

2.2.4 ฟังไจ (fungi)

ฟังไจที่สามารถสังเคราะห์แคลโรทีนอยด์ได้มีหลายชนิด โดยการผลิตแคลโรทีนอยด์จากฟังไจที่พบบ่อยครั้งได้จากการและยีสต์ ทั้งนี้ราซึ่งมีการสร้างสารสีในเส้นใยและก้านชูสปอร์ ได้แก่ *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor mucedo* และ *Blakeslea trispora* สำหรับยีสต์ที่นิยมใช้ในการผลิตแคลโรทีนอยด์ ได้แก่ *Phaffia rhodozyma* และ *Rhodotorula glutinis* (Margalith. 1992)

2.3 สาหร่ายสีเขียว (green algae)

2.3.1 ลักษณะทั่วไป

2.3.1.1 ผนังเซลล์

สาหร่ายสีเขียวมีทั้งกลุ่มที่ไม่มีผนังเซลล์และกลุ่มที่มีผนังเซลล์ โดยกลุ่มที่ไม่มีผนังเซลล์หุ้มอาจหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์เพลลิเคิล (pellicle) เพริพลาสต์ (periplast) หรือหุ้มด้วยเกล็ด (ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544) และกลุ่มที่มีผนังเซลล์จะมีผนังเซลล์ที่สมบูรณ์คล้ายพืชชั้นสูง ประกอบไปด้วยสารพวกเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นไมโครไฟบริลประสานกันไปมาครอบคลุมเซลล์ นอกจากนี้ยังมีสารพวกที่ไม่เป็นรูปร่าง (amorphous material) หลายชนิดที่ทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์ (matrix) หรือสารที่เป็นพื้นปะปนอยู่ อาจมีสปอโรพอลเลนิน (sporopollenin) ซึ่งเป็นรงควัตถุพวกแคลโรทีนอยด์ (polymerized carotenoid material) ปะปนอยู่มากน้อยต่างกัน ทั้งนี้การสร้างผนังเซลล์ของสาหร่ายอาศัยกอลจิบอดีส์ (golgi bodies) ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่ผลิตสารองค์ประกอบของผนังเซลล์เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง (ยูดี พีรพรพิศาล. 2546)

2.3.1.2 คลอโรพลาสต์ (ยูดี พีรพรพิศาล. 2546 ; ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544)

ลักษณะทั่วไปของคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวคล้ายกับพืชชั้นสูง คือ มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นนอกและชั้นใน ทั้งนี้เยื่อหุ้มชั้นในมีการม้วนตัว ทำให้เกิดระบบเยื่อที่ซับซ้อนอยู่ภายใน โดยมีเยื่อที่มีลักษณะเป็นถุงกลมแบน เรียกว่า ไทลาคอยด์ (thylakoid) ซึ่งเยื่อภายในไทลาคอยด์ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ รงควัตถุหลักประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ และ บี และรงควัตถุประกอบ ได้แก่ แคลโรทีน (เบตา หรือแกมมา) และแซนโทฟิลล์ สาหร่ายสีเขียวมีไทลาคอยด์จำนวน 2-6 อัน เรียงซ้อนกันอยู่เป็นตั่งๆ แต่ละตั่งเรียกว่า กรานัม (granum) พหุพจน์เรียก กรานา (grana) กรานาจะเรียงตัวเป็นชั้นๆ เรียกว่าลามลลา (lamellae) หรือกรานาลามลลา ระหว่างกรานัมจะมีเยื่อเชื่อมต่อกันเรียกว่า สโตรมาลามลลา (stroma lamellae) ส่วนบริเวณที่ไม่มีเยื่อภายในคลอโรพลาสต์เรียกว่า สโตรมา (stroma) หรือเมทริกซ์ ซึ่งในส่วนของสโตรมาจะมีดีเอ็นเอ ไรโบโซม และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

2.3.1.3 รูปร่าง (ยูดี พีรพพิศาล, 2546 ; ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

