ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta*

น.ส.พัทธ์ศริยา พงษ์ลำเจียกงาม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Factors affecting growth and lutein production in microalga *Dunaliella tertiolecta*

Miss Patsariya Ponglumjeakngam

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	ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta*
โดย	น.ส.พัทธ์ศริยา พงษ์ลำเจียกงาม
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพร โทณานนท์)

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

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

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

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พัทธ์ศริยา พงษ์ลำเจียกงาม : ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta*. (Factors affecting growth and lutein production in microalga *Dunaliella tertiolecta*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.กษิดิศ หนูทอง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข

การศึกษานี้ประเมินความเป็นไปได้ของการนำจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* จากคลังเก็บสายพันธุ์ของห้องปฏิบัติการมาศึกษาการผลิตลูทีนภายใต้สภาวะความเค็ม, ปริมาณและแหล่งไนโตรเจน, ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง และรูปแบบการให้อากาศที่แตกต่างกัน ดำเนินการทดลองเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 136 มิลลิเมตร x ความสูง 248 มิลลิเมตร) เป็นเวลา 8 วัน โดยปรับความความเค็มของอาหารเลี้ยงในช่วง 30 – 150 พีพีที ปริมาณไนโตรเจนในช่วง 3.1-18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มแสง 67-402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร×วินาทีด้วยแสงสีแดง สีน้ำเงิน และแสงสีขาว โดยมีรูปแบบการให้อากาศเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและอากาศปกติที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 150%-1,000% ผลการศึกษาพบว่าจุลสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในการเพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที ที่แหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 1,000% ไนโตรเจน เพาะเลี้ยงด้วยหลอดไฟแอลอีดีสีขาวภายใต้ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร×วินาที ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรที่อัตราการไหล 1.6 ลิตร/นาที โดยจุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ 549.91 ± 41.49 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ได้รับน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 1,397.3 ± 84.03 มิลลิกรัม/ลิตร และสามารถผลิตลูทีนได้เท่ากับ 3.25 ± 0.23 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 2.49 ± 0.08 มิลลิกรัม/กรัม ภายใต้สภาวะดังกล่าวจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* สามารถผลิตโปรตีนได้ 46.44% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งคิดเป็น 464.38 มิลลิกรัม/กรัม

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2565 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

6470053321 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORD: microalgae, Dunaliella tertiolecta, Lutein production

Patsariya Ponglumjeakngam : Factors affecting growth and lutein production in microalga *Dunaliella tertiolecta*. Advisor: Assoc. Prof. KASIDIT NOOTONG, Ph.D. Co-advisor: Sorawit Powtongsook, Ph.D.

This study evaluated the feasibility of introducing *Dunaliella tertiolecta* stored in the laboratory's culture collection to produce lutein. Microalgae were cultured in a 2-L Duran bottle (diameter 136 mm. x height 248 mm.) for 8 days under conditions of salinity, nitrogen content and source, light intensity and wavelength, and different air supply patterns. The salinity of the medium was adjusted in the range of 30 – 150 ppt. Nitrogen content in the range of 3.1-18.6 mg-nitrogen/l. Nitrogen source are $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea and $(NH_4)_2SO_4$ at light intensity of 67-402 µmol photons/m²×s with red, blue and white light. The airing pattern was 2.5% v/v carbon dioxide and normal air at 150%-1,000% nitrogen concentration. The results show that microalgae can be grown in culture at 30 ppt salinity by $Ca(NO_3)_2$ as nitrogen source at 1,000% nitrogen concentration, using white light at 402 µmol photons/m²×s with 2.5% v/v carbon dioxide aeration at a flow rate of 1.6 liters/min give the maximum microalgae growth at 435.18 ± 57.47 x 10^4 cells/ml, obtained maximum dry weight of 1,397.3 ± 84.03 mg/l and produce lutein with 3.25 ± 0.23 mg/l or 2.49 ± 0.08 mg/g. Under these conditions, the microalgae *Dunaliella tertiolecta* was able to produce 46.44% protein by dry weight, which was 464.38 mg/g.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study: Chemical Engineering Student's Signature .....

Academic Year: 2022 Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงแนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดการทำวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข ที่คอยแนะนำขั้นตอนการทำวิจัย รวมถึงให้คำปรึกษาเพื่อแก้ปัญหาตลอดการทำวิจัย ขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านสำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ณัฐพร โทณานนท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพน์ ศาสตราจารย์ ดร.อาทิวรรณ โชติพฤกษ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งมีความกรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่มอบความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ทั้งในทางทฤษฎีและทางปฏิบัติตลอดจนการนำมาประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดการทำงานวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ในศูนย์ที่คอยให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการทำวิจัย รวมถึงให้ความช่วยเหลือและแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดการทำวิจัยจนสามารถทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง ขอบคุณสำหรับกำลังใจจากพี่ๆ เพื่อนๆ ในศูนย์ที่มีให้กันตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่คอยให้กำลังใจและคำปรึกษาในการเผชิญปัญหาต่างๆ จนผ่านมาได้ ขอบคุณเพื่อนๆ และน้องสาวที่อยู่เคียงข้าง ถามไถ่ด้วยความเป็นห่วง ขอบคุณความห่วงใยจากทุกท่านที่ให้กำลังใจข้าพเจ้าจนทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนประสบความสำเร็จด้วยดี

พัทธ์ศริยา พงษ์ลำเจียกงาม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย 3

1.3.1 จุลสาหร่ายที่ใช้ในงานวิจัยคือ *Dunaliella tertiolecta* ซึ่งได้รับมาจากคลังหัวเชื้อของห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 3

1.3.2 การเพาะเลี้ยง *Dunaliella tertiolecta* จะเป็นการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์ฟองอากาศขนาด 2 ลิตร ให้แสงด้วยหลอดไฟแอลอีดี..... 3

1.3.3 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเป็นอาหารสูตร F/2 ที่มีการปรับธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน และความเค็มเท่านั้น 3

1.3.4 อากาศที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายจะเป็นอากาศปกติ และอากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์จากถังที่อัตราส่วนต่างกัน โดยอากาศจะถูกทำให้สะอาดโดยการกรองผ่านไส้กรองที่มีรูพรุน 0.1 ไมครอน 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่าย *Dunaliella* sp. 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2 รงควัตถุในสาหร่าย 4
2.2.1 คลอโรฟิลล์ 5
2.2.2 แคโรทีนอยด์ 5
2.2.3 ลูทีน 5
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย 7
2.3.1 ความเข้มแสงและคุณภาพแสง 7
2.3.2 อุณหภูมิ 8
2.3.3 ธาตุอาหาร 9
2.3.4 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10
2.2.5 ความเค็ม (salinity) 10
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลูทีนของสาหร่าย 10
2.4.1 ความเข้มแสง (Light intensity) 10
2.4.2 ความเข้มข้นของไนโตรเจน (Nitrogen concentration) 11
2.4.3 อุณหภูมิ 11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 13
3.1 แผนผังสรุปการดำเนินการวิจัย 13
3.2 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย 14
3.3 การศึกษาผลของความเค็มที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน 15
3.4 การศึกษาผลของปริมาณไนเตรตที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน 15
3.5 การศึกษาผลของแหล่งที่มาไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน 16
3.6 การศึกษาผลของความเข้มแสงที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน 17
3.7 การศึกษาผลของคุณภาพแสงที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน 17
3.8 การศึกษาผลของการให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอิทธิพลต่อการเติบโตและการผลิตลูทีน 18
3.9 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง 18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.9.1 ความหนาแน่นเซลล์ 18
3.9.2 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง 18
3.9.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ 19
3.9.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นไนโตรเจนจากแหล่งไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยง 19
3.9.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นไนโตรเจนจากแหล่งแอมโมเนียในอาหารเพาะเลี้ยง 20
3.9.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสฟอรัสในอาหารเพาะเลี้ยง 20
3.9.7 ปริมาณลูทีน 20
3.9.8 ปริมาณโปรตีนในเซลล์ 21
บทที่ 4 วิธีการดำเนินงานวิจัย 22
4.1 การปรับเปลี่ยนความเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ 22
4.2 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน 26
4.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน 32
4.4 ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน 36
4.5 ผลของความยาวคลื่นแสงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน 43
4.6 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน 47
4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* 54
บทที่ 5 สรุปการทดลองและข้อเสนอแนะ 57
5.1 สรุปผลการทดลอง 57
5.2 ข้อเสนอแนะ 60
บรรณานุกรม 62
ภาคผนวก 69
ประวัติผู้เขียน 98

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยที่ผ่านมาของการเติบโตและผลผลิตลูทีนของจุลสาหร่าย Dunaliella โดยใช้ปัจจัยการทดลองต่าง ๆ 12

ตารางที่ 3.1 อาหารสูตรมาตรฐาน F/2 (Guillard and Ryther, 1963) 14

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบ Trace metal solution 14

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบ Vitamin solution 15

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะความเค็ม 30 พีพีที 26

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะความเข้มข้นไนโตรเจน 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 31

ตารางที่ 4.3 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้แหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$ 36

ตารางที่ 4.4 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะความเข้มแสง 402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที 42

ตารางที่ 4.5 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะแสงสีขาว 47

ตารางที่ 4.6 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรที่ความเข้มข้น 1,000 ไนโตรเจน 53

ตารางที่ 4.7 สรุปผลปัจจัยที่มีต่อการเติบโตและการผลิตลูทีน 54

ตารางที่ 5.1 สรุปผลปัจจัยที่มีต่อการเติบโตและการผลิตลูทีน 58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ภาพรวมของการสังเคราะห์ลูทีนในสาหร่ายขนาดเล็ก 6

ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของอัตราการสังเคราะห์แสงจากความเข้มของแสง 7

ภาพที่ 2.3 ผลของความเข้มของแสงต่ออัตราการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก 8

ภาพที่ 3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการทำวิจัยในวิทยานิพนธ์ 13

ภาพที่ 4.1 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย D. tertiolecta เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับความเค็ม 30-150 พีพีที 24

ภาพที่ 4.2 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta (B) น้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในวันที่ 8 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่ความเค็ม 30-150 พีพีที 25

ภาพที่ 4.3 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่อน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในวันที่ 8 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่ความเค็ม 30-150 พีพีที 25

ภาพที่ 4.4 ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในวันที่ 8 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่ความเค็ม 30-150 พีพีที 26

ภาพที่ 4.5 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 29

ภาพที่ 4.6 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 30

ภาพที่ 4.7 ความเข้มข้นลูทีนในและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 30

ภาพที่ 4.8 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 31

ภาพที่ 4.9 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ 34

ภาพที่ 4.10 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมทั้งหมดในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ 34

ภาพที่ 4.11 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ 35

ภาพที่ 4.12 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ 35

ภาพที่ 4.13 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย [65] 37

ภาพที่ 4.14 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที 40

ภาพที่ 4.15 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที 41

ภาพที่ 4.16 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที 41

ภาพที่ 4.17 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที42

ภาพที่ 4.18 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว..... 45

ภาพที่ 4.19 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว..... 45

ภาพที่ 4.20 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว..... 46

ภาพที่ 4.21 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว 46

ภาพที่ 4.22 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน..... 51

ภาพที่ 4.23 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน..... 52

ภาพที่ 4.24 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน..... 52

ภาพที่ 4.25 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย D. tertiolecta ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน 53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ลูทีน (Lutein) เป็นหนึ่งในสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นที่ต้องการค่อนข้างสูงของตลาดโลก [1] เนื่องจากลูทีนเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ยกตัวอย่างเช่น สามารถป้องกันโรคจอประสาทตาเสื่อม ลดความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดสมองและหัวใจวาย และบรรเทาโรคจากความผิดปกติของเมตาบอลิซึม [2] ซึ่งโดยปกติแล้วลูทีนจัดเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ รงควัตถุสีเหลืองอมส้มหรือสีแดงที่สามารถละลายในน้ำมัน ถูกผลิตขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ อย่างเช่น พืช หรือสาหร่าย มีบทบาทในการสังเคราะห์พลังงานจากแสงสีน้ำเงินและถ่ายโอนพลังงานไปยังศูนย์กลางการสังเคราะห์แสง ตลอดจนปกป้องเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจาก Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์เสียสภาพ [3] สำหรับผลิตภัณฑ์ลูทีนที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการทางธรรมชาติจะนิยมใช้ส่วนกลีบดอกดาวเรืองมาสกัดลูทีนออกมา แม้ว่าการปลูกต้นดาวเรืองเพื่อนำดอกมาผลิตลูทีนนั้นเป็นกระบวนการที่ง่ายไม่ซับซ้อน แต่กระบวนการผลิตจำเป็นต้องระยะเวลาในการปลูกหลายสัปดาห์กว่าพืชจะออกดอก และใช้พื้นที่ปลูกค่อนข้างมาก เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อนำชีวมวลมาสกัดลูทีนกลับพบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีแนวโน้มที่ได้เปรียบ และเหมาะในการผลิตลูทีนมากกว่า เนื่องด้วยเหตุผลสามข้อ 1) ปริมาณลูทีนในชีวมวลของจุลสาหร่ายนั้นสูงกว่าเมื่อเทียบกับกลีบดอกดาวเรือง [4] 2) ใช้พื้นที่สำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายน้อยกว่า และ 3) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจนสามารถนำชีวมวลมาสกัดลูทีนได้นั้น น้อยกว่าการปลูกดอกดาวเรืองมาก [5] , [6]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในบรรดาจุลสาหร่ายทั้งหมดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ (เบต้าแคโรทีน ลูทีน ซีอะแซนทีน) ได้สูงหากปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่นการใช้สภาวะแวดล้อมที่ความเค็มสูง ความเข้มแสงสูง และปริมาณไนเทรตต่ำ จะสามารถผลิตเบต้าแคโรทีนได้มากขึ้น [7] การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายชนิดนี้ส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่การผลิตเบต้าแคโรทีน ซึ่งมีการดำเนินงานในเชิงพาณิชย์มาอย่างยาวนาน จุดแข็งอีกประการของจุลสาหร่ายชนิดนี้คือไม่มีผนังเซลล์จึงทำให้เซลล์แตกและนำลูทีนออกมานอกเซลล์เพื่อทำบริสุทธิ์ได้ง่าย ทำให้สามารถลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการสกัดรงควัตถุไปได้อย่างมาก อย่างไรก็ตามการ

ผลิตลูทีนด้วยสาหร่ายสกุลนี้ยังมีการรายงานไว้ไม่มาก Shan-Rong Xie และคณะ (2021) [8] ได้ศึกษาเรื่องการนำสารยับยั้งการผลิตเบต้าแคโรทีนมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* แล้วพบว่าสามารถเพิ่มการสะสมของลูทีนในเซลล์สาหร่ายขึ้น 46% ส่วนสภาวะการเพาะเลี้ยง และปัจจัยที่ส่งผลให้จุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* สามารถผลิตลูทีนได้มากขึ้นอย่างการปรับธาตุอาหาร การให้แสงที่มีคุณภาพ และการเติมคาร์บอนไดออกไซด์นั้นมีอยู่น้อยมาก

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาสภาวะที่จุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* จะสามารถเพิ่มผลผลิตลูทีนได้ รวมถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตรงควัตถุชนิดนี้ โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Dunaliella* sp. ในห้องปฏิบัติการที่สามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้อย่างสมบูรณ์ เพื่อให้ได้รับข้อมูลที่ประโยชน์ในการนำไปพัฒนาเพื่อขยายการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาผลของความเค็ม ปริมาณและแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta*

1.2.2 ศึกษาผลของความเข้มแสงและคุณภาพแสงต่อการเติบโตและการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta*

1.2.3 ศึกษาผลของการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเติบโตและการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 จุลสาหร่ายที่ใช้ในงานวิจัยคือ *Dunaliella tertiolecta* ซึ่งได้รับมาจากคลังหัวเชื้อของห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.2 การเพาะเลี้ยง *Dunaliella tertiolecta* จะเป็นการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์ฟองอากาศขนาด 2 ลิตร ให้แสงด้วยหลอดไฟแอลอีดี

1.3.3 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเป็นอาหารสูตร F/2 ที่มีการปรับธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน และความเค็มเท่านั้น

1.3.4 อากาศที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายจะเป็นอากาศปกติ และอากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์จากถังที่อัตราส่วนต่างกัน โดยอากาศจะถูกทำให้สะอาดโดยการกรองผ่านไส้กรองที่มีรูพรุน 0.1 ไมครอน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้รับข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตและผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* เพื่อนำไปใช้พัฒนา และขยายการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.4.2 การศึกษานี้สอดคล้องกับแนวคิดเศรษฐกิจ BCG ซึ่งเป็นนโยบายที่สำคัญของรัฐบาลที่จะใช้ขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศให้มีความยั่งยืน ผลของงานวิจัยนี้คาดว่าจะสามารถเพิ่มผลผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ทำให้สร้างมูลค่าของจุลสาหร่ายซึ่งเป็นทรัพยากรชีวภาพเพิ่มขึ้น นอกจากนี้จุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* สามารถผลิตลูทีนได้ในสภาวะแวดล้อมหลากหลายและไม่จำเป็นต้องใช้ทรัพยากรที่ฟุ่มเฟือยในการเพาะเลี้ยง สร้างความยั่งยืนในการผลิตผลผลิตได้รวมถึงลดภาระค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่าย *Dunaliella* sp.

จุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* เป็นจุลสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่อยู่ในวงศ์ *Polyblepharidaceae* โดยเซลล์ของ *Dunaliella* sp. นั้นไม่มีผนังเซลล์ และแพร่พันธุ์โดยการแบ่งตัวตามยาวของเซลล์โมไทล์หรือโดยการหลอมรวมกันของเซลล์เคลื่อนที่สองเซลล์เพื่อสร้างไซโกต [9] โดย *Dunaliella tertiolecta* ขนาดลำตัวยาว 8-25 ไมครอน ความกว้าง 5-15 ไมครอน มีแฟลกเจลลา 2 เส้น โดยลักษณะรูปร่างภายนอกสามารถเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อมที่อาศัยอยู่ [10] ลำดับต่อไปนี้จะแสดงการจัดเรียงลำดับอนุกรมวิธานของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ตั้งแต่ดิวิชั่นจนถึงลำดับสกุล

Division *Chlorophyta*

Subdivision *Chlorophytina*

Class *Chlorophyceae*

Order *Chlamydomonadales*

Family *Dunaliellaceae*

Genus *Dunaliella Teodoresco*, 1904

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 รงควัตถุในสาหร่าย

สาหร่ายสร้างเม็ดสีเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งสามารถดูดซับและปลดปล่อยพลังงานเพื่อให้เซลล์นำไปใช้ในภายหลัง สารสีเหล่านี้ประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์และแคโรทีน นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุอื่นๆ เช่น ไฟโคบิลิโปรตีน ฟูโคแซนทีน และแซนโทฟิลล์ ซึ่งทำหน้าที่ดักจับพลังงานของแสงและนำไปสู่ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงด้วยออกซิเจน

2.2.1 คลอโรฟิลล์

คลอโรฟิลล์เป็นเม็ดสีหลักในพืช โดยคลอโรฟิลล์จะดูดซับความยาวคลื่นสีน้ำเงิน (425–500 นาโนเมตร) และสีแดง (625–675 นาโนเมตร) ในขณะที่สะท้อนแสงสีเขียว (ความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร) เป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้พืชมีสีเขียว โดยพืชบกและสาหร่ายสีเขียวทั้งหมดมีรงควัตถุสองรูปแบบ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี [11] โดยคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุที่สามารถรับแสงได้โดยตรง ทำให้สามารถเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังเคมีระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ส่วนคลอโรฟิลล์ บี จะช่วยดูดกลืนแสงและส่งต่อไปให้คลอโรฟิลล์ เอ สังเคราะห์แสงต่อไป [12]

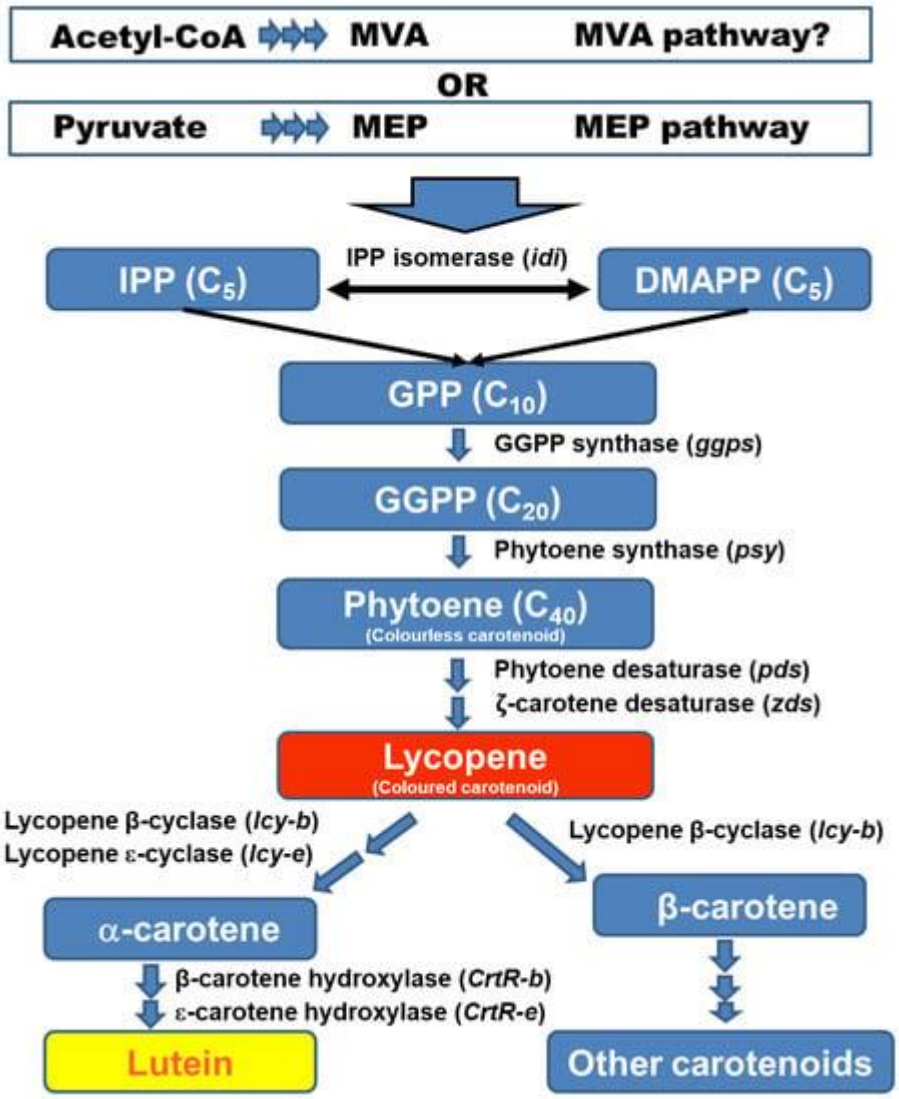
2.2.2 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือสีแดงที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติซึ่งจะดูดซับแสงและถ่ายโอนพลังงานไปยังคลอโรฟิลล์เพื่อทำการสังเคราะห์ด้วยแสง แคโรทีนอยด์มีลักษณะเป็นสารจำพวกไขมันประกอบไปด้วยคาร์บอน 40 อะตอม ในบริเวณใกล้เคียงกับคลอโรฟิลล์ นอกจากนี้แคโรทีนอยด์ยังป้องกันความเสียหายที่เกิดจากแสง เนื่องจากดูดกลืนแสงมากเกินไป (Photoprotective agents) ทำให้จุลสาหร่ายเกิดภาวะความเครียด [13] , [14] แคโรทีนอยด์สามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แคโรทีน (Carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) โดยแคโรทีน (Carotene) เป็นรงควัตถุที่มีสีส้มหรือสีส้ม-แดง ประกอบไปด้วย แอลฟา-แคโรทีน (alpha-carotene) และ เบต้า-แคโรทีน (Beta-carotene) เป็นองค์ประกอบหลัก [14] โดยทั่วไป พืชจะประกอบด้วยแคโรทีนอยด์หกชนิด ได้แก่ นีออกแซนทีน (neoxanthin) วิโอลาแซนทีน (violaxanthin) แอนเธอราแซนธิน (antheraxanthin) ซีแซนทีน (zeaxanthin) ลูทีน (lutein) และเบต้า-แคโรทีน [15] โดยลูทีนเป็นรงควัตถุสีเหลืองที่พบในผักและผลไม้ และเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีมากที่สุดในพืช [16]

2.2.3 ลูทีน

ลูทีนเป็นรงควัตถุสีเหลืองซึ่งสามารถพบได้ในสาหร่ายจำพวก *Chlorophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Cryptophyta*, *Euglenophyta* และ *Rhodophyta* [17] แนวคิดในปัจจุบันเรื่องเส้นทางการสังเคราะห์ลูทีนเชื่อกันว่าแคโรทีนอยด์ทุกชนิด รวมทั้งลูทีน ได้มาจากโมเลกุลตั้งต้นที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (C5) คือ isopentenyl diphosphate (IPP) และ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) สารตั้งต้นเหล่านี้ อาจได้มาจาก 2 เส้นทางหลักๆ ได้แก่ 1.ไซโตซิลิกเมวาโลเนต (MVA) ที่เริ่มต้นจาก Acetyl-CoA หรือ 2.พลาสติดิก (คลอโรพลาสต์ที่อยู่ในสาหร่ายขนาดเล็ก) เมทิลเลอริทริทอล 4-ฟอสเฟต (methylerythritol 4-phosphate, MEP) ที่เริ่มต้นจากไพรูเวต อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่ากระบวนการ methylerythritol 4-phosphate เป็นกระบวนการ

สังเคราะห์แคโรทีนอยด์ รวมถึงการสังเคราะห์ลูทีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. [18] และ *Haematococcus pluvialis* [19]



