รายงานการวิจัย

กระบวนการต้นแบบในการผลิตแอสตาแซนทินจากสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส
เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง

Processing Prototype of Astaxanthin Production from *Haematococcus*

Microalgae as an Active Ingredient in Cosmetics

ผศ.ดร.ทัศนภา ว่องสนั่นศิลป์	Tasanapa Wongsanansilp
ดร.วิกิจ ผินรับ	Wikit Pinrab
ผศ.มาโนช ขำเจริญ	Manoch Khamchareon
นายจรัญ บุญรงค์	Charan Boonrong

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชมงคลศรีวิชัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการประเมินความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาให้เกิดประโยชน์ ตลอดจนผลการวิจัยสามารถใช้เป็นแนวทางส่งเสริมให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาตินำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย พร้อมทั้งสถาบันเครือข่ายทุกสถาบันผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และ เครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนสถานที่ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่อุทิศกำลังกายและกำลังใจช่วยในการวิจัยครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาส นี้

ผศ.ดร.ทัศนภา ว่องสนั่นศิลป์

บทคัดย่อภาษาไทย

ในการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* สาหร่ายถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มข้นของแสง 4 ระดับ คือ 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ลักซ์ โดยเริ่มจากความหนาแน่นเซลล์ 5.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในวันแรกของการบ่มเชื้อ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของแสง 10,000 ลักซ์เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยทำให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ 54.03×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12 หลังการบ่มเชื้อ อัตราการเจริญของสาหร่ายตั้งแต่วันที่ 18 เป็นต้นไปมีแนวโน้มลดลง ด้วยเพราะการลดลงของสารอาหารที่จำเป็น ส่วนความเข้มแสงที่สูงกว่า 10,000 ลักซ์ส่งผลให้สาหร่ายชะลอการเจริญเติบโตและไปยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุคลอโรฟิลล์ ความเข้มของแสงสูงส่งผลให้เซลล์สาหร่ายเกิดสภาวะเครียดและสังเคราะห์รงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์แทนที่คลอโรฟิลล์ อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อบีในครั้งนี้อยู่ในระดับประมาณ 2: 1 ในทุกระดับความเข้มแสง ในส่วนของการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม จึงได้เพาะเลี้ยง *Haematococcus* ที่ระดับความเข้มข้นไนเตรท 1.0 3.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ จากความหนาแน่นเซลล์ 10×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ 62.22×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 12 วัน ผลจากการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะพบว่าที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดคือ 0.198 ± 0.005 ต่อวัน สาหร่ายใช้เวลา 3.50 ± 0.08 วัน ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้เป็นสองเท่าจากจำนวนเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 1.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ หลังการบ่มเชื้อได้ 12 วัน และพบแอสตาแซนทินสูงสุด 0.376 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 20 ผลการเก็บน้ำหนักแห้งสาหร่ายได้มีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* ในถัง 6 ลิตรจำนวน 20 ใบ จนกระทั่งสาหร่ายตกตะกอน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 21 วัน ได้ผลผลิตสาหร่ายในรูปของน้ำหนักแห้ง 0.095 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: แอสตาแซนทิน, ฮีมาโตคอกคัส, สารต้านอนุมูลอิสระ, เครื่องสำอาง

Abstract

The effects various factors were studied on *Haematococcus*. Algae was cultured in modified BBM medium for 24 days under four levels of light intensity: 5,000, 10,000, 15,000 and 20,000 lux. Alga were inoculated in media with cell density of 5.0×10^5 cells/ml on the first day of treatment. The optimum light concentration for this study was 10,000 lux; The maximum cell density of 54.03×10^5 cells/ml was determined within 12 days after incubation. The growth rate of algae from the 18^{th} day onwards tended to decrease, due to deficiency of essential nutrients. The light intensity above 10,000 lux could slow down the algal growth and also inhibited the synthesis of chlorophyll. At high light intensity, the algae cells could get stressed and synthesized carotenoid pigments instead of chlorophyll. However, the ratio of chlorophyll A to B was approximately 2:1 for all light intensity levels. For the study of appropriate nitrogen concentrations, *Haematococcus* were cultured in BBM media containing 1.0, 3.0 and 10.0 mM of nitrate, with the initial cell density of 10×10^3 cells/ml. It was found to be that nitrate concentration of 10.0 mM provided a maximum cell density of 62.22×10^3 cells/ml, at 12 days of incubation. The specific growth rate study showed that at a light intensity of 10,000 lux, was the highest of 0.198±0.005 per day. The algae took 3.50±0.08 days to double the number of cells from original number. Moreover, algal cells cultured in light intensity of 10,000 lux were able to accumulate 1.11 mg/L of carotenoids at 12 days after incubation and accumulated 0.376 mg/L of astaxanthin on the 20^{th} day. To determine *Haematococcus* dried weight production, algae were cultured in 20 six-liter tanks until the algae settled, which took about 21 days. The yield was about 0.095 g/l of algae on dried weight basis.

Keywords: astaxanthin, *Haematococcus*, antioxidant, cosmetics

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ก
บทคัดย่อภาษาไทย ข
บทคัดย่ออังกฤษ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง จ
สารบัญภาพ ฉ
1. บทนำ 1
    1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
    1.2 หลักการแนวคิด ทฤษฎี หรือสมมุติฐาน 1
    1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ 10
    1.4 กรอบแนวคิดวิจัย 10
    1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 10
2. วิธีการดำเนินการวิจัย 11
    2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส 11
    2.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง 13
    2.3 แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ 13
    2.4 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน 14
3. ผลการวิจัย และอภิปรายผล 15
    3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส 15
    3.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง 25
    3.3 แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ 29
    3.4 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน 30
4. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 32
5. เอกสารอ้างอิง 34

สารบัญตาราง

ตารางที่

1	ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มมวลชีวภาพ *Haematococcus* sp. โดย Wongsing *et al*. (2018)	5
2	สูตรอาหารและเงื่อนไขวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* spp. เพื่อให้ได้มวลชีวภาพและแอสตาแซนทินสูงที่สุด สรุปโดย Oslan *et al*. (2021)	6
3	อัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาความหนาแน่นเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าสำหรับการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร BBM เป็นเวลา 24 วัน	26
4	น้ำหนักแห้ง และปริมาณแอสตาแซนทินจากการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 3 ระดับ	27
5	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี แคโรทีนอยด์จากการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 4 ระดับ	28

สารบัญภาพ

ภาพที่

1 ผลของความเข้มข้นไนเตรทต่อน้ำหนักแห้งสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส 15

2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแสงต่อความหนาแน่นเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส 17

3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส 18

4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส 19

5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 15,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส 20

6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส 21

7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคโรทีนอยด์รวม จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 5,000 – 20,000 ลักซ์ 22

สารบัญภาพ (ต่อ)

8	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไนเตรทต่อปริมาณแอสตาแซนทิน จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส	23
9	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอสตาแซนทินต่อน้ำหนักแห้ง จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ความเข้มข้นไนเตรท 3 ระดับ ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส	24
10	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนโตรเจนกับความหนาแน่นเซลล์ จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส โดยเริ่มต้นจากความหนาแน่นเซลล์ 10×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร	25
11	ภาพรวมกิจกรรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ชุมชนแหลมขาม อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง	31

1. บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สิ่งที่ทำให้แอสตาแซนทินมีบทบาทในปัจจุบันคือ อนุมูลอิสระที่มากับรังสีอัลตร้าไวโอเล็ตหรือรังสียูวี อันเป็นผลพวงหนึ่งจากมลภาวะและสภาวะโลกร้อน รังสีชนิดนี้เป็นอันตรายต่อชีวิตและสุขภาพของทั้งคนและสัตว์ (ดวงจันทร์, 2557) เป็นสาเหตุหลักของการสะสมอนุมูลอิสระตามร่างกายของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากรังสียูวีเป็นส่วนหนึ่งของแสงแดด การได้สัมผัสกับแสงแดดโดยตรงจึงมีโอกาสได้รับอนุมูลอิสระมากกว่า สาเหตุอื่นของอนุมูลอิสระที่นอกเหนือจากรังสียูวีคือ การสัมผัสมลสารอื่นๆ อย่างเช่น โอโซนที่เกิดจากอุตสาหกรรม ตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งทางผิวหนัง หายใจ และกินเข้าไปอย่างไม่ตั้งใจ รวมทั้งความเครียดในชีวิตประจำวัน ก็เป็นสาเหตุของการเกิดการสะสมสารอนุมูลอิสระ ปัจจุบันนี้อาหารเสริมและเครื่องสำอางต้านอนุมูลอิสระจึงได้รับความนิยม เพื่อลดอันตรายจากอนุมูลอิสระที่เกิดกับร่างกาย จากรายงานในปี 2008 ตลาดเครื่องสำอางของประเทศไทยมีมูลค่าทั้งสิ้น 250 พันล้านบาท โดยมีมูลค่าจากผู้ใช้ในประเทศมากถึง 150 พันล้านบาท และมีแนวโน้มที่เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นทุกปี (Jinachai *et al.*, 2016) แอสตาแซนทินเป็นวัตถุดิบอีกหนึ่งอย่างที่นำเข้ามา เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านเครื่องสำอาง และอาหารเสริม เนื่องจากแอสตาแซนทินเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระแบบเดียวกับแคโรทีนอยด์ประเภทอื่น แต่เมื่อเทียบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มแคโรทีนอยด้วยกันของแอสตาแซนทินมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้สูงมาก ปัจจุบันสารตัวนี้กำลังได้รับความสนใจในวงการอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ ปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสนใจในการใช้เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมจากธรรมชาติมาก เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมี จึงเป็นโอกาสอันดีที่ประเทศไทยจะได้นำทรัพยากรที่มีอยู่อย่างมากมายมาศึกษาและพัฒนาต่อไป เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากร และเป็นการนำทรัพยากรที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด

1.2 หลักการแนวคิด ทฤษฎี หรือสมมุติฐาน

แคโรทีนอยด์เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โมเลกุลของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยแหวนเทอร์พีนสี่วงต่อกัน แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุเสริมเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วยแสงทั้งในแบคทีเรีย เห็ดรา สาหร่าย พืช และสัตว์ มีรายงานสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ไม่ต่ำกว่า 850 ชนิดในธรรมชาติ แต่มีเพียงแบคทีเรีย เห็ดรา สาหร่ายและพืชเท่านั้นสามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ขึ้นมาได้โดยปฏิกิริยาเมทาบอลิซึม ในขณะที่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้ได้จึงต้องรับเข้ามาโดยวิธีกินสิ่งมีชีวิตที่ผลิตหรือสะสมแคโรทีนอยด์ ในปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วยแสง แคโรทีนอยด์ทำงานร่วมกับคลอโรฟิลล์ทำหน้าที่เก็บ

เกี่ยวพลังงานแสงในส่วนความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์ไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ แล้วส่งพลังงานกลับมายังคลอโรฟิลล์ที่เป็นศูนย์กลาง คุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญอีกอย่างของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์คือ มีความสามารถละลายในไขมันและตัวทำละลายไขมันทั้งประเภทที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ในเวลาเดียวกัน แคโรทีนอยด์เกือบทั้งหมดไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แคโรทีนอยด์แบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ แคโรทีนและแซนโทฟิลล์ แคโรทีนเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วย C กับ H เท่านั้น แกนมีโครงสร้างเป็นอะตอมคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาวพันธะเดี่ยวสลับพันธะคู่ ปลายทั้งสองขดเป็นวงแหวนที่เรียกว่า ไอโอโนน (ionone) ส่วนแซนโทฟิลล์เป็นแคโรทีนอยด์ที่มีแกนไฮโดรคาร์บอนเหมือนกับแคโรทีน แต่ส่วนปลายทั้งสองข้างที่เป็นวงแหวนมีหมู่ไฮดรอกซิลติดอยู่ ซึ่งแอสตาแซนทินก็เป็นแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแซนโทฟิลล์ (Maoka, 2020)

แอสตาแซนทินมีชื่อทางเคมี 3,3’-dihydroxy- β, β -carotene-4,4’-dione (Maoka, 2020) ประกอบด้วยไอโซพรีนอยด์ 8 หน่วยเชื่อมกันเป็นโมเลกุลเดียว จึงมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 40 อะตอม เนื่องจากเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์ จึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงมากและมีประสิทธิภาพที่สุดในโลกเมื่อเทียบกับวิตามิน, เบต้าแคโรทีนและสารอื่นๆ เช่นเดียวกับสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป แอสตาแซนทินเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ตามธรรมชาติทำให้เซลล์มีสีแดงสดใส รวมทั้งสีแดงของเปลือกและขนในสัตว์หลายชนิด (Li *et al*., 2019) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอันเกิดจากแสงแดดและมลภาวะ มีส่วนช่วยปกป้องร่างกายและผิวพรรณให้คงความอ่อนเยาว์ สารแอสตาแซนทินตัวนี้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางหรืออาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้ แอสตาแซนทินสามารถสกัดได้จากสาหร่ายจุลินทรีย์ พืชและสัตว์อีกหลายชนิด ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scendesmus vacuolatus* และสาหร่ายสีแดง *Catenella repens* รวมทั้งมีรายงานพบการสังเคราะห์ในยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ซึ่งเป็นยีสต์กลุ่ม Basidiomycota แบคทีเรีย *Agrobacterium aurantiacum*, พืชกลุ่มทานตะวัน *Adonis aestivalis*, ในสัตว์อีกหลายชนิดมักเป็นสัตว์ขาข้อรวมไปถึง *Euphausia pacifica*, *Euphausia superba* and *Pandalus borealis* (Lobo *et al*., 2010)

