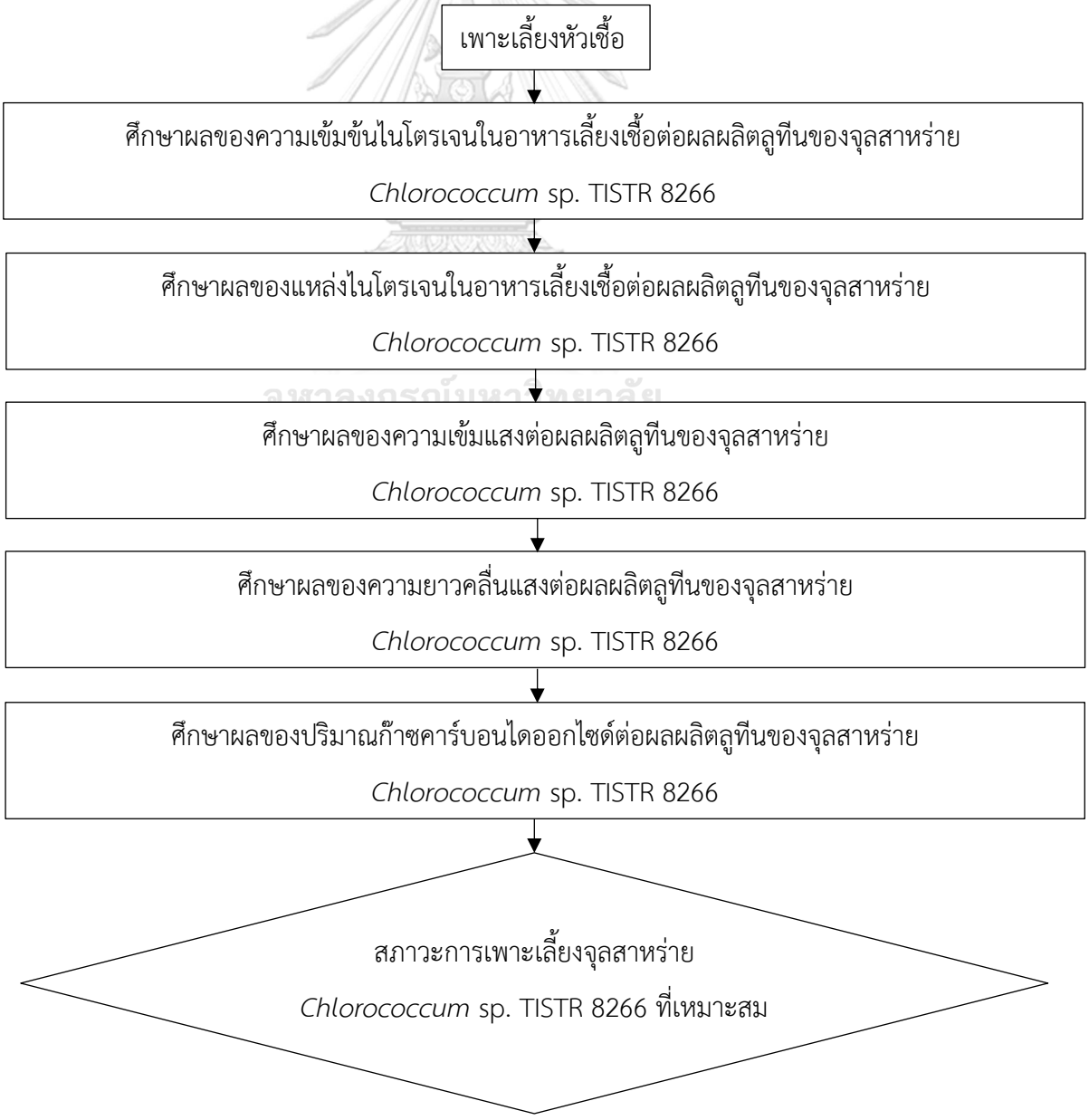
ตารางที่ 2.5 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสำหรับการผลิตลูทีนโดยใช้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง

สกุล	สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)	อ้างอิง
Desmodesmus sp.	- ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Modified Bristol ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 4.3 มิลิโมลาร์ - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส	3.76	[54]
Scenedesmus almeriensis	- ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 3% โดยปริมาตร - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Mann and Myers - ความเข้มแสง 54 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส	5.71	[51]
Chromochloris zofingiensis	- ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 4% โดยปริมาตร - เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Kuhl - ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที - เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Bubble column photobioreactor)	7.73 ± 0.52	[52]

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 จากศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 แผนผังสรุปการดำเนินการวิจัย



3.2 การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อจุลสาหร่าย

ทำการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 (ตารางที่ 3.1) นำหัวเชื้อจุลสาหร่ายปริมาตร 100 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ผสมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร (ขวดแก้วดูแรนและแท่งกวนแม่เหล็ก) ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำหัวเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยในงานวิจัยนี้จะกำหนดความเข้มข้นของหัวเชื้อจุลสาหร่ายเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสง (C_2) เท่ากับ 0.1 (เทียบเท่าน้ำหนักแห้งประมาณ 90 มิลลิกรัม/ลิตร) แล้วทำการคำนวณปริมาตรดังสมการที่ 3.1

$$C_1V_1 = C_2V_2 \qquad (3.1)$$

โดยที่ C_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของหัวเชื้อ, V_1 = ปริมาตรหัวเชื้อ, V_2 = ปริมาตรที่เพาะเลี้ยงในการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11[57]

ส่วนประกอบ	**ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)**
$NaNO_3$	1.500
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.040
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036
Na_2CO_3	0.020
Citric acid	0.006

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 [57]

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA	0.001
Trace metal mix A_5	1 mL
ส่วนประกอบของ Trace metal mix A_5	
H_3BO_3	2.860
$MnCl_2$	1.810
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.390
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.222
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.050

3.3 การศึกษาผลของการปรับความเข้มข้นไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลผลิตลูทีน

ทำการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ตามวิธีการในหัวข้อ 3.2 นำหัวเชื้อปริมาตรที่คำนวณได้จากสมการ 3.1 ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนออก แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนด้านล่างไปล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 0%, 25%, 50%, 100%, 125% และ 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 โดยแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ จากนั้นผสมหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับความเข้มข้นของไนโตรเจน ปริมาตร 0.9 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้เป็น 1 ลิตร ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ให้แสงสีขาวจากหลอดไฟแอลอีดีที่ความเข้มแสง 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที ควบคุมอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ระหว่างการทดลองได้เก็บตัวอย่างน้ำ 30 มิลลิลิตร จากขวดแก้วดูแรนเพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง**
<u>ตัวแปรต้น</u>	
1. ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	0% $NaNO_3$, 25% $NaNO_3$, 50% $NaNO_3$, 100% $NaNO_3$, 125 $NaNO_3$ และ 150% $NaNO_3$
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์
2. แคโรทีนอยด์	ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์
3. ลูทีน	ความเข้มข้นของลูทีน
4. ความเข้มข้นของธาตุอาหาร	ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (O.D.) = 0.1
2. ความเข้มแสง	134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที
3. อัตราการไหลของอากาศ	0.8 ลิตร/นาที
4. อัตราการกวนของเหลวภายในถัง	900 รอบ/นาที
5. อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4 การศึกษาผลของการปรับแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลผลิตลูทีน

ทำการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ตามวิธีการในหัวข้อ 3.2 นำหัวเชื้อปริมาตรที่คำนวณได้จากสมการ 3.1 ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนออก แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนด้านล่างไปล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับแหล่งของ

ไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และ CH_4N_2O (ยูเรีย) ที่ความเข้มข้นตามผลการศึกษาในหัวข้อ 3.3 โดยแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ จากนั้นผสมหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับแหล่งของไนโตรเจน ปริมาตร 0.9 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้เป็น 1 ลิตร ให้แสงสีขาวจากหลอดไฟแอลอีดีที่ความเข้มแสง 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที ควบคุมอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ระหว่างการทดลองได้เก็บตัวอย่างน้ำ 30 มิลลิลิตร จากขวดแก้วดูแรนเพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.3 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.4

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง**
<u>ตัวแปรต้น</u>	
1. แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	NaNO3, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และ ยูเรีย
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์
2. แคโรทีนอยด์	ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์
3. ลูทีน	ความเข้มข้นของลูทีน
4. ความเข้มข้นของธาตุอาหาร	ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (O.D.) = 0.1
2. ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	จากผลการทดลองที่ 3.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.4

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง**
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
3. ความเข้มแสง	134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที
4. อัตราการไหลของอากาศ	0.8 ลิตร/นาที
5. อัตราการกวนของเหลวภายในถัง	900 รอบ/นาที
6. อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส

3.5 การศึกษาผลของการปรับความเข้มแสงต่อผลผลิตลูทีน

ทำการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ตามวิธีการในหัวข้อ 3.2 นำหัวเชื้อปริมาตรที่คำนวณได้จากสมการ 3.1 ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนออก แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนด้านล่างไปล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับความเข้มข้นและแหล่งของไนโตรเจนตามผลการศึกษาในหัวข้อ 3.3 และ 3.4 จากนั้นผสมหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกันกับที่ล้างเซลล์ ปริมาตร 0.9 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้เป็น 1 ลิตร ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ให้แสงสีขาวจากหลอดไฟแอลอีดีโดยเปลี่ยนความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที โดยแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที ควบคุมอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ระหว่างการทดลองได้เก็บตัวอย่างน้ำ 30 มิลลิลิตร จากขวดแก้วดูแรนเพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3.4 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.5

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง**
<u>ตัวแปรต้น</u>	
1. ความเข้มแสง	134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์
2. แคโรทีนอยด์	ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์
3. ลูทีน	ความเข้มข้นของลูทีน
4. ความเข้มข้นของธาตุอาหาร	ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (O.D.) = 0.1
2. ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	จากผลการทดลองที่ 3.3
3. แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	จากผลการทดลองที่ 3.4
4. อัตราการไหลของอากาศ	0.8 ลิตร/นาที
5. อัตราการกวนของเหลวภายในถัง	900 รอบ/นาที
6 อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6 การศึกษาผลของการปรับความยาวคลื่นแสงต่อผลผลิตลูทีน

ทำการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ตามวิธีการในหัวข้อ 3.2 นำหัวเชื้อปริมาตรที่คำนวณได้จากสมการ 3.1 ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนออก แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนด้านล่างไปล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับความเข้มข้น

และแหล่งของไนโตรเจนตามผลการศึกษาในหัวข้อ 3.3 และ 3.4 จากนั้นผสมหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดียวกันกับที่ล้างเซลล์ ปริมาตร 0.9 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้เป็น 1 ลิตร ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ให้แสงจากหลอดไฟแอลอีดีที่มีการปรับความยาวคลื่นของแสง โดยใช้แสงสีขาวที่ความยาวคลื่น 442 - 655 นาโนเมตร แสงสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร และแสงสีแดงที่ความยาวคลื่น 639 นาโนเมตร ซึ่งใช้ความเข้มแสงตามผลการศึกษาในหัวข้อ 3.5 โดยแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที ควบคุมอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ระหว่างการทดลองได้เก็บตัวอย่างน้ำ 30 มิลลิลิตร จากขวดแก้วดูแรนเพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.5 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.6

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง**
<u>ตัวแปรต้น</u>	
1. ความยาวคลื่นแสง	แสงสีขาว (442-655 นาโนเมตร) แสงสีน้ำเงิน (460 นาโนเมตร) และแสงสีแดง (639 นาโนเมตร)
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์
2. แคโรทีนอยด์	ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์
3. ลูทีน	ความเข้มข้นของลูทีน
4. ความเข้มข้นของธาตุอาหาร	ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (O.D.) = 0.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3.5 (ต่อ) ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.6

ตัวแปร	ค่าที่ใช้ในการทดลอง
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
2. ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	จากผลการทดลองที่ 3.3
3. แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	จากผลการทดลองที่ 3.4
4. ความเข้มแสง	จากผลการทดลองที่ 3.5
5. อัตราการไหลของอากาศ	0.8 ลิตร/นาที
6. อัตราการกวนของเหลวภายในถัง	900 รอบ/นาที
7. อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส

3.7 การศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตลูทีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ทำการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ตามวิธีการในหัวข้อ 3.2 นำหัวเชื้อปริมาตรที่คำนวณได้จากสมการ 3.1 ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนออก แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนด้านล่างไปล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับความเข้มข้นและแหล่งของไนโตรเจนตามผลการศึกษาในหัวข้อ 3.3 และ 3.4 จากนั้นผสมหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดียวกันกับที่ล้างเซลล์ ปริมาตร 0.9 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้เป็น 1 ลิตร ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ให้แสงที่ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสงตามผลการทดลองในหัวข้อ 3.5 และ 3.6 อัตราการให้อากาศที่ 0.8 ลิตร/นาที สำหรับชุดควบคุม ส่วนชุดทดลองมีการให้อากาศในอัตราที่เท่ากับชุดควบคุมร่วมกับการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร อีกทั้งยังมีการเพิ่มชุดทดลองที่ใช้อาหาร BG-11 ปกติเพื่อลดข้อจำกัดของธาตุอาหารไนโตรเจน โดยทำการผสมหัวเชื้อตามปริมาตรที่คำนวณได้จาก

สมการ 3.1 กับอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ปกติ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที สำหรับชุดควบคุม ส่วนชุดทดลองมีการให้อากาศในอัตราที่เท่ากับชุดควบคุมร่วมกับการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร และใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับชุดทดลองที่กล่าวไปข้างต้น ควบคุมอัตราการกวนของเหลวในถังที่ 900 รอบ/นาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ระหว่างการทดลองได้เก็บตัวอย่างน้ำ 30 มิลลิลิตร จากขวดแก้วดูแรนเพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของลูทีน ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.6 ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.7

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง**
<u>ตัวแปรต้น</u>	
1. การให้อากาศ	อากาศ และอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์
2. แคโรทีนอยด์	ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์
3. ลูทีน	ความเข้มข้นของลูทีน
4. ความเข้มข้นของธาตุอาหาร	ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (O.D.) = 0.1
2. ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	จากผลการทดลองที่ 3.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) ตัวแปรต้น ตัวแปรตาม และตัวแปรควบคุมที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.7

ตัวแปร	ค่าที่ใช้ในการทดลอง
ตัวแปรควบคุม	
3. แหล่งของไนโตรเจนในอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	จากผลการทดลองที่ 3.4
4. ความเข้มแสง	จากผลการทดลองที่ 3.5
5. ความยาวคลื่นแสง	จากผลการทดลองที่ 3.6
6. อัตราการไหลของอากาศ	0.8 ลิตร/นาที
7. อัตราการกวนของเหลวภายในถัง	900 รอบ/นาที
8. อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส

3.8 การวิเคราะห์ผล

3.8.1 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง

การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งดำเนินการตามวิธีการของ APHA (1998) [58] โดยนำกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 103 - 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ และนำไปเก็บไว้ใน Vacuum desiccator นำตัวอย่างน้ำ 20 มิลลิลิตร มาผ่านกระดาษกรอง แล้วนำกระดาษกรองไปอบเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ น้ำหนักเซลล์แห้งคือผลต่างของน้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์กับน้ำหนักกระดาษกรองเริ่มต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.8.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

การวิเคราะห์ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ดำเนินการตามวิธีการของ Strickland และ Parsons (1972) [59] โดยนำตัวอย่างน้ำ 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลว นำเซลล์มาบดด้วยแท่งแก้ว และเติมสารละลายอะซิโตน 100% โดยปริมาตร ในปริมาณที่เท่ากับตัวอย่างเริ่มต้น

หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างในที่มืดในตู้เย็น และนำตัวอย่างของเหลวมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 645 และ 665 นาโนเมตร ในวันถัดไป ด้วย UV-Vis Spectrophotometer รุ่น PowerWave HT Microplate Spectrophotometer นำข้อมูลการดูดกลืนแสงมาคำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เอได้จากสมการ

$$\text{คลอโรฟิลล์เอ (มิลลิกรัม/ลิตร)} = (11.6 * E_{665} - 1.31 * E_{645} - 0.14 * E_{630}) \cdot V_a/V_b$$

เมื่อ E_i คือค่าการดูดกลืนแสงที่ i นาโนเมตร V_a คือ ปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) และ V_b คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

3.8.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ดำเนินการตามวิธีการของ Strickland และ Parsons (1972) [59] ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับการวิเคราะห์ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ แต่นำตัวอย่างของเหลวมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร นำข้อมูลการดูดกลืนแสงมาคำนวณความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ได้จากสมการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

$$\text{แคโรทีนอยด์รวม (มิลลิกรัม/ลิตร)} = (4 * E_{480}) \cdot V_a/V_b$$

เมื่อ E_{480} คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร V_a คือ ปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) และ V_b คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

3.8.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของลูทีน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของลูทีนจะใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มี Photo Diode Array Detector ฉีดตัวอย่างของเหลวที่สกัดแคโรทีนอยด์จากขั้นตอนในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในหัวข้อ 3.8.3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าไปในคอลัมน์ C-18 โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมระหว่างน้ำกลั่น เมทานอล อะซิโตไนไตร์ล และไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 1:10:79:10 ตามลำดับ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 30 นาที

3.8.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแหล่งไนเตรท

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแหล่งไนเตรทดำเนินการตามวิธีการของ APHA (1998), Strickland และ Parsons (1972) [58, 59] โดยกรองตัวอย่างของเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร แล้วนำของเหลวตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐานจะได้ความเข้มข้นของไนโตรเจน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแหล่งแอมโมเนีย