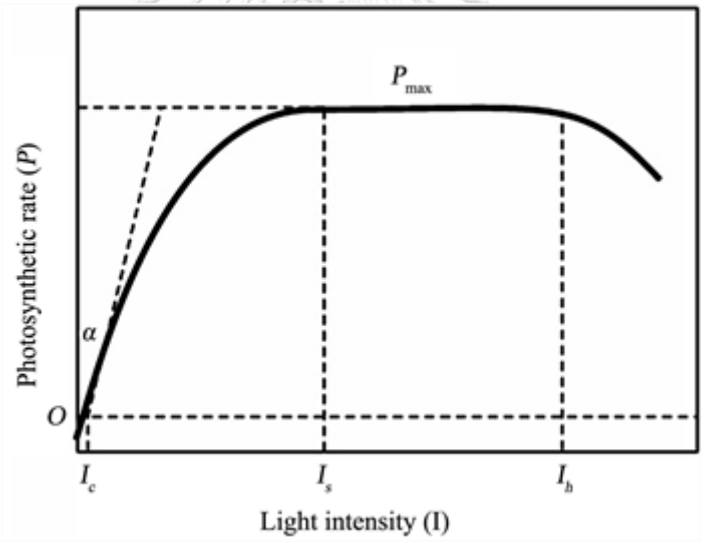
ภาพที่ 2.1 ภาพรวมของการสังเคราะห์ลูทีนในสาหร่ายขนาดเล็ก

(Sushanta Kumar Saha et. al, 2020)

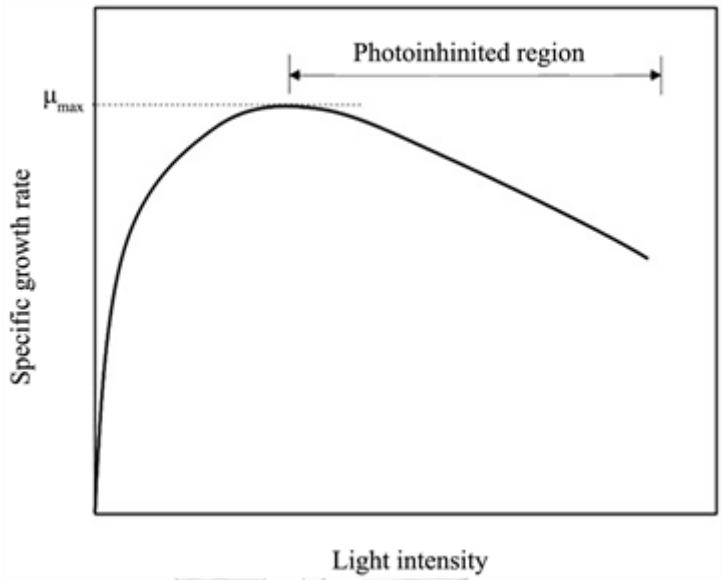
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.3.1 ความเข้มแสงและคุณภาพแสง

แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการเจริญเติบโตของพืชและจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้ เนื่องจากแสงเป็นพลังงานหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืชและจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้ อย่างไรก็ตาม แสงที่มากเกินไปรวมถึงอุณหภูมิที่ต่ำกว่าปกติหรือระดับออกซิเจนสูงอาจทำให้เซลล์ที่มีหน้าที่สังเคราะห์แสงเสียหายได้ [20] ดังนั้นเครื่องปฏิกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหรือรูปแบบการเพาะเลี้ยงกลางแจ้งจึงต้องมีการออกแบบที่เหมาะสมเพื่อให้มีแสงที่จ่ายให้กับระบบการเพาะเลี้ยงเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์ [21] , [22] การเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กขึ้นกับอัตราการสังเคราะห์แสงดังรูปที่ 2 จากรูปจะแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มของแสงเพิ่มขึ้น อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงในสาหร่ายขนาดเล็กก็จะเพิ่มขึ้นเช่นกันจนกระทั่งถึงอัตราสูงสุดที่จุดอิ่มตัว (ภาพที่ 2.2) [23] , [24]



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของอัตราการสังเคราะห์แสงจากความเข้มของแสง
(Kamrul Hasan Chowdury et. al, 2020)



ภาพที่ 2.3 ผลของความเข้มของแสงต่ออัตราการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก
(Kamrul Hasan Chowdury et. al, 2020)

การเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นแสงมีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย แสงสีแดงสามารถเพิ่มอัตราการเติบโตในเซลล์ขนาดเล็กและมีการดูดซึมสารอาหารต่ำ ในทางกลับกัน แสงสีน้ำเงินจะส่งผลต่อยีนและเมแทบอลิซึมของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยกระตุ้นให้มีการดูดซึมสารอาหารสูง แต่ทำให้เซลล์ขนาดใหญ่มีอัตราการเติบโตที่ต่ำลง โดยสาหร่ายสีเขียวไม่สามารถใช้แสงสีเหลืองและสีเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการขาดไฟโคบิลิน (phycobilins) [25] , [26]

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิถือเป็นหนึ่งในปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดที่มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย ขนาดของเซลล์ องค์ประกอบทางชีวเคมี และความต้องการสารอาหาร การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจะดูดซับความร้อนจากแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้ ส่งผลให้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ดังนั้น สำหรับการเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง รังสีจากแสงแดดและอุณหภูมิที่จึงเป็นปัจจัยควบคุมที่สำคัญ [27] อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20°C ถึง 35°C และบางชนิดสามารถทนได้ถึง 40°C อย่างไรก็ตาม เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม ผลผลิตที่ได้จะลดลง และเมื่อความร้อนสูงเกินไปเซลล์อาจจะถูกทำลายได้ [28] ดังนั้น ความผันแปรของฤดูกาล ซึ่งนำไปสู่ความผันแปรของอุณหภูมิในรอบกลางวัน/กลางคืน จึงส่งผลกระทบอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย

2.3.3 ธาตุอาหาร

สารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดส่งผลอย่างมากในองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายขนาดเล็ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสำหรับสาหร่ายขนาดเล็กต้องมีองค์ประกอบอนินทรีย์ เช่น ฟอสฟอรัส (P) ไนโตรเจน (N) และเหล็ก (Fe) และอื่นๆ ซึ่งอาจแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ [29] ดังนั้น สารอาหารหรือธาตุอาหารหลักที่สำคัญที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟิค (autotrophic) คือ คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) และฟอสฟอรัส (P) [30] ตามสูตรโมเลกุลของมวลชีวภาพ มีเหตุผลที่จะกล่าวว่าประมาณ 50% ของมวลชีวภาพประกอบด้วยคาร์บอน (C) [29] เซลล์ต้องการความเข้มข้นของคาร์บอนในปริมาณมาก เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารอินทรีย์ทั้งหมดที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้น เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดนิวคลีอิก วิตามิน และไขมัน [30] สาหร่ายขนาดเล็กมีกระบวนการดูดซึมคาร์บอนอนินทรีย์ ดังนั้นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) จึงมีความสำคัญมากเพื่อให้ได้อัตราการผลิต autotrophic สูง [30] นอกจากนี้สารประกอบอินทรีย์ (เช่น น้ำตาล กรด และแอลกอฮอล์) ยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดที่เติบโตในสภาวะมิกซ์โซโทรฟิก

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดรองจากคาร์บอน [31] โดยเป็นองค์ประกอบที่มีมากเป็นอันดับสองในมวลชีวภาพของจุลสาหร่าย ซึ่งที่มีความเข้มข้น 1% ถึง 14% ในชีวมวลแห้ง มีหน้าที่สร้างโปรตีน กรดนิวคลีอิก วิตามิน และเม็ดสีที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงแสง [30] อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ (ยูเรีย ไนไตรท์ และไนเตรต) ภาวะการขาดไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงช่วยจุลสาหร่ายสามารถสังเคราะห์ไขมันและคาร์โบไฮเดรตได้เป็นพิเศษ [32] เมื่อสาหร่ายขนาดเล็กประสบปัญหาการขาดแคลนไนโตรเจน เซลล์มักจะเกิดการเปลี่ยนสี (คลอโรฟิลล์ลดลงและแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น) และเกิดการสะสมของสารประกอบอินทรีย์ เช่น โพลีแซคคาไรด์และน้ำมันบางชนิด [31]

ฟอสฟอรัสเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น การถ่ายโอนพลังงาน การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (DNA) และอื่น ๆ [30] ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.05% ถึง 3.3% ในชีวมวลแห้ง [33] ฟอสฟอรัสมีอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น โพลีฟอสเฟต ไพโรฟอสเฟต ออร์โธฟอสเฟต และเมตาฟอสเฟต [34] องค์ประกอบของการผลิตมวลชีวภาพได้รับอิทธิพลจากปริมาณของฟอสฟอรัสซึ่งส่งผลต่อปริมาณไขมันและคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ การลดลงของฟอสฟอรัสอาจทำให้เกิดการสะสมเม็ดสีในสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด แต่ผลกระทบจะน้อยกว่าการขาดไนโตรเจน [31] การขาดฟอสฟอรัสหรือมีความเข้มของฟอสฟอรัสต่ำ

เกินไปนำไปสู่การจำกัดผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิด [35] สาหร่ายขนาดเล็กสามารถสะสมฟอสฟอรัสสำรองไว้ภายในเซลล์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้เมื่อฟอสฟอรัสหมดไป ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่เรียกว่าการดูดซึมหรือสะสมอย่างฟุ่มเฟือย (luxury uptake) [36]

2.3.4 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก ในการผลิตชีวมวล 1 กิโลกรัม สาหร่ายขนาดเล็กต้องการ CO_2 ตั้งแต่ 1.8 ถึง 2.0 กิโลกรัม [29] เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนนี้ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอยู่ในอากาศ (0.03%) ไม่เพียงพอที่จะให้ผลผลิตในจุลสาหร่ายสูง ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงในการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องหาคาร์บอนทั้งในรูปของเกลือ เช่น ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) หรือฉีดอากาศที่อุดมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในการเพาะเลี้ยง [37] , [38]

2.2.5 ความเค็ม (salinity)

ความเค็มเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องให้ความสนใจในระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงแบบเปิด ค่าความเค็มจะเพิ่มขึ้นเพราะเกิดการระเหยของน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยทั่วไป ตามเกณฑ์ความทนทานต่อความเค็มของสาหร่ายขนาดเล็กสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท: โอลิโกฮาลีน (oligohaline) เป็นสาหร่ายประเภทที่เติบโตได้เฉพาะในน้ำที่มีความเค็มต่ำ (ความเค็มสูงสุดระหว่าง 0.5 ถึง 5 $g \cdot kg^{-1}$); เมโซฮาลีน (mesohaline) เป็นสาหร่ายประเภทที่เติบโตได้ในน้ำที่มีความเค็มปานกลาง โดยมีความเค็มระหว่าง 5 ถึง 18 $g \cdot kg^{-1}$ และโพลีฮาลีน (polyhaline) เป็นสาหร่ายประเภทที่เติบโตได้ในน้ำที่มีความเค็มสูง โดยมีความเค็มระหว่าง 18 ถึง 30 $g \cdot kg^{-1}$ [39] โดยจุลสาหร่าย *Dunaliella* sp. สามารถเติบโตได้ทั้งในน้ำที่มีความเค็มต่ำตลอดจนความเค็มสูง ซึ่งเป็นข้อดีของสาหร่ายขนาดเล็กชนิดนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลูทีนของสาหร่าย

2.4.1 ความเข้มแสง (Light intensity)

แสงที่เหมาะสมและคุณภาพหรือสเปกตรัมของแสงเป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์แสงและการสะสมมวลชีวภาพในสาหร่ายขนาดเล็ก นอกจากนี้ความเข้มของแสงยังถือเป็นปัจจัยความเครียดที่สำคัญสำหรับการกระตุ้นการสะสมของแคโรทีนอยด์ในเซลล์สาหร่าย [40] ลูทีนเป็นเมแทบอไลต์ปฐม

ภูมิและแคโรทีนอยด์ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างที่เซลล์ใช้การเก็บเกี่ยวแสง เพื่อให้การเก็บเกี่ยวแสงที่มีประสิทธิภาพ [41] โดยภายใต้สภาวะแสงน้อย การสังเคราะห์ลูทีนจะเพิ่มขึ้นพร้อมกับโปรตีนเชิงซ้อน [42] อย่างไรก็ตาม ลูทีนก็เป็นตัวปกป้องเซลล์จากความเสียหายจากโฟโตออกซิเดชัน ดังนั้น ความเครียดจากความเข้มแสงสูงจะกระตุ้นการสะสมของลูทีนเป็นการตอบสนองต่อความเครียดในเซลล์สาหร่าย [43] , [44] อย่างไรก็ตาม ความเครียดจากแสงสูงในบางครั้งอาจสร้างความเสียหายอย่างถาวรให้กับสรีรวิทยาของเซลล์สาหร่าย ส่งผลให้การสะสมของมวลชีวภาพลดลง [40] , [45] แสดงให้เห็นว่าการปรับแสงให้เหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสะสมลูทีนให้ได้ปริมาณสูงสุดในเซลล์สาหร่าย [4]

2.4.2 ความเข้มข้นของไนโตรเจน (Nitrogen concentration)

ลูทีนเป็นเมทาบอไลต์ปฐมภูมิและการสังเคราะห์ลูทีนขึ้นกับการเจริญเติบโตของสาหร่าย [46] ดังนั้น ไนโตรเจนที่เพียงพอจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มการสะสมลูทีนในสาหร่ายให้มากขึ้น เนื่องจากผลผลิตของชีวมวลและอัตราการเติบโตได้รับการกระตุ้นจากการแสงที่เหมาะสมและแหล่งไนโตรเจน [47] เนื่องจากลูทีนเป็นสารชีวโมเลกุลจึงไม่ต้องการไนโตรเจนสำหรับการสังเคราะห์ และได้รับการพิสูจน์แล้วว่าการสังเคราะห์ลูทีนไม่ได้รับผลกระทบจากการจำกัดไนโตรเจนในระยะ exponential [48]

2.4.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยความเครียดทางชีวภาพที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่กระตุ้นให้เกิดการสะสมของลูทีนในเซลล์สาหร่าย อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึงขีดจำกัดความเครียดจะช่วยเพิ่มการผลิตลูทีน ในขณะที่การเพิ่มขึ้นเกินเกณฑ์วิกฤตจะส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ เชื่อกันว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดความเครียดจากการออกซิเดชันของแสง ซึ่งลูทีนจะเข้ามายับยั้งความเครียดจากภาวะนี้ [46] ในทางกลับกัน ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าปกติจะลดการผลิตลูทีนลงเนื่องจากการลดลงของการผลิตมวลชีวภาพ [4]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>ตารางที่ 2.1</u> งานวิจัยที่ผ่านมาของการเติบโตและผลผลิตลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella* โดยใช้ปัจจัยการทดลองต่าง ๆ

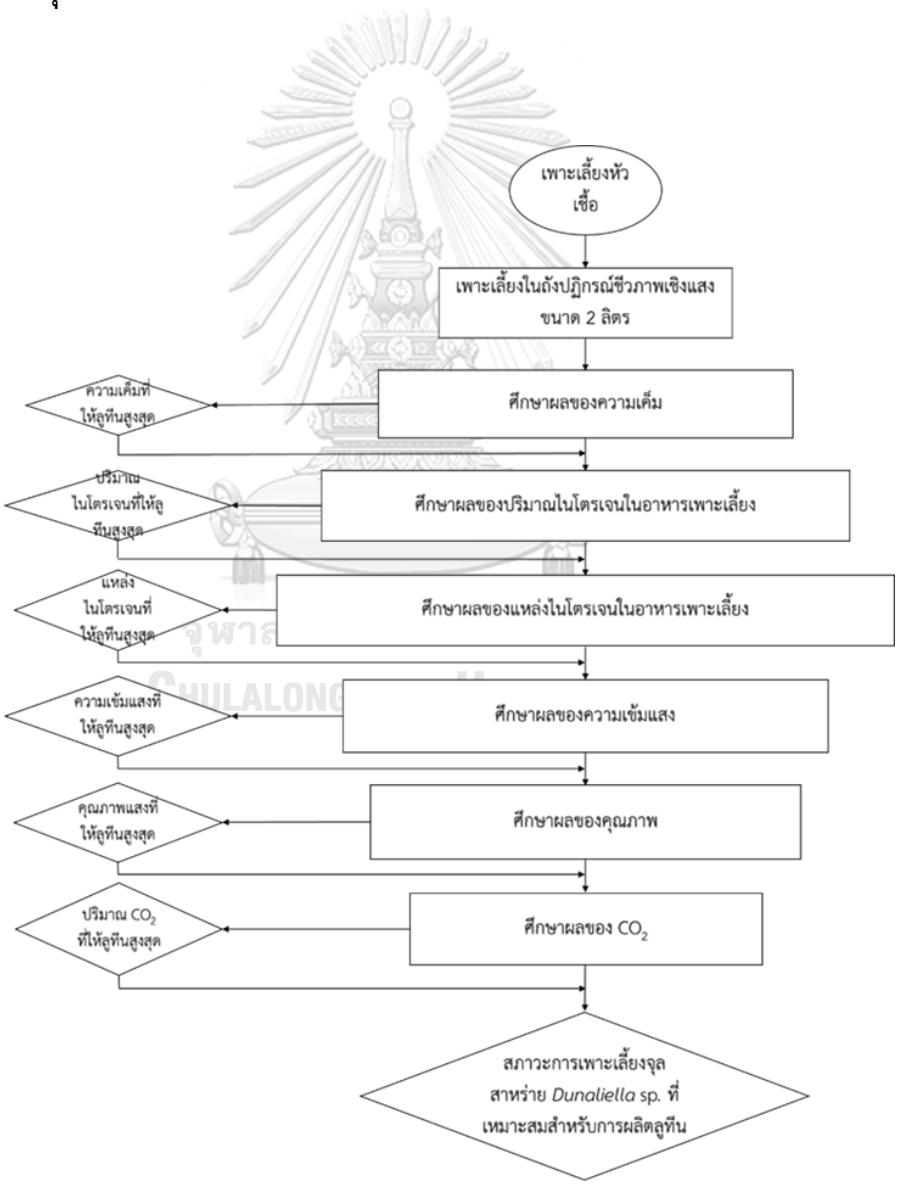
ชนิดของสาหร่าย	สภาวะการทดลอง	อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	ผลการทดลอง	อ้างอิง
Dunaliella salina UTEX 2538	- เพาะเลี้ยงที่อัตราการไหลของ CO_2 38 cm^3/s - อุณหภูมิ 25 °C - ค่า pH 7.5 ± 0.5	อาหารมาตรฐานสูตร f2 โดยดัดแปลงเพิ่ม 2 mM $NaHCO_3$, 5 mM $NaNO_3$ และ 2 M NaCl	- Biomass productivity สูงสุด 2 g m^{-2} d^{-1} - ปริมาณลูทีนที่ได้ 5.2 mg/L(culture)	(Mercedes García-González และคณะ, 2005) [49]
Dunaliella bardawil FACBH-847	- ความเข้มแสงที่ 103.5 µE/m^2/s และความเข้มข้นของคริเอนิน 500 µg/mL	Shan-Rong Xie et al.'s medium adding creatinine	ปริมาณลูทีนประมาณ 2.25 µg/mL	(Shan-Rong Xie และคณะ, 2021) [8]
Dunaliella salina (UTEX LB #200)	- อุณหภูมิ 25 ± 2 °C - ค่า pH 6.5 - 7.5 - ให้อากาศที่ 90 mL/min โดยประกอบด้วย CO_2 2.5% - อัตราการไหลของก๊าซ 90 cm^3/min - ใช้แสงสีแดงที่ความเข้มแสง 128 µE/m^2/s	Modifying Gg medium	- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 0.32 gDCW/L/day - ปริมาณลูทีนที่ได้ประมาณ 0.0256 mg/L/day	(Weiqi Fu และคณะ, 2013) [50]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

หัวเชื้อจุลสาหร่าย *Dunaliella* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 แผนผังสรุปการดำเนินการวิจัย



ภาพที่ 3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการทำวิจัยในวิทยานิพนธ์

3.2 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย

นำหัวเชื้อจุลสาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 (ตารางที่ 1 สูตรอาหารมาตรฐาน F/2) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ F/2 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 67.03 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร•วินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระหว่างดำเนินการวิจัยได้ทำการเปลี่ยนถ่ายหัวเชื้อทุกสัปดาห์เพื่อให้ปริมาณเพียงพอตลอดการวิจัย

ตารางที่ 3.1 อาหารสูตรมาตรฐาน F/2 (Guillard and Ryther, 1963)

ส่วนประกอบ	**กรัม/ลิตร**
$NaNO_3$	0.075
$NaH_2PO_4.H2O$	0.005
$Na_2SiO_3.9H_2O$	0.03
Trace metal solution	1 มิลลิลิตร
Vitamin solution	0.5 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบ Trace metal solution

ส่วนประกอบ	**กรัม/ลิตร**
$FeCl_3.6(H_2O)$	3.15 กรัม
$Na_2(EDTA).2(H_2O)$	4.36 กรัม
$CuSO_4.5(H_2O)$	0.00918
$Na_2MoO_4.2(H_2O)$	0.0063
$ZnSO_4.7(H_2O)$	0.022
$CoCl_2.6(H_2O)$	0.01
$MnCl_2.4(H_2O)$	0.18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบ Vitamin solution

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Thiamine HCl (vitamin B1)	200 มิลลิกรัม
Biotin (Vitamin H)	0.001
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	0.001

3.3 การศึกษาผลของความเค็มที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน

ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตและผลการผลิตลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* เริ่มต้นด้วยการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่ายตามวิธีในหัวข้อที่ 3.2 จากนั้นนำหัวเชื้อจุลสาหร่ายปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับความเค็มเป็น 30, 70, 110 และ 150 พีพีที ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 136 มิลลิเมตร X ความสูง 248 มิลลิเมตร) ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองอยู่ที่ประมาณ $1x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำมาใช้งาน ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์ฟองอากาศแบบกะเป็นเวลา 8 วันด้วยอัตราการไหล 1.6 ลิตร/นาที ระหว่างการทดลองได้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงจากหลอดไฟแอลอีดีสีขาวที่ 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 30 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และความเข้มข้นของลูทีน

3.4 การศึกษาผลของปริมาณไนเตรตที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน

ดำเนินการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ตามหัวข้อที่ 3.2 จากนั้นนำหัวเชื้อจุลสาหร่ายปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ในระดับความเค็มที่ได้จากผลการทดลองหัวข้อที่ 3.3 การทดลองนี้ได้ปรับเปลี่ยนปริมาณไนเตรตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนของจุล

สาหร่ายเป็น 25% 50% 75% 100% (อาหารสูตร F/2) 125% และ 150% ของปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 136 มิลลิเมตร X ความสูง 248 มิลลิเมตร) แบบกะเป็นเวลา 8 วัน ด้วยอัตราการไหล 1.6 ลิตร/นาที ระหว่างการทดลองได้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงจากหลอดไฟแอลอีดีสีขาวที่ 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที เก็บตัวอย่างของเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และความเข้มข้นของลูทีน

3.5 การศึกษาผลของแหล่งที่มาไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน

เตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ตามหัวข้อที่ 3.2 จากนั้นนำหัวเชื้อจุลสาหร่ายปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ในระดับความเค็มและปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากผลการทดลองตามหัวข้อที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ การทดลองนี้ได้เลือกใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ $NaNO_3$ (แหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ F/2), $Ca(NO_3)_2$, NH_2CONH_2 (Urea) และ $NH_4(SO_4)_2$ ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองอยู่ที่ประมาณ $1x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบกะเป็นเวลา 8 วัน ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 136 มิลลิเมตร X ความสูง 248 มิลลิเมตร) แบบกะเป็นเวลา 8 วันด้วยอัตราการไหล 1.6 ลิตร/นาที ระหว่างการทดลองได้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงจากหลอดไฟแอลอีดีสีขาวที่ 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 30 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และความเข้มข้นของลูทีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6 การศึกษาผลของความเข้มแสงที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน

เตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ตามหัวข้อที่ 3.2 จากนั้นนำหัวเชื้อจุลสาหร่าย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ในระดับความเค็ม ปริมาณไนโตรเจน และแหล่งที่มาไนโตรเจนที่ได้จากผลการทดลองตามหัวข้อที่ 3.3 ถึง 3.5 การทดลองนี้ได้เลือกใช้ความเข้มแสง 3 ความเข้มแสง ได้แก่ 67.03 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201.1 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402.2 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองอยู่ที่ประมาณ $1x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบกะเป็นเวลา 8 วัน ในถังขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 136 มิลลิเมตร X ความสูง 248 มิลลิเมตร) แบบกะเป็นเวลา 8 วันด้วยอัตราการไหล 1.6 ลิตร/นาที ระหว่างการทดลองได้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยหลอดไฟแอลอีดีสีขาว และเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 30 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และความเข้มข้นของลูทีน

3.7 การศึกษาผลของคุณภาพแสงที่เหมาะสมกับการเติบโตและการผลิตลูทีน

เตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ตามหัวข้อที่ 3.2 จากนั้นนำหัวเชื้อจุลสาหร่าย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ในระดับความเค็ม ปริมาณไนโตรเจน แหล่งที่มาไนโตรเจน และความเข้มของแสงที่ได้จากผลการทดลองตามหัวข้อที่ 3.3 ถึง 3.6 การทดลองนี้ได้เลือกใช้ 3 ความยาวคลื่นแสง ได้แก่ แสงสีขาว, แสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองอยู่ที่ประมาณ $1x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบกะเป็นเวลา 8 วัน ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 136 มิลลิเมตร X ความสูง 248 มิลลิเมตร) แบบกะเป็นเวลา 8 วันด้วยอัตราการไหล 1.6 ลิตร/นาที ระหว่างการทดลองได้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยหลอดไฟแอลอีดีสีขาว และเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 30 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และความเข้มข้นของลูทีน

3.8 การศึกษาผลของการให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอิทธิพลต่อการเติบโตและการผลิตลูทีน

เตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ตามหัวข้อที่ 3.2 จากนั้นนำหัวเชื้อจุลสาหร่ายปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ในระดับความเค็ม ปริมาณไนโตรเจน แหล่งที่มาไนโตรเจน ความเข้มของแสง และคุณภาพของแสงที่ได้จากผลการทดลองตามหัวข้อที่ 3.3 ถึง 3.7 โดยให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ (ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3% โดยปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองอยู่ที่ประมาณ $1x10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบกะเป็นเวลา 8 วัน ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 136 มิลลิเมตร X ความสูง 248 มิลลิเมตร) แบบกะเป็นเวลา 8 วันด้วยอัตราการไหล 1.6 ลิตร/นาที ระหว่างการทดลองได้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยหลอดไฟแอลอีดีสีขาว และเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 30 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และความเข้มข้นของลูทีน

3.9 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.9.1 ความหนาแน่นเซลล์

การเติบโตของจุลสาหร่ายสามารถติดตามได้จากการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์และกล้องจุลทรรศน์ (Viriyayingsiri และคณะ, 2006)

3.9.2 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาน้ำหนักเซลล์แห้งดำเนินการตามวิธีการของ APHA (2005) โดยนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 25 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร ที่ผ่านการชั่งน้ำหนักแล้ว ล้างเกลือโดยการกรองด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำกระดาษกรองไปอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เปรียบเทียบน้ำหนักกระดาษกรองก่อนและหลังการอบ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสามารถคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/ลิตร) = (A-B) x (1,000/C) (3.1)

เมื่อ A คือ น้ำหนักกระดาษกรองที่ผ่านการกรองหลังอบแห้ง (มิลลิกรัม), B คือ น้ำหนักกระดาษกรอง (มิลลิกรัม) และ C คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร) น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้สามารถนำไปคำนวณหาอัตราการผลิตชีวมวล (Productivity) จากสมการ

อัตราการผลิตชีวมวล = $(X_2 - X_1) / (t_2 - t_1)$ (3.2)

เมื่อ X_1 และ X_2 คือน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา t_1 และ t_2 ตามลำดับ

3.9.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ดำเนินการตามวิธีของ Strickland and Parson (1972) โดยนำตัวอย่างของเหลวจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์แยกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบดเซลล์ให้แตกด้วยแท่งแก้วและเติมเมทานอลความเข้มข้น 99% โดยปริมาตรเพื่อสกัดคลอโรฟิลล์ จากนั้นนำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงและนำตัวอย่างไปเก็บในตู้เย็นในที่มืดเป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำตัวอย่างของเหลวในชั้นเมทานอลมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ การสกัดคลอโรฟิลล์อาจดำเนินการมากกว่า 1 ครั้ง จนกระทั่งเซลล์มีสีขาวซีด ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมสามารถคำนวณได้จากสมการที่ (3.3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Total carotenoid = $(4 \times E_{480}) \times (V_a/V_b)$ (3.3)

เมื่อ E_{480} คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร V_a คือปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) และ V_b คือปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

3.9.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นไนโตรเจนจากแหล่งไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยง

วิเคราะห์ความเข้มข้นไนเตรทโดยใช้วิธี UV Screening method โดยอ้างอิงจากวิธี APHA (1992) ทำการกรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร จากนั้นทำการวิเคราะห์เริ่มต้นจากนำน้ำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต

มิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 220 และ 275 นาโนเมตรนำผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตรมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนในน้ำเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไนเตรทมาตรฐาน

3.9.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นไนโตรเจนจากแหล่งแอมโมเนียในอาหารเพาะเลี้ยง

การวิเคราะห์ความเข้มข้นแอมโมเนียจะดำเนินการตามวิธี ของ Bower and Holm-Hansen (1980) โดยทำการกรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร นำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายซาลิไซเลตคะตะลิสต์ 0.6 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไลน์ไฮโปรคลอไรด์ 1.0 มิลลิลิตร ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ Vortex ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 1 ชั่วโมงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 640 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

3.9.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสฟอรัสในอาหารเพาะเลี้ยง

วิเคราะห์ความเข้มข้นฟอสฟอรัสโดยใช้วิธีของ APHA (1992) ทำการกรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร จากนั้นนำน้ำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมรีเอเจนต์ผสม (Ammonium molybdate solution Ascorbic acid และ Potassium antimony-tartrate solution) ลงในตัวอย่างด้วยอัตราส่วนของรีเอเจนต์ผสมต่อปริมาณของเหลวตัวอย่าง 1:10 ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ Vortex ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที (ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 885 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

3.9.7 ปริมาณลูทีน

การวัดปริมาณลูทีนจะใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่มี Photo Diode Array Detector ฉีดตัวอย่างของเหลวที่สกัดแคโรทีนอยด์จากขั้นตอนในข้างต้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าไปในคอลัมน์ C-18 โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมระหว่างน้ำกลั่น เมทานอล อะซิโตไนไตร์ล และได

คลอโรมีเทน อัตราส่วน 1:10:79:10 ตามลำดับ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 30 นาที

3.9.8 ปริมาณโปรตีนในเซลล์

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี CHNS analysis ด้วยเครื่อง CHNS Analyzer ที่มหาวิทยาลัยศิลปากร ใช้วิเคราะห์ปริมาณธาตุ C H N และ S ในตัวอย่างสารอินทรีย์ทุกชนิดในระดับปริมาณที่เกินกว่า 0.4 % ขึ้นไป โดยอาศัยการเผาไหม้สารตัวอย่างด้วยความร้อนสูงเพื่อให้สารอยู่ในสถานะแก๊สและตรวจวัดปริมาณธาตุด้วย Thermal conductivity detector โดยนำผลของธาตุไนโตรเจนที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ ดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีนในเซลล์ (\%wt)} = N \times 6.25 \qquad (3.4)$$

เมื่อ N คือ ธาตุไนโตรเจนในหน่วย % โดยน้ำหนักแห้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
วิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 การปรับเปลี่ยนความเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ

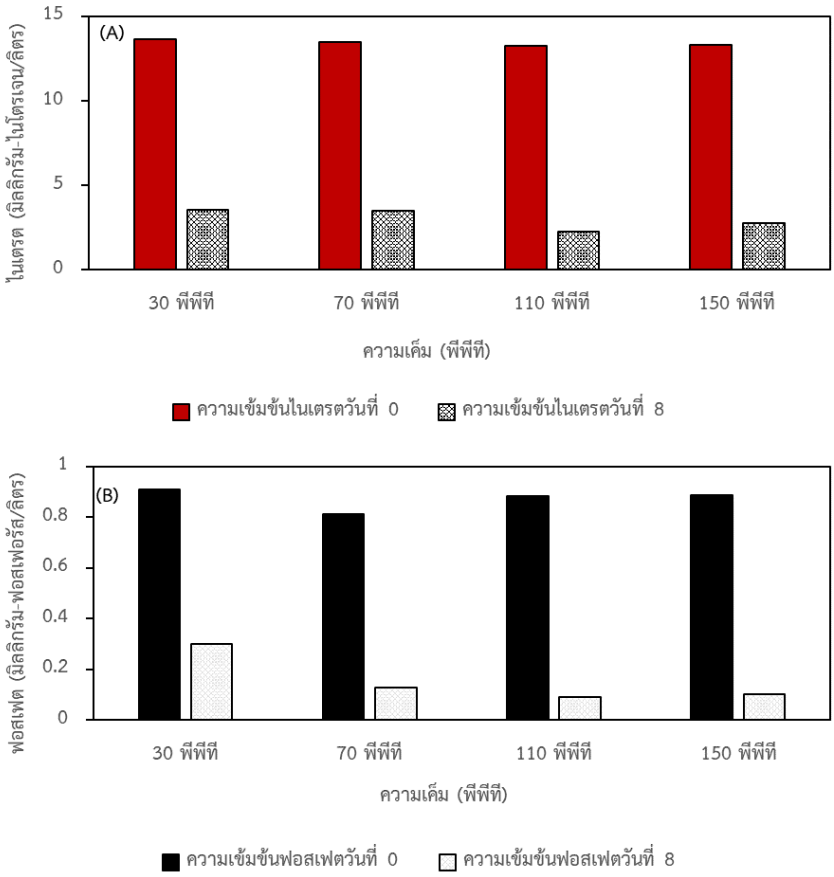
เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* แบบกะด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับความเค็ม 30 – 150 พีพีที ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงตามรายละเอียดที่ระบุไว้ในหัวข้อที่ 3.1 ผลการตรวจวัดธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนเตรตและฟอสเฟต ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่ามีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญเติบโตในทุกชุดการทดลอง ผลการติดตามการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปของความหนาแน่นเซลล์ ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.2(A) พบว่าจุลสาหร่ายมีระยะการปรับตัว (Lag phase) ในช่วงวันที่ 0 – 1 ในทุกชุดการทดลอง จากนั้นจุลสาหร่ายในทุกชุดการทดลองจะเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 8 ซึ่งยืนยันได้จากการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นเซลล์ จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที เจริญเติบโตดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 เป็นสภาวะดั้งเดิมสำหรับใช้เตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ทดลอง จึงทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องปรับตัวเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ที่มีการปรับความเค็ม โดยความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันที่ 8 มีค่าเท่ากับ $207.9 \pm 67.05 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าความหนาแน่นเซลล์ในชุดการทดลองที่ใช้ความเค็ม 70, 110 และ 150 พีพีที ในส่วนของน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 4.2(B)) พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 30 พีพีที ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดที่ 340 ± 44 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าน้ำหนักแห้งที่ความเค็มอื่นๆ เล็กน้อย ผลการทดลองที่ได้รับมีความสอดคล้องกับงานวิจัยในอดีต ซึ่งรายงานว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็มต่ำ (58 พีพีที) และให้ค่าความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 50×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ความเค็มสูงขึ้น (116-232 พีพีที) อย่างชัดเจน [51] ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *D. tertiolecta* โดยใช้อาหาร F/2 ที่ความเค็ม 30 พีพีที จะช่วยเพิ่มอัตราการเติบโต และผลผลิตชีวมวลมากกว่าการเพาะเลี้ยงที่สภาวะความเค็มสูงขึ้น

ภาพที่ 4.3 แสดงความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่อน้ำหนักแห้ง ผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที ให้ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดเท่ากับ 2.64 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์รวมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

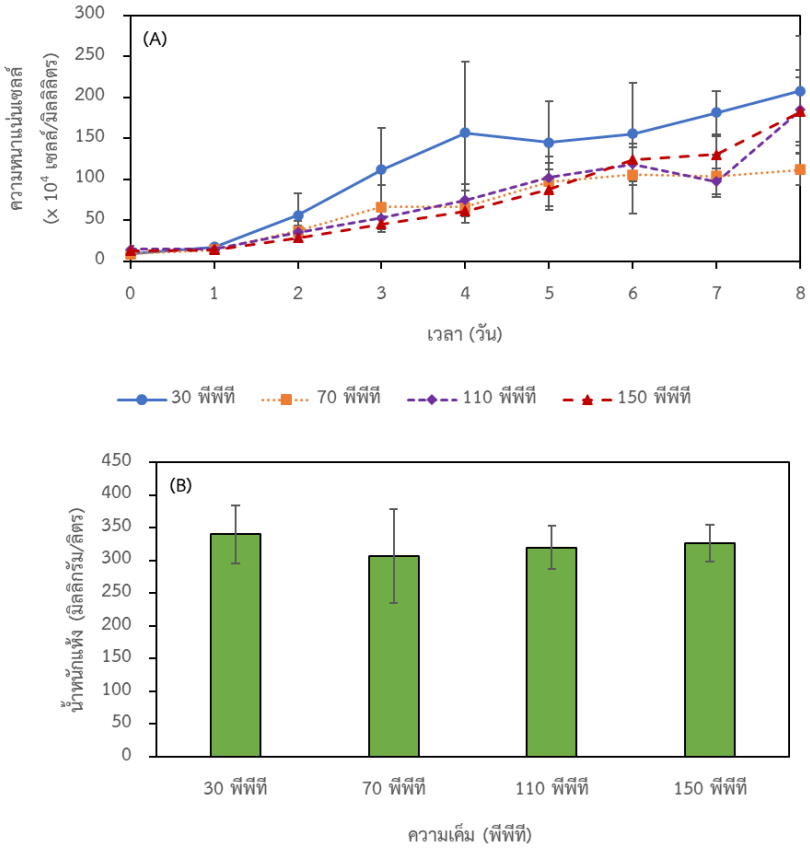
ความเค็ม 70 พีพีที ประมาณร้อยละ 17.3 และเมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่อน้ำหนักแห้ง พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที ให้ค่าสูงสุดเช่นกัน (8.03 มิลลิกรัม/กรัม) ผลการทดลองที่ได้รับตรงกับงานวิจัยในอดีต รายงานว่าจุลหร่าย *Scenedesmus* sp. ซึ่งเป็นจุลสาหร่ายสีเขียว สามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวมที่ความเค็มต่ำ (5 – 20 พีพีที) ได้มากกว่าที่ความเค็มสูง (40 – 60 พีพีที) ประมาณร้อยละ 57.17 [52] ในส่วนของลูทีนซึ่งเป็นหนึ่งในแคโรทีนอยด์สำคัญของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* [53] พบว่าการทดลองนี้ได้รับความเข้มข้นของลูทีนสูงสุด (0.79 ± 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร) และปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าทั้งสองตัวแปรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p > 0.05$) ผลการคำนวณอัตราการผลิตลูทีนที่ความเค็ม 30 พีพีที มีค่าเท่ากับ 0.10 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ซึ่งมากกว่าอัตราการผลิตลูทีนในสภาวะรองลงมา (70 พีพีที) ถึงประมาณร้อยละ 20 โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการผลิตชีวมวลในรูปน้ำหนักแห้งที่ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเค็ม 30 พีพีที ผลการทดลองที่ได้รับสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ren และคณะ [54] ซึ่งพบว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* สามารถผลิตลูทีนได้ดีที่ความเค็มต่ำ เนื่องจาก pathway การสังเคราะห์ลูทีนมีความเครียดต่อการเพิ่มความเค็ม โดยจุลสาหร่ายจะเกิดปฏิกิริยาออสโมซิส (Osmosis) ขึ้น ทำให้การเจริญเติบโตลดลง [7] จึงถูกยับยั้งการสังเคราะห์เมื่อความเค็มสูงขึ้น นำไปสู่การที่จุลสาหร่ายผลิตเบต้าแคโรทีนแทนแอลฟ่าแคโรทีน [55]

จากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สรุปในเบื้องต้นได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* เพื่อผลิตลูทีนควรดำเนินการที่ความเค็ม 30 พีพีที เนื่องจากได้รับความหนาแน่นเซลล์และอัตราการผลิตลูทีนสูงสุดเมื่อเทียบกับที่ความเค็มอื่นๆ

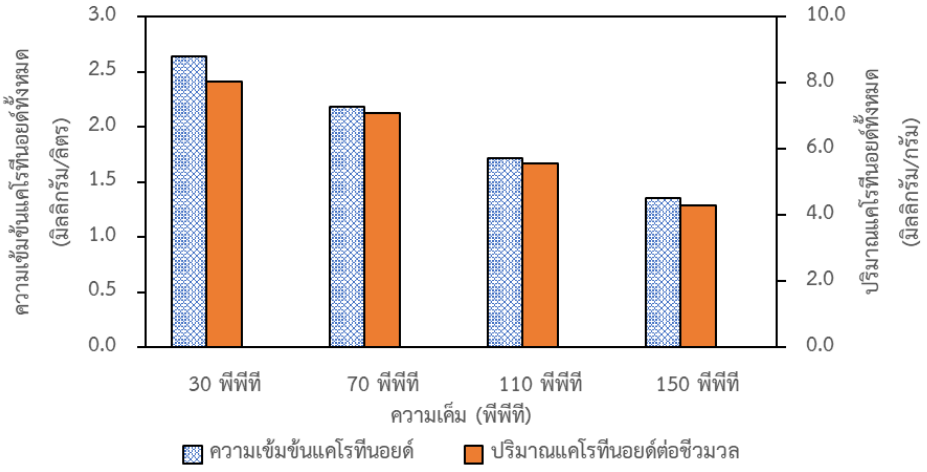


ภาพที่ 4.1 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับความเค็ม 30-150 พีพีที

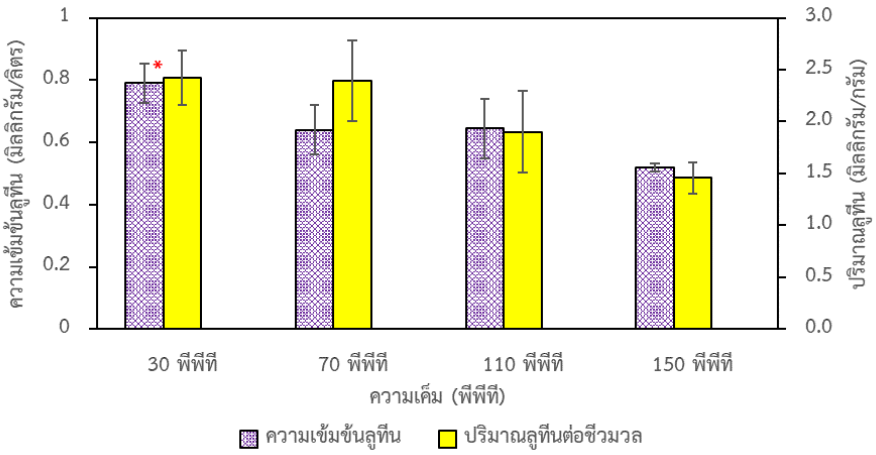
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4.2 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* (B) น้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย D. tertiolecta ในวันที่ 8 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่ความเค็ม 30-150 พีพีที



ภาพที่ 4.3 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่อน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในวันที่ 8 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่ความเค็ม 30-150 พีพีที



ภาพที่ 4.4 ความเข้มข้นของลูทีนและปริมาณลูทีนต่อน้ำหนักแห้งในจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในวันที่ 8 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร F/2 ที่ความเค็ม 30-150 พีพีที

หมายเหตุ: (*) หมายความว่าแตกต่างจากค่าอื่นอย่างมีนัยยะสำคัญ

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะความเค็ม 30 พีพีที

อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร•วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร•วัน)	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)
29.07 ± 4.73	0.099 ± 0.008	2.42 ± 0.26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2 ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน

ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ความเค็ม 30 พีพีที และปรับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ให้อยู่ในช่วง 25% - 150% ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์จุลสาหร่ายในแต่ละชุดการทดลองไม่ได้มีความแตกต่างกันมากนักในช่วงวันที่ 0 - 4 อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์จุลสาหร่ายมีความแตกต่างอย่างชัดเจนมากขึ้นหลังจากวันที่ 4 โดยชุดการทดลองที่ปรับไนโตรเจนอยู่ในช่วง 75% - 150% จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าการใช้ไนโตรเจน 25% และ 50% อย่างชัดเจน ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากปริมาณไนโตรเจนในอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ในขณะเดียวกันจุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้มากขึ้นอย่างชัดเจน

เมื่อปรับความเข้มข้นไนโตรเจนเป็น 100% (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2), 125% และ 150% โดยมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดในวันสุดท้ายเท่ากับ 125.5 ± 47.73 x 10^4 , 104.5 ± 8.74 x 10^4 และ 128.2 ± 16.69 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5(A)) ในส่วนของน้ำหนักแห้งที่ตรวจวัดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4.5(B)) พบว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 150% ให้น้ำหนักแห้งสูงสุดที่ 253.33 ± 53.27 มิลลิกรัม/ลิตร (25.42 ± 6.66 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน) ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่น

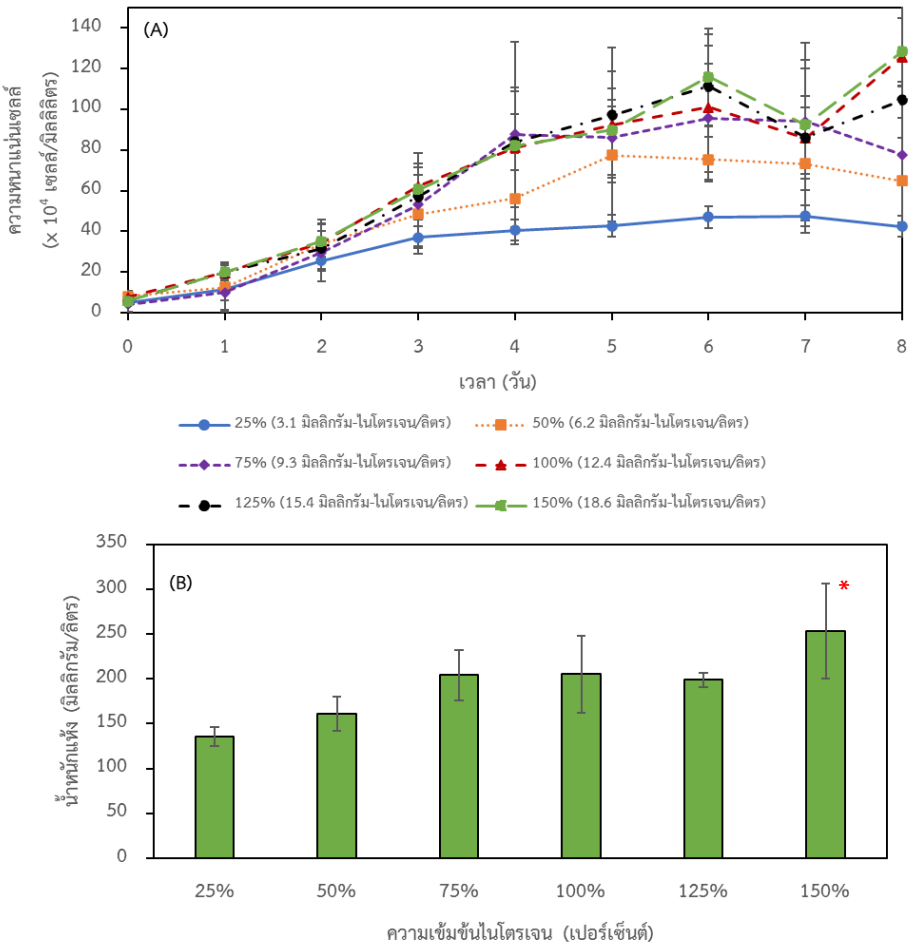
จากภาพที่ 4.6 พบว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับธาตุอาหารไนโตรเจนให้อยู่ในช่วง 100 – 150% สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีกว่าการปรับลดไนโตรเจนเหลือ 25% - 75% โดยได้รับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์อยู่ในช่วงระหว่าง 1.8 – 2.3 มิลลิกรัม/ลิตร ผลการทดลองที่ได้รับพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัย Nellis และคณะ [56] ที่รายงานว่าการลดปริมาณไนเตรตลงจะทำให้จุลสาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ได้ลดลง ในขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มปริมาณไนเตรทขึ้นจุลสาหร่ายจะสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากขึ้น ในส่วนของลูทีน (ภาพที่ 4.7) นั้นจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2 ที่ปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 150% ได้รับความเข้มข้นของลูทีนสูงสุดเท่ากับ 0.58 ± 0.094 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเทียบเท่าปริมาณลูทีนต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.11 ± 0.048 มิลลิกรัม/กรัม นอกจากนี้ความสามารถในการผลิตลูทีนลดลงตามปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองที่ได้รับนั้นมีความคล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Nellis และคณะ [56] ที่ศึกษาจุลสาหร่าย *Dunaliella salina* และ Shin-Hsin Ho และคณะ [57] ที่ศึกษาจุลสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ซึ่งรายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนมีปริมาณมาก จุลสาหร่ายจะสามารถเติบโตได้เป็นอย่างดีและสามารถผลิตลูทีนได้มากตามการเติบโตของจุลสาหร่าย นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นให้จุลสาหร่ายผลิตลูทีนมากขึ้น เนื่องจากไนเตรทมีองค์ประกอบเป็นไนโตรเจนที่ช่วยสังเคราะห์โปรตีนใน Light Harvesting Complex II (LHCll) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย [58]

การตรวจวัดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนเตรตและฟอสเฟต พบว่าสาหร่ายในทุกชุดการทดลองมีการใช้ธาตุอาหารทั้งสองในการเจริญเติบโต โดย *D. tertiolecta* ในชุดการทดลองที่ปรับความเข้มข้นของไนเตรทเป็น 25%, 50%, 75%, 100%, 125% และ 150% นั้นมีการใช้ธาตุอาหารไนเตรทไป และ 4.1, 5.8, 8.3, 9.5, 10.9 และ 12.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งแนวโน้มการใช้ไนเตรทในการศึกษานี้สอดคล้องกับผลผลิตชีวมวลในแต่ละชุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าความ

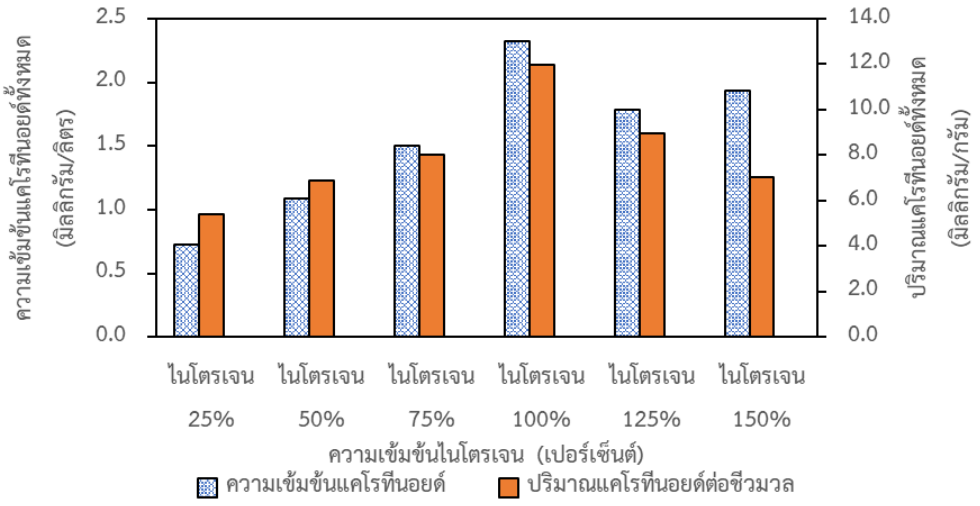
เข้มข้นของธาตุอาหารไนเตรทนั้นมีความสำคัญกับบทบาทการผลิตชีวมวลสาหร่ายของระบบเพาะเลี้ยง ในส่วนของฟอสเฟตพบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงจาก 1 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ไปเป็น 0.11 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ด้วยความเข้มข้นของไนโตรเจน 75% - 150% ให้ผลการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนได้ดี จึงสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นตั้งแต่ 75% - 150% ไนโตรเจน เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ทั้งในด้านการเติบโตและผลิตลูทีน อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาค้นคว้าพบว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* สามารถเจริญเติบโตและผลิตลูทีนได้มากขึ้นอีกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจน และเมื่อเปรียบเทียบต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 4 จากต้นทุนเดิม ขณะที่รายได้ที่คาดว่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 45.9 จึงตัดสินใจเลือกใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจน 150% ของปริมาณในอาหารสูตร F/2 และความเค็ม 30 พีพีที เพื่อเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในการทดลองต่อไป

