

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงหาสภาวะที่เหมาะสมของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*  
เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

OPTIMAL CULTIVATION CONDITIONS OF *Scenedesmus armatus*  
FOR BIODIESEL PRODUCTION



นางสาวเกษไพริน

ศิริรัตน์กุล

นางสาวณัฐริดา

อาริยะ

นางสาวไอลดา

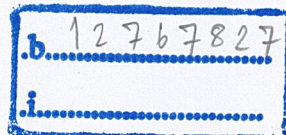
พິงและ

ร.พ.

๗๗๘๒๗

๒๐๐๗

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 141982  
วัน,เดือน,ปี. 1.1 ๒๕๕๙ 2559



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

OPTIMAL CULTIVATION CONDITIONS OF *Scenedesmus armatus*  
FOR BIODIESEL PRODUCTION

KESPAIRIN

SIRIRUTTANAKUL

NUTTIDA

ARIYA

ILADA

PUNGLAE

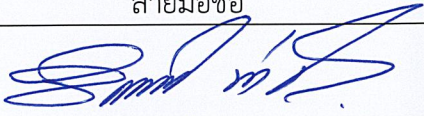

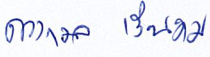
A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2014

หัวข้อโครงการพิเศษ การเพาะเลี้ยงหาสภาวะที่เหมาะสมของสาหร่าย  
*Scenedesmus armatus* เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล  
 Optimal cultivation conditions of *Scenedesmus armatus* for  
 biodiesel production

ชื่อนักศึกษา นางสาวเกษไพริน ศิริรัตนกุล รหัสนักศึกษา 54050354  
 นางสาวณัฐธิดา อาริยะ รหัสนักศึกษา 54050374  
 นางสาวไอลดา พึ่งและ รหัสนักศึกษา 54050474

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
 ภาควิชา ชีววิทยา  
 ปีการศึกษา 2557  
 อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ดวงกมล เรือนงาม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้  
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
 (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ ประธานกรรมการ	
อ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
อ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การเพาะเลี้ยงหาสภาวะที่เหมาะสมของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเกษไพริน	ศิริรัตนกุล	รหัสนักศึกษา 54050354
	นางสาวณัฐธิดา	อาริยะ	รหัสนักศึกษา 54050374
	นางสาวไอลดา	พິงและ	รหัสนักศึกษา 54050474
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2557		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ดวงกมล	เรือนงาม	

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เพื่อนำไปผลิตไบโอดีเซลซึ่งทำการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตร BG-11 และสูตร BG-11 ดัดแปลงที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหารที่ทำให้สาหร่ายมีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ สูตรอาหาร BG-11 ที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการเจริญแบบจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) 0.4191 ต่อวัน มีจำนวนเซลล์สูงสุด  $1.313 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 0.0007 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 และ 680 นาโนเมตร คือ 0.745 และ 0.958 ตามลำดับ และสภาวะภายใต้บีม้อัดอากาศ ให้อากาศแบบสายยางปกติที่อัตราการไหลของอากาศ 190 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 22 วัน ในอาหารสูตร BG-11 และสูตร BG-11 ที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหารที่ทำให้สาหร่ายมีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ สูตรอาหาร BG-11 ที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการเจริญแบบจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) 0.2651 ต่อวัน มีจำนวนเซลล์สูงสุด  $0.420 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 0.0030 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 และ 680 นาโนเมตร คือ 0.675 และ 0.591 ตามลำดับ นำสาหร่ายที่เลี้ยงทั้ง 2 สภาวะไปสกัดด้วยเฮกเซน จากนั้นนำไปเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน และวิเคราะห์ผลด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

คำสำคัญ : กลูโคส ไบโอดีเซล ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน สาหร่าย *Scenedesmus armatus*

<b>Title</b>	Optimal cultivation conditions of <i>Scenedesmus armatus</i> for biodiesel production		
<b>Students</b>	Kespairin	Siriruttanakul	Student ID 54050354
	Nuttida	Ariya	Student ID 54050374
	Ilada	Punglae	Student ID 54050474
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Biotechnology)		
<b>Department</b>	Biology		
<b>Academic Year</b>	2014		
<b>Advisor</b>	Dr. Duangkamol	Ruen-ngam	

### Abstract

This work aims to study the cultivation conditions of *Scenedesmus armatus* in order to produce Biodiesel. *S. armatus* was growth in both BG-11 and modified BG-11 medium with continuous shaking at 120 rpm for 24 days. The temperature of cultivation was conducted at 27°C. Modified BG-11 was done by addition of glucose at the concentration of 5, 10, 20 and 40 g/l. The results indicated that *S. armatus* growth in BG-11 with 10 g/L of glucose had highest growth rate with the specific growth rate was 0.4191  $\mu$ /day. The highest number of cell was found to be  $1.313 \times 10^5$  cell/ml with the dried weight was 0.0007 g/ml. The measurement at absorbance at 560 and 680 nm were 0.745 and 0.958, respectively. Moreover, cultivation conditions were operated under air pump with an air flow rate of 190 mL/min at 27°C in both BG-11 and modified BG-11 in 600 mL for 22 days. On the basis of these results, the specific growth rate and the number of cell was found the highest in modified BG-11 with 10 g/l of glucose and got the specific growth rate was 0.2651 $\mu$ /day, cell number was  $0.420 \times 10^5$  cell/ml and cell dry weight was 0.0030 g/ml dried weight whereas absorbance at 560 and 680 nm were 0.675 and 0.591, respectively. Oil in algae was then extracted by hexane and oil was continuously changed to biodiesel through transesterification reaction and lipid profile was determined by gas chromatography.

**Key words:** Glucose, Biodiesel production, Transesterification, *Scenedesmus armatus*

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.ดวงกมล เรืองงาม อาจารย์ที่ปรึกษาประจำโครงการพิเศษ ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางในการทำโครงการให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการที่เข้าร่วมรับฟังการนำเสนอโครงการพิเศษ และให้คำแนะนำในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีณา ชูโชติ เป็นหนึ่งในคณะกรรมการที่ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางในการทำโครงการให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ ที่คอยสอน และแนะนำการใช้เครื่องมือ ซึ่งทำให้โครงการสำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณพี่น้องวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่คอยอนุเคราะห์ในการเบิกยืมเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ รวมทั้งให้คำแนะนำในการปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณป้ามาลี พานิชสิทธิ์ ที่คอยอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องโครงการพิเศษ ตลอดจนจบโครงการ

ขอขอบคุณเพื่อนๆที่คอยให้กำลังใจ ในการทำโครงการพิเศษ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้โครงการสำเร็จไปด้วยดี

นางสาวเกษไพริน

ศิริรัตนกุล

นางสาวณัฐธิดา

อาริยะ

นางสาวโอลดา

พึงและ

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
<b>บทที่ 1</b> .....	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2</b> .....	<b>4</b>
2.1 สาหร่ายสีเขียว (Green Algae).....	4
2.1.1 สาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp.....	4
2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	5
2.2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algal Cultivation).....	6
2.2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงสามารถแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ.....	7
2.2.3 การวัดการเจริญเติบโต.....	7
2.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	8
2.3 การเก็บเกี่ยว (Algal Harvesting).....	10
2.3.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเก็บเกี่ยวสาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล.....	11
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก.....	13
2.4.1 ชนิดของสาหร่าย.....	13
2.4.2 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง.....	14
2.4.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มน้ำมัน.....	15
2.5 ไบโอดีเซล.....	18
2.5.1 ความหมายของไบโอดีเซล.....	18
2.5.2 คุณสมบัติของไบโอดีเซล.....	18
2.5.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล.....	18

2.5.4	ข้อดีและข้อเสียของการใช้สาหร่ายในการผลิตไบโอดีเซล.....	20
2.5.5	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไขมันและคุณสมบัติไบโอดีเซล.....	22
2.6	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	23
2.6.1	ตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	24
2.6.2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	25
2.7	กรดไขมันและการวิเคราะห์กรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก .....	26
2.7.1	กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ .....	26
2.7.2	กรดไขมันอาจแบ่งโดยอาศัยคุณค่าทางโภชนาการเป็น 2 พวก คือ .....	28
2.7.3	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์กรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก.....	28
2.8	การวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก .....	33
<b>บทที่ 3</b>	.....	<b>35</b>
3.1	อุปกรณ์ที่ใช้.....	35
3.2	สารเคมีที่ใช้.....	36
3.3	แผนผังแสดงการทดลอง .....	37
3.4	วิธีการทดลอง .....	37
3.4.1	การเตรียมอาหารแข็ง BG-11 ในหลอดเลี้ยง .....	37
3.4.2	การเก็บรักษาเชื้อในอาหาร BG-11.....	38
3.4.3	การเตรียมอาหารเหลว BG11 เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ .....	38
3.4.4	การลงเชื้อในพลาสติกอาหารเหลว.....	39
3.4.5	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> โดยใช้เครื่องเขย่า.....	39
3.4.6	การวัดอากาศ.....	40
3.4.7	การนับ และวัดฟองอากาศ.....	40
3.4.8	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในขวดโหลแบบบีบอัดอากาศ .....	41
3.4.9	วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	42
3.4.10	การนับจำนวนเซลล์ (Cell Counting : Hemacytometer).....	42
3.4.11	การวัดผลการเจริญด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) .....	44
3.4.12	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-Sulfuric Method).....	45
3.4.13	การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย.....	47
3.4.14	การสกัดน้ำมันสาหร่าย และกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน .....	48
3.4.15	การระเหยสารสกัดจากสาหร่ายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน.....	49
3.4.16	การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Shimadzu GC-2014).....	50
3.4.17	การวัดแสงด้วยลักซ์มิเตอร์ (lux Meter light Meter) .....	51
3.4.18	การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, $\mu$ ).....	52

3.5 สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ.....	53
<b>บทที่ 4.....</b>	<b>54</b>
4.1 สภาวะเขย่าและการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> .....	54
4.2 สภาวะภายใต้บีม้อัดอากาศและการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ....	69
4.3 การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายระหว่างสภาวะเขย่ากับบีม้อัดอากาศ.....	78
4.4 การสกัดและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน.....	79
4.5 การวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี.....	80
<b>บทที่ 5.....</b>	<b>90</b>
5.1 สรุปผลงานวิจัย.....	90
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	90
บรรณานุกรม.....	92
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก (การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย).....	100
ภาคผนวก ข (การวัดอากาศและความเข้มแสง).....	101
ภาคผนวก ค (ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะต่างๆ).....	107

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สูตรโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัว และแหล่งของอาหาร.....	27
2.2 สูตรโครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัว จำนวนพันธะคู่ และแหล่งอาหาร.....	28
2.3 ชนิดของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้มาจาก <i>Chlorella</i> sp.....	29
2.4 ชนิดของกรดไขมันในสาหร่ายแต่ละชนิดที่นำมาทดลอง (ที่ : Talebi และคณะ 2013).....	30
2.5 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ไขมัน และองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก ....	31
2.6 แสดงองค์ประกอบของตัวอย่างไปโอดีเซลของสาหร่าย <i>Scenedesmus incassatus</i> .....	32
2.7 ร้อยละขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์.....	33
3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร .....	46
3.2 สภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography Condition).....	50
4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร.....	54
4.2 จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร .....	57
4.3 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, $\mu$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร.....	58
4.4 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร .....	60
4.5 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร .....	63
4.6 การวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (นาโนเมตร) โดยเทียบจากสีของตัวกรองแสง และสีของสารละลาย.....	66
4.7 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร.....	67
4.8 การนับจำนวนฟองอากาศที่นับได้ในเวลา 30 นาที และขนาดฟองอากาศ.....	70

4.9	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร.....	71
4.10	จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร.....	72
4.11	ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, $\mu$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร.....	73
4.12	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....	74
4.13	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....	76
4.14	ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และสีของน้ำตาล.....	77
4.15	น้ำหนักสาหร่ายแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว.....	78
4.16	น้ำหนักของน้ำมันสาหร่ายหลังระเหยเอาเฮกเซนแล้ว.....	79
4.17	วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1).....	81
4.18	วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2).....	82
4.19	น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหารBG-11 (ซ้ำที่ 1).....	83
4.20	น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 2).....	84
4.21	น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร.....	85
4.22	น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2).....	86
4.23	น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1).....	87
4.24	น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหารกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2).....	87
4.25	น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 1).....	88

4.26 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในสภาวะอาหาร BG-11  
(ซ้ำที่ 2)..... 89

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp.....	5
2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตน้ำมัน .....	6
2.3 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	8
2.4 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายจากสาหร่าย .....	11
2.5 โครงสร้างทางเคมีของ ก. กรดไขมันชนิดอิ่มตัว ข. กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว .....	27
3.1 การเก็บรักษาเชื้อด้วยเทคนิค Simple Streak.....	38
3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะเขย่า.....	40
3.3 การนับ และวัดฟองอากาศ .....	41
3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่มีการให้อากาศในขวดโหล (รูปซ้าย) และ การให้อัตราการไหลของอากาศ (รูปขวา) .....	41
3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Minicentifuge) (รูปซ้าย) และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (รูปขวา).....	42
3.6 ลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของสไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) .....	44
3.7 ตารางที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์จากภาพจริง และที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ....	44
3.8 บริเวณที่ใช้นับจำนวนเซลล์ (ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่คือ 1, 2, 3 และ 4 กับบริเวณที่ใช้ับจำนวน เซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมเล็กคือ A, B, C, D และ F).....	44
3.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) .....	45
3.10 สีของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานหลังจากผ่านวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก .....	46
3.11 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน มีค่าความชัน $x = (y - 0.0161)/1.06$ .....	46
3.12 สาหร่ายหลังจากผ่านการ Centifuge (รูปซ้าย) และตู้เก็บรักษาตัวอย่างสาหร่ายที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (รูปขวา).....	47
3.13 ลักษณะของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ผ่านขั้นตอนการ Freeze dry แล้ว.....	48
3.14 การสกัดสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> โดยใช้เฮกเซน .....	48
3.15 น้ำมันสาหร่ายที่ละลายในเฮกเซนหลังจากผ่านการกรองแล้ว.....	48
3.16 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporater).....	50
3.17 ลักษณะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) .....	51
3.18 อุปกรณ์วัดแสง (ลักซ์มิเตอร์).....	52
3.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(N/N_0)$ กับวันที่เก็บตัวอย่าง บริเวณลูกศรสีแดงคือค่าที่อยู่ใน ระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase) .....	53
3.20 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, $\mu$ ) คือ 0.2651.....	53

4.1	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	55
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ทั้ง 3 ซ้ำของการทดลอง ค่าเฉลี่ยกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ.....	56
4.3	จำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	57
4.4	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีชีวิตของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ.....	59
4.5	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	60
4.6	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ.....	62
4.7	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	63
4.8	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ.....	65
4.9	สาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (รูปซ้าย) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคส (รูปขวา).....	67
4.10	ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	68

4.11 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ.....	69
4.12 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	71
4.13 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	73
4.14 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	75
4.15 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง .....	76
4.16 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง .....	77
4.17 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปั๊มอัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว.....	79
4.18 การวิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1) .....	81
4.19 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2).....	82
4.20 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 1).....	82
4.21 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 2).....	83
4.22 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1).....	84
4.23 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2).....	85
4.24 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1) .....	86

4.25 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สำหรับ <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2) .....	87
4.26 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สำหรับ <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 1) .....	88
4.27 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สำหรับ <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 2) .....	89

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นในทุกๆ ปี เนื่องจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้ในปัจจุบันกำลังจะหมดไป และการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลก่อให้เกิดการสะสมของก๊าซที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจกในชั้นบรรยากาศและภาวะโลกร้อน ไบโอดีเซลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Martha และคณะ 2013) ซึ่งในปีที่ผ่านมาไบโอดีเซลได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ไบโอดีเซลหรือ Fatty acid Methyl Esters (FAMEs) สามารถหาได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันที่ใช้แล้วจากการปรุงอาหาร และสาหร่าย (Mandotra 2014) ฯลฯ

ในหลายๆ ประเทศจะมีการนำเอาพืชน้ำมันมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เช่น ถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม มะพร้าว เป็นต้น แต่การใช้พืชน้ำมันเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลจะส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ของพืชชนิดอื่น พืชน้ำมันเหล่านี้จะสามารถผลิตน้ำมันออกมาได้ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย ดังนั้นสาหร่ายจึงได้รับการยอมรับว่าเป็นวัตถุดิบที่สามารถผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งจะแตกต่างจากพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เนื่องจากสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทุกที่ตามแหล่งน้ำในระบบปิด และน้ำเสีย สาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตน้ำมันได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งผลิตได้ตลอดทั้งปีและมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ดังนั้นสาหร่ายจึงเป็นหนึ่งในวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตไบโอดีเซลได้ดีกว่าวัตถุดิบอื่นนั่นเอง (Mandotra 2014) และจากงานวิจัยของ Martinez และคณะ (1991) ที่พบว่า *Chlorella vulgaris* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา เนื่องจากกลูโคสมีผลโดยตรงต่อกระบวนการใช้คาร์บอนในเมทาบอลิซึม ขนาดของเซลล์ ความหนาแน่นของสารต่าง ๆ ที่สะสมอยู่ในเซลล์ เช่น แป้ง และไขมัน รวมทั้งโปรตีน คลอโรฟิลล์ RNA และวิตามิน ดังนั้นกลูโคสจึงเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งในการเจริญเติบโตและผลิตไขมันที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้ทดลองครั้งนี้ก็เป็นหนึ่งในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเช่นกัน จึงน่าจะมีความสามารถในการเพิ่มไขมันที่สามารถใช้ผลิตไบโอดีเซลได้

การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายมี 4 ขั้นตอน ดังนี้ การเจริญเติบโต การเก็บเกี่ยว การสกัด และการเปลี่ยนน้ำมันให้เป็นไบโอดีเซล สำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวมวลจากสาหร่ายควรจะต้องมีกระบวนการในการผลิตที่ถูกต้อง ดังนั้นการคัดกรองของสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก และจะต้องมีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลายได้ การใช้อาหารที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อมวลรวมชีวภาพและปริมาณไขมันของสาหร่าย การตั้ง

ไนโตรเจนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการสะสมของไขมันในสาหร่าย แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันจะทำให้ปริมาณมวลรวมชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องหาสภาวะในการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่สูง และมีอัตราการผลิตไขมันที่เหมาะสม (Mandotra 2014 และกลุ่มพัฒนามาตรฐานน้ำมันเชื้อเพลิง 2557) นอกจากนี้สภาวะในการเลี้ยงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ แสง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปัจจัยทางเคมี เช่น แหล่งคาร์บอน (กลูโคส, ฟรุกโตส, อะซิเตรท) แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียม, โซเดียมไนเตรท, ยูเรีย) และการเติมกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้สาหร่ายมีพลังงานเพียงพอต่อความต้องการใช้ในกิจกรรมของเซลล์ (Cerón García และคณะ 2006) เซลล์สาหร่ายจึงลดการสร้างคลอโรพลาสต์ที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการตรึงแสงเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน นอกจากนี้เซลล์ยังมีการสะสมไขมันไว้ภายในเม็ดไขมัน (lipid granule) ทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Wu และคณะ 1991) ซึ่งสามารถเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นจึงส่งผลให้ผลิตไบโอดีเซลได้เพิ่มขึ้น ในอดีตการสกัดน้ำมันพวกพืชน้ำมัน เช่น เมล็ดคาโนลาหรือถั่วเหลือง จะทำได้โดยการบดหลังจากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย และนำไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อให้ได้น้ำมันไบโอดีเซล

