บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือ แดง พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น พืชชั้นสูง สาหร่าย สัตว์ และจุลินทรีย์ (Gross, 1991; Borowitzka, 1988; Richmond, 1986; Young, 1993) ซึ่งแคโรทีนอยด์ในพืชนั้นสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ เช่น ผล ดอก และราก ส่วนแคโรทีนอยด์ที่พบในจุลินทรีย์พบได้ทั้งในจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ด้วยแสงและไม่สังเคราะห์ด้วยแสง (Young, 1993) แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (provitamin A) มีคุณสมบัติเป็นตัวต่อต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้ได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มสีผลิตภัณฑ์อาหารในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหาร เนยเทียม น้ำส้ม เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ ขนมอบกรอบ อาหารสัตว์ และ เครื่องสำอางค์ (Young, 1993) แคโรทีนอยด์แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แคโรทีน (carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) โดยในกลุ่มแคโรทีนได้รับความสนใจมาก โดยเฉพาะเบต้าแคโรทีน (β-carotene) ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์โดยเชื่อว่าช่วยป้องกันและรักษามะเร็งบางชนิดได้ ทั้งนี้เพราะเบต้าแคโรทีนมีคุณสมบัติเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระที่ดี และเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ ซึ่งเป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกายของมนุษย์ นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมทางการเกษตรโดยผสมในอาหารสัตว์น้ำ และสัตว์ปีก เพื่อให้สัตว์น้ำมีผิวหนัง เนื้อ และเกล็ดที่มีสีสันสวยงามขึ้น มีผลต่อการปรับปรุงระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ ส่วนในสัตว์ปีกจะทำให้ไข่แดงมีสีสันสดใสขึ้น เนื้อกุ้งที่มีสีเป็นธรรมชาติมากขึ้น และปลามีสีภายนอกที่สดใส (อรชุน เลียววัฒนะผล, 2539; Borowitzka and Borowitzka 1988)

ในปัจจุบันเบต้าแคโรทีนผลิตได้จาก 2 กระบวนการ คือ การสังเคราะห์ทางเคมี และการสกัดจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ แต่ผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสนใจกับเบต้าแคโรทีนที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติมากกว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากการใช้สารเคมีและปฏิกริยาทางเคมีต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้น อาจก่อให้เกิดหรือมีการตกค้างของสารอันตราย อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามหาแหล่งผลิตสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณมากมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย โดยแบคทีเรียสกุล *Flavobacterium* สามารถสร้างซีแซนทีน (zeaxanthin) และ

สกุล *Brevibacterium* สร้างแคนต้าแซนทีน (canthaxanthin) ส่วนยีสต์ *Phaffia rhodozyma* สร้างแอสต้าแซนทีน (astaxanthin) ส่วนรา *Phycomyces blakesleeanus* และ *Blakeslea trispora* สร้างเบต้าแคโรทีน (Johnson and Lewis, 1979; Margalith, 1992) แต่สารในกลุ่มแคโรทีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย ยีสต์และรา ยังมีปัญหาต่อการยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากผู้บริโภคเชื่อว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้เป็นเชื้อโรค ดังนั้นการผลิตสารในกลุ่มแคโรทีนจากสาหร่ายจึงได้รับความนิยมมากกว่าในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยมีรายงานว่านำสาหร่ายมาใช้ในการผลิตสารในกลุ่มแคโรทีน ได้แก่ *Dunaliella* spp. สร้างเบต้าแคโรทีน *Haematococcus pluvialis* สร้างแอสต้าแซนทีน, *Coelastrum* spp. และ *Scenedesmus* spp. สร้างคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) (Hanagata and Dubinsky, 1999) ประกอบกับการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายมีความน่าสนใจมากกว่าการผลิตจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากมีความปลอดภัยในการนำไปใช้และมีความเป็นพิษน้อย การที่ *Dunaliella salina* ผลิตเบต้าแคโรทีนได้สูงทำให้สาหร่ายชนิดนี้มีบทบาทในธุรกิจของอาหารเสริมสุขภาพ แต่การเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* ต้องเพาะเลี้ยงที่ความเค็มสูงทำให้มีปัญหาจากฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น หากฝนตกมากจะทำให้ความเค็มเจือจางไป (Borowitzka and Borowitzka, 1988) ส่วนสาหร่ายน้ำจืดที่ผลิตเบต้าแคโรทีนได้ เช่น สาหร่ายสีเขียวในกลุ่ม Chlorophyceae ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษา *Chlorosarcinopsis* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวที่แยกได้จากดินบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง สาหร่ายชนิดนี้มีรายงานว่าผลิตแคโรทีนอยด์ในสภาวะเครียดได้ เช่น สภาวะความเข้มแสงสูงและสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (ปราณี หนูในน้ำ, 2543) ดังนั้นผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในการผลิตเบต้าแคโรทีนในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

การตรวจเอกสาร

สาหร่ายเป็นพืชชั้นต่ำที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์จนถึงขนาดใหญ่ มองดูเหมือนมีราก ลำต้น และใบ ซึ่งรวมเรียกว่าทัลลัส (thallus) ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์ด้วยแสง (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2530)

อนุกรมวิธานของ *Chlorosarcinopsis* sp. (Arce and Harold, 1958)

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlorosarcinales

Family Chlorosarcinaceae

Genus *Chlorosarcinopsis*

ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* sp.

Chlorosarcinopsis sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว มีรูปร่างกลม อยู่เดี่ยวๆ ไม่เคลื่อนที่ ขนาดของเซลล์ประมาณ 5.0-12.5 ไมโครเมตร คลอโรพลาส (chloroplast) อยู่บริเวณขอบเซลล์ ในเซลล์ที่มีการเติบโตดีจะสร้างไพรีนอยด์ (pyrenoid) ที่มีรูปร่างกลม มีรงควัตถุประกอบ ด้วย คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บีและแคโรทีนอยด์ มีไพรีนอยด์ 1 อัน หรือมากกว่า 1 อัน อยู่ด้านข้างเซลล์ (Arce and Harold, 1958)

