การสกัดลิพิดอย่างหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris*

EXTRACTION OF CRUDE LIPID FROM MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS*

นางสาวปัทมา พิสุทธิพงศ์โชโต

นางาสวไพลิน คงความสุข

นางสาวสุจิตตา ทับสาร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EXTRACTION OF CRUDE LIPID FROM MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS*

MISS PATTAMA PISUTTIPHONGCHOTO

MISS PAILIN KHONGKHAMSUK

MISS SUJITTA TABSAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL RESOURCE CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสกัดลิพิดอย่างหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris* Extraction of Crude Lipid from Microalgae *Chlorella vulgaris*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปัทมา พิสุทธิพงศ์โชโต 49050587
	นางสาวไพลิน คงความสุข 49050598
	นางสาวสุจิตตา ทับสาร 49051164
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2552

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. พิสมัย ชัยรัตน์อุทัย	
ผศ.ดร. สุวรรณี จรรยาพูน	
ผศ.ดร. อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การเก็บเกี่ยวและการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris*
นักศึกษา	นางสาวปัทมา พิสุทธิพงศ์โชโต
	นางสาวไพลิน คงความสุข
	นางสาวสุจิตตา ทับสาร
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมีทรัพยากรสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2552
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ทำการศึกษาวิธีการในการเก็บเกี่ยวและการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายในอาหาร BG 11 ที่ความเข้มแสง 4,500 ลักซ์ ให้แสงช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ใน Autoclave ผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Sonication ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Osmotic shock และผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave คือที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 5 นาที ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบมีค่าเท่ากับ 27% แอมพลิจูดที่เหมาะสมในการทำเซลล์แตกด้วย วิธีการ Sonication คือการใช้คลื่นความถี่สูงที่ร้อยละแอมพลิจูด 25 ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบมีค่าเท่ากับ 25% สภาวะที่เมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Osmotic shock คือแช่ในสารละลาย NaCl เข้มข้น 5%(w/v) ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ 13% เปรียบเทียบระหว่างวิธีการทำให้เซลล์แตกทั้งสามวิธีพบว่าวิธีการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 5 นาที จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดลิพิดดีที่สุดสารที่สกัดได้มี Phytol, Linoleic และ Palmitic acid เป็นองค์ประกอบหลักลิพิดที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายมีปริมาณมากที่สุดเมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : การสกัดน้ำมัน, สาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ วิธีการทำให้เซลล์แตก

Title	Extrantion of Crude Lipid from Microalgae *Chlorella vulgaris*
Students	Miss Pattama Pisuttiphongchoto
	Miss Pailin Khongkhamsuk
	Miss Sujitta Tabsan
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Enviromental Resource Chemistry
Academic Year	2552
Advisor	Usarat Thawornchaisit

ABSTRACT

This special project studied extraction of crude lipid from microalgae, *Cholrella vulgaris* by cultivation and enrichmemt of algae in BG-11 under light intersity of 4500 Lux, light: dark cycle of 16:8, and temperature of 25°C. factors being inverfigated are time and temperature for autoclaving, percentage of amphitude by sonication, concentrations of NaCl by osmotic shock, and types of solvent for extraction. Results showed Hiat optimum Temperture and time disrubtion by autoclaving was 121°C and 5 min yielding crude extracts at 27%. Optimum amplitude for cell aisruption by sonication wass 25% yielding crude extract at 25% optimum concentration of NaCl for cell disruption by osmotic shock was 5%(w/v) yeilding crude extarct of 13%. Comparison exxtraction efficiency between autoclave, sonication, and osmotic shock found that autoclave was this effective in disruption cell yeilding highest quantity of crude lipid extract GC-MS analysis of crude extract from autoclave at 121°C , 5 min. Show that Phytol was major componeuts of lipids of accumalared in *Cholrella vulgaris* follow by Linoleioc acids and Palmitic acids. Lipid extraction efficiency vaaried with types of solution being used in extraction of crude lipids from *Cholrella vulgaris.* Results found that mixture of chloroform:methanol was most effective in extraction of lipids from *Cholrella vulgaris.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : Crude lipid extraction, Microalgae *Chlorella vulgaris* and Disrubtion cell

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความร่วมมือจากบุคคลหลายท่าน คณะผู้จัดทำโครงงานพิเศษจึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการโครงการพิเศษนี้อย่างใกล้ชิดตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และ ผศ. พิสมัย ชัยรัตน์อุทัย ที่กรุณาเสนอแนะและแก้ไขเพิ่มเติมโครงงานพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นางสาวรัตติยา อ่องมะลิ ที่กรุณาเสนอแนะ และให้คำปรึกษาและสอนเทคนิคต่างๆ ที่สำคัญและจำเป็นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจนสามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายมาใช้ในโครงงานพิเศษนี้ได้

นอกเหนือจากบุคคลที่กล่าวมาแล้วยังมีบุคคลอีกหลายท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ และให้กำลังใจในการจัดทำโครงงานพิเศษ ทางคณะผู้จัดทำโครงงานพิเศษใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ปัทมา พิสุทธิพงศ์โชโต
ไพลิน คงความสุข
สุจิตตา ทับสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 จุลสาหร่าย	4
2.2 ชนิดของจุลสาหร่ายที่สามารถสะสมน้ำมัน	5
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการสะสมน้ำมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*	7
2.4 การผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่าย	10
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	16
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	16
3.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น	17
3.3 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris*	17
3.4 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ(crude lipid extract)	18
3.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave	19
3.6 ศึกษาผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ sonication	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.7 ศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ osmotic shock 21

3.8 ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ 22

3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ 24

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 25

4.1 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา 25

4.2 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ 26

4.3 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave 28

4.4 ผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ sonication 29

4.5 ผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ osmotic shock 30

4.6 ผลของวิธีการทำให้เซลล์แตกต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ 32

4.7 ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ 36

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 41

5.1 สรุปผลการทดลอง 41

5.2 ข้อเสนอแนะ 42

เอกสารอ้างอิง 43

ภาคผนวก ก. 46

ภาคผนวก ข. 48

ภาคผนวก ค. 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณน้ำมันที่สกัดในเซลล์ของจุลสาหร่ายชนิดต่างๆ	6
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอสเทอร์ของกรดไขมันด้วย GC-MS	23
4.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพองค์ประกอบของลิพิดในการทำให้เซลล์แตกต่างๆ	34
4.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพองค์ประกอบของลิพิดที่ชนิดตัวทำละลายต่างๆ	38
ค.1 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ(crude lipid extract)	51
ค.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ	52
ค.3 ผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ	54
ค.4 ผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ	55
ค.5 ผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะทั่วไปของเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris*	5
2.2 กระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน	11
2.3 ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย	13
3.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในขวดรูปชมพูที่สภาวะเหมาะสม	17
4.1 หัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน	25
4.2 เซลล์สาหร่ายที่เจริญเติบโตในอาหาร BG-11 ในสภาวะที่มีแสงสว่างต่อมืด 16:8 ชมนานสองสัปดาห์	26
4.3 เซลล์สาหร่ายที่ผ่านการอบแห้งและนำไปใช้ในการสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ	26
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบกับระยะเวลาในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave (นาที)	27
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการสกัดลิพิดอย่างหยาบกับอุณหภูมิที่ใช้ในการนึ่งด้วยความร้อน (autoclave)(°c)	28
4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบกับร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในวิธีการ sonication	29
4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบกับร้อยละความเข้มข้นของสารละลายเกลือ	30
4.8 ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเมื่อใช้วิธีการทำให้เซลล์แตกสามวิธี ณ สภาวะที่เหมาะสม สำหรับแต่ละวิธี	31
4.9 โครมาโทแกรมแสดงสารจำพวกเมทิลเอสเทอร์ ของกรดไขมันที่พบในลิพิดที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งถูกทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการที่แตกต่างกันสามวิธี	33
4.10 ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเมื่อใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน	35
4.11 โครมาโทแกรมแสดงสารจำพวกเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่พบในลิพิดที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน 3 ชนิด	37

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

พลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างเช่น ไบโอดีเซล จัดเป็นแหล่งพลังงานทดแทนประเภทหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในขณะนี้ เนื่องจากสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงทางเลือกทดแทนการใช้น้ำมันดีเซลที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการกลั่นปิโตรเลียมได้ โดยไบโอดีเซลนั้นมีสมบัติหลายประการคล้ายคลึงกับน้ำมันดีเซล ทำให้สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยไม่ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์แต่อย่างใด ไบโอดีเซลเป็นสารจำพวกอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้จากกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของสารจำพวกไตรเอซิลกลีเซอรอลกับแอลกอฮอล์ในสภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา วัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซลได้มีอยู่หลายชนิดได้แก่ พืชน้ำมัน สบู่ดำ และสาหร่ายขนาดเล็ก เป็นต้น ในกรณีของพืชน้ำมันพบว่าประเทศไทยมีการเพาะปลูกพืชผลิตน้ำมันอยู่หลายชนิดอย่างเช่น ปาล์ม ถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน ทำให้วัตถุดิบชนิดนี้ถูกมองว่ามีอยู่ในปริมาณมากจนสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน แต่ในความเป็นจริงผลผลิตที่ได้จากพืชน้ำมันเหล่านั้นส่วนหนึ่งเป็นวัตถุดิบที่ต้องป้อนเข้าสู่อุตสาหกรรมอาหาร เพื่อผลิตเป็นน้ำมันสำหรับการบริโภค การนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณน้ำมันที่ต้องใช้เพื่อการบริโภคของมนุษย์ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) ในกรณีของสบู่ดำมีข้อจำกัดที่สำคัญคือให้ผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำ ใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกนานประกอบกับต้องใช้พื้นที่จำนวนมากในการเพาะปลูก และยังไม่มีสงเสริมให้ปลูกเชิงเศรษฐกิจ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวข้างต้นทำให้การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายเป็นหัวข้อวิจัยที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีข้อดีคือ ใช้พื้นที่ขนาดเล็กในการเพาะเลี้ยง ประกอบกับสาหร่ายสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและสามารถสะสมน้ำมัน หรือลิพิดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวประเภทเดียวกับที่พบในพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ ที่นำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ (Chisti, 2007) จากการศึกษาพบว่า เมื่อนำสาหร่ายขนาดเล็กมาสกัดจะได้น้ำมันหรือลิพิดที่เป็นไตรกลีเซอร์ไรด์ โดยมีกรดปาล์มมิติก กรดสเตียริค และกรดโอเลอิค เป็นส่วนประกอบหลักซึ่งเป็นกรดไขมันประเภทเดียวกันกับที่พบในน้ำมันพืช แสดงว่าน้ำมันที่ผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล (รัตนภรณ์, 2552) ส่วนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้นไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูก เมื่อเทียบกับการเพาะปลูกพืชที่ผลิตน้ำมันอื่นๆ เช่น สบู่ดำ และปาล์มน้ำมัน ใช้เวลาในการเพาะปลูกนานและใช้พื้นที่ในการเพาะมากอีกด้วย (รัตนภรณ์, 2552)

เอกสารนี้ได้รับการเผยแพร่ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เป็นสาหร่ายจำพวกหนึ่งที่สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วและสามารถสะสมน้ำมันต่อลิพิดประเภท Fuel oil ในปริมาณมาก (Chisti, 2007) จึงได้มีการวิจัยและศึกษาถึงศักยภาพของการนำเอาสาหร่ายชนิดนี้มาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไบโอดีเซล Mata *et al.* (2009)ได้สรุปว่าขั้นตอนในการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายมีอยู่ 6 ขั้นตอนสำคัญได้แก่ การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algae cultivation) การเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell harvesting) การทำให้เซลล์แห้ง (Cell drying) การทำให้เซลล์แตก (Cell disruption) การสกัดน้ำมันจากสาหร่าย (Oil extraction) และการผลิตไบโอดีเซล (Biodiesel production) ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้จะมีผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันที่ได้จากเซลล์สาหร่าย ตัวอย่างเช่น Lee *et al* .(2009) ได้เปรียบเทียบผลของวิธีการที่ทำให้เซลล์แตกรวมทั้งหมด 5 วิธี ได้แก่ Autoclave, Bead-beating, Microwave, Sonication, และ Osmotic shock ต่อปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากการศึกษาพบว่าวิธี Autoclave และ Microwave ให้ปริมาณน้ำมันต่อลิพิดที่สกัดได้สูงสุด รองลงไปคือวิธี Bead-beating และ Osmotic shock ในขณะที่ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวสาหร่ายมีผลต่อปริมาณน้ำมันต่อลิพิดที่สกัดได้จากสาหร่าย แต่พบว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องในเรื่องดังกล่าวกลับมีอยู่ค่อนข้างจำกัด โครงงานพิเศษนี้จึงได้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันต่อลิพิดที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายที่ถูกทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน พร้อมทั้งศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณน้ำมันต่อลิพิดที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่าย