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแหล่งแอมโมเนียดำเนินการตามวิธีของ Bower และ Holm-Hansen (1980) [60] โดยกรองตัวอย่างของเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร แล้วเติมสารละลายซาลิไซเลตคะตะลิสต์ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไลน์ไฮโปรคลอไรด์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1

ชั่วโมง แต่ไม่ควรเกิน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐานจะได้ความเข้มข้นของไนโตรเจน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแหล่งยูเรีย

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแหล่งยูเรียดำเนินการตามวิธีการของ Bower และ Holm-Hansen (1980) [60] ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับการวิเคราะห์ไนโตรเจนในแหล่งแอมโมเนีย เนื่องจากยูเรียสามารถแตกตัวได้ดังสมการ

$$NH_2CONH_2 \text{ (ยูเรีย)} \longrightarrow NH_3 \text{ (แอมโมเนีย)} + H^+ + CNO^-$$

$$CNO^- + H^+ + H_2O \longrightarrow NH_3 \text{ (แอมโมเนีย)} + CO_2$$

3.8.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อดำเนินการตามวิธีการของ APHA (1998), Strickland และ Parsons (1972) [58, 59] โดยกรองตัวอย่างของเหลวด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร แล้วเติมสารละลายที่เป็นสารผสมระหว่างแอมโมเนียม-โมลิบเดต กรดซัลฟิวริก กรดแอสคอร์บิก และโพแทสเซียมแอนติมอนี่ทาร์เทรต ลงในตัวอย่างด้วยอัตราส่วนรีเอเจนต์ต่อปริมาณของเหลวตัวอย่าง 1:10 ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 850 นาโนเมตร คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐานจะได้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส

3.8.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างจุลสาหร่ายส่งวิเคราะห์ CHN ด้วยเครื่อง CHN Analyzer โดยวิธี In-house method base on ISO 16948:2015 ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นำข้อมูลธาตุไนโตรเจนมาคำนวณปริมาณโปรตีนได้จากสมการ

โปรตีน (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) = N (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) x 6.25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 การปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน (เป็นระยะเวลาที่จุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีก่อนเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่) ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 โดยปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ (100%) ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ให้แสงสีขาวจากหลอดไฟแอลอีดีที่ความเข้มแสง 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที (0.8 วีวีเอ็ม) และควบคุมอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที

ผลการติดตามการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 4.1(a)) พบว่าจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ในชุดทดลองที่ใช้ $NaNO_3$ 25% – 150% มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติม $NaNO_3$ ที่มีการเพิ่มของน้ำหนักแห้งเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าชุดทดลองที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ 50% ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดที่ 630 ± 131 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเทียบเท่าอัตราการผลิตชีวมวล (Biomass productivity) เท่ากับ 73.1 ± 16.35 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ในขณะที่ชุดทดลองที่เติม $NaNO_3$ 25%, 100%, 125% และ 150% ได้รับน้ำหนักแห้งในวันสุดท้ายเท่ากับ 435 ± 79, 565 ± 230, 545 ± 201 และ 555 ± 100 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 39.2 ± 14.28, 55.8 ± 29.05, 55.4 ± 23.37 และ 56.3 ± 10.44 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งมีความสอดคล้องกับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้จากตัวอย่างชีวมวลจุลสาหร่าย กล่าวคือได้รับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุด (50.6 ± 22.42 มิลลิกรัม/ลิตร) ในชุดทดลองที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ 50% (รูปที่ 4.1(b))

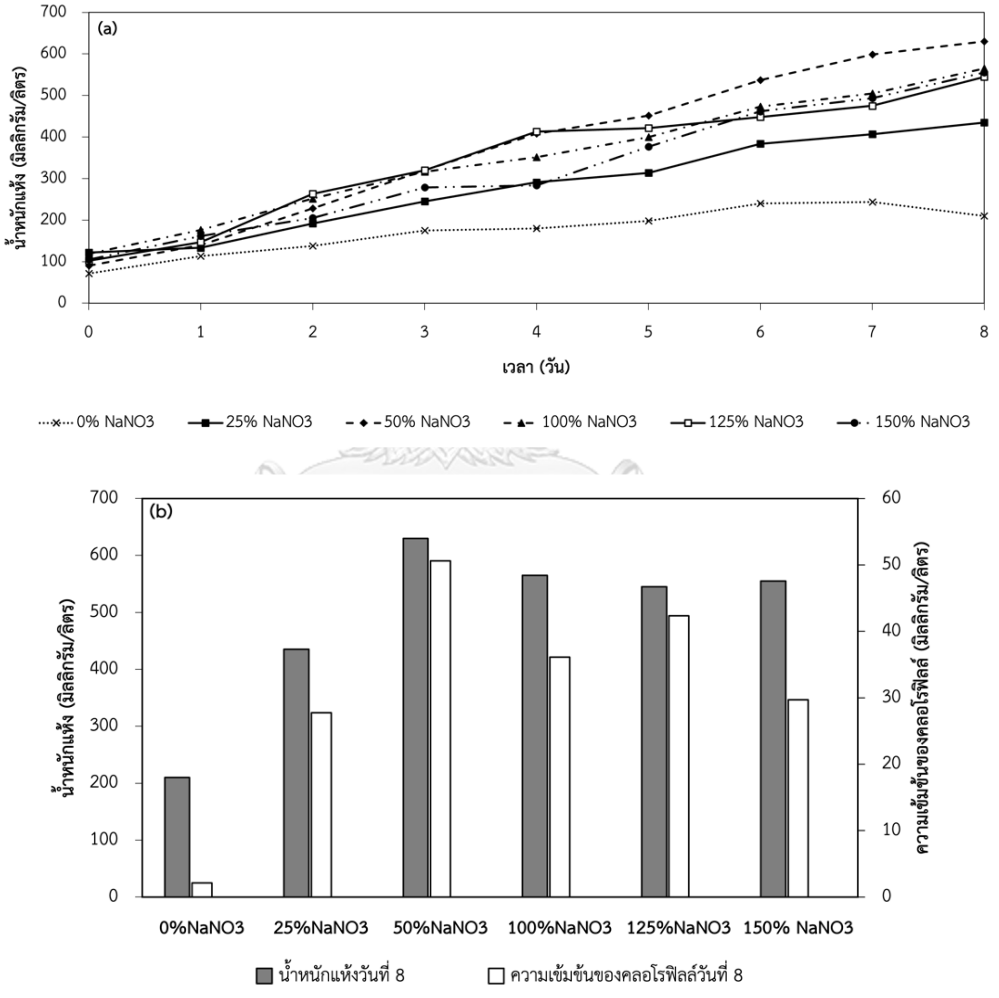
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.2 แสดงความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ผลการทดลองพบว่าชุดทดลองที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 50% และ 125% ให้ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มากกว่าชุดทดลองที่เหลือ (2.6 ± 0.80 มิลลิกรัม/ ลิตร สำหรับ 50% $NaNO_3$ และ 2.5 ± 0.68 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับ 125% $NaNO_3$) เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งพบว่าชุดทดลองที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 125% มีแคโรทีนอยด์สะสมสูงสุดที่ 4.9 ± 1.92 มิลลิกรัม/กรัม แต่เมื่อนำข้อมูลในวันที่ 8 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Kruskal-Wallis ANOVA พบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งในชุดทดลอง 50% $NaNO_3$ และ 125% $NaNO_3$ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลอง 25% $NaNO_3$ ในส่วนการผลิตลูทีนซึ่งเป็นหนึ่งในแคโรทีนอยด์หลักที่พบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* [61] พบว่าชุดทดลอง $NaNO_3$ 25% ให้ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.55 ± 0.19 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1.33 ± 0.63 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) ข้อมูลดังกล่าวเทียบเท่าอัตราการผลิตลูทีนเท่ากับ 0.07 ± 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน (ตารางที่ 4.1) ผลการทดลองที่ได้รับสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Chen และคณะ [53] ซึ่งรายงานว่าเมื่อลดความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เหลือ 40% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ ทำให้มีความเข้มข้นลูทีนเพิ่มขึ้น 34% ในจุลสาหร่าย *Chlorella sorokiniana*

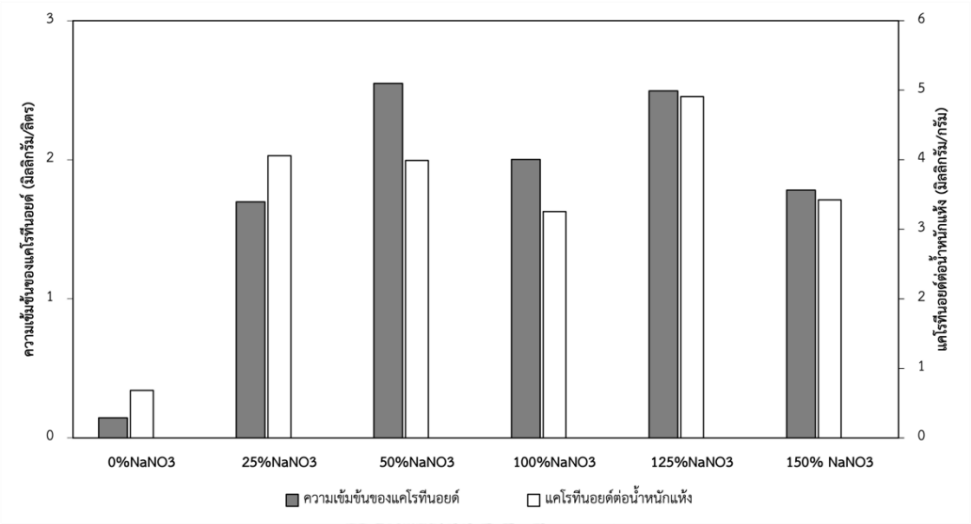
ในส่วนของการใช้ธาตุอาหารไนโตรเจนของจุลสาหร่าย (รูปที่ 4.4) พบว่าความเข้มข้นของไนเตรทลดลงทุกชุดทดลอง โดยเหลือความเข้มข้นของไนเตรทในวันสุดท้ายของการทดลองเท่ากับ 0.9 ± 0.14, 27.6 ± 5.07, 61.0 ± 11.60, 190 ± 14.0, 233 ± 12.13 และ 282 ± 22.59 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร เมื่อปรับ $NaNO_3$ เป็น 0%, 25%, 50%, 100%, 125% และ 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ตามลำดับ ในส่วนความเข้มข้นของฟอสเฟตพบว่าทุกชุดทดลองมีค่าลดลงดังที่แสดงในรูปที่ 4.5 โดยมีความเข้มข้นของฟอสเฟตเหลือในวันสุดท้ายเท่ากับ 1.8 ± 0.53, 0.5 ± 0.23, 0.6 ± 0.76, 0.4 ± 0.33, 0.4 ± 0.32 และ 0.4 ± 0.33 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร เมื่อปรับ $NaNO_3$ เป็น 0%, 25%, 50%, 100%, 125% และ 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าชุดทดลองที่มี 0% $NaNO_3$ มีความเข้มข้นของฟอสเฟตเหลือมากที่สุดซึ่งเป็นผลมาจากจุลสาหร่ายในชุดทดลองนี้เจริญเติบโตได้ไม่ดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

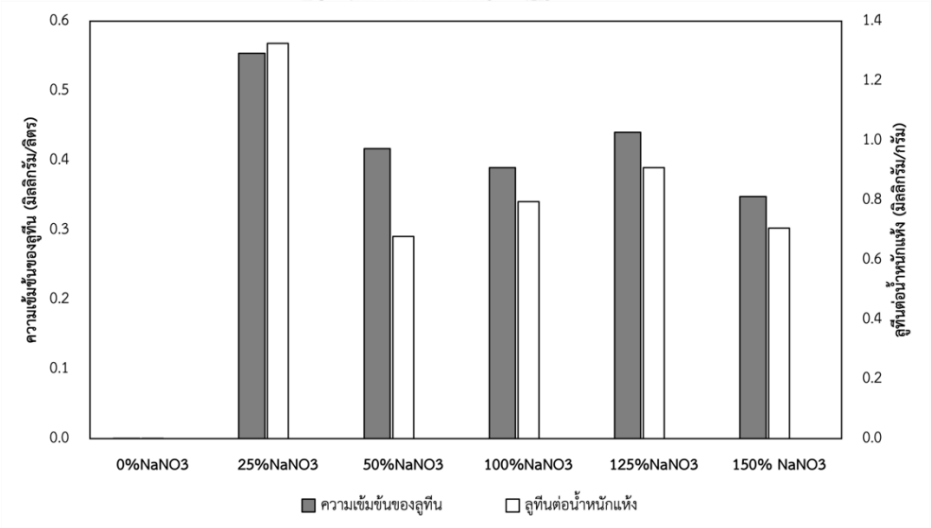
จากผลการทดลองจะพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 50% ให้น้ำหนักแห้งสูงสุด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการผลิตลูทีนกลับพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 25% ให้ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากที่สุด เพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตลูทีนดังนั้นจึงเลือกสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้น $NaNO_3$ เป็น 25% สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป



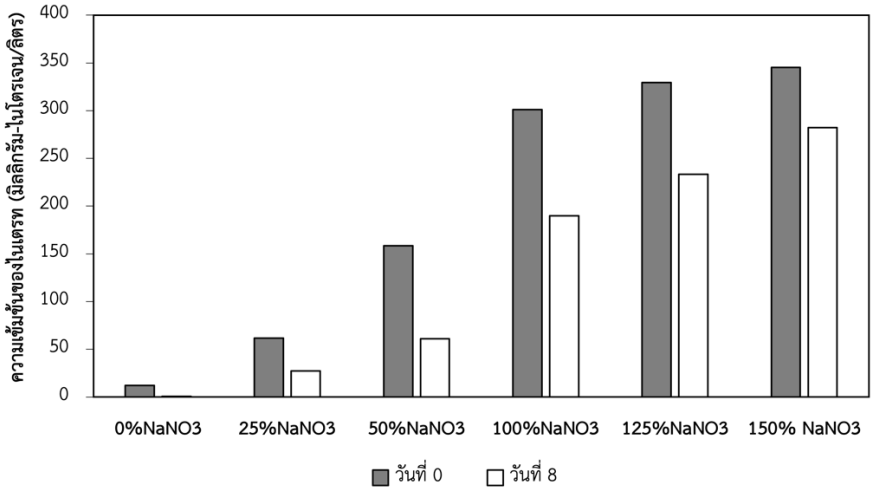
รูปที่ 4.1 (a) น้ำหนักแห้ง (b) น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน



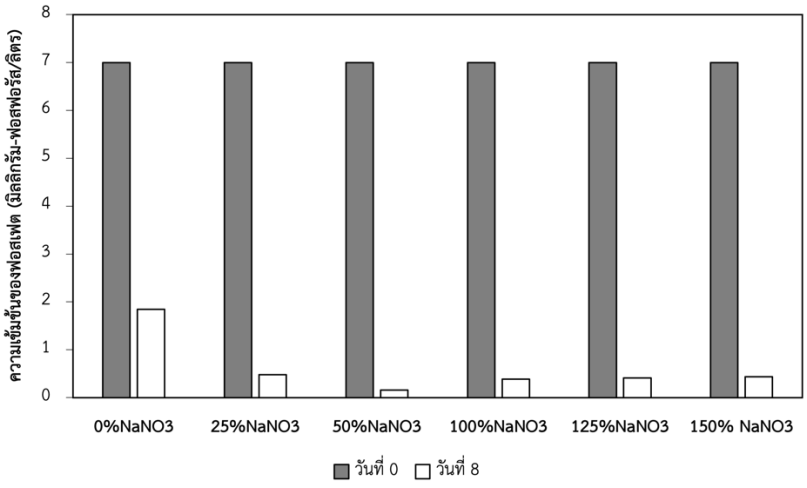
รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum sp.* TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum sp.* TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน



รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน



รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของลูทีน ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/กรัม)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)
0% $NaNO_3$	ND	ND	ND
25% $NaNO_3$	0.55 ± 0.19	1.33 ± 0.63	0.07 ± 0.02
50% $NaNO_3$	0.42 ± 0.11	0.68 ± 0.23	0.05 ± 0.01
100% $NaNO_3$	0.39 ± 0.22	0.79 ± 0.53	0.05 ± 0.03
125% $NaNO_3$	0.44 ± 0.26	0.91 ± 0.63	0.06 ± 0.03
150% $NaNO_3$	0.35 ± 0.35	0.71 ± 0.81	0.04 ± 0.04

4.2 การปรับแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 โดยปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 25% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 (62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) ซึ่งเป็นผลการทดลองจากหัวข้อที่ 4.1 ควบคุมความเข้มแสงที่ 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที อัตราการให้อากาศที่ 0.8 ลิตร/นาที (0.8 วีวีเอ็ม) และอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลการติดตามการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปน้ำหนักแห้งพบว่าจุลสาหร่ายในชุดทดลองที่ปรับแหล่งไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, และยูเรียมีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีการเพิ่มของน้ำหนักแห้งเพียง