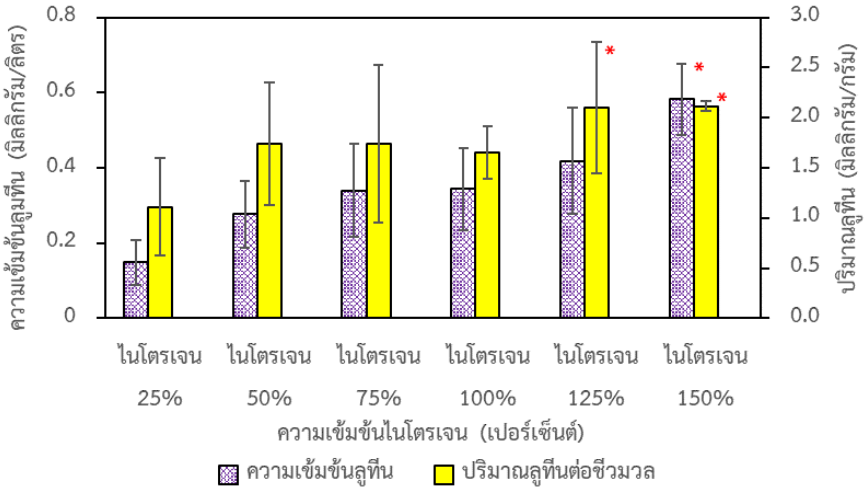
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



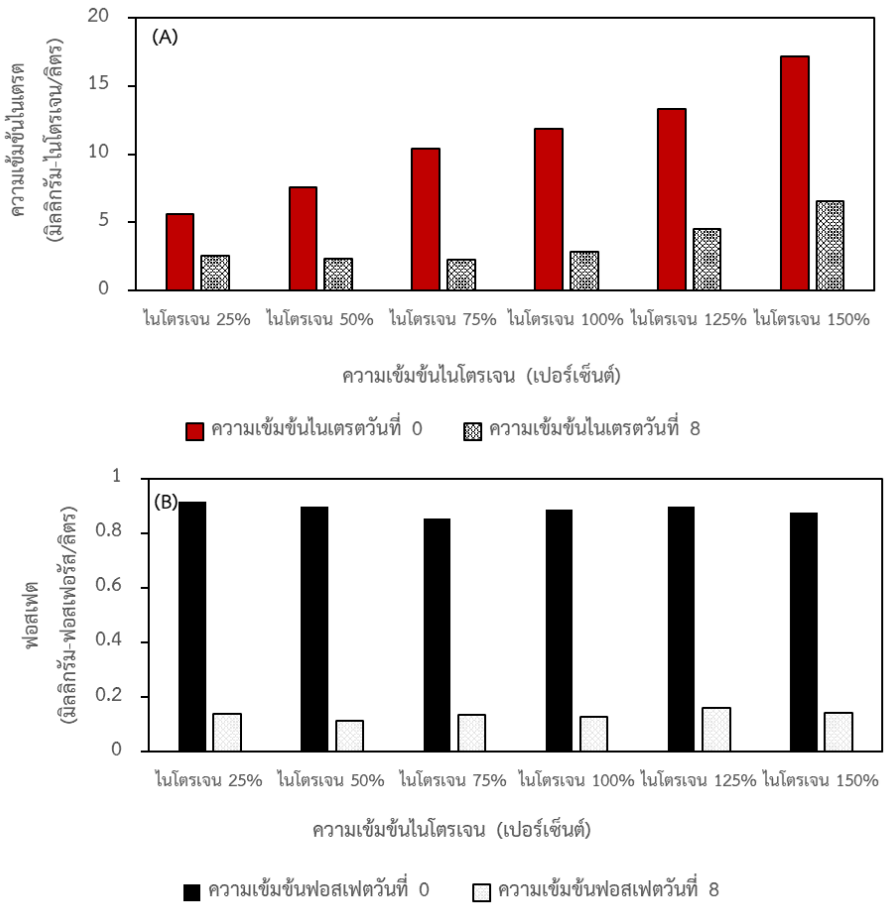
ภาพที่ 4.5 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร)



ภาพที่ 4.6 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร)



ภาพที่ 4.7 ความเข้มข้นลูทีนในและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร)



ภาพที่ 4.8 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 25% (3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 50% (6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 75% (9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 100% (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) 125% (15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร)

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะความเข้มข้นไนโตรเจน 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)

อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร•วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร•วัน)	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)
25.42 ± 6.66	0.073 ± 0.01	2.11 ± 0.05

4.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตชีวมวล เนื่องจากจุลสาหร่ายสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งไนเตรตและแอมโมเนียในการส่งเสริมให้เจริญเติบโต [59] จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในการศึกษาที่ 4.3 นี้จะมีชุดการทดลองทั้งหมด 4 ชุดตามการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนในอาหาร F/2 (ความเค็ม 30 พีพีที) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 แหล่ง ได้แก่ $NaNO_3$ (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/2), $Ca(NO_3)_2$ ที่ใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และ Urea, $(NH_4)_2SO_4$ ที่ใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยกำหนดความเข้มข้นเป็น 18 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ก่อนนำมาใช้เพาะเลี้ยง *D. tertiolecta* ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลองที่ 3.1 เมื่อติดตามการเติบโตของสาหร่ายจากค่าความหนาแน่นเซลล์พบว่าทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีระยะการเติบโตแบบทวีคูณในช่วงวันที่ 0-5 แต่ $(NH_4)_2SO_4$ จะมีระยะการเติบโตแบบทวีคูณในช่วงวันที่ 0-4 ซึ่งระยะการเติบโตน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น (ภาพที่ 4.9(A)) เนื่องจากแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 32.8 ไมโครกรัม-แอมโมเนีย/ลิตร ถือว่ามีความเป็นพิษต่อจุลสาหร่ายแล้ว ทำให้การเจริญเติบโตถูกยับยั้งไว้ [60] นอกจากนี้ความหนาแน่นเซลล์ของแหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$ ยังสามารถเจริญเติบโตได้อีกจึงเป็นข้อได้เปรียบของแหล่งไนโตรเจนนี้ โดยความหนาแน่นเซลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงที่แหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$ ($220.85 \pm 77.41 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร) มีค่ามากกว่าชุดการทดลองที่ใช้แหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ $167.29 \pm 13.75 \times 10^4$, $206.34 \pm 51.34 \times 10^4$ และ $157.63 \pm 15.91 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในส่วนของน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 4.9B) พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งมีน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 สูงสุดเท่ากับ 280 ± 46.36, 290 ± 16.17, 252 ± 18.90 และ 292 ± 22.03 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักแห้งของชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดนี้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

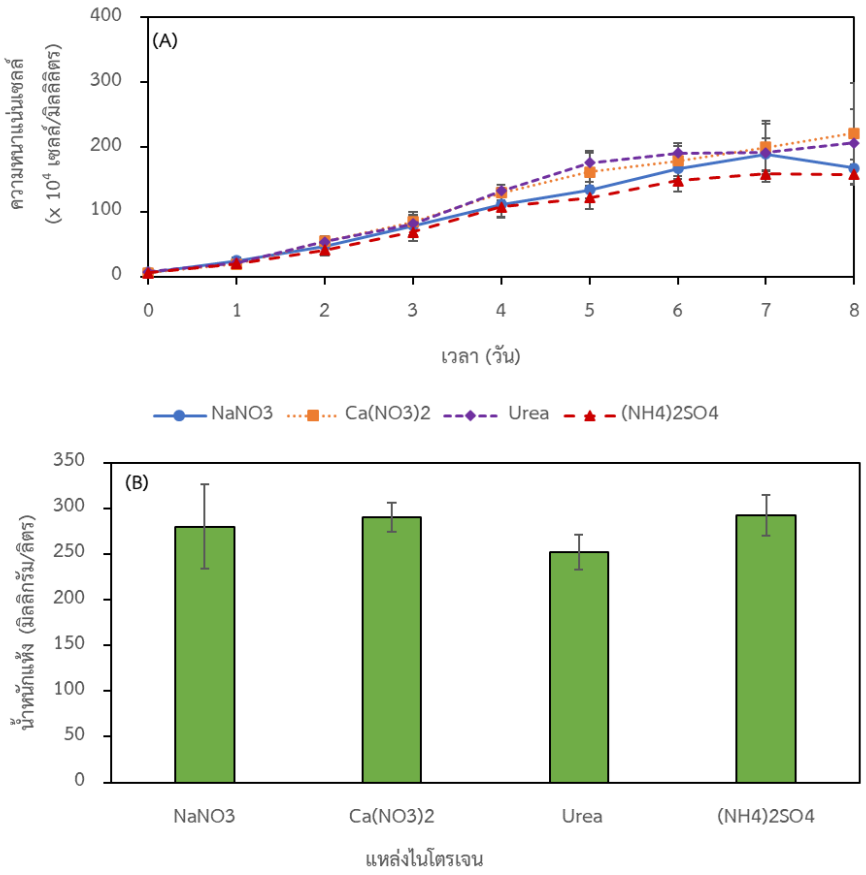
ในส่วนของแคโรทีนอยด์รวมที่จุลสาหร่ายผลิตได้ทั้งหมด (ภาพที่ 4.10) พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* โดยใช้ $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

สามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวมใกล้เคียงกัน ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 2.0 - 2.6 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่อน้ำหนักแห้งพบว่าแหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$ และ $(NH_4)_2SO_4$ มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมต่อน้ำหนักแห้งสูงสุดสุดเท่ากับ 9 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งมากกว่าแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ และ Urea ในส่วนการผลิตลูทีนพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* โดยใช้ $Ca(NO_3)_2$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้รับลูทีนสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการทดลองประมาณ 0.9 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 3 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งมากกว่าแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ และ Urea ประมาณร้อยละ 72.41

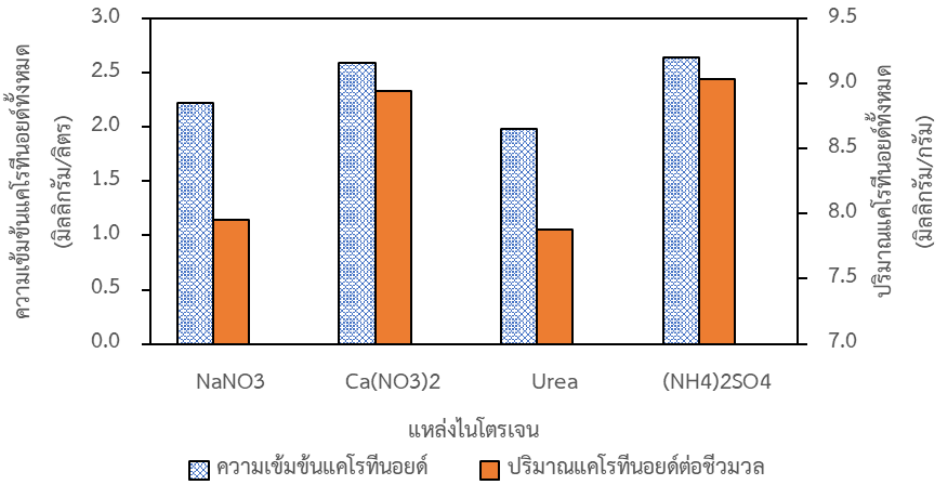
เมื่อตรวจวัดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่าจุลสาหร่ายมีการใช้ธาตุอาหารทั้งสองในการเจริญเติบโต โดยไนโตรเจนลดลงจากประมาณ 17 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร เหลือประมาณ 3.60 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$ และ $Ca(NO_3)_2$ ส่วนในแหล่งไนโตรเจน Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ จะเหลือประมาณ 0.23 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรในวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เนื่องจากการตรวจวัดธาตุอาหารไนโตรเจนใน Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ ใช้วิธี Bower and Holm-Hansen (1980) ในส่วนของฟอสเฟตพบว่าความเข้มข้นได้ลดลงจากประมาณ 1 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง เหลือประมาณ 0.06 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตรในวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

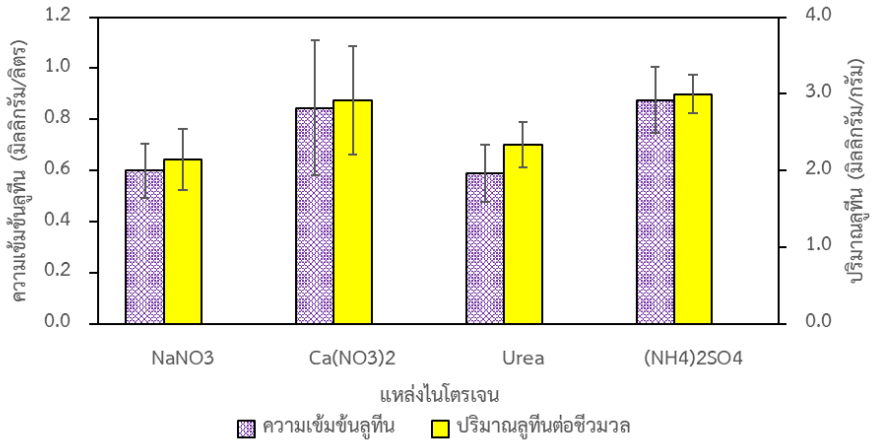
จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ด้วยแหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$ ให้ผลการเติบโตและการผลิตลูทีนได้ดี และเมื่อทำการศึกษาค้นคว้าพบว่า Ca^{2+} ที่มีปริมาณเพียงพอยังสามารถช่วยกระตุ้นให้จุลสาหร่ายสังเคราะห์แสงได้เป็นอย่างดี [61] นอกจากนี้ $Ca(NO_3)_2$ มีราคาที่ถูกกว่าแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$ ถึงร้อยละ 23.79 จึงสรุปได้ว่าเลือก $Ca(NO_3)_2$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 150% ไนโตรเจนของปริมาณในอาหารสูตร F/2 และความเค็ม 30 พีพีที เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในการทดลองต่อไป



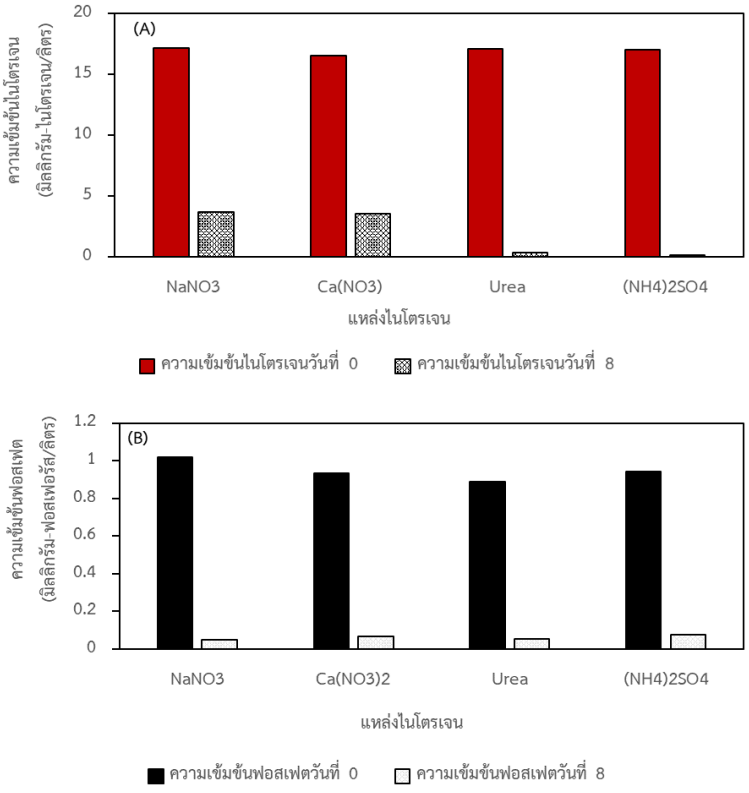
ภาพที่ 4.9 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$



ภาพที่ 4.10 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมทั้งหมดในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$



ภาพที่ 4.11 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$



ภาพที่ 4.12 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในแหล่งไนโตรเจน $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, Urea และ $(NH_4)_2SO_4$

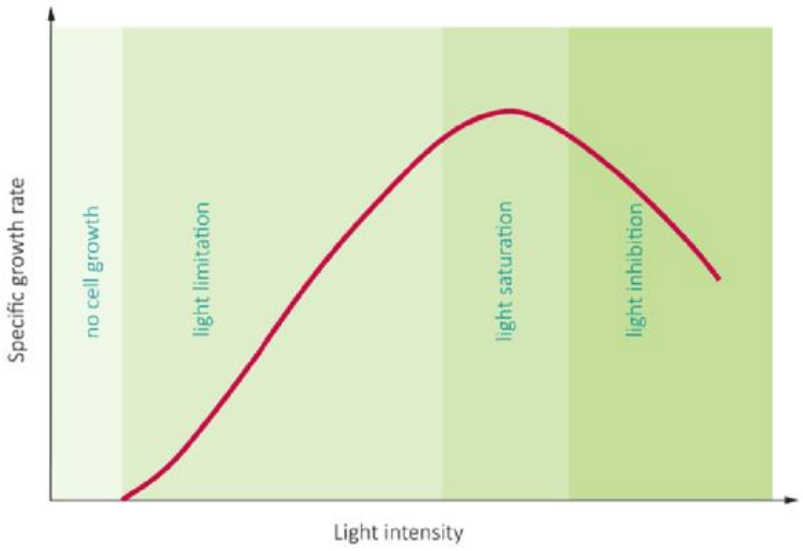
ตารางที่ 4.3 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้แหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$

อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)
26.29 ± 2.02	0.091 ± 0.04	2.91 ± 0.71

4.4 ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน

การศึกษานี้จะศึกษาผลของความเข้มแสงซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* โดยจะเพาะเลี้ยง *D. tertiolecta* ด้วยอาหาร F/2 (ความเค็ม 30 พีพีที)ที่มีการปรับแหล่งไนโตรเจนเป็น $Ca(NO_3)_2$ 18 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยจะแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดตามความเข้มแสงที่ใช้ 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที (5000 ลักซ์), 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที (15,000 ลักซ์) และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที (30,000 ลักซ์) เนื่องจากความเข้มแสงในช่วงนี้เป็นความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย [62] เมื่อติดตามการเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปของความหนาแน่นเซลล์ (ภาพที่ 4.13(A)) จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดจนถึงวันที่ 3 ซึ่งเป็นแนวโน้มเดียวกันทั้ง 3 ความเข้มแสง โดยความหนาแน่นเซลล์ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีค่าเท่ากับ $302.99 \pm 44.46 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ความเข้มแสงอื่นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อนำมาเทียบกับผลการทดลองที่ผ่านมาจะพบว่าแสงที่เพิ่มขึ้นทำให้ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่ายเพิ่มขึ้นด้วย (เพิ่มขึ้นประมาณ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) เมื่อหาค่าเฉลี่ยความหนาแน่นเซลล์วันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 67-402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที โดยวิธี One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที แตกต่างจากความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในส่วนของน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 4.13(B)) พบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ได้รับน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 สูงสุดเท่ากับ 412 ± 67.88

มิลลิกรัม/ลิตร เทียบเท่าอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 45.5 ± 9.19 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ซึ่งมีค่ามากกว่าน้ำหนักแห้งภายใต้สภาวะความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีค่าเท่ากับ 264 ± 10.58 มิลลิกรัม/ลิตร และ 230.67 ± 16.17 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามผลของงานวิจัยที่ผ่านมา [63] ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับความเข้มแสงที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* โดยพบว่าที่ความเข้มแสงสูงจะได้รับน้ำหนักแห้งสูงกว่าความเข้มแสงที่ต่ำกว่า โดยที่ความเข้มแสง 690 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ได้รับน้ำหนักแห้งมากกว่าความเข้มแสง 92 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ถึง 1.5 เท่า อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มแสงขึ้นไปจนถึง 920 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที จะได้รับน้ำหนักแห้งลดลงไป 1.06 เท่า และจากงานวิจัยของ Sui และ Harvey [64] ซึ่งทำการศึกษาในจุลสาหร่าย *Dunaliella salina* ที่ความเข้มแสง 100 – 600 ไมโคลโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที โดยรายงานว่าที่ความเข้มแสง 400 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย *D. salina* มีค่ามากกว่าที่ความเข้มแสง 100, 200, 300 และ 600 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที กล่าวคือภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูงจะไปกระตุ้นการเติบโตของสาหร่ายได้ดีกว่าความเข้มแสงต่ำ แต่เมื่อให้แสงมากจนเกินความต้องการของจุลสาหร่ายอาจส่งผลเสียแก่การเจริญเติบโตได้



ภาพที่ 4.13 ผลของความเข้มแสงที่มีต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย [65]

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งภายใต้สภาวะความเข้มแสง 67-402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที พบว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที สามารถผลิตชีวมวลได้มากกว่าชุดการทดลองที่สภาวะความเข้มแสง 67 และ 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาทีอย่างชัดเจน ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (ภาพที่ 4.15) พบว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 สูงสุดเท่ากับ 2.88 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าความเข้มแสงอื่นๆ โดยที่ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 2.62 มิลลิกรัม/ลิตร และความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 1.97 มิลลิกรัม/ลิตร

ในส่วนการผลิตลูทีนพบว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ได้รับลูทีนเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 1.17 ± 0.403 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 3.88 ± 2.74 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงอื่นๆ โดยที่ความเข้มแสง 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ผลิตลูทีนได้เท่ากับ 0.70 ± 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 3.02 ± 0.22 มิลลิกรัม/กรัม และความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ผลิตลูทีนได้เท่ากับ 1.06 ± 0.079 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 4 ± 0.17 มิลลิกรัม/กรัม โดยผลจากงานวิจัยที่ผ่านมา [63] ศึกษาเกี่ยวกับความเข้มแสงที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* โดยพบว่าที่ความเข้มแสงสูง (690 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที) จะได้รับลูทีนมากกว่าความเข้มแสงที่ต่ำกว่า (92 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที) 1.87 เท่า เนื่องจากปริมาณแสงที่มากเพียงพอจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายทำสามารถสังเคราะห์ลูทีนได้มากขึ้น

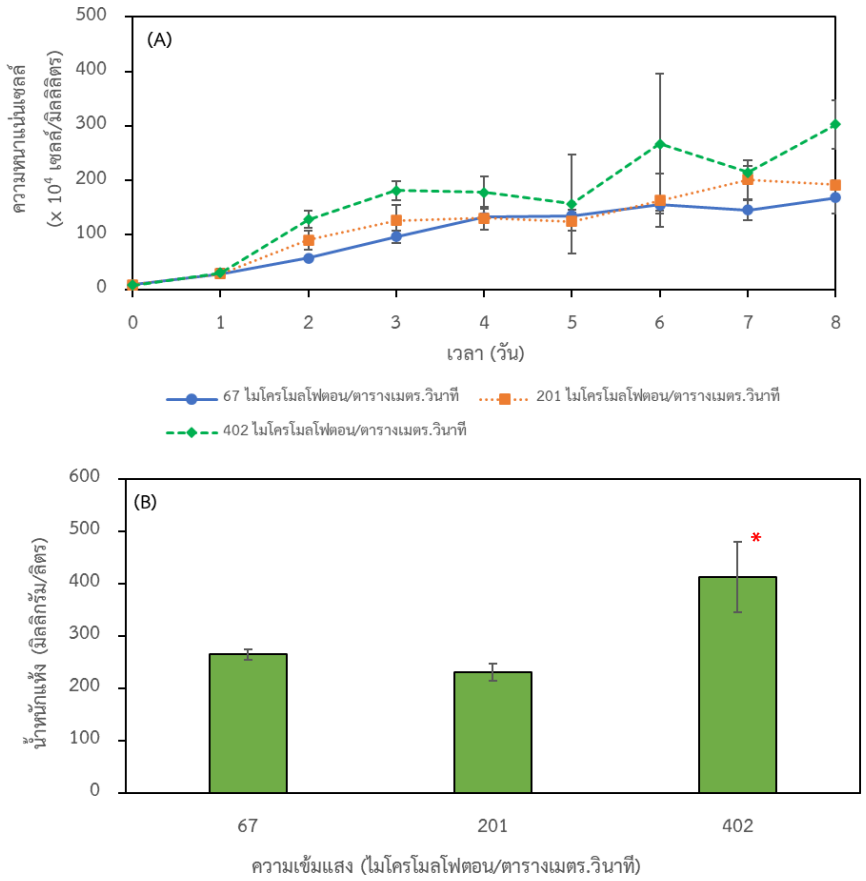
การตรวจวัดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักของจุลสาหร่าย ได้แก่ ไนเตรต และ ฟอสเฟต พบว่าจุลสาหร่ายใช้ธาตุอาหารทั้งสองในการเจริญเติบโต โดยไนเตรตลดลงจากประมาณ 18 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง เหลือประมาณ 3.7 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ในวัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ในส่วนของฟอสเฟตพบว่าความเข้มข้นลดลงจากประมาณ 1 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง เหลือประมาณ 0.05 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