การสืบพันธุ์มีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้างซูสปอร์ (zoospore) ซึ่งมีลักษณะรูปร่างรีเป็นแบบ Protosiphon-type ยาว 7-13 ไมโครเมตร กว้าง 3-6 ไมโครเมตร มี 1 นิวเคลียส (nucleus) อยู่ตรงกลางเซลล์ มีพลาสติด (plastid) อยู่ด้านข้าง ด้านหน้าของเซลล์มี แฟลเจลลา (flagella) 2 เส้นขนาดเท่ากัน ยาวไปตามลำตัว มี สติกมา (stigma) และมีคอนแทรกไทล์ แวคคิวโอล (contractile vacuole) 2 อัน นอกจากนี้จะมีการแบ่งเซลล์เป็นส่วนๆ แต่จะมีโปรโตพลาสต์เชื่อมติดกันหลังจากแบ่งแบบไมโตซิส (mitotis) แล้วเซลล์ลูก (หรือเรียกว่า daughter cells) ยังคงถูกปิดล้อมด้วยเซลล์พ่อแม่ แล้วแบ่งเซลล์ต่อเนื่องแบบตั้งฉาก แต่ละเซลล์มีคลอโรพลาสต์รูปถ้วยซึ่งมีไพรีนอยด์อยู่ภายใน การเพาะเลี้ยงในระยะคงที่ เป็นเวลา 1-2 เดือน เซลล์อยู่ในสภาพขาดอาหาร เซลล์จะเปลี่ยนไปเป็นอะไคนีต (akinete หรือ resting spore) และสะสมอาหารในรูปแป้งมีไพรีนอยด์มากกว่า 1 อัน เซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีส้มและมีความทนทาน สามารถนำไปเพาะเลี้ยงได้ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีรูป

ร่าง และขนาดเหมือนกัน เรียกว่า ไอโซแกมมีต (isogamete) ที่เป็นเซลล์สีเขียว การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของ *Chlorosarcinopsis* sp. จะจำแนกตามลักษณะของโครมาโตฟอร์ (chromatophore) ซึ่งอยู่ด้านข้าง ต้องมีไพรีนอยด์อย่างน้อย 1 อัน รูปแบบการแบ่งเซลล์และกลุ่มของเซลล์ (Herndon, 1958)

รูปที่ 1 สาหร่าย *Chlorosarcinopsis* sp.

แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและอนุพันธ์ของไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ อาจจะอยู่ในรูปอะลิฟาติค (aliphatic) หรืออะโรมาติก (aromatic) โดยแคโรทีนอยด์จะประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของไอโซพรีน (isoprene) เชื่อมต่อกัน 8 หน่วย (Young, 1993) แคโรทีนอยด์แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแคโรทีน (carotene) มีอยู่สามชนิด ได้แก่ แอลฟา (α) เบต้า (β) และเอปซีลอน (ε) ชนิดที่พบมากที่สุดคือ เบต้าแคโรทีนและกลุ่มออกซีแคโรทีนอยด์ (oxycarotenoid) หรือกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) โดยกลุ่มแคโรทีนจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีเพียงคาร์บอนและไฮโดรเจน ส่วนกลุ่มแซนโทฟิลล์นอกจากโครงสร้างจะประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนแล้ว ยังมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบร่วมอยู่ด้วย (Ben-Amotz and Avron, 1992)

แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายมีหลากหลายชนิด โดยชนิดของแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่าย (Young, 1993)

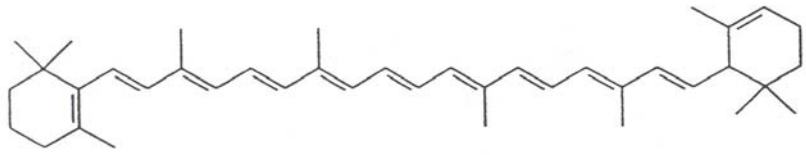
สาหร่ายกลุ่มต่างๆ	รงควัตถุที่สำคัญ	รงควัตถุอื่นๆ
Chlorophyceae	Antheraxanthin, β-carotene Lutein, Neoxanthin, Siphonaxanthin Siphonein, Violaxanthin, Zeaxanthin	Astaxanthin, ,ε- carotene β-Cryptoxanthin, 2,3-Didehydro fritschiellaxanthin, Fritschiellaxanthin, Loroxanthin
Prasinophyceae	Antheraxanthin, β-carotene Lutein, Neoxanthin, Siphonaxanthin Siphonein, Violaxanthin, Zeaxanthin Prasinoxanthin, Violaxanthin	Astaxanthin, α-carotene γ-carotene Canthaxanthin, Dihydro-prasinoxanthin Epoxide Echinenone, Lutein-5,6-epoxide Lycopene, Uriolide
Euglenophyceae	Diadinoxanthin, Diatoxanthin, Heteroxanthin, Neoxanthin	3',4'-Anhydrodiatoxanthin, Alloxanthin diester, Astaxanthin, 7,8-Didehydroastaxanthin, Canthaxanthin, α- Cryptoeutreptiellanone, β-Cryptoeutreptiellanone, Echinenone, Hexadehydro-β-caroten-3-ol,Octadehydro-β, β-carotene, Pectenolone, Pectenolone diester, Siphonein
Rhodophyceae	α-carotene, β-carotene, Lutein Zeaxanthin	α-Cryptoxanthin, β-Cryptoxanthin,Fucoxanthin
Cryptophyceae	Alloxanthin, α-carotene, β-carotene,ε-carotene, Lycopene	-
Dinophyceae	Diadenoxanthin, Diatoxanthin, Peridinin Diadenoxanthin, Diatoxanthin, Fucoxanthin, 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	Astaxanthin, β-carotene, γ-carotene, Canthaxanthin, Diadinochrome, Dinoxanthin, Echinenone, P457, Peridinol, Pyrrhoxanthinol 19'-Butanoyloxyfucoxanthin, 19'- Butanoyloxyhalocynthicanthin 3'-acetate, α-carotene, β-carotene,Diadenochrome, Halocynthiaxanthin 3'-acetate, 19-Hexanoyloxyhalocynthiaxanthin 3'-acetate, 19'-Hexanoyloxyparacentrone 3-acetate, Gyroxanthin diester

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สาหร่ายกลุ่มต่างๆ	รงควัตถุที่สำคัญ	รงควัตถุอื่นๆ
Chrysophyceae	β-carotene, Fucoxanthin	Antheraxanthin, α-carotene, ε-carotene, Cryptoxanthin, Cryptoxanthin epoxide, Diadenoxanthin, Diatoxanthin,Neoxanthin, Violaxanthin, Zeaxanthin
Raphidophyceae	β-carotene, Diadinoxanthin β-carotene, Fucoxanthin	Dinoxanthin, Heteroxanthin, Neoxanthin, Vaucheriaxanthin-3, 19-diacetate Fucoxanthinol, Violaxanthin, Zeaxanthin
Xanthophyceae	β-carotene, Diadenoxanthin, Diatoxanthin, Heteroxanthin Vaucheriaxanthin diester	β-Cryptoxanthin-5',6'-Epoxide, β-Cryptoxanthin diepoxide Neoxanthin
Eustimatophyceae	Antheraxanthin, β-carotene, Vaucheriaxanthin 3'-acetate, Violaxanthin, Zeaxanthin	Canthaxanthin, β-Cryptoxanthin, β-Cryptoxanthin-5',6'- Epoxide
Prymnesiophyceae	β-carotene, Diadenoxanthin, Diatoxanthin, Fucoxanthin, Epoxide, 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	Canthaxanthin, α-carotene γ-carotene, β-carotene β-Cryptoxanthin diepoxide, β-Cryptoxanthin epoxide, Deepoxyneoxanthin, Dinoxanthin, Echinenone, Fucoxanthinol, 19'-Butanoyloxyfucoxanthin, 19'Hexanoyloxyfucoxanthinol 19'-Hexanoyloxyparacentrone, 3-acetate
Bacillariophyceae	β-carotene, Diadenoxanthin, Diatoxanthin, Fucoxanthin	ε-carotene, Canthaxanthin, Echinenone, Neoxanthin
Phaeophyceae	β-carotene, Fucoxanthin, Violaxanthin	Antheraxanthin, ε-carotene, Diadenoxanthin, Diatoxanthin, Fucoxanthinol, Neoxanthin, Zeaxanthin
Cyanobacteria	Caloxanthin, Canthaxanthin, β-carotene ,β-Cryptoxanthin, Echinenone, Myxoxanthin, Nostoxanthin, Oscillaxanthin, Zeaxanthin	-
Prochlorophyceae	β-carotene, Zeaxanthin	β-carotene-5,6-epoxide, β-Cryptoxanthin, Echinenone