ในงานวิจัยนี้ทำการทดลองโดยเลือกปรับปรุงสูตรอาหาร BG-11 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนลงในสูตรอาหาร BG-11 เนื่องจากในอาหารสูตรนี้มีแต่แหล่งอาหารที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้กลูโคสยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายขนาดเล็กและจุลินทรีย์หลายๆ กลุ่มสามารถนำไปใช้ได้ง่าย (Perez-Garcia และคณะ 2011) ทั้งนี้อาจเกิดจากกลูโคสจะให้พลังงานสูงกว่าสารอื่นเมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากัน เช่น กลูโคสให้พลังงาน 2.8 กิโลจูลต่อโมล ในขณะที่อะซิเตทให้พลังงานเพียง 0.8 กิโลจูลต่อโมล เท่านั้น (Boyle และ Morgan 2009) และที่สำคัญเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ประหยัดค่าใช้จ่าย และเห็นผลได้ชัดเจนว่าสาหร่าย *Scenedesmus armatus* มีความสามารถในการเพิ่มน้ำมัน

## 1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในระบบเขย่าขนาด 100 มิลลิลิตร
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในระบบขยายขนาด เป็น 600 มิลลิลิตร ที่มีสายยางเป็นตัวให้อากาศ
- 1.2.3 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคสที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณชีวมวลของ *Scenedesmus armatus*
- 1.2.4 เพื่อศึกษาการทำไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

### 1.3 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาเฉพาะสำหรับ *Scenedenmus armatus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 วัน ในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ และปริมาณไขมันของสาหร่าย แล้วคัดเลือกสภาวะที่ดีที่สุดมาทำการเพาะเลี้ยงในขวดโหลภายใต้สภาวะป้อนอากาศ โดยให้อัตราการไหลของอากาศ 190 มิลลิลิตรต่อนาที ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 22 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ โดยใช้ขวดโหลขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร และทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายโดยการทำให้แห้ง จากนั้นนำสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้ไปทำการสกัดด้วยเฮกเซน และเข้ากระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอทานอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์เปลี่ยนเป็นน้ำมันไบโอดีเซล นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สาหร่าย *Scenedenmus armatus* เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้
- 1.4.2 ทราบระบบที่เหมาะสมการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* เพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวล
- 1.4.3 ทราบสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มปริมาณไขมันในสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ได้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สาหร่ายสีเขียว (Green Algae)

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) สาหร่ายในดิวิชันนี้ส่วนใหญ่มีสีเขียวเนื่องจากภายในมีองค์ประกอบเป็นคลอโรพลาสต์ซึ่งมีรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์ทั้ง เอ และ บี จำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุพวกแคโรทีน และแซนโทฟิลล์ และอีกหลายชนิดซึ่งมีรูปร่างหลายแบบ ลักษณะเหล่านี้สามารถนำมาจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียวได้อย่างชัดเจน สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีไฟรีนอยด์ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการสร้างแป้งในเซลล์ของสาหร่าย สาหร่ายสีเขียวจะพบได้ทั่วไปแทบทุกหนทุกแห่ง ประมาณร้อยละ 10 ของสาหร่ายทั้งหมดเป็นสาหร่ายทะเลซึ่งจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มแสง ความสมบูรณ์ของอาหาร และสภาพแวดล้อม สาหร่ายสีเขียวที่เป็นสาหร่ายทะเลมักพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง อาจมีบ้างที่พบในระดับความลึกถึง 300 ฟุต ส่วนอีกร้อยละ 90 ของสาหร่ายสีเขียวที่เหลือจะเป็นสาหร่ายน้ำจืดหรือสาหร่ายที่ขึ้นอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศ สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดอาจจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ เช่น ห้วย หรือลำธาร หรือน้ำลึกที่แสงส่องถึงเช่น อ่างเก็บน้ำ สาหร่ายหลายชนิดเป็นแพลงก์ตอน สาหร่ายบางชนิดก็ขึ้นอยู่บนก้อนหิน ทราวย โคลน เปลือกหอย บนพืช หรือสัตว์ชนิดอื่น (ยิวดี 2549)

#### 2.1.1 สาหร่าย *Scenedesmus* sp.

ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย *Scenedesmus* sp.

อนุกรมวิธาน

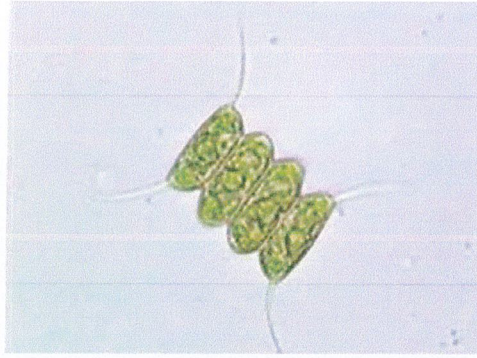
Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlorococcales

Family Scenedesmaceae

Genus *Scenedesmus*



รูปที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. (ที่มา : กิตติคุณ 2554)

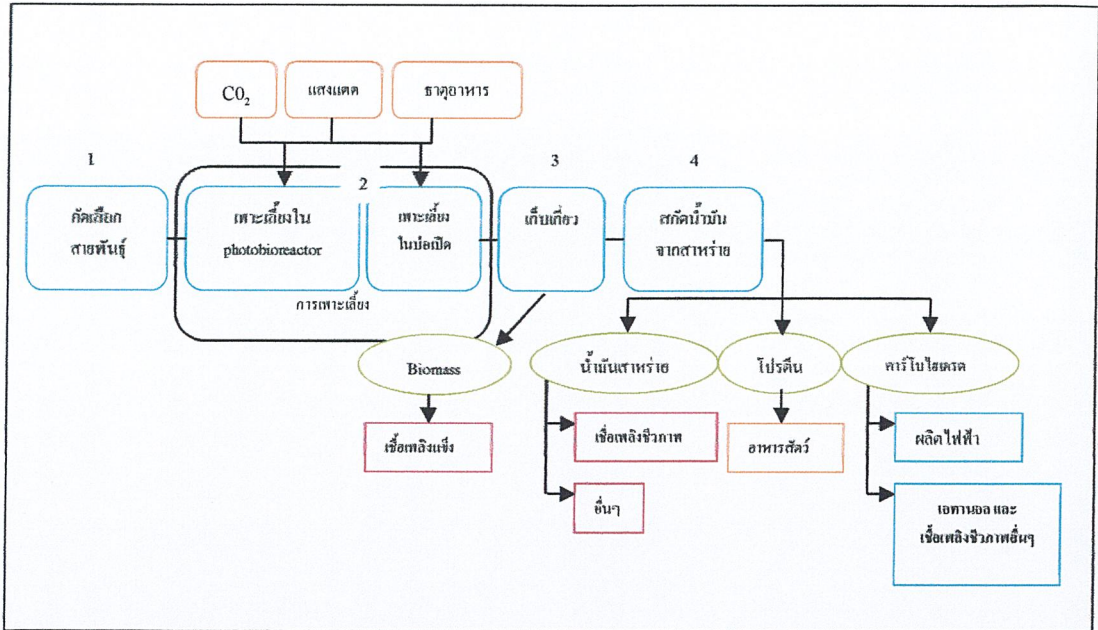
*Scenedesmus* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ไม่มีการเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เรียงชิดติดกันเป็นลักษณะจานแบน ส่วนใหญ่โคโลนีจะประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8, 16, 32 บางครั้งก็เป็นเซลล์เดี่ยว แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกรูปไข่ กระจายหรือพระจันทร์ครึ่งซีก โดยปกติแล้วปลายสุดทั้งสองด้านของแต่ละเซลล์จะมีความยาวถึง 200 ไมโครเมตร ยื่นออกมานอกเซลล์แต่ละเซลล์มีคลอโรพลาสต์ที่มีลักษณะคล้ายจานเป็นแถบข้างเซลล์มีไฟรินอยด์ 1 อัน เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนผนังเซลล์อาจหุ้มด้วยเซลล์กันกระแทกหรือเซลล์ที่มีลักษณะเป็นร่างแห (Reticulation) มีมากกว่า 100 สายพันธุ์ จะแตกต่างกันตามจำนวน และรูปแบบที่อยู่บนผนังเซลล์

*Scenedesmus* sp. พบได้ทั่วไปในพวกแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำจืด แม่น้ำ สระน้ำ บ่อน้ำ หรือบางครั้งอาศัยอยู่ในน้ำกร่อย พบได้ทั่วทุกทวีป ตั้งแต่ทวีปอเมริกาเหนือที่มีสภาพอากาศเขตร้อนไปจนถึงขั้วโลกเหนือ *Scenedesmus* sp. ที่พบทั้งหมดมี 76 สายพันธุ์ และพบในประเทศไทย 17 สายพันธุ์ หนามและขนของมันทำให้โคโลนีลอยตัวสูงขึ้น ช่วยให้ดูดซึมแสงและสารอาหารต่างๆ และยังช่วยป้องกันไม่ให้สัตว์กินพืชเข้ามาทำร้ายอีกด้วย สาหร่ายชนิดนี้จะเป็นตัวบ่งชี้สภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมี นิยมใช้ในการตรวจสอบสารอาหารและสารพิษที่เกิดจากมนุษย์ในการใช้แหล่งน้ำ จะมีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและเป็นโคโลนี แต่ละเซลล์ของเซลล์พ่อแม่จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยไม่มีแฟลกเจลลาที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ลูกให้เหมือนกับเซลล์พ่อแม่ โคโลนีใหม่ที่ได้อาจเกาะกันแน่นภายในผนังเซลล์

## 2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

([http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal\\_biofuel\\_mar57.pdf](http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal_biofuel_mar57.pdf))

น้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่ายต้องมีการผ่านขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ได้แก่ การคัดเลือกสายพันธุ์ การเพาะเลี้ยง การเก็บเกี่ยว และการสกัดน้ำมัน ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตน้ำมัน

ที่มา: [http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal\\_biofuel\\_mar57.pdf](http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal_biofuel_mar57.pdf)

### 2.2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algal Cultivation)

การเลี้ยงสาหร่ายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ การเพาะเลี้ยงในระบบเปิด และระบบปิด

2.2.1.1 การเพาะเลี้ยงในระบบเปิด (Open-system) เป็นระบบที่มีการถ่ายโอนมวลจากระบบไประบบไปสิ่งแวดล้อมหรือจากสิ่งแวดล้อมไปสู่ระบบ หรือคือเป็นวิธีการเลี้ยงสาหร่ายแบบธรรมชาติ เช่น เลี้ยงในบ่อน้ำ คลอง และชายทะเล เป็นต้น แต่การเลี้ยงสาหร่ายโดยวิธีนี้ยากต่อการดูแล ทั้งในเรื่องการปนเปื้อนของบ่อน้ำ เช่น แบคทีเรีย ที่มีผลกระทบต่ออัตราการเติบโตของสาหร่าย และการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.2.1.2 การเพาะเลี้ยงในระบบปิด (Closed-system Bioreactor Plants) เป็นระบบที่มีการควบคุมมวลระหว่างระบบและสิ่งแวดล้อม เป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการวิจัยและพัฒนาเพราะการเพาะเลี้ยงวิธีนี้สามารถควบคุมอุณหภูมิ และสิ่งปนเปื้อน อีกทั้งยังสามารถพัฒนาและออกแบบให้อยู่ในช่วงที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงระบบปิดสามารถตั้งใกล้กับโรงงานที่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย

## 2.2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงสามารถแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่

2.2.2.1 แบบออโตโทรฟิค (Autotrophic Cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ใช้แสงและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากธรรมชาติเป็นหลักในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์สารชีวมวลต่างๆ หรือคือการใช้อนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน

2.2.2.2 แบบเฮเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic Cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น กลูโคส ซูโครส หรือน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ซึ่งจะเพาะเลี้ยงในที่ที่ไม่มีแสงหรือในที่มืดตลอดเวลา

2.2.2.3 แบบมิกโซโทรฟิค (Mixotrophic Cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอน และแสงเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยแสงที่ใช้อาจเป็นแสงจากธรรมชาติหรือจากหลอดไฟ

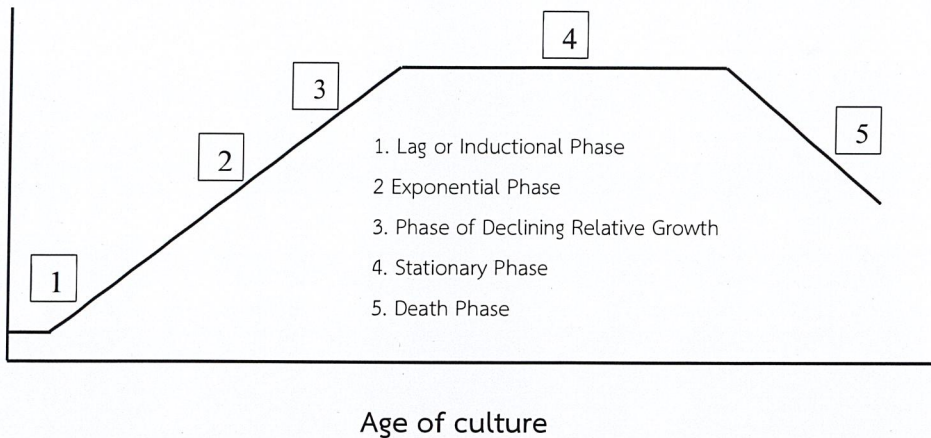
## 2.2.3 การวัดการเจริญเติบโต

การวัดมวลชีวภาพหรือปริมาณของสาหร่ายเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวน และการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นสามารถประเมินหรือทำการวัดได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การนับจำนวน (Number) หรือหามวลชีวภาพ (Biomass) ของสาหร่ายต่อหน่วยปริมาตรน้ำโดยการที่จะเลือกใช้วิธีใดนั้นต้องคำนึงถึงความเหมาะสม และข้อจำกัดของแต่ละวิธีตลอดจนชนิดของสาหร่าย อย่างไรก็ตามก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษาด้วย

การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่ายจะทำให้ทราบอัตราการเติบโต หรือ “Growth rate” ของเซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความสำคัญต่อการตรวจสอบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสาหร่ายตลอดจนระบบการจัดการเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตของสาหร่ายสูงสุด ทั้งนี้การเจริญเติบโตของสาหร่ายมีลักษณะกราฟโค้งรูปตัว “S” (Sigmoid Curve) ซึ่งเรียกว่า เส้นโค้งการเติบโต (Growth Curve) โดยเส้นกราฟหรือเส้นโค้งการเจริญเติบโต แบ่งออกได้ 5 ระยะ คือ

1. ระยะปรับตัว (Lag phase or Inductional phase)
2. ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential phase)
3. ระยะเฉื่อย (Retardation phase or phase of declining relative growth)
4. ระยะคงที่ (Stationary phase)
5. ระยะตาย (Death phase)

Biomass



รูปที่ 2.3 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย (ที่มา: ลัดดา 2543)

การวัดมวลชีวภาพหรือปริมาณของสาหร่ายเป็นการศึกษาการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงซึ่งการวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้น สามารถทำได้ 2 วิธี คือ ทางตรง และทางอ้อมโดยการวัดประชากรสาหร่ายทางตรง จากการนับจำนวนเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตของสาหร่ายโดยใช้สไลด์สำหรับนับเซลล์ที่นิยมใช้สำหรับนับสาหร่ายขนาดเล็ก (0.5–10 ไมโครเมตร) (ขจรเกียรติ 2550 และ Anderson 2005) ส่วนในการวัดประชากรสาหร่ายทางอ้อม จะทำการวัดความหนาแน่นของสาหร่ายโดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (ชุตินันท์ และคณะ 2552) ซึ่งปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้และกระจายออกจะเป็นสัดส่วนและความหนาแน่นของเซลล์โดยการนำตัวอย่างของสาหร่ายใส่ในหลอดวัด (Cuvette) และอ่านค่าร้อยละของแสงที่ผ่านออกมา (ร้อยละ Transmittance) ถ้าตัวอย่างสาหร่ายมีความขุ่นมาก ร้อยละที่แสงผ่านได้จะมีน้อย แต่โดยทั่วไปมักอ่านค่าการดูดกลืนแสง (OD) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์ ข้อดี คือ มีสะดวก และรวดเร็วในการให้ข้อมูลเกี่ยวกับมวลชีวภาพของสาหร่าย แต่ข้อเสีย คือ อาจเกิดความผิดพลาดจากสิ่งแขวนลอยที่ไม่มีชีวิตหรือเซลล์ที่ตายแล้ว นอกจากนี้ยังสามารถวัดปริมาณมวลของเซลล์ที่แปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายซึ่งวิธีนี้ต้องทำให้เซลล์แห้งจนน้ำหนักคงที่และต้องไม่มีสารอื่นปะปนมาด้วยเป็นวิธีที่เสียเวลาเหมาะสำหรับงานวิจัยเท่านั้น (ขจรเกียรติ 2550)

#### 2.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

Morowvat และคณะ (2010) ศึกษาปริมาณน้ำมันในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BG-11 ซึ่งมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อย่างไม่จำกัด

ภายใต้การให้แสงจากฟลูออเรสเซนซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายผลิตน้ำมันได้สูงที่สุด จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ไปสกัดน้ำมันโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล (1:2) พบว่าปริมาณน้ำมันที่สกัดได้คือ ร้อยละ 25 ของมวลชีวภาพ แล้วนำน้ำมันที่สกัดได้นั้นไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี เพื่อวิเคราะห์ของกรดไขมันพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ประกอบด้วยกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์คือ กรดโดโคซานอิกเมทิลเอสเทอร์ (Docosanoic acid methyl ester) กรดเตตราเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (Tetradecanoic acid methyl ester) กรดเฮกซะเดคะโมอิกเมทิลเอสเทอร์ (Hexadecanoic acid methyl ester) และกรดโนนอิกเมทิลเอสเทอร์ (Nonanoic acid methyl ester)

กิตติคุณ และคณะ (2554) เมื่อนำสาหร่ายสายพันธุ์ *Ankistrodesmus* sp.W53 มาเลี้ยงในถังเลี้ยงสาหร่ายขนาด 20 ลิตร โดยเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 15 ลิตร โดยเติมหัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 เลี้ยงในสภาวะให้อากาศด้วยปั๊มให้อากาศ ให้แสงแบบต่อเนื่องจากหลอดฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เก็บตัวอย่างครั้งละ 2 มิลลิลิตร 3 ชั่วโมง ทุกๆ 2 วัน นำไปวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ด้วยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ การวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ และการหาปริมาณภายในเซลล์ด้วยวิธีการสกัดพบว่า *Ankistrodesmus* sp.W53 มีการผลิตไขมันมากที่สุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง 0.597 น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณเซลล์  $2.042 \times 10^5$  ต่อ มิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ 1.536 มิลลิกรัมต่อลิตร มีไขมันสูงสุดร้อยละ 26.09 กรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

เบญจพร และคณะ (2555) ศึกษาการเจริญผลิตไขมันของสาหร่าย 20 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหาร BG-11 ปริมาตร 1 ลิตร ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายจำนวน 3 สายพันธุ์ที่มีการเรืองแสงของไขมันเป็นจำนวนมากที่สุดด้วยวิธีการย้อมสีไนต์เรด คือ *Chlamydomonas* sp. S2/55, *Scenedesmus* sp. S16/55 และ *Selenastrum* sp. S19/55 นำสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 5 ลิตร เพื่อศึกษาการเจริญ ปริมาณไขมัน และองค์ประกอบภายในเซลล์พบว่า *Chlamydomonas* sp. S2/55 มีปริมาณไขมันมากที่สุด คือ ร้อยละ  $27.2377 \pm 2.25$  ต่อกรัม อัตราการเจริญจำเพาะ 0.356 ต่อวัน มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และซี  $0.837 \pm 0.27$ ,  $5.1516 \pm 0.10$  และ  $4.9393 \pm 0.2$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณแคโรทีนอยด์  $0.0157 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนร้อยละ  $11.6656 \pm 0.66$  ต่อกรัม ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ  $45.9665 \pm 5.56$  ต่อกรัม ปริมาณความชื้นร้อยละ  $8.4407 \pm 1.83$  ต่อกรัม และปริมาณเถ้าร้อยละ