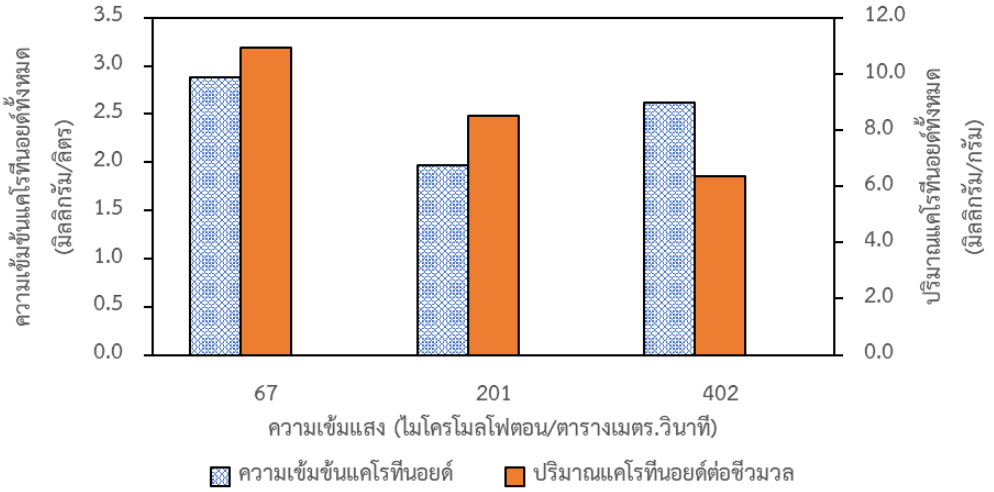
จากผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที มีการเจริญเติบโตมากที่สุด เมื่ออ้างอิงจากงานวิจัยที่ผ่านมา [62] ได้ทำการศึกษารวบรวมอิทธิพลความเข้มแสง (5-3,500 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที) ต่อจุลสาหร่ายสายพันธุ์ต่างๆ โดยติดตามผลการเจริญเติบโตโดยน้ำหนักแห้ง คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ รายงานว่าการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงสูงจุลสาหร่ายจะสามารถผลิตลูทีนได้มากขึ้น เนื่องจากแสงจะเข้าไปกระตุ้นการเติบโตของสาหร่าย แต่เมื่อความเข้มแสงสูงเกิดไปอาจเกิดการทำลายเซลล์ของจุลสาหร่ายได้ [63] ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเลือกความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที โดยมี $Ca(NO_3)_2$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 150% ไนโตรเจนของปริมาณในอาหารสูตร F/2 และความเค็ม 30 พีพีที เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

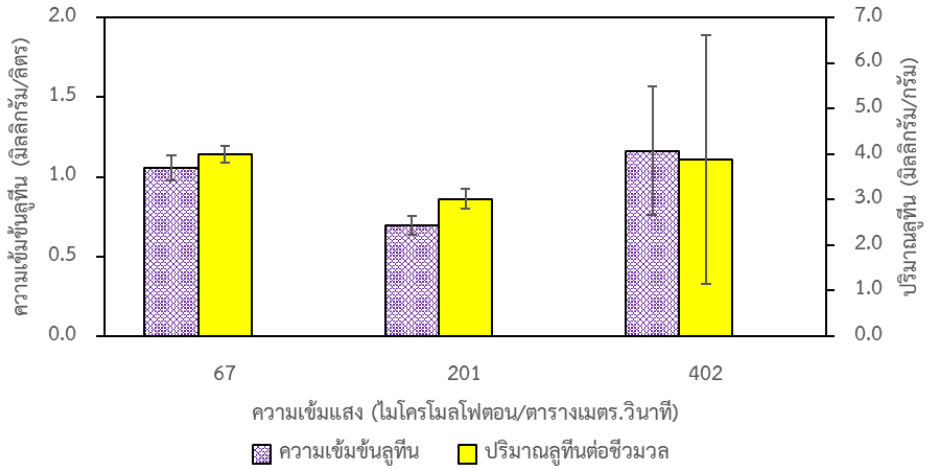


ภาพที่ 4.14 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

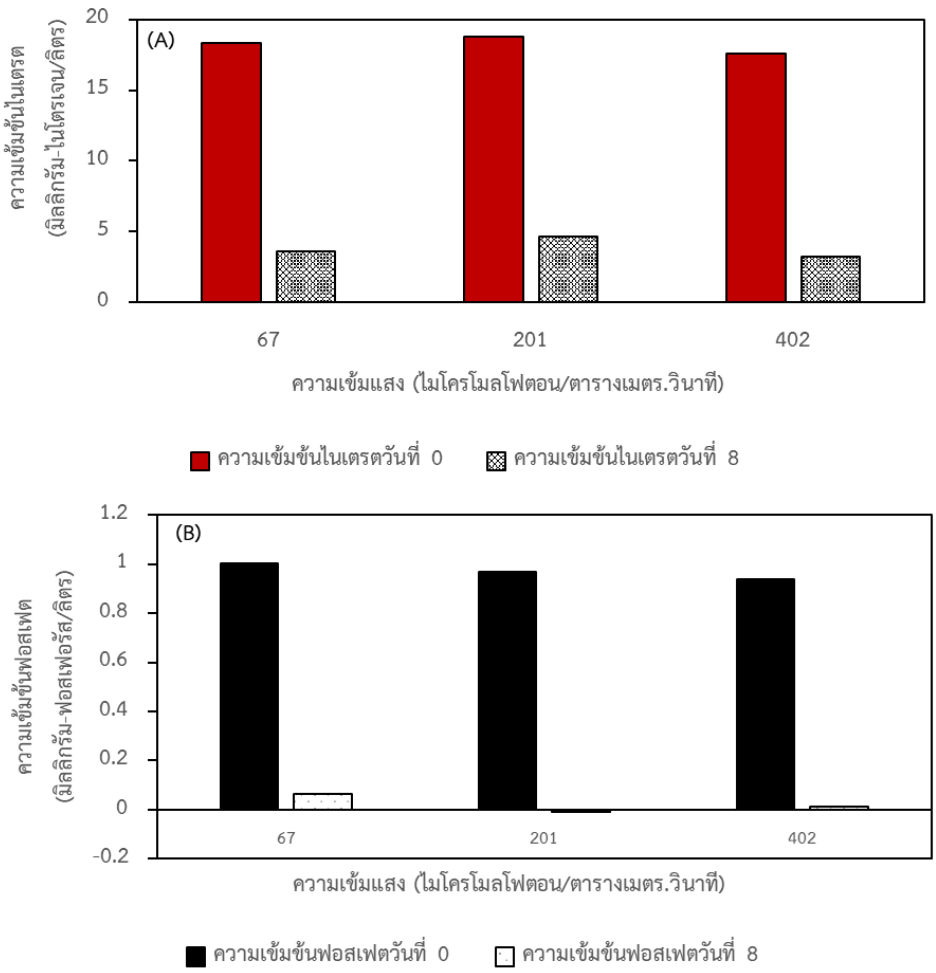
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4.15 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที



ภาพที่ 4.16 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที



ภาพที่ 4.17 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ความเข้มแสง 67 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที, 201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที และ 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.4 การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะความเข้มแสง 402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที

อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)
45.5 ± 9.19	0.15 ± 0.05	3.88 ± 2.47

4.5 ผลของความยาวคลื่นแสงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน

การศึกษานี้จะศึกษาผลของความยาวคลื่นแสงต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* โดยจะเพาะเลี้ยง *D. tertiolecta* ด้วยอาหาร F/2 (ความเค็ม 30 พีพีที)ที่มีการปรับแหล่งไนโตรเจนเป็น $Ca(NO_3)_2$ 18 มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร โดยจะแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดตามความเข้มแสงที่ใช้โดยมีการปรับความยาวคลื่นแสงออกเป็น 3 ความยาวคลื่น ได้แก่ แสงสีแดง (639 นาโนเมตร), แสงสีน้ำเงิน (460 นาโนเมตร) และแสงสีขาว (442-665 นาโนเมตร) เมื่อติดตามการเจริญเติบโต (ภาพที่ 4.18(A)) พบว่าความหนาแน่นเซลล์จุลสาหร่ายในแต่ละชุดการทดลองไม่ได้มีความแตกต่างกันมากนักในช่วงวันที่ 0 – 2 อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์จุลสาหร่ายมีความแตกต่างอย่างชัดเจนมากขึ้นหลังจากวันที่ 3 โดยจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแสงสีขาวจะมีความหนาแน่นเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 238.62 ± 25.17 $x10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าความหนาแน่นเซลล์ในแสงสีอื่นๆ โดยแสงสีน้ำเงินมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 230.03 ± 18.98 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และแสงสีแดงมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 225.14 ± 34.05 $x10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร และในส่วนของน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 4.18B) พบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแสงสีขาวมีค่าสูงถึง 255.56 ± 36.72 มิลลิกรัม/ลิตร เทียบเท่าอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 23.11 ± 1.95 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับผลจากการทดลองที่แล้วพบว่าความหนาแน่นเซลล์มีจำนวนลดลงเนื่องจากในการทดลองนี้ใช้หลอดไฟสปอร์ตไลท์แทนหลอดไฟแอลอีดี

ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวม (ภาพที่ 4.19) พบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแสงสีขาวสามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวมได้สูงสุดเท่ากับ 2.35 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าความยาวคลื่นแสงอื่นๆ โดยภายใต้สภาวะแสงสีน้ำเงินผลิตแคโรทีนอยด์รวมได้เท่ากับ 2.17 มิลลิกรัม/ลิตร และภายใต้สภาวะแสงสีแดงสามารถผลิตแคโรทีนอยด์รวมได้เท่ากับ 2.14 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากแสงสีน้ำเงินสามารถกระตุ้นให้จุลสาหร่ายเกิดความเครียดได้มากกว่าแสงสีแดง จึงมีการสะสมปริมาณแคโรทีนอยด์ได้มากกว่า

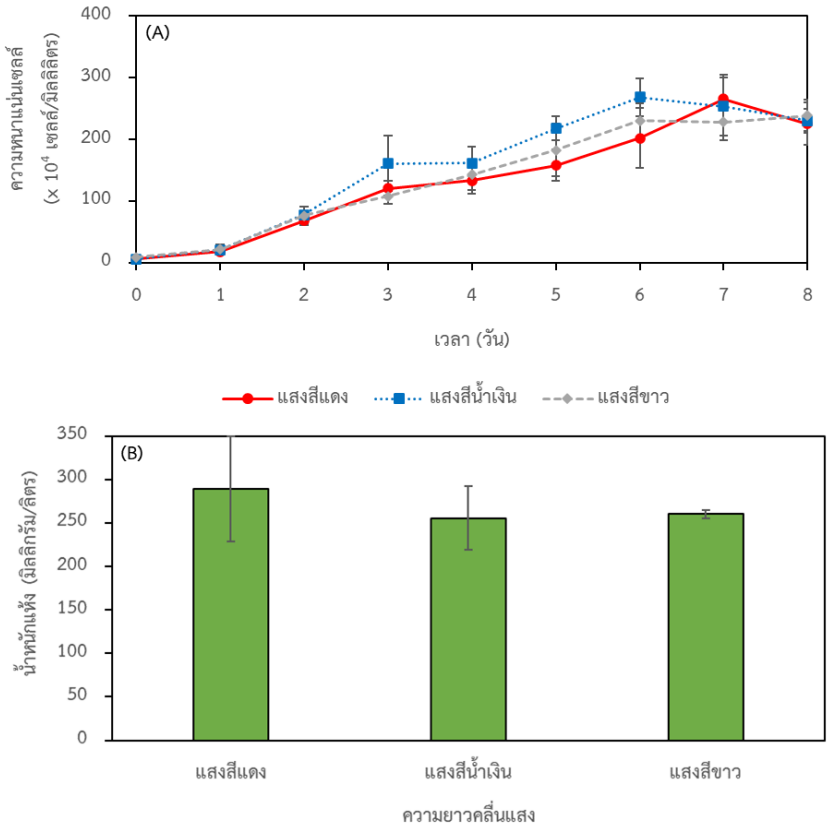
ในส่วนการผลิตลูทีน พบว่าภายใต้สภาวะแสงสีขาวได้รับลูทีนเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 0.98 ± 0.006 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 3.45 ± 0.70 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความยาวคลื่นแสงอื่นๆ โดยที่แสงสีแดงผลิตลูทีนได้เท่ากับ 0.96 ± 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 3.43 ± 0.91 มิลลิกรัม/กรัม ภายใต้สภาวะแสงสีน้ำเงินผลิตลูทีนได้เท่ากับ 0.72 ± 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 2.83 ± 0.32 มิลลิกรัม/กรัม จากผลการทดลองพบว่าเป็นไปตามงานวิจัยที่ผ่านมา โดยมีรายงานว่าที่แสงสี

ขาวจะมีการกระจายสเปคตรัมเพียงพอต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. [66] ซึ่งจะไปกระตุ้นการผลิตลูทีนได้มากขึ้น อย่างก็ตามเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นลูทีนในวันที่ 8 โดยวิธี One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าค่าเฉลี่ยของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ภายใต้สภาวะแสงสีขาวแตกต่างจากภายใต้สภาวะแสงสีน้ำเงิน อย่างมีนัยยะสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากภายใต้สภาวะแสงสีแดง ($p > 0.05$)

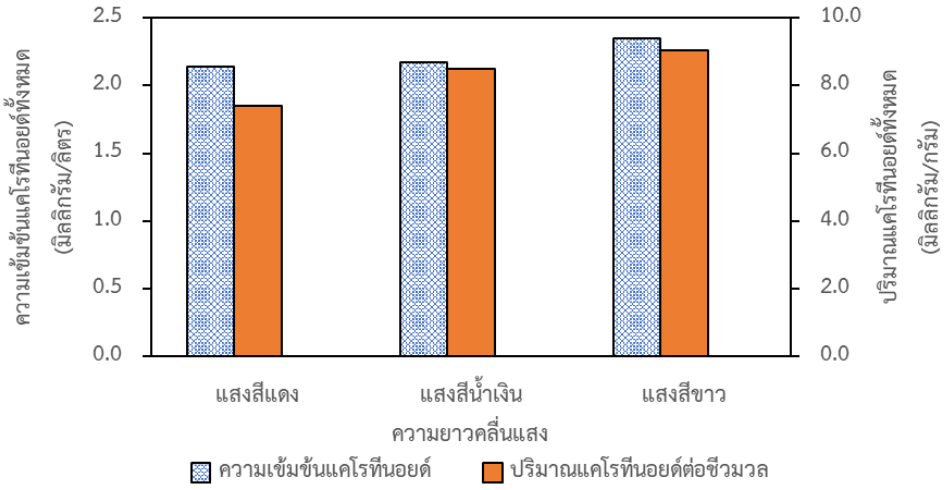
การตรวจวัดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักของจุลสาหร่าย ได้แก่ ไนเตรท และ ฟอสเฟต พบว่าจุลสาหร่ายใช้ธาตุอาหารทั้งสองในการเจริญเติบโต โดยไนเตรทลดลงจากประมาณ 17 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง เหลือประมาณ 1.17 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร ในวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ในส่วนของฟอสเฟตพบว่าความเข้มข้นลดลงจากประมาณ 0.85 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง เหลือประมาณ 0.01 มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร ในวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ภายใต้สภาวะแสงสีขาวมีความเหมาะสมในเรื่องการกระตุ้นการเติบโตและการผลิตลูทีน เนื่องจากแสงสีขาวมีการกระจายของสเปคตรัมที่เพียงพอต่อการเติบโตของสาหร่าย [66] และค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของลูทีนภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในแสงสีขาวมีค่ามากกว่าภายใต้สภาวะแสงสีน้ำเงินอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายส่วนใหญ่มักจะใช้แสงสีขาวในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาที่ถูกกว่าแสงสีแดงและสีน้ำเงิน จึงสรุปได้ว่าเลือกแสงสีขาวที่ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที โดยมี $Ca(NO_3)_2$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 150% ไนโตรเจนของปริมาณในอาหารสูตร F/2 และความเค็ม 30 พีพีที เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

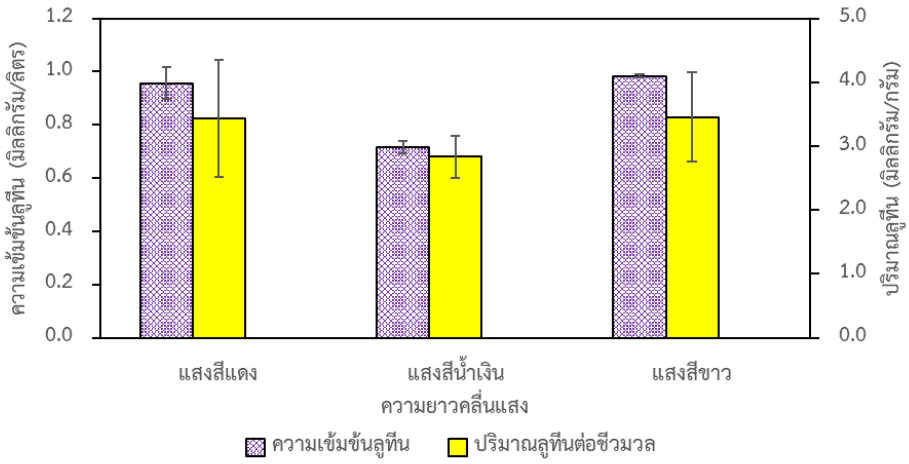
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



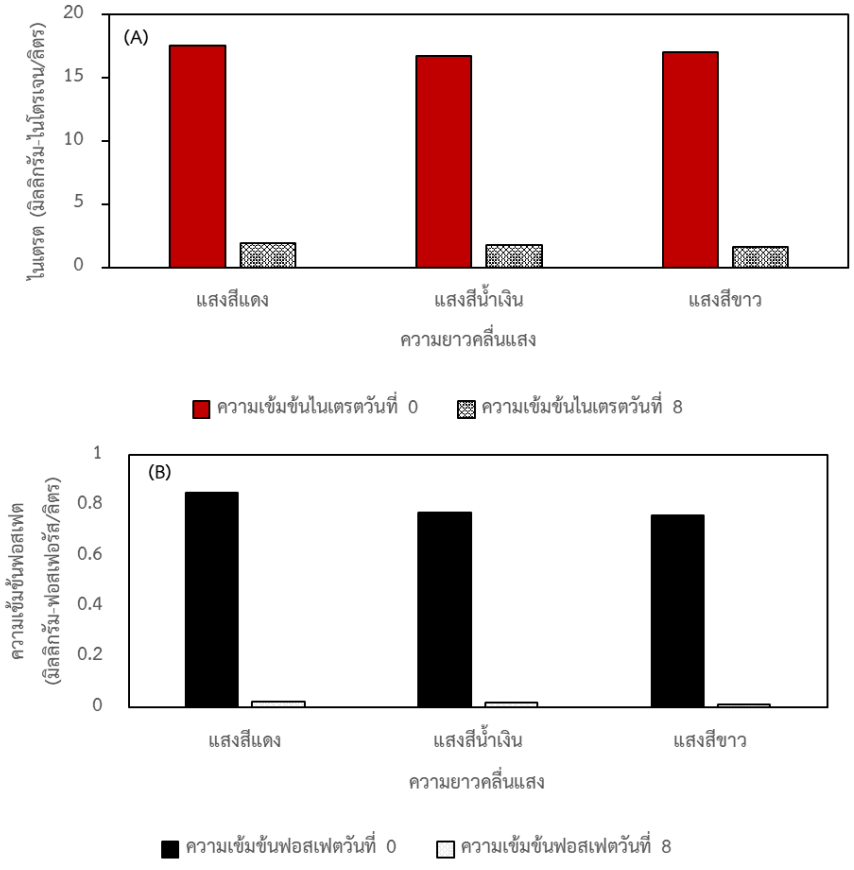
ภาพที่ 4.18 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว



ภาพที่ 4.19 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว



ภาพที่ 4.20 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว



ภาพที่ 4.21 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่แสงสีแดง, แสงสีน้ำเงิน และแสงสีขาว

<u>ตารางที่ 4.5</u> การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะแสงสีขาว

อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร•วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร•วัน)	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)
23.11 ± 1.95	0.12 ± 0.0007	3.45 ± 0.70

4.6 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีน

ในการศึกษานี้เป็นการเพาะเลี้ยง *Dunaliella tertiolecta* เป็นเวลา 8 วัน โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากการศึกษาที่ 4.1 – 4.5 (ใช้อาหาร F/2 ที่มี $Ca(NO_3)_2$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้แสงสีขาวความเข้ม 402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร•วินาที) แล้วแบ่งชุดการทดลองตามการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% และการเพิ่มความเข้มข้นของธาตุอาหารไนโตรเจน ออกเป็น 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ (1) ชุดการทดลอง N150A ที่ให้อากาศปกติ (คาร์บอนไดออกไซด์ 0.3% โดยปริมาตร) และปรับธาตุอาหารไนโตรเจนเป็น 150%, (2) ชุดการทดลอง N150C ที่ให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% และปรับธาตุอาหารไนโตรเจนเป็น 150%, (3) ชุดการทดลอง N500A ที่ให้อากาศปกติ (คาร์บอนไดออกไซด์ 0.3% โดยปริมาตร) และปรับธาตุอาหารไนโตรเจนเป็น 500%, (4) ชุดการทดลอง N500C ที่ให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% และปรับธาตุอาหารไนโตรเจนเป็น 500%, (5) ชุดการทดลอง N1000A ที่ให้อากาศปกติ (คาร์บอนไดออกไซด์ 0.3% โดยปริมาตร) และปรับธาตุอาหารไนโตรเจนเป็น 1,000% และ (6) ชุดการทดลอง N1000C ที่ให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% และปรับธาตุอาหารไนโตรเจนเป็น 1,000% แล้วติดตามผลการเจริญเติบโตรูปความหนาแน่นเซลล์ พบว่าจุลสาหร่ายในทุกชุดการทดลองมีระยะปรับตัว (Lag phase) ประมาณ 1 วัน จากนั้นจะมีระยะการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 โดยมีแนวโน้มเดียวกันทุกชุดการทดลอง หลังจากนั้นการเติบโตของ *D. tertiolecta* ในทุกชุดการทดลองจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ความหนาแน่นเซลล์ของชุดการทดลอง N1000C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 549.91 ± 41.49 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ชุดการทดลองอื่นๆ (N1000A มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 494.11 ± 46.46 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร N500C มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ

438.32 ± 51.12 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร N500A มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 435.18 ± 57.47 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร N150C มีความหนาแน่นเซลล์เทากับ 208.23 ± 80.6 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร และ N150A มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 304.14 ± 13.03 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร) ในส่วนของน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 4.22B) พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ในชุดการทดลอง N1000C ได้รับปริมาณน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 สูงสุดเท่ากับ 1,397.33 ± 84.03 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเทียบเท่าอัตราการผลิตชีวมวล 167.5 ± 9.04 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งของชุดการทดลอง N1000A, N500C, N500A, N150C และ N150A มีค่าเท่ากับ 1,305.33 ± 58.56 มิลลิกรัม/ลิตร, 1,136 ± 32.74 มิลลิกรัม/ลิตร, 1,054.67 ± 20.3 มิลลิกรัม/ลิตร, 212 ± 5.66 มิลลิกรัม/ลิตร และ 432 ± 30.2 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* แบบให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร และการเพาะเลี้ยงแบบให้อากาศปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยสาเหตุคาดว่าเกิดจากการมีคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนเกินจากชุดการทดลองที่ใช้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% (N1000C, N500C และ N150C) แพร่ออกมาจากระบบเพาะเลี้ยงแล้วมาสะสมอยู่ที่อากาศภายในห้องเพาะเลี้ยงซึ่งไม่มีการระบายอากาศสู่ภายนอกห้อง เมื่อทดสอบตรวจวัดค่าความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศบริเวณนั้นพบว่ามีค่าสูงถึง 3,000 พีพีเอ็ม (0.3%) โดยที่ปั๊มจ่ายอากาศของระบบเพาะเลี้ยงสาหร่ายก็จะสูบอากาศเหล่านี้ป้อนเข้าสู่ระบบเพาะเลี้ยงทั้งหมดในการศึกษานี้ ส่งผลให้ชุดการทดลองที่ N1000A, N500A และ N150A ได้รับอากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนเกิน 0.3% แทนอากาศปกติ จึงส่งผลให้ผลการทดลองที่ได้ไม่ถูกเท่าที่ควร

ในส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (ภาพที่ 4.23) จากผลการทดลองพบว่าแนวโน้มคล้ายคลึงกันกับความหนาแน่นเซลล์ โดยในจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่มีการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (ชุดการทดลองที่ N1000C, N500C และ N150C) มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอากาศปกติ (ชุดการทดลองที่ N1000A, N500A และ N150A) เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีส่วนช่วยในการสังเคราะห์ 3-phosphoglycerate (3-PGA) [67] ในจุลสาหร่าย หลังจากนั้นต่อจากนี้ 3-PGA จะถูกนำมาใช้ในการแปลงโมเลกุลของเซลล์ต่างๆ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ isoprenoids หรือแคโรทีนอยด์ [68],[69] ทำให้เมื่อใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แทนอากาศปกติ แคโร