เบต้าแคโรทีน

เบต้าแคโรทีนเป็นสารชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ มีสีส้ม แดง ไม่ละลายทั้งในน้ำและในแอลกอฮอล์ แต่ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม (chloroform) โดยเบต้าแคโรทีนจะพบในพืชและสาหร่ายทุกชนิด (Richmond,1986; Borowitzka and Borowitzka 1988; กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) โครงสร้างทางเคมีของเบต้าแคโรทีนจะประกอบไปด้วยโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยโมเลกุลของไอโซพรีนหลายๆหน่วยต่อกัน (รูปที่ 2) เป็นโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว มีองค์ประกอบเป็นคาร์บอน 40 อะตอม และไฮโดรเจน 56 อะตอม น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 536.9 ลักษณะทางสเตอริโอไอโซมอร์ (stereoisomer) ของเบต้าแคโรทีนที่ได้จากธรรมชาติจะมีอยู่ 2 รูป คือ all-trans β- carotene และ 9-cis β-carotene โดยทั่วไปเบต้า แคโรทีนที่อยู่ในรูปผลึกจะมีสีม่วงแดง แต่เมื่ออยู่ในสารละลายพวกน้ำมันจะให้สีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่สีเหลืองอ่อนถึงสีส้ม โดยสัดส่วนของ all-trans β-carotene และ 9-cis β-carotene จะแตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด all-trans β-carotene ละลายได้น้อยในน้ำมันและตกผลึกได้ง่าย ส่วน 9-cis β-carotene ละลายได้ดีในสารละลายจำพวกน้ำและตกผลึกยาก ในการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนโดยวิธีทางเคมีจะได้เบต้าแคโรทีนชนิด all-trans β-carotene มากถึง 90% โดยเบต้าแคโรทีนในรูป 9-cis β-carotene ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ และจะพบได้ในธรรมชาติเท่านั้น (Ben-Amotz and Shaish, 1992)



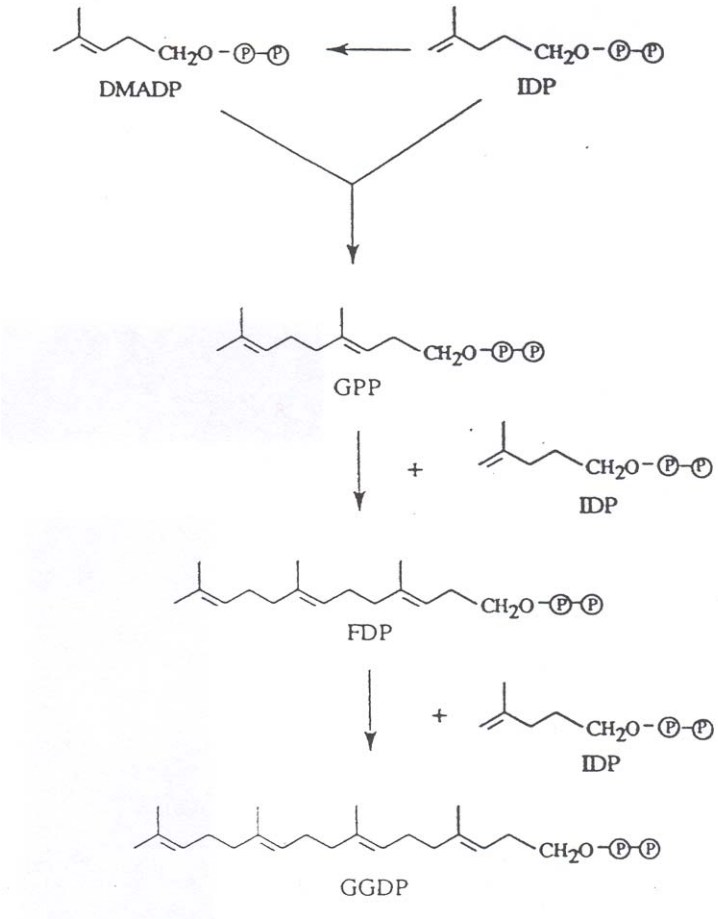
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของเบต้าแคโรทีน (Young and Britton, 1993)

การสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนทางชีวภาพ

การสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนทางชีวภาพ คือ การสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนโดยพืชและสาหร่าย มีขั้นตอนการสังเคราะห์ 4 ขั้นตอน ได้แก่ (Britton, 1993)

1. การสังเคราะห์ geranylgeranyl pyrophosphate (GGDP)