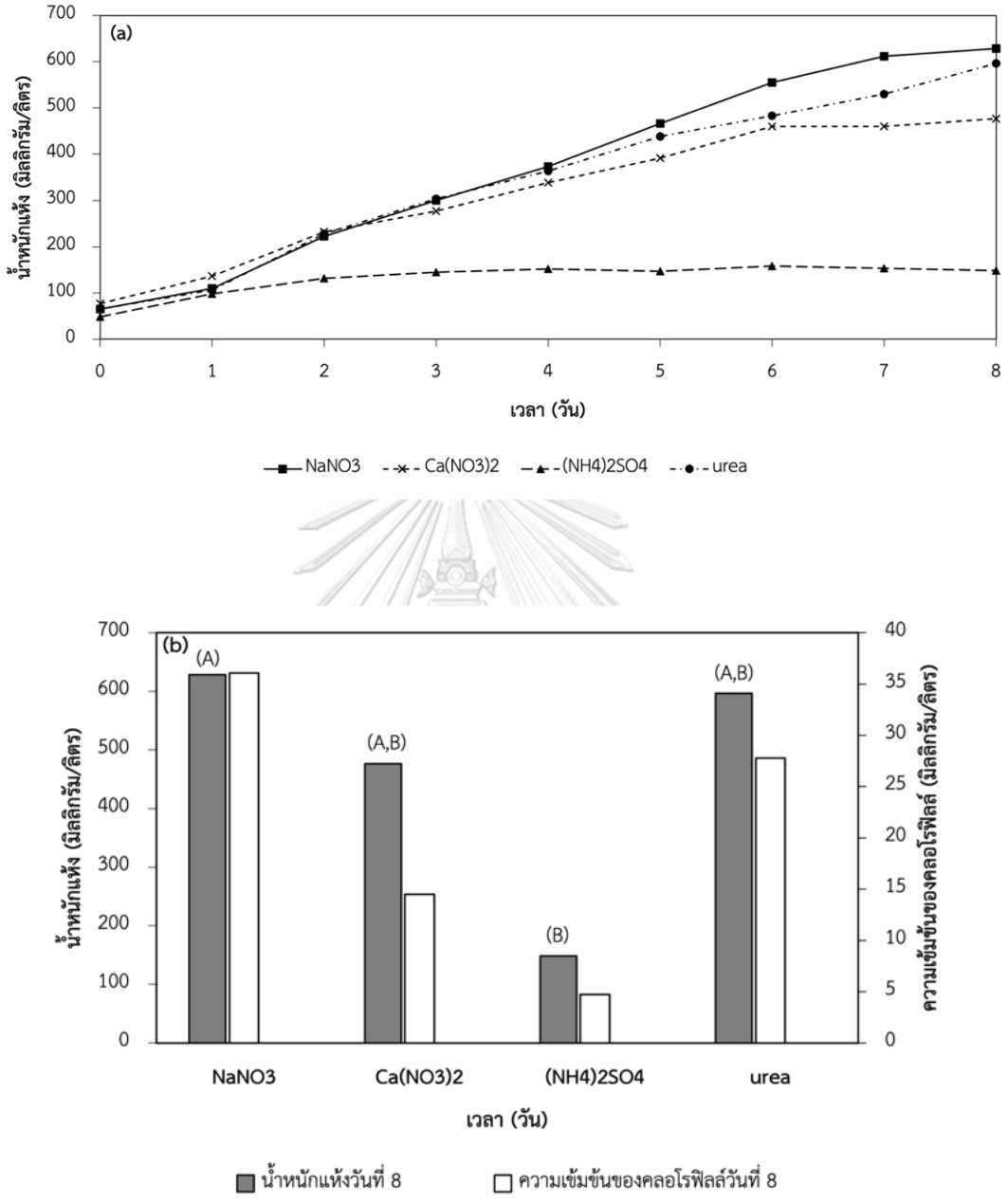
เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.6(a) เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายที่ใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนให้น้ำหนักแห้งมากที่สุด (628 ± 82.51 มิลลิกรัม/ลิตร) และมีอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 70.4 ± 8.84 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ในขณะที่ชุดทดลองที่ใช้ยูเรียได้รับน้ำหนักแห้งลดลงเล็กน้อยอยู่ที่ 596 ± 145.46 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเทียบเท่าอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 66.4 ± 18.68 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ในส่วนของ $Ca(NO_3)_2$ ได้รับน้ำหนักแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 476 ± 37.53 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิตชีวมวลได้เท่ากับ 49.9 ± 4.40 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์มีความสอดคล้องกับน้ำหนักแห้ง กล่าวคือพบความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุดในชุดทดลองที่ใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 4.6(b)) ผลการศึกษาโดยศิราภรณ์ ชื่นบาล และคณะ [62] รายงานความสำคัญของโซเดียมว่าเป็นธาตุอาหารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดและเป็นตัวควบคุมการทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ ในการทดลองนี้พบว่าการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนไม่สามารถช่วยการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายได้ดีเท่ากับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ โดยคาดว่าเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแอมโมเนียที่สูงเกินไปจึงเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต จากการสืบค้นวรรณกรรมไม่พบงานวิจัยที่รายงานความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* อย่างไรก็ตามผลการศึกษาโดย Tevatia และคณะ [63] ได้รายงานว่าการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียมากกว่า 9.8 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้ถึง 6.3 เท่า และผลการศึกษาของ Ramanna และคณะ [64] ได้รายงานว่ายูเรียมีการแตกตัวเป็นแอมโมเนียและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่มาจากการแตกตัวของยูเรียไม่มากเท่ากับอาหารที่มีแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนจึงไม่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตจากความเข้มข้นแอมโมเนียสูง ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเจริญเติบโตได้มากกว่าแหล่งแอมโมเนีย เมื่อนำข้อมูลน้ำหนักแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Kruskal-Wallis ANOVA พบว่าชุดทดลองที่มี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดทดลอง $(NH_4)_2SO_4$

ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองแสดงในรูปที่ 4.7 ซึ่งพบว่าชุดทดลองที่ใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนได้รับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์สูงสุด (13.4 ± 1.78 มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ปรับแหล่งไนโตรเจนเป็น $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย ซึ่งได้รับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 7.3 ± 1.70, 1.5 ± 0.35 และ 10.4 ± 7.60 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนของปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งได้ผลคล้ายกับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ เมื่อพิจารณาการผลิตลูทีน (รูปที่ 4.8) พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 เมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้รับความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากที่สุดเช่นกัน (0.75 ± 0.48 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1.14 ± 0.70 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ) ทำให้มีอัตราการผลิตลูทีนสูงถึง 0.09 ± 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน (ตารางที่ 4.2) จากผลการทดลองจะเห็นว่าน้ำหนักแห้งที่ได้รับเมื่อใช้ $NaNO_3$ มีค่ามากกว่าการใช้ $Ca(NO_3)_2$, และยูเรียไม่มากนัก แต่ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ทำให้อุปมาได้ว่า $NaNO_3$ อาจมีบทบาทสำคัญในการเร่งการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

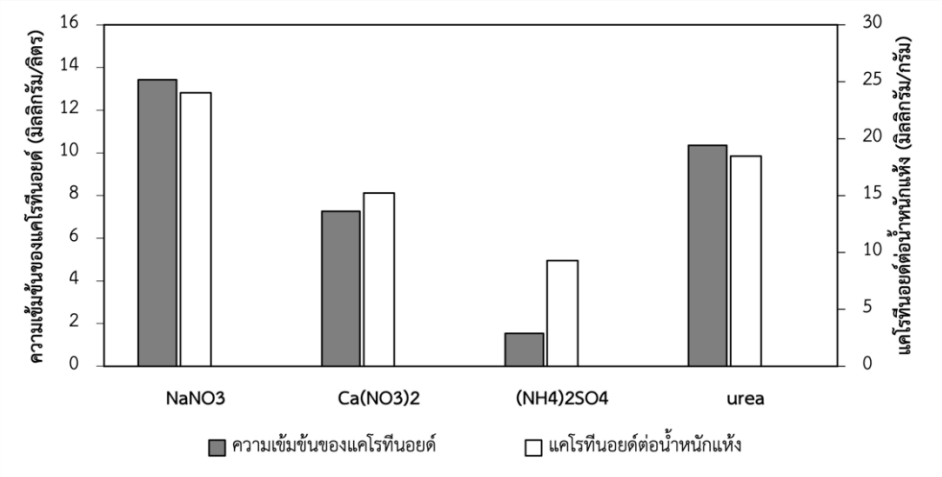
ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารไนโตรเจนในระบบเพาะเลี้ยงพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีความเข้มข้นของ $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย เหลืออยู่เท่ากับ 5.4 ± 2.68, 19.9 ± 2.19, 33.0 ± 2.19 และ 0.3 ± 0.07 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.9) จะเห็นว่าจุลสาหร่ายมีการใช้ไนโตรเจนในปริมาณมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $NaNO_3$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลของน้ำหนักแห้ง ในส่วนของการใช้ธาตุอาหารฟอสฟอรัส (รูปที่ 4.10) พบว่าทุกชุดทดลองมีการใช้ฟอสเฟตในปริมาณมากยกเว้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีความเข้มข้นของฟอสเฟตเหลือเท่ากับ 0.2 ± 0.02, 0.1 ± 0.05, 5.0 ± 1.03 และ 0.1 ± 0.02 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในชุดทดลองที่มี $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ซึ่งมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนให้น้ำหนักแห้งและการผลิตลูทีนได้สูงสุด จึงเลือกสภาวะดังกล่าวสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

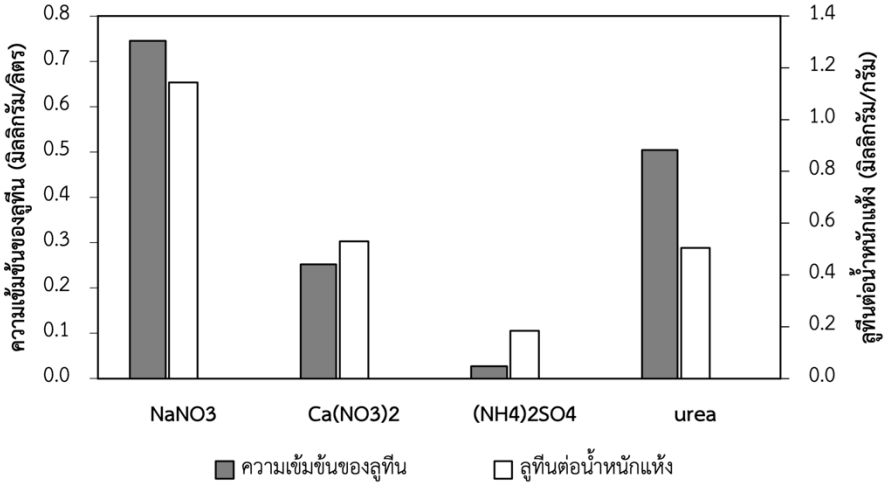
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



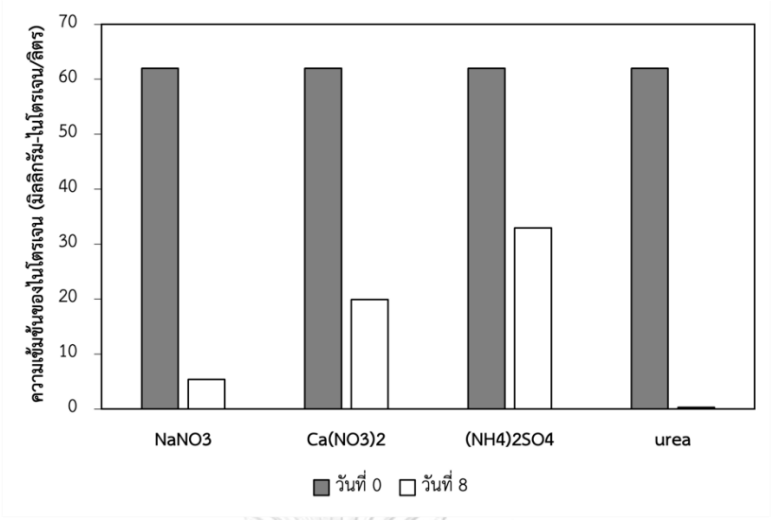
รูปที่ 4.6 (a) น้ำหนักแห้ง (b) น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร



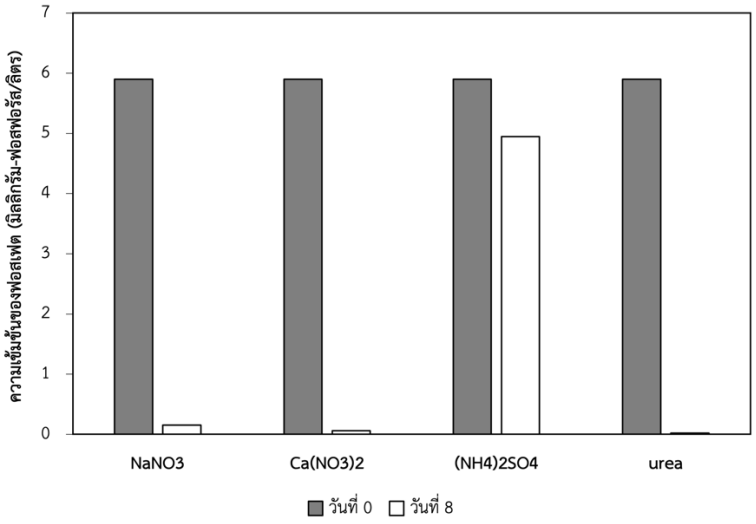
รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร



รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นของลูทีน และปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร



รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร



รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของลูทีน ลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีน จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย โดยควบคุมความเข้มข้นของไนโตรเจน 62 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/กรัม)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)
$NaNO_3$	0.75 ± 0.48	1.14 ± 0.70	0.09 ± 0.06
$Ca(NO_3)_2$	0.25 ± 0.03	0.53 ± 0.05	0.03 ± 0.003
$(NH_4)_2SO_4$	0.03 ± 0.002	0.18 ± 0.02	0.003 ± 0.001
ยูเรีย	0.28 ± 0.26	0.50 ± 0.43	0.03 ± 0.03

4.3 การปรับความเข้มแสง

การทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ ความเข้มข้น 25% เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นผลการทดลองจากหัวข้อที่ 4.1 และ 4.2 โดยปรับความเข้มแสงจากหลอดไฟแอลอีดีสีขาวที่ความเข้มแสง 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที (10,000 15,000 และ 30,000 ลักซ์) อัตราการให้อากาศที่ 0.8 ลิตร/นาที และอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที

ผลการติดตามการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปน้ำหนักแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.11) พบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ได้รับน้ำหนักแห้งมากที่สุด (783.3 ± 142.86 มิลลิกรัม/ลิตร) และมีอัตราการผลิตชีวมวลสูงที่สุด (97.8 ± 25.19 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ความเข้มแสงอื่น ในขณะที่ชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 134 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที พบว่ามีน้ำหนักแห้งเท่ากับ

708 ± 60.10 และ 700 ± 7.07 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่าอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 80.0 ± 8.84 และ 78.13 ± 3.25 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีความสอดคล้องกับน้ำหนักแห้ง กล่าวคือพบความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุดในชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตในรูปน้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ตามที่ได้กล่าวไปควบคู่กันชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มแสงจาก 134 เป็น 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ทำให้จุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มแสงสูงขึ้นเป็น 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ทำให้จุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้น้อยลง ผลการทดลองที่ได้รับสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Chen และ Liu [65] ซึ่งรายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มแสงจาก 150 เป็น 300 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ทำให้จุลสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากแสงเป็นพลังงานหลักสำหรับการผลิต ATP เมื่อความเข้มแสงในระบบการเพาะเลี้ยงสูงขึ้นจุลสาหร่ายจะได้รับพลังงานสูงขึ้นตามไปด้วยจึงเป็นสาเหตุให้เจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 450 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที กลับพบว่าน้ำหนักแห้งลดลงคาดว่าความเข้มแสงนี้มากเกินไปจนทำให้จุลสาหร่ายเกิดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง

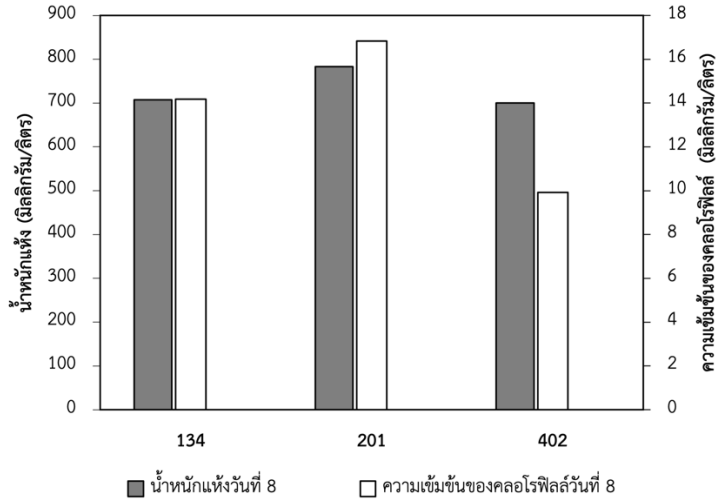
ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 134 และ 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ได้รับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ใกล้เคียงกันเท่ากับ 5.3 ± 1.02 และ 5.4 ± 1.05 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที (3.1 ± 1.03 มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งกลับพบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากที่สุดอย่างเห็นได้ชัด (7.3 ± 0.17 มิลลิกรัม/กรัม) ส่วนชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 134 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.4 ± 0.13 และ 5.1 ± 0.29 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการผลิตลูทีน (รูปที่ 4.13) พบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ได้รับความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากที่สุดเช่นกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.11 ± 0.32 มิลลิกรัม/

ลิตร และ 1.40 ± 0.15 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ ข้อมูลดังกล่าวเทียบเท่าอัตราการผลิตลูทีนเท่ากับ 0.14 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน (ตารางที่ 4.3) ผลการศึกษาโดย Chen และ Liu [65] รายงานผลกระทบของความเข้มแสงต่อลูทีนว่าเมื่อเพิ่มความเข้มแสงสูงขึ้นปริมาณของลูทีนจะสูงตามไปด้วย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มแสงสูงเกินกว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับจุลสาหร่ายในแต่ละสายพันธุ์ทำให้สารเชิงซ้อนในการเก็บเกี่ยวแสงที่อุดมไปด้วยลูทีนมีขนาดเล็กลงจึงส่งผลให้ปริมาณของลูทีนลดลงตามไปด้วย