ทีนอยด์รวมจึงเพิ่มขึ้น [70] โดยพบว่าชุดการทดลอง N1000C นั้นให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดเท่ากับ 5.37 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง N1000A, N500C, N500A, N150C และ N150A ซึ่งมี ผลผลิตแคโรทีนอยด์รวมได้เท่ากับ 5.2 มิลลิกรัม/ลิตร, 4.75 มิลลิกรัม/ลิตร, 4.51 มิลลิกรัม/ลิตร, 1.93 มิลลิกรัม/ลิตร และ 2.91 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อศึกษาปริมาณลูทีนที่จุลสาหร่ายแต่ละชุดการทดลองสามารถผลิตได้ พบว่ามีแนวโน้มคล้ายคลึงกับการผลิตแคโรทีนอยด์รวม (ภาพที่ 4.24) ซึ่งชุดการทดลอง N1000C เป็นการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิตลูทีนในวันที่ 8 มากที่สุด (3.25 ± 0.23 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 2.49 ± 0.08 มิลลิกรัม/กรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง N1000A, N500C, N500A, N150C และ N150A ซึ่งสามารถผลิตลูทีนได้ 2.79 ± 0.34, 2.26 ± 0.24, 1.88 ± 0.23, 0.49 ± 0.13 และ 0.91 ± 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณลูทีนสะสมในชีวมวลเท่ากับ 2.01 ± 0.36, 2.14 ± 0.2, 1.66 ± 0.22, 2.34 ± 0.69 และ 2.2 ± 0.1 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ

การตรวจวัดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนเตรตและฟอสเฟต พบว่าสาหร่ายมีการใช้ธาตุอาหารทั้งสองในการเติบโต โดยความเข้มข้นของไนเตรต (ภาพที่ 4.25A) จากผลการทดลองจะสังเกตได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ชุดการทดลอง N150C และ N150A ความเข้มข้นไนโตรเจนจะเริ่มหมดตั้งแต่ประมาณวันที่ 4 จึงเป็นผลทำให้การทดลองศึกษาอิทธิผลของการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้ผลการทดลองที่คลาดเคลื่อนได้ทั้งความหนาแน่นเซลล์ น้ำหนักแห้ง แคโรทีนอยด์รวม และลูทีน จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตไม่ดีเท่าการให้อากาศปกติ จึงทำการทดลองซ้ำที่ชุดการทดลอง N500C, N500A, N1000C และ N1000A ซึ่งจะสังเกตได้ว่าที่ความเข้มข้น 1,000% ไนโตรเจนในวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงยังคงมีปริมาณไนเตรตเพียงพอจึงไม่ส่งผลกระทบต่อผลการทดลอง

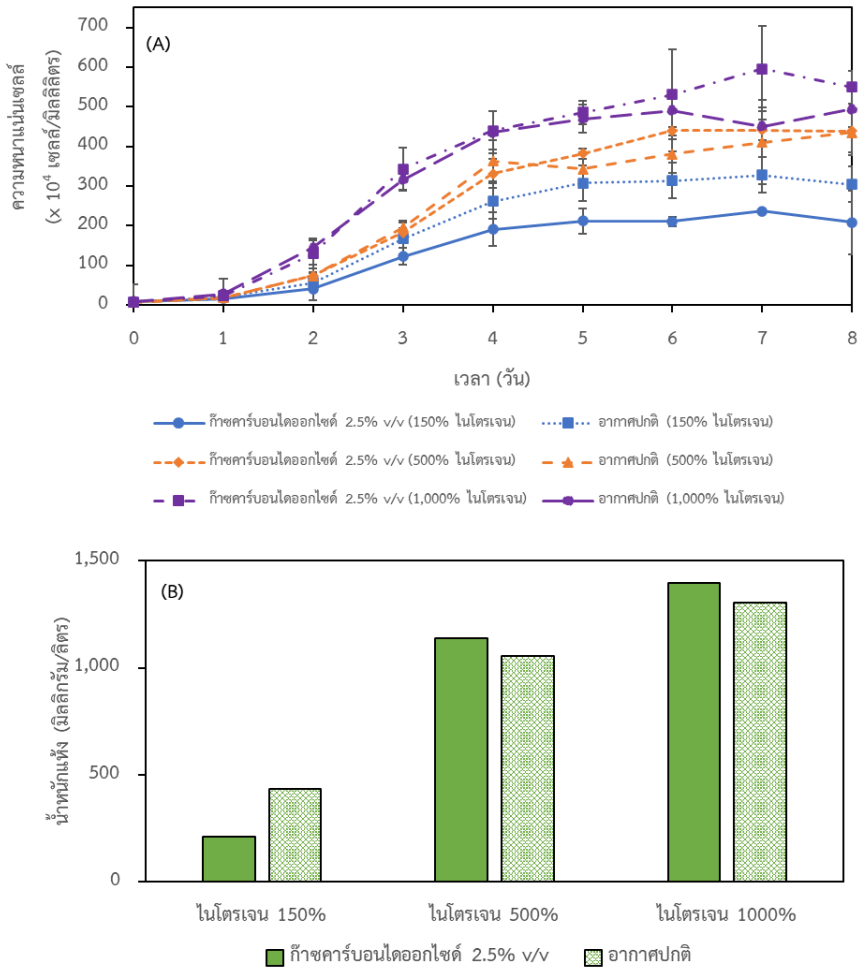
ในส่วนของฟอสเฟต (ภาพที่ 4.25 (B)) ให้ผลการทดลองเป็นแนวโน้มเดียวกับไนเตรต จึงมีการเพิ่มความเข้มข้นฟอสเฟตเป็น 500% และ 1,000% จากสูตร F/2 เดิม เพื่อไม่ให้เป็นข้อจำกัดในการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายและได้ผลการทดลองที่ชัดเจนขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่มีผลกระทบร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์คือปริมาณไนโตรเจนในอาหารที่ส่งผลให้การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อไนโตรเจนไม่เพียงพอจะไม่เกิดประโยชน์ และทำสูญเสียก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อย่างไม่จำเป็นด้วย นอกจากนี้น้ำเสียบางชนิดมีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอ ทำให้มีความเป็นไปได้ในการนำน้ำเสียมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าอากาศ

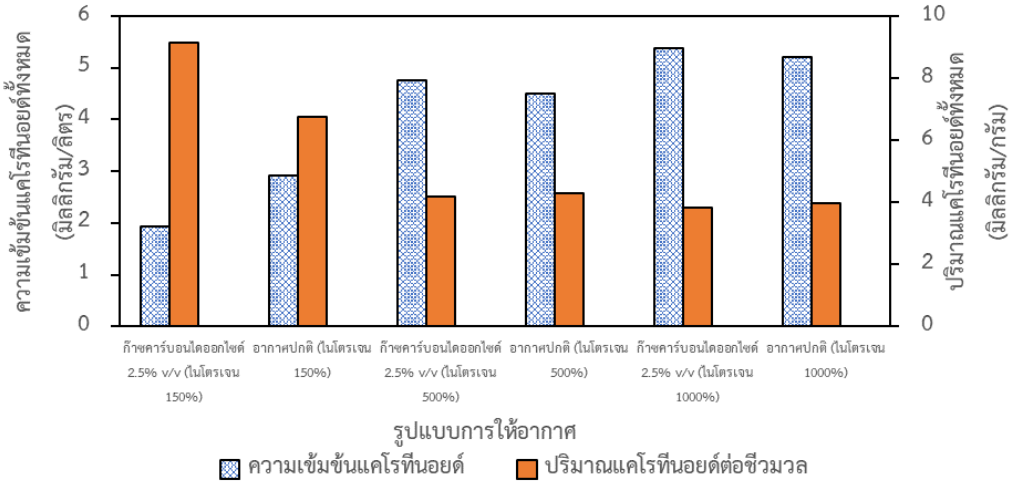
ดังนั้นจากการทดลองทั้งหมดสามารถเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* คือ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน F/2 โดยใช้แหล่งไนโตรเจน $Ca(NO_3)_2$ ที่ปรับความเข้มข้นเป็น 1,000% ไนโตรเจน ให้คาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรภายใต้สภาวะแสงสีขาวที่ความเข้มแสง 402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร·วินาที ตลอด 24 ชั่วโมง โดยให้น้ำหนักแห้งเท่ากับ 1,397.33 ± 84.03 มิลลิกรัม/ลิตร และสามารถผลิตลูทีนได้เท่ากับ 3.25 ± 0.23 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ 2.49 ± 0.08 มิลลิกรัม/กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

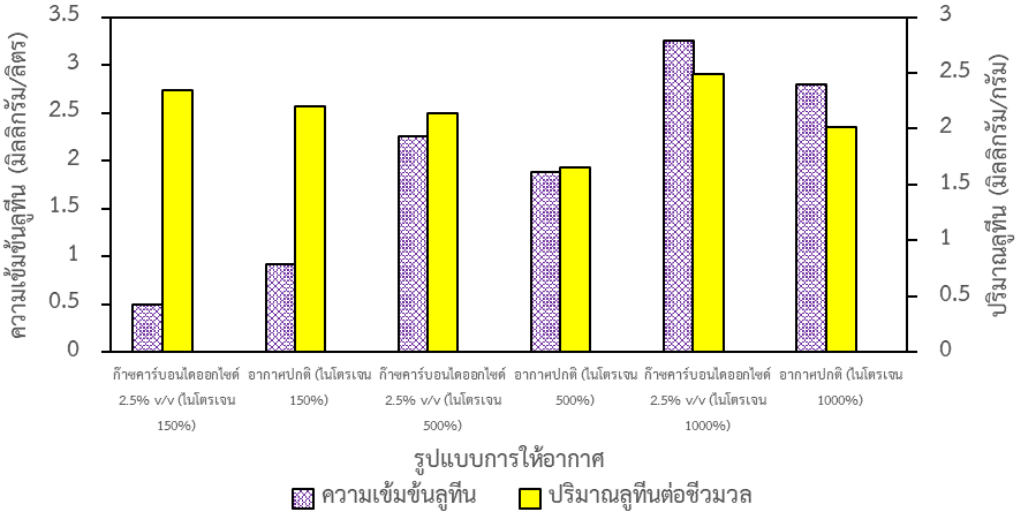


ภาพที่ 4.22 ความหนาแน่นเซลล์ และ (B) น้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน

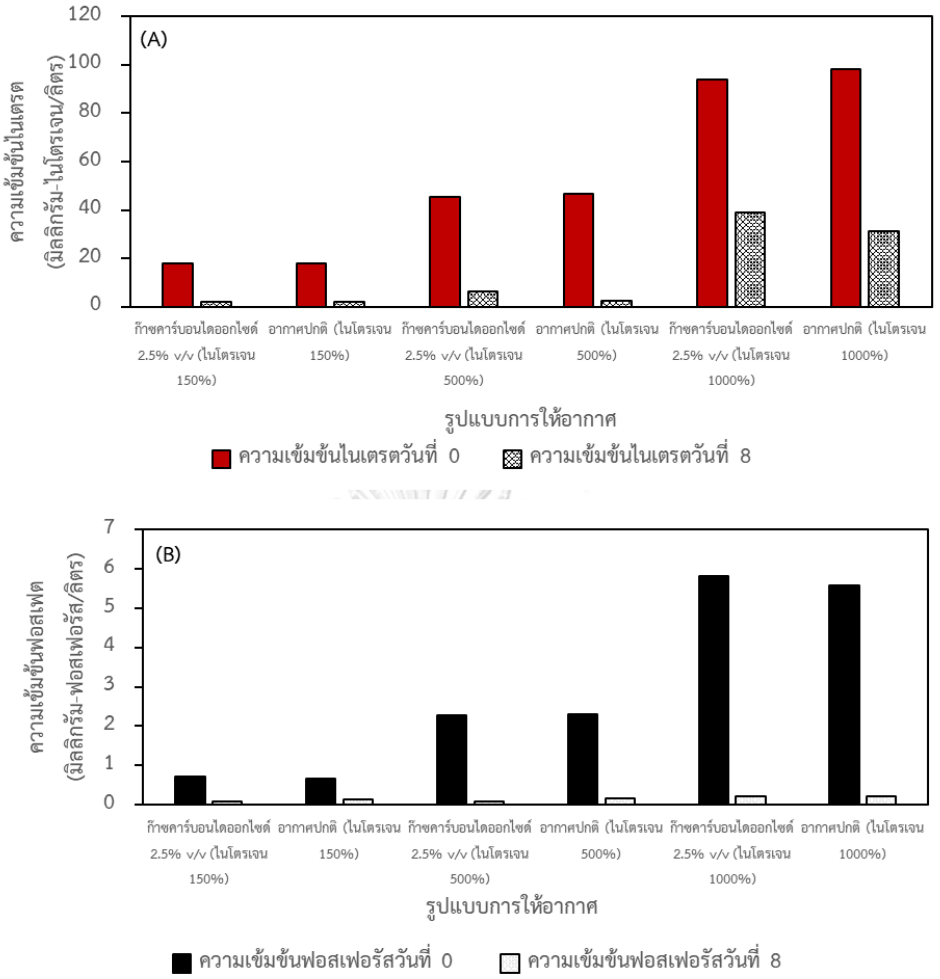
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 4.23 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์รวมและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน



ภาพที่ 4.24 ความเข้มข้นลูทีนและปริมาณลูทีนในวันที่ 8 ของจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน



ภาพที่ 4.25 ความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่ให้อากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรและให้อากาศปกติ ที่ความเข้มข้น 150%, 500% และ 1,000% ไนโตรเจน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>ตารางที่ 4.6</u> การเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตรที่ความเข้มข้น 1,000 ไนโตรเจน

อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)
167.5 ± 9.04	0.41 ± 0.03	2.49 ± 0.08

เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดอกดาวเรือง พบว่าดอกดาวเรืองสามารถผลิตลูทีนได้ประมาณ 0.219 – 0.976 mg/g หรือ 0.02-0.1% โดยน้ำหนัก [6],[71] ซึ่งจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* สามารถผลิตได้ถึง 2.49 mg/g ซึ่งมากกว่าดอกดาวเรืองร้อยละ 60.8-91.3 นอกจากนี้ระยะการเพาะปลูกของดอกดาวเรืองใช้เวลายาวนานกว่า (200 วัน) [71] ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการดูแลค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายที่ใช้เวลาน้อยกว่าก็สามารถได้ชีวมวลเพียงพอสำหรับการผลิตลูทีน นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบอื่นๆ อีก เช่น

1. จุลสาหร่ายเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีราคาถูกและมีประสิทธิภาพที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตสารประกอบที่มีมูลค่า รวมถึงสารเคมี วิตามิน แคโรทีนอยด์ และโพลีแซคคาไรด์

2. อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายมากกว่าพืชปกติ 5-10 เท่า

3. จุลสาหร่ายสามารถเพาะเลี้ยงได้ในน้ำทะเลหรือน้ำกร่อยและในพื้นที่ไม่เหมาะแก่การเพาะปลูก จึงไม่แย่งชิงทรัพยากรกับการเกษตรแบบอื่น

4. ชีวมวลของจุลสาหร่ายสามารถเก็บเกี่ยวได้ตลอดทั้งปี

[42], [72]

4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลจากการตรวจวิเคราะห์ CHNS Analysis พบว่าในจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* มีปริมาณไนโตรเจน 7.43% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อนำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณโปรตีนพบว่ามีปริมาณโปรตีนในจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* 46.44% โดยน้ำหนักแห้ง คิดเป็น 464.38 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับจุลสาหร่าย *Spirulina* (47% โดยน้ำหนักแห้ง) [73] จึงสามารถใช้ทดแทนหรือเป็นทางเลือกใหม่ในการผลิตโปรตีนได้

ตารางที่ 4.7 สรุปผลปัจจัยที่มีต่อการเติบโตและการผลิตลูทีน

การ	สภาวะ	ผลการศึกษา

ทดลอง	ความเค็ม (พีพีที)	ความเข้มข้นและแหล่งไนโตรเจน	ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง	การให้อากาศ	อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร·วัน)	ปริมาณลูทีนในชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร)
1	30	$NaNO_3$ (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	แสงสีขาว 64 ไมโครโฟตอน/ตาราง เมตร·วินาที	อากาศปกติ	29.07 ± 4.73	0.099 ± 0.008	2.42 ± 0.26
2	30	$NaNO_3$ 150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	แสงสีขาว 64 ไมโครโฟตอน/ตาราง เมตร·วินาที	อากาศปกติ	25.42 ± 6.66	0.073 ± 0.01	2.11 ± 0.05
3	30	150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) $Ca(NO_3)_2$	แสงสีขาว 64 ไมโครโฟตอน/ตาราง เมตร·วินาที	อากาศปกติ	26.29 ± 2.02	0.091 ± 0.04	2.91 ± 0.71
4	30	$Ca(NO_3)_2$ (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	แสงสีขาว 402 ไมโครโฟตอน/ตาราง เมตร·วินาที	อากาศปกติ	45.5 ± 9.19	0.15 ± 0.05	3.88 ± 2.47
5	30	$Ca(NO_3)_2$ (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	402 ไมโครโฟตอน/ตาราง เมตร·วินาที สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)	อากาศปกติ	23.11 ± 1.95	0.12 ± 0.0007	3.45 ± 0.70
6	30	$Ca(NO_3)_2$ (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	แสงสีขาว 402 ไมโครโฟตอน/ตาราง เมตร·วินาที	ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1,00%)	167.5 ± 9.04	0.41 ± 0.03	2.49 ± 0.08

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาจุลสาหร่าย *Dunalella tertiolecta* เพื่อพัฒนาการเติบโตและการผลิตลูทีนที่สูงขึ้น โดยอาศัยปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเค็ม ธาตุอาหาร แสง และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการสะสมลูทีนในจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* โดยผลการทดลองสามารถสรุปได้ ดังนี้

1. ความเค็มที่ 30 พีพีทีเป็นความเค็มระดับน้ำทะเล จึงไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมเรื่องการเติมเกลือ โดยที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 150% ของสูตร F/2 ปกติพบว่ามีปริมาณเพียงพอต่อการเติบโตของจุลสาหร่ายทำให้จุลสาหร่ายสามารถเติบโตได้โดยไม่มีการยับยั้งของปริมาณไนเตรต และจากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนพบว่าแหล่งไนโตรเจน $NH_4(SO_4)_2$ และ $Ca(NO_3)_2$ มีอัตราการผลิตชีวมวลและการผลิตลูทีนใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจาก $Ca(NO_3)_2$ มีราคาถูก จึงเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดนี้

2. การใช้ความเข้มแสง 402 µmol/m2/s จะสามารถให้อัตราการผลิตชีวมวลและการผลิตลูทีนสูงที่สุด อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มความเข้มแสงมากกว่านี้อาจจะเกิดปฏิกิริยา ROS ซึ่งเป็นการทำลายเซลล์ได้ นอกจากนี้การใช้แสงสีแดงทำให้การเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายดีกว่าแสงสีอื่นๆ อย่างไรตามเมื่อพิจารณาผลของการผลิตลูทีนพบว่าแสงสีขาวและแสงสีแดงให้ผลไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้แสงสีขาวเนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูกกว่าแสงสีอื่นๆ

3. คาร์บอนไดออกไซด์กระตุ้นให้จุลสาหร่ายใช้ไนโตรเจนมากขึ้น ดังนั้นจึงต้องใช้ปริมาณไนโตรเจนให้เพียงพอที่จะไม่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบของจุลสาหร่าย โดยคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลให้จุลสาหร่ายเติบโตได้มกกว่าอากาศปกติถึง 92%

4. สภาวะเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดในการเจริญเติบโตและการผลิตลูทีนในจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* คือที่ความเค็ม 30 พีพีที โดยใช้แหล่งไนโตรเป็น $Ca(NO_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 1,000% ไนโตรเจนที่แสงสีขาวความเข้มแสง 402 µmol/m^2/s โดยให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โดยปริมาตร ซึ่งให้อัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 167.5 ± 9.04 มิลลิกรัม/ลิตร·วัน ลูทีนในชีวมวลเท่ากับ 3.25 ± 0.23 มิลลิกรัม/กรัม มีโปรตีนเท่ากับ 464.38 มิลลิกรัม/กรัม

5. เมื่อเปรียบเทียบกับดอกดาวเรือง พบว่าจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* ที่สภาวะที่ดีที่สุดสามารถผลิตลูทีนได้ 22.14 มิลลิกรัม/ตารางเมตร·วัน ซึ่งมากกว่าดอกดาวเรืองร้อยละ 65.22

<u>ตารางที่ 5.1</u> สรุปผลปัจจัยที่มีต่อการเติบโตและการผลิตลูทีน

การทดลอง	สภาวะ				ผลการศึกษา		
	ความเค็ม (พีพีที)	**ความเข้มข้นและแหล่งไนโตรเจน**	**ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง**	**การให้อากาศ**	**อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)**	**อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)**	**ปริมาณลูทีนในชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร)**
1	30 70 110 150	$NaNO_3$ (12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	แสงสีขาว 64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	อากาศปกติ	29.07 ± 4.73 23.19 ± 7.56 32.64 ± 2.96 35.83 ± 2.08	0.10 ± 0.008 0.08 ± 0.01 0.08 ± 0.01 0.06 ± 0.001	2.42 ± 0.26 2.39 ± 0.39 1.90 ± 0.39 1.46 ± 0.15
2	30	$NaNO_3$ 25% 50% 75% 100% 125% 150%	แสงสีขาว 64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	อากาศปกติ	10.75 ± 1.32 13.92 ± 2.36 19.25 ± 3.5 19.42 ± 5.35 18.58 ± 1.04 25.42 ± 6.66	0.02 ± 0.007 0.03 ± 0.01 0.05 ± 0.002 0.05 ± 0.01 0.06 ± 0.009 0.07 ± 0.01	1.11 ± 0.48 1.74 ± 0.61 1.74 ± 0.78 1.66 ± 0.26 2.10 ± 0.66 2.11 ± 0.05
3	30	150% (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร) $NaNO_3$ $Ca(NO_3)_2$ Urea $NH_4(SO_4)_2$	แสงสีขาว 64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	อากาศปกติ	23.13 ± 5.53 26.29 ± 2.02 26.33 ± 0.76 28.10 ± 3.36	0.07 ± 0.01 0.09 ± 0.04 0.07 ± 0.01 0.10 ± 0.02	2.14 ± 0.40 2.91 ± 0.71 2.34 ± 0.30 3.0 ± 2.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทดลอง	สภาวะ				ผลการศึกษา		
	ความเค็ม (พีพีที)	ความเข้มข้นและแหล่งไนโตรเจน	ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง	การให้อากาศ	อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)	ปริมาณลูทีนในชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร)
4	30	$Ca(NO_3)_2$ (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	แสงสีขาว 64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที 201 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที 402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	อากาศปกติ	25.67 ± 3.33 22.33 ± 2.75 45.5 ± 9.19	0.13 ± 0.01 0.09 ± 0.007 0.15 ± 0.05	4.00 ± 0.17 3.02 ± 0.22 3.88 ± 2.47
5	30	$Ca(NO_3)_2$ (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที สีแดง (ความยาวคลื่น 660-665 นาโนเมตร) สีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 430-160 นาโนเมตร) สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)	อากาศปกติ	25.39 ± 8.28 25 ± 5.35 23.11 ± 1.95	0.12 ± 0.007 0.09 ± 0.003 0.12 ± 0.0007	3.43 ± 0.91 2.83 ± 0.32 3.45 ± 0.70
6	30	$Ca(NO_3)_2$ (18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)	แสงสีขาว 402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	ก๊าซ CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 150%)	22.08 ± 1.66	0.05 ± 0.03	2.34 ± 0.69
				อากาศปกติ (ไนโตรเจน 150%)	48 ± 3.5	0.11 ± 0.004	2.20 ± 0.098
				ก๊าซ CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 500%)	139.81 ± 3.89	0.28 ± 0.03	2.14 ± 0.20
				อากาศปกติ (ไนโตรเจน 500%)	127.88 ± 3.90	0.23 ± 0.03	1.66 ± 0.23
				ก๊าซ CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1,000%)	167.5 ± 9.04	0.41 ± 0.03	2.49 ± 0.08
				อากาศปกติ (ไนโตรเจน	156.83 ± 6.60	0.35 ± 0.04	2.01 ± 0.36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การทดลอง	สภาวะ				ผลการศึกษา		
	ความเค็ม (พีพีที)	ความเข้มข้นและแหล่งไนโตรเจน	ความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสง	การให้อากาศ	อัตราการผลิตชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)	อัตราการผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)	ปริมาณลูทีนในชีวมวล (มิลลิกรัม/ลิตร)
				1,000%)			

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* พบว่า นอกจากสารประกอบลูทีนและเบต้าแคโรทีนที่จุลสาหร่ายสามารถผลิตได้ยังมี วิโอลาแซนทิน (Violaxanthin) จึงอาจมีการศึกษาแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆที่มีราคาในตลาดสูงควบคู่กับการกระตุ้นให้จุลสาหร่ายผลิตสารที่มีคุณค่าในตลาดขึ้นมาด้วย

2. จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *D. tertiolecta* อาจมีการศึกษาอัตราการไหลที่ส่งผลต่อการเติบโตและผลิตลูทีน อัตราการไหลต่ำหรืออัตราการไหลสูงส่งผลมากกว่ากันเพื่อพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงต่อไป

3. การเก็บตัวอย่างควรดำเนินการโดยทันทีหลังจากทำการลงเพาะเลี้ยง เพื่อป้องกันการคลาดเคลื่อนในการวัดธาตุอาหารและค่า pH ในสภาวะเริ่มต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. การเพาะเลี้ยงโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ควรตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีปริมาณธาตุอาหารเพียงพอรวมถึงควรมีการระบายอากาศที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

1. McWilliams, A., *The Global Market for Carotenoids*, in *BCC Research Report Overview*. 2018.
2. Saha, S.K., H. Ermis, and P. Murray, *Marine microalgae for potential lutein production.* Applied Sciences, 2020. 10(18): p. 6457.
3. Jahns, P. and A.R. Holzwarth, *The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2012. 1817(1): p. 182-193.
4. Zheng, H., et al., *Recent advances in lutein production from microalgae.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2022. 153: p. 111795.
5. Chan, M.-C., et al., *Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N.* Biochemical Engineering Journal, 2013. 78: p. 24-31.
6. Lin, J.-H., D.-J. Lee, and J.-S. Chang, *Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae.* Bioresource Technology, 2015. 184: p. 421-428.
7. Powtongsook, S., *STRAIN SELECTION AND CULTURE OF Dunaliella salina (CHLOROPHYCEAE) FOR BETA-CAROTENE PRODUCTION*. 1993, Chulalongkorn University.
8. Xie, S.-R., et al., *Creatinine combined with light increases the contents of lutein and β-carotene, the main carotenoids of Dunaliella bardawil.* Enzyme and Microbial Technology, 2021. 151: p. 109913.
9. Oren, A., *The ecology of Dunaliella in high-salt environments.* J Biol Res (Thessalon), 2014. 21(1): p. 23.
10. Riisgård, H.U., K. Nielsen, and B. Søgaard-Jensen, *Further studies on volume regulation and effects of copper in relation to pH and EDTA in the naked marine flagellate Dunaliella marina.* Marine Biology, 1980. 56: p. 267-276.
11. Hörtensteiner, S. and D.W. Lee, *Chlorophyll catabolism and leaf coloration.* Annual Plant Reviews: Senescence Processes in Plants, 2007(26): p. 12-31.
12. Lee, J., et al., *Metabolic alterations of lutein, β-carotene and chlorophyll a*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

during germination of two soybean sprout varieties. Food Chemistry, 2013. 141(3): p. 3177-3182.