สาหร่ายสีเขียวเป็นดิวิชันที่มีรูปร่างหลากหลาย คือ มีทั้งเซลล์เดี่ยว โคลโลนี เส้นสาย หลอดหรือท่อต่อกันตลอด และแบบทาลัสส์ที่เป็นเนื้อเยื่อพาราไคมา พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวและพวกที่เป็นโคลโลนีทั้งที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้มักพบเป็นแพลงก์ตอนพืชในน้ำจืดเป็นส่วนใหญ่ โดยชนิดที่มีขนาดส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมรีรูปกระสวย ส่วนพวกที่เป็นเส้นสายมักพบในน้ำจืดและมีบ้างที่พบในน้ำทะเล สำหรับพวกที่เป็นหลอดหรือท่อต่อกันตลอดและพวกที่มีลักษณะเป็นทาลัสส์ทั้งเล็กและใหญ่มักพบในทะเลเป็นส่วนใหญ่

2.3.2 การจำแนกหมวดหมู่

การจำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียวมีหลายระบบ เช่น Whitford และ Schumacher (1969) ได้จัดจำแนกดิวิชันนี้ออกเป็น 1 คลาส 10 ออร์เดอร์ Round (1973) ได้จัดจำแนกออกเป็น 4 คลาส 21 ออร์เดอร์ Bold และ Wynne (1978) ได้จัดจำแนกออกเป็น 1 คลาส 15 ออร์เดอร์ Prescott (1978) ได้จัดจำแนกออกเป็น 1 คลาส 13 ออร์เดอร์ และ Irvine และ John (1984) ได้จัดจำแนกออกเป็น 5 คลาส 14 ออร์เดอร์ เป็นต้น

2.4 ความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายสีเขียวในประเทศไทย

คทาวิฐ ปานบุญ (2542) ศึกษาความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชในจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งเก็บตัวอย่างน้ำทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 ปี (เดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม) จากแหล่งน้ำ 25 สถานี แบ่งเป็นแม่น้ำตอนบน 6 สถานี แม่น้ำตอนล่าง 5 สถานี แหล่งน้ำตามธรรมชาติ 5 สถานี และแหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้น 9 สถานี พบแพลงก์ตอนพืช 92 สกุล โดยสกุลที่พบทุกสถานีเป็นสาหร่ายในคลาส Cyanophyceae คือ *Oscillatoria* และสกุลที่พบเกือบทุกสถานีในคลาส Cyanophyceae ได้แก่ *Microcystis*, *Anabaena* และ *Spirulina* คลาส Chlorophyceae ได้แก่ *Eudorina*, *Pediastrum* และ *Scenedesmus* คลาส Bacillariophyceae ได้แก่ *Synedra* และ *Suriella* คลาส Euglenophyceae ได้แก่ *Trachelomonas* คลาส Dinophyceae ได้แก่ *Peridinium* และ *Cerutium*

อารัตน์ มหาจันทร์ และคณะ (2542) ในการสำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำจืดที่สะอาด 300 ตัวอย่างในพื้นที่กรุงเทพมหานครและปริมณฑล รวมทั้งสิ้น 6 จังหวัด 23 เขต/อำเภอ ได้แก่ กรุงเทพมหานคร 12 เขต จำนวน 149 ตัวอย่าง นครปฐม 2 อำเภอ จำนวน 32 ตัวอย่าง นนทบุรี 3 อำเภอ จำนวน 52 ตัวอย่าง ปทุมธานี 2 อำเภอ จำนวน 50 ตัวอย่าง สมุทรปราการ 2 อำเภอ จำนวน 7 ตัวอย่าง และสมุทรสาคร 2 อำเภอ จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าสาหร่ายที่มีความถี่ในการแพร่กระจายสูงกว่าร้อยละ 20.0 ของตัวอย่าง พบ 4 สกุล คือ สาหร่ายสีเขียวสกุล *Chlorella* มีการแพร่กระจายในตัวอย่างที่สำรวจมากที่สุดถึง 104 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 34.7 รองลงไปได้แก่ สาหร่ายสีเขียว

แกมน้ำเงินสกุล *Phormidium*, สาหร่ายสีเขียวสกุล *Scenedesmus* และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* พบการแพร่กระจายคิดเป็นร้อยละ 25.0 23.7 และ 22.7 ตามลำดับ