6.6895±3.96 ต่อกรัม ชนิดกรดไขมันที่พบในปริมาณมาก คือ กรดลอริกร้อยละ 23.04 กรดโอเลอิกร้อยละ 15.52 และกรดปาล์มิติกร้อยละ 17.03 ตามลำดับ

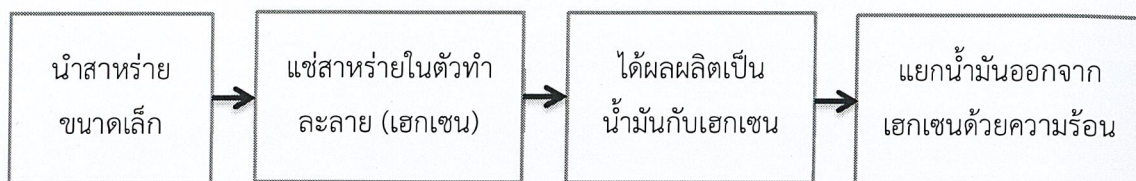
ธนะพันธ์ และคณะ (2552) ศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่แยกได้จากน้ำตกกล้วยไม้ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา และแหล่งน้ำในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่ามีสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ 8 คือ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. โดยเฉพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร คือ JM, BG-11 และ N8 ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 แล้วสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณไขมันที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอื่น ซึ่ง *Chlamydomonas* sp. มีปริมาณไขมันมากที่สุด คือ ร้อยละ 22.74 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือ *Scenedesmus* sp. คือ มีปริมาณไขมันร้อยละ 12.43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ *Chlorella* sp. ที่มีปริมาณไขมันร้อยละ 12.43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

## 2.3 การเก็บเกี่ยว (Algal Harvesting)

การเก็บเกี่ยวสาหร่ายทำได้หลายวิธีโดยใช้เครื่องมือและวิธีการต่างๆ ตามแต่ชนิดของสาหร่ายเช่น เครื่องเหวี่ยง การตกตะกอน การกรอง ซึ่งวิธีการปั่นเหวี่ยงไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดเนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้นจึงมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการเก็บเกี่ยวสาหร่ายให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ เช่น การนำเทคนิคต่างๆ มาประยุกต์ใช้ร่วมกัน เช่น การตกตะกอน (Flocculation) การชะน้ำออก (Dewatering) และการทำแห้ง (Drying)

การสกัดน้ำมันจากสาหร่าย (Algal Extraction) สามารถทำได้หลายวิธี อาทิ การบีบอัดเพื่อให้คายน้ำมัน (Expeller/ Press) การใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย (Hexane Solvent Method) การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อให้สารสกัดเข้าไปละลายน้ำมันออกมา (Enzymatic Extraction) การใช้อุลตราโซนิกร่วมด้วยในการสกัด โดยคลื่นเสียงจะทำให้สาหร่ายเกิดการสั่นจากนั้นน้ำมันหลุดออกมาละลายกับตัวทำละลาย (Ultrasonic-assisted Extraction) และการใช้เทคนิคออสโมซิสโดยอาศัยความต่างของความดันเพื่อให้เซลล์แตก (Osmotic Shock)

วิธีการสกัดไขมันโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvents Extraction) ในทางอุตสาหกรรมมีการนำเอาตัวทำละลายมาช่วยในการสกัดน้ำมันให้ได้น้ำมันออกมามากที่สุด ส่วนใหญ่การใช้ตัวทำละลายจะสกัดได้มากกว่าร้อยละ 90 ของปริมาณน้ำมันที่มีในวัตถุดิบ การสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายเป็นการสกัดที่ใช้ในโรงงานผลิตน้ำมันพืชทั่วไป โดยนำวัตถุดิบที่เป็นส่วนที่ให้น้ำมันมา จากนั้นนำไปตากแดดหรืออบไล่ความชื้นออก แล้วจึงแช่ในตัวทำละลาย ตัวทำละลายมีอยู่หลายชนิด เช่น อีเทอร์ เบนซีน และที่นิยมมากที่สุดคือ เฮกเซน ก็จะได้สารละลายที่มีส่วนผสมของน้ำมันและเฮกเซนออกมา จากนั้นจึงนำไปแยกตัวทำละลายออกจากน้ำมันโดยการระเหยโดยใช้ความร้อน เพื่อแยกน้ำมันออกจากโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย แสดงดังรูป 2.4



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายจากสาหร่าย (ที่มา : พิจักษ์ และคณะ 2554)

### 2.3.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเก็บเกี่ยวสาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล

นฤตชวรรณ (2555). งานวิจัยนี้ศึกษาการเก็บเกี่ยว และผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก สายพันธุ์ *Chlorella* sp. ชนิดน้ำเค็ม โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ส่วน คือ 1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายด้วยวิธีโคแอกกูเลชัน-ฟลอคคูเลชัน โดยใช้โปรแกรม Response Surface Methodology (RSW) ตัวแปรที่ศึกษา 2 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของสารช่วยตกตะกอน (อลูมิเนียมซัลเฟต และเพอริคลอไรด์) 30-200 มิลลิกรัมต่อลิตร และพีเอช 6-10 2. ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการตกจมสาหร่าย 3. ศึกษาชนิดของกรดไขมันจากสารที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Thin layer chromatography (TLC) และเครื่อง Gas chromatography–Flame ionization detector (GC-FID) และ 4. ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน และเอสเทอร์ิฟิเคชัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายด้วยอลูมิเนียมซัลเฟต คือ ความเข้มข้น 152 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6 เวลาในการตกจม 60 นาที และเพอริคลอไรด์ คือความเข้มข้น 143 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 8.1 เวลาในการตกจม 40 นาที ซึ่งให้ร้อยละประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวเท่ากับ 100 และจากการศึกษาชนิดของกรดไขมัน พบว่าสารที่สกัดได้จากสาหร่ายประกอบด้วยไขมัน 3 ชนิดหลัก คือ กรดปาล์มมิติก ร้อยละ 27.73 กรดปาล์มมิโอเลอิก ร้อยละ 15.99 และกรดโอเลอิก ร้อยละ 5.69 และการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน และเอสเทอร์ิฟิเคชัน พบว่ามีร้อยละเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้น แต่ค่าที่ได้ยังต่ำกว่าค่ามาตรฐานอยู่มาก หากพิจารณาคุณลักษณะทางกายภาพ พบว่าการใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีผลทำให้การแยกชั้นในขั้นตอนการล้างน้ำทำได้ยากกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากวัตถุดิบตั้งต้นมีร้อยละกรดไขมัน เท่ากับ 20.95 ดังนั้นการผลิตไบโอดีเซลจึงควรทำปฏิกิริยาแบบ 2 ขั้นตอน คือทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระ แล้วตามด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

การสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีดั้งเดิมจะมีหลักการที่เกี่ยวข้อง 2 หลักการที่สำคัญ คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction) เช่น ทำการสกัดไขมันด้วยคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ (1:2:0.8 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้วิธีการของ Bligh และ Dyer (Molina Grima และคณะ 1994) ผสมกันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดแยกชีวมวลออกจากสาร ไขมันที่เหลืออยู่ในชีวมวล

ของสารห่วยจะถูกสกัดอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำของเหลวที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ผสมกัน นำสารละลายที่ผสมกันมาแยกด้วยคลอโรฟอร์ม และน้ำผสมกับเมทานอลเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น ในอัตราส่วนสุดท้ายของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ เป็น 1:1:0.9 ชั้นบน (เมทานอลผสมกับน้ำ) เป็นชั้นที่ถูกกำจัดออก และชั้นของคลอโรฟอร์มเป็นชั้นที่ไขมันละลายอยู่และทำการวัดน้ำหนัก (Gravimetric Determination) โดยนำไขมันที่ได้มาชั่งน้ำหนัก แสดงผลเป็นร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบ (Crude Extractions) ที่ได้มาทำการแยกไขมันที่เป็นกลาง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin-layer Chromatography, TLC) โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas Chromatography, GC) หรือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) แต่การดำเนินการด้วยวิธีนี้ยังมีปัญหาที่สำคัญคือ ใช้เวลาและใช้แรงงานมากทำให้ยากต่อการคัดแยกสาหร่ายที่มีจำนวนมาก อีกทั้งยังต้องศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายที่อาจจะมีผลต่อไขมันที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่าย เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) เป็นผลให้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านสนใจถึงการวัดแหล่งกำเนิดของไขมันด้วยวิธีอื่นๆ (Bligh และ Dyer 1959, Cooksey และคณะ 1987, Eltgroth และคณะ 2005, Izard และ Libberger 2003)

Morowwat และคณะ (2010) ศึกษาปริมาณน้ำมันในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BG-11 ซึ่งมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อย่างไม่จำกัด ภายใต้การให้แสงจากฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายผลิตน้ำมันได้สูงที่สุด จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ไปสกัดน้ำมันโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเอทานอล (1:2) พบว่าปริมาณน้ำมันที่สกัดได้คือ ร้อยละ 25 ของมวลชีวภาพ แล้วนำน้ำมันที่สกัดได้นั้นไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี เพื่อวิเคราะห์ของกรดไขมันพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ประกอบด้วยกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์คือ กรดโดโคซานอิกเมทิลเอสเทอร์ (docosanoic acid methyl ester) กรดเตตราเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (tetradecanoic acid methyl ester) กรดเฮกซะเดคะโมอิกเมทิลเอสเทอร์ (hexadecanoic acid methyl ester) และกรดโนนอิกเมทิลเอสเทอร์ (nonanoic acid methyl ester)

## 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก

### 2.4.1 ชนิดของสาหร่าย

สาหร่ายที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตไขมันเพื่อเป็นพลังงานควรมีอัตราการเจริญเติบโตสูงให้ปริมาณไขมันสูง ทนต่อสภาวะแวดล้อม และมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงสูง นอกจากนี้ควรให้ผลพลอยได้ (By Products) ที่มีมูลค่าสูงด้วย การคัดเลือกสายพันธุ์จากธรรมชาติ (Novel Habitats And Ecosystems) ควรมีวิธีการคัดเลือกที่รวดเร็วเพื่อค้นหาว่าสายพันธุ์ใดมีปริมาณไขมันสูง และมีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายสกุลเดียวกันไว้ เนื่องจากอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์จึงควรมีการรวบรวมข้อมูลความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ไว้ เช่น ปริมาณไขมัน และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การปรับปรุงพันธุ์สาหร่ายมรลีแยกได้จากธรรมชาติเพื่อให้สาหร่ายผลิตไขมันสูงขึ้น เช่น การใช้สารเคมีหรือแสงยูวี รวมทั้งการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม อีกทั้งควรศึกษาวิธีการสังเคราะห์ไขมันระดับยีน และการควบคุมผลของสภาวะแวดล้อมที่มีต่อการสร้างและสะสมไขมัน องค์ประกอบของผนังเซลล์ซึ่งจะส่งผลต่อการสกัด (มรกต 2554) วิธีการคัดแยกเชื้อสาหร่าย (Isolation Method) แบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้ (ขจรเกียรติ 2550)

2.4.1.1 Enrichment Method : วิธีนี้ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมเฉพาะสาหร่ายชนิดที่ต้องการ เช่น การเตรียมอาหารที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายชนิดที่ต้องการศึกษา ซึ่งจะทำให้สาหร่ายชนิดอื่นไม่เจริญหรือเจริญได้น้อย

2.4.1.2 Manipulative Method : วิธีการแยกสาหร่ายชนิดนี้ต้องการออกจากสาหร่ายชนิดอื่นๆโดยวิธีกลหรือวิธีการทางฟิสิกส์ เช่น การปั่น การใช้ปิเปต การเขี่ย เชื้อบนอาหารวุ้น เป็นต้น

2.4.1.3 Antibiotic Method : วิธีใช้ยาปฏิชีวนะฆ่าสาหร่ายหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่เราไม่ต้องการ ซึ่งยาปฏิชีวนะที่นิยม คือ เพนิซิลิน ฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดี โดยไปห้ามการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพวกแบคทีเรียแกรมบวก) สเตรปโตมัยซิน ฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้ดี โดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซมชนิด 70S ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น และคลอแรมเฟนิคอล ฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซมชนิด 70S ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกัน

## 2.4.2 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้เซลล์ในปริมาณมากและมีการสะสมไขมันไว้ในเซลล์ในปริมาณสูงนั้น มีปัจจัยสำคัญ คือ แหล่งอาหาร แสง และอุณหภูมิ (แพรวพิลาศ และ ผกาวดี 2553)

2.4.2.1 แหล่งอาหาร (Nutrients) ไม่ว่าจะเป็นคาร์บอนกับไนโตรเจน โดยคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งสาหร่ายสามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์ และอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายได้ในน้ำ ซึ่งอยู่ในรูปของคาร์บอนเนต และไบคาร์บอนเนต นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว ไนโตรเจนก็เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อการชักนำให้สะสมไขมัน โดยจำเป็นต้องมีการควบคุมการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนหรือมีในปริมาณที่จำกัดจะมีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์ไขมันของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้น (Widjaja และคณะ 2009) นอกจากนี้ไนโตรเจนมีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์สาหร่ายอีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกรดอะมิโน โปรตีน และเอนไซม์ภายในเซลล์

2.4.2.2 แสง (Light) แสงมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไป ถ้ามีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยมีการให้แสงด้วยหลอดได้ควรให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ เพราะแสงที่ได้จะมีอุณหภูมิไม่สูงเหมือนแสงจากหลอดไฟชนิดอื่นนอกจากนี้การควบคุมช่วงเวลาการให้แสงสลับกับการหยุดให้แสงจะส่งผลให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีกว่าการให้แสงตลอดเวลา โดยช่วงแสงสว่างที่นิยมใช้คือ 16 ชั่วโมงสว่างต่อ 8 ชั่วโมงมืด เป็นต้น (Barsanti และ Gualtieri 2006)

2.4.2.3 อุณหภูมิ (Temperature) มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์สาหร่ายและการทำงานของสาหร่าย รวมถึงโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆในเซลล์สาหร่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณไขมันในเซลล์สาหร่าย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิต่อการเจริญของสาหร่ายแต่ละชนิด (พินิตา 2552)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดการสะสมไขมันไม่ว่าจะเป็นกรดแผล่งไนโตรเจน การจำกัดฟอสเฟต ความเข้มข้นของเกลือสูง รวมทั้งมีการเติมโลหะบางชนิด เช่น แคดเมียม (Cadmium) จะทำให้สาหร่ายหลายๆชนิดมีปริมาณของไขมันเพิ่มขึ้นหลังจากที่สภาวะมีการเปลี่ยนแปลง โดยปกติระดับไขมันจะอยู่ที่ร้อยละ 20-50 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง บางที่สามารถสะสมไขมันได้ถึงร้อยละ 80 (Guschina และ Harwood 2006, Rao และคณะ 2007 และ Illman และคณะ 2009) ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และการสะสมไขมันภายในเซลล์สาหร่ายให้สูงขึ้น

### 2.4.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มน้ำมัน

Hong-Yu Ren และคณะ (2014) จากการศึกษาอิทธิพลของ  $Fe^{3+}$  (0–0.12 กรัมต่อลิตร)  $Mg^{2+}$  (0–0.73 กรัมต่อลิตร) และ  $Ca^{2+}$  (0–0.98 กรัมต่อลิตร) การสะสมชีวมวลและไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กในที่มีตพบว่าการผลิตชีวมวลและไขมันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของไอออนโลหะเพิ่มขึ้น โดยในตัวอย่างที่มี  $Fe^{3+}$   $1.2 \times 10^{-3}$  กรัมต่อลิตร,  $Mg^{2+}$   $7.3 \times 10^{-3}$  กรัมต่อลิตร และ  $Ca^{2+}$   $9.8 \times 10^{-4}$  กรัมต่อลิตร มีการผลิตชีวมวล ปริมาณไขมันทั้งหมด และการผลิตไขมันสูงสุด 3.49 กรัมต่อลิตร, 47.4 เปอร์เซ็นต์ และ 275.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับที่สำคัญกว่านั้น การเติม EDTA ( $1.0 \times 10^{-3}$  กรัมต่อลิตร) สามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของไอออนโลหะ (เหล็กและแคลเซียม) และเพิ่มปริมาณในสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งทำให้มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ปริมาณไขมันทั้งหมดและการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น 28.2 เปอร์เซ็นต์ และ 29.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไอออนโลหะและ EDTA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นประโยชน์ต่อการสะสมไขมันของเซลล์ *Scenedesmus* sp.

Qiang Lin และคณะ (2012) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งและความเข้มข้นของ ferric ion ที่มีต่อผลผลิตชีวมวล การผลิต fatty acid methyl esters (FAME) และองค์ประกอบจากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีลักษณะคล้าย *Scenedesmus rubescens* ซึ่งพบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไว้ใน  $Fe^{2+}$ - $SO_4^{2-}$  ต่อ EDTA มีการผลิตชีวมวลแห้งไร้เถ้า (AFDB) และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เอ สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไว้ใน  $Fe^{2+}$ - $SO_4^{2-}$  และ  $Fe^{3+}$ - $Cl^-$  ( $P < 0.001$ ) ความเข้มข้น  $Fe^{2+}$  ที่สูงหรือต่ำเกินไปจะขัดขวางการใช้แอมโมเนีย การสะสม AFDB และ FAME โดยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร  $Fe^{2+}$  สาหร่ายที่มีการผลิต AFDB และ FAME สูงที่สุด ( $341.1 \pm 25.8$  และ  $107.8 \pm 19.3$  มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน) ( $P < 0.001$ ) ปริมาณโดยเฉลี่ยของ C16 และ C18 ที่ทุกความเข้มข้นของ  $Fe^{2+}$  มีค่าเท่ากับ  $88.6$  เปอร์เซ็นต์  $\pm 2.9$  เปอร์เซ็นต์ของ FAME ทั้งหมด และลดลงเมื่อความเข้มข้นของ  $Fe^{2+}$  เพิ่มขึ้น และในกลุ่มของกรดไขมัน ปริมาณของ C18: 0, C18: 1n-7 และ C18: 1n-9 เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของ  $Fe^{2+}$  เปลี่ยนไป แต่ปริมาณของ C16 ไม่เปลี่ยนแปลง

Fei-Fei และคณะ (2014) เพื่อศึกษาสารฟอสฟอรัสที่มีผลกระทบต่อการผลิตไบโอดีเซลจาก *Scenedesmus obliquus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใต้สภาวะที่ขาดไนโตรเจนของอาหารทั้ง 6 ชนิดในการรวมกันของไนโตรเจนที่เพียงพอหรือที่ขาด และฟอสฟอรัสที่เพียงพอหรือที่มีข้อจำกัด และที่ขาดเทียบกับที่มีไนโตรเจนที่เพียงพอพบว่าการมีไนโตรเจนที่เพียงพอจะทำให้เชื้อผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นนอกจากนี้ผลผลิตไบโอดีเซลจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงในสภาวะการขาดฟอสฟอรัสที่มีฟอสฟอรัสรวมทั้งสภาวะที่มีฟอสฟอรัสเพียงพอจะได้ผลผลิต FAMEs สูงสุดที่ 24.2 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งมีผลผลิตสูงกว่าถึงสองเท่าในสูตร

อาหารที่มีสารอาหารครบสมบูรณ์แต่ขาดฟอสฟอรัสซึ่งฟอสฟอรัสที่สะสมอยู่ในเซลล์มากขึ้น ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนกับที่มีฟอสฟอรัสเพียงพอแต่จะไม่มีการสร้างโพลีฟอสเฟต เกิดขึ้นการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสภาวะที่ขาดไนโตรเจนแต่มีแหล่งฟอสเฟตเพียงพอจะทำให้เกิดสภาวะ ‘lipid trigger’ อย่างแท้จริง ซึ่ง เชื้อก็จะสามารถผลิต FAMES ได้ดีและ นอกจากนี้การศึกษาในปัจจุบันยังแสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้ศักยภาพในการใช้ประโยชน์ จากสาหร่ายที่จะรวมกันกำจัดฟอสฟอรัสจากน้ำเสียและการผลิตไบโอดีเซล