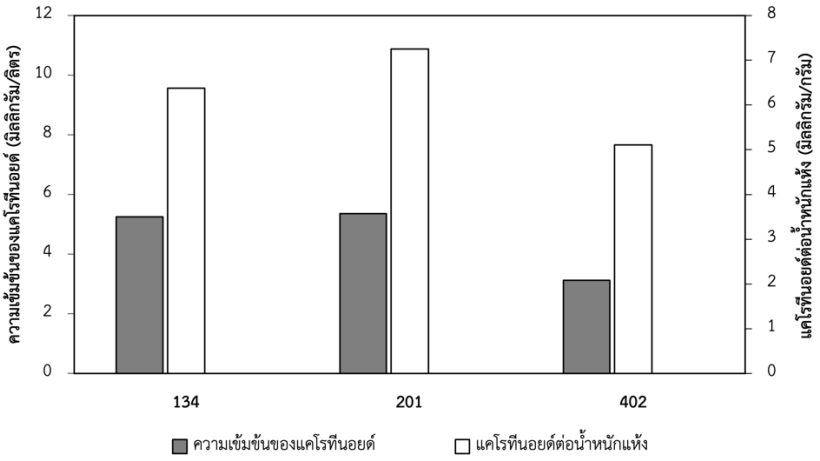
ผลการตรวจวัดความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรท (รูปที่ 4.14) จากระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที พบว่ามีไนเตรทคงเหลือในระบบเท่ากับ 2.7 ± 2.90, 0.9 ± 0.21 และ 3.3 ± 1.73 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนของการใช้ธาตุอาหารฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตที่แสดงในรูปที่ 4.15 มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการใช้ธาตุอาหารไนโตรเจน ซึ่งพบความเข้มข้นของฟอสเฟตเหลือในระบบเท่ากับ 0.05 ± 0.03, 0.04 ± 0.07 และ 0.16 ± 0.06 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในชุดทดลองที่ปรับความเข้มแสง 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ให้ทั้งน้ำหนักแห้งและการผลิตลูทีนสูงที่สุด จึงเลือกสภาวะดังกล่าวสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

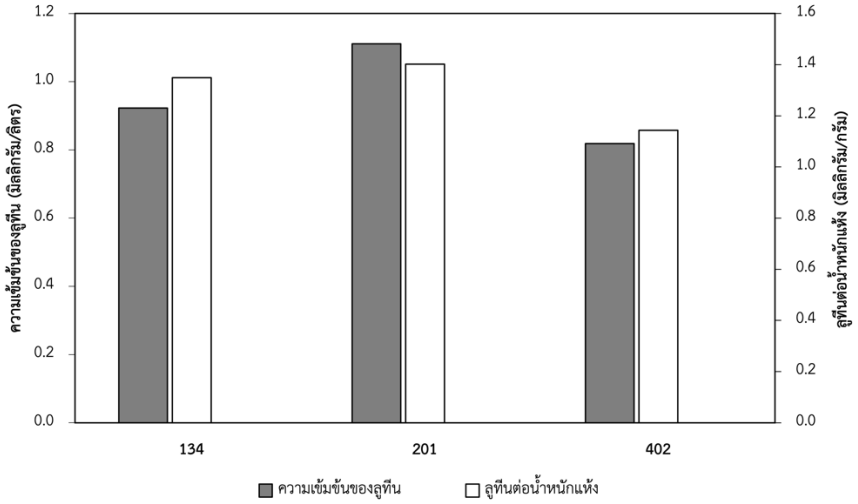
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



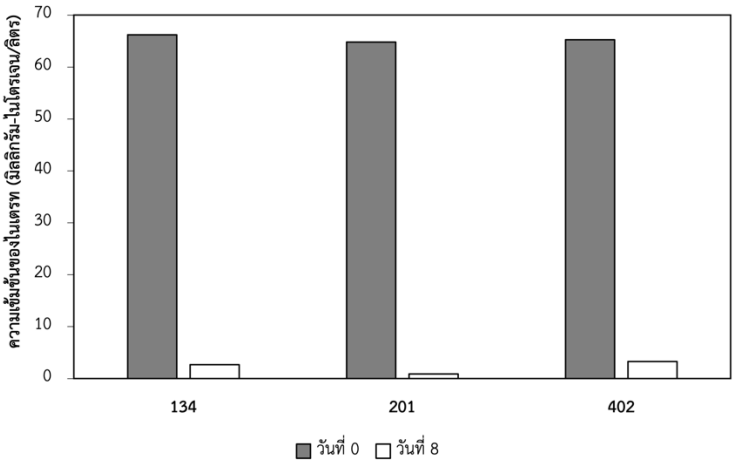
รูปที่ 4.11 น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที



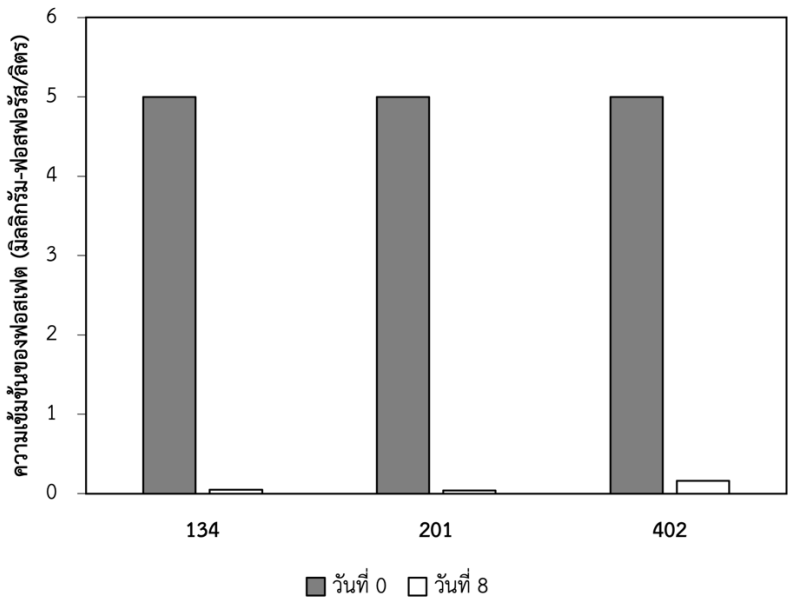
รูปที่ 4.12 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที



รูปที่ 4.13 ความเข้มข้นของลูทีน และปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที



รูปที่ 4.14 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร วินาที



รูปที่ 4.15 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของลูทีน ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมล/ตารางเมตร·วินาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความเข้มแสง (ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที)	**ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)**	**ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/กรัม)**	**อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)**
134	0.92 ± 0.29	1.35 ± 0.28	0.12 ± 0.04
201	1.11 ± 0.32	1.40 ± 0.15	0.14 ± 0.04
402	0.82 ± 0.05	1.14 ± 0.07	0.10 ± 0.01

4.4 การปรับความยาวคลื่นแสง

ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ ความเข้มข้น 25% เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมความเข้มแสงที่ 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ซึ่งเป็นผลการทดลองจากหัวข้อที่ 4.1 - 4.3 โดยปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว (442 - 655 นาโนเมตร) แสงสีแดง (639 นาโนเมตร) และแสงที่น้ำเงิน (460 นาโนเมตร) ให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที และอัตราการกวนของเหลวภายในถังที่ 900 รอบ/นาที

ผลการติดตามการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปน้ำหนักแห้งพบว่าในชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงและแสงสีขาวมีน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ใช้แสงสีน้ำเงินที่มีการเพิ่มของน้ำหนักแห้งน้อยกว่าและเริ่มคงที่ในวันที่ 7 ดังที่แสดงในรูปที่ 4.16(a) เมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงพบว่ามีน้ำหนักแห้งและอัตราการผลิตชีวมวลสูงที่สุดในชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดง (875 ± 65.57 มิลลิกรัม/ลิตร และ 101.9 ± 8.59 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ตามลำดับ) ในขณะที่ชุดทดลองที่ใช้แสงสีขาวและสีน้ำเงินมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 695 ± 95.39 และ 510 ± 82.61 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 82.8 ± 8.40 และ 59.4 ± 7.07 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์มีความสอดคล้องกับน้ำหนักแห้ง กล่าวคือพบคลอโรฟิลล์ที่ความเข้มข้นสูงที่สุดในชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงดังที่แสดงในรูปที่ 4.16(b) โดยคาดว่ามีสาเหตุมาจากชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงนั้นมีความยาวคลื่นที่ 639 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกับการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอ (662 นาโนเมตร) และคลอโรฟิลล์บี (642 นาโนเมตร) [66] จึงทำให้การใช้แสงสีแดงมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงมากกว่าชุดทดลองอื่น น้ำหนักแห้งที่ได้รับจากการใช้แสงสีแดงจึงมากกว่าแสงสีน้ำเงินถึง 1.7 เท่า ส่วนชุดทดลองที่ใช้แสงสีน้ำเงินมีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดเนื่องมาจากคลอโรฟิลล์ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้จึงมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงต่ำ เมื่อนำข้อมูลน้ำหนักแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Kruskal-Wallis ANOVA พบว่าชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดทดลองที่ใช้แสงสีขาว

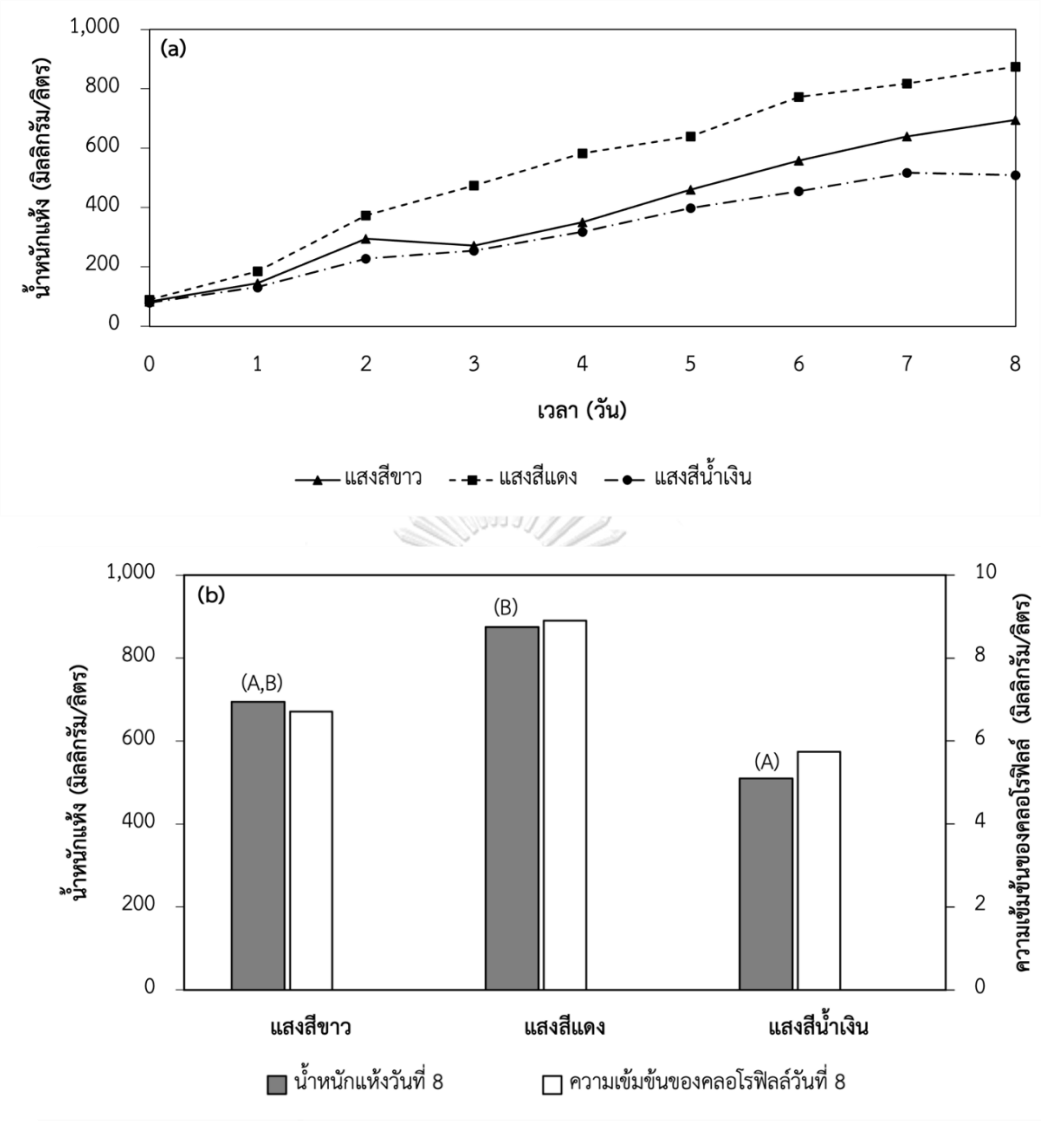
เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 พบว่าชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงได้รับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มากที่สุด (3.4 ± 0.59 มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ใช้แสงสีขาว และแสงสีน้ำเงิน ซึ่งได้รับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 2.7 ± 0.35 และ 1.7 ± 0.65 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.17) เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งกลับพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวมีค่ามากที่สุด (4.2 ± 1.04 มิลลิกรัม/กรัม) ส่วนชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงินมีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.9 ± 0.05 และ 3.3 ± 0.26 มิลลิกรัม/กรัม จากผลการทดลองที่ได้รับทำให้สรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีแดงไม่ได้กระตุ้นให้จุลสาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์ในชีวมวลได้เพิ่มขึ้น แต่ที่มีความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มากเป็นผลมาจากการเจริญเติบโตที่มากกว่าชุดทดลองอื่น ในขณะเดียวกันหากพิจารณาการผลิตลูทีนในวันที่ 8 (รูปที่ 4.18) พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีขาวนั้นได้รับทั้งความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากที่สุดเท่ากับ 1.12 ± 0.30 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1.61 ± 0.36 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่าอัตราการผลิตลูทีนเท่ากับ 0.13 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน (ตารางที่ 4.4) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีแดงได้รับความเข้มข้นของลูทีนมากกว่าแสงสีน้ำเงิน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งกลับพบว่าการใช้แสงสีน้ำเงินมีปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากกว่า ทำให้สรุปได้ว่าความเข้มข้นของลูทีนในการเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีแดงเกิดจากการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายเช่นเดียวกับผลผลิตแคโรทีนอยด์ ในขณะที่แสงสีน้ำเงินเป็นสภาวะที่สามารถกระตุ้นให้จุลสาหร่ายสะสมลูทีนในชีวมวลได้มากขึ้น ผลการศึกษาของ Loganathan และคณะ [67] รายงานผลกระทบของความยาวคลื่นแสงต่อผลผลิตลูทีนว่าแสงสีขาวเป็นช่วงความยาวคลื่นแสงที่กว้าง (442 - 655 นาโนเมตร) มีการทับซ้อนกับช่วงความยาวคลื่นที่สังเคราะห์รงควัตถุ (400 – 500 นาโนเมตร) ทำให้การเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีขาวมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์รงควัตถุ เช่น ลูทีน มากกว่าแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงที่มีค่าการดูดกลืนแสงตำแหน่งเดียวคือ 460 และ 639 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าแสงสีน้ำเงินมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ใกล้กับช่วงความยาวคลื่นของการสังเคราะห์รงควัตถุมากกว่าแสงสีแดงจึงทำให้แสงสีน้ำเงินสามารถกระตุ้นการสะสมรงควัตถุในชีวมวลได้มากกว่าแสงสีแดง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไนเตรท (รูปที่ 4.19) และฟอสเฟต (รูปที่ 4.20) ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่จุลสาหร่ายใช้ในระหว่างการเจริญเติบโต พบว่าความเข้มข้นของไนเตรทในวันสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 0.86 ± 0.12, 0.58 ± 0.15 และ 0.92 ± 0.08 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร และความเข้มข้นฟอสเฟตในวันสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 0.04 ± 0.08, 0.03 ± 0.01 และ 0.05 ± 0.01 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีขาว แสงสีแดง และแสงที่น้ำเงิน ซึ่งทั้งความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตที่เหลือในระบบมีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นไนเตรทและฟอสเฟตมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตโดยชุดการทดลองที่มีการเจริญเติบโตมากทำให้มีการใช้ธาตุอาหารที่มากตามไปด้วยซึ่งพบในการเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีแดง

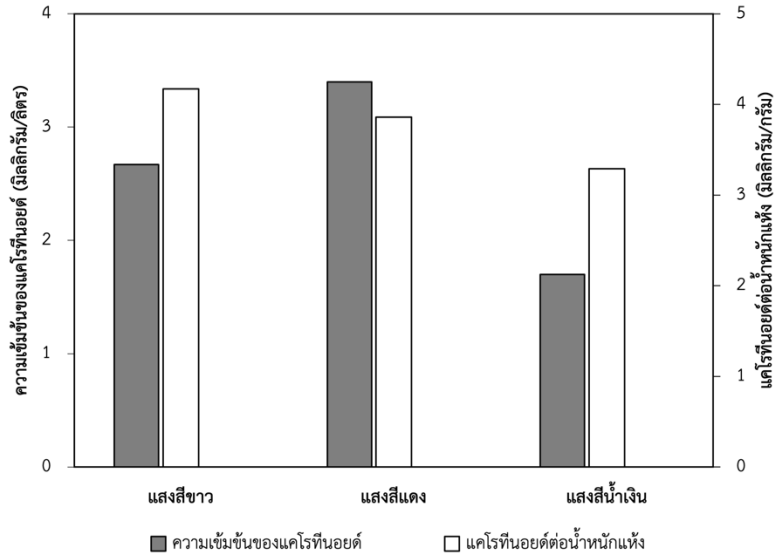
จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ใช้แสงสีแดงให้น้ำหนักแห้งสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงที่ใช้แสงสีขาวให้ผลผลิตลูทีนสูงที่สุด ดังนั้นเพื่อตอบสนองต่อเป้าหมายในการเพิ่มผลผลิตลูทีนจึงเลือกแสงสีขาวสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