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการอบนึ่งด้วยความร้อนของไอน้ำ (Autoclave) ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ (crude lipid extract) จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris*
2. เพื่อศึกษาผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูง (Sonication) ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris*
3. เพื่อศึกษาชนิดของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris*
4. เพื่อศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดลิพิดอย่างหยาบจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในสภาวะที่มีการสะสมน้ำมัน อ้างอิงสภาวะตามชิโนรสและคณะ (2552)
2. ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Autoclave โดยเปรียบเทียบเวลาที่ 3 สภาวะ คือเวลาที่ 5 นาที , 10 นาที และ 15 นาที
3. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการAutoclave โดยเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิ 3 อุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิ 115 , 121 และ 125 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
4. ศึกษาผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Sonication โดยเปรียบเทียบผลของร้อยละแอมพลิจูด 3 ค่า คือ ที่ร้อยละแอมพิจูด 25, 30 และ 35 นาน 5 นาที
5. ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock โดยเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของสารละลายเกลือ 3 ค่า คือ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 5 นาที
6. ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล เฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตก เพื่อให้ได้ปริมาณลิพิดที่สกัดออกจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในปริมาณสูงสุด

2. ทราบชนิดตัวทำละลายในการสกัดที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันที่สกัดออกจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในปริมาณสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลสาหร่าย (Microalgae)

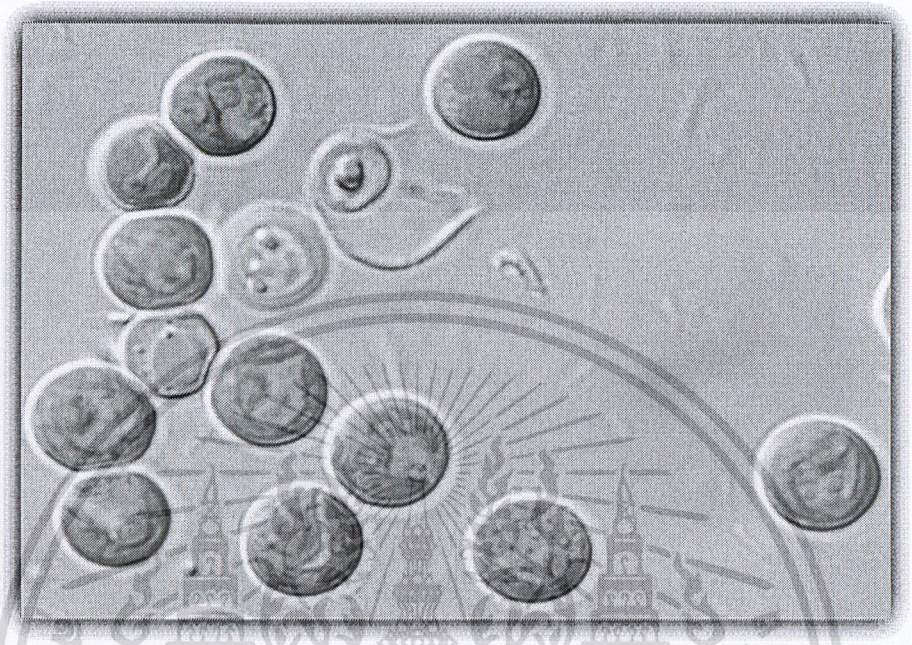
จุลสาหร่ายหรือสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในธรรมชาติที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ จัดอยู่ในอาณาจักรโปรติสที่มีลักษณะเซลล์เป็นพวกยูคารีโอต (eukaryote) จุลสาหร่ายมีมากมายหลายประเภท และมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ขนาดเล็กมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนถึงขนาดใหญ่คล้ายพืช แต่ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริงโดยมีการคาดการณ์ว่ามีจำนวนมากถึง 200,000-800,000 สายพันธ์ (Wikipedia, 2010) แต่ละประเภทมีลักษณะและคุณสมบัติแตกต่างกันไป โดยสาหร่ายบางชนิดมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูง เช่น สไปรูไลน่า (*Spirulina platensis*) ในขณะที่สาหร่ายบางชนิดมีคาร์โบไฮเดรตสูง เช่น นอสตอก (*Nostoc sp.*) หรือมีไขมัน (หรือกรดไขมัน) ในปริมาณมาก เช่น คีโตเซอรอส (*Chaetoceros calcitrans*) หรือชิโซไซเตรียม (*Schizochytrium sp.*) นอกจากนี้ยังมีการรายงายว่าสาหร่ายหลายชนิดอย่างเช่นบอทริลโอคอคคัส (*Botryococcus braunii*) และคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) สามารถผลิตน้ำมันเป็น Extracellular Product ได้ (ประเสริฐ, 2552) จุลสาหร่ายแต่ละชนิดจะเจริญเติบโตในธรรมชาติที่มีสภาวะแตกต่างกัน สามารถพบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็มทั้งในรูปแขวนลอยในน้ำและยึดเกาะติดกับสิ่งอื่น โดยจุลสาหร่ายถูกนำมาใช้ประโยชน์หลายประการตั้งแต่ใช้ทำอาหารเสริมทั้งของมนุษย์และเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารสัตว์ ทำปุ๋ยหรือผลิตสารเคมีบางประเภทที่มีมูลค่าสูงอย่างเช่น สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หรือนำไปใช้ในการฟื้นฟูและรักษาสิ่งแวดล้อม (ประเสริฐ, 2552)

จากนี้ในปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถสะสมน้ำมัน เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล และเนื่องจากในโครงงานพิเศษนี้ได้เลือก *Chlorella vulgaris* เป็นสาหร่ายสายพันธุ์ที่จะศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ ดังนั้นในหัวข้อนี้จะทบทวนความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวกับสาหร่ายสายพันธุ์นี้

Chlorella vulgaris เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว (unicellular green algae) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1890 โดย เอ็ม ดับพลิว ไบเจอร์นิค (วิสัย, 2536) จัดอยู่ในดีวิชันคลอโรไฟตา (*Division Chlorophyta*) อยู่ในคลาสคลอโรไฟซีส (*Chlorophyceae*) ซึ่งเป็นกลุ่มของสาหร่ายสีเขียว (green algae) ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปร่างรี ขนาด 2-10 ไมครอน (รูปที่ 2.1) มีรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี และสารจำพวกคาโรทีน ได้แก่ แอลฟา, เบต้า, และแกมมา-คาโรทีน รงควัตถุเหล่านี้จะอยู่ในคลอโร พลาสต์ ซึ่งมีหลายแบบเช่น รูปถ้วย (cup-shape) รูปเกือกม้า (girdle-shape) ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพกตินบางชนิด เช่น *Volvox* สามารถผลิตสารเมือก (mucilaginous substances) มาห่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเซลล์มีลักษณะคล้าย *Chlorococcum* เคลื่อนที่ไม่ได้



รูปที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ที่มา:http://botany.natur.cuni.cz/algo/images/determin/chlvulgaris.jpg

Chlorella เป็นสาหร่ายที่พบได้ทั่วไป ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์มาก เนื่องจากเจริญเติบโตง่ายและมีปริมาณโปรตีนสูง (Casey and Lubitz, 1963 อ้างอิงโดย การญจนภาชน์, 2527)มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโตสปอร์ (autospore) ภายในเซลล์แม่ แต่ละสปอร์จะมีลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้คือ อุณหภูมิ แสงสว่าง ความเป็นกรดด่าง ความชื้นและสารอาหาร โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Chlorella sp.* จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 6.8 ความเข้มแสงที่ทำให้มีการเจริญสูงสุด คือ 2,400 ลักซ์ อัตราการเจริญเท่ากับ 13.85 X 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ปาจารีย์ และคณะ, 2540 อ้างอิงโดย กฤษณะ และคณะ, 2547)

2.2 ชนิดของจุลสาหร่ายที่สามารถสะสมน้ำมัน

จุลสาหร่ายโดยทั่วไปสามารถเพิ่มชีวมวลของตนเองด้วยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ในสิ่งแวดล้อมและใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน อย่างไรก็ตามพบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมมีจุลสาหร่ายบางชนิดที่สามารถสะสมน้ำมันภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่น *Botryococcus braunii,*

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlorella vulgaris, Navicula pelliculosa, Scenedsmus acutus, Crypthecodinium cohnii, Dunaliella primolecta, Monallanthus salina, Neochloris oleoabundans, Phaeodactylum tricornutum, and *Tetraselmis sueica* (Li, Du and Liu, 2008) โดยทั่วไปปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์มีค่าระหว่าง 20-50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Chisti, 2007) แต่ในสาหร่ายบางชนิดอาจมีปริมาณน้ำมันสูงถึง 80% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Mata *et al.*, 2009)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของจุลสาหร่ายชนิดต่างๆ

ชนิดของจุลสาหร่ายน้ำจืดและน้ำเค็ม	ปริมาณน้ำมัน (% นน.เซลล์แห้ง)	ผลผลิต (productivity) (g/L/day)
Botryococcus braunii	25.0-75.0	0.02
Chlorella vulgaris	5.0-58.0	0.02-0.20
Chlorella sp.	10.0-48.0	0.02-2.5
Crypthecodinium cohnii	20.0-51.0	20
Dunaliella primolecte	23.1	0.09
Ellipsoidion sp.	27.4	0.17
Isochrysis sp.	7.1-33	0.08-0.17
Monallanthus salina	20.0-22.0	0.08
Nahnochloropsis sp.	12.0-53.0	0.17-1.43
Nannochloropsis sp.	31.0-68.0	0.17-1.43
Phaeodactylum tricornutum	20.0-30.0	0.003-1.9
Pavlova salina	30.9	0.16
Skeletonema sp.	13.3-31.8	0.09
Skeletonema sp.	13.3-31.8	0.09
Tetraselmis sueica	8.5-23.0	0.12-0.32

ที่มา: (Chisti, 2007 ; Mata *et al.* ,2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการสะสมน้ำมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

2.3.1 สารอาหาร

1. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย คาร์บอนที่พืชนำไปใช้ได้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อนินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์คาร์บอน โดยสาหร่ายใช้อนินทรีย์คาร์บอนในรูปแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งละลายได้ในน้ำ หรือในรูปของเกลือคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต ผลของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายยังไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากในงานวิจัยของ Burris *et al.*(1981: อ้างถึงในกรองจันทร์, 2536) พบว่าแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการสังเคราะห์แสง เมื่อปริมาณความเข้มข้นของ HCO_3^- สูงประมาณ 2-3 มิลลิโมล จะทำให้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนย้ายคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์ แต่ในงานวิจัยของ Richmond (1986) กลับพบว่าอัตราการเติบโตของ *Chlorella sp.* ในอาหารที่เติมและไม่เติมคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 0.56-4.43 มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ควรให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของสาหร่ายแต่อาจหยุดให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในช่วงมืด ซึ่งจะไม่มีผลกระทบต่อการเติบโตของ

นอกจากอนินทรีย์คาร์บอนแล้ว สาหร่ายยังสามารถเจริญได้โดยใช้คาร์บอนในรูปของสารประกอบอินทรีย์อย่างเช่นน้ำตาลชนิดต่างๆ (ลัดดา, 2540) จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอินทรีย์คาร์บอนจะทำให้ภายในเซลล์มีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น เมื่อเติมกลูโคสจะทำให้เปอร์เซ็นต์ไขมันในเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้น (ชิโนรส และคณะ 2552)

แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเติบโตของสาหร่าย เป็นตัวที่มีบทบาทเกี่ยวกับน้ำหนักแห้งของสาหร่าย โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ สาหร่ายมีปริมาณไนโตรเจนคิดเป็นร้อยละ 1-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในสาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนจะมีการสร้างสารประเภทคาร์บอน เช่น น้ำมันหรือแป้งมาแทน (ลัดดา วงศ์รัตน์ , 2540)

สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งรูปของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร ไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ได้แก่เกลือแอมโมเนีย (NH_4^+) ไนเตรท (NO_3^-) และไนไตรท์ (NO_2^-) โดยพบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตสูงในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปไนเตรทหรือแอมโมเนีย ในสภาวะที่มีไนโตรเจนทั้งสองรูปฟอร์มนี้พบว่าสาหร่ายจะใช้แอมโมเนียหมดก่อนแล้วจึงใช้ไนเทรตสำหรับสาหร่ายบางชนิด สาหร่ายบางชนิดสามารถใช้ไนไตรท์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้แต่จะใช้ได้ในความเข้มข้นต่ำประมาณ 1 มิลลิโมล นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการเติบโตของสาหร่าย ส่วนการใช้แอมโมเนียเป็น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งไนโตรเจนพบว่าจะทำให้ค่ากรด-เบสของอาหารลดลง ก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ สาหร่ายบางชนิดมีความไวสูงต่อความเข้มข้นของแอมโมเนีย โดยจะเกิดการยับยั้งการเติบโตที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลของแอมโมเนีย (ลัดดา วงศ์รัตน์ , 2540)

ไนโตรเจนในรูปอินทรีย์สารที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ เอไมด์ เอมีน ยูเรีย และแอสพาราจีน เป็นต้น การใช้ยูเรียให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้ไนเทรต และแอมโมเนีย ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่าย ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุหรือสารสี (pigments) ของเซลล์รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอมไซม์บางชนิดลดลงด้วย (ลัดดา 2540 และRichmond, 1986)

2. แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเติบโต มีบทบาทต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงาน และกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก รวมทั้งทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยให้ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายค่อนข้างคงที่ แม้ว่าในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีปริมาณสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงกว่าฟอสฟอรัสอนินทรีย์ แต่สาหร่ายต้องการใช้ฟอสฟอรัสในรูปสารอนินทรีย์มากกว่า ฉะนั้นสารฟอสฟอรัสอินทรีย์จึงจัดว่าเป็นแหล่งเบื้องต้นของฟอสฟอรัสซึ่งจะแตกตัวเป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ ออโธฟอสเฟต หรือฟอสเฟต โดยอาศัยเอนไซม์ที่เรียกว่าฟอสฟาเทสหรือฟอสโฟเอสทาเรสในปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณอาจสูงกว่าหรือต่ำกว่านี้ก็ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำ ระดับค่ากรด-เบส และปริมาณของธาตุอาหารชนิดอื่น ได้แก่ โซเดียม โปแตสเซียม หรือแมกนีเซียม ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลเสียต่อการเจริญเติบโต คือปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์-เอ RNA และ DNA จะลดลง แต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตกลับเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) Hosaku (1972) พบว่า *Chlorella sp.*และ *Scenedesmus obliquus* เติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของฟอสเฟต 1 มิลลิโมลต่อลิตร และถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตต่ำกว่า 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร Knauss and Porter (1954) อ้างอิงใน Hosakul (1972) พบว่า ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 6-45 มิลลิโมลต่อลิตร ไม่มีผลยังยั้งการเติบโตของสาหร่าย

3. เหล็ก

เหล็กจัดเป็นสารอาหารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการเติบโตและการสะสมน้ำมันของสาหร่าย ชิโนรสและคณะ (2552) พบว่าเฟอร์ริกคลอไรด์มีผลต่อการสะสมน้ำมันภายในเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายพื้นเมือง ซึ่งปริมาณเฟอร์ริกคลอไรด์มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 0.002 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด 0.542 ต่อวัน และมีไขมันสะสมในเซลล์ เท่ากับ 6.42 เปอร์เซ็นต์ Liu *et al.* (อ้างถึงในกรองจันทร์ 2536) พบว่าความเข้มข้นของเหล็กที่สูงมีอิทธิพลมากต่อการสะสมน้ำมันใน *Chlorella vulgaris* เมื่อเพิ่มปริมาณของเหล็กในอาหารจะพบปริมาณการสะสมน้ำมันใน *Chlorella vulgaris* เพิ่มขึ้น

2.3.2 แสง

แสงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสง เมื่อความเข้มของแสงเพิ่มขึ้น การเติบโตของสาหร่ายจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการหายใจของเซลล์ การเกิดปรากฏการณ์การยับยั้งด้วยแสง(photoinhibition) ขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่าย และช่วงระยะเวลาได้รับแสง (Richmond, 1986) ชิโนรส และคณะ (2552) พบว่าความเข้มของแสงและระยะเวลาการให้แสงมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสะสมน้ำมัน เมื่อความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีขึ้น เท่ากับ 0.542 ต่อวัน ทำให้สาหร่ายสะสมน้ำมันได้ดีขึ้น เท่ากับ 6.41 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาการให้แสงต่อเนื่องช่วงสว่างต่อมืด 16:8 มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมน้ำมันของสาหร่ายด้วย

2.3.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโต และการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งสาหร่ายแต่ละชนิดตอบสนองต่อช่วงอุณหภูมิแตกต่างกัน และทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงที่แตกต่างกัน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส หรือมากกว่า สาหร่ายไม่สามารถปรับตัวได้จะชะงักการเจริญเติบโต ส่วนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเล็กน้อยจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง (กรองจันทร์, 2536) จึงต้องมีการจำกัดและรักษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม และให้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้เซลล์สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด

Richmond (1986) พบว่า *Chlorella sp.* เติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตอนกลางวัน และ 15 องศาเซลเซียสในตอนกลางคืนในสภาพห้องปฏิบัติการและที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตอนกลางวัน และ 20 องศาเซลเซียสในตอนกลางคืน

Norak และ Brune (1985) อ้างอิงใน กรองจันทร์ (2536) พบว่า *Chlorella vulgaris* เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในสภาพห้องปฏิบัติการมีอัตราเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.070 ต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 15, 22 และ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 0.015, 0.025 และ 0.045 ต่อชั่วโมงตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส สาหร่ายไม่สามารถเติบโตได้

2.3.4 พีเอช

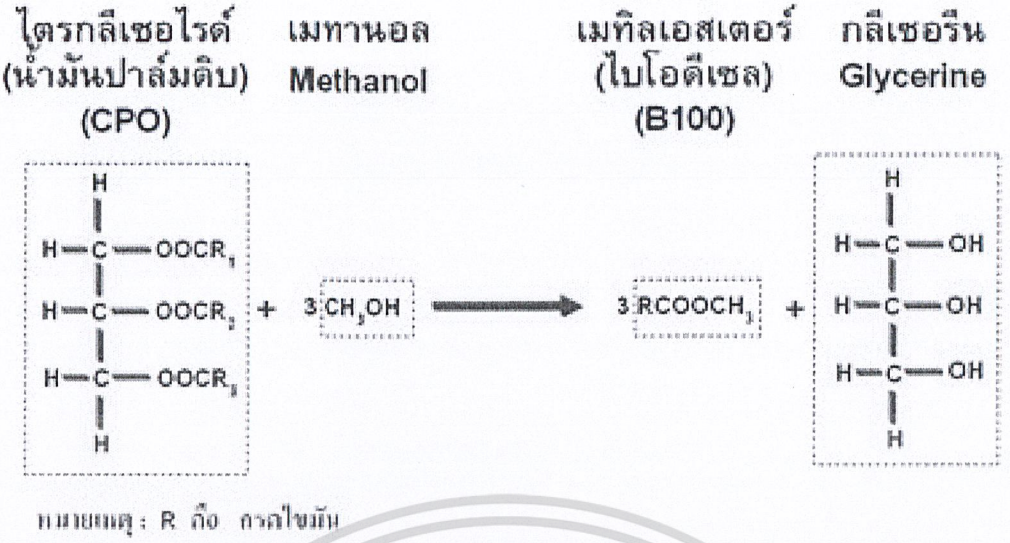
พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย มีผลต่อกระบวนการต่างๆ ทางชีววิทยาของเซลล์ ค่าพีเอชเป็นตัวบ่งบอกการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ หรือปริมาณของไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์สาหร่าย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) Richmond (1986) พบว่าสาหร่ายตอบสนองต่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสาหร่าย สำหรับ *Chlorella vulgaris* เติบโตได้ดีในพีเอชช่วงกว้าง แต่โดยทั่วไปสามารถเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกรดเล็กน้อยจนถึงกลาง และบางสายพันธุ์ เช่น *Chlorella saccharophila* สามารถเติบโตได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 และ *Chlorella homosphaera* เติบโตได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6 Malis-Arad and McGowan (1982; อ้างถึงในกรองจันทร์, 2536) พบว่า *Chlorella vulgaris* เติบโตไดดีที่พีเอช 6.3 โดยจะให้ปริมาณเซลล์สูงและเกิดการแบ่งเซลล์สูงสุด

2.4 การผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่าย

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานทดแทนที่ได้รับการส่งเสริมจากภาครัฐ ให้มีผลิตขึ้นใช้เองอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายอย่าง เช่น สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ และไม่ปล่อยสารประกอบของกำมะถัน เช่น ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวการที่ทำให้เกิดภาวะฝนกรด (acid rain) ในบรรยากาศ (Miao *et al.* ,2004 อ้างอิงในผกาวดีและคณะ, 2551)

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตได้จากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เช่น ปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ทานตะวัน สบู่ดำ หรือ น้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่ผ่านการใช้งานแล้ว โดยนำมาทำปฏิกิริยาทางเคมีเรียกว่า กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ร่วมกับเมทานอลหรือเอทานอลจนเกิดเป็นสารอัลคิลเอสเตอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า ไบโอดีเซล (B100) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งเมื่อนำมาผสมกับน้ำมันดีเซลเกรดที่ใช้กันในปัจจุบันในสัดส่วนร้อยละ 5- 10 (B5-B10) จะสามารถนำมาใช้งานในเครื่องยนต์ดีเซลได้เป็นอย่างดี โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงถึงกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ที่มา:http://blog.eduzones.com/tenny/3668

ประเทศไทยมีวัตถุดิบหลายชนิดที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ น้ำมันปาล์ม สบู่ดำ และน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว แต่วัตถุดิบดังกล่าวข้างต้นมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล น้ำมันปาล์มเป็นวัตถุดิบที่ต้องป้อนเข้าสู่อุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้ผลิตน้ำมันพืชเพื่อการบริโภค การนำมาใช้ผลิตเป็นไบโอดีเซลจะก่อให้เกิดปัญหาการแย่งชิงวัตถุดิบระหว่างอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมด้านพลังงานทดแทน (สวทท, 2551) การผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันที่ไม่ใช่พืชอาหารอย่าง เช่น สบู่ดำ มีข้อจำกัดตรงที่พืชชนิดนี้ยังให้ผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำ และยังไม่มีการส่งเสริมให้ปลูกในเชิงเศรษฐกิจ (สวทท, 2551) ในขณะที่การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วนั้นมีข้อจำกัดในเรื่องของความไม่สม่ำเสมอของคุณภาพน้ำมันและน้ำมันพืชเหล่านี้ยังมีวัฏจักรการซื้อขายกลับมาใช้ซ้ำในตลาด (สวทท, 2551) นอกเหนือจากวัตถุดิบดังกล่าวข้างต้น ในปัจจุบันพบว่าน้ำมันจากสาหร่าย โดยเฉพาะจุลสาหร่าย (Microalgae oil) มีศักยภาพในการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซล ข้อดีของการใช้จุลสาหร่ายเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ สาหร่ายเหล่านี้จะเติบโตง่ายและสร้างเซลล์ได้รวดเร็วภายในไม่กี่วัน โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในสิ่งแวดล้อมและพลังงานแสงอาทิตย์ (Mata *et al.*, 2009) มีอัตราการเติบโตและผลผลิตต่อไร่สูงกว่าพืชน้ำมัน ใช้เนื้อที่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์น้อยกว่า พื้นที่ที่ใช้ในการปลูกสบู่ดำ ถั่วเหลือง ลดปัญหาการแย่งชิงพื้นที่เพาะปลูกพืชที่ใช้ในการบริโภค

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากจุลสาหร่ายขนาดเล็กแสดงดังรูปที่ 2.3 โดยแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ คือ ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algae cultivation) ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวสาหร่าย (Haruesring) ขั้นตอนการทำให้เซลล์แห้ง (Cell drying) ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก (Cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Disruption) ขั้นตอนการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย (Algal oil extraction) และขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล (Biodiesel production) ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะมีผลต่อปริมาณน้ำมันและชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ และ ประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซล (Mata *et al.*, 2009)

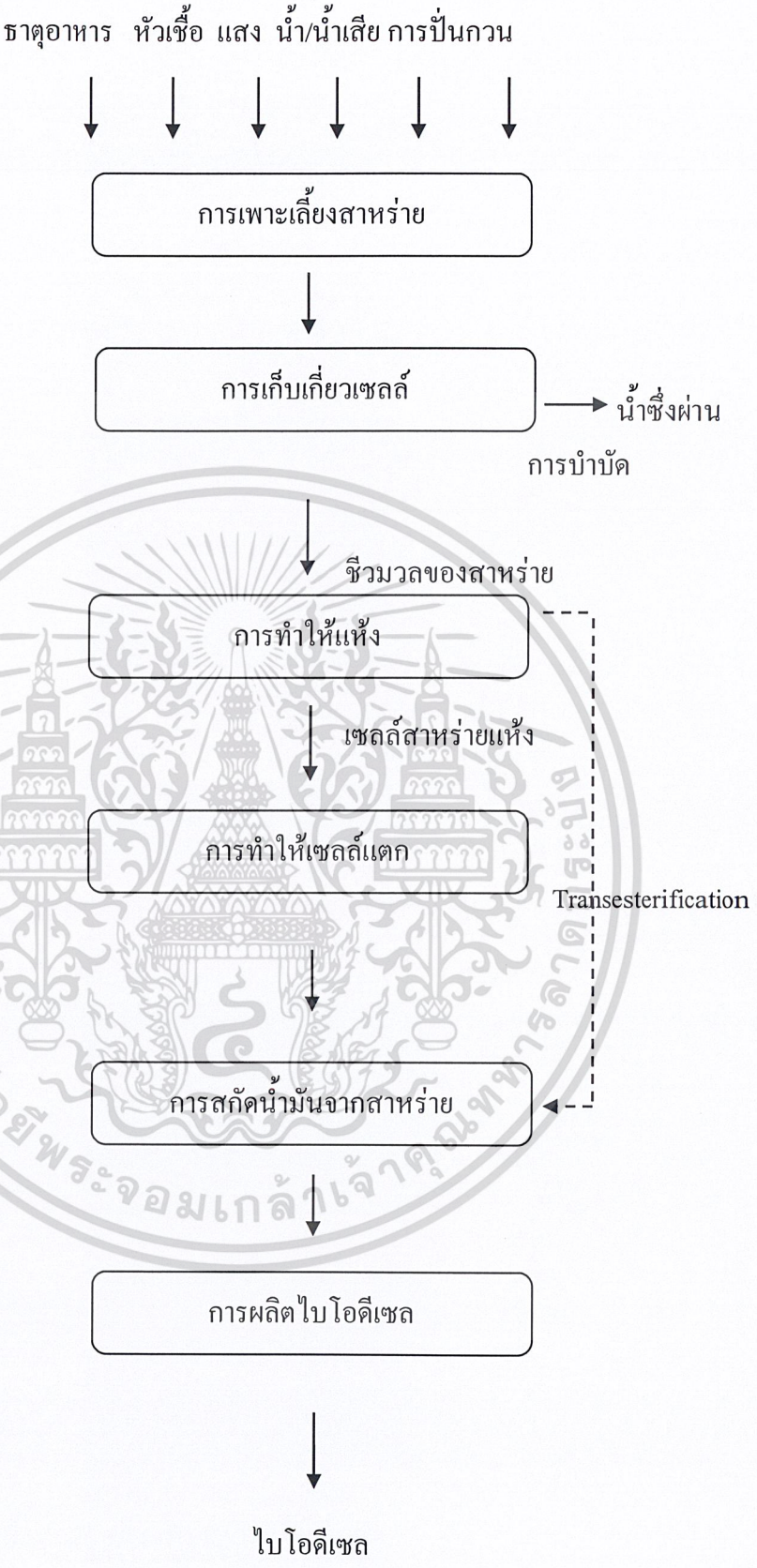
2.4.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สาหร่ายจะถูกนำมาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่าย โดยให้มีปริมาณเพียงพอที่สามารถจะนำไปทำสกัดลิพิดจากสาหร่ายเพื่อนำมาผลิตไบโอดีเซล