สาหร่ายฮีมาโตคอกคัส เป็นสาหร่ายสีเขียวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Haematococcus pluvialis* เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถผลิตแอสตาแซนทินได้ในปริมาณสูงที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ทุกชนิดจากข้อมูลที่มีอยู่ในปี 2022 สาหร่าย *Haematococcus* มีอยู่หลายชนิดหลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตแอสตาแซนทินครั้งนี้คือ *Haematococcus* sp. ที่พบตามแหล่งน้ำจืดในจังหวัดนครศรีธรรมราช มีขนาดอยู่ระหว่าง 8-10 ไมโครเมตร (μm) ในระยะไมโครซูออยด์ (micro-zooid) สาหร่ายที่อยู่ในระยะตั้งแต่มาโครซูออยด์ (macro-zooid) เป็นต้นไป ขนาดของเซลล์โดยเฉลี่ย

22 ไมโครเมตร หากถูกกระตุ้นด้วยสภาวะเครียด สาหร่ายระยะมาโครซูออยด์จะเริ่มสะสมแอสตาแซนทิน แล้วเข้าสู่ระยะอะพลาโนสปอร์ (aplanospore) ซึ่งเซลล์จะกลายเป็นสีแดงมีเปลือกแข็งหุ้ม แต่ถ้าไม่ถูกกระตุ้นด้วยสภาวะเครียด สาหร่ายจะแบ่งเซลล์เป็น 2, 4, 8, 16 หรือ 32 เซลล์ขึ้นอยู่กับสถานการณ์ แต่ละเซลล์จะเจริญเป็นไมโครซูออยด์รุ่นใหม่ สะสมอาหารเป็นมาโครซูออยด์ต่อไป (Li *et al*., 2019)

แอสตาแซนทิน (3,3’-dihydroxy- β, β -carotene-4,4’-dione) เป็นรงควัตถุแคโรทีนอยด์ถ้าพบในสัตว์ทะเลมักเป็นกลุ่มสัตว์ขาข้อที่มีเปลือกเช่น กุ้ง กั้ง และปู ทำให้เกิดสีแดงหรือชมพูในสัตว์ขาข้อพวกนั้น นอกจากนั้นยังพบในหอยหรือหมึก รวมทั้งสีส้มของเนื้อปลาในกลุ่มแซลมอนหรือเทร้าท์ก็เป็นผลมาจากแอสตาแซนทิน (Stachowiak and Szulc, 2021) แม้สัตว์จำพวกนี้จะมีแอสตาแซนทินในตัวที่มีปริมาณสูง แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าพวกมันสามารถผลิตแอสตาแซนทินขึ้นมาเองได้ ตรงกันข้ามสารสีแคโรทีนอยด์ตัวนี้จะต้องได้รับมาผ่านทางอาหาร หน้าที่อันหลากหลายด้านเชิวภาพของแอสตาแซนทินนี้รวมไปถึงการป้องกันมะเร็ง โดยการหนุนเสริมระบบตอบสนองภูมิคุ้มกัน (Fraser *et al*., 1997) ดังนั้นสิ่งนี้จึงเป็นหลักฐานว่า แอสตาแซนทินเป็นโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพทั้งทางด้านเภสัชศาสตร์และอุตสาหกรรมอาหาร แอสตาแซนทินเป็นกลุ่มของสารประกอบที่รู้จักกันในชื่อแซนโทฟิลล์ พวกนี้คือแคโรทีนอยด์ที่ได้รับการดัดแปลงในส่วนของหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจน แซนโทฟิลล์พบทั่วไปในเนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ที่มีคลอโรพลาสต์เป็นส่วนประกอบ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์แอสตาแซนทินถูกจำกัดเฉพาะในสิ่งมีชีวิตกลุ่มจุลินทรีย์ ยกตัวอย่างเช่น ยีสต์ (*Phaffia rhodozyma*) สาหร่ายน้ำจืดรวมทั้ง *Haematococcus pluvialis* และแบคทีเรียน้ำเค็ม *Agrobacterium aurantiacum* และ *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ PC-1 เมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการค้นพบและแยกยีนสังเคราะห์แอสตาแซนทินและสารระหว่างกลางของมัน นำไปสู่การค้นพบวิถีการสังเคราะห์ทางชีวภาพของมัน วิถีการสังเคราะห์จึงได้ถูกนำเสนอมาในสภาพที่ขาดเอนไซม์จำเพาะซึ่งต้องคาดเอาจากงานวิจัยศึกษาอื่น การเติมหมู่ไฮดรอกซิลของเบต้าแคโทตินที่ตำแหน่ง 3 และ 3’ บนแหวนเบต้าไอโอโนนทำให้เกิดซีเอแซนทินผ่านทางเบต้าคริพโทแซนทินได้รับการคาดเดาว่าเป็นผลงานของยีนที่มีชื่อว่า *crtZ* ที่แยกมาจาก *Erwinia* หลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียน้ำเค็มด้วย การเปลี่ยนไปโดยตรงของกลุ่มเมทิลีนเป็นคีโทที่ตำแหน่ง 4 และ 4’ ของแหวนเบต้าไอโอโนน ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปกลายเป็นแคนธาแซนทินผ่านการแซนโทฟิลล์จำพวกเอไคโนนเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการควบคุมของยีน *crt*W ที่พบในแบคทีเรียน้ำเค็ม และยีน *bkt* ของ *Haematococcus pluvialis* ถ้าเปรียบเทียบโดยอนุมานจากลำดับกรดอะมิโนแสดงให้เห็นความคล้ายคลึงกันระหว่างยีน *crt*Z ที่มาจากแบคทีเรียน้ำเค็มชื่อว่า *A. aurantiacum* และ *Alcoligenea* ว่า มีความใกล้เคียงกับยีน *crt*W ในสกุล *Erwinia* ถึง 54% (Fraser *et al*., 1997)

ประโยชน์ของแอสตาแซนทิน

1) ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์และมนุษย์ ในเนื้อปลาแซลมอนพบสารแอสตาแซนทินปริมาณที่สูง รวมทั้งเปลือกกุ้งและปู อย่างไรก็ตามเปลือกกุ้งและปูมีสิ่งเจือปนอย่างอื่นรวมทั้งสารกระตุ้นภูมิแพ้ ดังนั้นเนื้อปลาแซลมอนหรือปลาเทร้าท์เหมาะสมเป็นแหล่งแอสตาแซนทินมากกว่า

2) ใช้เป็นแหล่งให้สีในอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอาหารของสัตว์น้ำทะเล ได้แก่ ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ ปลาทะเลอื่นๆ และกุ้ง จำเป็นต้องมีแอสตาแซนทินผสมอยู่ โดยสารแอสตาแซนทินนั้นมีความสำคัญหลายประการ ได้แก่ ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันจำเป็นไม่อิ่มตัว ป้องกันผลกระทบจากรังสียูวี ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เพราะสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินได้เอง อาหารสำหรับสัตว์จึงต้องมีการเติมแอสตาแซนทินลงไป เพื่อให้ได้สีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แอสตาแซนทินที่ใช้สำหรับสัตว์มักมาจากกุ้งเคย ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำมันในปริมาณสูงส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากแอสตาแซนทินละลายในน้ำมันได้ดี (Guerin *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005; Orosa *et al.*, 2005; Goa *et al.*, 2012)

3) ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารเสริมและเครื่องสำอาง ด้วยคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนทินที่สูงกว่าสารอื่นจึงได้มีการนำมาผสมในเครื่องสำอางหรือนำมาทำเป็นอาหารเสริมแคปซูล ยังไม่มีรายงานความเป็นพิษของแอสตาแซนทินในมนุษย์ รวมทั้งการทดลองแอสตาแซนทินในหนูก็ยังไม่ปรากฏผลการเกิดพิษในสัตว์พวกนั้น อย่างไรก็ตามก็ยังไม่อาจยืนยันได้ว่า การบริโภคแอสตาแซนทินต่อเนื่องกันเป็นระยะยาวนานมีผลตกค้างต่อร่างกายหรือไม่อย่างไร หนูทดลองที่ได้รับแอสตาแซนทินมีน้ำหนักตัวลดลงเล็กน้อย และกินอาหารน้อยลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ (Katsumata *et al.*, 2014)

แอสตาแซนทินมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระในด้านชะลอวัย โดยการไปจับที่เยื่อหุ้มเซลล์หรือองค์ประกอบเซลล์ที่เป็นเยื่อหุ้ม ช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งตามธรรมชาติของเยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเข้าหาได้ทั้งน้ำและไขมัน ทำให้เยื่อหุ้มมีความสามารถจับอนุมูลอิสระที่มาทั้งในน้ำแลไขมัน นอกเหนือจากนี้แอสตาแซนทินยังมีบทบาทช่วยป้องกันไม่ให้ไมโตคอนเดรียจากถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ ช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเลือด มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบได้อย่างดี อีกทั้งช่วยลดการทำลายของดีเอ็นเอและยังสามารถดูดซึมแสงช่วยป้องกันการเกิด Photooxidative damage โดยการปกป้องจาก Oxidation และจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่เป็นสาเหตุหลักของริ้วรอยและผิวขาดความชุ่มชื้นอันเป็นที่มาของความชรา แอสตาแซนทินเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ มีบทบาทสำคัญในการรักษาสุขภาพและเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง ทั้งนี้โดยปกติร่างกายของมนุษย์เราสามารถเปลี่ยนแอสตาแซนทินไปเป็นวิตามินเอได้ตามปริมาณที่ร่างกายต้องการ วิตามินเอก็เป็นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกตัวหนึ่ง ดังนั้นประโยชน์ของแอสตาแซนทินคือ ช่วยดูแลรักษาผิวพรรณ ชะลอความ

แก่ เพราะแอสตาแซนทินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยลดความเสื่อมของเซลล์จากอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดกระบวนการแก่ ช่วยบำรุงสุขภาพของดวงตา แอสตาแซนทินเมื่อโดนย่อยสลายที่ตับจะได้วิตามินเอ ซึ่งร่างกายนำวิตามินเอไปใช้สร้างสารโรดอปซินในดวงตาส่วนเรตินา ทำให้ตามีความสามารถในการมองเห็นในตอนกลางคืนได้ และยังลดความเสี่ยงของเซลล์ลูกตา ลดความเสี่ยงต่อการเป็นต้อกระจกด้วย (ดวงจันทร์, 2557)

ในการเพาะสาหร่ายให้ได้น้ำหนักแห้งมากที่สุด Göksan *et al* (2011) รายงานว่าหากใช้ BG11 ความเข้มแสง 75 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที $NaNO_3$ 1.5 กรัมต่อลิตร ในโหลขนาด 1 ลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้แหล่งของไนโตรเจนต่างกัน พบว่าการใช้ NH_4NO_3 0.25 กรัมต่อลิตร ให้มวลชีวภาพสูงสุด 1.25 กรัมต่อลิตร

ในขณะที่ Sipaúba-Tavares *et al*. (2015) รายงานว่าถ้าอาหารสูตร WC เป็นเวลา 28 วัน อุณหภูมิ 21±0.9 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที ได้แอสตาแซนทินสูงสุด 0.03±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักแห้งต่อเซลล์สูงสุด ความหนาแน่นเซลล์ $1.1\pm0.6\times10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ 0.15

ในขณะที่ Wongsing *et al*. (2018) ได้ศึกษาวิธีการเพิ่มมวลชีวภาพโดยใช้อาหารสูตรต่างๆ พบว่า BG11 เป็นอาหารที่เหมาะสมกับการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุด ที่ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน สาหร่ายเพิ่มมวลชีวภาพจาก 0.07 เป็น 0.32 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหารต่อการเพิ่มมวลชีวภาพ *Haematococcus* sp. โดย Wongsing *et al*. (2018)

ระยะเวลา (วัน)	BG11		BBM		CA		N8	
	Biomass (g/L)	Abs_{680}	Biomass (g/L)	Abs_{680}	Biomass (g/L)	Abs_{680}	Biomass (g/L)	Abs_{680}
0	0.07±0.01	0.10±0.00	0.07±0.01	0.10±0.00	0.07±0.01	0.10±0.00	0.07±0.01	0.10±0.00
7	0.10±0.00	0.10±0.01	0.10±0.01	0.13±0.01	0.09±0.01	0.13±0.01	0.10±0.01	0.13±0.02
14	0.13±0.00	0.14±0.02	0.13±0.01	0.16±0.01	0.11±0.01	0.13±0.00	0.12±0.01	0.13±0.01
21	0.25±0.00	0.37±0.02	0.16±0.01	0.21±0.03	0.18±0.00	0.25±0.04	0.21±0.00	0.27±0.03
28	0.32±0.11	0.33±0.01	0.24±0.00	0.27±0.02	0.22±0.00	0.31±0.02	0.26±0.02	0.44±0.04

ส่วน Wu *et al* (2021) รายงานว่า หากเติม CO_2 ลงในอาหารให้ได้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 4 และ 8 มิลลิโมลาร์ จะได้มวลชีวภาพสูงสุด 0.10 กรัมต่อลิตร จาก 0.04 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไปได้ 1.5 วัน

สาหร่ายฮีมาโตคอกคัสเป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว ที่สามารถสังเคราะห์และสะสมแอสตาแซนทินเมื่อเซลล์อยู่ตกอยู่ในสภาวะเครียดจากความเข้มแสงสูงและถูกจำกัดสารอาหารไนโตรเจน (Mularczyk *et al*., 2020; Hoyos *et al*., 2021)