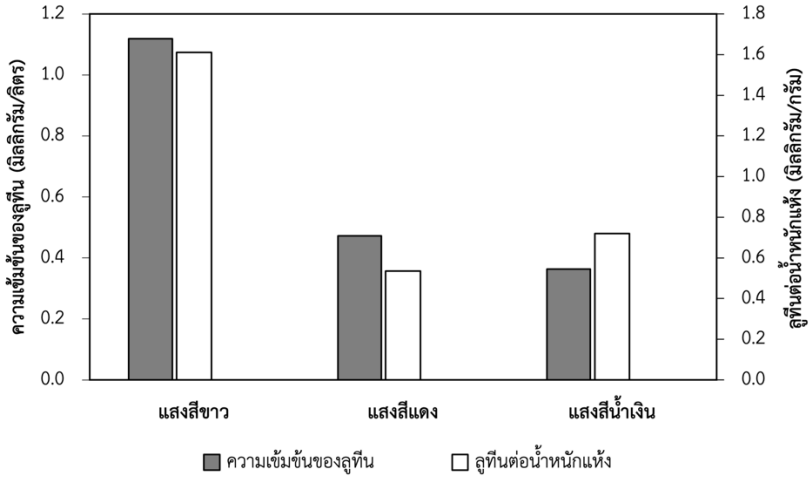


CHULALONGKORN UNIVERSITY

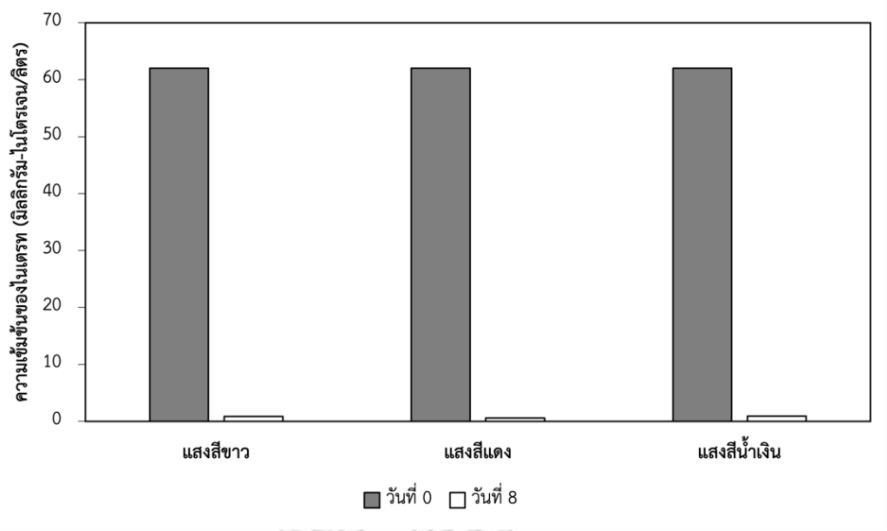
รูปที่ 4.16 (a) น้ำหนักแห้ง (b) น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน



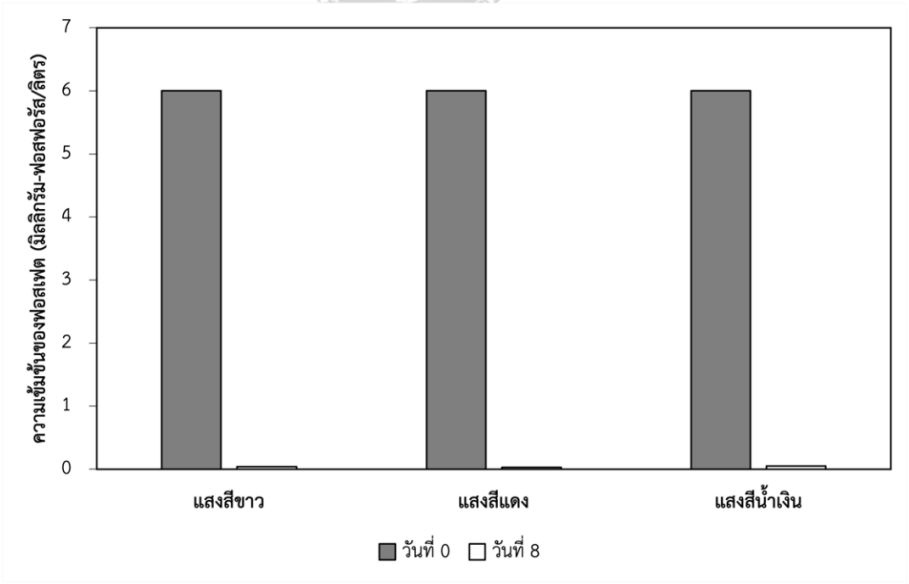
รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน



รูปที่ 4.18 ความเข้มข้นของลูทีน และปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน



รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน



รูปที่ 4.20 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของลูทีน ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน

ความยาวคลื่นแสง	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/กรัม)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)
แสงสีขาว	1.12 ± 0.30	1.61 ± 0.36	0.13 ± 0.04
แสงสีแดง	0.47 ± 0.12	0.54 ± 0.09	0.05 ± 0.02
แสงสีน้ำเงิน	0.36 ± 0.04	0.72 ± 0.08	0.04 ± 0.005

4.5 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตลูทีน

ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการปรับลด $NaNO_3$ ลงเหลือ 25% มาเพาะเลี้ยงโดยการเติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ให้อากาศปกติที่ไม่มีการผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (N25A) อีกทั้งยังมีการเพิ่มชุดทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C) และชุดทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) เพื่อลดข้อจำกัดเรื่องธาตุอาหารไนโตรเจน ระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายของทั้ง 4 ชุดทดลองจะใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดที่ได้รับจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.2 – 4.4 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพระบบเพาะเลี้ยงให้สามารถผลิตลูทีนได้มากที่สุด

ผลการติดตามการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปน้ำหนักแห้งพบว่าเมื่อใช้อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายกลับทำให้ระบบเพาะเลี้ยงในชุดทดลองที่ N25C ให้น้ำหนักแห้งในวันที่ 8 (510 ± 42.43 มิลลิกรัม/ลิตร) น้อยกว่าชุดทดลอง N25A ซึ่งใช้อากาศปกติใน

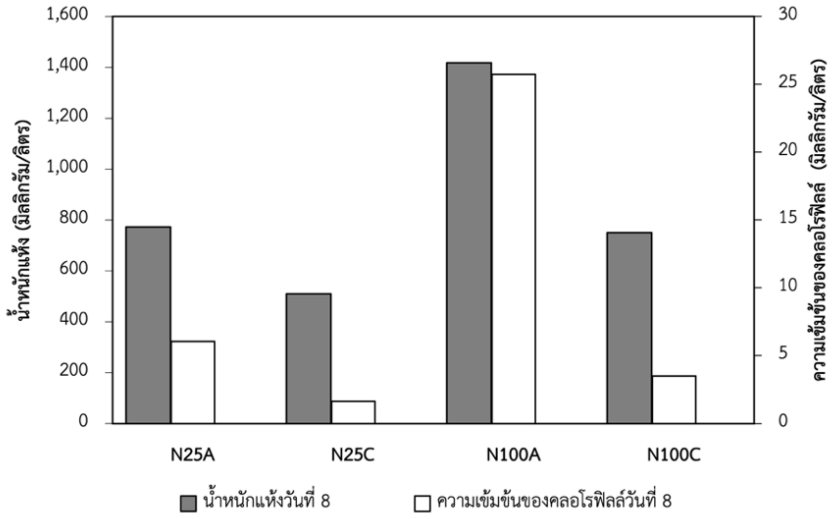
การเพาะเลี้ยง (773 ± 53.03 มิลลิกรัม/ลิตร) ทั้งนี้เป็นเพราะการเติมคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบเพาะเลี้ยงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 มีค่าสภาพด่างต่ำ (Total alkalinity = 60 มิลลิกรัมของแคลเซียมคาร์บอเนต/ลิตร) หรือความสามารถในการต้านความเป็นกรดจากคาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำต่ำจนส่งผลให้ pH ในระบบเพาะเลี้ยงของชุดทดลอง N25C ลดลงจนอยู่ในช่วง 6 – 7 เท่านั้น ซึ่งเป็นสภาวะที่จุลสาหร่ายเติบโตได้น้อยกว่าชุดทดลอง N25A ที่ตรวจพบค่า pH อยู่ที่ 7.5 - 8 ตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chai และคณะ[68] ที่พบว่าจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. สามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 8 อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักแห้งที่ตรวจวัดได้ในวันที่ 8 ของชุดทดลอง N25A กับค่าน้ำหนักแห้งของชุดทดลองที่ให้แสงด้วยไฟแอลอีดีสีขาวในการศึกษาที่ 4.4 ซึ่งมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเหมือนกันทุกประการ กลับพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในชุดทดลองที่ N25A ให้น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากมีคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนเกินจากชุดทดลองที่ใช้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์แพร่ออกมาจากระบบเพาะเลี้ยงแล้วมาสะสมอยู่ที่อากาศภายในห้องเพาะเลี้ยงซึ่งไม่มีระบบระบายอากาศสู่ภายนอก เมื่อตรวจวัดค่าความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศบริเวณนั้นพบว่ามีค่าสูงถึง 3,000 พีพีเอ็ม (0.3%) โดยที่ปั๊มจ่ายอากาศของระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายก็จะสูบอากาศบริเวณนั้นป้อนเข้าสู่ระบบเพาะเลี้ยงทั้งหมดในการศึกษานี้ ส่งผลให้ชุดทดลอง N25A และ N100A ได้รับอากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนเกิน 0.3% แทนอากาศปกติ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการเพิ่มผลผลิตชีวมวลด้วยการให้อากาศที่ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพียง 0.3% เท่านั้น แต่การที่จะสร้างระบบผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้ได้ 0.3% จากท่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ในระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายนั้นยังทำได้ยากในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการผลิตชีวมวลของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ที่ผ่านมานั้นถูกจำกัดธาตุอาหารไนโตรเจนอยู่เพียง 25% เพื่อกระตุ้นการผลิตลูทีน ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่จำกัดการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่จุลสาหร่ายได้รับให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเพิ่มชุดทดลอง N100A และ N100C เพื่อลดข้อจำกัดตรงส่วนนี้ เมื่อติดตามผลน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตชีวมวลได้จริง แต่การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยอากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3% ก็ยังให้ผลผลิตชีวมวลมากกว่าอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% อยู่ดี โดยพบน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของชุดทดลอง N100A และ N100C เท่ากับ 1,418 ± 53.03 และ 750 ± 62.12 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อนำค่าน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของแต่ละชุดทดลองมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นคลอโรฟิลล์พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันดังที่แสดงในรูปที่ 4.21

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในขณะเดียวกันเมื่อติดตามผลจากการตรวจวัดความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 8 ดังที่แสดงในรูปที่ 4.22 พบว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของทั้ง 4 ชุดทดลองนั้นมีแนวโน้มเช่นเดียวกับน้ำหนักแห้งและคลอโรฟิลล์อย่างเห็นได้ชัด โดยชุดทดลอง N100A มีค่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ (8.6 ± 2.30 มิลลิกรัม/ลิตร) มากกว่าชุดทดลอง N100C (1.5 ± 0.57 มิลลิกรัม/ลิตร) และชุดทดลอง N25A มีค่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ (1.4 ± 0.24 มิลลิกรัม/ลิตร) มากกว่าชุดทดลอง N25C (1.3 ± 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร) นั่นแสดงให้เห็นว่าในการศึกษานี้ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์หรือแม้กระทั่งลูทีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในแคโรทีนอยด์คือการผลิตชีวมวลจากระบบเพาะเลี้ยงซึ่งจะขึ้นอยู่กับการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสม และการเติมธาตุอาหารไนโตรเจนให้เพียงพอไม่เพียงแค่ส่งเสริมการผลิตชีวมวลเท่านั้นแต่ยังช่วยกระตุ้นให้การสะสมแคโรทีนอยด์ในชีวมวลของชุดทดลอง N100A มีค่าสูงถึง 5.8 ± 0.49 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งมากกว่าชุดทดลองอื่นอย่างเห็นได้ชัด ในส่วนการผลิตลูทีน (รูปที่ 4.23) พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับแคโรทีนอยด์ตามที่ได้อภิปรายไว้ในข้างต้น ซึ่งชุดทดลอง N100A นั้นให้ความเข้มข้นลูทีนสูงสุดที่ 1.24 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเทียบเท่าอัตราการผลิตลูทีน 0.15 ± 0.05 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน (ตารางที่ 4.5) แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งกลับพบว่ามีแนวโน้มที่แตกต่างจากความเข้มข้นของลูทีน กล่าวคือชุดทดลอง N25A ที่มีการจำกัดธาตุอาหารไนโตรเจนกลับมีปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากกว่าชุดทดลอง N100A ที่ไม่มีการจำกัดไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่าการจำกัดไนโตรเจนอยู่ที่ 25% $NaNO_3$ ยังคงมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสะสมลูทีนในชีวมวล แต่ถ้าหากต้องการให้ภาพรวมของระบบเพาะเลี้ยงสามารถผลิตลูทีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ในชุดทดลอง N100A นั้นจะเป็นตัวเลือกที่ดียิ่งกว่า

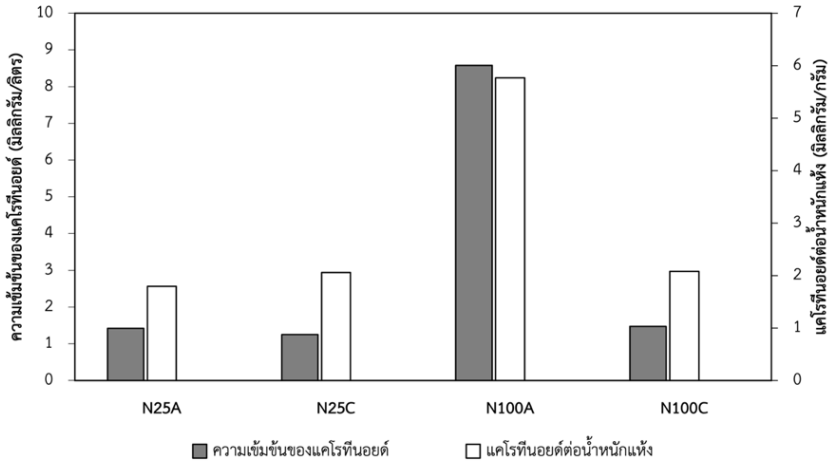
ในส่วนของการใช้ธาตุอาหารไนโตรเจนในรูปของไนเตรทดังที่แสดงในรูปที่ 4.24 พบว่ามีไนเตรทคงเหลือในระบบเพาะเลี้ยงด้วยอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชุดทดลอง N25C (2.1 ± 1.03 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) มากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอากาศปกติในชุดทดลอง N25A (1.9 ± 0.90 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) เช่นเดียวกับในชุดทดลอง N100C ที่มีความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลือในระบบ (83 ± 6.36 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) มากกว่าชุดทดลอง N100A (65 ± 18.22 มิลลิกรัม-

ไนโตรเจน/ลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับผลของน้ำหนักแห้ง เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของฟอสเฟตในชุดทดลอง N25A, N25C, N100A และ N100C พบว่ามีความเข้มข้นของฟอสเฟตคงเหลือในระบบเท่ากับ 0.05 ± 0.08, 0.04 ± 0.02, 0.04 ± 0.01 และ 0.03 ± 0.01 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น (6 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร) ดังที่แสดงในรูปที่ 4.25 ชี้ให้เห็นว่าจุลสาหร่ายในทุกชุดทดลองสามารถใช้ธาตุอาหารฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

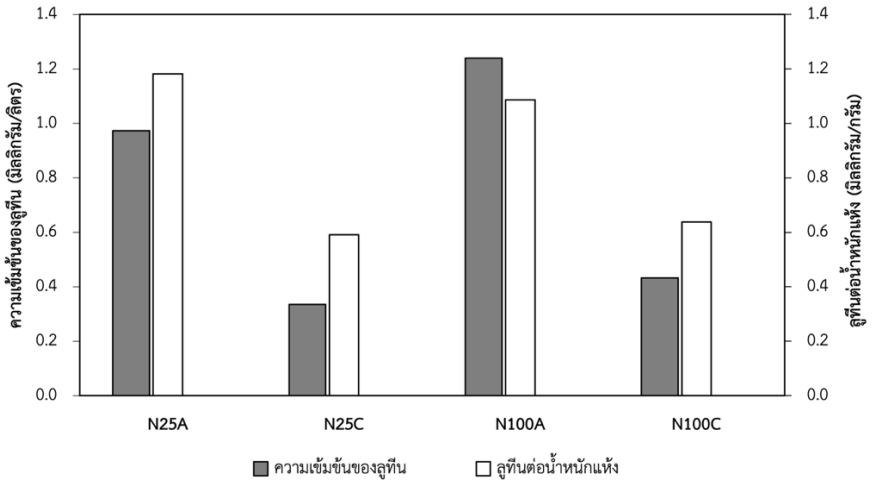


รูปที่ 4.21 น้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

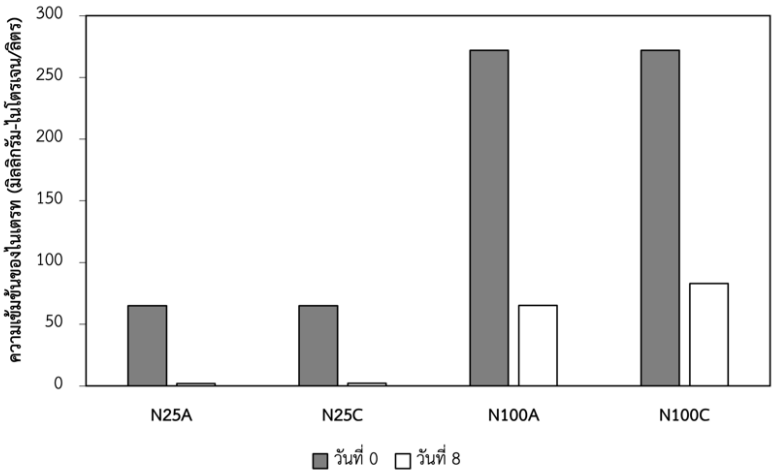
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