2.4.2 การเก็บเกี่ยวเซลล์

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการแยกชีวมวลหรือเซลล์ของสาหร่ายออกจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ วิธีการทั่วไปที่นิยมใช้ได้แก่ 1) การปั่นเหวี่ยง (Centrifugation) วิธีนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเก็บเกี่ยวสาหร่าย โดยเฉพาะสาหร่ายเซลล์เดียว (Unicellular algae) เช่น *Chlorella* เนื่องจากมีข้อดีตรงที่รวดเร็ว และสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้เป็นจำนวนมากนอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้ยังสามารถฆ่าเชื้อ เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ (Mata *et al.*, 2009) และ 2) การกรองด้วยเยื่อเมมเบรน (Membrans filtration) ซึ่งเป็นวิธีการเก็บเกี่ยวที่นิยมใช้เมื่อสาหร่ายที่เลี้ยงเป็นแบบเส้นสาย (Filamentous algae) เช่น *Spirulina* การกรองวิธีนี้ไม่เหมาะที่จะใช้เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่มีขนาดเล็กมากๆ เพราะจะก่อให้เกิดปัญหา การอุดตันของเยื่อกรองซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของการกรองลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย (Mata *et al.*, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 การทำให้เซลล์แห้ง

ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลล์ เซลล์สาหร่ายมักถูกทำให้แห้งเพื่อลดการเน่าเสียของเซลล์และรักษาคุณภาพของน้ำมันที่สะสมในเซลล์ ซึ่งวิธีการที่ใช้ในการทำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กอย่าง เช่น *Chlorella sp., Scendesmus./spirulina* มีอยู่หลายวิธี spray-drying, drum-drying, freeze-drying และ sun-drying แต่ที่นิยมใช้ ได้แก่ การตากแดด (sun drying) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และเสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่มีข้อเสีย เช่น ต้องขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ และอาจเกิดการเสียหายจากแสงแดดที่มากเกินไป หรือเกิดการหมักขึ้น การตากแดดมักใช้กับสาหร่ายเกลียวทองที่นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ โดยการเกลี่ยสาหร่ายบนแผ่นพลาสติกในถาดแล้วนำไปตากแดด

2.4.4 การทำให้เซลล์แตก

เมื่อผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แห้งแล้ว เซลล์สาหร่ายจะถูกทำให้เซลล์แตกจุดประสงค์เพื่อให้เกิดการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ หรือสารที่เราสนใจออกมา ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความหนาของผนังเซลล์และลักษณะสมบัติของสารที่สนใจ ซึ่งสามารถทำได้ทั้งวิธีทางกล และวิธีทางเคมี ตัวอย่างวิธีทางกล ได้แก่ Cell homogenizers, bead mills, ultrasounds, autoclave และ spray drying ตัวอย่างวิธีทางเคมี ได้แก่ freezing, organic solvents และ osmotic shock โดยมี กรดและเบสเป็นเอนไซม์ของปฏิกิริยา

2.4.5 การสกัดน้ำมัน

หลังจากเซลล์สาหร่ายผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แตกแล้ว เซลล์สาหร่ายจะถูกนำมาสกัดเอาส่วนที่เป็นน้ำมันมาวัดปริมาณที่แท้จริง โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดจะมีผลต่อปริมาณน้ำมันที่ได้ ตัวอย่างตัวทำละลาย ได้แก่ Chloroform : methanol, Hexane, Ethanol, Octanol, Methanol, Cyclohexane เป็นต้น

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยศวดี (2547) ทำการเปรียบเทียบผลของวิธีการทำให้เซลล์แห้งระหว่างการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และวิธี Freeze drying ต่อปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย *Botryococcus braunii* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรคาร์บอนในปริมาณมากและถูกคัดแยกจากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากการศึกษาพบว่าวิธีการทำให้เซลล์แห้งแบบFreeze drying จะให้ปริมาณน้ำมันดีกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

ชิโนรส และคณะ (2552) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสะสมไขมันของสาหร่ายประเภทคลอเรลลา โดยแปรค่าความเข้มแสง (3000 ลักซ์ และ 5000 ลักซ์) ชนิดของแสง (แสงสีส้มและแสงสีขาว) และระยะเวลาการให้แสง (12:12 และ 16:18 ชั่วโมง) จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายพื้นเมืองประเภทคลอเรลลามีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 0.542 ต่อวันและมีไขมันสะสม

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ แสวงหาผลประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเซลล์ ร้อยละ 6.42 ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ โดยแสงสีส้มเป็นแหล่งพลังงาน ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง ปริมาณเฟอร์ริคคลอไรด์และกลูโคสเท่ากับ 0.003 และ 0.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Lewis *et al.* (2000) ทำการศึกษาวิธีการสกัดของกรดไขมันจากจุลินทรีย์เฮทเทอโรโทรฟที่ผลิตน้ำมัน โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายและลำดับที่เหมาะสมของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไขมันออกเซลล์ของจุลินทรีย์ระหว่าง น้ำ : เมทานอล : คลอโรฟอร์ม หรือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ จากการศึกษาพบว่าลำดับที่เหมาะสมของตัวทำลายที่ใช้ในการสกัด คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดน้ำมันได้ดีกว่า นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วนที่ของตัวทำละลายที่เหมาะสมระหว่าง คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ควรมีอัตราส่วนดังนี้ คือ 1:2:0.8

Zhu *et al.* (2002) ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไขมันและน้ำมันที่สกัดได้จากเซลล์แบบเปียกและเซลล์ที่ถูกทำให้แห้งของเซลล์เห็ดรา *Mortierella alpine* โดยใช้วิธีการสกัดไขมันและน้ำมันอ้างอิงตามวิธีการของ Bligh and Dyer จากการศึกษาพบว่าเซลล์เปียกถูกสกัดน้ำมันได้ไม่สมบูรณ์ การสกัดแบบแห้งจึงมีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดแบบเปียก

Lee *et al.* (2009) ทำการศึกษาผลของวิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclaving, bead-beating, microwaves, sonication และosmotic shock ต่อปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายสามชนิดดังนี้ *Botryococcus sp., Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus sp.*สารละลายของเซลล์ที่แตกถูกนำไปสกัดโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform และ methanol(1:1) พบว่าในกรณีของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยวิธีการสกัดน้ำมันที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด คือ microwaves กับ Autoclaving รองลงไปคือวิธีการ bead-beating กับ osmotic shock วิธีการ sonication และ non-disruption ตามลำดับ

Vicente *et al*. (2009) ทำการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดน้ำมันจากเชื้อราชนิด *Mueor circinelloides* โดยศึกษาเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากตัวทำละลาย 3 ประเภทได้แก่ ตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform : methanol ตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform : methanol : น้ำ และ n-hexane ซึ่งผลการทดลองพบว่า Chloroform : methanol (2:1 V/V) จะให้ปริมาณน้ำมันสูงสุด เท่ากับ 19.9 ± 1.3 wt %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องอบนึ่งแบบความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HV-50 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
2. เครื่องกำเนิดแรงสั่นด้วยคลื่นความถี่ (Sonicator) รุ่น vibra cell บริษัท SCIENTIFIC PROMOTION CO.LTD.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น A007465 ยี่ห้อ SANYO
4. เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (Evaporator) รุ่น Aspirator A-3s บริษัท EYELA Tokye Rikakikal
5. เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex) รุ่น FT01/17 Fisherbrand บริษัท Labquip International Limited
6. เครื่องเขย่าสาร (Shaker) บริษัท GALLENKAMP
7. ตู้อบ (oven) บริษัท Delta Laboratory รุ่น1375FX
8. เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-254 ยี่ห้อ DENVER Instrument
9. โถดูดความชื้น (Dessicator)
10. ลักซ์มิเตอร์ (Lux meter)
11. นาฬิกาจับเวลา
12. เทอร์โมมิเตอร์
13. กระดาษกรอง
14. บริภัณฑ์เครื่องแก้ว

3.1.2 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ BG11 ดังแสดงในภาคผนวก ก
2. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ความบริสุทธิ์ 99.00% เกรดวิเคราะห์ บริษัท Labscan (Thailand) Co. Ltd.
3. เมทานอล (Methanol) ความบริสุทธิ์ 99.90% เกรดวิเคราะห์ บริษัท Apex (Thailand) Co. Ltd.
4. เฮกเซน (Hexane) ความบริสุทธิ์ 99.00% เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italma(Thailand) Co. Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italma(Thailand) Co. Ltd.
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Italma(Thailand) Co. Ltd.
7. น้ำกลั่น

3.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อ TISTR 8580 ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ถูกนำมาเตรียมเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นโดย นางสาวรัตติยา อ่องมะลิ ด้วยการเลี้ยงด้วยในอาหารสูตร BG 11 (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก) พร้อมกับเขย่าให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.3 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ทำได้โดยถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.2 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG 11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 4,500 ลักซ์ โดยให้แสงช่วงสว่างต่อมืดเป็นเวลา 16:8 ชั่วโมง ทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ชิโนรสและคณะ, 2552) ลักษณะการเพาะเลี้ยงแสดงดังรูปที่ 3.1 เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเซลล์สารละลายในขวดรูปชมพู่มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์สาหร่ายออกจากอาหารเหลว ถ่ายเซลล์สาหร่ายที่ได้ลงบนกระจกนาฬิกาและนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Lee *et al.*, 2009)

รูปที่ 3.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในขวดรูปชมพู่ที่สภาวะเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ (crude lipid extract)

1. ชั่งสาหร่ายที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 3.3 มา 0.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ลงในหลอด Centrifuge เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาที่กำหนดแล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปทำการสกัดเพื่อหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร อ้างอิงวิธีการสกัดตามวิธีการ Bligh & Dyer (1959) โดยมีรายละเอียดวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข
3. นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนของเหลวกับตะกอนเซลล์ออกจากกัน เทชั้นของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงลงในกรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายกับน้ำโดยชั้นบนเป็นตัวทำละลายเมทานอลผสมน้ำ และชั้นล่างเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอลและลิพิดที่สกัดได้
4. ไขชั้นตัวทำละลายซึ่งมีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักเริ่มต้น
5. นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทชั้นตัวทำละลายที่มีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมใบเดิมในข้อ 4
6. นำขวดก้นกลมไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator สภาวะที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิลิตรปรอท อุณหภูมิ 50 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling) 10 $\pm$2 องศาเซลเซียส
7. นำขวดก้นกลมในข้อ 6 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น
8. ใช้ตัวทำละลายชะลิพิดจากขวดก้นกลมแล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 nm นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้โดยใช้สมการในการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค หน้า 55 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้จะถูกนำมาหักลบจากน้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ในข้อ 7
9. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 1-8 ซ้ำ 2 ครั้ง
10. ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Autoclave จากเวลา 5 นาที เป็น 10 และ 15 นาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave

1. ชั่งสาหร่ายที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 3.3 มา 0.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ลงในหลอด Centrifuge เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่เหมาะสมตามข้อ 3.4 เมื่อครบกำหนดเวลาที่กำหนดแล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปทำการสกัดเพื่อหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร อ้างอิงวิธีการสกัดตามวิธีการ Bligh & Dyer (1959) โดยมีรายละเอียดวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข
3. นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนของเหลวกับตะกอนเซลล์ออกจากกัน เทชั้นของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงลงในกรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายกับน้ำโดยชั้นบนเป็นตัวทำละลายเมทานอลผสมน้ำ และชั้นล่างเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอลและลิพิดที่สกัดได้นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทตัวทำละลายผสมที่ได้จากการสกัดลงในขวดก้นกลม ในข้อ 4 เทสารละลายลงในกรวยแยกอันเดียวกัน
4. ไขชั้นตัวทำละลายซึ่งมีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักเริ่มต้น
5. นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทชั้นตัวทำละลายที่มีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมใบเดิมในข้อ 4
6. นำขวดก้นกลมไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator สภาวะที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิลิตรปรอท อุณหภูมิ 50 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling) 10 $\pm$2 องศาเซลเซียส
7. นำขวดก้นกลมในข้อ 6 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น
8. ใช้ตัวทำละลายชะลิพิดจากขวดก้นกลมแล้วนำไปวัดหาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 nm นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้โดยใช้สมการในการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค หน้า 55 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้จะถูกนำมาหักลบจากน้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ในข้อ 7
9. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 1-8 ซ้ำ 2 ครั้ง
10. ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนสภาวะของวิธีการทำให้เซลล์สาหร่ายแตก Autoclave จาก อุณหภูมิ 115 เป็น อุณหภูมิ 121 และ 125 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ศึกษาผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication

1. ชั่งสาหร่ายที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 3.3 มา 0.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ลงในหลอด Centrifuge เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป Sonication ที่ร้อยละแอมพลิจูด 25 เป็นเวลาที่เหมาะสมตามข้อ 3.4 เมื่อครบกำหนดเวลาที่กำหนดแล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปทำการสกัดเพื่อหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร อ้างอิงวิธีการสกัดตามวิธีการ Bligh & Dyer (1959) โดยมีรายละเอียดวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข
3. นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนของเหลวกับตะกอนเซลล์ออกจากกัน เทชั้นของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงลงในกรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายกับน้ำโดยชั้นบนเป็นตัวทำละลายเมทานอลผสมน้ำ และชั้นล่างเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอลและลิพิดที่สกัดได้นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทตัวทำละลายผสมที่ได้จากการสกัดลงในขวดก้นกลม ในข้อ 4 เทสารละลายลงในกรวยแยกอันเดียวกัน
4. ไขชั้นตัวทำละลายซึ่งมีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักเริ่มต้น
5. นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทชั้นตัวทำละลายที่มีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมใบเดิมในข้อ 4
6. นำขวดก้นกลมไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator สภาวะที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิลิตรปรอท อุณหภูมิ 50 $\pm$2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling) 10 $\pm$2 องศาเซลเซียส
7. นำขวดก้นกลมในข้อ 6 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น
8. ใช้ตัวทำละลายชะลิพิดจากขวดก้นกลมแล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 nm นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้โดยใช้สมการในการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค หน้า 55 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้จะถูกนำมาหักลบจากน้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ในข้อ 7
9. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 1-8 ซ้ำ 2 ครั้ง
10. ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนค่าร้อยละแอมพลิจูดวิธีการทำให้เซลล์แตก Sonication จาก ค่าร้อยละแอมพลิจูดที่ 25 เป็น ร้อยละแอมพลิจูดที่ 30 และ 35 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 ศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock

1. ชั่งสาหร่ายที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 3.3 มา 0.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ลงในหลอด Centrifuge เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี osmotic shock โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 % w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาที่กำหนดแล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปทำการสกัดเพื่อหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร อ้างอิงวิธีการสกัดตามวิธีการ Bligh & Dyer (1959) โดยมีรายละเอียดวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข
3. นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนของเหลวกับตะกอนเซลล์ออกจากกัน เทชั้นของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงลงในกรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายกับน้ำโดยชั้นบนเป็นตัวทำละลายเมทานอลผสมน้ำ และชั้นล่างเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอลและลิพิดที่สกัดได้นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทตัวทำละลายผสมที่ได้จากการสกัดลงในขวดก้นกลม ในข้อ 4 เทสารละลายลงในกรวยแยกอันเดียวกัน
4. ไขชั้นตัวทำละลายซึ่งมีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักเริ่มต้น
5. นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทชั้นตัวทำละลายที่มีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมใบเดิมในข้อ 4
6. นำขวดก้นกลมไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator สภาวะที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิลิตรปรอท อุณหภูมิ 50± 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling) 10± 2 องศาเซลเซียส
7. นำขวดก้นกลมในข้อ 6 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น
8. ใช้ตัวทำละลายชะลิพิดจากขวดก้นกลมแล้วนำไปวัดหาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 nm นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้โดยใช้สมการในการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค หน้า 55 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้จะถูกนำมาหักลบจากน้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ในข้อ 7
9. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 1-8 ซ้ำ 2 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ วิธีการทำให้เซลล์แตก osmotic shock จาก ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์จาก 5 เป็น 10 และ 20 % w/v เป็นเวลา 48 ชั่วโมงตามลำดับ

3.8 ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ

1. ชั่งสาหร่ายที่เพิ่มจำนวนได้ในข้อ 3.3 มา 0.5 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ใส่ลงในหลอด Centrifuge เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการที่เหมาะสม เป็นเวลาที่เหมาะสมตามที่ศึกษามาแล้ว เมื่อครบกำหนดเวลาที่กำหนดแล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปทำการสกัดเพื่อหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร อ้างอิงวิธีการสกัดตามวิธีการ Bligh & Dyer (1959) โดยมีรายละเอียดวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข
3. นำสารละลายที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนของเหลวกับตะกอนเซลล์ออกจากกัน เทชั้นของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงลงในกรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายกับน้ำโดยชั้นบนเป็นตัวทำละลายเมทานอลผสมน้ำ และชั้นล่างเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอลและลิพิดที่สกัดได้นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทตัวทำละลายผสมที่ได้จากการสกัดลงในขวดก้นกลม ในข้อ 4 เทสารละลายลงในกรวยแยกอันเดียวกัน
4. ไขชั้นตัวทำละลายซึ่งมีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักเริ่มต้น
5. นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 และ 3 เทชั้นตัวทำละลายที่มีลิพิดอยู่ลงในขวดก้นกลมใบเดิมในข้อ 4
6. นำขวดก้นกลมไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator สภาวะที่ใช้ในการระเหยคือ ความดัน 200 มิลลิลิตรปรอท อุณหภูมิ 50 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเครื่องทำความเย็น (Cooling) 10 $\pm$2 องศาเซลเซียส
7. นำขวดก้นกลมในข้อ 6 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น
8. ใช้ตัวทำละลายชะลิพิดจากขวดก้นกลมแล้วนำไปวัดหาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 nm นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B ที่มีอยู่ในลิพิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สกัดได้โดยใช้สมการในการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค หน้า 55 ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้จะถูกนำมาหักลบจากน้ำหนักลิพิดที่สกัดได้ในข้อ 7

9. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 1-8 ซ้ำ 2 ครั้ง
10. ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดจากตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล เป็น n-hexane และ Petroleum ether ตามลำดับ
11. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันและเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้ด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) โดยสภาวะGC – MS ที่ใช้ในการทดสอบเป็นดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอสเทอร์ของกรดไขมันด้วย GC-MS

GC condition

Gas Chromatograph	6890N (Agilent Technologies, Use)
Column	DB-FFAP 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 ㎛ capillary column (J&W scientific, USA.)
Temperature Program	Injector temperature : 240°C Oven temperature : 150°C (initial temperature), holding at 150°C for 5 mins, then increased from 150°C to 230°C at 4°C/min, holding at 230°C for 1 min. Detector temperature : 260°C
Injection mode	Split ratio 1 : 50 (คลอโรฟอร์ม : เมทานอล) Split ratio : Split less 1:100 (เฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์)
Helium Carrier gas	Flow rate 0.8 ml/min (99.999 % purity)(Praxair(Thailand) Co.,Ltd.)

และสภาวะMSที่ใช้ในการทดสอบมีดังต่อไปนี้

Mass Spectrometer condition

Detector	Mass Spectrometer 5973N (Agilent Technologies, USA)
MS mode	EI mode

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

1. นำเซลล์สาหร่ายมาทำให้แตกด้วยวิธี autoclave, sonication และ osmotic shock โดยใช้สภาวะที่ให้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้สูงสุดของแต่ละวิธีการ
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปทำการสกัดเพื่อหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร อ้างอิงวิธีการสกัดตามวิธีการ Bligh & Dyer (1959) ทำการปั่นเหวี่ยงสารละลายของเซลล์ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนของเหลวกับตะกอนเซลล์ออกจากกัน เทชั้นของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงลงในกรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลายกับน้ำ จากนั้นไขชั้นตัวทำละลายซึ่งมีลิพิดอยู่ลงในขวดรูปชมพู่
3. นำตะกอนเซลล์มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งตามวิธีการในข้อ 2 เทชั้นตัวทำละลายที่มีลิพิดอยู่ลงในขวดรูปชมพู่ใบเดิม กรองชั้นตัวทำละลายที่มีลิพิดอยู่โดยใช้กระดาษกรอง
4. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันและเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้ด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.1

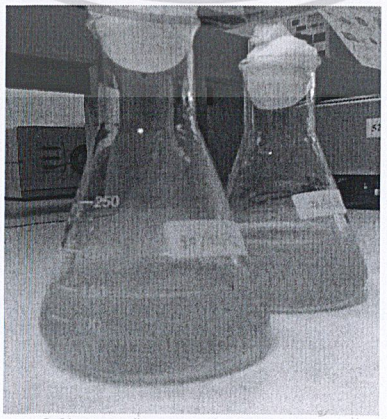
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

โครงงานพิเศษนี้ทำการศึกษาถึงการสกัดลิพิดอย่างหยาบจากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris* โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายนาน 2 สัปดาห์ แล้วทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายมาทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ โดยแบ่งเป็น (1) ศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วยวิธี Autoclave (2) ศึกษาผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication (3) ศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock และ(4) ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ ทำการวัดปริมาณลิพิดอย่างหยาบด้วยการวิเคราะห์โดยชั่งน้ำหนัก (Gravimetry) และวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) ได้ผลเป็นดังนี้

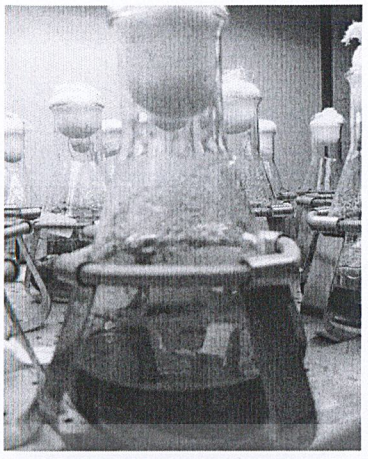
4.1 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา

สาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกเพิ่มจำนวนจากหัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในอาหารสูตร BG-11 โดยนางสาวรัตติยา อ่องมะลิ ลักษณะของหัวเชื้อเริ่มต้นเป็นดังรูปที่ 4.1 เมื่อถูกนำมาเพิ่มจำนวนโดยถ่ายลงในอาหารสูตร BG-11 ใหม่พร้อมกับให้แสงช่วงสว่างต่อมืดเป็นเวลา 16:8 ชั่วโมง ที่ความเข้ม 4500 ลักซ์ นาน 2 สัปดาห์ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์นั้นเจริญเติบโตเต็มที่ ลักษณะของเซลล์สาหร่ายมีสีเขียวเข้มดังแสดงรูปที่ 4.2 เมื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่โตเต็มที่แล้วด้วยวิธีการปั่นหวี่ยงและนำเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้เซลล์สาหร่ายที่นำไปใช้ในการศึกษาหาปริมาณลิพิดดังแสดงในรูปที่ 4.3

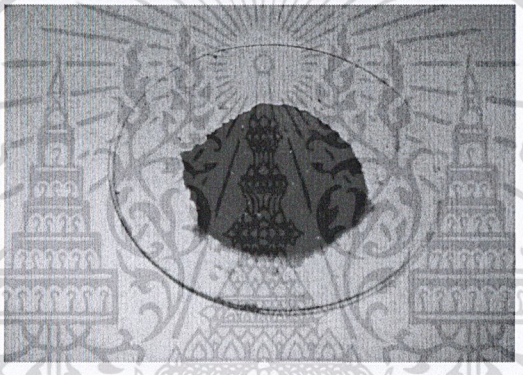


รูปที่ 4.1 หัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 เซลล์สาหร่ายที่เจริญเติบโตในอาหาร BG-11 ในสภาวะที่มีการให้แสง สว่าง:มืด 16:8 ชม. นาน 2 สัปดาห์