Oslan *et al*. (2021) ได้สรุปวิธีเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสพร้อมกับการสะสมแอสตาแซนทินได้มากที่สุด ผลการรวบรวมพบว่าวิธีการให้สาหร่ายเพิ่มแอสตาแซนทินได้มากที่สุดสำหรับอาหารสูตร BBM และ BG11 คือใช้ปุ๋ยยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 150 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที เป็นเวลา 15 วัน จะได้น้ำหนักแห้ง 10.2 กรัมต่อลิตร แอสตาแซนทิน 5.4 มิลลิกรัมต่อลิตร กรณีใช้อาหาร BG11 การเติมคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกันการงดให้ไนเตรทหากใช้สูตรอาหาร NIES-C ต้องใช้ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที ควบคุมอุณหภูมิให้ไม่ให้สูงเกิน 28 องศาเซลเซียส จึงจะได้ผลผลิตมวลชีวภาพและแอสตาแซนทินอย่างสม่ำเสมอ 2.34 กรัมต่อตารางเมตรต่อวันและ 60 มิลลิกรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ผลสรุปดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สูตรอาหารและเงื่อนไขวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* spp. เพื่อให้ได้มวลชีวภาพและแอสตาแซนทินสูงที่สุด สรุปโดย Oslan *et al*. (2021)

สูตรอาหาร	ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	อุณหภูมิห้อง (องศาเซลเซียส)	กรด-เบส	ความเข้มแสง (µmol/m^2 s), ชม.สว่าง/มืด	เวลาที่ใช้ (วัน)
	วิธีการสร้างความเครียด		เงื่อนไขที่ดีที่สุดหรือผลที่ได้		
BBM, BG11	0.4-0.5 g/L	25±1	6-7	150 µmol	15
	ใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนไม่เหมือนกัน		ปุ๋ยยูเรียดีที่สุดให้ผล BM 10.2 g/L Asta 5.4 mg/L		
NIES-C	0.4 g/L	25±1	7.5.8	250 µmol, 12:12	10
	ควบคุมอุณหภูมิ vs ปล่อยตามยถากรรม		ควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 28 องศาจะให้ BM 2.34 g/m^2/d และ Asta 60 mg/m^2/d		

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	อุณหภูมิห้อง (องศาเซลเซียส)	กรด-เบส	ความเข้มแสง (μmol/m^2 s), ชม.สว่าง/มืด	เวลาที่ใช้ (วัน)
	วิธีการสร้างความเครียด		เงื่อนไขที่ดีที่สุดหรือผลที่ได้		
RM	$6x10^4$ cell/mL	25±1	Not mentioned	1500 lux, 12:12	ไม่ระบุ
	ความเข้มข้นของ NaCl 0.8, 1.5 และ 2.5%		NaCl 2.5% เพิ่ม Asta เป็น 4.8 เท่าจาก 10 เป็น 48 พิโคกรัม/เซลล์		
BG11	$5x10^5$ cell/mL	25±1	Not mentioned	40 μmol, 16:8	15
	งดให้ไนโตรเจน และเพิ่มความเข้มแสง		งดให้ไนโตรเจนและเพิ่มความเข้มแสงเป็น 400 μmol จะให้ผลแอสตาแซนทินมากที่สุด (ไม่ระบุปริมาณ)		
MLA	$4.07x10^4$ cell/mL	25±1	Not mentioned	65-75 μmol	17
	ปล่อยให้ธาตุอาหารไนโตรเจนหมดไปเอง		หลังจากงดให้สารอาหารไนโตรเจน ขนาดเส้นผ่านของเซลล์เพิ่มเป็น 30% ของขนาดเดิม แต่ความหนาแน่นเซลล์ลดลงไปเรื่อย ๆ		
BG11	$1x10^4$ cell/mL	25±1	7-7.5	50 μmol	9
	ปรับสารอาหาร $MgSO_4.7H_2O$, H_3BO_3 Na_2CO_2 (ไม่ได้ระบุต้องทำอย่างไร) ความเข้มแสงคงที่		ได้มวลชีวภาพ 0.15 g/L/d แอสตาแซนทิน 13.33 mg/L/d (ไม่ได้ระบุว่า วิธีไหนดีที่สุด)		
Basal	1.0 g/L	25±1	7.5	4±1 μmol	12
	ปรับอัตราส่วน C/N		มวลชีวภาพ 9.18 g/L (100% เซลล์ไม่เคลื่อนที่) แอสตาแซนทิน 15.45 mg/L/d		
BBM	$2x10^5$ cell/mL	25±1	Not mentioned	20 μmol	15
	ปรับสูตรอาหารไนเตรทและฟอสเฟต		เพิ่มฟอสเฟตเป็น 3 เท่า ทำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูงสุด และอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่ม 86%		

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	อุณหภูมิห้อง (องศาเซลเซียส)	กรด-เบส	ความเข้มแสง ($\mu mol/m^2$ s), ชม.สว่าง/มืด	เวลาที่ใช้ (วัน)
	วิธีการสร้างความเครียด		เงื่อนไขที่ดีที่สุดหรือผลที่ได้		
BG11	0.26 g/L	25±1	<8	100 μmol	14
	งดธาตุอาหารบางชนิด ความเข้มแสง 445 และ 546 μmol		เติม CO_2 ลงไป ได้แอสตาแซนทิน 29.62 mg/g งดไนโตรเจน แอสตาแซนทินได้ 30.07 mg/g ความเข้มแสง 546 μmol		
BBM	$4x10^5$ cell/mL	25±1	Not mentioned	ไม่ระบุ	15
	ให้คาร์บอนไดออกไซด์ 1.54% โซเดียมไนเตรท 1.06 g/L ความเข้มแสง 2,420 lux		ได้มวลชีวภาพสูงสุด 0.51 g/L		
Basal	$4.95x10^5$ cell/mL	25±1	7	1,500 lux	12 - 16
	เติมเกลือ เติมอะซิเตท ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน		การเติมอะซิเตททำให้ได้แอสตาแซนทินสูงขึ้น ในอาหารที่มีความเค็ม 0.25 และ 0.5% ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดถ้าใช้ KNO_3 และต่ำสุดถ้าเติม $(NH_3)_2NO_3$ pH ระหว่าง 6-8 ส่งเสริมการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน เซลล์ที่มีอายุมากสะสมแอสตาแซนทินได้มากกว่าระหว่าง 8.3-10.69 mg/L		

Boussiba and Vonshak (1991) ได้ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* ในสูตรอาหาร BG11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรทจาก $NaNO_3$ 1.5 และ 0.15 กรัมต่อลิตรและความเข้มแสง 85 และ 170 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที โดยมีชุดควบคุมคือ $NaNO_3$ 1.5 กรัมต่อลิตร และความเข้มแสง 85 และ 170 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที ระหว่างที่เพาะเลี้ยงมีการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ความเข้มข้น 1.5% ลงไป ปรับค่าความเป็นกรด-เบสระหว่าง 6.8 – 7 อุณหภูมิคงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ผลที่ได้คือ ในอาหารที่มีไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร และความเข้มแสง 170 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาทีได้แอสตาแซนทินสูงสุด 65 พิโคกรัมต่อเซลล์หรือ 1.7% ของน้ำหนักแห้ง และการงดฟอสเฟตทำให้ได้แอสตาแซนทินสูงสุดที่ 1.9% น้ำหนักแห้ง

ส่วน Choi *et al*. (2002) ได้ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* ในสูตรอาหาร OHM ประกอบด้วย KNO_3 0.41 กรัม $NaHPO_4$ 0.03 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.246 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.11 กรัม Fe(III)-citrate.H_2O 2.62 มิลลิกรัม $CoCl_2.6H_2O$ 0.011 มิลลิกรัม $CuSO_4.5H_2O$ 0.012 มิลลิกรัม Cr_2O_3 0.075 มิลลิกรัม $MnCl_2.4H_2O$ 0.98 มิลลิกรัม $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.12 มิลลิกรัม SeO_2 0.005 มิลลิกรัม ไบโอทิน 25 ไมโครกรัม ไธเอมีน 17.5 ไมโครกรัม และวิตามินบี-12 15 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้เครื่องเขย่า 180 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 50±7 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที โดยใช้หลอดเรืองแสงสีขาว 20 วัตต์เป็นแหล่งพลังงานแสง ระหว่างที่เพาะเลี้ยงเติมอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 350 ส่วนต่อล้านอยู่ตลอดเวลา เพาะเลี้ยงจนกระทั่งกราฟการเจริญเติบโตคงที่ แล้วนำมาทดลองกับปัจจัยต่างๆ หลายอย่าง มีทั้งงดและเติมไนเตรท ฟอสเฟต แมกนีเซียม อะซิเตท และเฟอร์รัส เป็นเวลา 8 วัน ผลจากการศึกษาชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มแสง 500 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที ร่วมกับงดไนเตรท ฟอสเฟต และแมกนีเซียม แต่มีการเติมเกลืออะซิเตท (CH_3COONa) 15 มิลลิโมลาร์ เกลือเฟอร์รัส ($FeSO_4$) 15 มิลลิโมลาร์และ NaCl 25 มิลลิโมลาร์ ได้แอสตาแซนทินต่อเซลล์สูงสุด 243.2 พิโคกรัมต่อเซลล์ ส่วนชุดที่ได้ผลผลิตสูงสุดคือใช้ความเข้มแสง 500 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที ร่วมกับงดไนเตรท เกลือเฟอร์รัส และอะซิเตท แต่มีการเติมฟอสฟอรัส 0.21 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียม 1 มิลลิโมลาร์ ส่วน NaCl ไม่มีการควบคุม ได้แอสตาแซนทิน 26.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส เพื่อผลผลิตแอสตาแซนทินในระดับอุตสาหกรรมอยู่ในหลายประเทศเช่น อิสราเอล ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา จีน และสเปน เป็นต้น ผลผลิตของสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสจะอยู่ในสองรูปแบบ ได้แก่ สาหร่ายแห้งสำหรับใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพและเป็นส่วนผสมในอาหาร และในรูปสารสกัดแอสตาแซนทินสำหรับใช้ในอุตสาหกรรม

จากข้อมูลงานวิจัยเท่าที่มีอยู่ในปัจจุบันถือ แอสตาแซนทินเป็นสารกลุ่มแซนโทรฟิลล์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในบรรดาสารต้านอนุมูลอิสระเท่าที่มีรายงานว่า โดยแอสตาแซนทินมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระเป็น 40 เท่าของเบต้าแคโรทีน 800 เท่าของโคเอนไซม์คิวเทน 550 เท่าของวิตามินอี 560 เท่าของสารสกัดจากชาเขียวคาทีซิน และ 6,000 เท่าของวิตามินซี (Lorenz and Cysewski, 2000; Guerin *et al*., 2003; García-Malea *et al*., 2006) สาหร่ายฮีมาโตคอกคัส 1 ลิตร ให้ผลผลิต 7 กรัม มีแอสตาแซนทิน 350 มิลลิกรัม จะมีราคาสูงถึง 3,850 บาท ขณะนี้ในประเทศไทยยังไม่มีใครเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในเชิงพาณิชย์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังที่จะนำเอาสารแอสตาแซนทินจากสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสมาเป็นวัตถุดิบหลักในผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้า ซึ่งนอกจากจะเป็นวัตถุดิบหลักสำคัญที่สามารถสกัดได้จากธรรมชาติแล้ว ยังเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าสารแอสตาแซนทินสังเคราะห์จากต่างประเทศ นอกจากนี้

สามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรไทยได้อีกด้วยเพื่อต้องการทราบกระบวนการหรือกรรมวิธีการเลี้ยงและการเพิ่มชีวมวลของสาหร่ายตลอดจนการชักนำ ให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้าจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อทราบกระบวนการหรือกรรมวิธีการเลี้ยงและการเพิ่มชีวมวลของสาหร่ายตลอดจนการชักนำให้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้าจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

1.4 กรอบแนวคิดวิจัย

งานวิจัยนี้ได้เริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ภายใต้เงื่อนไขสภาวะแวดล้อมต่างๆ รวมทั้งความเข้มข้นของแสง และความเข้มข้นของไนโตรเจนซึ่งอยู่ในรูปของไนเตรท เพื่อศึกษาผลของปัจจัยเหล่านั้นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและปริมาณการผลิตแอสตาแซนทินของสาหร่าย นำไปเป็นข้อมูลประกอบการเสนอความเป็นไปได้ที่จะนำสาหร่ายชนิดนี้ไปพัฒนาต่อยอดเพื่อเป็นแหล่งผลิตสารแอสตาแซนทินในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อต้องการทราบกระบวนการหรือกรรมวิธีการเลี้ยงและการเพิ่มชีวมวลของสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในอาหารเหลว นำไปสู่การสกัดสารแอสตาแซนทินจากสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสเพื่อเป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้า ซึ่งนอกจากจะเป็นวัตถุดิบที่สกัดได้จากธรรมชาติแล้ว ยังเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าสารแอสตาแซนทินสังเคราะห์จากต่างประเทศ นอกจากนี้สามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรไทยได้อีกด้วย และเป็นหนทางการกระตุ้นให้ผู้มีส่วนได้เสียประยุกต์ใช้สาหร่ายผลิตแอสตาแซนทินในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส

การเตรียมกล้าเซลล์ สาหร่ายฮีมาโตคอกคัส (*Haematococcus* sp.) แยกมาจากแหล่งน้ำจืดในจังหวัดนครศรีธรรมราช บริเวณใกล้กับมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร BBM ที่เติมวุ้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ pH เท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงคัดแยกโคโลนีของสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส บนอาหารแข็งที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง BBM เป็นเวลา 7 วัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้ได้สาหร่ายฮีมาโตคอกคัสที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ แล้วจึงย้ายตัวอย่างสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสลงเลี้ยงในอาหารเหลวดัดแปลง BBM (Borowitzka, 1988) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยเลี้ยงบนชั้นสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย ให้อากาศโดยใช้เครื่องปั๊มลม และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 15 วัน การเลี้ยงสาหร่ายแบ่งออกเป็นรูปของการทดลองสองระยะดังนี้