ชินอรส และคณะ (2551) เลี้ยงสาหร่ายท้องถิ่นสายพันธุ์ *Chlorella* sp. โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง Watanabe โดยมีการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนที่ต่ำ พบว่า สาหร่ายมีการผลิตปริมาณไขมันสูงขึ้นและมีการเพิ่มสารประกอบอื่น เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วย เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กลูโคส และเหล็กที่อยู่ในรูปสารประกอบเฟอร์ริคคลอไรด์ เป็นต้น ซึ่งพบว่า กลูโคสที่สาหร่ายได้รับไปนั้นจะกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันภายในเซลล์ ส่วนสภาวะที่ไม่มีการเติมกลูโคสแต่มีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์ต่ำ

Tang และคณะ (2011) ศึกษาความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่แตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.03, 5, 10, 20, 30 และ 50 โดยทดลองกับสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด คือ *Scenedesmus obliquus* SJTU-3 กับ *Chlorella pyrenoidosa* SJTU-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 โดยสกัดไขมันด้วยการใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรและการระเหยในเครื่องระเหยสุญญากาศที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas chromatography, GC) ซึ่งจากผลการทดลองสกัดไขมัน พบว่า ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ร้อยละ 50 ให้ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวมากที่สุด โดยใน *Scenedesmus obliquus* SJTU-3 พบร้อยละ 76.24 *Chlorella pyrenoidosa* SJTU-2 พบร้อยละ 67.06 ซึ่งถือได้ว่ามีความเหมาะสมในการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

ชุตินันท์ และคณะ (2552) ศึกษาสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมัน โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorococcum* sp., *Chlorella* sp. (k1), *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. (k2) และ *Chadophora* sp. ในสูตรอาหาร JM โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 วัน ซึ่งพบว่า *Scenedesmus* sp. มีปริมาณไขมันมากที่สุด คือร้อยละ 87.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จึงนำมาทดลองสภาวะในการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของสูตรอาหาร โดยเริ่มจากการทดลองความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อน้ำ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 1 ต่อ 1,000, 1 ต่อ 2,000, 1 ต่อ 3,000, 2 ต่อ 1,000 และ 3 ต่อ 1,000 มิลลิลิตร พบว่า *Scenedesmus* sp. สามารถผลิตกรดไขมันได้ในปริมาณที่มากที่สุดในความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อน้ำ 2 ต่อ 1,000 โดยมีปริมาณไขมันร้อยละ 34.08 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร JM ที่ระดับความเข้มข้นของอาหารต่อน้ำ 2 ต่อ 1,000 และมีการให้

แสงอย่างต่อเนื่อง 3 ความเข้มแสง คือ 1,500 ลักซ์ 3,000 ลักซ์ และ 4,500 ลักซ์ ซึ่งความเข้มแสงที่ 4,500 ลักซ์นั้นมีปริมาณไขมันมากที่สุด คือร้อยละ 34.36 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นนำมาทดสอบความเข้มข้นไนโตรเจน 3 ความเข้มข้น คือ 0, 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ 320 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นทำให้สาหร่ายมีปริมาณไขมันมากที่สุด คือ ร้อยละ 54.38 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยมีการเติมน้ำมันดีเซล 3 ระดับ คือ ที่ 0, 0.1 และ 0.3 มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าที่มีการเติมน้ำมันไบโอดีเซล 0.3 มิลลิลิตร มีการผลิตไขมันมากที่สุด คือ ร้อยละ 51.83 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

จิรรัตน์ และสุนิรัตน์ (2556) ศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร *Chollrella* ซึ่งมีการให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 20.45 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 5 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 0.17, 0.34, 0.51, 0.68 และ 0.85 กรัมต่อลิตร ศึกษาปริมาณรงควัตถุ ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต และวิเคราะห์ไขมันด้วยการใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ปริมาตรต่อปริมาตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 20 พบว่า อาหารที่มีความเข้มข้นไนโตรเจน 0.51 กรัมต่อลิตรนั้น ทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คาร์โบไฮเดรต และปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด โดยมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ 16.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณคาร์โบไฮเดรต 0.65 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแคโรทีนอยด์ 3.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.85 กรัมต่อลิตร พบว่า สาหร่ายมีปริมาณชีวมวล ปริมาณไขมัน และปริมาณโปรตีนมากที่สุด โดยมีปริมาณชีวมวล 1613 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันร้อยละ 25.72 และมีปริมาณโปรตีน 1.58 มิลลิกรัมต่อกรัม

On-Anong และคณะ (1976) ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสาหร่ายสีเขียว 2 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. และ *Chlorella* sp. ในอาหาร Fertilizer (ปุ๋ย) สูตรไนโตรเจน ต่อฟอสฟอรัส ต่อ โพแทสเซียม ต่อ แมกนีเซียม ในอัตราส่วน 12 ต่อ 12 ต่อ 17 ต่อ 2 และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 4 ซึ่งจากการทดลองพบว่า *Scenedesmus* sp. มีปริมาณโปรตีนมากกว่า *Chlorella* sp. ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 62.16 และร้อยละ 48.30 ตามลำดับ แต่ปริมาณชีวมวลทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ปริมาณชีวมวลมากกว่า *Scenedesmus* sp. โดยมีปริมาณชีวมวลทั้งหมด 26 กรัมต่อตารางเมตร ส่วน *Scenedesmus* sp. มีปริมาณชีวมวลทั้งหมด 13.70 กรัมต่อตารางเมตร ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนของ *Chlorella* sp. มีปริมาณที่มากกว่า *Scenedesmus* sp. คือ *Chlorella* sp. มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 125 กรัมต่อตารางเมตร ส่วน *Scenedesmus* sp. มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเพียง 8.5 กรัมต่อตารางเมตร

## 2.5 ไบโอดีเซล

### 2.5.1 ความหมายของไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล หมายถึงน้ำมันเชื้อเพลิงที่สามารถใช้ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลได้ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก และสามารถใช้ได้กับเครื่องยนต์ดีเซลแทบทุกชนิด ไบโอดีเซลนั้นได้จากการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาผ่านการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับ แอลกอฮอล์โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นสารเอสเทอร์และกลีเซอรอล เรียกรวมปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นว่าทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าน้ำมันที่ได้จากปิโตรเลียม เนื่องจากมีออกซิเจนสูงกว่าทำให้เกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ เกิดคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่า ไม่เกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์และให้เขม่าคาร์บอนน้อยกว่า ไบโอดีเซลที่เป็นที่รู้จักกันในประเทศไทยในช่วงแรกจะเป็นการเติมน้ำมันพืชลงไปเครื่องยนต์โดยตรง น้ำมันพืชที่ใช้ เช่น น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม แต่คุณสมบัติของน้ำมันพืชมีความแตกต่างกับน้ำมันดีเซลอยู่มากจึงทำให้เกิดปัญหากับเครื่องยนต์ทำให้เป็นเวลานาน ต่อมาจึงมีการพัฒนามาใช้ไบโอดีเซลที่ผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อทำให้คุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลมีลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากขึ้นจนสามารถใช้กับเครื่องยนต์ได้

### 2.5.2 คุณสมบัติของไบโอดีเซล

พืชน้ำมันที่นำมาผลิตไบโอดีเซลมีด้วยกันหลายชนิดส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไบโอดีเซลที่ได้มีความแตกต่างกันจึงต้องมีข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันขึ้น เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการบ่งชี้คุณภาพของน้ำมัน เนื่องจากไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชหรือไขมันจากสัตว์ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้คุณภาพหลายประเภทของไบโอดีเซลแตกต่างจากน้ำมันดีเซลซึ่งได้แก่ ความหนืด (Viscosity) ความหนาแน่น (Density) และจุดวาบไฟ (Flash Point) โดยน้ำมันไบโอดีเซลจะมีค่าความหนืดและค่าความหนาแน่นสูงกว่าน้ำมันดีเซลซึ่งจะมีการไหลตลอดจนการสเปรย์น้ำมันภายในเครื่องยนต์ทำได้ช้า การจุดระเบิดภายในเครื่องยนต์จึงทำได้ยากกว่า จะเห็นได้จากจุดวาบไฟที่สูงกว่าดีเซลปกติ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อค่าซีเทน (Cetane Number) จุดขุ่น (Cloud Point) และจุดไหลเท (Pour Point)

### 2.5.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล (ธัญญารัตน์ และคณะ 2553.)

การผลิตไบโอดีเซลเป็นอุตสาหกรรมที่ทำกันทั่วโลกร้อยละ 80 จะใช้เมล็ดเรพเป็นวัตถุดิบในการผลิต รองลงมาได้แก่ น้ำมันเมล็ดทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลือง ประมาณร้อยละ 10 ในสหภาพยุโรปจะใช้เมล็ดเรพเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไบโอดีเซล เป็นที่รู้จักกันในชื่อเรพซีดเมทิลเอสเทอร์ (Rapeseed Methyl Ester) หรืออาร์เอ็มอี รองลงมาได้แก่เมล็ด

ทานตะวันซึ่งทำการผลิตในประเทศฝรั่งเศส ขณะที่สหรัฐอเมริกาใช้น้ำมันที่ผ่านการใช้แล้ว และน้ำมันจากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้ น้ำมันทั้ง 3 ชนิดแล้ว ยังมีการใช้ปาล์มและไขมันสัตว์เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงทดแทน และนอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำมันจากแหล่งต่างๆ คือ

#### 2.5.3.1 ปาล์มน้ำมัน

น้ำมันเป็นส่วนที่ได้จากผลปาล์มซึ่งจะให้น้ำมันอยู่ 2 ชนิด คือ น้ำมันปาล์ม ที่สกัดได้จากส่วนเปลือกและน้ำมันเมล็ดในปาล์มที่สกัดจากเมล็ด น้ำมันทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันโดยน้ำมันปาล์มมีกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16 ตัว เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่น้ำมันในเมล็ดปาล์มมีกรดไขมันที่มีคาร์บอน 12 ตัว การผลิตไบโอดีเซลจะสามารถใช้น้ำมันทุกส่วนที่ได้จากปาล์มน้ำมันมาเป็นวัตถุดิบ เช่น น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มโอสลิน กรดไขมันปาล์มกลั่น และน้ำมันเมล็ดใน ที่นิยมมากที่สุดคือ น้ำมันปาล์มดิบ

#### 2.5.3.2 มะพร้าว

การผลิตมะพร้าวในเชิงอุตสาหกรรมเป็นการสกัดน้ำมันจากเนื้อมะพร้าวแห้งโดยมีกรดไขมันลอริกที่มีคาร์บอน 12 ตัวเป็นองค์ประกอบหลัก

#### 2.5.3.3 ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชน้ำมัน ประกอบด้วยโปรตีนและน้ำมัน น้ำมันถั่วเหลืองมีกรดไขมันลิเลอิก เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 18 ตัว จำนวนสองคู่เป็นองค์ประกอบหลัก การสกัดน้ำมันถั่วเหลืองทำได้โดยใช้เครื่องบีบอัดหรือสกัดด้วยตัวทำละลาย ในปัจจุบันการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด และได้น้ำมันถั่วเหลืองดิบที่มีคุณภาพ

#### 2.5.3.4 สบู่ดำ

เมล็ดสบู่ดำมีน้ำมันเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง ไม่นิยมนำมาบริโภค เพราะจะทำให้เกิดอาการท้องเดิน คลื่นไส้ อาเจียน น้ำมันสบู่ดำมีศักยภาพสูงในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลโดยที่ไม่ต้องเข้าไปแย่งพืชทางการเกษตรมาเป็นวัตถุดิบ

#### 2.5.3.5 น้ำมันพืชและสัตว์ที่ใช้แล้ว

เป็นแหล่งวัตถุดิบอีกแหล่งหนึ่งที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากน้ำมันที่ผ่านการทอดซ้ำหลายๆครั้งจะเกิดสารใหม่ขึ้น เป็นสารที่อันตรายต่อสุขภาพ การนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมีปัญหาในการรวบรวม และในเรื่องของคุณภาพน้ำมัน เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนจากกระบวนการทำอาหารจึงต้องควบคุมคุณภาพ เพื่อให้ผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนด

#### 2.5.3.6 พืชน้ำมันชนิดอื่น

สาหร่ายบางสายพันธุ์มีองค์ประกอบของน้ำมันอยู่ในเซลล์สูงจึงสามารถเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เช่น แหล่งน้ำมันจากสาหร่ายโดยสาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการสะสมไขมันได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน รวมทั้งองค์ประกอบของไขมันที่ได้จากสาหร่ายแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกันด้วย นอกจากนี้ชนิดของสาหร่ายแล้วสาเหตุที่ทำให้องค์ประกอบของไขมันที่ได้มีความแตกต่างกันอาจมีผลมาจากชนิดของสับสเตรทที่ใช้และสภาวะในการเพาะเลี้ยง

การผลิตไบโอดีเซลจากพืชนั้น จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกมาก เมื่อเทียบกับการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกน้อยกว่าหลายเท่าตัว (Chisti 2007) นอกจากนี้สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด เช่น *Chlorella* sp. *Schizochytrium* sp. มีการสะสมไขมันในเซลล์ได้สูงถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กมีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันพืชคือ มีส่วนประกอบเป็นไตรกลีเซอไรด์ซึ่งมีจำนวนคาร์บอนอยู่ระหว่าง 12-22 อะตอมต่อโมเลกุล สาหร่ายขนาดเล็กที่มีการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อใช้ในการผลิตน้ำมันมีอยู่หลายชนิด เช่น *Scenedesmus dimorphus*, *Neochloris oleabundans*, *Chlorella vulgaris* และสาหร่ายกลุ่มไดอะตอม เป็นต้น (Fei-Fei 2014) และไขมันที่พบในสาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีจำนวนคาร์บอนภายในโมเลกุลทั้งหมด 16-18 อะตอม ในสภาวะปกติสาหร่ายจะไม่สะสมพลังงานในรูปของไขมันทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีองค์ประกอบของไขมันลดลง แต่เมื่ออยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร สาหร่ายจะเริ่มสะสมอาหารในรูปไขมัน ซึ่งจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีองค์ประกอบของไขมันมากขึ้น รวมทั้งมีการสะสมไขมันภายในเซลล์ในรูปของอนุพันธ์ของกลีเซอรอล ฟอสโฟลิปิด และไกลโคลิปิด

#### 2.5.4 ข้อดีและข้อเสียของการใช้สาหร่ายในการผลิตไบโอดีเซล

##### 2.5.4.1 ข้อดีของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่าย

สาหร่ายมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูงประมาณร้อยละ 3-8 ของพลังงานแสงอาทิตย์ที่ได้รับสามารถเปลี่ยนเป็นชีวมวลได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่สามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ได้เพียงร้อยละ 5.0 โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งใช้สารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ที่อยู่ในน้ำเสียได้จึงเป็นการช่วยบำบัดน้ำเสียและผลิตพลังงานไปพร้อมกัน ที่สำคัญสาหร่ายที่ใช้ในการเจริญเติบโตรวดเร็วโดยแบ่งตัวเพียง 1-10 วัน และสะสมไขมันได้สูงถึงร้อยละ 40-80 ของน้ำหนักแห้งซึ่งสาหร่ายให้ปริมาณน้ำมันต่อพื้นที่เพาะเลี้ยงมากกว่าพืช 10-20 เท่า นอกจากนี้สาหร่ายสามารถเลี้ยงได้ในน้ำเค็มหรือพื้นที่ที่ไม่เหมาะสมในการเพาะปลูกพืช และสามารถเพาะเลี้ยงได้ในระบบทั้งหมดซึ่งสามารถ

ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงจึงทำให้สามารถเลี้ยงได้ตลอดปี (มรกต 2554) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่มาก ทำได้ทุกฤดูกาลอีกทั้งยังใช้เวลาเพียงแค่ 1-2 สัปดาห์ ก็สามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันได้แล้ว ขณะที่พืชน้ำมันชนิดอื่นที่นำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล เช่น สบู่ดำ ปาล์มน้ำมัน การเพาะปลูกจะใช้เวลานานและใช้พื้นที่มาก (รัตนภรณ์ 2551) ดังนั้นสาหร่ายขนาดเล็กมีสิ่งที่ได้เปรียบพืชน้ำมันอื่นๆ หลายประการ นอกจากจะมีกรดไขมันสูงแล้วสาหร่ายขนาดเล็กยังเพาะเลี้ยงง่าย ใช้สารอาหารที่ไม่ซับซ้อนมากคือ สามารถใช้ของเหลือทิ้งได้ เช่น น้ำเสียจากโรงงานหรือใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากอุตสาหกรรม เป็นต้น การเก็บเกี่ยวได้เร็วประมาณ 2-3 สัปดาห์ ก็เก็บเกี่ยวได้แล้ว น้ำเลี้ยงสาหร่ายยังสามารถนำมาเลี้ยงสาหร่ายรุ่นต่อไปได้อีกหลายครั้ง การเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กใช้พื้นที่น้อยมากเมื่อเทียบกับการปลูกพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ยังใช้แรงงานน้อยกว่า การปลูกพืชน้ำมันชนิดต่างๆอีกด้วย ข้อได้เปรียบเหล่านี้นำมาซึ่งความหวังที่จะได้น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กอย่างยั่งยืน (ยุวดี 2556) และสำหรับในประเทศไทยมีสายพันธุ์สาหร่ายประมาณ 1,000 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ใช้คัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดีที่สุด เพื่อที่จะเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมในการเพาะปลูกสาหร่ายมากที่สุดประเทศหนึ่งเช่นกัน นอกจากการคัดเลือกสายพันธุ์จากธรรมชาติ แล้วยังมีการวิจัยเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ ด้วยเทคนิคด้านจีโนมิก (Genomic) และ เมตาบอลิซึม (อาภรณ์ และคณะ 2556)

#### 2.5.4.2 ข้อเสียของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่าย

ประสิทธิภาพในการออกแบบและการทดลองถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพแบบชนิดให้แสง (Photobioreactor) ยังมีไม่มากจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงต่ำลง ต้นทุนในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายสูง (Separation) เพื่อให้เกิดการคั่งคูนมากขึ้นจึงมีแนวคิดที่จะนำผลพลอยได้จากสาหร่ายมาใช้จากการที่สาหร่ายประกอบด้วยไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ไขมันที่ได้จะถูกแยกออกไปผลิตเป็นไบโอดีเซล ส่วนคาร์โบไฮเดรตนำไปใช้ในการผลิตเป็นเอทานอล และโปรตีนใช้เป็นอาหารสัตว์ (มรกต 2554) นอกจากนี้กระบวนการเลี้ยงสาหร่ายจำเป็นต้องมีคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูง หากนำคาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานมาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้น จำเป็นจะต้องทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ ซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากในการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค “Clean Coal Gasification Systems” (วรวิภา 2555) การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น เช่น มันสำปะหลัง ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสูงกว่า

เท่าตัว ในอนาคตหากมีการพัฒนากระบวนการผลิตเชื่อว่าจะสามารถลดต้นทุนการผลิตให้ใกล้เคียงกับพืชพลังงานทดแทนอื่นได้แน่นอน (รัตนภรณ์ 2551)