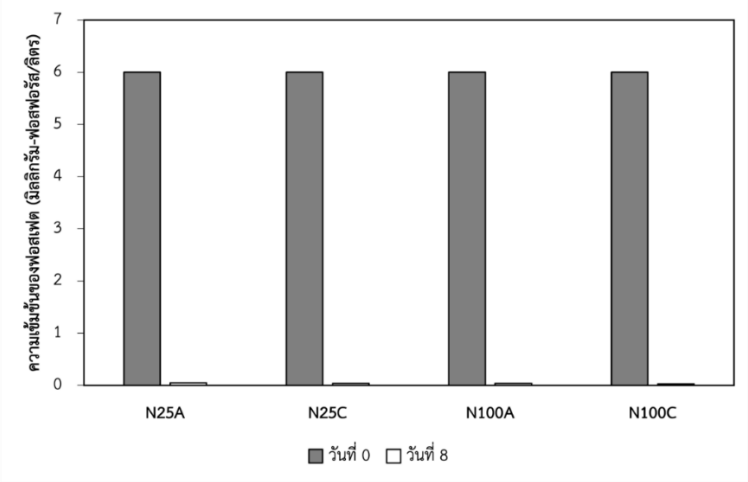
รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)



รูปที่ 4.23 ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหาร BG-11 สูตรปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหาร BG-11 สูตรปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)



รูปที่ 4.24 ความเข้มข้นของไนเตรทในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum sp.* TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)



รูปที่ 4.25 ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวันที่ 0 และวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นของลูทีน ลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลูทีน จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

การทดลอง	**ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)**	**ลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/กรัม)**	**อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)**
อากาศ (N25A)	0.97 ± 0.42	1.18 ± 0.59	0.11 ± 0.05
อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C)	0.34 ± 0.07	0.59 ± 0.04	0.03 ± 0.01
อากาศ (N100A)	1.24 ± 0.42	1.13 ± 0.08	0.15 ± 0.05
อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)	0.43 ± 0.06	0.64 ± 0.07	0.04 ± 0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อนำข้อมูลจากผลการทดลองมาเปรียบเทียบผลผลิตลูทีน (ตารางที่ 4.6) สามารถเรียงลำดับความมีอิทธิพลต่อผลผลิตลูทีนจากมากไปน้อย ได้แก่ การให้อากาศ ความยาวคลื่นแสง ความเข้มแสง แหล่งของไนโตรเจน และความเข้มข้นของไนโตรเจน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยง

สภาวะการทดลอง	**สภาวะที่เหมาะสม**	**ความเข้มข้นลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)**	**เปรียบเทียบกับชุดควบคุม[1] (จำนวนเท่า)**
ปรับสภาวะการให้อากาศ (อากาศ และอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร)	อากาศ	1.24	3.2
ปรับความยาวคลื่นแสง (แสงสีขาว แสงสีแดง แสงสีน้ำเงิน)	แสงสีขาว	1.12	2.9
ปรับความเข้มแสง (134, 201, 402 ไมโครโมล-โฟตอน/ตารางเมตร·วินาที)	201	1.11	2.8
ปรับแหล่งของไนโตรเจน ($NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย)	$NaNO_3$	0.75	1.9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) เปรียบเทียบความเข้มข้นของลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยง

สภาวะการทดลอง	**สภาวะที่เหมาะสม**	**ความเข้มข้นลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)**	**เปรียบเทียบกับชุดควบคุม[1] (จำนวนเท่า)**
ปรับความเข้มข้นของไนโตรเจน (0%, 25%, 50%, 100%, 125%, 150% $NaNO_3$)	25% $NaNO_3$	0.55	1.4

[1] สภาวะของการทดลองในชุดควบคุมคือการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในอาหาร BG-11 ปกติ (มี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน) ให้แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 134 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และให้อากาศในอัตรา 0.8 ลิตร/นาที ได้รับผลผลิตลูทีนเท่ากับ 0.39 มิลลิกรัม/ลิตร

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ทำให้สรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในอาหาร BG-11 ปกติ ที่มี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้การให้แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3 % โดยปริมาตร ในการเพาะเลี้ยงเป็นสภาวะที่สามารถเพิ่มผลผลิตลูทีนได้สูงถึง 3.2 เท่าจากชุดควบคุม

4.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

จากการนำจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับสภาวะให้มีผลผลิตลูทีนสูงที่สุดไปวิเคราะห์ CHN พบว่ามีปริมาณไนโตรเจน 6.57% โดยน้ำหนักแห้ง สามารถคำนวณปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 41.06% โดยน้ำหนักแห้ง หรือเท่ากับ 410.6 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนที่พบในจุลสาหร่าย *Spirulina platensis* ซึ่งรายงานว่าเป็นจุลสาหร่ายที่มีโปรตีนสูง โดยมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 50 - 70% โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจุลสาหร่าย *Chlorococcum* อาจเป็นอีกหนึ่งในแหล่งโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนาประสิทธิภาพของระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร ให้มีผลผลิตลูทีนสูงที่สุดโดยอาศัยปัจจัยจากความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาผลของการปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 50% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตทั้งในรูปน้ำหนักแห้งและคลอโรฟิลล์ ในขณะเดียวกันชุดทดลองที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 50% นี้ให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์ในวันที่ 8 ใกล้เคียงกับชุดที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 125% แต่เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งในวันเดียวกันกลับพบว่าชุดทดลองที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 125% มีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงการผลิตลูทีนกลับพบว่าชุดทดลองที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 25% ให้ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งสูงที่สุด ทำให้สรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เหลือ 25% เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเพิ่มผลผลิตลูทีน

2. การศึกษาผลของการปรับแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน พบว่าชุดทดลองที่ใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดทั้งในเรื่องของการเจริญเติบโต การผลิตแคโรทีนอยด์ และการผลิตลูทีน

3. การศึกษาผลของการปรับความเข้มแสงต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน พบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที เป็นสภาวะที่ทำให้จุลสาหร่ายเจริญเติบโตมากที่สุดทั้งในรูปน้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ในส่วนของผลผลิตแคโรทีนอยด์ในวันที่ 8 พบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 134 และ 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งกลับพบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสงที่ 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีค่ามากกว่าอย่างเห็นได้ชัด ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาการผลิตลูทีน พบว่าชุดทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที นี้ได้รับความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งสูงที่สุด ทำให้สรุปได้ว่าความเข้มแสงที่ 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum*

4. การศึกษาผลของการปรับความยาวคลื่นแสงต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน พบว่าชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงได้รับน้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในวันที่ 8 สูงที่สุด จึงกล่าวได้ว่าแสงสีแดงเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* อย่างไรก็ตามชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงไม่เพียงแต่ทำให้การเจริญเติบโตดีเท่านั้นแต่ให้ผลผลผลิตแคโรทีนอยด์ในวันที่ 8 มากที่สุดด้วย เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งกลับพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวมีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากกว่า ทำให้ทราบได้ว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่มากในชุดทดลองที่ใช้แสงสีแดงเป็นผลมาจากการที่จุลสาหร่ายเติบโตได้ดี แต่แสงสีแดงไม่ได้ช่วยกระตุ้นให้มีการสะสมแคโรทีนอยด์ในชีวมวลมากเท่ากับชุดทดลองที่ใช้แสงสีขาว ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาไปถึงการผลิตลูทีนพบว่าชุดทดลองที่ใช้แสงสีขาวได้รับทั้งความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมากกว่าแสงสีอื่นๆ ดังนั้นทำให้สรุปได้ว่าแสงสีขาวเหมาะสมกับระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* เพื่อเพิ่มผลผลิตลูทีนมากที่สุด

5. การศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

พบว่าชุดทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่มีการให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3 % โดยปริมาตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้รับทั้งน้ำหนักแห้ง ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งสูงที่สุด รวมไปถึงความเข้มข้นของลูทีนสูงที่สุดอีกด้วย แต่เมื่อพิจารณาปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งกลับพบว่าชุดทดลองที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของ $NaNO_3$ 25% มีค่ามากที่สุด ทำให้ทราบได้ว่าปริมาณไนโตรเจนที่จำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมของลูทีนในชีวมวลได้ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การพัฒนาประสิทธิภาพในภาพรวมของระบบจึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ด้วยด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3 % โดยปริมาตรเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด

6. จากการสืบค้นวรรณกรรมพบว่ามีการนำจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ไปเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำ ใช้ในการบำบัดของเสีย เช่น น้ำเสีย และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ [10, 68, 69] แต่ยังพบการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการนำมาเป็นแหล่งผลิตลูทีนที่ค่อนข้างน้อย หากนำน้ำเสียที่มีธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส และแก๊สเผาไหม้ (flue gas) จากระบบการผลิตอื่นๆ มาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายร่วมกับสภาวะที่เหมาะสมจากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้มาประยุกต์ร่วมกันเพื่อผลิตเป็นสารมูลค่าสูงทั้งลูทีน และโปรตีนจะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่จุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 5.1 สรุปผลการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 และอัตราการผลิตชีวมวล

ชุดการทดลอง		**น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/ลิตร)**	**อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)**
ความเข้มข้น $NaNO_3$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	0% $NaNO_3$	210 ± 18.03	17.29 ± 1.44
	25% $NaNO_3$	435 ± 78.58	39.17 ± 14.28
	50% $NaNO_3$	630 ± 131.43	73.13 ± 16.35
	100% $NaNO_3$	565 ± 229.62	55.79 ± 29.05
	125% $NaNO_3$	545 ± 201.43	55.35 ± 23.37
	150% $NaNO_3$	555± 100.37	56.25 ± 10.44
แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	$NaNO_3$	628 ± 82.51	70.36 ± 8.84
	$Ca(NO_3)_2$	477 ± 37.53	49.92 ± 4.40
	$(NH_4)_2SO_4$	148 ± 22.55	12.44 ± 3.58
	ยูเรีย	597 ± 145.46	66.40 ± 18.68
ความเข้มแสง (ไมโครโมล-โฟตอน/ตารางเมตร·วินาที	134	708 ± 60.10	80.0 ± 8.84
	201	783 ± 142.86	97.81 ± 25.19
	402	700 ± 7.07	78.13 ± 3.25
ความยาวคลื่นแสง	แสงสีขาว	695 ± 95.39	82.81 ± 8.40
	แสงสีแดง	875 ± 65.57	101.88 ± 8.59
	แสงสีน้ำเงิน	510 ± 82.61	59.38 ± 7.07

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) สรุปผลการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 และอัตราการผลิตชีวมวล

ชุดการทดลอง		**น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/ลิตร)**	**อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)**
การให้อากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	อากาศ (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$)	773 ± 53.03	124.01 ± 24.93
	อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$)	510 ± 42.43	60.24 ± 5.02
	อากาศ (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ)	1418 ± 53.03	138.54 ± 36.13
	อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ)	750 ± 62.12	82.43 ± 10.36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5.2 สรุปผลการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง

ชุดการทดลอง		**ความเข้มข้นลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)**	**ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/กรัม)**
ความเข้มข้น $NaNO_3$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	0% $NaNO_3$	ND	ND
	25% $NaNO_3$	0.55 ± 0.19	1.33 ± 0.63
	50% $NaNO_3$	0.42 ± 0.11	0.68 ± 0.23
	100% $NaNO_3$	0.39 ± 0.22	0.79 ± 0.53
	125% $NaNO_3$	0.44 ± 0.26	0.91 ± 0.63
	150% $NaNO_3$	0.35 ± 0.35	0.71 ± 0.81
แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11	$NaNO_3$	0.75 ± 0.48	1.14 ± 0.70
	$Ca(NO_3)_2$	0.25 ± 0.03	0.53 ± 0.05
	$(NH_4)_2SO_4$	0.03 ± 0.002	0.18 ± 0.02
	ยูเรีย	0.28 ± 0.26	0.50 ± 0.43
ความเข้มแสง (ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที	134	0.92 ± 0.29	1.35 ± 0.28
	201	1.11 ± 0.32	1.40 ± 0.15
	402	0.82 ± 0.05	1.14 ± 0.07
ความยาวคลื่นแสง	แสงสีขาว	1.12 ± 0.30	1.61 ± 0.36
	แสงสีแดง	0.47 ± 0.12	0.54 ± 0.09
	แสงสีน้ำเงิน	0.36 ± 0.04	0.72 ± 0.08

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5.2 (ต่อ) สรุปผลการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มแสง ความยาวคลื่นแสง และผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง

ชุดการทดลอง		**ความเข้มข้นลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)**	**ปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม/กรัม)**
การให้อากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	อากาศ (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$)	0.97 ± 0.42	1.18 ± 0.02
	อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$)	0.34 ± 0.07	0.59 ± 0.43
	อากาศ (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ)	1.24 ± 0.42	1.13 ± 0.28
	อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ)	0.43 ± 0.06	0.64 ± 0.15

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันพบว่า $NaNO_3$ อาจมีบทบาทสำคัญในการเร่งการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึกต่อไป

2. จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยความยาวคลื่นแสงที่แตกต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีแดงทำให้จุลสาหร่ายผลิตชีวมวลได้มาก ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวทำให้จุลสาหร่ายผลิตลูทีนได้มาก ดังนั้นอาจทำการศึกษาถึงการประยุกต์ใช้ความยาวคลื่นแสงสีแดงร่วมกับแสงสีขาวในการเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจจะทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตลูทีนได้มากขึ้น

3. ศึกษาในระบบที่มีขนาดใหญ่ขึ้นร่วมกับการใช้แสงจากธรรมชาติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

1. Zheng, H., et al., *Recent advances in lutein production from microalgae.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2022. **153**.
2. Demmig-Adams, B. and W.W. Adams, 3rd, *Antioxidants in photosynthesis and human nutrition.* Science, 2002. **298**(5601): p. 2149-53.
3. Weikel, K.A., C.J. Chiu, and A. Taylor, *Nutritional modulation of age-related macular degeneration.* Mol Aspects Med, 2012. **33**(4): p. 318-75.
4. กมลรัตน์ ยงเจริญ, et al., ระดับความเข้มข้นของลูทีนในอาหารต่อสีของปลาการ์ตูนลายปล้อง. 2556.
5. Del Campo, J.A., M. Garcia-Gonzalez, and M.G. Guerrero, *Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives.* Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **74**(6): p. 1163-74.
6. Lin, J.H., D.J. Lee, and J.S. Chang, *Lutein production from biomass: marigold flowers versus microalgae.* Bioresour Technol, 2015. **184**: p. 421-428.
7. Ma, R., et al., *Two-stage bioprocess for hyper-production of lutein from microalga Chlorella sorokiniana FZU60: Effects of temperature, light intensity, and operation strategies.* Algal Research, 2020. **52**.
8. Sánchez, J.F., et al., *Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain Scenedesmus almeriensis.* Process Biochemistry, 2008. **43**(4): p. 398-405.
9. Del Campo, J.A., et al., *Lutein production by Muriellopsis sp. in an outdoor tubular photobioreactor.* J Biotechnol, 2001. **85**(3): p. 289-95.
10. Powtongsook, S. and K. Nootong, *Photoautotrophic cultivation of Chlorococcum humicola in stirred tank and airlift photobioreactors under different light settings and light supplying strategies for biomass and carotenoid production.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2019. **94**(10): p. 3084-3092.
11. Zhang, D.-H. and Y.-K. Lee, *Ketocarotenoid production by a mutant of Chlorococcum sp. in an outdoor tubular photobioreactor.* Biotechnology Letters, 1999. **21**(1): p. 7-10.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

12. Wannachod, T., et al., *Photoautotrophic cultivating options of freshwater green microalgal Chlorococcum humicola for biomass and carotenoid production.* Prep Biochem Biotechnol, 2018. **48**(4): p. 335-342.
13. Pirastru, L., et al., *Carotenoid production and change of photosynthetic functions in Scenedesmus sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment.* Journal of Applied Phycology, 2011. **24**(1): p. 117-124.
14. Vaquero, I., et al., *Light-mediated lutein enrichment of an acid environment microalga.* Algal Research, 2014. **6**: p. 70-77.
15. Dineshkumar, R., S.K. Dash, and R. Sen, *Process integration for microalgal lutein and biodiesel production with concomitant flue gas CO2 sequestration: a biorefinery model for healthcare, energy and environment.* RSC Advances, 2015. **5**(90): p. 73381-73394.
16. Xie, Y., et al., *Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant Desmodesmus sp. for lutein production: effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation.* Bioresour Technol, 2013. **144**: p. 435-44.
17. ยุวดี พีรพรพิศาล, et al., การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบมิกโซโทรฟิกเพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพจากสาหร่าย. 2554.
18. Farag, I. and K. Price, *Resources Conservation in Microalgae Biodiesel Production.* " International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR, 2013. **1**: p. 49-56.
19. Hall, D.O. and K.K. Rao, *Photosynthesis*. 6th ed. ed. 1999, Cambridge: The Press Syndicate Of The University Of Cambridge.
20. แจ้งเอี่ยม, ว., กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, 2553. **13**(1): p. 68-77.
21. ภูไพรำ ภูไพบูลย์, ผลของอัตราการไหลของอากาศและความยาวคลื่นแสงต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในถงปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง. 2559, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.
22. Cassidy, K.O., *Evaluating Algal Growth at Different Temperature*. 2011, University of Kentucky: Kentucky.
23. ผกาวดี แก้วกันเนตร, พรเทพ ถนนแก้ว, and พนิดา รัตรพลที, การเพาะเลี้ยงและการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลที่ยั่งยืน. 2552.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