การเพาะเลี้ยงมีขั้นตอนดังนี้

1) การศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสม: เพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เริ่มจากความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 5.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร BBM ดัดแปลง (ตามสูตรในส่วนท้ายหัวข้อ 2.1 นี้) โดยใส่อาหารลงไป 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 5000, 10000, 15000, 20000 ลักซ์ ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ โดยมีระยะเวลาให้แสงสว่างและมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง ระหว่างการเพาะเลี้ยงเติมอากาศโดยใช้ปั๊มลม ทำการเพาะเลี้ยงจนกว่าเซลล์จะเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งอยู่ระหว่างวันที่ 12 - 18 วัน ตรวจวัดการเจริญของสาหร่ายตามวิธีการแสดงไว้ในตอนท้ายของหัวข้อนี้

2) การศึกษาความเข้มข้นไนเตรทที่เหมาะสม: เลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เริ่มจากความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 5.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร BBM ที่ความเข้มข้นของไนเตรท ($NaNO_3$) 1.0, 3.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ชุดควบคุมคือ 3.0 มิลลิโมลาร์ โดยใส่อาหารลงไป 400 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงเฉลี่ย 5,000 ลักซ์ ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์โดยมีระยะเวลาให้แสงสว่างและมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง ระหว่างการเพาะเลี้ยงเติมอากาศจากปั๊มลม ทำการเพาะเลี้ยงจนกว่าเซลล์จะเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase)

อาหารเพาะเลี้ยงดัดแปลงจากสูตร BBM ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย

สต๊อก	ปริมาตรที่ใช้	
1.0 M $NaNO_3$	3	มิลลิลิตร
1.5 M KH_2PO_4	2	มิลลิลิตร
0.25 M $MgSO_4.7H_2O$	2	มิลลิลิตร
0.05 M $CaCl_2.2H_2O$	2	มิลลิลิตร
0.5 M NaCl	2	มิลลิลิตร
Micro A	2	มิลลิลิตร
Micro B (Manganese)	2	มิลลิลิตร
Micro C (Iron-EDTA)	2	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดจะนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วัดอัตราการเจริญของสาหร่ายในรูปของคลอโรฟิลล์และรงควัตถุ นำสาหร่าย 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วการหมุน 5,000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอะซิโตน ทิ้งไว้ค้างคืน กรองเอาแต่ของเหลวมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 480 645 และ 662 นาโนเมตร คำณวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามสูตรที่มีรายงานใน Kobayashi *et al*. (1991) ดังนี้:

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ:

$$\text{Chl A (mg/L)} = 11.24 \times OD_{662} - 2.04 \times OD_{645}$$

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี:

$$\text{Chl B (mg/L)} = 20.13 \times OD_{645} - 4.19 \times OD_{662}$$

ปริมาณแคโรทีนอยด์:

$$\text{Carotenoids (mg/L)} = 1000 \times O_{D470} - [1.90 \times \text{Chl A} + 63.14 \times \text{Chl B}]$$

ปริมาณแอสตาแซนทิน:

$$\text{Astaxanthin (mg)} = (OD_{480} \times \text{ปริมาตรที่ใช้สกัด} \times \text{ค่าการละลาย} \times 10)/2500$$

ตรวจวัดความหนาแน่นเซลล์โดยการหยดตัวอย่างที่มีสาหร่ายลงบน haemacytometer แล้วนับตัวเลขจำนวนเซลล์ที่อยู่ในช่องสี่เหลี่ยม 1x1 มิลลิเมตร นำผลที่ได้ไปคูณด้วย 1×10^4 จะได้ความหนาแน่นเซลล์ในหน่วยจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

ทุกการทดลองใช้จำนวนซ้ำ 4 ซ้ำต่อหนึ่งชุดการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

2.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

คำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : μ) ตามสมการ (Vonshak, 1986)

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

โดยที่ X_1 = ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นในการทดลอง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

X_2 = ความหนาแน่นของเซลล์ที่ระยะเวลา t (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

t_1 = ระยะเวลาศึกษาเริ่มต้น (วัน)

t_2 = ระยะเวลาศึกษาที่เวลา t (วัน)

คำนวณหาระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า (doubling time), t_d จากสมการ (Vonshak, 1986) ในช่วง exponential growth phase

$$t_d = \ln 2 / \mu = 0.693 / \mu$$

2.3 แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์

การเลี้ยงสาหร่ายจะเกิดผลประโยชน์เมื่อได้เก็บผลผลิต โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร เริ่มจากความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 5.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร BBM ดัดแปลง 4.5 ลิตรต่อถัง ความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้น 10 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงเฉลี่ย 4,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์แบบเย็น โดยมีระยะเวลาให้แสงสว่างและมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง ระหว่างการเพาะเลี้ยงเติมอากาศจากปั๊มลม ทำการเพาะเลี้ยงจนกว่าเซลล์ตกตะกอน แล้วนำไปกรองผ่านผ้ากรองแพลงก์ตอน นำไปตากแดดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง แล้วบันทึกผล

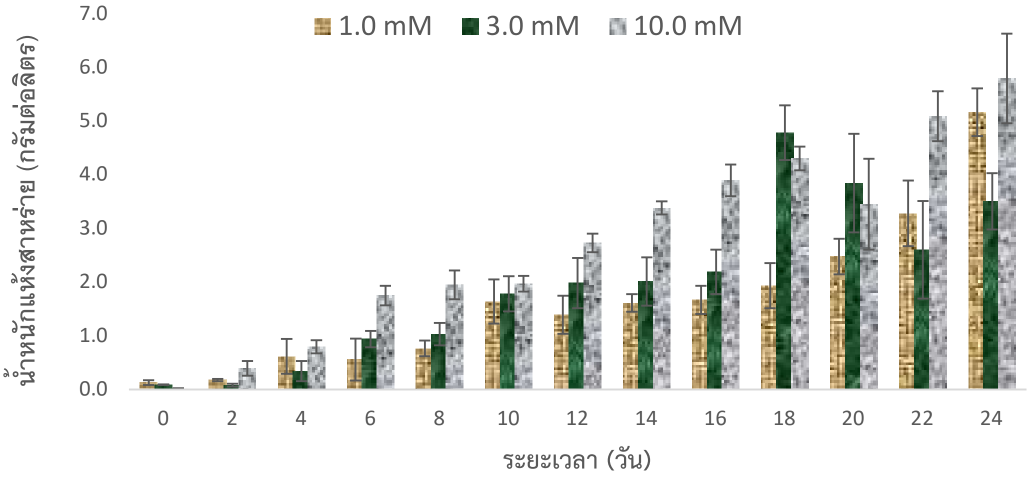
2.4 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน

มีกำหนดถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ชุมชน โดยการเลือกชุมชนบ้านแหลมมะขาม ตำบลเขาไม้แก้ว อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง เป็นชุมชนที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีในครั้งนี้

3. ผลการวิจัย และอภิปรายผล

3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส

การศึกษาครั้งนี้ได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดจำนวน 4 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส (*Haematococcus* sp.) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BBM ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) 1.0 3.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งไนเตรทใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของสาหร่าย ผลปรากฏว่า ไนเตรทที่ระดับ 1.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ให้รูปแบบการเจริญของสาหร่ายแบบค่อยเป็นค่อยไป นั่นก็เป็นเพราะสาหร่ายต้องการใช้ไนเตรทสำหรับการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามปริมาณไนเตรทต้องอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม ถ้ามีมากเกินไปหรือน้อยเกินไปก็จะทำให้สาหร่ายเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร (Kong *et al*., 2017) จากภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับมวลชีวภาพของสาหร่ายคือ 3.0 มิลลิโมลาร์ โดยสังเกตจากเส้นกราฟการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงจุดสูงสุดในวันที่ 18 อันเนื่องมาจากการใช้สารอาหารหมดไปอย่างรวดเร็วกว่าจนกระทั่งเซลล์สาหร่ายรุ่นใหม่ไม่มีสารอาหารเหลือใช้ ผลที่เห็นก็คือจำนวนเซลล์หรือน้ำหนักแห้งของสาหร่ายลดลงหลังจากวันนั้น

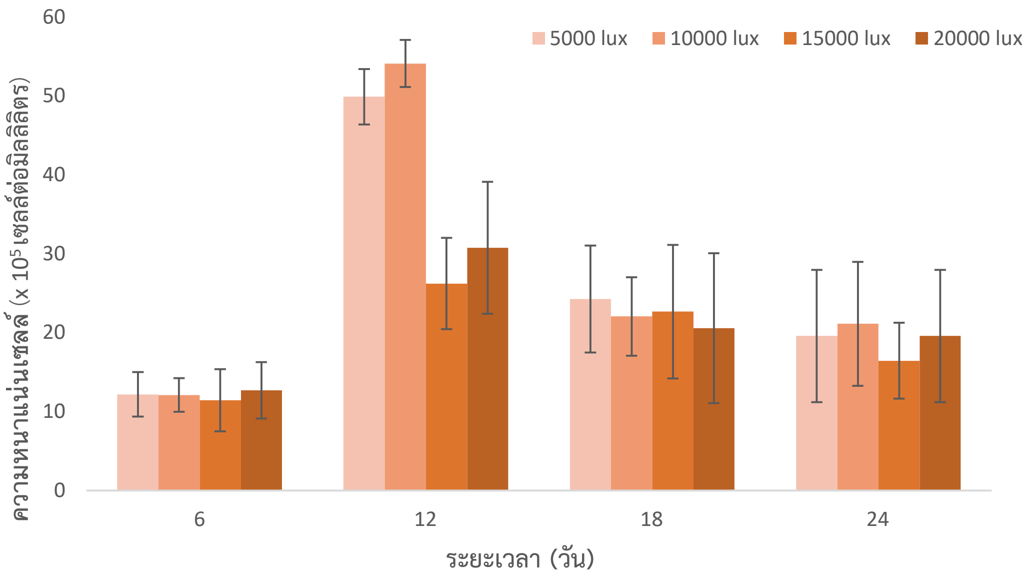


ภาพที่ 1 ผลของความเข้มข้นไนเตรทต่อน้ำหนักแห้งสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; ชุดควบคุมคือ 3.0 มิลลิโมลาร์; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้นของไนเตรทก็มีผลต่อความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทินในสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสปริมาณแอสตาแซนทิน จากการที่สาหร่ายประสบภาวะขาดสารอาหารไนเตรทหรือความเข้มแสงสว่างมากเกินไป (Mularczyk *et al*., 2020) อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์แอสตาแซนทินจำเป็นต้องใช้สารอาหารที่ได้มาจากสารตั้งต้นซึ่งเป็นกรดอินทรีย์อันเป็นผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงเช่น acetyl CoA หรือ pyruvic acid ผ่านขบวนการกลายเป็น geranyl pyrophosphate (Maoka, 2020) ซึ่งนอกจากเป็นสารตั้งต้นสำหรับแอสตาแซนทินแล้ว ยังเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์แคโรทีนและสารควบคุมการเจริญเจริญเติบโตในพืช ไนโตรเจนไม่ได้เป็นองค์ประกอบของกรดอินทรีย์พวกนี้ แต่ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนและจำเป็นในการสังเคราะห์รงควัตถุคลอโรฟิลล์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์อาหารของพืชสาหร่าย หากไนโตรเจนไม่เพียงพอ นอกจากทำให้รงควัตถุไม่เพียงพอแล้วยังมีผลให้สาหร่ายไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ สาหร่ายจึงไม่สามารถสังเคราะห์แอสตาแซนทินได้มากนักจึงพบแอสตาแซนทินในปริมาณไม่มากในการทดลองครั้งนี้ ถ้ามีไนโตรเจนมากถึงระดับหนึ่ง สาหร่ายก็มีความสามารถสังเคราะห์อาหารต่อไปได้ทำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณขึ้นและสาหร่ายสามารถใช้สารอาหารไปได้หมดพร้อมกัน เมื่อไนโตรเจนหมดสารอาหารอื่นก็หมดพร้อมกันสาหร่ายจึงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ จึงปรากฏการเจริญแบบสูงขึ้นจุดหนึ่งแล้วจำนวนเซลล์หรือน้ำหนักแห้งเริ่มลดลงเนื่องจากการขาดสารอาหาร ผลก็คือเซลล์สาหร่ายลดจำนวนลงแต่ก็มีการสังเคราะห์แอสตาแซนทินไม่มากนัก ในกรณีที่มีไนโตรเจนน้อยแต่ไม่ได้น้อยเกินไป สาหร่ายสามารถสังเคราะห์อาหารได้และเจริญเติบโตได้ถึงจำนวนหนึ่ง จนถึงจุดที่มีการใช้สารอาหารไนโตรเจนหมด แต่ยังเหลือสารอาหารอื่น ทำให้สาหร่ายยังคงเจริญเติบโตได้แต่สารอาหารไนโตรเจนไม่เพียงพอ จึงเกิดสภาวะเครียดและมีการสะสมแอสตาแซนทินอันเป็นผลจากความเครียดอันเนื่องมาจากการขาดสารอาหาร (Zhao *et al*., 2017) ผลต่อมาคือสาหร่ายลดจำนวนลง ทำให้การสังเคราะห์แอสตาแซนทินเกิดได้น้อย (Mularczyk *et al*., 2020)