#### 2.5.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไขมันและคุณสมบัติไบโอดีเซล

ประกาศิต และอนุพนธ์ (2555) ศึกษาการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ *Chlamydomonas* sp. W55, *Chlorococcum* sp. W55, *Chlorococcum* sp. C53, *Chlorella* sp. VB55, *Chlorella* sp. W55, *Monoraphidium* sp. C53, *Scenedesmus* sp. BB55, *Scenedesmus* sp. PA55, *Scenedesmus* sp. W55 และ *Euglena* sp. WS53 ในอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 1 ลิตร ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ พบว่า สาหร่ายที่มีการเรืองแสงของไขมันที่สะสมในเซลล์ดีที่สุด 3 สายพันธุ์คือ *Chlamydomonas* sp. W55, *Chlorella* sp. VB55, *Scenedesmus* sp. PA55 จากนั้นนำสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 สายพันธุ์มาศึกษาการเจริญ การผลิตไขมัน และองค์ประกอบภายในเซลล์ในอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ พบว่า *Scenedesmus* sp. PA55 มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุดคือ ร้อยละ 34.37 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.82 ต่อวัน ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ  $2.06 \pm 0.05$  มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุดเป็น  $4.53 \pm 0.30$  มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนร้อยละ 18.96 ปริมาณไขมันร้อยละ 34.49 ปริมาณความชื้นร้อยละ 93.16 และปริมาณเถ้าร้อยละ 3.12 โดยมีกรดไขมันคาร์บอน 16 และ 18 อะตอมเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 91.57 ของกรดไขมันทั้งหมด) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวร้อยละ 77.51 ของกรดไขมันทั้งหมด

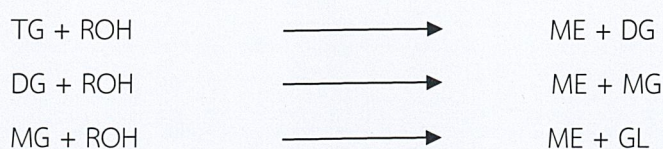
Marth และคณะ (2013) การศึกษาศักยภาพของน้ำมันสาหร่าย *Scenedenmus incrassatulus* เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่าย *Scenedenmus incrassatulus* และไขมันที่ได้ในระหว่างการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีการสังเคราะห์แสงร่วมกับการให้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ (mixotrophic) เป็น 1.8 กรัมต่อลิตร และ  $19.5 \pm 1.5$  ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ องค์ประกอบที่สำคัญของไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันสาหร่าย *Scenedenmus incrassatulus* คือ methyl palmitate (26 เปอร์เซ็นต์) และ methyl linoleate (49 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นลักษณะของไบโอดีเซลคุณภาพสูง คุณสมบัติของเชื้อเพลิงถูกกำหนดโดยสมการเชิงทฤษฎี และพบว่า มีข้อกำหนดของไบโอดีเซลตามมาตรฐานของสหรัฐอเมริกา ASTM D6751 และสหภาพยุโรป EN 14214 คุณสมบัติของไบโอดีเซลคุณภาพสูง คือ มีค่าซีเทนสูง (62) ความหนาแน่นต่ำ (803 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร) ความหนืดต่ำ (3.78 ตาราง

มิลลิเมตรต่อวินาที) เสถียรภาพการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (9 ชั่วโมง) และจุดจุดดับต้นไส้กรองที่อุณหภูมิต่ำ (-4 องศาเซลเซียส) ดังนั้นสำหรับสาย *Scenedesmus incrassatulus* มีคุณสมบัติเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลคุณภาพดี

Mandotra และคณะ (2014) ในงานวิจัยฉบับนี้ทำการศึกษเกี่ยวกับความสามารถของสายสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus abundans* ในการผลิตไบโอดีเซล เพื่อทำการศึกษหาปริมาณมวลรวมชีวภาพและค่าผลได้ของไขมัน โดยเลี้ยงสายสาหร่าย *Scenedesmus abundans* ในอาหาร BBM, Modified CHU-13 และ BG-11 พบว่าในอาหาร Modified CHU-13 ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.32 กรัมต่อลิตรได้ปริมาณมวลชีวภาพมากที่สุดคือ  $1.113 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร และได้ค่าผลได้ของไขมันสูงที่สุดคือ  $489 \pm 23$  กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังทำการศึกษผลของการสกัดไขมัน รวมถึงกระบวนการทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Transesterification) พบว่ารูปแบบกรดไขมันของสายสาหร่าย *Scenedesmus abundans* ที่เลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมจะพบกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16 ตัว และ 18 ตัวในปริมาณมาก คุณสมบัติอื่นๆของไบโอดีเซล เช่น Cetain number, Iodine value, Saponification value พบว่ามีความสอดคล้องกับไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากบริษัท Brazilian National Petroleum Agency (ANP255) และ European biodiesel standard EN14214 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสายสาหร่าย *Scenedesmus abundans* นั้นมีความสามารถในการผลิตไบโอดีเซล

## 2.6 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกนำน้ำมันพืชหรือไตรกลีเซอโรล (TG) ทำปฏิกิริยากับเมทานอล (ROH) เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ (ME) หรือไบโอดีเซลกับไดกลีเซอไรด์ (DG) จากนั้นไดกลีเซอโรล (DG) ทำปฏิกิริยากับเมทานอลเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์กับโมโนกลีเซอไรด์ และในขั้นตอนสุดท้ายโมโนกลีเซอไรด์ (MG) ทำปฏิกิริยากับเมทานอล เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์กับกลีเซอโรล ดังนั้นในการผลิตไบโอดีเซล เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ จะสามารถควบคุมปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ ไม่ให้หลงเหลือในไบโอดีเซลเกินที่มาตรฐานกำหนดไว้



ที่มา: ธีญญารัตน์ และคณะ 2553.

## 2.6.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

### 2.6.1.1 การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดช้ากว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานมากกว่า 3 ชั่วโมงถึงจะเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์

กรดที่ใช้กันทั่วไปคือ กรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะทำให้ได้ผลผลิตคือ น้ำมันไบโอดีเซลในปริมาณมากแต่ปฏิกิริยาเกิดช้ามาก อาจใช้เวลามากกว่า 1 วันปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ แต่ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ใช้ได้กับกลีเซอรอลที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและน้ำในปริมาณสูงได้ เช่น น้ำมันที่ใช้แล้ว (Fukuda และคณะ 2005)

### 2.6.1.2 การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ซึ่งควรใช้ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือเอทานอล โดยน้ำมันที่ใช้จะเป็นชนิดใดก็ได้ เช่น น้ำมันดิบ หรือน้ำมันที่ใช้แล้วก่อนทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันควรเปลี่ยนจากรูปเบสไปเป็นในรูปของสารประกอบอัลคอกซี (Alcoxy) ก่อน

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อีกทั้งยังทำให้ได้ไบโอดีเซลปริมาณสูง (Ma และคณะ 1999) ส่วนข้อจำกัดตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสคือ น้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันดิบถ้ามีน้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระอยู่ในระบบของการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณมากจะทำให้มีสบู่เกิดขึ้นแทนที่จะได้น้ำมันไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ (Agarwal 2006)

### 2.6.1.3 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การนำไฮโดรไลติกส์เอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ แต่ในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันยังใช้เอนไซม์กันไม่แพร่หลาย ปัจจัยที่ศึกษาทั่วไปเช่น ตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของเอนไซม์ ปัจจัยเหล่านี้ต้องศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตามเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา และผลผลิตที่ได้ยังด้อยกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส

เอนไซม์ที่ใช้คือเอนไซม์ไลเปส มีข้อดีคือ เป็นปฏิกิริยาที่สามารถควบคุมได้ เกิดในสถานะไม่รุนแรงไม่มีสารพิษในของเสียจากปฏิกิริยาสามารถกำจัดกลีเซอรอลออกได้ง่าย และถ้าเป็นเอนไซม์ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่ข้อเสียคือราคาค่อนข้างแพง

## 2.6.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

สุวิมล (2553) ได้ศึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์กับเมทานอล โดยใช้โนโวไซม์ 435 ตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อผลิตไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอย่าง ต่อเนื่องด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เบดบรรจุผลการศึกษาพบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดของการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เบดบรรจุเป็นการบรรจุคอลัมน์แบบผสมโนโวไซม์ 435 และเม็ดแก้วอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลเป็น 1 : 1 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของสารละลายผสมของสารตั้งต้น เท่ากับ 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.5 กรัม โดยมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของปริมาณโนโวไซม์ 435 ต่อเม็ดแก้วเป็น 1 : 4 หลังจากนั้นทดสอบการผลิต ไบโอดีเซลโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เบดบรรจุ 3 คอลัมน์ ซึ่งกำหนดอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลเป็น 1 : 1 ในแต่ละคอลัมน์ โดยใช้ปัจจัยทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นเป็นปัจจัยควบคุม พบว่า สามารถผลิตไบโอดีเซลได้อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 83.33 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับปริมาตรรวมของสารละลายผสมของสารตั้งต้น 1 ลิตร โดยหลังจากทำปฏิกิริยาผ่านคอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 ให้ผลรวมของเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์โดยเฉลี่ย เท่ากับ 11.67, 16.25 และ 23.42 เปอร์เซ็นต์ และให้อัตราการผลิต เท่ากับ 0.1516, 0.1966 และ 0.2695 กรัมไบโอดีเซลต่อกรัมน้ำมันต่อกรัมเอนไซม์ต่อชั่วโมงตามลำดับ

Martha และคณะ (2013) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์จะดำเนินการในหลอดทดลองที่บรรจุสาร 170 มิลลิลิตรของน้ำมัน *S. incrasatulus* Novozym 435 ปริมาณ 39 มิลลิลิตร (23 เปอร์เซ็นต์) และอัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1 : 6 โมลาร์ ให้ความร้อนแก่น้ำมันจาก *S. incrasatulus* ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายร้อนใส่เอนไซม์ไป และเมื่อเริ่มเกิดปฏิกิริยาใส่สารละลายเมทานอลเข้าไปในระบบสารละลายเมทานอลที่ใส่เข้ามาใน 3 ขั้นตอนต่อเนื่อง (1ต่อ3 ของเวลาทั้งหมดในแต่ละครั้ง) เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งของเอนไซม์ (Shimada และคณะ 1999) ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่มีการกวนคงที่ 150 รอบต่อนาที หลังจากทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่กำหนดให้เก็บตัวอย่างมาผสมกับนอร์มอล-เฮกเซน (n-Hexan) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอนไซม์ Novozym 435 ออก นำเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAMES) มาทำการเจือจางเพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครโมโทกราฟี ผลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเป็นไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันสำหรับขนาดเล็กจะแสดงเป็นร้อยละน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAMES) กับร้อยละน้ำหนักของน้ำมัน การดำเนินการทดลองทั้งหมดได้ทำการทดลองหลายซ้ำ และมีรายงานผลเป็น  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ย

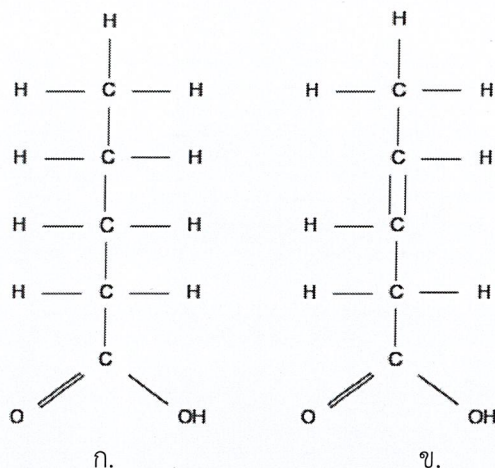
## 2.7 กรดไขมันและการวิเคราะห์กรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยมักจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 2 อะตอมขึ้นไป มีสูตรทั่วไป คือ  $R-COOH$  ลักษณะสูตรโครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เรียกว่าคาร์บอกซิล ( $COOH$ ) ซึ่งมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมตัวกันอยู่ อีกส่วนหนึ่งเรียกว่า ห่วงโซ่คาร์บอน ( $R$ ) โดยมีธาตุคาร์บอนยึดเหนี่ยวกันเป็นห่วงโซ่ โดยปกติธาตุคาร์บอนจะมีอยู่ 4 แขน แขนที่เหลือจากการจับธาตุคาร์บอนด้วยกันจะไปจับกับธาตุไฮโดรเจน กรดไขมันมีอยู่หลายชนิด ทุกชนิดจะมีหน่วยคาร์บอกซิลอยู่หนึ่งหน่วยเหมือนกัน ส่วนที่แตกต่างกันคือลักษณะทางเคมีในส่วนของโซ่คาร์บอน ทำให้กรดไขมันมีข้อแตกต่างกันไป

### 2.7.1 กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.7.1.1 กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated Fatty Acid) หมายถึง กรดไขมันที่คาร์บอนในโมเลกุลมีไฮโดรเจนจับเกาะอยู่เต็มที่แล้ว ไม่สามารถรับไฮโดรเจนหรือธาตุอื่นใดเข้าไปในโมเลกุลได้อีก โดยที่ห่วงโซ่คาร์บอน ( $R$ ) เท่ากับ  $C_nH_{2n+1}$  และ  $n$  เป็นตัวเลขที่แสดงถึงจำนวนคาร์บอนอะตอม กรดไขมันชนิดนี้พบมากในไขมันสัตว์ น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม

2.7.1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated Fatty Acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีคาร์บอนในโมเลกุลมีไฮโดรเจนน้อยกว่าชนิดอิ่มตัว โดยที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 2 อะตอมจับกันเองด้วยพันธะคู่ (=) การมีพันธะคู่ 1 แห่ง จะทำให้มีไฮโดรเจนน้อยลงกว่าชนิดอิ่มตัว 2 อะตอม การมีพันธะคู่อาจมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง กรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้พบมากในไขมันพืช ยกเว้นน้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม การมีพันธะคู่อยู่มากจะทำให้ไขมันเหม็นหืนได้ง่ายเมื่อตั้งทิ้งไว้ในอากาศ แต่พบว่าไขมันสัตว์มีกลิ่นเหม็นเร็วกว่าไขมันพืชทั้ง ๆ ที่ไขมันพืชมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่า ทั้งนี้เพราะไขมันพืชมีวิตามินอีซึ่งเป็นสารป้องกันการเติมออกซิเจนอยู่แล้วตามธรรมชาติ ตัวอย่างกรดไขมันชนิดนี้ ได้แก่ กรดไลโนเลอิก



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ ก. กรดไขมันชนิดอิ่มตัว ข. กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (ที่มา: <http://www.ipesp.ac.th/learning/biocheme/html/bt4.pdf>)

ตารางที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัว และแหล่งของอาหาร (ที่มา: <http://www.ipesp.ac.th/learning/biocheme/html/bt4.pdf>)

ชื่อกรดไขมันอิ่มตัว	สูตรโครงสร้าง	แหล่งอาหาร
กรดบิวทริก (Butyric acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$	เนย ( Butter fat )
กรดคาโปรอิก (Caproic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 \text{COOH}$	เนย (Butter fat )
กรดคาปริลิก (Caprylic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_6 \text{COOH}$	น้ำมันมะพร้าว (Coconut oil)
กรดคาปริก (Capric acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_8 \text{COOH}$	น้ำมันปาล์ม (Palm oil)
กรดลอริก (Lauric acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{10} \text{COOH}$	น้ำมันมะพร้าว ( Coconut oil)
กรดไมริสติก (Myristic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{12} \text{COOH}$	ไขมันสัตว์ เนย ( Animal fat ,Butter)
กรดปาล์มิติก (Palmitic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COOH}$	น้ำมันพืชและไขมันสัตว์ (Vegetable and Animal fat )
กรดสเตียริก (Stearic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{16} \text{COOH}$	น้ำมันถั่วลิสง
กรดอะราซิดิก (Arachidic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{18} \text{COOH}$	น้ำมันถั่วลิสง
กรดบีฮีนิก (Behenic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{20} \text{COOH}$	น้ำมันถั่วลิสง
กรดลิกโนซีริก (Lignoceric acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{22} \text{COOH}$	เนย ( Butter fat )

ขตารางที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัว จำนวนพันธะคู่ และแหล่งอาหาร (ที่มา: <http://www.ipesp.ac.th/learning/biocheme/html/bt4.pdf>)

ชื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว	สูตรโครงสร้าง	จำนวนพันธะคู่	แหล่งอาหาร
กรดปาล์มมิโอเลอิก (Palmitoleic acid)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	1	เนย (Butter fat)
กรดโอเลอิก (Oleic acid)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	1	น้ำมันมะกอก (Olive oil)
กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	2	น้ำมันลินซีด (Linseed oil)
กรดไลโนเลนิก (Linolenic acid)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	3	น้ำมันลินซีด (Linseed oil)
กรดอะราชิโดนิก (Arachidonic acid)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=(\text{CHCH}_2\text{CH})_3=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	4	เลซิทิน (Lecithin)

2.7.2 กรดไขมันอาจแบ่งโดยอาศัยคุณค่าทางโภชนาการเป็น 2 พวก คือ

2.7.2.1. กรดไขมันจำเป็น (Essential Fatty Acids) เป็นกรดไขมันที่ร่างกายสังเคราะห์เองไม่ได้ ต้องได้จากอาหารที่รับประทานเข้าไปเท่านั้น ส่วนมากมีในน้ำมันพืช กรดไขมันที่จำเป็นนั้นเป็นพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก กรดไขมันจำเป็นต่อร่างกายคนเรามีอยู่ 3 ชนิดคือ กรดไลโนเลอิก กรดไลโนเลนิก และกรดอะราชิโดนิก

2.7.2.2. กรดไขมันไม่จำเป็น (Non-essential Fatty Acid) เป็นกรดไขมันที่นอกจากจะได้จากอาหารแล้ว ร่างกายยังสามารถสังเคราะห์ได้เองด้วย กรดไขมันไม่จำเป็นนี้จะรวมกรดไขมันอิ่มตัวทุกชนิด และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยกเว้นกรดไขมันจำเป็นดังกล่าวข้างต้น

2.7.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์กรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก

Amini และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีการให้อากาศ และให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ซึ่งจากการสกัดไขมันทั้งหมดออกจากสาหร่ายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน โดยวิเคราะห์ ชนิดกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามี Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) หลายชนิด แต่พบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวปริมาณมาก ซึ่งเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่ คือ กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid methyl ester), กรดไมริสติก (Myristic acid methyl ester), กรดสเตียริก (Stearic acid methyl ester)

acid methyl ester) และกรดอะเดคคาโนอิก (Undecanoic acid methyl ester) ดังที่แสดงในตารางที่ 2 ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สาหร่ายสายพันธุ์นี้มีความเหมาะสมในการเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล และพบว่ามีชีวมวลทั้งหมด 1.9 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.3 ชนิดของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้มาจาก *Chlorella* sp.(ที่มา : Amini และคณะ 2011)

FAMES	ชื่อสามัญ	สูตร	ปริมาณ FAMES (ร้อยละทั้งหมด)
Methyl tetradecanoate	Methyl myristate	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	25.9
Methyl decanoate	Methyl caprate	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1.1
Methyl dodecanoate	Methyl lurate	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	5.9
Methyl undecanoate		C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	17.7
Methyl hexadecanoate	Methyl pamitate	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	23.6
Methyl heptadecanoate	Methyl margarate	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2.1
Methyl octadecanoate	Methyl sterrate	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	12.8
Methyl pentadecanoate		C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	6.3