13. Polívka, T. and H.A. Frank, *Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids.* Acc Chem Res, 2010. 43(8): p. 1125-34.
14. Westphal, A., V. Böhm, and Jena, *Carotenoids. Properties, distribution, bioavailability, metabolism and health effects.* Ernahrungs Umschau 2015. 32(11): p. 196-207.
15. Ruban, A.V., et al., *Carotenoid-Dependent Oligomerization of the Major Chlorophyll a/b Light Harvesting Complex of Photosystem II of Plants.* Biochemistry, 1997. 36(25): p. 7855-7859.
16. García-Plazaola, J.I., S. Matsubara, and C.B. Osmond, *The lutein epoxide cycle in higher plants: its relationships to other xanthophyll cycles and possible functions.* Functional Plant Biology, 2007. 34(9): p. 759-773.
17. Takaichi, S., *Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions.* Mar Drugs, 2011. 9(6): p. 1101-1118.
18. Barredo, J.-L., *Microbial carotenoids from bacteria and microalgae.* Methods and Protocols; Humana Press: New York, NY, USA, 2012: p. 5.
19. Gwak, Y., et al., *Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in Haematococcus pluvialis.* Journal of Experimental Botany, 2014. 65(15): p. 4317-4334.
20. Tredici, M.R. and G.C. Zittelli, *Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors.* Biotechnol Bioeng, 1998. 57(2): p. 187-97.
21. Acién Fernández, F.G., et al., *Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance.* Chemical Engineering Science, 2001. 56(8): p. 2721-2732.
22. Tredici, M.R., et al., *Energy balance of algal biomass production in a 1-ha "Green Wall Panel" plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio.* Applied Energy, 2015. 154: p. 1103-1111.
23. Rai, M.P. and S. Gupta, *Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Scenedesmus abundans. Energy Conversion and Management, 2017. 141: p. 85-92.

24. Chisti, Y., *Biodiesel from microalgae.* Biotechnology Advances, 2007. 25(3): p. 294-306.
25. Takache, H., J. Pruvost, and H. Marec, *Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of Chlamydomonas reinhardtii in conditions representative of photobioreactor cultivation.* Algal Research, 2015. 8: p. 192-204.
26. Schulze, P.S.C., *Effects of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on microalgal production*. 2014.
27. Deb, U.K., et al., *The effect of irradiance related temperature on microalgae growth in a tubular photo bioreactor for cleaner energy.* American Journal of Computational Mathematics, 2017. 7(3): p. 371-384.
28. Bernard, O. and B. Rémond, *Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth.* Bioresource Technology, 2012. 123: p. 520-527.
29. Acién, F.G., et al., 1 - *Photobioreactors for the production of microalgae*, in *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, C. Gonzalez-Fernandez and R. Muñoz, Editors. 2017, Woodhead Publishing. p. 1-44.
30. Richmond, A., *Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview.* Asian pacific phycology in the 21st Century: Prospects and challenges, 2004: p. 33-37.
31. Becker, E.W., *Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects*, in *Handbook of Microalgal Culture*. 2013. p. 671-691.
32. Yang, J., et al., *Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance.* Bioresource Technology, 2011. 102(1): p. 159-165.
33. Sacristán de Alva, M., et al., *Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes.* Algal Research, 2018. 34: p. 97-103.
34. Markou, G., D. Vandamme, and K. Muylaert, *Microalgal and cyanobacterial cultivation*: *The supply of nutrients.* Water Research, 2014. 65: p. 186-202.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

35. Matouke, M.M., D.T. Elewa, and K. Abdullahi, *Binary effect of titanium dioxide nanoparticles (nTio2) and phosphorus on microalgae (Chlorella 'Ellipsoides Gerneck,* 1907). Aquatic Toxicology, 2018. 198: p. 40-48.

36. Powell, N., et al., *Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics.* Water Research, 2009. 43(17): p. 4207-4213.

37. Park, J.B.K., R.J. Craggs, and A.N. Shilton, *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production.* Bioresource Technology, 2011. 102(1): p. 35-42.

38. Cho, S., et al., *Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production.* Bioresource Technology, 2011. 102(18): p. 8639-8645.

39. Venkata Mohan, S. and M.P. Devi, *Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae.* Bioresource Technology, 2014. 165: p. 288-294.

40. Carvalho, A.P., et al., *Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects.* Appl Microbiol Biotechnol, 2011. 89(5): p. 1275-88.

41. Tukaj, Z., et al., *Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga Scenedesmus armatus.* Plant Physiology and Biochemistry, 2003. 41(4): p. 337-344.

42. Fernández-Sevilla, J.M., F.G. Acién Fernández, and E. Molina Grima, *Biotechnological production of lutein and its applications.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. 86(1): p. 27-40.

43. 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.

44. Vaquero, I., et al., *Light-mediated lutein enrichment of an acid environment microalga.* Algal Research, 2014. 6: p. 70-77.

45. 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.* Bioresource Technology, 2013. 144: p. 435-444.

46. Shi, T.-Q., et al., *Stresses as First-Line Tools for Enhancing Lipid and Carotenoid*

Production in Microalgae. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020. 8.

47. Henríquez, V., et al., *Carotenoids in microalgae.* Carotenoids in Nature, 2016: p. 219-237.
48. Yeh, T.-J., et al., *Transcriptome and physiological analysis of a lutein-producing alga Desmodesmus sp. reveals the molecular mechanisms for high lutein productivity.* Algal Research, 2017. 21: p. 103-119.
49. García-González, M., et al., *Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis-??-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor.* Journal of biotechnology, 2005. 115: p. 81-90.
50. Fu, W., et al., *Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga Dunaliella salina with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution.* Appl Microbiol Biotechnol, 2013. 97(6): p. 2395-403.
51. Abubakar, A.L., *Effect of Salinity on the Growth Parameters of Halotolerant Microalgae, Dunaliella spp.* Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences, 2016. 24(2): p. 85-91.
52. Elloumi, W., et al., *Effect of Mild Salinity Stress on the Growth, Fatty Acid and Carotenoid Compositions, and Biological Activities of the Thermal Freshwater Microalgae Scenedesmus sp.* Biomolecules, 2020. 10(11): p. 1515.
53. Chagas, A.L., et al., *Production of carotenoids and lipids by Dunaliella tertiolecta using CO2 from beer fermentation.* Process Biochemistry, 2015. 50(6): p. 981-988.
54. Ren, Y., et al., *Carotenoid Production from Microalgae: Biosynthesis, Salinity Responses and Novel Biotechnologies.* Marine Drugs, 2021. 19(12): p. 713.
55. Borowitzka, M.A., L.J. Borowitzka, and D. Kessly, *Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga Dunaliella salina.* Journal of Applied Phycology, 1990. 2(2): p. 111-119.
56. Marín, N., et al., *Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of Dunaliella salina cultivated under low illumination and preadapted to different salinities.* Journal of Applied Phycology, 1998. 10(4): p. 405-411.
57. Ho, S.-H., et al., *Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

strategies on lutein production with Scenedesmus obliquus FSP-3. Bioresource Technology, 2015. 184: p. 131-138.

58. Leong, Y.K. and J.-S. Chang, *Lutein biosynthesis from microalgae — Recent advances and circular economy.* Environmental Technology & Innovation, 2023. 30: p. 103097.

59. Chen, W.-C., et al., *Enhancing production of lutein by a mixotrophic cultivation system using microalga Scenedesmus obliquus CWL*-1. Bioresource Technology, 2019. 291: p. 121891.

60. Källqvist, T. and A. Svenson, *Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, Nephroselmis pyriformis, Chlorophyta.* Water Research, 2003. 37(3): p. 477-484.

61. Tang, C.C., et al., *Calcium ions-effect on performance, growth and extracellular nature of microalgal-bacterial symbiosis system treating wastewater.* Environ Res, 2022. 207: p. 112228.

62. Maltsev, Y., et al., *Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition.* Biology, 2021. 10(10): p. 1060.

63. Cordero, B.F., et al., *Enhancement of lutein production in Chlorella sorokiniana (Chorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis.* Mar Drugs, 2011. 9(9): p. 1607-1624.

64. Sui, Y. and P.J. Harvey, *Effect of light intensity and wavelength on biomass growth and protein and amino acid composition of Dunaliella salina.* Foods, 2021. 10(5): p. 1018.

65. Zhang, X., *Microalgae removal of CO 2 from flue gas*. 2015.

66. Zhao, X., et al., *Strategies related to light quality and temperature to improve lutein production of marine microalga Chlamydomonas sp.* Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019. 42(3): p. 435-443.

67. Zhao, B. and Y. Su, *Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014. 31: p. 121-132.

68. Becker, E.W., *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Vol. 10. 1994:

Cambridge University Press.

69. Polle, J.E.W., et al., *Carbon Partitioning in Green Algae (Chlorophyta) and the Enolase Enzyme.* Metabolites, 2014. 4(3): p. 612-628.

70. Dineshkumar, R. and R. Sen, *A sustainable perspective of microalgal biorefinery for co-production and recovery of high - value carotenoid and biofuel with CO2 valorization.* Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2020. 14(4): p. 879-897.

71. Caffarri, S., et al., *The Major Antenna Complex of Photosystem II Has a Xanthophyll Binding Site Not Involved in Light Harvesting*.* Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(38): p. 35924-35933.

72. Yen, H.-W., et al., *Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products.* Bioresource Technology, 2013. 135: p. 166-174.

73. Ramirez Rodrigues, M., et al., *Spirulina platensis Protein as Sustainable Ingredient for Nutritional Food Products Development.* Sustainability, 2021. 13: p. 6849.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก.

การนับเซลล์และคำนวณความหนาแน่นเซลล์

(Fox, 1983)

ดำเนินการนับเซลล์จุลสาหร่าย Dunaliella tertiolecta ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X โดยสไลด์นับเม็ดเลือด 1 อัน มีช่องใส่ตัวอย่างซึ่งมีลักษณะเป็นตารางสี่เหลี่ยม 2 ตารางอยู่กลางสไลด์ โดยแต่ละตารางมีพื้นที่เท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร และมีความลึกเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร ดังภาพที่ ก-1 ซึ่งการนับเซลล์จะทำการใส่ตัวอย่างลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนับเซลล์บนตารางสี่เหลี่ยมและนำมาคำควความหนาแน่เซลล์โดยใช้สูตร ดังนี้

ปริมาตรของสไลด์นับเม็ดเลือด = ความกว้าง x ความยาว x ความลึก

= 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร

= 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 0.0001 มิลลิเมตร

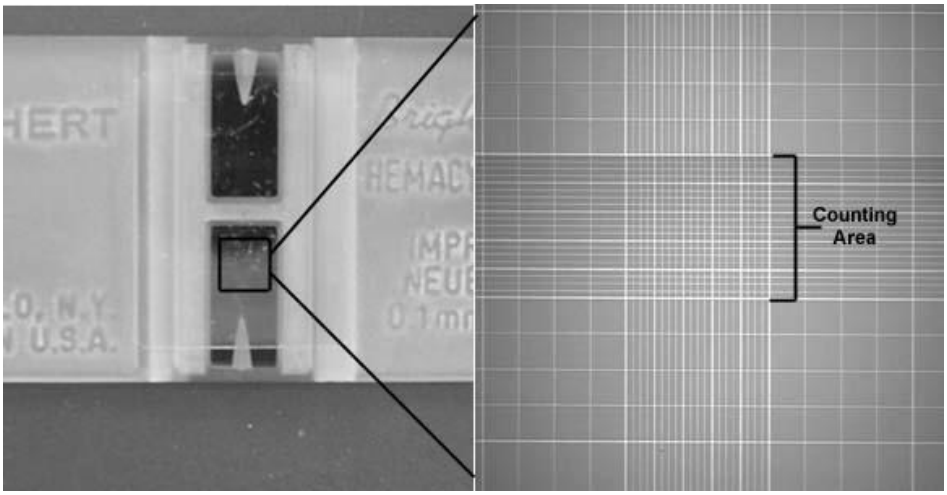
= 1×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร

สูตรควาหนาแน่นเซลล์ = $\frac{n}{x} \times \frac{10{,}000}{1}$ = จำนวนเซลล์ใน 1 มิลลิลิตร

เมื่อ n = จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้

X = ตัวหารซึ่งใช้ค่าร้อยละของพื้นที่ของและช่องที่นับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ ก-1 สไลด์นับเม็ดเลือดและพื้นที่ตารางสำหรับนับเซลล์ (Melissa Rouge, 2002)

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

(APHA, 1992)

<u>อุปกรณ์และสารเคมี</u>

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. กระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร
3. ตู้อบ
4. Vacuum dessicator

<u>วิธีการวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง</u>

1. กระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 103 – 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ และนำไปเก็บไว้ที่ Vacuum dessicator
2. เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 5 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างน้ำกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบแห้งจากข้อ 1
4. ล้างเซลล์บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น
5. นำกระดาษกรองมาอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่
6. น้ำหนักเซลล์แห้งคือผลต่างของน้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์กับน้ำหนักกระดาษกรองเริ่มต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์และคลอโรทีนอยด์

(Strickland and Parsons et al., 1972)

<u>อุปกรณ์และสารเคมี</u>

1. UV-Vis Spectrophotometer
2. เครื่อง Centrifuge
3. เครื่อง Vortex
4. ชุดเครื่องแก้วทดลอง
5. แท่งแก้วบดสาร
6. สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 99% โดยปริมาตร

<u>วิธีการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์</u>

1. เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 1.5 มิลลิลิตร
2. นำตัวอย่างน้ำประมาณ 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลวใส
3. บดเซลล์ให้แตกด้วยแท่งแก้ว
4. เติมสารละลายเมทานอลเข้มข้น 99% โดยปริมาตร ในปริมาณเท่ากับตัวอย่างน้ำเริ่มต้น
5. นำไป vortex ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
6. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที (สังเกตเห็นเซลล์สีขาวตกตะกอน)
7. นำตัวอย่างของเหลวที่สกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV–VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 480 630 645 และ 665 นาโนเมตร

<u>ช่วงความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง</u>

1. คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) ช่วงความยาวคลื่น 630 645 และ 665 นาโนเมตร
2. แคโรทีนอยด์ (Total carotenoids) ช่วงความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

วิธีการคำนวณ

Total carotenoids (µg/mL) = $(4*E_{480}) * (V_a/V_b)$

Chlorophyll A (µg/mL) = $(11.6*E_{665}-1.31*E_{645}-0.14*E_{630}) * (V_a/V_b)$

สำหรับ cuvette ความกว้าง 1 เซนติเมตร

เมื่อ V_a คือปริมาตรสารละลาย (mL)

V_b คือปริมาตรของเหลวตัวอย่าง (mL)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์ HPLC

(Chaoruangrit, L et al., 2017)

<u>อุปกรณ์และสารเคมี</u>

1. เครื่อง HPLC (Shimadzu Model Photodiode array detector SPD-M20A)
2. เครื่อง Centrifuge
3. เครื่อง Vortex
4. กระดาษกรอง Nylon membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
5. ชุดเครื่องแก้วทดลอง
6. แท่งแก้วบดสาร
7. สารละลายเมทานอล HPLC Grade ความเข้มข้น 99% โดยปริมาตร
8. ขวดบรรจุสารสำหรับ HPLC (Shimadzu)

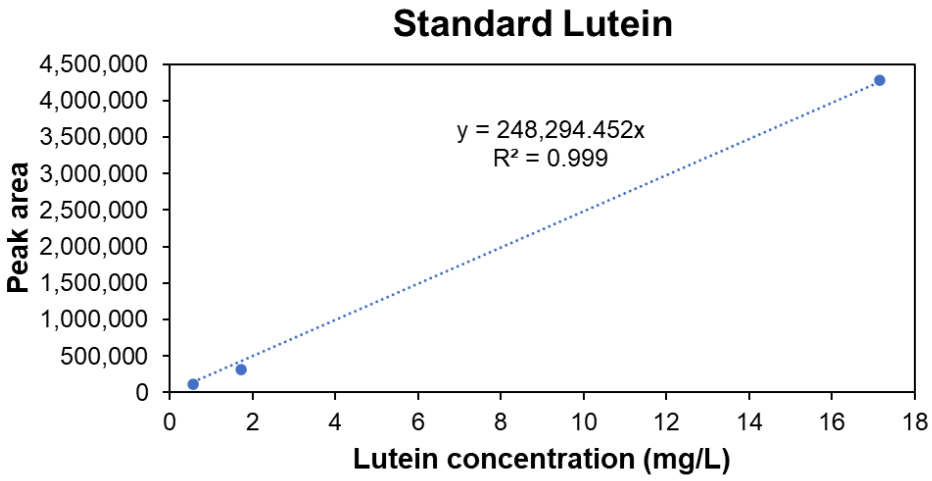
<u>วิธีการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์</u>

1. นำตัวอย่างน้ำประมาณ 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลวใส
2. บดเซลล์ให้แตกด้วยแท่งแก้ว
3. เติมสารละลายเมทานอลเข้มข้น 99% โดยปริมาตร ในปริมาณเท่ากับตัวอย่างน้ำเริ่มต้น
4. นำไป vortex ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที (สังเกตเห็นเซลล์สีขาวตกตะกอน)
6. นำตัวอย่างของเหลวที่สกัดมากรองด้วยตัวกรอง Nylon membrane บรรจุใส่ขวดตัวอย่างเฉพาะของเครื่อง HPLC และนำเข้าเครื่อง พร้อมทำการวิเคราะห์ที่ base line 452 นาโนเมตร

<u>วิธีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC</u>

1. นำตัวอย่างที่สกัดมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วย C-18 คอลัมน์และ Photo Diode Array Detector รุ่น SPD-M20A
2. เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างน้ำกลั่น เมทานอล อะซิโตไนไตรล์ และไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 1:10:79:10 ตามลำดับ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที

3. ทำการฉีดตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร โดยใช้เวลาในการวิเคราห์ทั้งหมด 30 นาที
4. ทำการจำแนกชนิดสารกลุ่มแคโรทีนอยด์อาศัยการเปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC กับข้อมูลสเปกตรัมที่ใช้สำหรับจำแนกชนิดของรงวัตถุจากหนังสือ Phytoplankton pigments in oceanography : Guidelines to modern methods (R.F.C. Mantoura and S.W. Wright, 1997)
5. คำนวณความเข้มข้นของลูทีนจากกราฟสอบเทียบจากมาตรฐาน (ภาพที่ ง.1)



ภาพที่ ง.1 กราฟสอบเทียบของสารมาตรฐานลูทีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก จ.

การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตและฟอสเฟต

(APHA, 1992) และ (Strickland and Parsons et al., 1972)

<u>อุปกรณ์และสารเคมี</u>

1. UV-Vis Spectrophotometer
2. กระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร
3. ชุดเครื่องแก้วทดลอง
4. Ammonium molybdate: $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$
5. Sulfuric Acid: H_2SO_4
6. Ascorbic Acid
7. Potassium antimony tartrate: $K(SbO)C_4H_4O_6.0.5H_2O$

<u>วิธีการเตรียมสารละลายรีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัส</u>

1. Ammonium molybdate: $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$
    - ละลาย Ammonium molybdate 15 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดทึบแสง)
2. Sulfuric Acid: H_2SO_4
    - เติม Sulfuric Acid ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดแก้วและเก็บไว้ในที่เย็น)
3. Ascorbic Acid
    - ละลาย Ascorbic Acid (AR grade) 27 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกและเก็บไว้ในที่เย็น)
4. Potassium antimony tartrate: $K(SbO)C_4H_4O_6.0.5H_2O$
    - ละลาย Potassium antimony tartrate 0.34 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกหรือขวดแก้ว)
5. Mixed Reagent

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- นำ Ammonium molybdate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ Sulfuric Acid ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Ascorbic Acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ Potassium antimony tartrate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

<u>หมายเหตุ</u>: Mixed Reagent ไม่ควรเก็บไว้เกิน 6 ชั่วโมงและควรเตรียมสำหรับการวิเคราะห์ใหม่ทุกครั้ง ปริมาตรดังกล่าวใช้ได้กับตัวอย่างน้ำจำนวน 50 ตัวอย่าง

<u>การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standards) ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต</u>

1. เตรียมสารละลายไนเตรทจากสารละลาย (KNO_3)NO_3 ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 มิลลิกรัม/ลิตร
2. เตรียมสารละลายฟอสเฟตจากสารละลาย PO_4 ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร
3. เติมรีเอเจนต์ในสารละลายฟอสเฟตในอัตราส่วนรีเอเจนต์ต่อสารตัวอย่าง 1:10 ทิ้งไว้ 10 นาที ไม่เกิน 2 ชั่วโมง ขณะที่สารละลายไนเตรทไม่มีการเติมรีเอเจนต์
4. นำสารทั้งสองชนิดวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยไนเตรทวัดในช่วง 220 และ 275 นาโนเมตร และฟอสเฟตในช่วงความคลื่น 885 นาโนเมตร
5. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นไนเตรทและฟอสเฟต

<u>ขั้นตอนการวิเคราะห์ไนเตรท</u>

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. กรองของเหลวตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร
2. Dilute สารละลายตัวอย่าง 3 เท่า
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโมเมตร
4. คำนวณผลที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

<u>ขั้นตอนการวิเคราะห์ฟอสเฟต</u>

1. กรองของเหลวตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร
2. เติมรีเอเจนต์ลงในตัวอย่างด้วยอัตราส่วนของรีเอเจนต์ต่อปริมาณของเหลวตัวอย่าง 1:10
3. ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex
4. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที และไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร
6. คำนวณผลที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ.

การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

(Bower and Holm-Hansen, 1980)

การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำดัดแปลงมาจากวิธีของ Bower และ Holm-Hansen (1980) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์ดังนี้

<u>การเตรียมสารเคมี</u>

1. สารละลายซาลิไซเลตคะตะลิสต์ (Salicylate-catalyst solution) สามารถเตรียมได้โดยการละลายโซเดียมซาลิไซเลต (Sodium salicylate; $C_6H_4(OH)COONa$) ปริมาณ 440 กรัม และโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ (Sodium nitroprusside dehydrate; $Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$) ปริมาณ 0.28 กรัม ลงในน้ำปราศจากไอออน (De-ionized water) และปรับปริมาตสารละลายซาลิไซเลตคะตะลิสต์ให้ มีปริมาตรเท่ากับ 1 ล. โดยการเก็บสารละลายควรเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส และควรเตรียมสารละลายใหม่ทุก 3 เดือน

2. สารละลายอัลคาไลน์ซิเทรต (Alkaline-citrate solution) สามารถเตรียมได้โดยการละลายโซเดียมไทดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) ปริมาณ 18.5 กรัม และโซเดียมซิเตรต (Sodium citratedehydrate; $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) ปริมาณ 100 กรัม ลงในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรสารละลายอัลคาไลน์ซิเทรตให้มีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร โดยการเก็บสารละลายควรเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส

3. สารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochlorite solution) สามารถใช้สารละลายไฮโปรคลอไรด์ทางการค้าความเข้มข้น 1.5 นอร์มอล

4. สารละลายอัลคาไลน์ไฮโปรคลอไรด์ (Alkaline-hypochlorite solution) สามารถเตรียมได้ โดยการผสมสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรด์และสารละลายอัลคาไลน์ซิเทรตในอัตราส่วน 1:9 ซึ่งเมื่อผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันควรใช้สารละลายอัลคาไลน์ไฮโปรคลอไรด์ในกระบวนการวิเคราะห์ภายในเวลา 1 ชั่วโมง

<u>ขั้นตอนการวิเคราะห์</u>

สำหรับการเก็บน้ำตัวอย่างควรเก็บใส่ขวดพลาสติกปริมาตร 30 มล. ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C จากนั้นควรทำการวิเคราะห์ทันที หากไม่สามารถทำได้ควรเก็บน้ำตัวอย่างแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

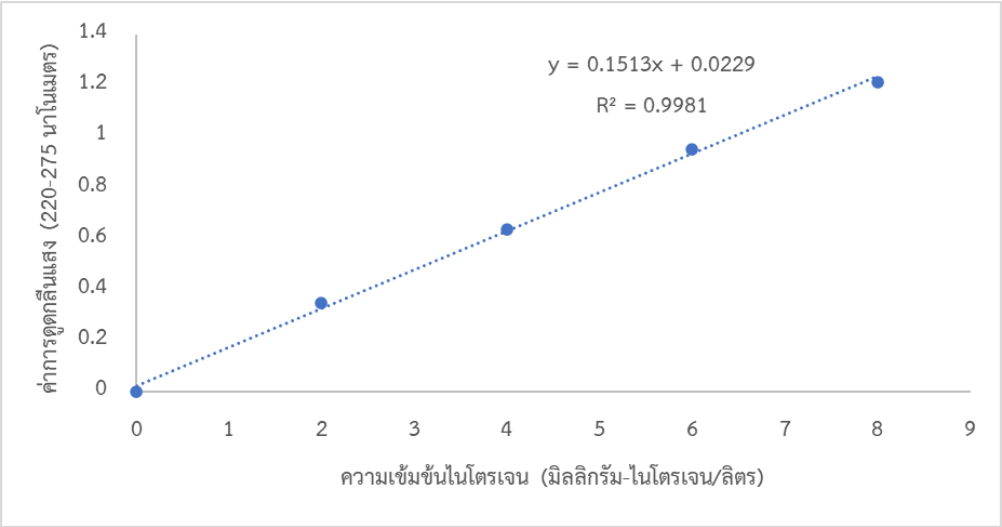
กระบวนการวิเคราะห์เริ่มต้นจากการปิเปตนำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายซาลิไซเลตคะตะลิสต์ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไลน์ไฮโปรคลอไรด์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ทั้งนี้สามารถปรับเพิ่มลดปริมาตรน้ำตัวอย่างและสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ได้โดยคงอัตราส่วนให้มีค่าเท่าเดิม) เขย่าสารให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 ซม. แต่ไม่ควรเกิน 3 ซม. สำหรับการวิเคราะห์แบลงค์ (Blank) สามารถทำได้โดยใช้น้ำปราศจากไอออน ที่มีการเติมสารละลายเช่นเดียวกับน้ำตัวอย่างและใช้กระบวนการวิเคราะห์เช่นเดิม จากนั้นน้ำตัวอย่างไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 640 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน (Standard ammonia solution) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมแอมโมเนีย-ไนโตรเจน/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเตรียมจากสารละลายสต็อกแอมโมเนีย (Stock ammonia solution) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมแอมโมเนีย-ไนโตรเจน/ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

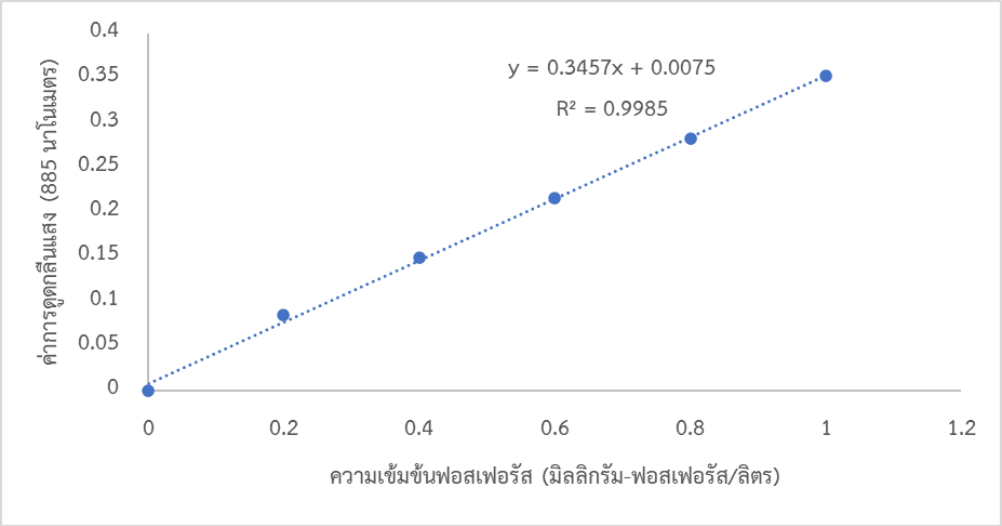
ภาคผนวก ช.