การเจริญของสาหร่ายสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในภาพที่ 2 วัดในรูปของความหนาแน่นเซลล์ ทุกชุดการทดลองเริ่มจากความหนาแน่นของเซลล์ 5.0×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มแสง 4 ระดับ 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ลักซ์ เพาะในอาหารดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ผลแสดงจากภาพที่ 2 พบว่าความเข้มแสงมีผลต่อความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงในเงื่อนไขดังกล่าว พบการเจริญของสาหร่ายเพิ่มขึ้นไปจนถึงวันที่ 12 ไม่ว่าความเข้มข้นแสงจะมากหรือน้อย นั่นแสดงถึงระยะแรกของการเพาะเลี้ยง แสงกระตุ้นให้สาหร่ายเจริญและเพิ่มจำนวน โดยที่ระดับความเข้มแสง 10,000 ลักซ์มีการกระตุ้นจนความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ 54.03×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2) แต่เมื่อความเข้มแสงถึงระดับหนึ่งแล้วสาหร่ายก็ไม่มีการเพิ่มอัตราการเจริญอีกต่อไป สอดคล้องกับการศึกษาโดย Bialevich *et al*. (2022) ในคลามัยโดโมแนส ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีแฟลกเจลล่ากลุ่มเดียวกับฮีมาโตคอกคัส ซึ่งได้ผลออกมาว่า การเพิ่มความเข้มข้นของแสงทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่ถ้าหากความเข้มข้นของแสงมากเกินไปสาหร่ายบางส่วนจะเริ่มหยุดการเจริญเติบโต ดังผลการศึกษาของ

Metsoviti *et al*. (2020) ในคลอเรลล่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ความหนาแน่นของสาหร่ายที่เพิ่มขึ้นจะเริ่มสะสมสารเคมีบางอย่างที่เข้าไปยับยั้งการเจริญของสาหร่าย ด้วยเหตุผลดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงพบว่า สาหร่ายฮีมาโตคอกคัสสามารถเจริญดีได้ในสภาวะแสงไฟในห้องทดลอง ความเข้มส่องสว่างตั้งแต่ 5,000 ลักซ์เป็นต้นไป

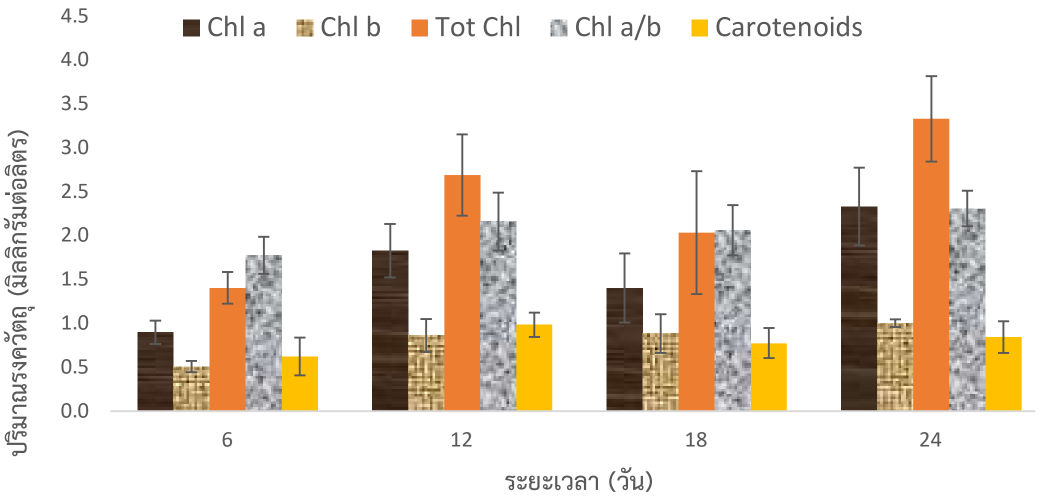


ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแสงต่อความหนาแน่นเซลล์สาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การศึกษาสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในครั้งนี้ได้มีการศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มแสงต่อปริมาณคลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่นๆ โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ความเข้มแสง 4 ระดับ 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ลักซ์ เป็นเวลา 24 วัน ผลการศึกษาปรากฏดังต่อไปนี้

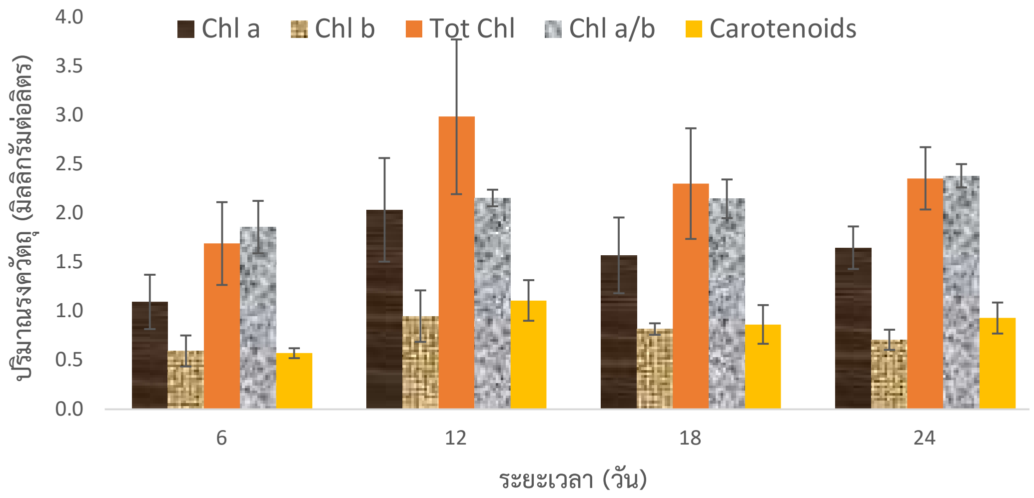
จากแผนภาพที่ 3 แสดงถึงความเข้มแสงมีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุคลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่นๆ ในกรณีของคลอโรฟิลล์ แสงมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารคลอโรฟิลล์ทั้งเอและบี ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ยังคงสามารถทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้จากรายงานโดย Ferreira *et al*. (2015) สาหร่ายต้องการความเข้มข้นของแสงไม่มากนัก ความเข้มข้นของแสงในรูปโฟตอนเพียง 16.91 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาทีก็เพียงพอสำหรับสาหร่ายสีเขียว ความเข้มข้นของแสงในรูปโฟ

ตอน 16.91 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาทีนี้ เทียบได้กับความส่องสว่างประมาณ 1,210 ลักซ์สำหรับหลอดเรืองแสงธรรมดา (Sharakshane, 2018) นั่นแสดงว่าในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ก็นับว่าเพียงพอสำหรับสาหร่ายสีเขียวอย่างฮีมาโตคอกคัส



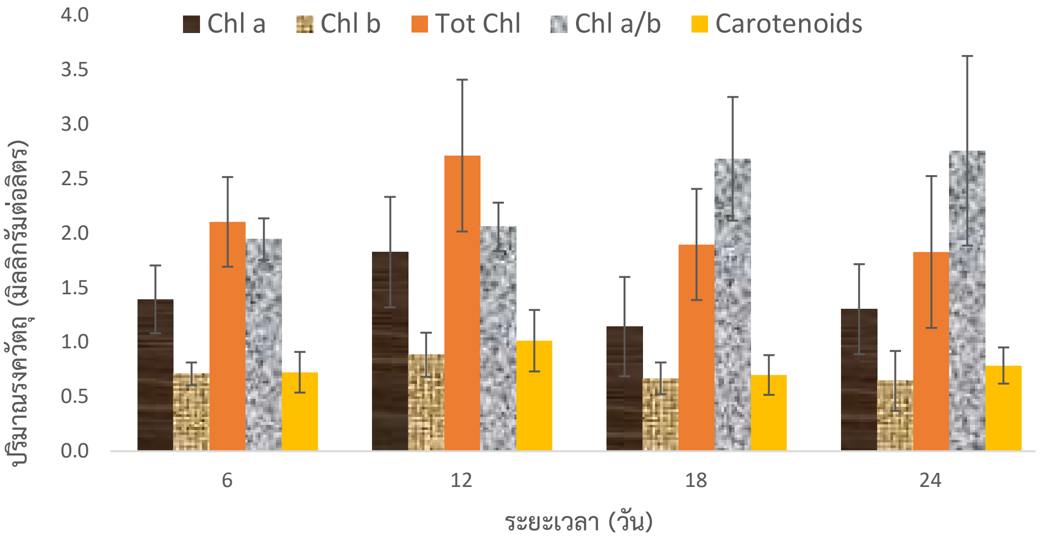
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ถ้าหากความเข้มข้นของแสงเกินระดับความส่องสว่าง 10,000 ลักซ์อย่างเช่นที่ระดับความเข้มส่องสว่าง 15,000 และ 20,000 ลักซ์ (ภาพที่ 4 - 6) ความเข้มแสงระดับนี้เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์อาหาร แต่ที่น่าสังเกตคือ ความเข้มแสงระดับ 15,000 และ 20,000 ลักซ์ จะส่งเสริมการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มากกว่าคลอโรฟิลล์ (ภาพที่ 5 และ 6) และความเข้มแสงต่ำสาหร่ายเลือกสังเคราะห์คลอโรฟิลล์มากกว่าเนื่องจากจำเป็นต้องใช้คลอโรฟิลล์ในการสังเคราะห์อาหาร จึงเหลือวัตถุดิบไม่มากนักสำหรับเปลี่ยนมาเป็นแคโรทีนอยด์ ในขณะที่ความเข้มแสงสูงขึ้นอย่างเช่น 15,000 ลักซ์ สาหร่ายก็ไม่จำเป็นต้องใช้คลอโรฟิลล์ในปริมาณมาก (Ferreira *et al*., 2015; Zhao *et al*., 2017) เพราะว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ก็เพียงพอสำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง เซลล์สาหร่ายจึงเปลี่ยนผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงให้มาอยู่ในรูปรงควัตถุอื่นเช่น แคโรทีนอยด์



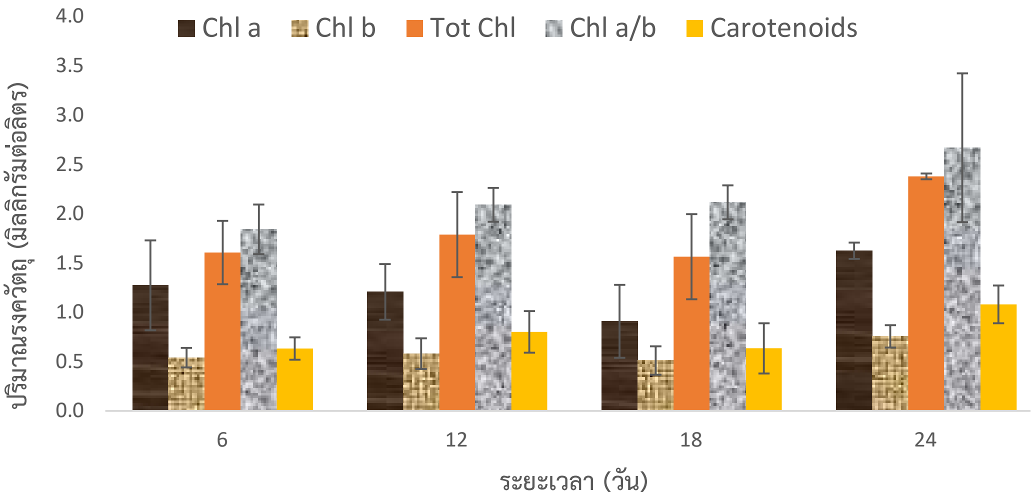
ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ถ้าเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์บีจากฮีมาโตคอกคัสในสภาพที่เพาะเลี้ยงในความเข้มแสงต่างกัน ผลที่ได้ก็จะไม่ต่างจากคลอโรฟิลล์เอ ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งสองรูปแบบมักมีความสัมพันธ์กันเพราะว่าคลอโรฟิลล์บีเป็นรงค์วัตถุช่วยเสริมการทำงานของคลอโรฟิลล์เอในปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วยแสง (Kitajima and Hogan, 2003) เป็นโมเลกุลที่เกาะด้านข้างคลอโรฟิลล์เอ ซึ่งทำหน้าที่เป็นจุดศูนย์กลางปฏิกิริยา โดยคลอโรฟิลล์บีมีความสามารถดักจับพลังงานแสงสีน้ำเงินเป็นส่วนใหญ่ แล้วส่งผ่านพลังงานไปยังคลอโรฟิลล์เอที่อยู่ติดกัน ตำแหน่งที่ตั้งของโมเลกุลคลอโรฟิลล์บีเกือบทั้งหมด มักอยู่ขนาบข้างหรือเกาะติดกับโมเลกุลคลอโรฟิลล์เอ ทั้งนี้อาจเพื่อความรวดเร็วในการส่งผ่านพลังงาน (Eggink *et al*., 2001) ที่ระดับความเข้มแสงสูงขึ้นปริมาณคลอโรฟิลล์จะลดลง ทั้งเนื่องจากสภาวะเครียดจากความเข้มแสงสูงขึ้นและไม่จำเป็นต้องใช้คลอโรฟิลล์ทั้งสองรูปแบบในปริมาณมาก จึงส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมลดลง (Grant and Louda, 2010)



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 15,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