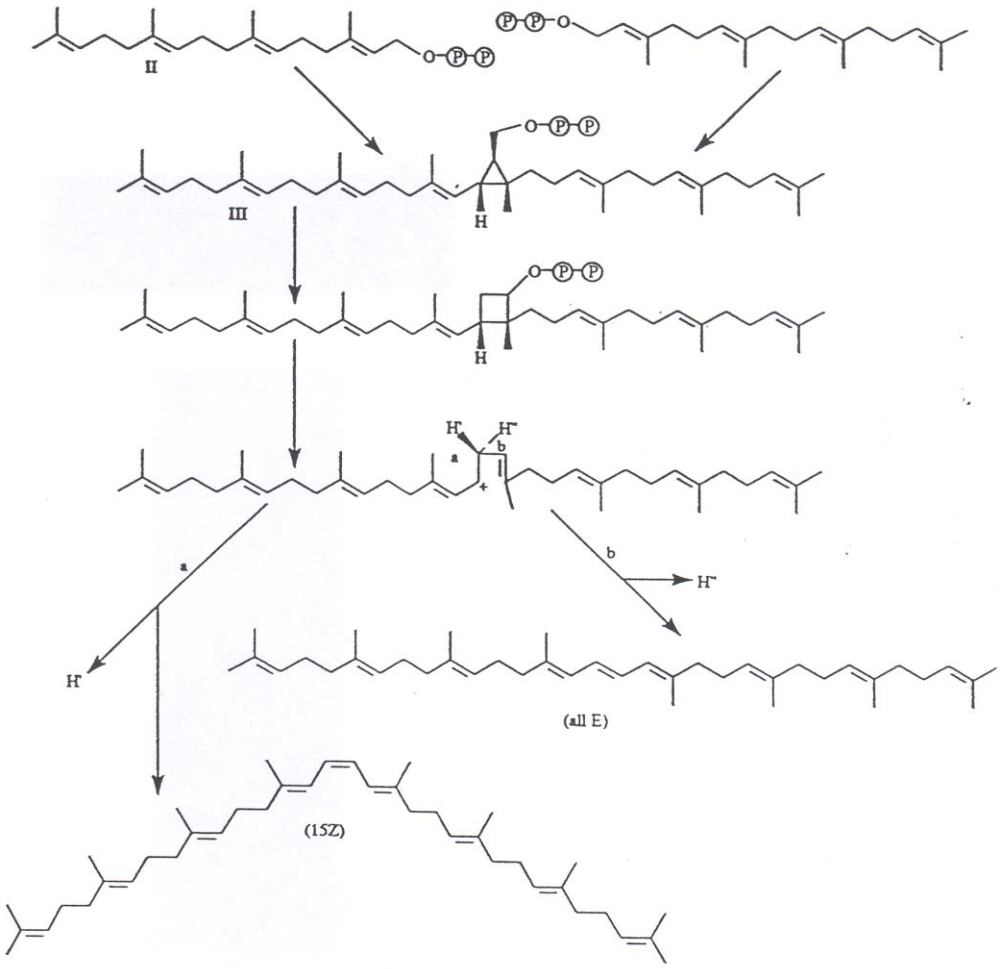
โมเลกุลของ Dimethylallyl diphosphate (DMAP) จนรวมตัวกับโมเลกุลของ Isopentenyl diphosphate (IDP) แล้ว IDP จะเข้ามาสร้างพันธะเชื่อมต่อกันเรื่อยๆจนเป็น geranylgeranyl diphosphate (GGDP) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างและการสังเคราะห์ของ geranylgeranyl pyrophosphate (GGDP) โดยทางชีวภาพ (Britton, 1993)

2. การสังเคราะห์ phytoene

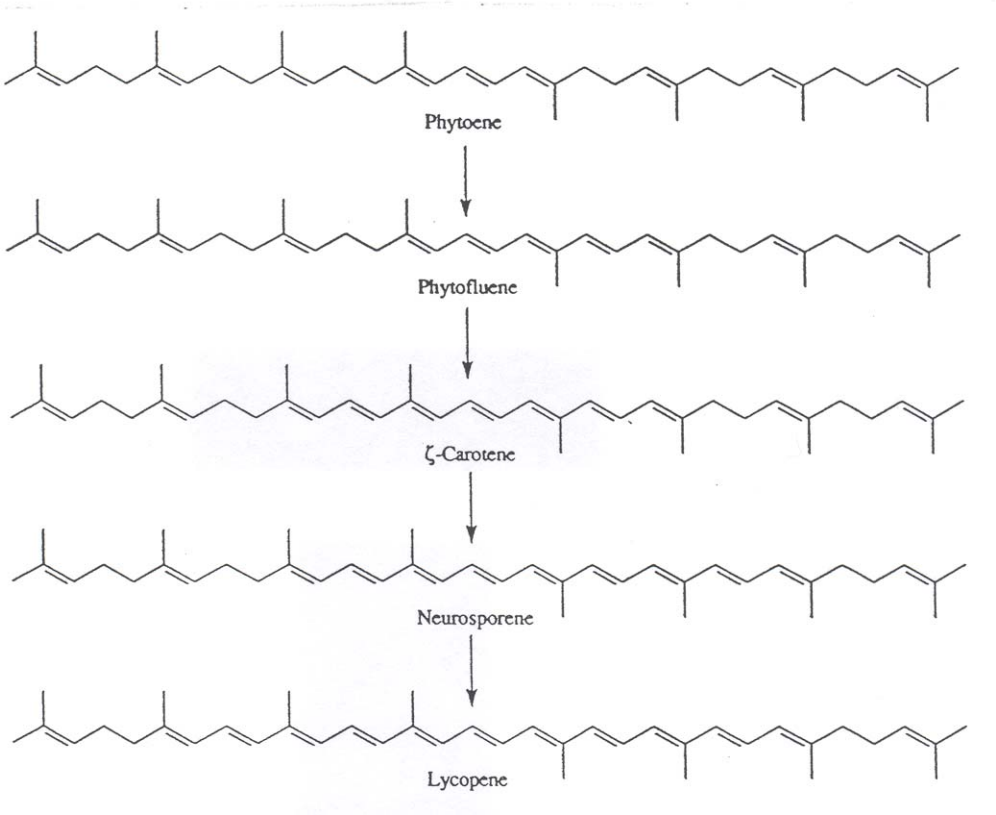
ในขั้นตอนนี้ GGDP 2 โมเลกุลจะทำรวมตัวกันได้เป็นโมเลกุลที่มีคาร์บอนเรียงตัวกันเป็นสายยาว มี 40 อะตอม เรียกว่า C_{40} intermediate แล้วจะเปลี่ยนไปเป็น prephytoene diphosphate (PPDP) ก่อนจะเปลี่ยนต่อไปเป็น phytoene โดย stereochemical ของ phytoene ที่ได้จะมีอยู่ 2 ลักษณะ ได้แก่ all-E-phytoene และ 15Z-phytoene ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 กลไกและสเตอริโอไอโซเมอร์ของ all-E-phytoene และ 15Z-phytoene (Britton, 1993)

3. การลดความอิ่มตัว (desaturation)

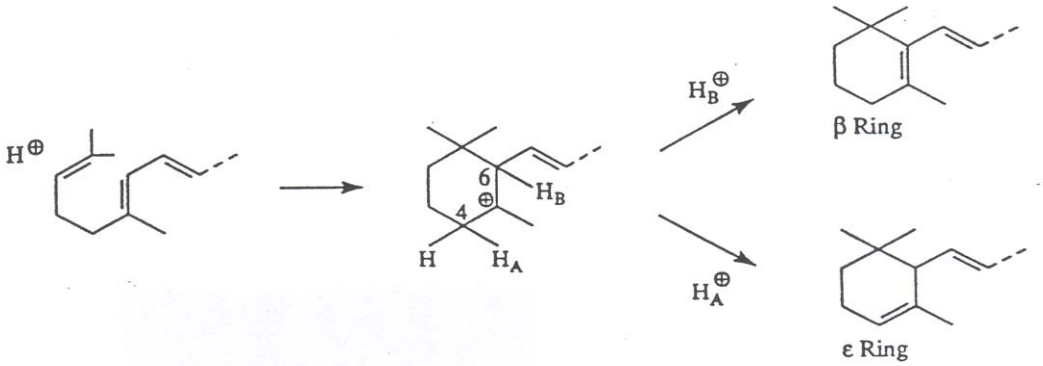
โดยในขั้นตอนนี้จะเป็นกระบวนการลดความอิ่มตัวของไฟโตอีน (phytoene) ไปเรื่อยๆจนกลายเป็นไลโคพีน (lycopene) กระบวนการนี้เป็นการกำจัดอะตอมของไฮโดรเจนออกจากโครงสร้างของโมเลกุล ทำให้เกิดพันธะคู่ภายในโมเลกุลมากขึ้น ไอโซเมอร์จึงเปลี่ยนไปจนกลายเป็นไลโคพีน ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ขั้นตอนการลดความอิ่มตัวของไฟโตอีน (phytoene) ไปเป็นไลโคพีน (lycopene) (Britton, 1993)