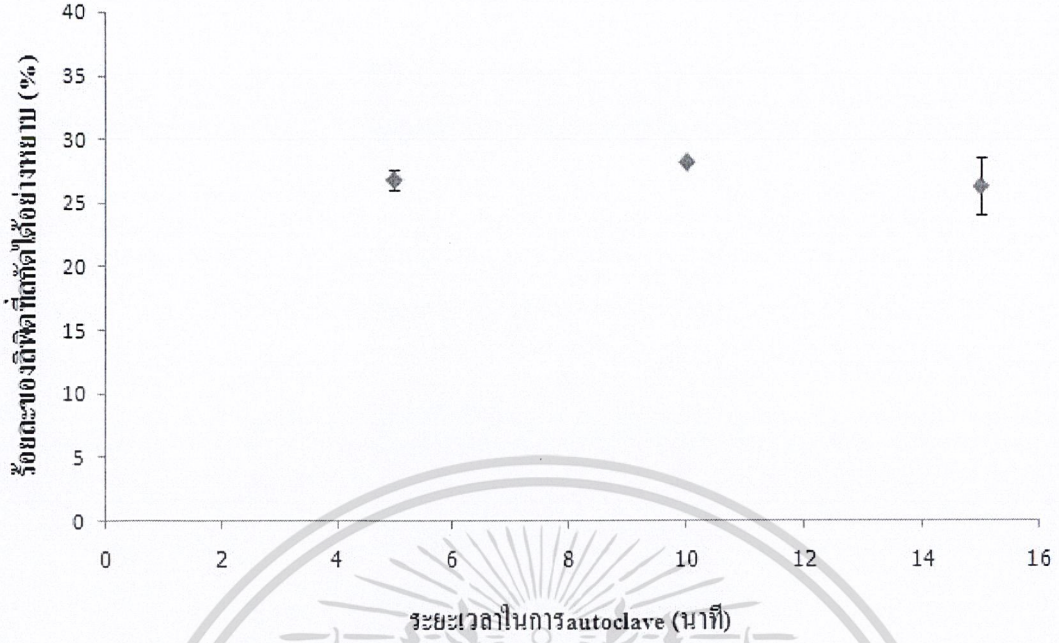


รูปที่ 4.3 เซลล์สาหร่ายที่ผ่านการอบแห้งและนำไปใช้ในการสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ

4.2 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ (crude lipid extract)

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วยวิธีการ autoclave ต่อ ร้อยละของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ (crude lipid extract) โดยแปรค่าระยะเวลาที่ใช้ในการนึ่งเซลล์ด้วยความร้อนจากไอน้ำ (autoclave) จาก 5 นาที เป็น 10 และ 15 นาที นำสารละลายเซลล์ไปทำการสกัดหาปริมาณลิพิดตามวิธีของ Bligh and Dyer ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบกับระยะเวลาในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี autoclave (นาที)

จากรูปที่ 4.4 พบว่า เมื่อใช้เวลาในการ autoclave นาน 5 นาที จะได้ร้อยละของปริมาณลิพิดที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 27±0.7 เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการ autoclave ให้นานขึ้นเป็นเวลา 10 นาที ร้อยละของการสกัดลิพิดอย่างหยาบจะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 28±0.1 และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการ autoclave ให้นานขึ้นอีกเป็นเวลา 15 นาที ร้อยละการสกัดลิพิดอย่างหยาบจะลดลงเป็น 26±2.3 เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาทดสอบทางสถิติโดยวิธี t-test พบว่าปริมาณลิพิดที่สกัดได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ใช้ในนึ่งเซลล์ด้วยความร้อนจากไอน้ำหรือautocalveในช่วงเวลาที่ทดสอบไม่มีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้ หรืออาจเป็นเพราะน้ำหนักของเซลล์แห้งที่ใช้ในการสกัดที่มีปริมาณที่น้อยเกินไปจึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของระยะเวลาในการ autoclave ดังนั้นการ autoclave นาน 5 นาที จัดว่าเป็นระยะเวลาที่เพียงพอสำหรับทำให้เซลล์สาหร่ายแตก และทำให้ได้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบในอัตราที่สูงและไม่สิ้นเปลืองทรัพยากร พลังงาน และระยะเวลา ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave คือ 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ โดยแปรค่าอุณหภูมิที่ใช้ในการ autoclave ต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 115 , 121 และ 125 องเซลเซียส กำหนดระยะเวลาในการ autoclave เป็นเวลา 5 นาที นำสารละสายเซลล์ไปทำการสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบตามวิธีของ Bligh and Dyer ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.5

รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบกับอุณหภูมิที่ใช้ในการนึ่งด้วยความร้อนจากไอน้ำ (autoclave) (องศาเซลเซียส)

จากรูปที่ 4.5 พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave จะมีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ โดยเมื่อใช้อุณหภูมิในการ autoclave ที่ 115 องศาเซลเซียส จะได้ร้อยละปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเท่ากับ 18.0±0.03 และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการautoclave เป็น 121 องศาเซลเซียส ร้อยละของปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 32.0±1.9 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ทำให้ความดันเพิ่มขึ้นส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายถูกทำให้แตกมากขึ้น จึงส่งผลให้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการ autoclave เป็น 125 องศาเซลเซียส ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 35.0±1.1 ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% เมื่อนำข้อมูลของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบระหว่างอุณหภูมิ 121 และ 125 องศาเซลเซียส ไปทดสอบทางสถิติด้วยวิธี t-test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave

4.4 ผลของร้อยละแอมพิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication

ในการศึกษาผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการสั่นด้วยคลื่นความถี่ (sonication) ทำการแปรค่าร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในวิธี sonication โดยแอมพลิจูด (amplitude) คือ ความสูงแนวดิ่งให้มีการกระจัดสูงสุด A ในลูกคลื่นเสียง ซึ่งค่านี้แปรผกผันกับความถี่เมื่อกำหนดให้แฟกเตอร์อย่างอื่นคงที่ (http://www.glenbrook.k12.il.us/gbssci/phys/Class/waves/wavestoc.html) เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถกำหนดความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้ได้ ในการศึกษาจึงใช้การแปรค่าร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในวิธี sonication ให้มีค่าเป็น 25, 30 และ 35 โดยกำหนดระยะเวลาในการใช้คลื่นความถี่สูงไว้นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์ไปทำการสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบตามวิธีของ Bligh and Dyer ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.6

รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบกับร้อยละของแอมพลิจูดที่ใช้ในวิธีการ sonication

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.6 พบว่าคลื่นความถี่ที่ร้อยละแอมพลิจูดต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ โดยเมื่อเพิ่มร้อยละของแอมพลิจูดที่ใช้ในการสั่นเซลล์ด้วยคลื่นความถี่สูงหรือ sonication จาก 25% เป็น 30% และ 35% ตามลำดับพบว่า ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงร้อยละ 25 โดยอาจเป็นเพราะน้ำหนักของเซลล์แห้งที่ใช้ในการสกัดที่มีปริมาณที่น้อยเกินไปจึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการ sonication แสดงให้เห็นว่าคลื่นความถี่ที่ร้อยละแอมพลิจูดเท่ากับ 25 จัดเป็นร้อยละแอมพลิจูดที่เหมาะสมต่อการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ sonication

4.5 ผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock ต่อร้อยละลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ ทำได้โดยแปรค่าความเข้มข้นของสารละลายเกลือ (NaCl) จาก 5 เป็น 10 และ 20 %(w/v) นำสารละลายเซลล์ไปทำการสกัดหาปริมาณลิพิดอย่าง ตามวิธีการสกัดของ Bligh and Dyer ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.7

รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบกับร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

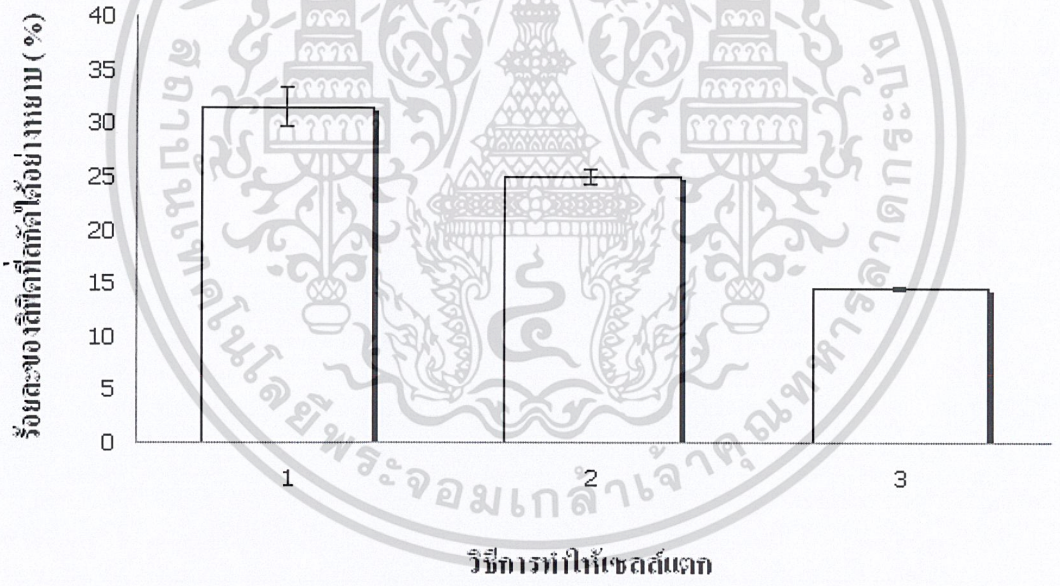
จากรูปที่ 4.7 พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารละลาย NaCl ที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกของวิธี osmotic shock จะมีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย NaCl ที่ใช้ในการทำให้เซลล์ด้วยวิธี osmotic shock ที่ 5 %(w/v)จะได้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเท่ากับ 14±2.56 เมื่อใช้ค่าความเข้มข้นของสารละลาย NaCl สูงขึ้นเป็น 10%(w/v)จะได้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเท่ากับ 13±1.65 และเมื่อเพิ่มค่าความเข้มข้นของสารละลาย NaCl ให้สูงขึ้นเป็น20 %(w/v) จะได้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเท่ากับ 14±0.17 เมื่อนำข้อมูลมาทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ t-test พบว่าปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ประมาณ อาจเป็นเพราะน้ำหนักของเซลล์แห้งที่ใช้ในการสกัดที่มีปริมาณที่น้อยเกินไปจึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของร้อยละความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ จึงเลือกความเข้มข้นสารละลายNaClที่ 5 %(W/V) ที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี osmotic shock ในการศึกษาต่อไป

4.6 ผลของวิธีการทำให้เซลล์แตกต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

เมื่อนำผลของปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกของแต่ละวิธีมาเปรียบเทียบกันผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.8



โดย 1= autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2= sonication ที่ร้อยละแอมพลิจูดที่ 25 เป็นเวลา 5 นาที
3= osmotic shock ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20 %(W/V)

รูปที่ 4.8 ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเมื่อใช้วิธีการทำให้เซลล์แตก 3 วิธีการ ณ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับแต่ละวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.8 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการทำให้เซลล์แตกทั้งสามวิธีในแง่ของร้อยละปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ พบว่าวิธีการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จัดเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดลิพิดอย่างหยาบออกมาได้ดีที่สุด โดยให้ร้อยละของปริมาณลิพิดที่สกัดได้สูงถึง 32.0±1.9 ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al.*(2009) ที่พบว่าวิธีการ autoclave เป็นวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัดลิพิดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัดรองลงมาคือ วิธีการ sonication ที่ร้อยละแอมพลิจูด 25 จะได้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้เท่ากับ 25.0±0.7 และวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัดน้อยที่สุดคือวิธีการ osmotic shock ที่แช่เซลล์สาหร่ายในสารละลาย NaCl เข้มข้น 20 %(w/v) โดยวิธีการนี้ให้ปริมาณลิพิดที่สกัดได้เพียงร้อยละ 14.0±0.2 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัย Lee *et al.*(2009) พบว่าผลที่ได้แตกต่างกัน โดยในงานวิจัยของ Lee *et al.*(2009) พบว่า การแช่เซลล์ในสารละลายเกลือหรือวิธีการ osmotic shock มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่า วิธีการ sonication ความแตกต่างในเรื่องของประสิทธิภาพในการสกัดของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยที่ผ่านมาอาจเป็นผลเนื่องมาจากการใช้สภาวะในการทดลองที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยของ Lee *et al* .(2009) ใช้ความถี่ 10 kHz เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นคลื่นความถี่ในการทำให้เซลล์แตก

เมื่อนำลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบด้วยวิธีการทำให้เซลล์แตกทั้ง 3 วิธี ไปหาองค์ประกอบจำพวกเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid Methyl ester) ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ GC-MS ผลที่ได้แสดงดังรูป 4.9 และตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมแสดงสารจำพวกเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่พบในลิพิดที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งถูกทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการที่ต่างกัน 3 วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพองค์ประกอบของลิพิดในวิธีการทำให้เซลล์แตกต่างๆ