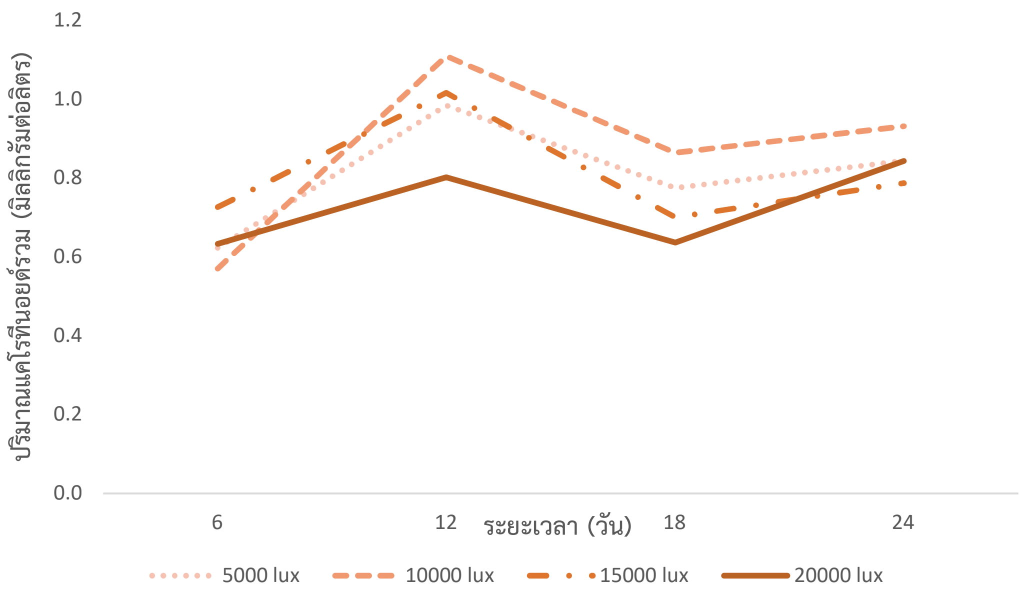
ในการศึกษาครั้งนี้อัตราส่วนของคลอโรฟิลล์ทั้งสองอยู่ระหว่าง 1.77 – 2.67 และพบว่าอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอกับบีมีค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป อย่างไรก็ตามความเข้มแสงไม่มีผลต่ออัตราส่วนคลอโรฟิลล์จากผลการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่ามีรายงานอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อบีมักมีค่าลดลงหากความเข้มแสงสูงขึ้น โดยเฉพาะผลการศึกษาในยูกลีนา (Beneragama and Goto, 2010) หากเปรียบเทียบกับพืชชั้นสูง รวมทั้งจากรายงานของ Grant and Louda (2010) กล่าวในทำนองเดียวกันคือ อัตราส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อรงควัตถุชนิดอื่นมักมีค่าลดลงเมื่ออยู่ในแสงที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้อัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อบีลดลง แต่ในรายงานของ Kitajima and Hogan (2003) ได้เสนอผลที่ตรงข้ามกันและให้เหตุผลไว้ว่า ระดับความเข้มแสงสูงอัตราการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์บีจะลดลงเมื่อเทียบกับคลอโรฟิลล์เอ เนื่องจากที่ความเข้มแสงระดับนั้น สิ่งมีชีวิตจำพวกสาหร่ายไม่จำเป็นต้องใช้รงควัตถุเสริม จึงทำให้อัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อบีมีค่าสูงขึ้น ไม่ได้ลดลงดังที่นักวิทยาศาสตร์สองกลุ่มแรกกล่าวอ้างไว้ ในส่วนของสาหร่ายมักมีอัตราส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อบีในอัตราส่วนต่ำกว่าในพืชชั้นสูง (Kitajima and Hogan, 2003; Grant and Louda, 2010) ซึ่งอาจแสดงถึงกลไกลักษณะการทำงานของระบบเก็บเกี่ยวแสงที่ต่างกัน (Grant and Louda, 2010) โดยอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอและบีในสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ระหว่างคลอโรฟิลล์เอ 2 – 3 โมเลกุล ต่อคลอโรฟิลล์บี 1 โมเลกุล



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรงควัตถุต่างๆ จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ปริมาณแคโรทีนอยด์ก็ได้รับผลกระทบจากความเข้มแสงในทำนองเดียวกับปริมาณคลอโรฟิลล์รวมทั้งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมก็เป็นไปในทางเดียวกันกับปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และคลอโรฟิลล์รวมคือ ที่ระดับความเข้มข้นของแสงระดับ 5,000 และ 10,000 ลักซ์ (ภาพที่ 3 และ 4) สาหร่ายสามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ดีกว่าในสภาวะที่แสงมีความเข้มสูงเกินไป อย่างเช่นที่ระดับความเข้มส่องสว่าง 15,000 ลักซ์ (ภาพที่ 5) ซึ่งพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงสุดในวันที่ 24 ถึงแม้ว่าแสงจำเป็นต่อการสังเคราะห์อาหารของสาหร่าย แต่หากแสงมีความเข้มสูงขึ้นความจำเป็นในการสังเคราะห์รงควัตถุคลอโรฟิลล์ก็จะลดลงในขณะเดียวกันก็ประสบกับปัญหาใหม่คือ ภาวะเครียดจากแสง ทำให้สาหร่ายเริ่มสะสมรงควัตถุอื่นที่ไม่ใช่คลอโรฟิลล์ ยกตัวอย่างเช่น แคโรทีนอยด์รวมในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการศึกษาโดย Minhas *et al*. (2016) ได้รายงานว่า แสงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้สาหร่ายสะสมรงควัตถุแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะที่ความเข้มแสงสูงสาหร่ายจะเลือกสะสมแคโรทีนอยด์มากกว่าคลอโรฟิลล์ โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ สาหร่ายสะสมแคโรทีนอยด์รวมสูงสุดในวันที่ 12 คือ 1.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในวันเดียวกันอยู่ที่ 2.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลอันนี้ก็เป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาของ Minhas *et al*. (2016) ที่กล่าวไว้ว่าความเข้มแสงระดับสูงจะกระตุ้นให้เกิดการสะสมแคโรทีน แคโรทีนอยด์นี้ถูกกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์จากผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่น ออกซิเจน

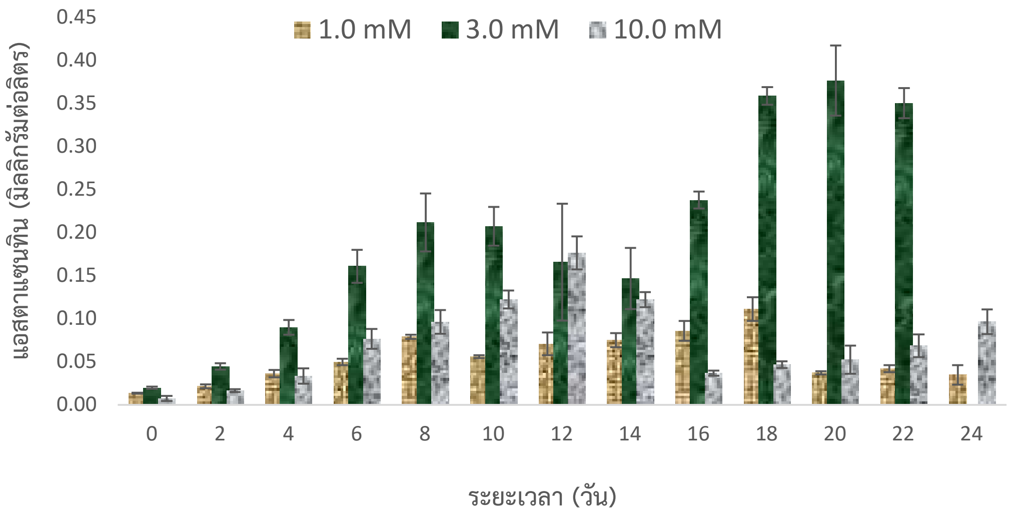
โมเลกุลเดี่ยวที่เกิดจากการแตกตัวของโมเลกุลน้ำ ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของความเครียดในเซลล์สาหร่าย ซึ่งแคโรทีนอยด์นี้ก็ทำหน้าที่จัดการกับอนุมูลอิสระพวกนี้ (Ramel *et al*., 2012; Sandmann, 2019)



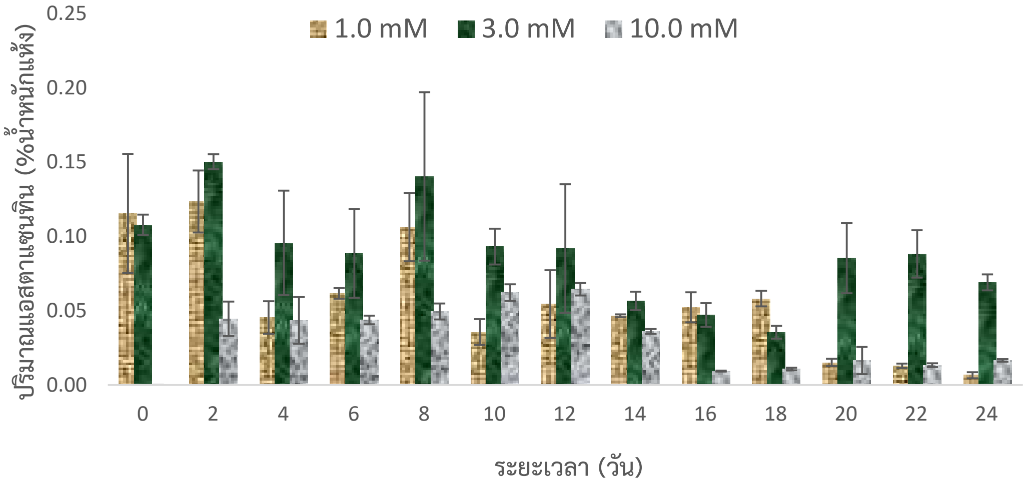
ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคโรทีนอยด์รวม จากสาหร่าย *Haematococcus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 5,000 – 20,000 ลักซ์

แอสตาแซนทินเป็นส่วนหนึ่งของแคโรทีนอยด์สังเคราะห์เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียด เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ ทำให้สาหร่ายสะสมคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4 และ 7) จึงได้เลือกใช้ความเข้มแสงนี้เพื่อศึกษาการสะสมแอสตาแซนทินในสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส ซึ่งผลแสดงดังภาพที่ 8 และ 9 พบว่า สาหร่ายมีการสังเคราะห์แอสตาแซนทินตั้งแต่ระยะแรกของการเพาะเลี้ยง ในวันที่ 2 และ 8 มีแอสตาแซนทินสะสม 0.15 และ 0.14 %น้ำหนักแห้งตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นไนเตรท 3.0 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นการสังเคราะห์แอสตาแซนทินมากที่สุด (ภาพที่ 9) อย่างไรก็ตามหากหากมองในภาพรวม การสะสมแอสตาแซนทินเกิดขึ้นสูงสุดในระหว่างวันที่ 18 – 24 (ภาพที่ 8) นั่นเป็นเพราะว่าในช่วงเวลาดังกล่าวสาหร่ายมีมวลชีวภาพลดลงตัวหารจึงลดตาม ส่งผลให้ปริมาณแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นดังที่ได้แสดงในภาพที่ 8 โดยเฉพาะตั้งแต่วันที่ 16 เป็นต้นไป อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์แอสตาแซนทินค่อนข้างซับซ้อน การเพิ่มหรือลดไนเตรทไม่ได้ส่งผลต่อการผลิตหรือสะสมแอสตาแซนทินของสาหน่าย

มากนัก ดังจากรายงานการศึกษาการสังเคราะห์แอสตาแซนทินโดยในสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสโดย Boussiba and Vonshak (1991) การลดปริมาณไนเตรทในอาหารเหลือเพียง 1 ใน 10 ของชุดควบคุม ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์แอสตาแซนทินเพียงเล็กน้อยจาก 0.5 เป็น 0.6 %น้ำหนักแห้ง และจาก 1.4 เป็น 1.7 %น้ำหนักแห้ง ในที่ความเข้มพลังงานแสง 80 และ 175 ไมโครโมลต่อตารางเมตรวินาที ตามลำดับ รวมทั้งผลการศึกษาโดย Choi *et al*. (2002) ที่สรุปไว้ว่า การลดไนโตรเจนและเพิ่มความเข้มแสงเป็นเพียงหนึ่งในวิธีการส่งเสริมการสังเคราะห์แอสตาแซนทินของสาหร่าย การเพิ่มความเข้มข้นของแสงมีอิทธิพลมากกว่าการลดไนโตรเจน