24. Ota, M., et al., *Variation of photoautotrophic fatty acid production from a highly CO2 tolerant alga, Chlorococcum littorale, with inorganic carbon over narrow ranges of pH.* Biotechnol Prog, 2015. **31**(4): p. 1053-7.
25. Karemore, A., R. Pal, and R. Sen, *Strategic enhancement of algal biomass and lipid in Chlorococcum infusionum as bioenergy feedstock.* Algal Research, 2013. **2**(2): p. 113-121.
26. Feng, P., et al., *Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of Chlorella sp. GN1 outdoors.* Bioresour Technol, 2020. **301**: p. 122762.
27. Masojídek, J., et al., *Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga Chlorococcum sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress.* Journal of Applied Phycology, 2000. **12**(3): p. 417-426.
28. Yuan, J.-P., et al., *Carotenoid composition in the green microalga Chlorococcum.* Food Chemistry, 2002. **76**(3): p. 319-325.
29. Christaki, E., E. Bonos, and P. Florou-Paneri, *Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition*, in *Handbook of Marine Microalgae*. 2015. p. 233-243.
30. Bartley, G.E. and P.A. Scolnik, *Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health.* Plant Cell, 1995. **7**(7): p. 1027-38.
31. Krinsky, N.I., *Antioxidant functions of carotenoids.* Free Radic Biol Med, 1989. **7**(6): p. 617-35.
32. *Carotenoids*, in *Carotenoids*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, Editors. 1996, Birkhäuser Basel.
33. Stahl, W. and H. Sies, *Antioxidant activity of carotenoids.* Mol Aspects Med, 2003. **24**(6): p. 345-51.
34. Peng, L., C.Q. Lan, and Z. Zhang, *Evolution, detrimental effects, and removal of oxygen in microalga cultures: A review.* Environmental Progress & Sustainable Energy, 2013. **32**(4): p. 982-988.
35. Cerón, M.C., et al., *Recovery of lutein from microalgae biomass: development of a process for Scenedesmus almeriensis biomass.* J Agric Food Chem, 2008.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

56(24): p. 11761-6.

36. Saha, S.K., H. Ermis, and P. Murray, *Marine Microalgae for Potential Lutein Production.* Applied Sciences, 2020. **10**(18).
37. Carvalho, A.P., et al., *Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects.* Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **89**(5): p. 1275-88.
38. del Rio-Chanona, E.A., et al., *Kinetic modeling and process analysis for Desmodesmus sp. lutein photo-production.* AIChE Journal, 2017. **63**(7): p. 2546-2554.
39. Fu, W., et al., *Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga Dunaliella salina.* Microb Cell Fact, 2014. **13**: p. 3.
40. Ho, S.H., et al., *Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus FSP-3 using light-related strategies.* Bioresour Technol, 2014. **152**: p. 275-82.
41. Li, D., et al., *Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of Chlorella sp. AE10.* Bioresour Technol, 2019. **291**: p. 121783.
42. McGee, D., et al., *Influence of spectral intensity and quality of LED lighting on photoacclimation, carbon allocation and high-value pigments in microalgae.* Photosynth Res, 2020. **143**(1): p. 67-80.
43. Přibyl, P., et al., *The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in Scenedesmus sp.* Algal Research, 2016. **16**: p. 69-75.
44. Shi, T.Q., et al., *Stresses as First-Line Tools for Enhancing Lipid and Carotenoid Production in Microalgae.* Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 610.
45. Ram, S., C. Paliwal, and S. Mishra, *Growth medium and nitrogen stress sparked biochemical and carotenogenic alterations in Scenedesmus sp. CCNM 1028.* Bioresource Technology Reports, 2019. **7**.
46. Coulombier, N., et al., *Effects of Nitrogen Availability on the Antioxidant Activity and Carotenoid Content of the Microalgae Nephroselmis sp.* Mar Drugs, 2020. **18**(9).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

47. Ho, S.H., et al., *Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating strategies on lutein production with Scenedesmus obliquus FSP-3.* Bioresour Technol, 2015. **184**: p. 131-138.

48. Li, Y., et al., *Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga Neochloris oleoabundans.* Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **81**(4): p. 629-36.

49. Xu, N., et al., *Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of Ellipsoidion sp. (Eustigmatophyta).* Journal of Applied Phycology, 2001. **13**(6): p. 463-469.

50. Hsieh, C.H. and W.T. Wu, *Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation.* Bioresour Technol, 2009. **100**(17): p. 3921-6.

51. Molino, A., et al., *Enhancing Biomass and Lutein Production From Scenedesmus almeriensis: Effect of Carbon Dioxide Concentration and Culture Medium Reuse.* Front Plant Sci, 2020. **11**: p. 415.

52. Ren, Y., et al., *Developing a Chromochloris zofingiensis Mutant for Enhanced Production of Lutein under CO(2) Aeration.* Mar Drugs, 2022. **20**(3).

53. Chen, C.-Y., et al., *Enhancing lutein production with Chlorella sorokiniana Mb-1 by optimizing acetate and nitrate concentrations under mixotrophic growth.* Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017. **79**: p. 88-96.

54. Xie, Y., et al., *Enhancing cell growth and lutein productivity of Desmodesmus sp. F51 by optimal utilization of inorganic carbon sources and ammonium salt.* Bioresour Technol, 2017. **244**(Pt 1): p. 664-671.

55. Xie, Y., et al., *Pilot-scale cultivation of Chlorella sorokiniana FZU60 with a mixotrophy/photoautotrophy two-stage strategy for efficient lutein production.* Bioresour Technol, 2020. **314**: p. 123767.

56. Heo, J., et al., *Indigenous microalga Parachlorella sp. JD-076 as a potential source for lutein production: Optimization of lutein productivity via regulation of light intensity and carbon source.* Algal Research, 2018. **33**: p. 1-7.

57. Rippka, R., et al., *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.* Microbiology, 1979. **111**(1): p. 1-61.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

58. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. 1998, Washington DC: American Public Health Association.

59. Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons, *A practical Handbook of Seawater Analysis*. 2nd ed. 1972, Ottawa: Supply and Services Canada.

60. E., B.C. and H.-H. T., *A salicylate–hypochlorite method for determining ammonia in seawater.* Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1980. **4**(5): p. 794-798.

61. Eghbali Babadi, F., et al., *Identification of carotenoids and chlorophylls from green algae Chlorococcum humicola and extraction by liquefied dimethyl ether.* Food and Bioproducts Processing, 2020. **123**: p. 296-303.

62. ศิราภรณ์ ชื่นบาล, ฐปน ชื่นบาล, and รุ่งทิพย์ กาวารี, การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในถังปฏิกรณ์ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์. 2557.

63. Tevatia, R., Y. Demirel, and P. Blum, *Kinetic modeling of photoautotropic growth and neutral lipid accumulation in terms of ammonium concentration in Chlamydomonas reinhardtii.* Bioresour Technol, 2012. **119**: p. 419-24.

64. Ramanna, L., et al., *The optimization of biomass and lipid yields of Chlorella sorokiniana when using wastewater supplemented with different nitrogen sources.* Bioresour Technol, 2014. **168**: p. 127-35.

65. Chen, C.Y. and C.C. Liu, *Optimization of lutein production with a two-stage mixotrophic cultivation system with Chlorella sorokiniana MB-1.* Bioresour Technol, 2018. **262**: p. 74-79.

66. Anderson, G., C. Koc, and A. Kommreddy, *Use of Red and Blue Light-Emitting Diodes (LED) and Fluorescent Lamps to Grow Microalgae in a Photobioreactor.* The Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh, 2012. **65**.

67. Gatamaneni Loganathan, B., et al., *A comprehensive study on the effect of light quality imparted by light-emitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of Chlorella variabilis and Scenedesmus obliquus cultivated in dairy wastewater.* Bioprocess Biosyst Eng, 2020. **43**(8): p. 1445-1455.

68. Chai, X., X. Zhao, and W. Baoying, *Biofixation of carbon dioxide by Chlorococcum sp. in a photobioreactor with polytrtrafluoroethene membrane*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

sparger. Journal of Biotechnology, 2012. **11**(29): p. 7445-7453.

69. ณกรณ์ เที่ยงภักดี, การกำจัดน้ำเสียชุมชนด้วยจุลสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์คลอโรคอกคัม ฮิวมิโคลส. 2562, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี: อุบลราชธานี.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

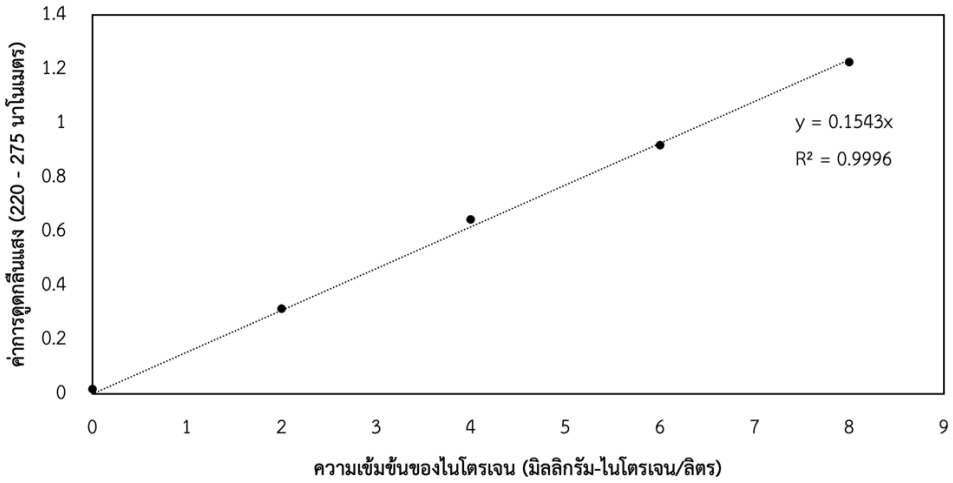
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

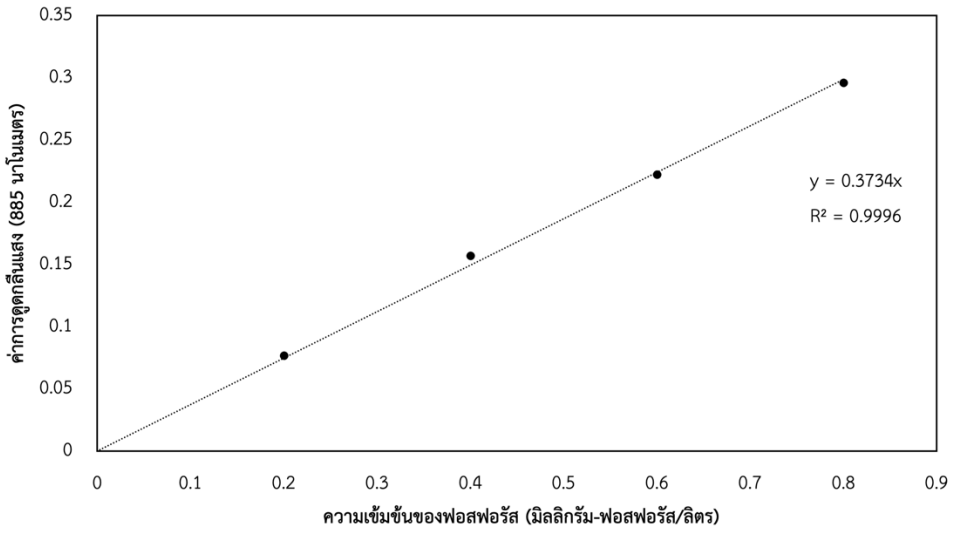
ภาคผนวก ก.

การติดตามผลการทดลอง

1. ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานสารละลายไนเตรท



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานสารละลายฟอสเฟต

ภาคผนวก ข

ผลการเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ ข-1 น้ำหนักแห้งของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)					
	0% $NaNO_3$	25% $NaNO_3$	50% $NaNO_3$	100% $NaNO_3$	125% $NaNO_3$	150% $NaNO_3$
0	71.67±7.64	121.67±53.46	90±5.00	118.70±28.28	102.22±23.59	105±18.03
1	113.33±20.82	133.33±7.64	133.33±7.64	176.67±20.82	146.67±75.22	161.67±12.58
2	113.33±20.82	133.33±7.64	133.33±7.64	176.67±20.82	146.67±75.22	161.67±12.58
3	175±5.00	245±31.22	245±31.22	316.67±58.38	320±40.93	278.33±51.32
4	71.67±7.64	290.83±64.24	408.33±46.46	351.67±72.17	413.33±98.28	283.33±97.77
5	198.33±23.63	313.33±67.14	451.67±36.17	400±105.83	421.67±72.51	376.67±7.64
6	240±84.11	383.33±70.24	536.67±85.05	473.33±178.63	448.33±141.45	461.67±62.52
7	243.33±42.52	406.67±91.15	598.33±66.40	505±168.60	475±157.88	493.33±46.46
8	210±18.03	435±78.58	630±131.43	565±229.62	545±201.43	555±100.37

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ข-2 น้ำหนักแห้งของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย

เวลา (วัน)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)			
	$NaNO_3$,	$Ca(NO_3)_2$	$(NH_4)_2SO_4$	ยูเรีย
0	65.43±12.50	77.31±2.52	48.80±6.59	65.43±12.50
1	110±5.00	136.67±15.28	98.33±15.28	106.67±5.77
2	222.62±34.04	232.35±18.19	131.55±4.61	228.33±17.56
3	300±35.00	276.67±16.07	145±13.23	303.33±36.17
4	373.33±20.82	338.33±34.03	151.67±5.77	363.33±75.72
5	466.67±59.65	391.67±23.63	146.67±17.56	438.33±59.65
6	555±60.62	460±18.03	158.33±16.07	483.33±73.71
7	611.67±122.920	460±18.03	153.33±14.43	530±85.29
8	628.33±82.51	476.67±37.53	148.33±22.55	596.67±145.46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ข-3 น้ำหนักแห้งของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

เวลา (วัน)	**น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**		
	134	201	402
0	68.33±7.64	75.00±0.00	76.67±5.77
1	151.67±17.56	160±8.66	171.67±7.64
2	241.67±30.14	271.67±32.15	283.33±42.52
3	323.33±11.55	383.33±43.68	371.67±62.52
4	388.33±37.53	461.67±54.85	446.67±40.41
5	461.67±57.74	570±51.96	548.33±27.54
6	555.00±43.59	660±48.22	623.33±28.43
7	623.33±52.04	730±90.42	671.67±20.82
8	707.50±60.10	783.33±142.86	700±7.07

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ข-4 น้ำหนักแห้งของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน

เวลา (วัน)	**น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**		
	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
0	83.33±7.64	90±5.00	80±5.00
1	145±13.23	185±8.66	131.67±20.82
2	295±130.29	373.33±40.72	228.33±30.14
3	271.67±24.66	475±21.79	255±32.79
4	350±34.64	583.33±57.52	318.33±36.86
5	460±30.41	640±23.79	398.33±47.52
6	558.33±55.75	773.33±96.48	455±87.18
7	640±63.84	818.33±79.74	516.67±110.15
8	695±95.39	875±65.57	510±82.61

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ข-5 น้ำหนักแห้งของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

เวลา (วัน)	**น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**			
	N25A	N25C	N100A	N100C
0	80.00±20.21	105±13.23	117.50±3.54	75±8.66
1	117.50±20.21	155±27.84	190±0.00	152.50±27.84
2	272.50±28.43	315±35.36	375±98.99	367.50±62.92
3	402.50±96.57	317.50±97.00	435±77.78	410±15.28
4	650±103.00	372.50±59.65	712.50±38.89	520±138.65
5	775.00±117.58	458.33±61.66	905.00 42.43	540±8.66
6	790±139.19	520±5.39	1077.50±53.03	597.50±39.05
7	757.50±293.21	512.50±28.43	1267.50±38.89	690±33.29
8	772.50±53.03	510±42.43	1417.50±53.03	750±62.12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค.
ผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ตารางที่ ค-1 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**					
	0% $NaNO_3$	25% $NaNO_3$	50% $NaNO_3$	100% $NaNO_3$	125% $NaNO_3$	150% $NaNO_3$
0	2.62±2.27	4.67±0.51	9.03±0.15	7.52±2.57	5.02±0.80	13.56±2.92
1	7.74±6.31	14.52±7.18	12.56±2.12	14.76±5.91	12.87±5.30	12.31±7.32
2	3.88±3.15	23.64±11.60	16.66±10.83	22.75±12.69	14.13±7.23	22.24±17.53
3	2.38±1.78	18.97±6.22	21.78±9.60	17.24±7.90	14.49±8.99	22.04±15.17
4	2.52±2.09	25.51±8.70	35.97±6.94	29.77±6.93	29.43±7.10	18.81±8.82
5	1.93±1.53	32.16±10.01	43.18±9.06	34.67±9.92	38.74±11.44	24.01±9.38
6	3.42±2.56	34.16±10.86	58.71±18.03	35.80±14.77	36±8.80	30.47±17.78
7	2.98±2.45	28.27±8.06	39.52±10.57	37.61±14.89	32.97±14.30	18.05±7.25
8	2.13±0.01	27.75±7.51	50.62±22.42	36.13±16.44	42.36±14.07	29.70±7.68