Talebi และคณะ (2013) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพสายพันธุ์สาหร่ายสำหรับนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยนำสาหร่าย 6 สายพันธุ์ คือสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Dunallella* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. และสาหร่ายไดอะตอม *Amphora* sp. เพาะเลี้ยงในอาหาร Mah 202 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งในการวิเคราะห์จะเน้นที่กรดไขมันอิ่มตัว หลังจากการวิเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายแต่ละชนิด พบว่าสาหร่ายทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาสามารถผลิตกรดโอเลอิก (18:1) ได้ ยกเว้น *Amphora* sp. นอกจากนี้สาหร่ายทั้ง 6 สายพันธุ์ ยังสามารถที่จะผลิตโอเมก้า 3 ได้ ส่วนกรดปาล์มติก (14:0) สามารถพบได้ในสาหร่ายทุกชนิด แต่พบในปริมาณที่น้อยใน *Dunallella* sp. สาหร่ายที่สามารถสร้างกรดสเตียริก (18:0) สูงที่สุดคือ *Chlorella vulgaris* และ *Amphora* sp. กรดโอเลอิก (18:1) มีการสะสมใน *Dunallella* sp. และ *Chlorella vulgaris* กรดไลโนเลอิก (18:2) พบมากใน *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella salin* และจากการทดลองพบว่าไม่มีสาหร่ายสายพันธุ์ใดสามารถผลิตกรดอะราซิดิก (20:0) ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ชนิดของกรดไขมันในสาหร่ายแต่ละชนิดที่นำมาทดลอง (ที่ : Talebi และคณะ 2013)

สายพันธุ์สาหร่าย	กรดไขมัน (ร้อยละ)						
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	16.24	3.06	7.18	17.66	8.48	28.68	2.55
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	23.77	1.94	4.41	19.73	6.58	25.49	1.21
<i>Chlorella protothecoides</i>	16.15	-	6.63	19.23	7.02	29.17	2.35
<i>Chlorella salin</i>	21.50	2.62	7.83	14.39	10.88	29.75	1.50
<i>Chlorella vulgaris</i>	14.55	1.18	10.5	23.62	13.80	32.10	-
<i>Amphora</i> sp. (Persian Gulf)	28.61	38.16	12.6	-	3.86	4.55	-
<i>Dunaliella salina</i> (Shariati)	12.02	4.45	1.90	23.67	2.28	40.36	1.40
<i>Dunaliella salina</i> (UTEX)	16.33	1.03	6.43	19.57	6.76	27.70	2.28
<i>Scenedesmus</i> sp.	15.62	4.06	2.97	15.23	7.00	22.99	7.49
<i>Dunaliella</i> sp. (Persian Gulf)	9.19	0.08	4.27	22.51	3.84	44.31	1.42
<i>Chlorella emersonii</i>	14.75	-	9.80	17.01	9.04	29.32	2.74

Isik และคณะ (1999) ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus abundans* และ *Monoraphidium minutum* เพาะเลี้ยงในถังขนาดใหญ่ที่มีการบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Jaworski ซึ่งมีการให้อากาศโดยใช้ปั๊ม โดยไม่มีการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ 24 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ใช้คือ 3,600 วัตต์ ซึ่งจากการทดลองพบว่าสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดต่างดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง เถ้า ไขมัน และองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก (ที่มา : Isik และคณะ 1999)

องค์ประกอบของ สาหร่าย	สายพันธุ์สาหร่าย		
	<i>Scenedesmus abundans</i>	<i>Monoraphidium minitum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (ร้อยละ)	11.70	14.98	19.61
เถ้า (ร้อยละ)	0.58	1.58	1.19
ไขมัน (ร้อยละ)	9.22	10.28	17.30
14 : 0	0.47	0.52	0.16
16 : 0	6.30	10.65	20.42
18 : 0	3.40	19.08	9.80
18 : 2	1.58	4.65	18.57
18 : 3	3.07	15.38	26.76
20 : 0	ND	0.16	0.28
20 : 5	ND	ND	0.47
22 : 6	ND	ND	0.16
ผลรวมของกรดไขมัน (มิลลิกรัมต่อกรัม)	14.82	50.44	76.62

หมายเหตุ : ND หมายถึง ไม่ปรากฏ

Martha และคณะ (2013) การผลิตไบโอดีเซลผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันพืช (ไตรเอคิลกลีเซอรอล) กับเมทานอลเป็นส่วนผสมของเมทิลเอสเทอร์ของไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวโซ่ยาว (FAMES) Novozym 435 เอนไซม์ไลเปสจาก *C. Antarctica* ที่ได้รับการรับรองบนเรซินชนิด macroporous ซึ่งพบว่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดี และมีเสถียรภาพเมื่อเทียบกับเอนไซม์ไลเปสอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกได้ไปเป็นไบโอดีเซล (FAMES) ได้กำหนดเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน (6, 12 และ 24 ชั่วโมง) พบว่าผลต่างของ FAMES เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง  $67.9 \pm$  เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 6 ชั่วโมงของเวลาที่เกิดปฏิกิริยา แล้วช้ามากมีค่าสูงสุด  $71.7 \pm 0.3$  เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นต่อไป เวลาที่เกิดปฏิกิริยาจาก 6 ถึง 24 ชั่วโมงทำให้เกิดผลกระทบน้อยลงในการเปลี่ยนแปลงของน้ำมัน *S. incrustatus* ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าผลต่างของ FAMES สูงสามารถเกิดขึ้นได้ในเวลาที่เกิดปฏิกิริยาสั้นลง

ตารางที่ 2.6 แสดงองค์ประกอบของตัวอย่างไบโอดีเซลของสาหร่าย *Scenedesmus incrassatulus* (ที่มา : Martha T. และคณะ 2013)

เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน	ความเข้มข้นสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
Methyl myristate (C14:0)	0.93	0.84	0.48
Methyl palmitate (C16:0)	25.98	25.77	26.94
Methyl palmitoleate (C16:1)	3.14	3.22	3.37
Methyl margarate (C17:0)	1.36	1.33	1.43
Methyl stearate (C18:0)	4.55	4.19	4.39
Methyl oleate (C18:1)	48.54	48.37	48.89
Methyl linoleate (C18:2)	3.45	3.32	3.37
Methyl linolenate (C18:3)	3.68	3	2.82
Others	8.37	9.96	8.31
Saturated	32.82	32.13	33.24
Monounsaturated	51.68	51.59	52.26
Polyunsaturated	7.13	6.32	6.19

หลังจากที่เปลี่ยนแปลงไขมัน *S. incrassatulus* เป็น FAMES โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยเอโนไซม์ วิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอดีเซลที่ได้โดยแก๊สโครโมโทกราฟี (GC) เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAMES) ที่ผลิตไบโอดีเซลสำหรับปฏิกิริยา 3 ครั้ง (6, 12 และ 24 ชั่วโมง) มีการระบุไว้ในตารางที่ 2.6 พบว่า Palmitate (C16: 0), Palmitoleate (C16: 1), Stearate (C18: 0) Oleate (C18: 1), Linoleate (C18: 2) และ Linolenate (C18: 3) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญซึ่งคิดเป็น 88 เปอร์เซ็นต์ ของเมทิลเอสเทอร์ทั้งหมด รูปแบบของ FAMES ในไบโอดีเซลจากน้ำมัน *S. incrassatulus* บอกว่าชีวมวลนี้อาจเป็นวัตถุดิบที่ดีสำหรับการผลิตไบโอดีเซลเนื่องจากสัดส่วนที่สูงของเมทิลเอสเทอร์ของไขมันอิ่มตัวและไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (> 83 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งได้รับการพิจารณาว่าเหมาะสำหรับการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมันมีคุณสมบัติการไหลเวียนที่ดีกว่า โดยไม่ต้องสูญเสียเสถียรภาพการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรักษาค่าซีเทนในระดับที่ยอมรับ (Knothe 2009)

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการรายงานก่อนหน้านี้สำหรับน้ำมันจาก *Scenedesmus* sp. (Chen และคณะ 2012) *S. Obliquus* CNW-N (Ho และคณะ 2010, 2012) น้ำมัน *Scenedesmus* sp. LX1 การเพาะเลี้ยงด้วยแสงที่อุณหภูมิ (30 องศาเซลเซียส) (Li และคณะ 2011) และองค์ประกอบของ FAME จาก *Chlorella*

*protothecoides* โดยปฏิภิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida* sp. 99-125 (Li และคณะ 2007)

## 2.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงได้ และสามารถเจริญเติบโตได้ทุกที่ เช่น น้ำเสีย น้ำเกลือ โดยไม่จำเป็นต้องอยู่ในพื้นที่ที่มีความสมบูรณ์ ใช้สารอาหารได้น้อยกว่าแต่มีอัตราการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น นอกจากนี้องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายได้แก่ ไบโอมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ยังสามารถที่จะนำมาแปรรูปเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงและสารเคมีได้ โดย Demirbas (2011) รวบรวมสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มาแสดงในตารางที่ 2.7 ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงองค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 2.7 ร้อยละขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ (ที่มา : Demirbas 2011)

สายพันธุ์สาหร่าย	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไบโอมัน	กรดนิวคลีอิก
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas rheihardii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrical</i>	43-56	25-30	4-7	-

ชนิษฐา และคณะ (2547) ศึกษาปริมาณโปรตีนของสาหร่ายจำนวน 4 สายพันธุ์ คือสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* sp. และ *Kirchneriella* sp. สาหร่ายไดอะตอม *Navicula* sp. และ *Coccomyxa* sp. โดยใช้สูตรอาหาร f/2 เริ่มแรกเลี้ยงสาหร่ายแต่ละชนิดที่ความหนาแน่น  $1 \times 10^4$

เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ให้  
อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 3 ตลอด 24 ชั่วโมง โดยจะนับจำนวนเซลล์ทุกวัน พบว่า  
จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Coccomyxa* sp. มีปริมาณมากที่สุดรองลงมาได้แก่ *Chlorella* sp.

*Kirchneriella* sp. และ *Navicula* sp. โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ คือ  $240.27 \times 10^6$ ,  $239.35 \times 10^6$ ,  $68.98 \times 10^6$  และ  $1.09 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรของการเพาะเลี้ยงในวันที่ 10, 8, 10 และ 10  
ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสาหร่าย 4 ชนิด ในวันที่ 5, 7, 9, 12 และ 15 ของการ  
เลี้ยง พบว่าสาหร่ายที่ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ *Chlorella* sp. รองลงมาได้แก่ *Kirchneriella* sp.,  
*Coccomyxa* sp. และ *Navicula* sp. คือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 58.60, 53.35, 42.47 และ 11.25  
ของน้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 5, 5, 5 และ 9 ตามลำดับ

## บทที่ 3

# อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

### 3. วัสดุ และอุปกรณ์

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้

- 3.1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) (Super Clean, 120BS, Thailand)
- 3.1.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (TOMY, ES-315, Japan)
- 3.1.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (WTB binder, ED53, Germany)
- 3.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND, GF-800, Japan)
- 3.1.5 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 3.1.6 เครื่องผสมสาร (Vortex) (VORTEX – Genie 2, G560E, USA)
- 3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (HERMEL, Z326K, Germany)
- 3.1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10S UV-VIS, USA)
- 3.1.9 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter) (Takemura, DM -28, Japan)
- 3.1.10 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus, CH30, Japan)
- 3.1.11 สไลด์นับเซลล์ ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) (BOECO, deep 1 ต่อ 10 มิลลิเมตร, Germany)
- 3.1.12 เดซิคาเตอร์ (Desiccator) (DURAN, Vackuumfest, England)
- 3.1.13 คิวเวทท์ (Cuvette) (VWR, Germany)
- 3.1.14 ตัวต่อปรับปริมาตรอากาศ และตัวต่อสายยางแบบ 3 ทาง
- 3.1.15 กระจกตวง (Graduated cylinder) (VIT LAB, Germany)
- 3.1.16 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- 3.1.17 ไมโครปิเปต (Micropipette) (BRAND, Transferpette, Germany)
- 3.1.18 ขวดแก้วพร้อมฝาปิดขนาด 1 ลิตร
- 3.1.19 สายยางขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 03.1.4 เซนติเมตร
- 3.1.20 กระจกฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)
- 3.1.21 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares) (Pyrex, Germany)
- 3.1.22 เครื่องปั๊มอัดอากาศ (ปั๊มเล็ก) กำลังไฟ 58 วัตต์ แรงลม 70 ลิตรต่อนาที แรงดันลม 0.028 โมลпасคาล (Yamano, AP-40, china) และเครื่องปั๊มอัดอากาศ (ปั๊ม

ใหญ่) กำลังไฟ 47 วัตต์ แรงลม 70ต่อ40 ลิตรต่อนาที แรงดันลม 0.038/0.044

โมลปราศคาล (Atman, HP-80000, china)

3.1.23 เครื่อง Shimadzu Gas Chromatograph (GC-2014, China)

3.1.24 ขวดปรับปริมาตร (Pyrex, Germany)

3.1.25 Water bath

3.1.26 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporater) (Heidolph, Germany)

### 3.2 สารเคมีที่ใช้

3.2.1 อาหารสูตร BG-11 – สูตรอาหารเหลว (ภาคผนวก ก-1)

3.2.2 อาหารสูตร BG-11 – สูตรอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก-2)

3.2.3 เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 95

3.2.4 ซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 98

3.2.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

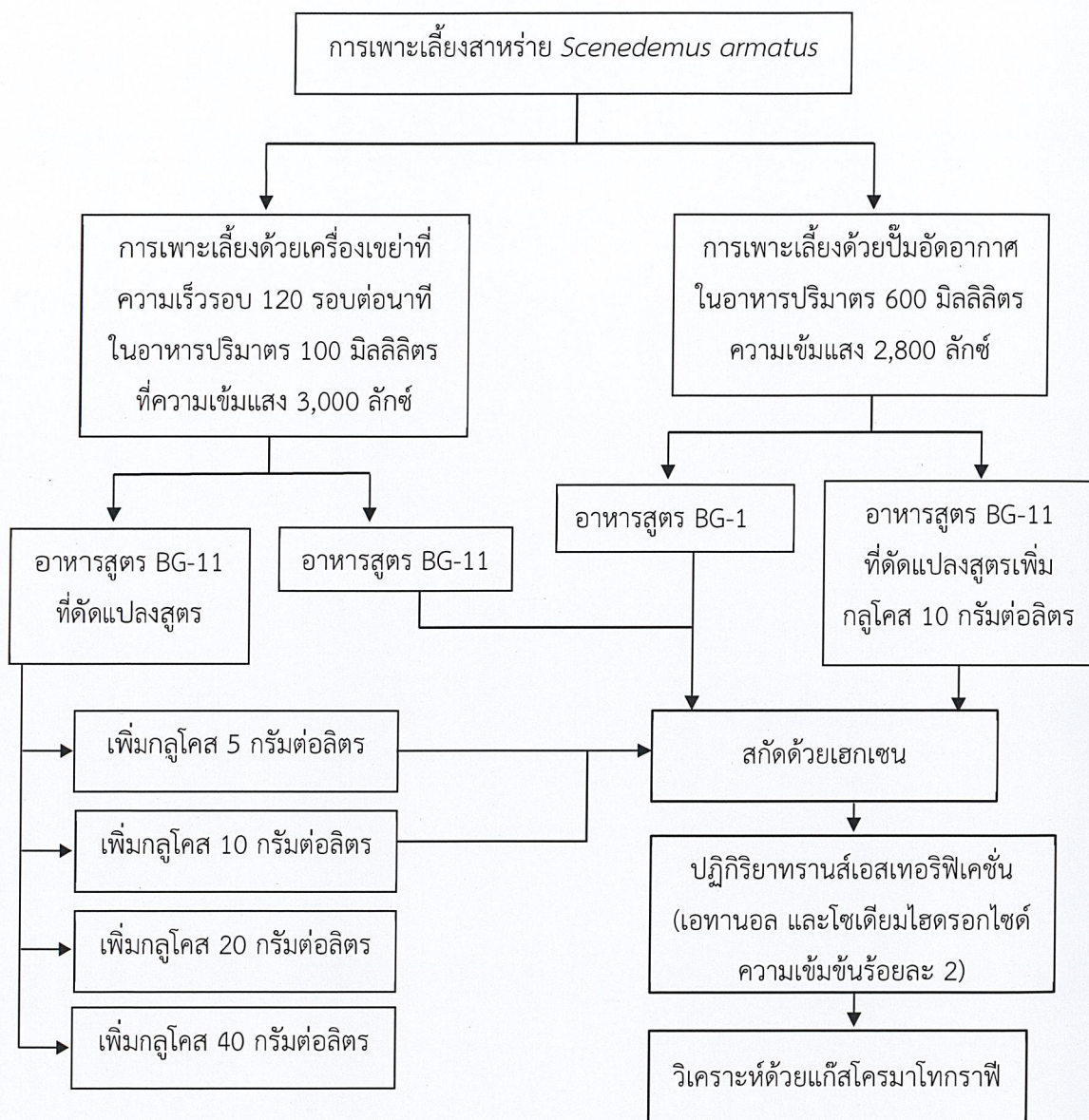
3.2.6 กลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ )

3.2.7 ฟีนอล (Phenol)

3.2.8 เฮกเซน (Hexane)

3.2.9 น้ำกลั่น

## 3.3 แผนผังแสดงการทดลอง



## 3.4 วิธีการทดลอง

## 3.4.1 การเตรียมอาหารแข็ง BG-11 ในหลอดเอียง

3.4.1.1 เติมหาตุอาหารสูตรดังกล่าวลงในน้ำกลั่น

3.4.1.2 เติมวุ้นลงไปตามสูตรอาหาร (ภาคผนวก ก-2)

3.4.1.3 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3.4.1.4 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้สารละลาย HCl 0.1 โมล และ NaOH 0.1 โมล

- 3.4.1.5 ทำให้วุ้นละลายโดยการอุ่นในไมโครเวฟ
- 3.4.1.6 ใช้ปิเปตดูดอาหารลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยจุกสำลี
- 3.4.1.7 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยไอน้ำที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 3.4.1.8 รอให้อาหารเย็นลงเล็กน้อย จากนั้นเอียงหลอดอาหาร โดยให้ด้านบนของหลอดสูงกว่าด้านล่างหลอดเล็กน้อย เพื่อให้มีบริเวณพื้นผิวหน้าของอาหารมากขึ้น
- 3.4.1.9 ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารในหลอดเย็นตัวลงจนแข็ง
- 3.4.1.10 ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อทดสอบว่าอาหารไม่มีการปนเปื้อน
- 3.4.1.11 เก็บอาหารไว้ในที่สะอาด สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

### 3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อในอาหาร BG-11

- 3.4.2.1 นำหลอดอาหารที่ไม่มีการปนเปื้อนมาถ่ายเชื้อในตู้ถ่ายเชื้อ ที่มีการเปิดยูวีทิ้งไว้แล้ว 30 นาที
- 3.4.2.2 นำหลอดอาหารที่มีเชื้อขึ้นและไม่มีการปนเปื้อน มาทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (เพียงหนึ่งโคโลนีต่อหนึ่งหลอดอาหาร) เพื่อถ่ายลงในหลอดอาหารเอียงด้วยเทคนิค Simple streak
- 3.4.2.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 26-30 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 1600-1800 ลักซ์ ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานหลายสัปดาห์หรืออาจเป็นเดือนๆ หรืออาจจะเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่ำๆ เพื่อให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโตทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น



รูปที่ 3.1 การเก็บรักษาเชื้อด้วยเทคนิค Simple Streak

### 3.4.3 การเตรียมอาหารเหลว BG11 เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์

- 3.4.3.1 เดิมธาตุอาหารสูตรดังกล่าวลงในน้ำกลั่น (ภาคผนวก ก-1)

- 3.4.3.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร
- 3.4.3.3 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้สารละลาย HCL 0.1 โมล และ NaOH 0.1 โมล
- 3.4.3.4 บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากพลาสติกด้วยจุกสำลี
- 3.4.3.5 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
- 3.4.3.6 ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อทดสอบว่าอาหารไม่มีการปนเปื้อน
- 3.4.3.7 เก็บอาหารไว้ในที่สะอาด สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### 3.4.4 การลงเชื้อในพลาสติกอาหารเหลว