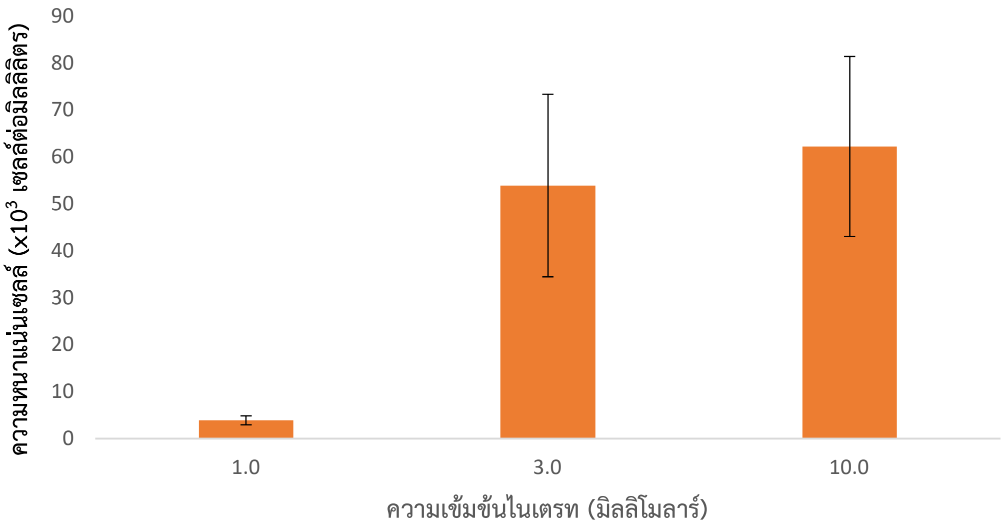


ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไนเตรทต่อปริมาณแอสตาแซนทิน จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; ชุดควบคุมคือ 3.0 มิลลิโมลาร์; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอสตาแซนทินต่อน้ำหนักแห้ง จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ความเข้มข้นไนเตรท 3 ระดับ ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส; ชุดควบคุมคือ 3.0 มิลลิโมลาร์; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ดังที่กล่าวมาแล้วความเข้มข้นของไนเตรทมีผลต่อการผลิตแอสตาแซนทินในสาหร่ายเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามความเข้มข้นไนเตรทมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และมวลชีวภาพของสาหร่าย ซึ่งถ้าหากสาหร่ายมีจำนวนเซลล์มากขึ้น การสะสมแอสตาแซนทินก็จะมีมากขึ้น จึงได้มีการศึกษาผลของไนเตรทต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ สาหร่ายฮีมาโตคอกคัสได้ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารดัดแปลง BBM ที่มีความเข้มข้นไนเตรท 1.0 3.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส โดยเริ่มต้นที่ความหนาแน่นเซลล์ $10x10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 วัน ซึ่งผลการทดลองอยู่ในภาพที่ 10 แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นไนเตรทที่มีความเหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายฮีมาโตคอกคัสคือที่ระดับ 10.0 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามหากลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่งเหลือ 3.0 มิลลิโมลาร์ก็ไม่ได้ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ของสาหร่ายมากนัก (ภาพที่ 10) รวมทั้งรายงานของ (Kong *et al*., 2017) ไนโตรเจนที่มาจากไนเตรทช่วยให้เกิดการเจริญเติบโตทางกิ่งก้านใบ หากเทียบกับสาหร่ายก็คือการเพิ่มจำนวนเซลล์ แสดงถึงความจำเป็นที่จะต้องมีไนโตรเจนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายให้มากที่สุด จากนั้นจึงนำเซลล์สาหร่ายที่ได้มาใช้ประโยชน์



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนเตรทกับความหนาแน่นเซลล์ จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตรดัดแปลง BBM ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 32±3 องศาเซลเซียส โดยเริ่มต้นจากความหนาแน่นเซลล์ 10×10^{3} เซลล์ต่อมิลลิลิตร; ชุดควบคุมคือ 3.0 มิลลิโมลาร์; เส้นแนวตั้งแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในการศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง BBM และได้นับปริมาณเซลล์ที่ในแต่ละวันในหน่วยความหนาแน่น 10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เริ่มต้นจากความหนาแน่นเซลล์ 5.0×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความหนาแน่นเซลล์ก็ได้เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 12 ของการทดลอง ซึ่งได้พบว่าระดับความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ 54.03×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร หากเทียบเป็นอัตราการเจริญจำเพาะก็จะมีค่าประมาณ 0.198±0.005 ตามข้อมูลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 หลังจากวันนั้นความหนาแน่นของเซลล์ก็ลดลงตามลำดับ เหลือความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 21.10×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 24 (ตารางที่ 5) การลดลงของจำนวนเซลล์หลังวันที่ 12 เป็นต้นไป เกิดจากปริมาณสารอาหารที่ลดลงเนื่องมาจากการใช้ก่อนหน้านี้ โดยที่น่าสังเกตอย่างหนึ่งคือ สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงท่ามกลางความเข้มแสงที่สูงกว่า อัตราการใช้ปริมาณอาหารก็จะสูงกว่า สารอาหารก็จะหมดเร็วกว่า จึงพบว่าความหนาแน่นของเซลล์ในวันที่ 12 เป็นต้นไป ลดลงเร็วกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระดับความเข้มแสงที่ต่ำกว่า

ตารางที่ 3 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะเวลาความหนาแน่นเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าสำหรับการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร BBM เป็นเวลา 24 วัน

ชุดการทดลองที่	ระดับความเข้มข้นแสง (ลักซ์)	อัตราการเจริญจำเพาะ μ	ระยะเวลาที่ความหนาแน่นเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่า, T_d (วัน)
1	5,000	0.191	3.62
2	10,000	0.198	3.50
3	15,000	0.137	5.15
4	20,000	0.149	4.71

อัตราการเจริญจำเพาะเป็นตัวชี้วัดอีกตัวหนึ่งที่บอกถึงการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (Vonshak, 1986) คำนวณได้จากสูตรอัตราการเจริญจำเพาะ μ = (ln X2- ln X1) / (t2- t1) โดยที่ X1, X2 อาจเป็นน้ำหนักหรือจำนวนเซลล์ก็ได้ สำหรับครั้งนี้ได้หาอัตราการเจริญจำเพาะโดยเทียบจากจำนวนเซลล์ และค่าอัตราการเจริญจำเพาะระยะยังสามารถนำไปหาระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเป็นสองเท่า t_d จากสูตร t_d = ln 2 / μ = 0.693/μ ในครั้งนี้ได้ใช้ข้อมูลจาก 12 วันแรกของการเพาะเลี้ยงที่เส้นกราฟขึ้นอย่างสม่ำเสมอดังในภาพที่ 2 ก็จะได้ค่า μ และ t_d ปรากฏในตารางที่ 3 ได้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในครั้งนี้ ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ทำให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสาหร่ายสูงสุดคือ 0.198±0.005 ต่อวัน ซึ่งจะส่งผลให้มีระยะเวลาที่มีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าสั้นที่สุดคือ 3.50±0.08 วัน หรือใช้เวลาเพียง 3.50 วัน ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายเพิ่มเป็นสองเท่า จากผลการศึกษาครั้งนี้ก็ได้แสดงให้เห็นว่า ไม่จำเป็นต้องใช้ระดับความเข้มข้นของแสงในสูงมากก็สามารถทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญได้ดี ซึ่งในที่นี้คือ 10,000 ลักซ์ อย่างไรก็ตามหลังวันที่ 18 ผ่านไปแล้วจำนวนความหนาแน่นของเซลล์ก็ลดลงในทุกชุดการทดลอง อันเนื่องมาจากความเข้มข้นสารอาหารไม่เพียงพอสำหรับเลี้ยงสาหร่ายมีการเจริญต่อไป

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่าย *Haematocuccus* ในการศึกษาครั้งนี้สูงสุดที่ 0.198 หากนำไปเทียบกับผลการศึกษาของ Wu *et al*. (2021) ที่มีค่าประมาณ 0.49 นั่นเพราะว่าในกรณีศึกษาของ Wu *et al*. การเติมแหล่งคาร์บอนอื่นลงไปจะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น อย่างไรก็ตามในรายงานจากผลการศึกษาของ Galvão *et al*. (2013) สิ่งที่มีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย *Haematocuccus* คือความเข้มแสง สภาพความเข้มแสงต่ำประมาณ 2,000 ลักซ์ มีสภาพเอื้อต่อการ

แบ่งเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้มากกว่าสภาพความเข้มแสงสูง ในที่ความเข้มแสงสูง 10,000 ลักซ์ ความหนาแน่นเซลล์จะลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นเซลล์ในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์

ตารางที่ 4 น้ำหนักแห้ง และปริมาณแอสตาแซนทินจากการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 3 ระดับ; อักษรต่างกันกันแสดงถึงค่าแตกกต่างกันด้วยระดับนัยสำคัญ P < 0.05 จากการเปรียบเทียบ Fisher's Least Significance Difference Test

ความเข้มข้น $NaNO_3$ (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของแอสตาแซนทินต่อน้ำหนักแห้ง
วันที่ 6			
1.0	0.56 b	0.050 b	0.062
3.0	1.05 b	0.090 a	0.089
10.0	1.75 a	0.077 a	0.044
วันที่ 12			
1.0	1.39 b	0.071 b	0.058
3.0	2.37 a	0.207 a	0.036
10.0	2.73 a	0.176 b	0.011
วันที่ 18			
1.0	1.93 c	0.111 b	0.058 a
3.0	6.73 a	0.237 a	0.036 b
10.0	4.30 b	0.047 c	0.011 c
วันที่ 24			
1.0	5.16	0.035 c	0.007 c
3.0	5.07	0.350 a	0.069 a
10.0	5.79	0.097 b	0.017 b

ตารางที่ 5 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี แคโรทีนอยด์จากการเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ในอาหารเหลวดัดแปลงสูตร BBM เป็นเวลา 24 วัน ภายใต้ความเข้มแสง 4 ระดับ; อักษรต่างกันกันแสดงถึงค่าแตกกต่างกันด้วยระดับนัยสำคัญ P < 0.05 จากการเปรียบเทียบ Fisher’s Least Significance Difference Test

ความเข้มแสง (ลักซ์)	คลอโรฟิลล์เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	คลอโรฟิลล์บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	แคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความหนาแน่นเซลล์ (x10^4 ต่อมิลลิลิตร)
วันที่ 6				
5,000	0.896 b	0.507	0.622	12.16
10,000	1.094 ab	0.594	0.570	12.08
15,000	1.393 a	0.711	0.725	11.41
20,000	1.275 ab	0.541	0.633	12.67
วันที่ 12				
5,000	1.825 ab	0.862 ab	0.983	49.83 a
10,000	2.034 a	0.948 a	1.108	54.03 a
15,000	1.827 ab	0.884 a	1.015	26.18 b
20,000	1.207 b	0.581 b	0.801	30.72 b
วันที่ 18				
5,000	1.403 ab	0.884 a	0.774	24.22
10,000	1.568 a	0.817 a	0.864	22.01
15,000	1.144 ab	0.668 ab	0.700	22.63
20,000	0.910 b	0.512 b	0.636	20.52
วันที่ 24				
5,000	2.328 a	1.000	0.843	19.55
10,000	1.645 ab	0.707	0.931	21.10
15,000	1.304 b	0.647	0.786	16.41
20,000	1.623 ab	0.756	1.082	17.06

ปริมาณการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และแอสตาแซนทินขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มของแสงและประมาณไนเตรทในอาหารเพาะเลี้ยงแสดงให้เห็นในภาพที่ 4 สำหรับแคโรทีนอยด์และภาพที่ 9 สำหรับแอสตาแซนทิน อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ความเข้มของแสงที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์สารทั้งสองอยู่ที่ 10,000 ลักซ์ ความเข้มแสงที่ต่ำกว่านี้จะทำให้สาหร่ายสังเคราะห์อาหารได้เพิ่มขึ้นและทำมวลชีวภาพได้เพิ่มขึ้น ดังเช่นผลการศึกษาโดย Galvão *et al*. (2013) ความเข้มแสงดังกล่าวจะกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพื่อนำไปเป็นเครื่องมือดักพลังงานแสง ทำให้สาหร่ายมีสีเขียวเข้มอันเนื่องมาจากคลอโรฟิลล์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งจะเกิดผลตอบสนองดีขึ้นหากใช้ความเข้มแสงต่ำควบคู่ไปกับปริมาณไนโตรเจนที่สูง นั่นเพราะไนโตรเจนเป็นสารสำคัญที่ใช้สังเคราะห์คลอโรฟิลล์ แต่เมื่อความเข้มแสงสูงขึ้น สาหร่ายก็ไม่จำเป็นต้องใช้คลอโรฟิลล์จำนวนมากสำหรับการเก็บเกี่ยวพลังงานแสง สาหร่ายจึงตอบสนองโดยการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์น้อยลง สารอาหารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นระหว่างปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง ก็จะนำไปสังเคราะห์สารสีตัวอื่นแทนเช่น แคโรทีนอยด์ หากความเข้มข้นไนโตรเจนต่ำเซลล์สาหร่ายก็จะเผชิญกับความเครียดอันเนื่องมาจากการขาดสารอาหาร (Choi *et al*., 2002) รวมเข้ากับความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นก็ทำให้เซลล์สาหร่ายมีความเครียดเพิ่มขึ้นอีก แอสตาแซนทินเป็นผลลัพธ์จากกระบวนการปรับตัวต่อความเครียดในกรณีนี้ (Stachowiak and Szulc, 2021) อย่างไรก็ตามเมื่อประกอบอัตราการเจริญของสาหร่ายที่ลดลงอันเนื่องมาจากความเข้มแสงสูง ปริมาณแอสตาแซนทินโดยรวมจะลดลง อันเนื่องจากจำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แอสตาแซนทินนี้ได้ลดจำนวนลงตามไปด้วย

3.3 แนวทางการนำไปใช้ประโยชน์

ผลจากการเก็บเกี่ยวมวลชีวภาพสาหร่ายจากการกรองสาหร่ายที่เลี้ยงในถังพลาสติก 6 ลิตร จำนวน 20 ใบ คิดเป็นปริมาตรทั้งหมด 90 ลิตร ได้มวลชีวภาพสาหร่ายทั้งหมด 8.55 กรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็นอัตราส่วน 0.095 กรัมต่อลิตร หากเทียบกับผลการศึกษาของ Wongsing *et al*. (2018) ที่มีผลน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.09 – 0.26 กรัมต่อลิตรแล้วก็อยู่ในระดับล่างสุดของผลการศึกษาโดย Wongsing *et al*. ด้วยเหตุผลคือ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้แหล่งคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศภายนอกโดยไม่มีการเสริมคาร์บอนไดออกไซด์จากแหล่งอื่นเข้าไป ซึ่งจากผลการศึกษาของ Wu *et al*. (2021) ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารมีบทบาทต่อการเพิ่มน้ำหนักแห้งของ *Haematococcus* อีกทางหนึ่งคือความเข้มข้นของแสงก็มีผลต่อมวลชีวภาพ โดยในการศึกษาของ Galvão *et al*. (2013) ที่พบว่าความเข้มของแสงที่เพิ่มขึ้นกลับทำให้มวลชีวภาพของสาหร่ายลดลง โดยมีเหตุผลประกอบคือ ความเข้มแสงที่สูงขึ้นทำให้ค่า pH ในสารละลายสูงขึ้น ซึ่งพีเอชสูงนี้ก็ไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสที่เจริญได้ดีในสภาวะค่อนข้างเป็นกรด