4. การเกิดเป็นวงแหวน (cyclization)

ปฏิกริยาการเกิดเป็นวงแหวนของแคโรทีนอยด์นั้นเกิดได้ยาก เนื่องจากการต่อกันเป็นสายยาวของโมเลกุลโพลีอีน (polyene) มีความแข็งแรงมาก ดังนั้นในการเกิดเป็นวงแหวน จึงเกิดได้เฉพาะบริเวณปลายของโมเลกุล โดยจะเกิดเป็นวงแหวนที่มีลักษณะเป็น 6 เหลี่ยม ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การเกิดเป็นวงแหวนของแคโรทีน (Britton, 1993)

บทบาทและหน้าที่ของเบต้าแคโรทีน

เบต้าแคโรทีนเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยเป็นรงควัตถุประกอบที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง โดยดูดกลืนแสงแล้วถ่ายทอดพลังงานที่ได้รับส่งไปยังคลอโรฟิลล์ (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) นอกจากคุณสมบัติดังกล่าว เบต้าแคโรทีนยังสามารถป้องกันพืชจากแสงที่มีความเข้มแสงสูง โดยเป็นตัวป้องกันคลอโรฟิลล์ไม่ให้ถูกทำลาย ตัวอย่างเช่น ใน *Dunaliella bardawil* ที่มีการสะสมเบต้าแคโรทีนต่ำจะตายเมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มสูง ขณะที่ *D. bardawil* ที่มีการสะสมเบต้าแคโรทีนในปริมาณสูงจะมีชีวิตรอด (Borowitzka and Borowitzka, 1988; Ben-Amotz and Avron, 1992) นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนยังทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนจากปฏิกริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่าย ซึ่งสาหร่ายสามารถจะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน หากสารอาหารที่ใช้ในการดำรงชีวิตของเซลล์ไม่เพียงพอ (Borowitzka and Borowitzka, 1988; Ben-Amotz and Shaish, 1992) และยังช่วยป้องกันการเกิด oxidation ของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว (single oxygen quencher) ที่จะสร้างความเสียหายต่อคลอโรฟิลล์ในขณะที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้น

เบต้าแคโรทีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีความสำคัญ ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมไปถึงนำไปใช้ในทางโภชนาการ เนื่องจากเบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ โดย 1 โมเลกุล ของเบต้าแคโรทีนจะให้วิตามินเอ 2 โมเลกุล จึงมีการนำเอาเบต้าแคโรทีนมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และเนื่องจากเบต้าแคโรทีนมีคุณสมบัติในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยลดอนุมูลอิสระที่เป็นตัวทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ในทางการแพทย์พบว่าเป็นยาต่อต้านมะเร็งได้ จึงนำเบต้าแคโรทีนมาใช้ป้องกันการเกิดมะเร็งบางชนิด (Ben-Amotz and Avron, 1992) นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้ทำมาร์การีน เป็นส่วนผสมในขนมอบ และสีผสมอาหาร เนื่องจากมีคุณภาพและความคงตัวที่ดี จึงเหมาะในการเพิ่มสีสันทั้งในอาหารและเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ รวมถึงนำมาใช้ทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ โดยเป็นส่วนผสมในครีมกันแดด (อรชุน เลียววัฒนะผล, 2539; Borowitzka and Borowitzka, 1988;Packer, 1992)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย

การสังเคราะห์แสงเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของพืช ถ้าพืชชนิดใดมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงสูง การเจริญเติบโตของพืชชนิดนั้นก็มีโอกาสที่จะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ในทางตรงกันข้ามถ้าพืชมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงต่ำการเจริญเติบโตจะเป็นไปอย่างช้าๆ สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุหลายชนิดที่ทำหน้าที่ดูดกลืนแสง แต่รงควัตถุที่สำคัญและมีบทบาทต่อการสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์ คลอโรฟิลล์มีสีเขียวเนื่องจากดูดกลืนแสงสีแดงและสีน้ำเงินไว้แต่ไม่ดูดกลืนแสงสีเขียว จึงสะท้อนแสงสีเขียวออกมาให้เห็น

เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์นั้นเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆหลายประการ ทั้งที่เป็นปัจจัยภายนอกและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวของพืชเอง ความเข้มแสงเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งของกระบวนการสังเคราะห์แสง เมื่อความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นการเติบโตของสาหร่ายจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยจะเพิ่มการสังเคราะห์ด้วยแสงและเร่งการทำงานของเซลล์แต่ความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการหายใจของเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเร่งอัตราการหายใจมากเกินไปหรือการเกิดกระบวนการโฟโตออกซิเดชัน (photooxidation) ของรงควัตถุ ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงหรือหยุดชะงัก นอกจากนี้การเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยแสง (photoinhibition) ขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่าย และช่วงระยะเวลาที่รับแสง (สัมพันธ์ คัมภิรานนท์ และ วรวรรณ ลิ่มทอง, 2526; Richmond, 1986)

จากการศึกษาของ Lorenzen (1963 อ้างโดย Richmond, 1986) พบว่า *Chlorella* sp. เติบโตในสภาวะที่มีทั้งช่วงมืดและสว่าง แต่ไม่สามารถเติบโตในสภาวะที่มีแสงอย่างต่อเนื่อง การให้ความเข้มแสงสูงอย่างต่อเนื่อง มีผลทำให้เซลล์มีสีซีดหรือปรากฏลักษณะสีเหลืองอมน้ำตาล

ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เม็ดสีถูกทำลาย และจากการศึกษาของ สรวิศ เผ่าทองสุข และคณะ (2538 ข) พบว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *D. salina* จะอยู่ในช่วง 5,000-15,000 ลักซ์