2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย

2.5.1 ไนโตรเจน

Harker และคณะ (1996) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารซึ่งมีปริมาณไนเตรตต่างกันคือ 0.0 0.75 1.5 3.0 และ 6.0 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายมีปริมาณเซลล์สูงสุดในอาหารที่มีปริมาณไนเตรตเท่ากับ 3.0 มิลลิโมลาร์ (0.25 กรัมต่อลิตร) แต่การสะสมแอสตาแซนทีนภายในเซลล์สูงสุดพบในอาหารที่มีปริมาณไนเตรตเท่ากับ 0.0 มิลลิโมลาร์ โดยมีปริมาณแอสตาแซนทีน เท่ากับ 300 พิกोगرامต่อเซลล์ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงดำเนินการเสร็จสิ้นภายใน 30 วัน

Del Campo และคณะ (2000) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Muriellopsis* sp. ในอาหารซึ่งมีปริมาณไนเตรตต่างกันคือ 10 20 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสะสมลูทีนสูงสุดในอาหารที่มีปริมาณไนเตรต 20 มิลลิโมลาร์ (1.7 กรัมต่อลิตร) โดยมีปริมาณลูทีนเท่ากับ 23 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับในอาหารที่มีปริมาณไนเตรต 30 และ 40 มิลลิโมลาร์

2.5.2 ฟอสฟอรัส

Borowitzka และคณะ (1991) เพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ตั้งแต่ 0.001 ถึง 0.2 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการเจริญใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้น แต่จะมีการสะสมแอสตาแซนทีนดีที่สุดที่ความเข้มข้นไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตร ไม่พบการสร้างแอสตาแซนทีน

Harker และคณะ (1996) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารที่มีปริมาณฟอสเฟตต่างกันคือ 0.85 1.7 และ 3.4 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเท่ากับ 3.4 มิลลิโมลาร์ (0.462 กรัมต่อลิตร) สาหร่ายมีปริมาณเซลล์สูงสุด แต่การผลิตแอสตาแซนทีนสูงสุดพบที่ความเข้มข้นฟอสเฟต เท่ากับ 0.85 มิลลิโมลาร์ (0.116 กรัมต่อลิตร) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงดำเนินการเสร็จสิ้นภายใน 30 วัน

2.5.3 ฟีเอช

Del Campo และคณะ (2000) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Muriellopsis* sp. ในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นต่างกันคือ 6 6.5 7 8 และ 9 จากการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการเจริญสูงสุดที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 แต่ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 9 และ 6 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญกลับให้ปริมาณลูทีนต่อเซลล์สูงกว่าถึง 7 และ 5 เท่า ตามลำดับ

2.5.4 โขเดียมคลอไรด์

Gouveia และคณะ (1996) รายงานว่าการชักนำสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ด้วยโขเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารสีภายในเซลล์ พบว่าในวันที่ 5 ของการชักนำมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงสุด แต่ปริมาณแคโรทีนแซนทินและแอสตาแซนทินสูงสุดในวันที่ 22 ของการชักนำ

Harker และคณะ (1996) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* จนได้จำนวนเซลล์เพียงพอ จากนั้นนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่สาหร่ายขวดละ 50 มิลลิลิตร ทำการชักนำด้วยโขเดียมคลอไรด์ ปริมาณต่างกันคือ 0.0 40 70 และ 100 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการเจริญสูงสุดที่ความเข้มข้นของโขเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.0 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่การสะสมแอสตาแซนทินมีปริมาณสูงสุดที่ความเข้มข้นของโขเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ (5.85 กรัมต่อลิตร) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ดำเนินการเสร็จสิ้นภายใน 30 วัน

Del Campo และคณะ (2000) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Muriellopsis* sp. ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโขเดียมคลอไรด์ต่างกันคือ 2 35 70 100 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสะสมลูทีนสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของโขเดียมคลอไรด์เท่ากับ 35 มิลลิโมลาร์ (2.05 กรัมต่อลิตร) โดยมีปริมาณลูทีนเท่ากับ 31.7 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณลูทีนจะเริ่มลดลงในอาหารที่มีโขเดียมคลอไรด์มากกว่า 100 มิลลิโมลาร์ (5.85 กรัมต่อลิตร)