สาหร่ายฮีมาโตคอกคัสด้วยมวลแห้ง 8.55 กรัม ถ้าสามารถสังเคราะห์แอสตาแซนทินได้ 0.14% โดยน้ำหนักก็จะได้แอสตาแซนทินราว 0.012 กรัมต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย 90 ลิตร หรือ 0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร และต้องใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายราว 7,000 ลิตรเพื่อให้ได้แอสตาแซนทิน 1 กรัม หรือประมาณ 250 บาท หากต้องการลงทุนเพื่อผลิตแอสตาแซนทินด้วยวิธีนี้ จำเป็นศึกษาเงือนไขอื่นที่มีผลต่อการสังเคราะห์แอสตาแซนทินของสาหร่ายเช่น การเพิ่มหรือลดฟอสเฟต ซึ่งมีผลให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินมากพอสำหรับการลงทุน นอกจากนี้ความเสถียรของระบบการผลิตก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ตัดสินว่า การผลิตแอสตาแซนทินตามวิธีการนี้สามารถทำให้คุ้มทุนได้หรือไม่

3.4 การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน

องค์ความรู้เรื่องสาหร่ายฮีมาโตคอกคัส การเพาะเลี้ยงและการนำไปใช้ประโยชน์ ได้ถูกนำไปถ่ายทอดให้แก่ชุมชนแหลมขาม ตำบลเขาไม้แก้ว อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ในวันที่ 19 สิงหาคม 2565 และได้รับการยอมรับจากชุมชนเป็นอย่างดี มีผู้เข้าร่วมประชุมเพื่อรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีทั้งหมด 20 คน โดยมีภาพกิจกรรมดังนี้

ภาพที่ 11 ภาพรวมกิจกรรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ชุมชนแหลมขาม อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

ภาพที่ 11 ภาพรวมกิจกรรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ชุมชนแหลมขาม อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

4. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายฮีมาโตคอกคัสในห้องทดลองที่ระดับความเข้มของแสงตั้งแต่ 5,000 ไปจนถึง 20,000 ลักซ์ ความเข้มของแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายคือที่ระดับ 10,000 ลักซ์ ความเข้มแสงที่สูงกว่า 10,000 ลักซ์ ทำให้การปริมาณการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ลดลง เพราะว่าสาหร่ายไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ก็เพียงพอแล้ว สาหร่ายจึงหันไปสังเคราะห์รงควัตถุอื่นเช่น แคโรทีนอยด์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้ง A และ B จะอยู่สูงที่สุดในวันที่ 12 หลังการบ่มเชื้อ โดยมีอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อบีในอัตราส่วนที่ค่อนข้างคงที่คือ 2:1

ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปไนเตรทมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสาหร่ายการศึกษาครั้งนี้คือ 10.0 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ความเข้มข้นของไนเตรทก็ยังมีผลต่อการสังเคราะห์แอสตาแซนทินซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่ง โดยที่ความเข้มข้นไนเตรทที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์แอสตาแซนทินภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ คือ 3.0 มิลลิโมลาร์ ทำให้เกิดการสังเคราะห์แอสตาแซนทินสูงสุด 0.322 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของแสงที่สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดการสะสมแคโรทีนอยด์คือ 10,000 ลักซ์ หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 12 วัน มีการสะสมแคโรทีนอยด์ 1.11 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มแสงระดับนี้สาหร่ายมีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.198±0.005 หรือใช้เวลา 3.50±0.08 วันเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้เป็นสองเท่า

ต้นแบบของงานวิจัยนี้คือ การผลิตมวลชีวภาพเพื่อให้ได้แอสตาแซนทิน ซึ่งได้ทำการศึกษาโดยการเลี้ยงสาหร่ายในถัง 6 ลิตร 20 ใบ แล้วเก็บเกี่ยวสาหร่ายในรูปของน้ำหนักแห้งอยู่ที่ประมาณ 0.095 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณแอสตาแซนทินสังเคราะห์โดยเฉลี่ย 0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นค่าเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ทำให้ทราบว่าต้องใช้ถังเลี้ยงสาหร่าย 7,000 ลิตรเพื่อให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทิน 1 กรัมต่อครั้ง ถ้าให้เกิดความคุ้มค่าต่อการลงทุนจะต้องศึกษาปัจจัยอื่นที่เพิ่มความสามารถในการผลิตแอสตาแซนทิน รวมทั้งออกแบบให้ระบบการผลิตแอสตาแซนทินมีความเสถียร สามารถผลิตแอสตาแซนทินออกมาได้อย่างต่อเนื่องจึงจะนำไปสู่ความคุ้มทุนได้ นอกจากนี้การทำให้ผลิตภัณฑ์สะอาดเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคก็จำเป็นสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์นี้

การถ่ายทอดเทคโนโลยีไปสู่ชุมชนแหลมขาม ตำบลเขาไม้แก้ว อำเภอสิเกาจังหวัดตรัง มีผู้เข้าร่วมประชุมทั้งหมด 20 คน และได้รับความสนใจจากผู้ร่วมประชุม ด้วยมีผู้เข้าร่วมประชุมส่วนหนึ่งยกมือซักถามถึงรายละเอียดโครงการนี้ ดังแสดงในรูปภาพที่ 11

ข้อเสนอแนะ เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ผลผลิตของฮีมาโตคอกคัสที่ได้ค่อนข้างน้อย เนื่องมาจากในการศึกษาได้ใช้แหล่งคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศอย่างเดียวโดยไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่นลงไป ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการเติมแหล่งคาร์บอนอื่นเช่น น้ำตาลหรือสารอินทรีย์ในปริมาณหนึ่งเพื่อกระตุ้นให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตให้ผลผลิตมากขึ้น หรือไม่ก็พัฒนาอุปกรณ์ช่วยตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์อาหารของสาหร่าย สิ่งเหล่านี้นอกจากช่วยในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับสิ่งมีชีวิตแล้ว ยังเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศที่กำลังเป็นปัญหาใหญ่ของโลกในเวลานี้

เอกสารอ้างอิง

ดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์, (2557). แอสต้าแซนธิน: สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพที่สุดในโลก. ฝ่ายโภชนาการและสุขภาพสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. *วารสารอาหาร*, **44** (3), 15 – 17.

Beneragama CK and Goto K, (2010). Chlorophyll a:b ratio increases under low-light in ‘shade-tolerant’ *Euglena gracilis*. *Tropical Agricultural Research*, **22** (1), 12 – 25.

Bialevich V, Zachleder V and Bišová K (2022). The effect of variable light source and light intensity on the growth of three algal species. *Cells*, **11**, 1293. Doi: 10.3390/cells11081293.

Borowitzka, MA. (1988). Vitamin and fine chemical from micro-algae, pp. 165 – 174. In Borowitzka MA and Borowitzka LJ, (eds). Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.

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

Choi YE, Yun YS and Park JM, (2002). Evaluation of factors promoting astaxanthin production by a unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*, with fractional factorial design. *Biotechnology Progress*, **18**, 1170 – 1175.

Eggink LL, Park H and Hoober JK, (2001). The role of chlorophyll b in photosynthesis: Hypothesis. *BMC Plant Biology*, **1**, 2.

Ferreira VS, Pinto RF and Sant-Anna C, (2015). Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Applied Microbiology*, **120**, 661 – 670; Doi: 10.1111/jam.13007

Galvão RM, Santana TS, Fontes CHO and Sales EA, (2013). Modeling of biomass production of *Haematococcus pulvialis*. *Applied Mathematics*, **4**, 50 – 56. Doi: 10.4236/am.2013.48A008.

García-Malea LMC, Sánchez EDR, López JLC, Fernández FGA, Sevilla JMF, Rivas J, Guerrero MG, and Grima EM, (2006). Comparative analysis of the outdoor

culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, **123** (9), 329 – 342.

Goa Z, Meng C, Zhang X, Xu D, Zhao Y, Wang Y, Lv H, Yang L, Chen L and Ye N, (2012). Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. pluvialis*. *PLoSOne*, **7** (8).

Göksan T, Ak İ and Kılıç C, (2011). Growth characteristics of the alga Haematococcus pluvialis Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11, 377-383. Doi: 10.4194/1303-2712-v11_3_06

Grant CS and Louda JW, (2010). Microalgal pigment ratios in relation to light intensity: implications for chemotaxonomy. *Aquatic Biology*, **11**, 127 – 138.

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

Hoyos B, Miranda A, Meneses D, Vargas G and Sáez A, (2021). The effect of different concentrations of nitrogen and phosphorus on the production of lipid metabolites in *Heamatococcus pluvialis* UTEX 2505. *Research Square*, in press. Doi: 10.21203/rs.3.rs-262577/v1.

Jinachai N, Anantachoti P and Winit-Watjana W, (2016). Exploring competitiveness of Thailand’s cosmetic industry using Porter’s diamond model. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, **40** (4), 172 – 178.

Kang CD, Lee JS, Park TH and Sim SJ, (2005). Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**, 237 – 241.

Katsumata T, Ishibashi T and Kyle D, (2014). A sub-chronic toxicity elevation of natural astaxanthin-rich carotenoid extract of *Paracoccus carotinifaciens* in rats. *Toxicology Reports*, **1**, 582 – 588. Doi: 10.1016/j.toxrep.2014.08.008.

Kitajima K and Hogan KP, (2003). Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant Cell and Environment*, **26**, 857 – 865.

Kong LG, Xie Y, Hu L, Si JS and Wang ZS, (2017). Excessive nitrogen application dampens antioxidant capacity and grain filling in wheat as revealed by metabolic and physiological analyses. *Scientific Reports*, **7**, 43363. Doi: 10.1038.srep43363.

Kobayashi MT, Kakizono T and Nagai S, (1991). Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* to oxidative stress. Ph.D. dissertation, The university of Hong Kong, Hong Kong, 157 p.

Li F, Cai MG, Lin MW, Huang XH, Wang J, Ke HW, Zheng XH, Chen D, Wang CH, Wu SY and An Y, (2019). Differences between motile and nonmotile cells of *Haematococcus pluvialis* in the production of astaxanthin at different light intensities. *Marine Drugs*, **17**, 39. Doi: 10.3390/md17010039

Lobo V, Patil A, Phatak A and Chandra N, (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, **4** (8), 118 – 126. Doi: 10.4103/0973-7847.70902.

Lorenz RT and Cysewski GR, (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, **18** (4), 160 – 167.

Mularczyk M, Michalak I and Marycz K, (2020). Astaxanthin and other nutrient from *Haematococcus pluvialis* – Multifunctional Applications. *Marine Drugs*, **18**, 459. Doi: 10.3390/md18090459.

Maoka T, (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicine*, **74**, 1 – 16. Doi: 10.1007/s11418-019-01364-x.

Metsovit MN, Papapolymerou G, Karapanagiotidis IT and Katsoulas N (2020). Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*, **9**, 31. Doi: 10.3390/plqnts9010031

Minhas AK, Hodgson P, Barrow CJ and Adholeya A, (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgae lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 54. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00546

Orosa MD, Franqueira AC and Abalde J, (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, **96**, 373 – 378.

Oslan SNH, Shoparwe NF, Yusoff AH, Rahim AA, Chang CS, Tan JS, Oslan SN, Arumugam K, Ariff AB, Sulaiman AZ and Mohamed MS, (2021). A review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red Stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*, **11**, 256. Doi: 10.3390/biom11020256.

Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaaphylidès C and Havaux, (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *PNAS*, **109** (14), 5535 – 5540. Doi: 10.1073/pnas.1115982109.

Sandmann G, (2019). Antioxidant protection from UV- and light-stress related to carotenoid structures. *Antioxidants*, **8**, 219; doi:10.3390/antiox8070219.

Sharakshane A, (2018). An easy estimate of the PFDD for a plant illuminated with white LEDs. Doi: 10.1101/289280.

Sipaúba-Tavares LH, Berchielli-Morais FA and Scardoeli-Truzzi B, (2015). Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology*, **75** (4), 796-803. Doi: 10.1590/1519-6984.23013

Stachowiak B and Szulc P, (2021). Astaxanthin for the food industry. *Molecules*, **26**, 2666. Doi: 10.3390/molecules26092666.

Vonshak A, (1986). Microalgae: Laboratory Growth Techniques and Outdoor Biomass Production. In J. Coombs, Hall D.O., Long S.P., and Scurlock J.M.O., eds. Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis. 2nd ed. Pergamon Press., New York.

Wongsing N, Sirisattha S, Moonmangmee S and Itsaranuwat P, (2018). Effect of different culture media on growth of microalgae *Haematococcus* sp. TISTR 9459RE. *International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology*, **ICoFAB2018**, 72 – 79.

Wu KB, Ying KZ, Zhou J, Liu D, Liu L, Tao Y, Hanotu J, Zhu XS and Cai ZH, (2021). Optimizing the growth of *Haematocuccus pluvialis* based on a novel microbubble-driven photobioreactor. *IScience*, **24**, 103461.

Zhao LZ, Li K, Wang QM, Song XY, Su HN, Xie BB, Zhang XY, Huang F, Chen XL, Zhou BC and Zhang YZ, (2017). Nitrogen starvation impacts the photosynthetic performance of *Porphyridium cruentum* as revealed by chlorophyll a fluorescence. *Scientific Reports*, **7**, 8542. Doi: 10.1038/s41598-017-08428-6.