วิธีการทำให้เซลล์แตก	Relention time (min)	ชื่อสาร	% peak area
Autoclave	9.601	n-Heptadecane	1.09
	14.693	9,12-Octadecadienoic acid	8.88
	14.819	Linoletic acid	6.55
	15.304	Palmitic acid	18.11
	18.722	Phytol	35.82
	19.122	Linoleic acid	20.19
	19.248	7,10,13-Hexadecatrienoic acid	9.37
Sonication	9.606	n-Heptadecane	1.42
	14.687	Cyclodecene	6.03
	14.824	Linoletic acid	4.86
	15.299	Palmitic acid	15.33
	18.722	Phytol	42.92
	19.122	Linoleic acid	19.03
	19.248	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	10.40
Osmotic shock	9.606	n-Heptadecane	2.33
	14.676	7-Hexadecenoic acid	5.32
	14.819	Linoletic acid	3.92
	15.287	Palmitic acid	15.14
	18.722	Phytol	43.67
	19.111	Linoleic acid	20.15
	19.242	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	9.48

จากรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.1 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารที่พบในลิพิดที่สกัดได้ด้วยวิธีการทำให้เซลล์สาหร่ายแตกที่ต่างกัน 3 วิธี คือ วิธีการ autoclave วิธีการ sonoication และวิธีการ osmotic shock โดยใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์คือ GC-MS พบว่า ชนิดของสารที่พบในลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบด้วยวิธีการทำให้เซลล์แตกทั้ง 3 วิธีมีความคล้ายคลึงกัน โดยสารที่พบใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัดส่วนมากที่สุดคือ Phytol รองลงมาคือ กรดไขมันจำพวก Linoleic acid และ Plamitic acid สาร Phytol เป็นสารรงควัตถุที่มีอยู่ในเซลล์สาหร่ายที่สกัดได้ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณสารที่พบนั้นสามารถบอกได้อย่างคร่าวๆว่ามีปริมาณที่แตกต่างกันดังจะเห็นได้จากพื้นที่ใต้พีคแต่ละพีคที่ระยะเวลาเท่ากันจะมีพื้นที่ที่แตกต่างกัน โดยวิธีการ autoclave พบพื้นที่ใต้พีคขององค์ระกอบในลิพิดในปริมาณที่สูงกว่า วิธีการsoincation และ วิธีการosmotic shock ตามลำดับ

4.7 ผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ

จากการศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ ต่อร้อยละของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ โดยใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 3 ชนิด คือ ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล, เฮกเซน, และปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยใช้การทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วยวิธีการautoclave ที่สภาวะอุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อนำสารละลายเซลล์ไปทำการสกัดหาปริมาณลิพิดอย่างหยาบ ตามวิธีการสกัดของ Bligh and Dyer ผลที่ได้ดังรูปที่ 4.10

รูปที่ 4.10 ปริมาณของลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบเมื่อใช้ชนิดตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน

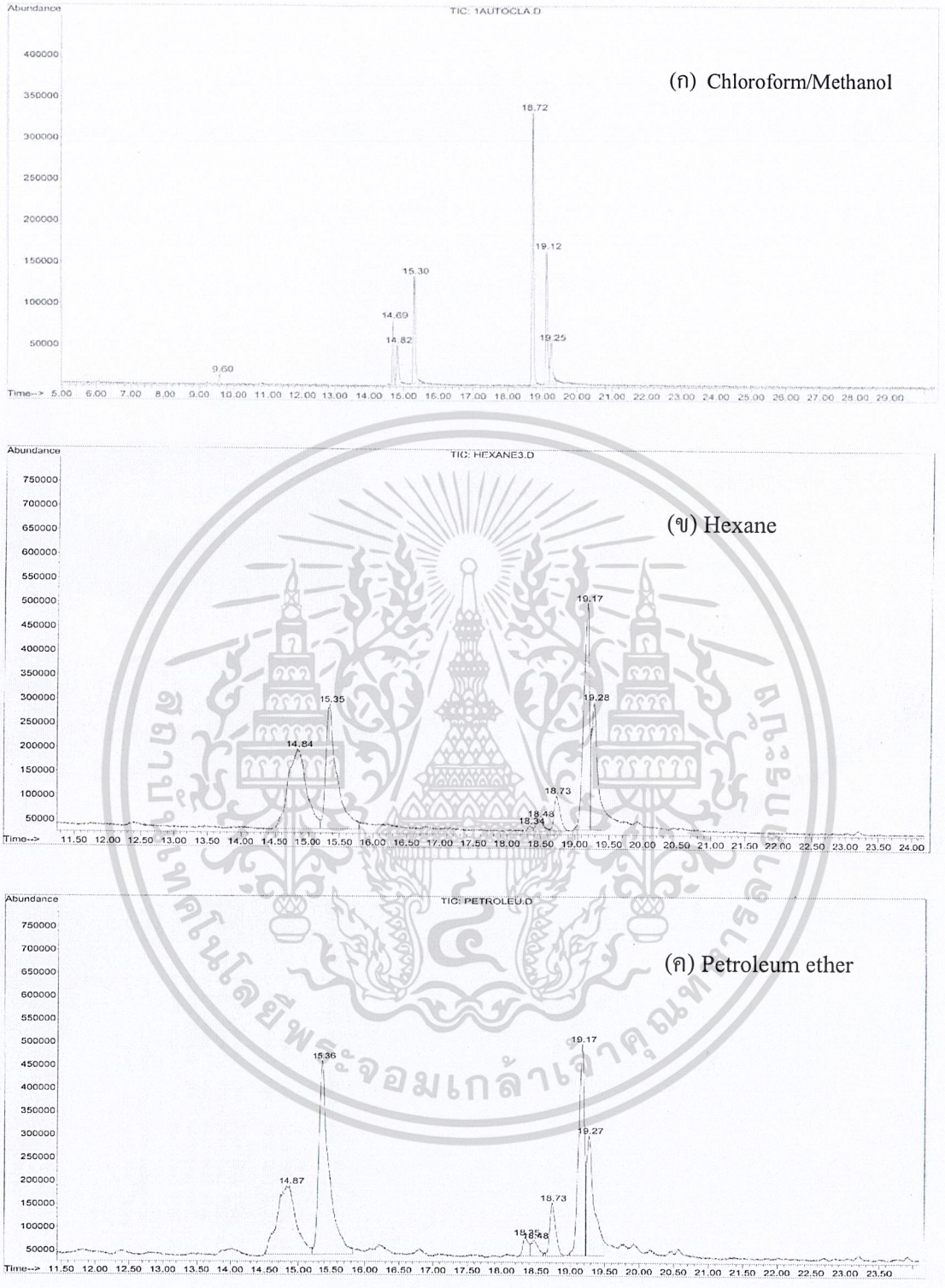
จากรูปที่ 4.10 พบว่าชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้ โดยเมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลในการสกัดพบว่าสามารถสกัดลิพิดอย่างหยาบได้ร้อยละ 32±4.0 เมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น n-hexane พบว่าปริมาณลิพิดที่สกัดได้มีค่าลดลงเป็นร้อยละ 14±2.0 ในทางกลับกันพบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น petroleum ether ได้ร้อยละการสกัดลิพิดอย่างหยาบเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 21±1.0 ความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากตัวทำละลายมีความสามารถในการสกัดลิพิดได้แตกต่างกัน ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมทานอลสามารถสกัดลิพิดออกมาได้ดีที่สุด เกิดขึ้นจากการผสมคลอโรฟอร์มซึ่ง เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว/มีขั้วน้อย กับตัวทำละลาย methanol ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้วทำให้ตัวทำละลายผสมชนิดนี้มีความสามารถในการสกัดลิพิดได้หลากหลายชนิดทั้งลิพิดที่โมเลกุลแบบมีขั้วและลิพิดที่โมเลกุลแบบไม่มีขั้ว ส่งผลให้ปริมาณลิพิดที่สกัดออกมาได้มีค่ามากที่สุดนั่นเอง

เมื่อนำลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ไปหาองค์ประกอบจำพวกเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid Methyl ester) ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ GC-MS ผลที่ได้แสดงดังรูป 4.10 และตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมแสดงสารจำพวกเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่พบในลิพิดที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน 3 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพองค์ประกอบของลิพิดที่ชนิดตัวทำละลายต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	Relention time (min)	ชื่อสาร	% peak area
Chloroform/Methanol	9.601	n-Heptadecane	1.09
	14.693	9,12-Octadecadienoic acid	8.88
	14.819	methyl ester	6.55
	15.304	Palmitic acid	18.11
	18.722	Phytol	35.82
	19.122	Linoleic acid	20.19
	19.248	7,10,13-Hexadecatrienoic acid	9.37
Hexane	14.845	Cyclododecyne	27.46
	15.347	Palmitic acid	27.72
	18.342	Linoleic acid	0.42
	18.480	Trans-Oleic acid	1.47
	18.726	Phytol	3.87
	19.167	Linoleic acid	24.84
	19.278	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	14.23
Petroleum ether	14.872	Cyclododecyne	21.75
	15.357	Palmitic acid	35.87
	18.248	Cis-Linoletic acid	1.75
	18.476	Oleic acide	1.78
	18.732	Phytol	5.07
	19.167	Linoleic acid	19.42
	19.268	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	14.36

จากรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.2 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารที่พบในลิพิดที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 ชนิด คือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform/Methanol, ตัวทำละลาย Hexance และ Pertroleum ether โดยใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์คือ GC-MS พบว่า องค์ประกอบและชนิดของสารที่พบในลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบมีลักษณะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำละลายโดยโครมาโทแกรมของสารที่พบเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform กับ Methanolจะมีลักษณะแตกต่างจากโครมาโทแกรมของสารที่สกัดด้วย ตัวทำละลาย Hexane และ Petroleum ether ซึ่ง ตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ชนิดของสารที่พบในลิพิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform กับ Methanol คือ Phytol รองลงมาคือ กรดไขมันจำพวก Linoleic acid และ Plamitic acid ในขณะที่ชนิดของสารที่พบในลิพิดที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Hexane และ Petroleum ether มีสารที่พบในสัดส่วนมากที่สุดกรดไขมันจำพวกคือ Palmitic acid รองลงมาคือ Linoleic acid และ Phytol ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

โครงการพิเศษนี้ได้ทำผลของวิธีการทำให้เซลล์แตกและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris* TISIR 8580 ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ autoclave พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการ autocalve เซลล์สาหร่ายที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 , 10 และ 15 นาที ไม่มีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ โดยลิพิดที่สกัดได้มีปริมาณใกล้เคียงกันอยู่ที่ร้อยละ 27 แต่พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการ autoclave มีผลต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำเซลล์แตกคือ autoclave ที่121 องศาเซลเซียส
2. ร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Sonication ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ โดยสภาวะที่เหมาะสมคือที่การสั่นด้วยคลื่นเสียงที่ร้อยละแอมพิจูดเท่ากับ 25
3. ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Osmotic shock พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดลิพิดมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อใช้ความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 5% เป็น 10 และ 20% ตามลำดับ
4. เมื่อเปรียบเทียบผลของวิธีการทำให้เซลล์แตกทั้งสามวิธี ณ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับแต่ละวิธีการพบว่า วิธีการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะให้ประสิทธิภาพในการสกัดลิพิดได้ดีที่สุด รองลงไปคือวิธีการ sonication ที่ร้อยละแอมพลิจูดเท่ากับ 25 และวิธีแช่ในสารละลาย NaCl (osmotic shock) เข้มข้น 5% นอกจากนี้พบว่าสารที่สกัดออกมาได้ด้วยวิธีการทั้งสามมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน โดยมีสารจำพวก Phytol ในสัดส่วนมากที่สุด รองลงไปคือกรดไขมันอิสระจำพวก Linoleic acid และ Palmitic
5. ในการศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดจากเซลล์สาหร่ายพบว่าปริมาณและชนิดของสารในลิพิดที่สกัดได้มีค่าแตกต่างกันไปตามชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ โดยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลให้ลิพิดที่สกัดได้ในปริมาณสูงสุด รองลงไปคือปิโตรเลียมอีเทอร์ และเฮกเซนตามลำดับ สารที่พบมากที่สุดในลิพิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลคือ Phytol ในขณะที่สารที่พบในสัดส่วนมากที่สุดในลิพิดที่สกัดด้วยเฮกเซน และ ปิโตรเลียมอีเทอร์คือ Palmitic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาระยะในการทำให้เซลล์แตกของวิธีการ Osmotic shock ที่ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์

2. ควรมีการศึกษาตัวทำละลายอื่นที่ไม่ใช่ Chloroform

3. ควรมีการศึกษาการวิเคราะห์เชิงปริมาณของลิพิดที่สกัดได้อย่างละเอียดขึ้น

4. ควรมีการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายที่มีผลต่อลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2551. รายงานน้ำมันของประเทศไทย [online] Available at : www.dede.go.th/dede/fileadmin/usr/wpd/static/2008/OilandThailand2008.pdf

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. 2536. **การเลี้ยง *Chlorella sp.* T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล**. โครงงานพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คลื่นเสียง. [online] Available at : http://www.glenbrook.k12.il.us/gbssci/phys/Class/waves/wavestoc.html

ชิโนรส ศรีศิริ, ยิ่งยศ ลับภู, ประสงค์ วงศ์วิชา และ กันยรัตน์ โหละสุต. 2552. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายท้องถิ่นเซลล์เดียว.** โครงงานพิเศษสาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ณัฐวุติ ปัญญานะ, ณัชฎภรณ์ ไม่อ่อนมือ และดนุพล เทแก้ว. 2547. **ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคาโรทีนอยด์ของสาหร่ายสีเขียว**. โครงงานพิเศษชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

น้ำมันไบโอดีเซล. [online] Available at : http://blog.eduzones.com/tenny/3668

ประเสริฐ ภวสันต์. 2552. การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย:ทางเลือกพลังงานในอนาคต. **ช่างพูด วารสารข่าวความรู้**. คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [Online] Availabie at : http://www.eng.chula.ac.th/newsletter/index.php?g=node/118

ผกาวดี แก้วกันเนตร และพนิดา รัตนพลที. 2551. **ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก**. วารสารศูนย์บริการวิชาการ ปีที่ 16 ฉบับที่ 1. 9-13

รัตนาภรณ์. 2552. **สาหร่ายน้ำจืดใช้ผลิตไบโอดีเซล.** [Online] Availabie at : http://www.tnews.teenee.com/etc/29819.htm/

ลักขณา ชนะวงศ์ . 2538. **เทคโนโลยีชีวภาพของสาหร่าย.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. วิศวกรรมสาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีที่ 22 ฉบับที่ 2. 51-61

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. **แพลงก์ตอนพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิสัย วงศ์สายปิ่น. 2536. **สาหร่ายเซลล์เดียว สารอาหารจากแสงตะวัน**. กรุงเทพฯ : รวมทรรศ์. 137 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

ยศวดี สวัสดิรักษา. 2547. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศษสตรมหาบัณฑิตสาขาโครงงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (สวทท.). 2551. **เราไม่ง้อน้ำมัน**. กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์ บุ๊คส์ .