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อกลไกการควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป จะมีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชต่ำ อุณหภูมิต่ำจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร อุณหภูมิที่ต่ำมากๆจะทำให้การเคลื่อนที่ของคาร์บอนไดออกไซด์ไปยังใบหยุดชะงัก เซลล์ถูกทำลาย การสังเคราะห์แสงไม่เกิดขึ้น ส่วนอุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจมีผลทำให้เกิดการทำลายเอนไซม์ขึ้น ทำให้คาร์บอนไดออกไซด์เคลื่อนที่เข้าไปในใบได้น้อย อัตราการสังเคราะห์แสงจึงต่ำ อุณหภูมิที่พอเหมาะสำหรับการสังเคราะห์แสงอยู่ระหว่าง 30–35 องศาเซลเซียส และหยุดชะงักเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเรื่อยๆระหว่าง 0-35 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น (สัมพันธ์ คัมภิรานนท์ และ วรวรรณ ลิ่มทอง, 2526)

สาหร่ายแต่ละชนิดตอบสนองต่อช่วงอุณหภูมิแตกต่างกัน และทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงจำกัดต่างกัน การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเล็กน้อยจะมีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงแต่หากอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วประมาณ 10-15 องศาเซลเซียสหรือมากกว่าสาหร่ายจะไม่สามารถปรับตัวได้และจะชะงักการเติบโต จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการเติบโตและการแบ่งเซลล์ของ *Chlorella* sp. ในตอนกลางวัน *Chlorella* sp. จะเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่ตอนกลางคืนจะเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสส่วน *Chlorella* sp. ที่เลี้ยงในบ่อกลางแจ้ง พบว่าเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในตอนกลางวัน และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสในตอนกลางคืน (Richmond, 1986)

จากการศึกษาของ Borowitzka and Borowitzka (1988) พบว่าสาหร่าย *Dunaliella* sp.ส่วนใหญ่จะทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *D. salina* จะอยู่ในช่วงระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *D. viridis* จะอยู่ในช่วง 14-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะทำให้สาหร่ายตายได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *D. bioculata* และ *D. primolecta* จะอยู่ในช่วง 25-29 องศาเซลเซียส และ *D. tertiolecta* จะเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ความเป็นกรด-เบส (pH) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อสาหร่าย ค่าความเป็นกรด-เบสของสารอาหารมีผลต่อการเติบโตและกระบวนการเมตาโบลิซึมของสาหร่าย ก๊าซคาร์บอนได

ออกไซด์ในน้ำมีผลต่อปริมาณไฮโดรเนียมอิออน(H^+)ของน้ำ เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทำปฏิกิริยากับน้ำให้ H^+ ทำให้ความเป็นกรด-เบสของน้ำต่ำ เช่น ในบ่อที่มีการเติบโตของสาหร่ายจำนวนมากหรือในบ่อเลี้ยงปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงความกรด-เบส ในช่วงกว้างตั้งแต่ 6.5 ในช่วงก่อนพระอาทิตย์ขึ้น เนื่องจากมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ และสูงขึ้นเป็น 11 ในช่วงเวลาเย็น เมื่อคาร์บอนไดออกไซด์ถูกใช้ไปในการสังเคราะห์แสง สาหร่ายตอบสนองต่อความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสาหร่าย สำหรับ *Chlorella* sp. เติบโตได้ดีในค่ากรด-เบสช่วงกว้าง โดยทั่วไปสามารถเติบโตได้ดีในช่วงค่ากรด-เบสที่มีค่าเป็นกรดเล็กน้อยจนถึงเป็นกลาง และบางสายพันธุ์ เช่น *Chlorella homosphaera* เติบโตได้ดีที่ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6 (Richmond, 1986) นอกจากนี้ Borowitzka and Borowitzka (1988) พบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 9 เหมาะสมต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Dunaliella salina*

ธาตุอาหารเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับสาหร่าย คือ คาร์บอน ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส การดำรงชีวิตของสาหร่ายแบ่งเป็น 2 แบบ คือ autotrophy ซึ่งเป็นการที่สาหร่ายได้รับธาตุอาหารต่างๆ จากสารประกอบอนินทรีย์และได้รับพลังงานจากแสงหรือจากการออกซิเดชัน และอีกแบบ คือ heterotrophy เป็นการที่สาหร่ายได้รับสารอาหารและพลังงานจากสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งสังเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตอื่น ปริมาณธาตุอาหารที่พอเหมาะสำหรับสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ความหนาแน่นของสาหร่าย แสง อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบส (Richmond, 1986)

<u>แหล่งคาร์บอน</u>

คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย การเติมสารอาหารที่จำเป็นต่างๆมากขึ้นจะไม่มีผลทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นหากปริมาณคาร์บอนถูกจำกัด สาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน คาร์บอนที่พืชนำไปใช้แบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ อนินทรีย์คาร์บอน และอินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายใช้คาร์บอนประเภทอนินทรีย์ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายน้ำ หรือรูปคาร์บอเนต(CO_3^{2-})และไบคาร์บอเนต(HCO_3^-) การที่คาร์บอนจะอยู่ในรูปใดนั้นขึ้นอยู่กับระดับของความเป็นกรด-เบส เช่น ที่ความเป็นกรด-เบสระหว่าง 7-9 คาร์บอนจะอยู่ในรูปไบคาร์บอเนต เมื่อความเป็นกรด-เบส มีค่าสูงกว่า 9.5 ขึ้นไป คาร์บอนจะอยู่ในรูปคาร์บอเนต คาร์บอนจะอยู่ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อน้ำมีสภาพค่อนข้างเป็นกรด(เช่น ค่าความเป็นกรด-เบส ประมาณ 5) สาหร่าย *Dunaliella salina* ใช้สารอนินทรีย์คาร์บอน โดยการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ผสมในอากาศ จะกระตุ้นการเติบโตของ *D. salina* ซึ่งการเพิ่ม คาร์บอนไดออกไซด์ผสมในอากาศ จะทำให้ความเป็นกรด-เบสลดลง และมี

คาร์บอนไดออกไซด์ละลายในน้ำมากขึ้น ซึ่งจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสำหรับใช้ในการสังเคราะห์แสง (Borowitzka and Borowitzka, 1988)

สาหร่ายสามารถใช้คาร์บอนประเภทอินทรีย์ เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ (ซูโครส, กลูโคส, กาแลคโตส เป็นต้น)ช่วยในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งสาหร่ายแต่ละชนิดจะต้องการชนิดและปริมาณของสารประกอบคาร์บอนแตกต่างกัน โดยทั่วไปสาหร่ายต้องการอินทรีย์คาร์บอนเมื่ออยู่ในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) หรือในที่ไม่มีแสงสว่าง (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) จากการศึกษาของ Richmond (1986) พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการคาร์บอนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวเนื่องจากโดยทั่วไปจะเติบโตในน้ำที่มีความเป็นกรด-เบสค่อนข้างสูงประมาณ 8.5-11.0