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ค-2 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**			
	$NaNO_3$,	$Ca(NO_3)_2$	$(NH_4)_2SO_4$	ยูเรีย
0	3.21±0.34	3.49±0.16	2.65±0.55	3.70±1.64
1	9.09±4.45	6.41±0.37	7.78±3.60	8.24±1.89
2	12.80±7.86	10.14±2.41	9.42±5.70	20.53±18.20
3	22.61±18.07	9.03±3.83	9.26±6.14	31.57±28.68
4	33.09±14.60	15.21±2.27	7.88±0.54	44.96±32.67
5	47.63±9.43	17.78±2.55	7.21±1.79	34.99±19.25
6	28.21±3.93	10.31±4.25	5.75±0.51	31.18±18.93
7	49.10±2.16	17.89±1.96	7.98±2.68	28.39±29.94
8	36.09±3.07	14.49±4.48	4.71±2.00	27.79±5.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ค-3 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**		
	134	201	402
0	0.54±0.03	0.49±0.15	1.04±0.33
1	2.07±0.10	2.22±0.21	2.04±0.12
2	5.03±0.89	5.99±2.04	5.45±1.05
3	9.01±1.02	7.87±2.15	6.44±1.27
4	9.00±2.20	11.36±2.06	6.95±2.00
5	12.91±2.45	10.60±2.59	6.68±0.72
6	15.33±3.96	13.13±3.87	7.94±0.95
7	15.03±3.31	14.67±3.73	7.92±0.66
8	14.18±1.47	16.83±3.82	9.92±0.59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ค-4 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**		
	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
0	0.91±0.27	0.75±0.11	0.79±0.23
1	2.95±1.07	2.03±0.35	1.84±0.13
2	4.46±1.23	7.64±1.38	4.19±1.24
3	6.17±2.88	4.78±0.34	8.54±1.26
4	7.85±0.67	9.76±1.57	6.72±0.92
5	8.37±1.81	8.11±0.66	9.86±1.25
6	10.88±2.89	12.09±1.66	10.44±1.79
7	9.35±3.76	7.42±2.09	7.27±1.47
8	6.71±1.20	8.90±2.05	5.74±0.64

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ค-5 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**			
	N25A	N25C	N100A	N100C
0	1.15±0.14	1.09±0.14	1.30±0.04	1.17±0.11
1	3.39±0.30	2.15±0.34	2.72±0.28	2.94±0.44
2	5.84±0.03	5.47±0.31	6.13±1.85	5.35±0.83
3	6.74±1.26	7.36±1.29	9.34±2.51	6.55±2.67
4	8.53±0.51	5.78±0.69	14.58±2.91	6.43±2.59
5	8.56±2.11	4.13±0.80	19.28±4.18	5.82±0.82
6	10.88±2.88	3.26±0.86	22.33±7.58	8.11±0.77
7	9.36±3.76	2.72±0.82	25.58±7.56	5.85±1.02
8	6.05±1.20	1.64±0.65	25.74±7.66	3.51±2.12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ง.
ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

ตารางที่ ง-1 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**					
	0% $NaNO_3$	25% $NaNO_3$	50% $NaNO_3$	100% $NaNO_3$	125% $NaNO_3$	150% $NaNO_3$
0	0.18±0.12	0.17±0.10	0.34±0.19	0.27±0.17	0.18±0.11	0.54±0.32
1	0.63±0.38	0.41±0.09	0.41±0.16	0.42±0.12	0.35±0.09	0.39±0.18
2	0.36±0.12	0.97±0.36	0.61±0.12	1.05±0.71	0.58±0.25	0.85±0.40
3	0.24±0.04	1±0.31	1.03±0.35	0.92±0.39	0.80±0.43	1.27±1.05
4	0.22±0.07	1.54±0.61	1.92±0.34	1.53±0.11	1.52±0.18	1.11±0.43
5	0.26±0.10	1.82±0.69	2.17±0.61	1.81±0.50	2.06±0.52	1.32±0.60
6	0.31±0.10	2.01±0.86	3.16±1.30	1.95±0.46	2.05±0.27	1.98±0.81
7	0.26±0.07	1.70±0.72	1.95±0.21	1.97±0.57	1.92±0.90	1.12±0.36
8	0.14±0.02	1.70±0.33	2.55±0.80	2±0.69	2.50±0.68	1.78±0.76

ตารางที่ ง-2 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**			
	$NaNO_3$,	$Ca(NO_3)_2$	$(NH_4)_2SO_4$	ยูเรีย
0	2.04±1.41	2.02±1.11	0.74±0.52	1.46±0.59
1	2.83±1.38	2.69±1.00	1.37±0.95	2.53±0.47
2	4.76±2.99	5.31±3.39	1.55±0.90	6.05±5.67
3	7.45±6.29	5.81±4.83	1.73±0.69	9.54±9.78
4	10.45±5.64	6.47±2.48	2.05±1.28	12.89±12.25
5	15.41±3.09	7.21±0.68	2.42±1.79	10.20±5.90
6	9.73±2.12	5.42±2.18	1.75±1.00	9.49±7.38
7	17.49±0.61	9.31±2.67	2.83±2.00	14.76±8.96
8	13.44±1.78	7.27±1.70	1.54±0.35	10.35±7.60

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ง-3 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**		
	134	201	402
0	0.19±0.01	0.16±0.05	0.39±0.13
1	0.70±0.03	0.75±0.09	0.67±0.06
2	1.74±0.28	2.03±0.64	1.94±0.29
3	3.05±0.33	2.73±0.65	2.36±0.38
4	3.07±0.70	3.81±0.62	2.57±0.55
5	4.36±0.57	3.55±0.87	2.60±0.06
6	5.06±1.16	4.49±1.04	3.03±0.40
7	5.11±0.94	4.94±1.04	3.15±0.28
8	5.25±1.02	5.35±1.05	3.12±1.03

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ง-4 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**		
	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
0	0.33±0.09	0.28±0.04	0.29±0.11
1	1.05±0.36	0.65±0.21	0.67±0.05
2	1.60±0.41	2.62±0.48	1.53±0.46
3	2.48±0.72	1.64±0.12	2.76±0.36
4	72.09±0.68	3.02±0.51	1.59±0.73
5	2.57±0.82	2.63±0.20	2.32±1.10
6	3.88±0.94	4.31±0.74	2.81±1.23
7	3.15±1.21	2.69±0.76	2.01±0.94
8	2.67±0.35	3.40±0.59	1.70±0.65

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ง-5 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เฉลี่ย (มิลลิกรัม/ลิตร)**			
	N25A	N25C	N100A	N100C
0	0.40±0.07	0.40±0.05	0.50±0.03	0.45±0.05
1	1.02±0.09	0.76±0.10	1.08±0.13	1.05±0.15
2	1.75±0.36	1.78±0.11	2.32±0.60	1.75±0.28
3	2.34±0.31	2.41±0.33	3.53±0.81	2.57±0.83
4	2.76±0.63	2.29±0.27	5.40±0.93	2.83±0.83
5	2.16±0.29	1.79±0.34	6.94±1.36	2.24±0.32
6	1.79±0.24	1.57±0.29	8.43±2.25	2.82±0.30
7	1.53±0.18	1.44±0.20	9.07±2.16	2.26±0.27
8	1.42±0.24	1.25±0.25	8.58±2.30	1.47±0.57

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก จ.

ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร

ตารางที่ จ-1 ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของไนโตรเจนเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)**					
	0% $NaNO_3$	25% $NaNO_3$	50% $NaNO_3$	100% $NaNO_3$	125% $NaNO_3$	150% $NaNO_3$
0	12.23±18.01	61.71±2.27	158.54±32.67	301.28±55.12	329.40±24.11	345.14±9.54
1	6.19±4.36	59.67±2.52	129.40±23.49	244.95±23.57	292.92±15.89	337.57±23.66
2	15.56±10.13	49.01±5.42	125.47±22.62	219.39±14.17	270.83±10.83	298.61±56.06
3	7.75±5.13	47.93±1.77	100.77±33.06	238.15±14.82	257.66±35.19	342.60±14.04
4	5.92±4.74	45.14±4.75	97.04±10.52	205.99±33.55	275.18±19.77	316.59±18.80
5	5.20±5.30	34.35±14.34	73.83±23.92	204.18±17.43	274.06±15.17	301.16±10.75
6	5.93±4.93	34.92±6.89	67.00±23.19	196.75±10.13	250.19±5.68	281.84±10.07
7	4.82±2.28	28.67±9.03	63.54±14.31	195.55±13.70	246.97±7.08	289.90±25.73
8	0.85±0.14	27.55±5.07	61.02±11.60	190.02±14.05	233.47±12.13	282.15±22.59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ จ-2 ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นของไนโตรเจนเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)			
	$NaNO_3$,	$Ca(NO_3)_2$	$(NH_4)_2SO_4$	ยูเรีย
0	66.02±13.42	62.42±15.82	59.70±11.20	62
1	63.12±11.78	59.95±14.14	57.96±12.46	54.29
2	49.98±13.14	49.77±13.60	43.61±11.49	46.58
3	40.40±11.20	44.95±11.79	44.05±16.41	38.86
4	29.27±15.15	38.06±12.32	31.99±10.20	31.15
5	28.29±12.91	34.50±12.10	42.36±11.97	23.44
6	19.70±13.77	30.43±13.64	38.93±12.62	15.73
7	13.51±14.66	26.55±13.71	37.11±13.49	8.01
8	5.35±12.68	19.89±12.19	32.97±12.19	0.30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ จ-3 ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของไนโตรเจนเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)**		
	134	201	402
0	66.17±1.22	64.78±1.25	65.26±0.12
1	64.45±0.52	63.36±1.15	62.07±0.68
2	52.26±2.98	47.28±3.77	48.12±4.03
3	42.22±4.09	35.68±2.54	38.59±3.09
4	34.66±3.00	28.63±3.87	32.20±4.32
5	26.61±5.00	20.02±5.42	26.01±1.55
6	16.34±2.93	10.26±5.25	18.76±0.39
7	9.76±3.24	4.57±3.35	13.34±0.71
8	2.69±2.90	0.89±0.21	3.27±1.73

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ จ-4 ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของไนโตรเจนเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)**		
	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
0	62.65±1.13	62.95±1.65	62±0.00
1	59.05±1.24	55.02±0.79	60.36±1.59
2	50.61±1.81	38.38±1.06	50.10±2.61
3	43.75±1.36	28.87±0.94	41.37±3.84
4	33.77±2.80	15.95±4.61	33.35±4.85
5	23.89±2.55	5.28±2.93	23.52±5.32
6	10.55±3.31	0.58±0.05	6.68±7.24
7	3.07±2.39	0.49±0.05	1.19±0.36
8	0.86±0.12	0.58±0.15	0.92±0.08

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ จ-5 ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของไนโตรเจนเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)**			
	N25A	N25C	N100A	N100C
0	65.31±1.55	65.64±0.65	272.49±1.97	272.33±4.42
1	62.21±2.37	62.51±1.27	265.55±14.59	251.72±20.75
2	26.59±10.98	29.44±7.08	214.60±1.28	203.50±13.69
3	2.47±1.90	4.51±3.92	172.28±8.31	176.90±13.16
4	1.40±0.47	0.83±0.17	148.69±8.30	146.30±13.63
5	1.82±1.18	1.53±1.06	127.50±5.49	130.13±8.38
6	2.58±0.60	1.99±0.97	108.58±9.87	118.28±3.97
7	2.37±0.97	1.97±0.78	88.78±15.63	106.64±9.09
8	1.94±0.90	2.12±1.03	65.14±18.22	82.99±6.36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ จ-6 ความเข้มข้นของฟอสเฟตจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ตั้งแต่ 0% - 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของฟอสเฟตเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ฟอสเฟต/ลิตร)**					
	0% $NaNO_3$	25% $NaNO_3$	50% $NaNO_3$	100% $NaNO_3$	125% $NaNO_3$	150% $NaNO_3$
0	5.96±6.64	7.32±4.56	7.61±1.58	7.54±1.04	7.92±1.63	5.95±8.60
1	9.91±7.10	6.48±5.84	8.94±7.09	7.67±6.02	8.29±4.94	9.45±7.50
2	9.67±7.85	3.99±4.89	6.34±6.19	5.12±5.30	4.90±4.65	6.75±9.74
3	7.75±6.48	2.41±2.38	4.66±5.90	2.87±3.89	3.70±3.98	6.87±7.65
4	3.63±0.73	0.89±0.70	1.06±0.83	1.55±0.88	1.48±0.46	2.61±1.83
5	4.24±0.44	0.71±0.59	0.83±0.74	1.14±0.41	1.17±0.31	2.14±1.65
6	1.85±0.25	0.39±0.11	67±23.19	0.47±0.12	0.60±0.10	0.71±0.26
7	1.86±0.61	0.55±0.32	0.50±0.47	0.54±0.46	0.61±0.36	0.71±0.26
8	1.84±0.53	0.48±0.23	0.16±0.13	0.39±0.33	0.41±0.32	0.71±0.26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ จ-7 ความเข้มข้นของฟอสเฟตจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปรับแหล่งของไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นของฟอสเฟตเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ฟอสเฟต/ลิตร)			
	$NaNO_3$,	$Ca(NO_3)_2$	$(NH_4)_2SO_4$	ยูเรีย
0	5.92±0.80	5.97±3.49	7.28±1.65	5.63±1.20
1	6.01±0.29	4.18±5.16	8.15±1.67	4.90±1.25
2	1.33±0.35	3.43±5.69	8.16±1.60	2.09±0.80
3	0.23±0.12	3.38±5.73	7.68±2.07	0.77±0.10
4	0.41±0.02	0.07±0.05	5.49±1.56	0.91±0.19
5	0.27±0.07	0.03±0.01	5.58±0.48	0.28±0.15
6	0.30±0.01	0.10±0.10	5.07±0.54	0.46±0.51
7	0.24±0.10	0.06±0.03	4.98±0.92	0.06±0.04
8	0.16±0.02	0.06±0.05	4.95±1.03	0.06±0.02

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ จ-8 ความเข้มข้นของฟอสเฟตจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความเข้มแสงเป็น 134, 201 และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของฟอสเฟตเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ฟอสเฟต/ลิตร)**		
	134	201	402
0	5.22±0.27	4.53±0.36	5.07±0.15
1	4.53±0.16	3.95±0.96	1.20±0.44
2	2.01±1.95	0.56±0.63	0.13±0.06
3	1.68±2.33	0.28±0.04	0.33±0.001
4	1.32±1.63	0.27±0.08	0.24±0.03
5	0.47±0.38	0.19±0.04	0.30±0.07
6	0.37±0.41	0.22±0.11	0.29±0.05
7	0.18±0.05	0.21±0.12	0.29±0.02
8	0.05±0.03	0.04±0.07	0.16±0.06

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ จ-9 ความเข้มข้นของฟอสเฟตจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ที่ปรับความยาวคลื่นแสงเป็นแสงสีขาว แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของฟอสเฟตเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ฟอสเฟต/ลิตร)**		
	แสงสีขาว	แสงสีแดง	แสงสีน้ำเงิน
0	5.93±0.60	6.19±0.53	6.14±0.23
1	3.46±2.61	3.96±0.96	5.45±0.48
2	2.86±2.33	1.35±1.67	4.20±0.60
3	2.55±1.18	1.09±0.56	3.03±0.37
4	1.80±1.43	0.18±0.23	2.63±0.50
5	0.93±0.79	0.07±0.05	1.19±0.79
6	0.10±0.09	0.04±0.01	0.13±0.02
7	0.08±0.07	0.04±0.01	0.04±0.01
8	0.04±0.08	0.03±0.01	0.05±0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ จ-10 ความเข้มข้นของฟอสเฟตจากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. TISTR 8266 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่ให้อากาศปกติ (N25A), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 25% $NaNO_3$ ที่เติมอากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N25C), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศปกติ (N100A) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติที่ให้อากาศผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (N100C)

เวลา (วัน)	**ความเข้มข้นของฟอสเฟตเฉลี่ย (มิลลิกรัม-ฟอสเฟต/ลิตร)**			
	N25A	N25C	N100A	N100C
0	6.29±1.41	8.75±0.43	6.92±0.25	7.64±0.66
1	5.02±2.44	6.63±0.32	5.57±0.42	5.58±0.48
2	0.42±1.15	0.01±0.01	0.20±0.06	0.00±0.00
3	0.03±0.04	0.00±0.00	0.02±0.01	0.00±0.00
4	0.04±0.03	0.01±0.01	0.02±0.00	0.02±0.01
5	0.05±0.07	0.01±0.01	0.03±0.01	0.03±0.04
6	0.04±0.04	0.02±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01
7	0.09±0.07	0.04±0.03	0.05±0.00	0.03±0.02
8	0.05±0.08	0.04±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวโยษิตา สวนแก้ว
วัน เดือน ปี เกิด	24 มีนาคม 2542
สถานที่เกิด	นครปฐม
วุฒิการศึกษา	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี
ที่อยู่ปัจจุบัน	78/2 ม.8 ต.ทุ่งขวาง อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
ผลงานตีพิมพ์	โยษิตา สวนแก้ว, สรวิศ เผ่าทองสุข และกษิดิศ หนูทอง. การประเมินจุลสาหร่ายสีเขียว Chlorococcum ต่างสกุลสำหรับการผลิตลูทีน. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University