- 3.4.4.1 นำพลาสติกอาหารเหลว ที่ไม่มีการปนเปื้อนมาถ่ายเชื้อในตู้ถ่ายเชื้อ ที่มีการเปิดยูวีไว้แล้ว 30 นาที
- 3.4.4.2 ใช้เข็มเชื้อเชื้อปลายกลม เชื้อเชื้อจากหลอดอาหารเอียง BG11 ที่มีเชื้อเจริญอยู่และไม่มีการปนเปื้อน แล้วใส่ลงหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน
- 3.4.4.3 จากนั้นทำการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และดูดเชื้อให้มีเซลล์เริ่มต้น  $10^5$ - $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิตร ลงในพลาสติกอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 3.4.4.4 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ 28-30 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ใช้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ บ่มไว้ให้เชื้อเจริญขึ้นใน พลาสติกอาหารเหลว

#### 3.4.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* โดยใช้เครื่องเขย่า

- 3.4.5.1 นำพลาสติกที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
- 3.4.5.2 เปิดแสงยูวีของตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนการใช้งานในขั้นต่อไป
- 3.4.5.3 เติมหาอาหารสูตร BG11 ที่เตรียมไว้แล้ว ลงในพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหาร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสตามความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ
- 3.4.5.4 ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ ลงในพลาสติก
- 3.4.5.5 ปิดปากพลาสติกด้วยจุกสำลี

- 3.4.5.6 นำพลาสติกวางลงในเครื่องเขย่า เปิดเครื่องให้เครื่องเริ่มทำงานที่ 120 รอบ ต่อนาที
- 3.4.5.7 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 26-30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์
- 3.4.5.8 ทำการตรวจผลการเจริญทุกๆ 2 วัน ด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การหาปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส และนำค่าที่ได้มาเขียนผลกราฟ



รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะเขย่า

#### 3.4.6 การวัดอากาศ

- 3.4.6.1 ปรับหัวจ่ายอากาศจากนั้นทำการจับเวลาเพื่อดูว่า ในระยะเวลาเท่าไรที่จะทำให้น้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรลดลงจนหมด
- 3.4.6.2 นำสายยางจ่ายอากาศใส่ลงในถังน้ำ และนำกระบอกตวงปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใส่น้ำให้เต็ม (ห้ามมีอากาศหลงเหลืออยู่) แล้วคว่ำใส่ลงในถังน้ำที่เตรียมไว้ จากนั้นนำสายยางจ่ายอากาศใส่เข้าไปในกระบอกตวงปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเริ่มจับเวลาไปจนกระทั่งน้ำในกระบอกตวงลดลงจนหมด จึงทำการหยุดเวลา และจดบันทึกการทดลอง

#### 3.4.7 การนับ และวัดฟองอากาศ

- 3.4.7.1 นำน้ำใส่ขวดโหลเพาะเลี้ยง (ประมาณครึ่งหนึ่งของภาชนะเพาะเลี้ยง) จากนั้นนำสายยางจ่ายอากาศใส่ลงไปในขวดโหลเพาะเลี้ยง
- 3.4.7.2 นำกล้องมาอัดวิดีโอทิ้งไว้ เป็นเวลา 30 นาที
- 3.4.7.3 ทำการนับฟองอากาศจากวิดีโอที่อัดไว้ (ภาคผนวก ข-2)
- 3.4.7.4 จากนั้นทำการถ่ายรูปสภาพฟองอากาศจากวิดีโอที่อัดไว้ (20 รูป)
- 3.4.7.5 วัดฟองอากาศที่ได้ (กว้าง × ยาว) จากนั้นนำไปหาพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 การนับ และวัดฟองอากาศ

### 3.4.8 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในขวดโหลแบบปัมอัดอากาศ

- 3.4.8.1 นำขวดโหลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
- 3.4.8.2 เปิดแสงยูวีของตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนการใช้งานในขั้นต่อไป
- 3.4.8.3 เติมหอาหารสูตร BG11 ที่เตรียมไว้แล้ว ลงในขวดโหลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหาร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้วโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสตามความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร
- 3.4.8.4 ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ ลงในขวดโหล
- 3.4.8.5 ต่อสายยางจ่ายอากาศที่ฝาปิดขวดโหล (ที่ประดิษฐ์ขึ้น) นำไปต่อกับปัมอัดอากาศที่อัตราการไหลของอากาศ 190 มิลลิลิตรต่อนาที
- 3.4.8.6 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 26-30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์
- 3.4.8.7 ทำการตรวจผลการเจริญทุกๆ 2 วัน ด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การหาปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส และนำค่าที่ได้มาเขียนผลกราฟ



รูปที่ 3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่มีการให้อากาศในขวดโหล (รูปซ้าย) และการให้อัตราการไหลของอากาศ (รูปขวา)

### 3.4.9 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

- 3.4.9.1 นำหลอดเซนตริฟิวส์ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวางไว้ในเดซิเคเตอร์ 15 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักหลอดเซนตริฟิวส์ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.4.9.2 เก็บตัวอย่างเซลล์สำหรับปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยง แล้วรินส่วนใสทิ้ง
- 3.4.9.3 เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงเหมือนใน 3.4.8.2 ทำซ้ำสองครั้งเพื่อเป็นการล้างเซลล์
- 3.4.9.4 นำหลอดไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน
- 3.4.9.5 นำหลอดเซนตริฟิวส์ที่อบแห้งแล้วใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาที
- 3.4.9.6 ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.4.9.7 รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Minicentrifuge) (รูปซ้าย) และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (รูปขวา)

### 3.4.10 การนับจำนวนเซลล์ (Cell Counting : Hemacytometer) (ดัดแปลงจากกิตติคุณ และคณะ 2554)

- 3.4.10.1 ทำการเก็บตัวอย่างสำหรับ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 3.4.10.2 หยดตัวอย่างสำหรับลงบนสไลด์นับเซลล์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
- 3.4.10.3 การนับจำนวนเซลล์แบ่งการนับออกเป็น 2 แบบคือ
  - การนับเซลล์ภายในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่จะทำการนับ 4 ช่อง (ช่อง 1, 2, 3, และ 4 ในรูปที่ 3.8) แล้วนำค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคูณด้วย  $\frac{1}{4} \times 10^4$  จากนั้นได้ปริมาตรเซลล์ของสำหรับในหน่วย เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์สำหรับ 2 ตาราง ดังรูปที่ 3.6 บริเวณวงกลมสีแดงทั้ง 2 วง สมมตินับได้ n และ m เซลล์

การรายงาน คือ  $\frac{n+m}{2} \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เช่น จำนวนเซลล์ของ *Scenedesmus armatus* จากสไลด์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (นับทั้ง 25 ช่อง) ทั้ง 2 ตาราง ได้ค่าดังนี้ นับครั้งที่ 1 = 68 เซลล์ และครั้งที่ 2 = 91 เซลล์

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น จำนวนเซลล์} &= \frac{68+91}{2} \times 10^4 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \\ &= 79.5 \times 10^4 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

- การนับเซลล์ภายในช่องสี่เหลี่ยมเล็กจะทำการนับ 5 ช่อง (ช่อง A, B, C, D และ F ในรูปที่ 3.8) แล้วนำค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้มาเฉลี่ยให้เหลือเพียง 1 ช่องเล็ก จากนั้นนำไปคูณด้วย  $\frac{1}{4} \times 10^6$  จากนั้นได้ปริมาตรเซลล์ของสาหร่ายในหน่วย เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือคำนวณปริมาณสาหร่ายจากสูตร

$$\text{ปริมาณมิลลิลิตร}^{-1} = \frac{c \times 1000 \text{ มม.}^3}{A \times D \times F}$$

เมื่อ  $C =$  จำนวนสาหร่ายที่นับได้  
 $A =$  พื้นที่ของ grids เท่ากับ 0.04 มิลลิเมตร<sup>2</sup>  
 $D =$  ความลึกของพื้นที่ที่นับ เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร  
 $F =$  จำนวนช่องหรือตารางที่นับ

**หมายเหตุ** เหมาะสำหรับสาหร่ายที่เป็นพวกเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก และไม่สามารถนับพวกที่อยู่เป็นโคโลนีได้

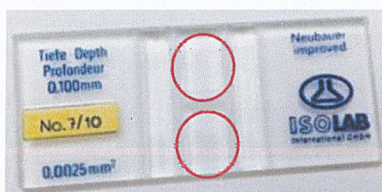
- ถ้าเซลล์สาหร่ายทับเส้นให้เลือกนับแบบใดแบบหนึ่งต่อไปนี้ ทับเส้นแนวนอน และเส้นแนวขวาให้นับ (ซ้าย-ล่าง ไม่นับ) หรือทับเส้นแนวล่าง และเส้นแนวซ้ายให้นับ (ขวา-บน ไม่นับ)

3.4.10.4 จากนั้นบันทึกผลการทดลอง นำจำนวนเซลล์ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่ทำการเพาะเลี้ยงกับจำนวนเซลล์ เพื่อวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

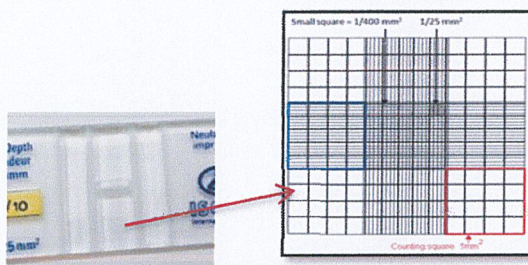
ข้อเสนอแนะ และการเลือกวิธีนำจำนวนเซลล์

1. การเลือกนับช่องใหญ่จะให้ค่าที่แม่นยำกว่าการเลือกนับด้วยช่องเล็กเนื่องจากช่องมีพื้นที่มากกว่า
2. สาหร่ายบางชนิดที่เป็นเส้นสายหรือมีขนาดใหญ่มาก จำเป็นต้องนับด้วยช่องใหญ่ เนื่องจากหากนับด้วยช่องเล็กเส้นสายของสาหร่ายมักจะเลยขอบช่องเล็ก
3. หากสาหร่ายมีความหนาแน่นต่ำควรเลือกนับด้วยช่องใหญ่

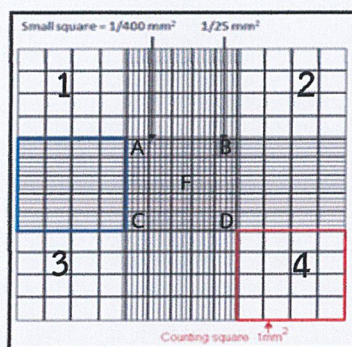
4. ในกรณีที่ต้องการสำหรัยที่นับมีความหนาแน่นสูงมาก การนับช่องใหญ่อาจใช้เวลามากก็สามารถเลือกนับช่องเล็กได้



รูปที่ 3.6 ลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของสไลด์นับเซลล์ (Hemacytometer)



รูปที่ 3.7 ตารางที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์จากภาพจริง และที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ที่มา: <http://dtc.pima.edu/blc/181/Lessons/L3/3step3/3step3page7a.htm>)



รูปที่ 3.8 บริเวณที่ใช้ับจำนวนเซลล์ (ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่คือ 1, 2, 3 และ 4 กับบริเวณที่ใช้ับจำนวนเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมเล็กคือ A, B, C, D และ F)

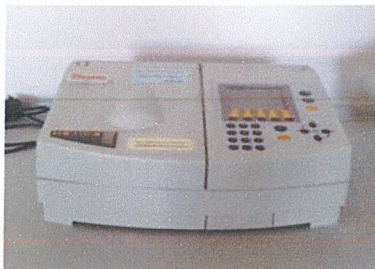
(ที่มา: <http://dtc.pima.edu/blc/181/Lessons/L3/3step3/3step3page7a.htm>)

### 3.4.11 การวัดผลการเจริญด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.4.11.1 นำตัวอย่างสำหรัยที่ต้องการวัดค่าการดูดกลืนแสงใส่ในควิวเวทท์

3.4.11.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (ขจรเกียรติ 2550)

3.4.11.3 บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้



รูปที่ 3.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

ชุดินันท์ และคณะ (2552) การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างใส่คิวเวทท์ (Cuvette) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จากนั้นบันทึกผลการทดลอง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่ทำการเพาะเลี้ยงกับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

#### 3.4.12 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-Sulfuric Method)

3.4.12.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 มิลลิลิตร

3.4.12.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยกรดลงที่ข้างหลอด

3.4.12.3 ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที จะเห็นสีน้ำตาลกลูโคสเป็นสีส้ม ดังแสดงในรูป 3.10

3.4.12.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัตต์ที่มีความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ส่วนน้ำตาลเพนโทส และกรดยูโรนิกนั้นวัดที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

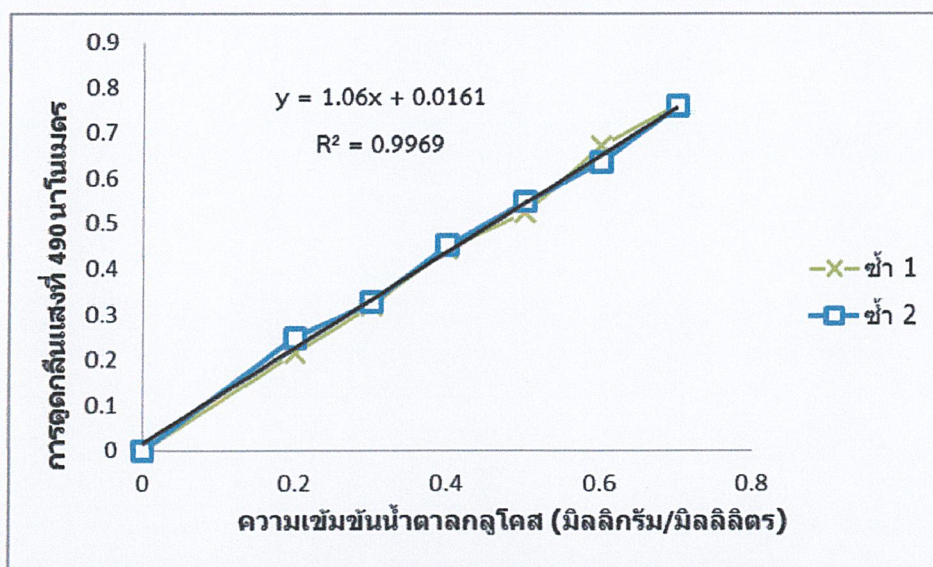
3.4.12.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเขียนกราฟกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 3.10 เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง



รูปที่ 3.10 สีของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานหลังจากผ่านวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก

ตารางที่ 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

น้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
0	0	0
0.2	0.215	0.250
0.3	0.319	0.328
0.4	0.445	0.453
0.5	0.525	0.549
0.6	0.671	0.636
0.7	0.762	0.759



รูปที่ 3.11 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน มีค่าความชัน  $x = (y - 0.0161)/1.06$

#### 3.4.12.6 คำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน})}$$

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารสูตร BG-11 ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร = 0.543

อัตราการเจือจาง = 50

$$\text{ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน} \quad x = \frac{y - 0.0161}{1.06}$$

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} &= \frac{(0.543 - 0.0161) \times (50)}{1.06} \\ &= 24.854 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

### 3.4.13 การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย

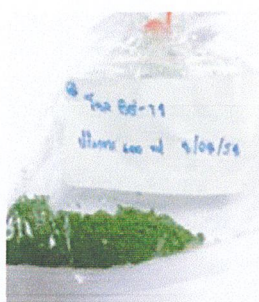
3.4.13.1 นำสาหร่ายที่พร้อมเก็บเกี่ยว ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.4.13.2 เทสารละลายใสส่วนบนออก นำส่วนเซลล์ของสาหร่ายใส่ภาชนะที่เตรียม และนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.12 สาหร่ายหลังจากผ่านการ Centifuge (รูปซ้าย) และตู้เก็บรักษาตัวอย่างสาหร่ายที่อุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส (รูปขวา)

3.4.13.3 นำตัวอย่างจากข้อที่ 3.4.13.2 ไปเข้าเครื่อง freeze dry เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดน้ำมันสาหร่ายต่อไป

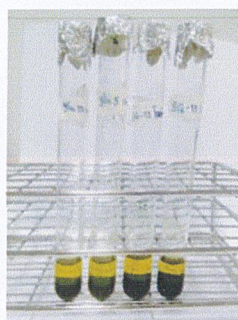


รูปที่ 3.13 ลักษณะของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ผ่านขั้นตอนการ Freeze dry แล้ว

#### 3.4.14 การสกัดน้ำมันสาหร่าย และกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

3.4.14.1 นำสาหร่ายที่ผ่านขั้นตอนการ Freeze dry แล้ว 0.3 กรัม

3.4.14.2 ใส่ตัวทำละลายเฮกเซน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในสาหร่ายในข้อที่ 3.4.14.1 ที่ตั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที



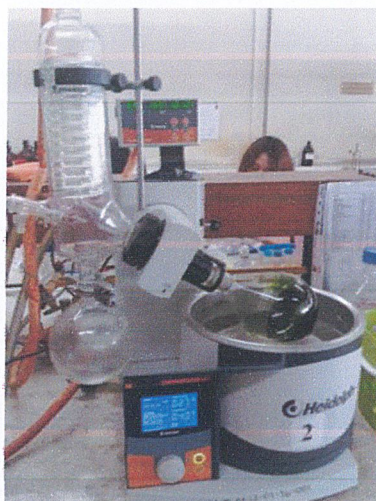
รูปที่ 3.14 การสกัดสาหร่าย *Scenedesmus armatus* โดยใช้เฮกเซน

3.4.14.3 ทำการกรองแยกกากและของเหลวออกจากกัน (ใช้กระดาษเบอร์ 1 จำนวน 2 ชั้น) และนำกากที่เหลือจากการกรองไปอบแห้งซ้ำ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.15 น้ำมันสาหร่ายที่ละลายในเฮกเซนหลังจากผ่านการกรองแล้ว

- 3.4.14.4 นำของเหลวที่กรองได้ไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ทำการ  
จัดบันทึกปริมาณที่ได้ จากนั้นนำเข้ากระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน
- 3.4.14.5 นำเอทานอลใส่ลงในน้ำมันสำหรับที่ได้จากข้อ 3.4.14.4 ในอัตราส่วน  
10:1 (เอทานอล:น้ำมันสำหรับ)
- 3.4.14.6 จากนั้นใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 และ 2 โดยน้ำหนัก ลงไปใน  
ของเหลวที่ได้จากข้อ 3.4.14.5
- 3.4.14.7 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิที่ 70–80 องศาเซลเซียส เพื่อทำปฏิกิริยา  
และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 60–90 นาที
- 3.4.14.8 นำมาล้างด้วยน้ำอุ่น จนน้ำล้างที่ได้มี พีเอช 7
- 3.4.14.9 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยน้ำออกจนหมด
- 3.4.14.10 นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี
- 3.4.15 การระเหยสารสกัดจากสำหรับด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน
- 3.4.15.1 เติมน้ำลงไปในอ่างให้ความร้อน
- 3.4.15.2 เปิด สวิตซ์ ส่วนให้ความร้อน ในส่วนของอ่างให้ความร้อน ตั้งค่าอุณหภูมิ  
ตาม ต้องการ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับ ชนิดตัวทำละลายที่ต้องการระเหยออก
- 3.4.15.3 เปิด สวิตซ์ ส่วนควบคุมอุณหภูมิภายในระบบ ตั้งค่าอุณหภูมิล้อเย็นของ  
เฮกเซนที่ต้องการระเหยออก
- 3.4.15.4 เมื่อได้อุณหภูมิตามต้องการให้ใส่ตัวอย่างสำหรับลงไปใน Evaporating  
flask ซึ่งจะอยู่ในส่วนให้ความร้อน โดยปากขวดจะต่อกับส่วนหมุน ส่วนกัน  
ขวดจุ่มอยู่ในอ่างให้ความร้อน
- 3.4.15.5 เปิดสวิตซ์ ส่วนหมุน จากนั้นปรับอัตราการหมุน
- 3.4.15.6 เปิดสวิตซ์ ส่วนทำสุญญากาศ pump เริ่มทำงาน
- 3.4.15.7 เปิดสวิตซ์ ชุดควบคุมความดันแบบอิเล็กทรอนิกส์ ตั้งค่าความดัน โดย set  
ค่าได้จากหน้าจอที่ปรากฏ โดยการตั้งค่าความดันจะขึ้นอยู่กับชนิดตัวทำ  
ละลายที่ต้องการระเหยออก จากนั้นสั่ง start จากปุ่มหน้าจอ
- 3.4.15.8 เมื่อเฮกเซนระเหยได้ตามที่ต้องการ ให้เอาสารออกจาก Evaporating  
flask และนำเฮกเซนที่ระเหยออกมาได้ใน Receiving flask ไปเก็บไว้ใช้  
ในงานอื่นๆต่อไป และเทน้ำในอ่างที่ให้ความร้อนทิ้งไป
- 3.4.15.9 ปิดระบบ โดยปิดระบบย้อนศรกลับจากวิธีการเปิดระบบ