<u>แหล่งไนโตรเจน</u>

ไนโตรเจน มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เซลล์สาหร่ายมีไนโตรเจนประมาณร้อยละ 7-10 ของน้ำหนักแห้ง ยกเว้นไดอะตอมซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น เนื่องจากซิลิกาเป็นธาตุที่สำคัญของผนังเซลล์ไดอะตอม ในสาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนเซลล์จะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้งมาทดแทน แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ของสาหร่ายได้แก่ ไนเตรท ไนไตรท์ และแอมโนเนียที่ละลายอยู่ในน้ำ โดยทั่วไปพบว่าสาหร่ายจะใช้แอมโมเนียหมดก่อนแล้วจึงใช้ไนเตรท(Richmond,1986) ถ้าแหล่งไนโตรเจนอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียเพียงอย่างเดียว จะทำให้ระดับค่ากรด-เบสของอาหารลดต่ำอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นอันตรายต่อสาหร่าย และถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุหรือสารสี (pigment) ของเซลล์ รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540; สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544)

ไนโตรเจนอินทรีย์ที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ เอมีน (amine) ยูเรีย (urea) กลูตามีน (glutamine) และแอสพาราจีน (asparagine) เป็นต้น การใช้ยูเรียให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้ไนเตรท และแอมโมเนีย ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่าย

<u>แหล่งฟอสฟอรัส</u>

ฟอสฟอรัสมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงานและกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิค แม้ว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีปริมาณสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัส แต่พืชต้องการใช้ฟอสฟอรัสในรูปของสารอนินทรีย์มากกว่า สารอินทรีย์ฟอสฟอรัสจะแตกตัวให้สารอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ได้แก่ ออโธฟอสเฟต (orthophosphate)ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะทำให้โปรตีน, คลอโรฟิลล์ เอ , RNA และ DNA ลดลง แต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย

ความเข้มของแสงสูง การขาดไนโตรเจน การขาดฟอสเฟต อุณหภูมิสูง และความเค็มสูง มีผลต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนจากสาหร่าย (Borowitzka and Borowitzka 1988; Choi *et al*., 2002) ภายใต้สภาวะเครียด เช่น ความเข้มแสงสูงและไนโตรเจนจำกัดในสาหร่ายสีเขียวประเภท *Chlorella zofingiensis, C. emersonii, Haematococcus pluvialis* และ *Ermosphera viridis* จะสะสม ketocarotenoid เช่น แคนต้าแซนทีน และแอสต้าแซนทีน โดยจะสะสมในส่วนที่เป็นไขมัน (lipid bodies) ภายนอกคลอโรพลาสต์ ส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง เช่นเดียวกับ *Trentepohlia aurea* และ *Dunaliella bardawil* จะสะสมเบต้าแคโรทีนในปริมาณมากเมื่อเติบโตภายใต้สภาวะเครียด (Orset and Young, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับ Hanagata and Dubinsky (1999) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus komarekii* ภายใต้ความเข้มแสงสูงและจำกัดไนโตรเจน จะทำให้สีของเซลล์ซึ่งมีสีเขียวถึงสีน้ำตาล เปลี่ยนไปเป็นสีส้มถึงสีแดงและพบการสะสมของแอสต้าแซนทีนและแคนต้าแซนทีน

ความเข้มแสงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการสะสมเบต้าแคโรทีน โดยสาหร่าย *Dunaliella salina* จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น 4.5-10 เท่า เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นส่วนคลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ บี จะลดลงเมื่อความเข้มแสงมากจนถึงจุดอิ่มตัว Borowitzka and Borowitzka (1988) นอกจากนี้ความเข้มแสงยังมีผลต่อสัดส่วนของ 9-cis β-*carotene และ all–trans* β-carotene ที่ *D. salina* โดยพบว่าที่ความเข้มแสงต่ำ (20-50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) สัดส่วนของ 9-cis และ all-trans β-carotene จะมากกว่า 2:1 ขณะที่ความเข้มแสงสูง (200–1,250 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) สัดส่วนของ 9-cis และ all-trans β-carotene จะน้อยกว่า 0.45 : 1 อย่างไรก็ดีไอโซเมอร์ทั้งสองของเบต้าแคโรทีนจะมีสัดส่วนมากหรือน้อยขึ้นกับไฟโตอีนและไลโคพีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเบต้าแคโรทีนด้วย (Orset and Young, 2000) Rabbani *et al*. (1998) ได้ทำการศึกษาการชักนำการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนใน *D. bardawil* โดยใช้สภาวะที่มีความเข้มแสงสูง และสภาวะการขาดอาหาร พบว่า *D. bardawil* ผลิตเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่สูงมาก โดยจะสะสมอยู่ในพลาสติดในรูปเม็ดไขมัน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ร่วมกัน

Hagen *et al*. (2000) ศึกษาการสะสมแอสต้าแซนทีน ใน *Haematococcus pluvialis* ระยะที่มีแฟลกเจลลา พบว่ามีการสะสมแอสต้าแซนทีนเกิดขึ้นภายใต้สภาวะขาดไนโตรเจนร่วมกับการให้ความเข้มแสงสูง โดยอัตราสูงสุดของการสังเคราะห์แอสต้าแซนทีน เท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมง ในขณะเดียวกันหลังจากจำกัดไนโตรเจน และให้ความเข้มแสงสูงเป็นเวลาหนึ่งวันครึ่ง มีอัตราสูง

สุดของการแบ่งเซลล์ เท่ากับ 0.027 ต่อชั่วโมง และการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เท่ากับ 0.015 ต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตาม Rise *et al*. (1994) ได้ศึกษาการสะสมแอสต้าแซนทีน ใน *Chlorella emersonii* เติบโตภายใต้ความเข้มแสงสูง 300 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และขาดแหล่งไนโตรเจนจะทำให้สาหร่ายมีการสะสมแอสต้าแซนทีนมากที่สุด คือ 0.78 พิโคกรัมต่อเซลล์