2.5.5 โขเดียมอะซีเตต

Borowitzka และคณะ (1991) เพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* เปรียบเทียบระหว่างอาหารที่เติมโขเดียมอะซีเตต 0.1 กรัมต่อลิตร และไม่เติมโขเดียมอะซีเตต พบว่าการเติมโขเดียมอะซีเตตจะส่งผลให้อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอีกทั้งชักนำให้เกิดการสะสมแอสตาแซนทิน

Kobayashi และคณะ (1991) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโขเดียมอะซีเตตต่างกันคือ 15 30 45 และ 60 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเติมโขเดียมอะซีเตตมากกว่า 30 มิลลิโมลาร์ (2.5 กรัมต่อลิตร) จะมีผลในการยับยั้งการเจริญ แต่จะกระตุ้นการสะสมแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น

Kobayashi และคณะ (2001) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เป็นระยะเวลา 4 วัน จากนั้นชักนำให้ผลิตแอสตาแซนทินโดยเติมโขเดียมอะซีเตต 45 มิลลิโมลาร์ เพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับอาหารที่เติมโขเดียมอะซีเตต 45 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับเฟอร์ริซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ ปรากฏว่าการเติมโขเดียมอะซีเตตเพียงอย่างเดียวทำให้สาหร่ายเข้าสู่ระยะชีสต์เต็มวัยเร็วกว่าการไม่เติมโขเดียมอะซีเตต โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 20 ไมโครเมตร ขณะที่อาหารซึ่งเติมโขเดียมอะซีเตตร่วมกับเฟอร์ริซัลเฟตทำให้จำนวนเซลล์สาหร่ายที่เข้าสู่ระยะชีสต์เต็มวัยมี

จำนวนมากขึ้น และมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ใหญ่กว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมอะซีเตตเพียงอย่างเดียว

Orosa และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในอาหารซึ่งมีความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตตต่างกันคือ ร้อยละ 0 0.25 0.5 1 และ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากการทดลองพบว่าสาหร่ายมีการผลิตแอสตาแซนทินสูงสุดในอาหารซึ่งมีปริมาณโซเดียมอะซีเตตร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.5.6 เฟอรัสซัลเฟต

Kobayashi และคณะ (1991) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* เป็นระยะเวลา 4 วัน จากนั้นทดลองชักนำด้วยโซเดียมอะซีเตต 45 มิลลิโมลาร์ (3.69 กรัมต่อลิตร) ร่วมกับเฟอรัสซัลเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตเป็น 0 150 300 450 และ 600 ไมโครโมลาร์ พบว่าการชักนำด้วยโซเดียมอะซีเตต 45 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับเฟอรัสซัลเฟต 450 ไมโครโมลาร์ (0.125 กรัมต่อลิตร) ให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุด โดยที่ความเข้มข้นเฟอรัสซัลเฟต 600 ไมโครโมลาร์ (0.167 กรัมต่อลิตร) กลับให้ปริมาณแอสตาแซนทินต่ำที่สุด

Estevez และคณะ (2001) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในอาหารซึ่งมีความเข้มข้นของเหล็ก (Fe EDTA) ต่างกันคือ 5 90 และ 500 ไมโครโมลาร์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสะสมเบต้าแคโรทีนสูงสุดในอาหารซึ่งความเข้มข้นของเหล็กเท่ากับ 90 ไมโครโมลาร์ (0.033 กรัมต่อลิตร)

Ip และ Chen (2005) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* ในสูตรอาหารที่มีปริมาณเฟอรัสซัลเฟตเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และทดลองชักนำให้ผลิตแอสตาแซนทินทำโดยเปรียบเทียบชนิดของสารชักนำ 3 ชนิด คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.1 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ($NaClO$) 1 มิลลิโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.001 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.5 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าการชักนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1 มิลลิโมลาร์ ได้ผลดีที่สุดคือผลิตแอสตาแซนทิน 12.58 มิลลิกรัมต่อลิตร