สาหร่าย *Chlorella vulgaris*. [online] Available at : http://botany.natur.cuni.cz/algo/images/determin/chlvulgaris.jpg

Chisti Y. 2007.Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. 25 :294-306

Hosakul K. 1972. **The Selection and Growth Characteristics of Some Local Microalgae Tolerating High Temperature**. Master of Science in Microbiology, Kasetsart University. 92 pp.

Kosaric N., Nguyen H.T. and Bengognou M.A. 1974. **Growth of Spirulina maxima Algae in Effluents from secondary Waste-Water Treatment Plant**. Biotechnol. Bioeng. 16 :881-869

Lee J.-Y., Yoo C., Jun S.-Y., Ahn C.-Y. and Oh H.-M. 2009. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**.

Lewis T., Nichols P.D. and McMeekin T.A. 2000. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods.** 43: 107-116

Li Q., Du W. and Liu D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol.** 8:749-756

Mata T.M., Martins A.A. and Caetano N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** .14:217-232

Richmond A. 1986. **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Floricia : CRC Press Inc. 528 pp.

Richmond A. 2004. **Handbook of Microalgal Mass Culture.** Biotechnology and Applied Phycology.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

Wikipedia. 2010. **Microphyte**. [online] Available at. http://en.wikipeclia.org/wiki/Microphyte

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

Vicente G., Bautista F., Rodriguez R.,Gutierrez F.J., Sadaba I., Vazqiez R.M.R., Martovez S.T. and Garre V. 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**

Zhu M., Zhou P.P. and Yu L.J. 2002.Extraction of lipids from *Mortierella alpine* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Bioresource Technology** .84: 93-95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร BG 11ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานิส (II)คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_{12}.4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต($ZnSO_4.7H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต($NaMoO_4.2H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์(II)ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์(II)ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG 11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4.6H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไฮเดรต ($CaCl_2.H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมอีทีดีเอ (Na_2EDTA)	279	ไมโครโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG 11

อาหาร BG 11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	1	มิลลิลิตร
(2กรัม / 1000 มิลลิลิตร)		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	มิลลิลิตร
(3.05 กรัม / 100 มิลลิลิตร)		
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$.Citrate)	1	มิลลิลิตร
(0.60 กรัม / 100 มิลลิลิตร)		
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย BG 11

- เตรียมส่วนประกอบ Trace metal mix 100 เท่า

  -ชั่งสารเคมีต่าง ๆ มาละลาย ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- เตรียมประกอบอาหาร BG 11 100 เท่า

  -ชั่งสารเคมีต่าง ๆ + Trace metal mix 50 มิลลิลิตร

  -ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไป Autoclave

- เตรียมส่วนประกอบอาหาร BG 11

  -อาหาร BG 11 100 เท่า 10 มิลลิลิตร

  -ปรับปริมาตร 997 ด้วยน้ำกลั่น นำไป Autoclave

  -เติมสารเคมี 3 ตัว ที่ผ่านการ Autoclave แล้ว อย่างละ 1 มิลลิลิตร

  -แบ่งไปเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดย Flask ละ 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการสกัดลิพิดตามวิธีการ Bligh & Dyer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายของเซลล์สาหร่ายที่ถูกทำให้แตกถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ อ้างอิงวิธีการตาม Bligh &Dryer ซึ่งมีรายละเอียดวิธีการที่ใช้ดังนี้

1. นำสารละลายเซลล์ที่แตกใส่ลงในภาชนะหลอดCentrifuge เติมตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตรจำนวน 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป Vortex นาน 1 นาที
2. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เติมตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตรลงในหลอดปั่นเหวี่ยงในข้อ 1 อีก 5 มิลลิลิตร นำไป Vortex นาน 1 นาที
3. เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เติมน้ำกลั่นลงในหลอดปั่นเหวี่ยงในข้อ 2 อีก 5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งนำหลอดทดลองไป Vortex นาน 1 นาที
4. นำสารละลายที่ไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. เทชั้นของเหลวที่ได้ลงในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (min)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
5	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.5025	0.4987
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.1965	96.0555
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.3420	96.1981
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1455	0.1396
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.494	0.514
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.878	0.941
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	8.06	8.44
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.137	0.131
10	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4971	0.4965
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	102.8875	92.1539
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	103.0387	92.3032
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1512	0.1493
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.353	0.590
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.647	0.990
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	11.60	9.51
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.139	0.139
15	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4951	0.5002
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.1965	102.8875
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.3275	103.0302
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1310	0.1487

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (min)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
15	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.549	0.582
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.978	0.988
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	8. 96	9.40
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.122	1.39

ตารางที่ ค.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (°C)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
115	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4985	0.4942
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.1965	102.8479
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.2917	102.9427
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.0952	0.0948
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.441	0.447
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.799	0.833
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	7.22	7.37
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.088	0.087

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 (ต่อ) ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (°C)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
121	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4937	0.4926
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.2835	102.8479
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.4298	103.0176
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1563	0.1697
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.438	0.475
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.836	0.998
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	7.26	8.05
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.149	0.11
125	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4929	0.4915
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.1965	102.8479
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.3797	103.0234
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1832	0.1755
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.520	0.520
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.899	0.935
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	8.43	8.51
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.175	0.167

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 ผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (%)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
25	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4928	0.4980
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.1965	102.8875
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.3224	103.0205
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1259	0.1330
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.485	0.342
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.997	0.655
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	8.19	5.85
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.118	0.127
30	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4959	0.4958
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	102.8875	88.1965
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	103.0206	88.3252
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1331	0.1287
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.424	0.442
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.784	0.832
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	6.98	7.30
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.126	0.121
35	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4972	0.4960
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	96.0585	92.1539
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	96.1937	92.2811
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1348	0.1272

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 (ต่อ) ผลของร้อยละแอมพลิจูดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication ต่อปริมาณ ลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (%)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
35	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.425	0.422
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.889	0.817
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	7.60	7.02
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.127	0.113

ตารางที่ ค.4 ผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (%)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
5	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4960	0.4983
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.1965	102.8875
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.2651	102.9738
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.686	0.863
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.576	0.526
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.998	0.989
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	9.35	8.69
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.059	0.078
10	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.5020	0.4972
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	96.0585	92.1539

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 (ต่อ) ผลของความเข้มข้นสารละลายเกลือที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Osmotic shock ต่อปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้ (%)	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
5	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.0651	0.090
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.509	0.255
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.988	0.535
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	8.47	1.30
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.570	0.680
20	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.5002	0.4956
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.1965	102.8875
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการทดลอง	88.3370	103.0302
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.755	0.727
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.565	0.366
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.981	0.693
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	2.76	1.82
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.173	0.071

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.5 ผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
Choloform/Methanol	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4954	0.4982
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	88.2835	102.8429
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการ ทดลอง	88.4289	103.0189
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1454	0.1769
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.438	0.478
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.821	0.953
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	2.17	2.40
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.143	0.175
Hexane	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4994	0.5175
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	96.0367	57.8999
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการ ทดลอง	96.1125	58.0565
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.0758	0.0666
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.102	0.098
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.357	0.221
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	0.906	0.505
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.750	0.660
Petroleume ether	น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายที่ใช้	0.4946	0.5030
	น้ำหนักขวดก้นกลมอบแห้งเริ่มต้น	55.8847	61.2429

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.5 (ต่อ) ผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดลิพิดอย่างหยาบ

สภาวะที่ใช้	พารามิเตอร์ที่วัด	ค่าที่วัดได้ (กรัม)	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
	น้ำหนักขวดก้นกลม+อบแห้งหลังสิ้นสุดการ ทดลอง	55.9892	61.3454
	น้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น	0.1045	0.1025
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm	0.056	0.087
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 nm	0.152	0.134
	น้ำหนักคลอโรฟิลล์ a+b ที่มีอยู่ในลิพิดที่สกัดได้	0.301	0.409
	น้ำหนักลิพิดที่สกัดได้(หักลบปริมาณคลอโรฟิลล์ a+b)	0.104	0.102

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างวิธีการคำนวณปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ

ปริมาณลิพิดที่สกัดได้อย่างหยาบ จะหาได้จากผลต่างของน้ำหนักของขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้นกับน้ำหนักคลอโรฟิลล์ a และ คลอโรฟิลล์ b ที่มีอยู่ในสารที่สกัดได้ การหาความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดจะหาได้จากการคำนวณอ้างอิงตามวิธีของ Richmond A.(2004) โดยใช้สมการต่อไปนี้

Chlorophyll a $= (16.5 \times A_{665}) - (8.3 \times A_{650})$

Chlorophyll b $= (33.8 \times A_{650}) - (12.5 \times A_{665})$

เมื่อ A_{650}, A_{665} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร ที่ละลายในเมทานอล กำหนดปริมาตรของเมทานอลที่ใช้ในการละลาย เท่ากับ 50 ml

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณลิพิดที่สกัดได้(จากวิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °c เป็นเวลา 5 นาที)

- Chlorophyll a $= (16.5 \times A_{665}) - (8.3 \times A_{650})$
  $= (16.5 \times 0.836) - (8.3 \times 0.438)$
  $= 10.16$ mg/L
  - หาน้ำหนัก Chlorophyll a

    $\frac{10.16 \text{ mg}}{\text{L}} \times \frac{\text{L}}{1000 \text{ ml}} \times 50\text{ml} = 0.508$ mg
  - 10 เท่า $= 0.508 \times 10 = 5.08$ mg
- Chlorophyll b $= (33.8 \times A_{650}) - (12.5 \times A_{665})$
  $= (33.8 \times 0.438) - (12.5 \times 0.836)$
  $= 4.35$ mg/L
  - หาน้ำหนัก Chlorophyll b

    $\frac{4.35 \text{ mg}}{\text{L}} \times \frac{\text{L}}{1000 \text{ ml}} \times 50\text{ml} = 0.218$ mg
  - 10 เท่า $= 0.218 \times 10 = 2.18$ mg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

➢ น้ำหนักขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น

น้ำหนัก lipid + Chlorophyll(a + b) = 156.3 mg

Chlorophyll (a + b) = 5.08 + 2.18 = 7.26 mg

❖ Lipid = 156.3 – 7.26 = 149.04 mg

Dry cell 493.7 mg ได้ lipid 149.04 mg

ถ้า 100 mg ได้ lipid $= \frac{149.04 \times 100}{493.7} = 30.19\ \%$

ครั้งที่ 2

➢ Chlorophyll a $= (16.5 \times A_{665}) - (8.3 \times A_{650})$

$= (16.5 \times 0.998) - (8.3 \times 0.475)$

$= 12.52$ mg/L

- หาน้ำหนัก Chlorophyll a

$\frac{12.52\ mg}{L} \times \frac{L}{1000\ ml} \times 50ml = 0.626$ mg

- 10 เท่า $= 0.626 \times 10 = 6.26$ mg

➢ Chlorophyll b $= (33.8 \times A_{650}) - (12.5 \times A_{665})$

$= (33.8 \times 0.475) - (12.5 \times 0.998)$

$= 3.58$ mg/L

- หาน้ำหนัก Chlorophyll b

$\frac{3.58\ mg}{L} \times \frac{L}{1000\ ml} \times 50ml = 0.179$ mg

- 10 เท่า $= 0.179 \times 10 = 1.79$ mg

➢ น้ำหนักขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้น

น้ำหนัก lipid + Chlorophyll(a + b) = 169.7 mg

Chlorophyll (a + b) = 6.26 + 1.79 = 8.05 mg

❖ Lipid = 169.7 – 8.05 = 161.65 mg

Dry cell 492.6 mg ได้ lipid 161.65 mg

ถ้า 100 mg ได้ lipid $= \frac{161.65 \times 100}{493.6} = 32.82\ \%$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้