นอกจากนี้ สรวิศ เผ่าทองสุข (2536) ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ที่ความเข้มแสง 5,000, 10,000 และ 15,000 ลักซ์ พบว่า *D. salina* มีอัตราการเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงสูงขึ้นและเซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีส้ม สอดคล้องกับ Ben-Amotz and Avron (1983) พบว่า *D. bardawil* เมื่อได้รับความเข้มแสงสูงหรือถูกยับยั้งการเติบโตมีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อเซลล์ลดลง และปริมาณเบต้าแคโรทีนต่อเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้อัตราส่วนระหว่างเบต้าแคโรทีนต่อคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.4 เป็น 13 กรัม/กรัมของเบต้าแคโรทีนต่อคลอโรฟิลล์ สีของเซลล์จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้ม จากการศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการเกิดซีสต์ของสาหร่ายสีเขียว *H. pluvialis* NIES144 ของจินตนา ดาราฉาย และคณะ (2539) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *H. pluvialis* NIES144 ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน Bold's basal medium ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่ากรด-เบส 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ เซลล์ปกติจะสร้างซีสต์ ภายใน 5-7 วัน โดยเซลล์มีลักษณะกลม ไม่เคลื่อนที่ มีสีแดง เนื่องจากมีการสะสมแอสต้าแซนทีน และมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติประมาณ 4 เท่า เมื่อทำให้แห้งโดยวิธี freeze drying จะมีแอสต้าแซนทีน สะสมอยู่ประมาณ 1-2% ของน้ำหนักแห้ง สอดคล้องกับ Fan *et al*. (1994) พบว่า การเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* ที่ความเข้มแสง 50, 100, 200 และ 400 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ในสูตรอาหาร BG-11 สาหร่ายจะสะสมแอสต้าแซนทีนสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง 400 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่วน Tjahjono *et al*. (1994) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *H. pluvialis* NIES-144 ที่ความเข้มแสง ระหว่าง 68-125 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับการสร้างแอสต้าแซนทีน จากการศึกษาของ Dominguez-Bocanegra *et al*. (2004) พบว่า เมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *H. pluvialis* ที่ความเข้มแสง 345 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร BAR ที่มีโซเดียมอะซิเตท 1 กรัมต่อลิตร สาหร่ายจะสะสมแอสต้าแซนทีนสูงที่สุดเท่ากับ 98 มิลลิกรัมต่อกรัม

ในการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบหรือการจำกัดปริมาณของธาตุอาหารบางชนิด อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของสาหร่ายได้ โดยในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่ขาดธาตุอาหารไนโตรเจน จะทำให้สาหร่ายผลิตเบต้าแคโรทีนสูงขึ้นกว่าปกติ จากการศึกษาของ Ben-Amotz and Avorn (1983) พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่าย *D. bardawil* โดยให้ปริมาณไนเตรทช่วง

0-1 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายจะสะสมเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้นตามลำดับ และจากการศึกษาของ สรวิศ เผ่าทองสุข (2536) พบว่า การลดปริมาณไนเตรทจะทำให้อัตราการเติบโตลดลงแต่ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น โดยพบว่าแคโรทีนอยด์เกือบทั้งหมด (98%) คือ เบต้าแคโรทีน โดยเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ที่ระดับความเข้มข้นของโปแตสเซียมไนเตรท 0.1 กรัมต่อลิตร(10% ของสูตร J/L) และความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ สาหร่าย *D. salina* สามารถสะสมแคโรทีนอยด์ได้ถึง 137.2 พิโคกรัมต่อเซลล์ หรือ 12% เบต้าแคโรทีนต่อน้ำหนักแห้งที่ปราศจากเถ้า (ash free dry weight) จากการศึกษาของ Harker *et al*. (1996) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* CCAP 34/7 ในอาหารสูตร modified BBM ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 0 , 0.75 , 1.5 มิลลิโมลาร์ สาหร่าย *H. pluvialis* CCAP 34/7 จะสะสมแอสต้าแซนทีนสูงขึ้น แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 3.0 และ 6.0 มิลลิโมลาร์ สาหร่าย *H. pluvialis* CCAP 34/7 จะสะสมแอสต้าแซนทีนลดลง

นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองถึงการจำกัดธาตุอาหารบางชนิด เช่น ฟอสเฟตและ ซัลเฟต พบว่า สาหร่าย *Dunaliella* ที่ขาดแหล่งฟอสเฟต จะมีอัตราการเติบโตต่ำ แต่ปริมาณของ เบต้าแคโรทีนจะมีการสะสมมากขึ้นแม้จะมีการจำกัดปริมาณฟอสเฟตหรือไม่ก็ตาม ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดลง (Phadwal and Singh, 2003) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับในสาหร่ายสีเขียว *H. pluvialis.* จะมีการสะสมแอสต้าแซนทีนสูงขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{2+} ก็จะมีผลกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมคีโตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น (Dominguez-Bocanegra *et al*., 2004; Harker *et al*., 1996) นอกจากแหล่งไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสจะมีผลต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนแล้ว ยังพบว่าการจำกัดแหล่งซัลเฟตจะทำให้ปริมาณโปรตีนและเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella* และสาหร่าย *H. pluvialis.* เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดลง (Phadwal and Singh, 2003; Salguero, *et al.,* 2003)

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสะสมเบต้าแคโรทีน และควบคุมการเติบโต การกระจาย การสืบพันธุ์ของสาหร่าย สาหร่ายน้ำจืดเกือบทุกชนิดเติบโตได้ดีที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 15 – 25 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะตาย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) Borowitzka และ Borowitzka (1988) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *D. viridis* จะอยู่ในช่วง 14-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะทำให้สาหร่ายตายได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *D. bioculata* และ *D. primolecta* จะอยู่ในช่วง 25-29 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย *D. salina* จะอยู่ในช่วง 20-40 องศาเซลเซียส และ *D. tertiolecta* จะเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

Tjahjono *et al*. (1994) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียว *H. pluvialis* NIES-144 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) ที่ความเข้มแสง 26 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30,33,35 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปริมาณแคโรทีนอยด์แทบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนจำนวนเซลล์จะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงจาก vegetative cell ไปเป็น resting spore เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส การเติบโตของสาหร่ายจะช้าลง ขณะที่การสะสมแคโรทีนอยด์ เพิ่มขึ้น 2.5 ถึง 3 เท่า (19 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 22.6 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 30 และ 33 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (8 มิลลิกรัมต่อลิตร) และจากการศึกษาของ Fan *et al*. (1994) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* ในสูตรอาหาร BG-11 ที่อุณหภูมิ 20, 22, 25, 28, 31 และ 33 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการเติบโตจะลดลง และเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 50, 100, 200 และ 400 ไมโครโมลควอนต้าต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่ายจะสะสมแอสต้าแซนทีน มากที่สุดที่ความเข้มแสง 400 ไมโครโมลควอนต้าต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยตารางที่ 2 แสดงผลของอุณหภูมิต่อปริมาณแอสต้าแซนทีน ของสาหร่าย H. *pluvialis* สายพันธุ์ต่างๆ

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณแอสต้าแซนทีน ของสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* สายพันธุ์ต่างๆ

สาหร่าย	อุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง (°C)	ปริมาณแอสต้าแซนทีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
H. pluvialis NIES 144	20	22	Kobayashi *et al*. (1993)
H. pluvialis NIES 144	30	50	Tjahjono *et al*. (1994)
H. pluvialis CCAP 34/7	25	19	Cordero *et al*. (1996)
H. pluvialis CCAP 34/7	22	50	Harker *et al*. (1996)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ และปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* sp. (PSU/CHL20)

2. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของโปแตสเซียมไนเตรทต่อการเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ และปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* sp. (PSU/CHL20)

3. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ปริมาณแคโรทีนอยด์ และปริมาณเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *Chlorosarcinopsis* sp. (PSU/CHL20)