การติดตามผลการทดลอง

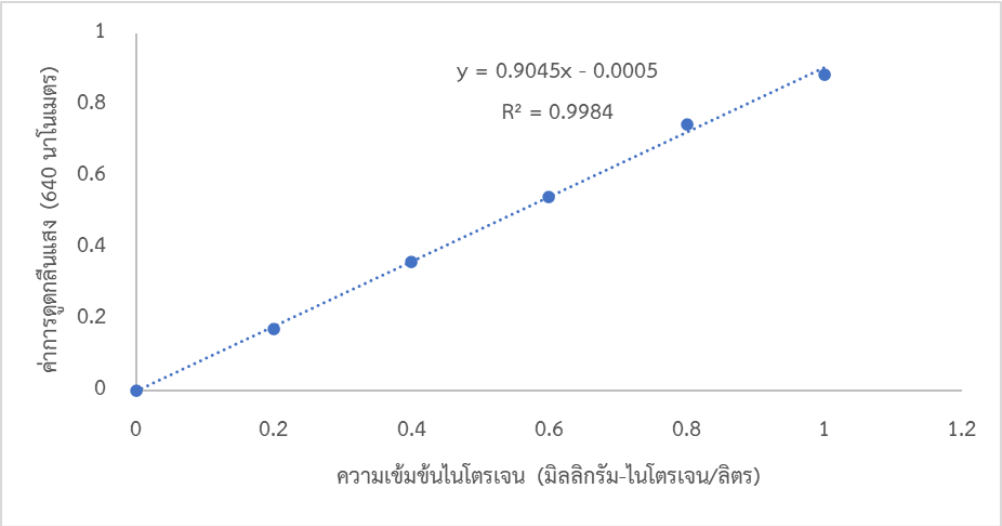
1. ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน



ภาพที่ ช-1 กราฟมาตรฐานสารละลายไนเตรต



ภาพที่ ช-2 กราฟมาตรฐานสารละลายฟอสเฟต



ภาพที่ ช-3 กราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ซ.

ผลการเติบโตของจุลสาหร่ายโดยความหนาแน่นเซลล์

ตารางที่ ซ-1 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเค็มต่างกัน

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)			
	30 พีพีที	70 พีพีที	110 พีพีที	150 พีพีที
0	9.53 ± 0.55	9.02 ± 0.89	14.53 ± 4.37	13.08 ± 2.17
1	17.19 ± 0.92	14.32 ± 4.33	14.55 ± 3.74	13.97 ± 2.86
2	56.23 ± 26.5	37 ± 11.96	35.53 ± 8.51	28.42 ± 4.05
3	111.87 ± 50.57	66.15 ± 26.66	53.05 ± 12.96	45.38 ± 9.31
4	156.39 ± 87.21	66.38 ± 20	74.5 ± 19.94	60.94 ± 5.92
5	144.77 ± 50.52	97.28 ± 30.58	102.31 ± 17.25	87.55 ± 25
6	155.24 ± 62.05	105.35 ± 46.92	118.28 ± 21.11	124.12 ± 19.54
7	181.11 ± 26.82	103.97 ± 25.54	97.22 ± 16.01	130.3 ± 22.15
8	207.89 ± 67.05	111.76 ± 18.78	184.71 ± 39.05	182.71 ± 50.97

ตารางที่ ซ-2 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
0	5.09±2.95	8.19±2.75	4.25±3.87	7.71±1.66	5.72±0.41	5.87±1.04
1	11.53±9.27	12.63±12.05	9.95±8.35	19.78±3.62	19.86±3.37	20.05±3.6
2	25.69±14.25	33.71±12.18	29.56±13.95	34.39±9.6	31.61±3.9	35.25±5.07
3	37.11±8.57	48.35±19.27	53.22±20.29	62.2± 16.39	56.9±14.61	60.6±10.93
4	40.51±8	56.14±22.44	87.61±45.51	81.03±29.4	83.83±13.88	81.94±26.76
5	42.42±7.94	77.36±32.56	86.06±18.39	92.36±26.04	97.05±32.99	89.67±11.83
6	47.04±9.48	75.3±10.94	95.5±26.58	100.88±35.66	111.18±19.85	115.76±23.67
7	47.55±20.77	73.13±27.91	93.96±25.79	85.86±46.66	86.09±20.09	92.33±31.9

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
8	42.46±18.08	64.78±21.14	77.65±33.27	125.55±47.73	125.55±8.74	128.18±16.69

ตารางที่ ซ-3 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)			
	$NaNO_3$	$Ca(NO_3)_2$	Urea	$(NH_4)_2SO_4$
0	6.11 ± 1.77	5.43 ± 0.24	7.53 ± 2.3	5.49 ± 2.5
1	24.61 ± 5.34	18.83 ± 5.18	21.74 ± 0	19.57 ± 0
2	47.04 ± 14.97	54.5 ± 3.99	53.35 ± 8.18	41.19 ± 8.21
3	78.11 ± 17.33	84.33 ± 9.37	81.54 ± 18.28	68.15 ± 13.5
4	111.5 ± 19	129.35 ± 11.94	131.75 ± 4.56	107.16 ± 15.94
5	133.51 ± 12.72	161.54 ± 29	175.36 ± 17.99	121.97 ± 17.68
6	166.39 ± 15.98	178.23 ± 23.8	190.81 ± 14.97	148.02 ± 17.53
7	188.7 ± 24.62	199.18 ± 41.39	191.49 ± 44.82	158.32 ± 3.89
8	167.29 ± 13.75	220.85 ± 77.41	206.34 ± 51.34	157.63 ± 15.91

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ-4 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มแสงต่างกัน

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)		
	64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
0	8.35 ± 1.14	8.24 ± 2.53	7.8 ± 1.73
1	28.55 ± 0.65	28.24 ± 4.19	30.13 ± 6.75
2	57.42 ± 0.52	90.81 ± 17.4	127.98 ± 15.58
3	96.39 ± 10.85	126.51 ± 28.86	181.62 ± 17.53
4	132.1 ± 7.55	130.47 ± 21.3	177.76 ± 29.54

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)		
	64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
5	134.93 ± 10.72	124.12 ± 16.38	156.90 ± 90.94
6	154.93 ± 9.92	163.26 ± 50	269.29 ± 128.26
7	145.14 ± 18.02	201.11 ± 35.99	214.74 ± 11.68
8	168.15 ± 28.84	192.13 ± 8.8	302.99 ± 44.46

ตารางที่ ซ-5 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความยาวคลื่นแสงต่างกัน

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)		
	สีแดง (ความยาวคลื่น 660-665 นาโนเมตร)	สีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 430-460 นาโนเมตร)	สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)
0	5.66 ± 1.11	5.63 ± 0.81	8.70 ± 1.78
1	17.97 ± 2.04	20.31 ± 2.44	21.74 ± 6.74
2	67.55 ± 6.91	77.25 ± 13.16	76.13 ± 5.94
3	120.08 ± 12.17	160.94 ± 45.52	107.21 ± 12.68
4	132.7 ± 20.46	161.11 ± 26.28	142.74 ± 24.73
5	157.93 ± 25.37	217.42 ± 19.57	182.4 ± 42.94
6	201.79 ± 48.99	268.23 ± 30.26	230.03 ± 28.71
7	265.65 ± 39.48	253.21 ± 47	227.89 ± 29.5
8	225.14 ± 34.05	230.03 ± 18.98	238.62 ± 25.17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ-6 ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่การให้อากาศต่างกัน

วัน	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร)					
	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 150%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 150%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 500%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 500%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1000%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 1000%)
0	8±0.63	7.37±0.84	8.2±0.7	6.88±0.98	8.04±0.64	9.41±1.02
1	15.77±1.62	20.96±4.77	16.88±3.47	18.86±1.04	23.16±1.47	27.54±7.63
2	40.46±1.84	56.54±8.45	73.42±6.69	74.05±8.14	128.92±37.85	144.43±18.57
3	122.74±20.86	167.66±15.4	182.08±12.45	195.3±12.16	342.48±54.47	31.21±25
4	191.07±42.32	261.79±4.46	331.03±36.92	363.65±53.09	440.04±47.98	435.46±53.36
5	211.49±31.16	307.28±8.76	381.67±12.42	343.33±40.83	486.1±29.19	469.79±34.76
6	211.15±31.16	313.29±16.55	440.33±53.66	380.81±47.27	531.02±114.18	490.39±42.52
7	236.47±0.61	328.17±3.25	441.47±25.52	410.57±106.46	595.68±107.89	450.34±48.26
8	208.23±80.6	304.14±13.03	438.32±54.12	435.18±57.47	549.91±41.49	494.11±46.46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ด.

การผลิตลูทีนของจุลสาหร่าย

ตารางที่ ด-1 ปริมาณลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเค็มต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)			
	30 พีพีที	70 พีพีที	110 พีพีที	150 พีพีที
0	0.096 ± 0.013	0.14 ± 0.06	0.15 ± 0.04	0.138 ± 0.03
8	0.791 ± 0.06	0.64 ± 0.08	0.645 ± 0.1	0.519 ± 0.01
วัน	การผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)			
	30 พีพีที	70 พีพีที	110 พีพีที	150 พีพีที
8	2.42 ± 0.26	2.39 ± 0.39	1.9 ± 0.39	1.46 ± 0.15

ตารางที่ ด-2 ปริมาณลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
0	0.23±0.42	0.236±0.42	0.24±0.42	0.27±0.68	0.271±0.68	0.27±0.68
8	0.15±0.06	0.28±0.09	0.34±0.12	0.343±0.11	0.42±0.14	0.58±0.09
วัน	การผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
8	1.11±0.48	1.74±0.61	1.74±0.78	1.66±0.2	2.1±0.66	2.11±0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ด-3 ปริมาณลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)			
	$NaNO_3$	$Ca(NO_3)_2$	Urea	$(NH_4)_2SO_4$
0	0.04 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.1 ± 0.01
8	0.6 ± 0.11	0.84 ± 0.26	0.59 ± 0.11	0.88 ± 0.13
วัน	การผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)			
	$NaNO_3$	$Ca(NO_3)_2$	Urea	$(NH_4)_2SO_4$
8	2.14 ± 0.4	2.91 ± 0.71	2.34 ± 0.3	3 ± 0.25

ตารางที่ ด-4 ปริมาณลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มแสงต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	64 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
0	0.186 ± 0.05	0.17 ± 0.09	0.19 ± 0.07
8	1.06 ± 0.08	0.70 ± 0.06	1.17 ± 0.4
วัน	การผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)		
	64 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
8	4 ± 0.17	3.02 ± 0.22	3.88 ± 2.74

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ด-5 ปริมาณลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความยาวคลื่นแสงต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	สีแดง (ความยาวคลื่น 660-665 นาโนเมตร)	สีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 430-460 นาโนเมตร)	สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)
0	0.35 ± 0.08	0.25 ± 0.11	0.32 ± 0.1
8	0.96 ± 0.06	0.72 ± 0.02	0.98 ± 0.005
วัน	การผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)		
	สีแดง (ความยาวคลื่น 660-665 นาโนเมตร)	สีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 430-160 นาโนเมตร)	สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)
8	3.43 ± 0.91	2.83 ± 0.32	3.45 ± 0.7

ตารางที่ ด-6 ปริมาณลูทีนของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่รูปแบบการให้อากาศต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของลูทีน (มิลลิกรัม/ลิตร)					
	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 150%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 150%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 500%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 500%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1000%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 1000%)
0	0.17±0.07	0.15±0.04	0.03±0.01	0.02±0.003	0.1±0.01	0.11±0.03
8	0.49±0.13	0.91±0.03	2.26±0.24	1.88±0.23	3.25±0.23	2.79±0.34
วัน	การผลิตลูทีน (มิลลิกรัม/กรัม)					
	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 150%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 150%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 500%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 500%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1000%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 1000%)
8	2.34±0.69	2.2±0.1	2.14±0.2	1.66±0.23	2.49±0.08	2.01±0.36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ต.

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

ตารางที่ ต-1 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเค็มต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)			
	30 พีพีที	70 พีพีที	110 พีพีที	150 พีพีที
0	0.01 ± 0.0001	0.12 ± 0.006	0.17 ± 0.002	0.17 ± 0.001
1	0.13 ± 0.02	0.4 ± 0.045	0.09 ± 0.15	0.17 ± 0.09
2	0.68 ± 0.5	0.45 ± 0.12	0.19 ± 0.55	0.2 ± 0.15
3	1.2 ± 0.24	0.66 ± 0.76	0.27 ± 0.44	0.32 ± 0.33
4	1.89 ± 0.46	0.97 ± 0.41	0.54 ± 0.26	0.38 ± 0.87
5	1.85 ± 0.7	0.97 ± 0.5	1.1 ± 0.49	0.53 ± 0.79
6	1.8 ± 0.59	1.43 ± 0.55	1.4 ± 0.89	0.81 ± 0.25
7	2.28 ± 0.47	1.61 ± 0.88	0.86 ± 0.99	0.98 ± 0.31
8	2.64 ± 0.48	2.18 ± 0.96	1.72 ± 0.39	1.35 ± 0.42

ตารางที่ ต-2 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
0	0.19±0.01	0.23±0.12	0.22±0.13	0.21±0.03	0.19±0.11	0.26±0.003
1	0.45±0.4	0.59±0.42	0.48±0.26	0.55±0.21	0.56±0.23	0.59±0.52
2	1.54±0.26	1.33±0.66	1.5±0.45	1.36±0.66	1.41±0.55	1.83±0.14
3	1.52±0.14	2.66±0.89	2.78±0.65	2.47±0.45	2.23±0.98	2.16±0.69
4	1.88±0.55	3.06±0.47	4.2±0.89	3.83±0.57	3.08±0.74	3.28±0.45
5	1.62±0.98	3.36±0.51	4.47±0.47	4.63±0.98	3.88±0.71	4.05±0.58
6	2.35±0.47	2.88±0.23	3.6±0.62	4.39±0.12	3.84±0.66	3.66±0.59
7	1.09±0.65	2.38±0.45	3.53±0.66	5.27±0.7	4.74±0.41	4.73±0.67

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
8	1.49±0.48	2.45±0.55	3.65±0.16	6.44±0.15	5.38±0.95	5.81±0.79

ตารางที่ ต-3 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)			
	$NaNO_3$	$Ca(NO_3)_2$	Urea	$(NH_4)_2SO_4$
0	0.1 ± 0.02	0.09 ± 0.006	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.001
1	0.14 ± 0.07	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.05
2	0.33 ± 0.14	0.26 ± 0.12	0.28 ± 0.2	0.25 ± 0.17
3	0.68 ± 0.25	0.71 ± 0.25	0.64 ± 0.18	0.64 ± 0.04
4	1.26 ± 0.88	1.14 ± 0.66	1.1 ± 0.18	1.68 ± 0.64
5	1.71 ± 0.68	1.43 ± 0.7	1.12 ± 0.5	1.77 ± 0.45
6	1.63 ± 0.56	2.1 ± 0.68	1.35 ± 0.98	2.16 ± 0.15
7	2 ± 0.5	2.14 ± 0.56	1.8 ± 0.72	2.36 ± 0.69
8	2.22 ± 0.89	2.59 ± 0.47	1.99 ± 0.69	2.64 ± 0.76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ต-4 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มแสงต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
0	0.18 ± 0.09	0.11 ± 0.02	0.1 ± 0.04
1	0.16 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.04
2	0.41 ± 0.07	0.41 ± 0.1	0.47 ± 0.05
3	1.19 ± 0.33	1.05 ± 0.21	1.13 ± 0.2
4	1.14 ± 0.06	0.77 ± 0.14	0.69 ± 0.57

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
5	1.59 ± 0.56	1.25 ± 0.46	1.5 ± 0.22
6	2.04 ± 0.34	1.8 ± 0.19	2.18 ± 0.2
7	2.01 ± 0.27	1.47 ± 0.08	1.73 ± 0.42
8	2.88 ± 0.42	1.97 ± 0.1	2.62 ± 0.64

ตารางที่ ต-5 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความยาวคลื่นแสงต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	สีแดง (ความยาวคลื่น 660-665 นาโนเมตร)	สีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 430-460 นาโนเมตร)	สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)
0	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.02
1	0.17 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.19 ± 0.05
2	0.66 ± 0.11	0.42 ± 0.02	0.71 ± 0.1
3	1.26 ± 0.26	0.99 ± 0.06	1.15 ± 0.37
4	1.52 ± 0.22	1.14 ± 0.13	1.45 ± 0.41
5	1.88 ± 0.27	1.74 ± 0.2	1.88 ± 0.46
6	2.24 ± 0.14	2.13 ± 0.02	2.27 ± 0.54
7	1.85 ± 0.2	1.76 ± 0.06	1.97 ± 0.3
8	2.14 ± 0.14	2.17 ± 0.1	2.35 ± 0.45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ต-6 ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่รูปแบบการให้อากาศต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)					
	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 150%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 150%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 500%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 500%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1000%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 1000%)
0	0.1±0.02	0.09±0.008	0.08±0.01	0.08±0.008	0.11±0.06	0.07±0.02
1	0.1 ± 0.002	0.06±0.01	0.11±0.02	0.26±0.31	0.16±0.02	0.22±0.02
2	0.73±0.2	0.67±0.22	0.5±0.06	0.45±0.02	0.91±0.05	1.04±0.2
3	1.06±0.15	1.9±0.75	1.92±0.66	1.54±0.07	2.38±0.14	2.55±0.21
4	1.35±0.24	2.63±0.18	3.05±0.53	2.8±0.12	3.77±0.23	3.87±0.19
5	1.61±0.23	2.7±0.09	3.42±0.13	3.38±0.3	4.61±0.26	4.49±0.12
6	1.61±0.46	2.82±0.07	4.06±0.03	4.04±0.16	5±0.17	4.78±0.12
7	1.74±0.41	2.79±0.19	4.6±0.1	4.55±0.17	5.32±0.08	5.02±0.18
8	1.93±0.7	2.91±0.21	4.75±0.16	4.51±0.46	5.37±0.04	5.2±0.19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ถ.

ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก

ตารางที่ ถ-1 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตวันที่ 0 และวันที่ 8ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเค็มต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)			
	30 พีพีที	70 พีพีที	110 พีพีที	150 พีพีที
0	13.64 ± 0.68	13.44 ± 1.27	13.24 ± 0.16	13.32 ± 0.45
8	3.53 ± 0.46	3.5 ± 0.5	2.22 ± 0.04	2.77 ± 0.61
วัน	ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร)			
	30 พีพีที	70 พีพีที	110 พีพีที	150 พีพีที
0	0.91 ± 0.05	0.45 ± 0.01	0.88 ± 0.07	0.89 ± 0.07
8	0.3 ± 0.1	0.13 ± 0.06	0.09 ± 0.009	0.1 ± 0.06

ตารางที่ ถ-2 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตวันที่ 0 และวันที่ 8ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
0	5.63±1.73	7.57±1.32	10.42±2.73	11.88±1.22	13.34±0.75	17.14±0.76
8	2.53±0.48	2.35±0.29	2.23±1.05	2.85±0.42	4.5±1.35	6.52±2.45
วัน	ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร)					
	3.1 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	6.2 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	9.3 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	12.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	15.4 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร	18.6 มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร
0	0.92±0.38	0.9±0.27	0.85±0.06	0.89±0.006	0.9±0.05	0.87±0.004
8	0.14±0.01	0.11±0.009	0.14±0.06	0.13±0.005	0.16±0.04	0.14±0.03

ตารางที่ ถ-3 ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตวันที่ 0 และวันที่ 8ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)			
	$NaNO_3$	$Ca(NO_3)_2$	Urea	$(NH_4)_2SO_4$
0	17.14 ± 0.67	16.52 ± 1.03	17.1 ± 012	17.04 ± 0.004
8	3.66 ± 0.25	3.57 ± 0.62	0.33 ± 0.01	0.13 ± 0.02
วัน	ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร)			
	$NaNO_3$	$Ca(NO_3)_2$	Urea	$(NH_4)_2SO_4$
0	1.02 ± 0.03	0.93 ± 0.03	0.89 ± 0.084	0.94 ± 0.03
8	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.008	0.05 ± 0.06	0.08 ± 0.2

ตารางที่ ถ-4 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตวันที่ 0 และวันที่ 8ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความเข้มแสงต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)		
	64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
0	18.32 ± 0.93	18.75 ± 0.11	17.56 ± 1.12
8	3.62 ± 0.19	4.63 ± 2.33	3.24 ± 0.35
วัน	ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร)		
	64 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	201 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที	402 ไมโครโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที
0	1 ± 0.03	0.97 ± 0.03	0.94± 0.02
8	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ถ-5 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตวันที่ 0 และวันที่ 8ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร ที่ความยาวคลื่นแสงต่างกัน

วัน	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)		
	สีแดง (ความยาวคลื่น 660-665 นาโนเมตร)	สีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 430-460 นาโนเมตร)	สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)
0	17.52 ± 0.04	16.7 ± 0.01	17 ± 0.02
8	1.93 ± 0.01	1.74 ± 0.005	1.64 ± 0.01
วัน	ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร)		
	สีแดง (ความยาวคลื่น 660-665 นาโนเมตร)	สีน้ำเงิน (ความยาวคลื่น 430-160 นาโนเมตร)	สีขาว (ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร)
0	0.85 ± 0.04	0.77 ± 0.02	0.76 ± 0.01
8	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.004	0.01 ± 0.02

ตารางที่ ถ-6 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตวันที่ 0 และวันที่ 8ของจุลสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ในขวดแก้วดูแรนขนาด 2 ลิตร รูปแบบการให้อากาศต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัน	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)					
	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 150%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 150%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 500%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 500%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1000%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 1000%)
0	17.73±0.04	18.08±0.009	45.25±1.64	46.53±0.5	94±4.43	98.2±1.16
8	1.89±0.005	1.98±0.001	6.08±2.5	2.28±2.34	38.72±6.72	31.14±8.07
วัน	ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัส/ลิตร)					
	CO_2 2.5% โดยปริมาตร	อากาศปกติ (ไนโตรเจน	CO_2 2.5% โดยปริมาตร	อากาศปกติ (ไนโตรเจน	CO_2 2.5% โดยปริมาตร	อากาศปกติ (ไนโตรเจน

วัน	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (มิลลิกรัม-ไนโตรเจน/ลิตร)					
	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 150%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 150%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 500%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 500%)	CO_2 2.5% โดยปริมาตร (ไนโตรเจน 1000%)	อากาศปกติ (ไนโตรเจน 1000%)
	(ไนโตรเจน 150%)	150%)	(ไนโตรเจน 500%)	500%)	(ไนโตรเจน 1000%)	1000%)
0	0.71±0.03	0.66±0.009	2.27±0.08	2.3±0.06	5.81±0.26	5.59±0.18
8	0.09±0.004	0.13±0.003	0.09±0.02	0.15±0.03	0.22±0.08	0.21±0.03

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พัทธ์ศริยา พงษ์ลำเจียกงาม
วัน เดือน ปี เกิด	18 พฤศจิกายน 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	30/20(12) ม.3 หมู่บ้านขวัญสุขนิเวศน์ ซ.นนทบุรี6 แยก3 ถ.นนทบุรี ต.ตลาดขวัญ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University