รูปที่ 3.16 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator)

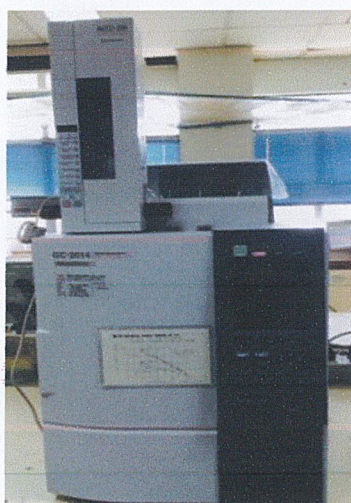
### 3.4.16 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Shimadzu GC-2014)

3.4.16.1 เปิดเครื่อง GC โดยเริ่มต้นจากการเปิดป้้ม เปิดแก๊สไฮโดรเจน ไนโตรเจน และฮีเลียม เปิดตัวเครื่อง GC คอมพิวเตอร์ และสุดท้ายเปิดโปรแกรม Lab solutions lite จากนั้นกำหนดสภาวะดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography Condition)

สภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟี	Shimadzu Gas Chromatograph (GC-2014, China)
คอลัมน์ (Column)	DB-WAX 122-7032 ยาว 30 เมตร กว้าง 0.25 มิลลิเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิ (Temperature Program)	<p>ขณะฉีด : 100 องศาเซลเซียส</p> <p>ของตัวอย่าง : เริ่มต้นคงสภาวะที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นจนถึง 180 องศาเซลเซียสในเวลา 10 นาที สภาวะคงที่เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นจนถึง 240 องศาเซลเซียสในเวลา 4 นาที สภาวะคงที่เป็นเวลา 7 นาที ใช้ระยะเวลารวม 35 นาที</p> <p>ขณะวิเคราะห์ : 240 องศาเซลเซียส</p>
วิธีการฉีด (Injection Mode)	<p>วิธี : Splitless</p> <p>ปริมาตรตัวอย่าง : 1 ไมโครลิตร</p> <p>อัตราการฉีด : 5</p>
แก๊สพา (Carrier Gas)	ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และฮีเลียม

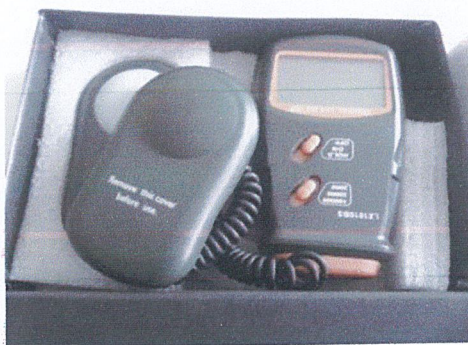
- 3.4.16.2 นำสารตัวอย่างใส่ลงในขวด Vial และกด System on (สั่งฉีดตัวอย่าง)
- 3.4.16.3 หลังจากวิเคราะห์ครบทุกตัวอย่างแล้ว ให้ทำการให้ความร้อนแก่คอลัมม์ เพื่อเป็นการทำความสะอาดสารของเราที่อาจตกค้างอยู่ออกไป โดยให้ตั้งอุณหภูมิสูงสุดที่ใช้ในการวิเคราะห์คอลัมม์เป็นเวลา 20-30 นาที เมื่อครบเวลาให้กด System off เพื่อหยุดการให้ความร้อน จากนั้นให้ปิดปั๊ม และแก๊สไฮโดเจนก่อน แต่ยังไม่สามารถปิดเครื่อง GC ได้ ต้องรอให้อุณหภูมิของคอลัมม์ ตู้อบ และดีเทคเตอร์ อยู่ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียสระหว่างที่รออุณหภูมิลงให้ทำการล้างเข็มฉีดสารตัวอย่างด้วยน้ำอูตราเพรียว หลังจากนั้นให้ปิดเครื่อง GC คอมพิวเตอร์ แก๊สไนโตรเจน และฮีเลียม ตามลำดับ



รูปที่ 3.17 ลักษณะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)

### 3.4.17 การวัดแสงด้วยลักซ์มิเตอร์ (lux Meter light Meter)

- 3.4.17.1 เปิดเครื่อง นำเครื่องลักซ์มิเตอร์วางตำแหน่งที่ต้องการจะวัดแสง อ่านตัวเลขที่ขึ้นบนหน้าจอ
- 3.4.17.2 ทำการวัดให้ครบทุกตำแหน่ง และจดบันทึก (ภาคผนวก ข-3)



รูปที่ 3.18 อุปกรณ์วัดแสง (ลักซ์มิเตอร์)

### 3.4.18 การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, $\mu$ ) (ยศวดี 2547)

ถ้าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เป็นอัตราที่เซลล์แบ่งตัว มีค่าเท่ากับจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นหารด้วยเวลา ถ้าหากไม่มีการตายเกิดขึ้นเลยปริมาณในการสะสมในการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ที่ระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase) จะได้ดังสมการ

$$\mu = \frac{\ln (N/N_0)}{t}$$

เมื่อ  $\mu$  = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

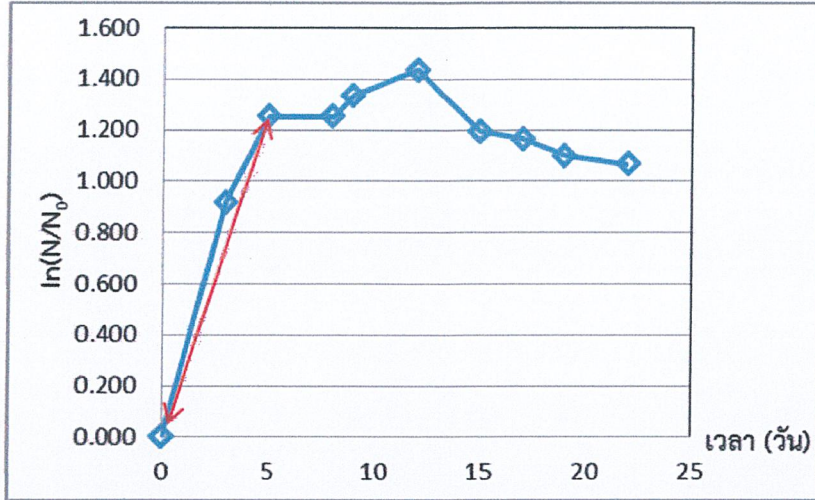
$N$  = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

$N_0$  = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันสุดแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

$t$  = เวลา (วัน)

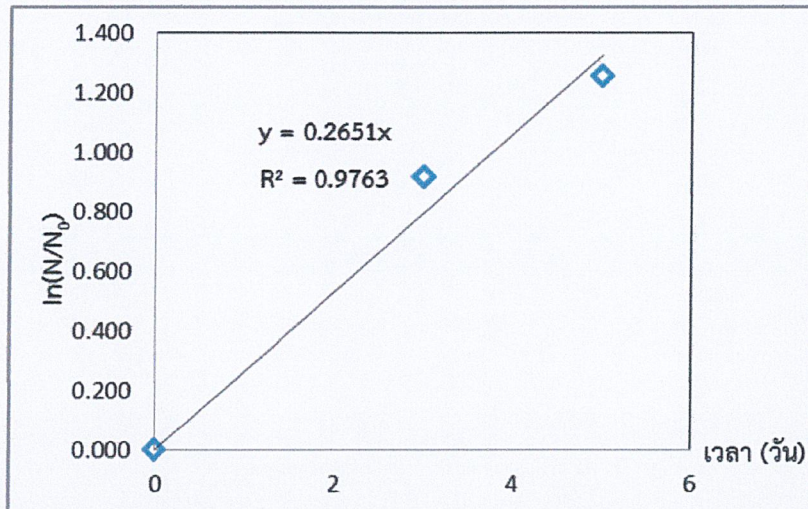
3.4.18.1 นำค่าการนับเซลล์สาหร่ายที่นับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ที่บันทึกไว้มาเปลี่ยนเป็นค่า  $\ln (N/N_0)$  และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $\ln (N/N_0)$  กับวันที่เก็บตัวอย่างใน Microsoft excel

3.4.18.2 แล้วเลือกค่าที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase) ดังรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $\ln(N/N_0)$  กับวันที่เก็บตัวอย่าง บริเวณลูกศรสีแดงคือค่าที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase)

- 3.4.18.3 เขียนกราฟเฉพาะค่าที่เลือก จนได้เป็นกราฟเส้นตรง ให้เพิ่มจัดรูปแบบเส้นแนวโน้ม เลือกเชิงเส้น แสดงจุดตัดบนแกน สมการบนแผนภูมิ และค่า R-squared บนแผนภูมิ ดังรูปที่ 3.20



รูปที่ 3.20 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate,  $\mu$ ) คือ 0.2651

### 3.5 สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

สาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus armatus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชากรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

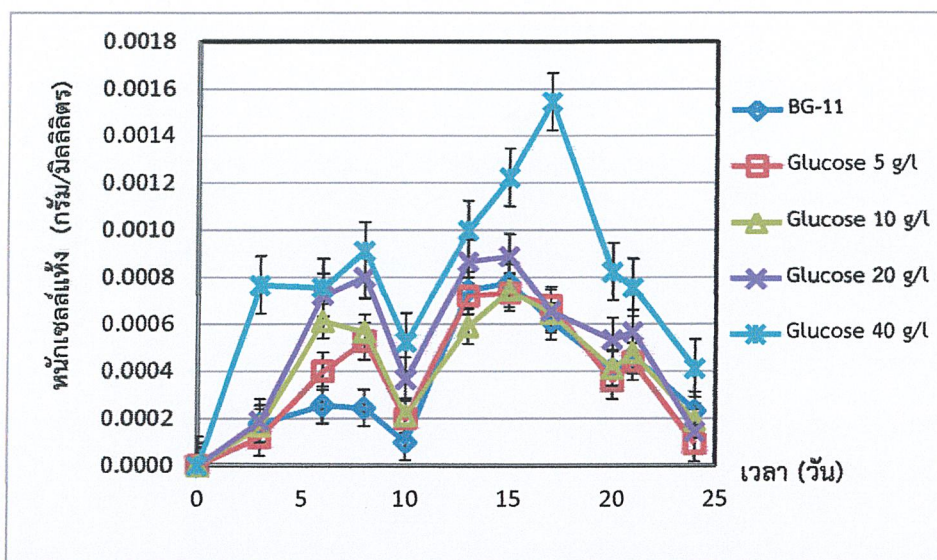
### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 สภาวะเขย่าและการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedenmus armatus*

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ทำการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้เซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (หัวเชื้อ)  $10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 11 กุมภาพันธ์-6 มีนาคม 2558 รวม 24 วัน และนำไปวัดการเจริญเติบโตได้ผลดังนี้ การวัดโดยวิธีการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

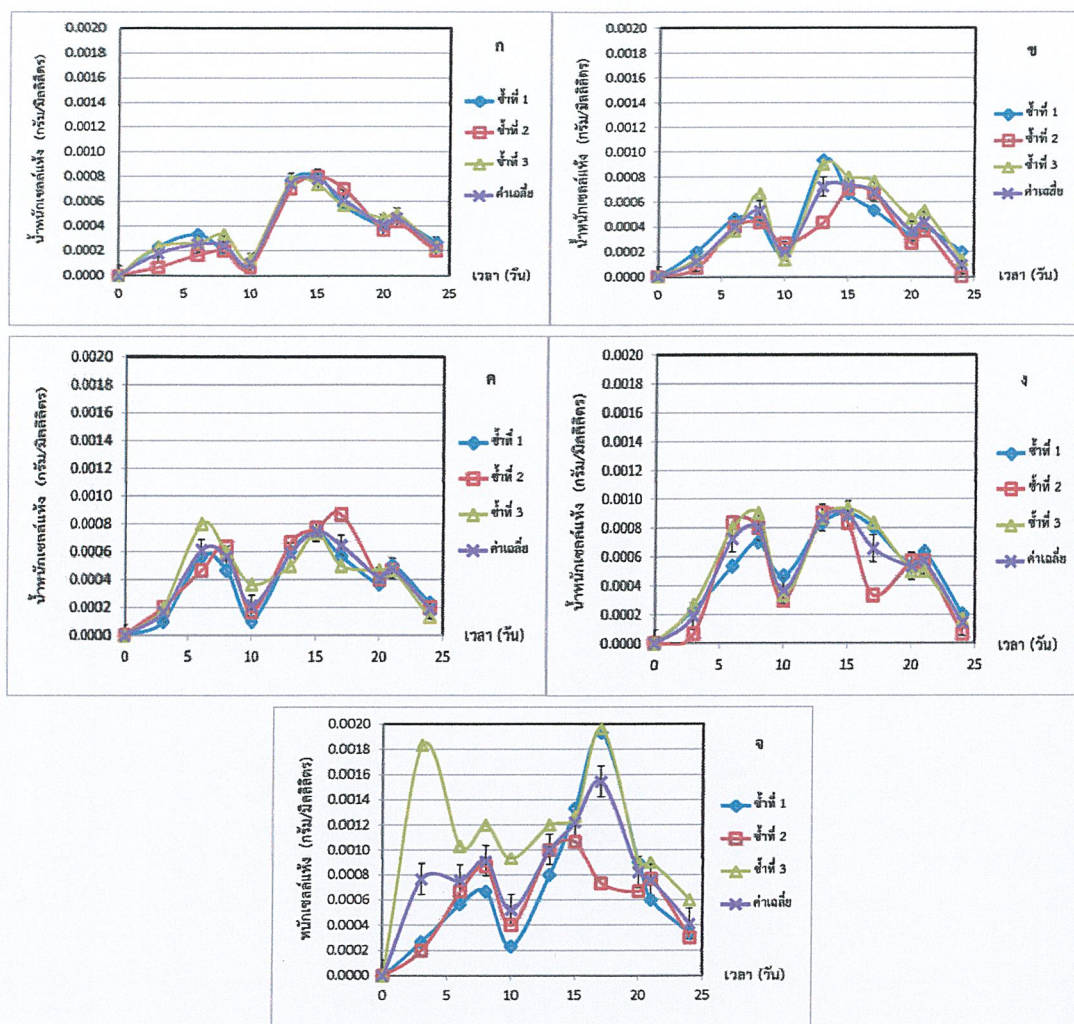
วันที่เก็บ	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อมิลลิลิตร)				
	BG-11	Glucose 5 g/l	Glucose 10 g/l	Glucose 20 g/l	Glucose 40 g/l
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	0.0002	0.0001	0.0002	0.0002	0.0008
6	0.0003	0.0004	0.0006	0.0007	0.0008
8	0.0002	0.0005	0.0006	0.0008	0.0009
10	0.0001	0.0002	0.0002	0.0004	0.0005
13	0.0007	0.0007	0.0006	0.0009	0.0010
15	0.0008	0.0007	0.0007	0.0009	0.0012
17	0.0006	0.0007	0.0006	0.0007	0.0015
20	0.0004	0.0004	0.0004	0.0005	0.0008
21	0.0005	0.0004	0.0005	0.0006	0.0008
24	0.0002	0.0001	0.0002	0.0001	0.0004



รูปที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 6 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะหนึ่งในทุกสูตรอาหาร และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงแล้ว ที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น 20, 10, 5 กรัมต่อลิตร และ BG-11 ตามลำดับ วันที่ 10 น้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงแล้ว ทุกความเข้มข้นมีน้ำหนักเซลล์ลดลง และค่อยๆ เพิ่มขึ้นสูงสุดอีกครั้งในวันที่ 15 และหลังจากวันนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งค่อยๆ ลดลง ยกเว้นอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงแล้ว ที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สูงสุดในวันที่ 17 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนจบการทดลอง

น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 15 คือ 0.0008, 0.0007, 0.0007 และ 0.0009 กรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 17 คือ 0.0015 กรัมต่อมิลลิเมตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมากกว่าอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงแล้วทุกความเข้มข้น และรูปที่ 4.2 (ก, ข, ค, ง และ จ) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงแล้วทุกความเข้มข้น ทั้ง 3 ซ้ำของการทดลอง

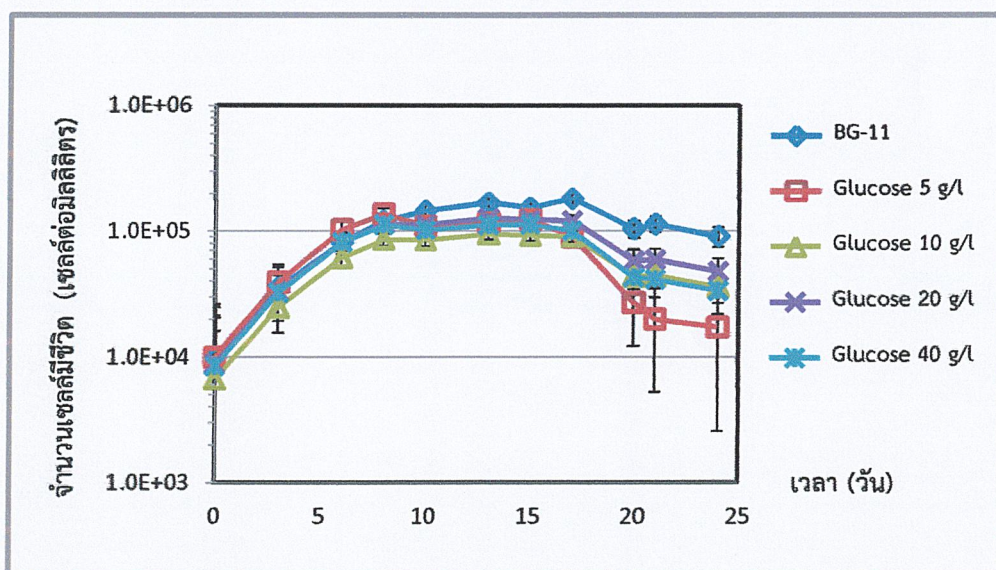


รูปที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ทั้ง 3 ซ้ำของการทดลอง ค่าเฉลี่ยกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การนับเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตโดยตรงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้วัดการเจริญเติบโตภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง นอกจากนี้ยังทำให้เห็นลักษณะภายนอกของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* อีกด้วย ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนเซลล์มีชีวิตจากการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

ตารางที่ 4.2 จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์สาหร่ายเฉลี่ย (เซลล์ต่อมิลลิเมตร)				
	BG-11	Glucose 5 g/l	Glucose 10 g/l	Glucose 20 g/l	Glucose 40 g/l
0	10,000	10,000	6,667	8,889	8,519
3	35,333	39,333	24,890	33,186	32,470
6	81,333	102,667	61,335	81,778	81,927
8	120,667	136,667	85,780	114,371	112,273
10	145,333	109,333	84,892	113,186	102,471
13	168,667	115,333	94,671	126,224	112,076
15	154,000	123,333	92,449	123,261	113,015
17	181,333	90,000	90,450	120,594	100,348
20	104,333	27,000	43,784	58,373	43,052
21	114,000	20,000	44,674	59,558	41,411
24	90,667	17,333	36,008	48,003	33,781



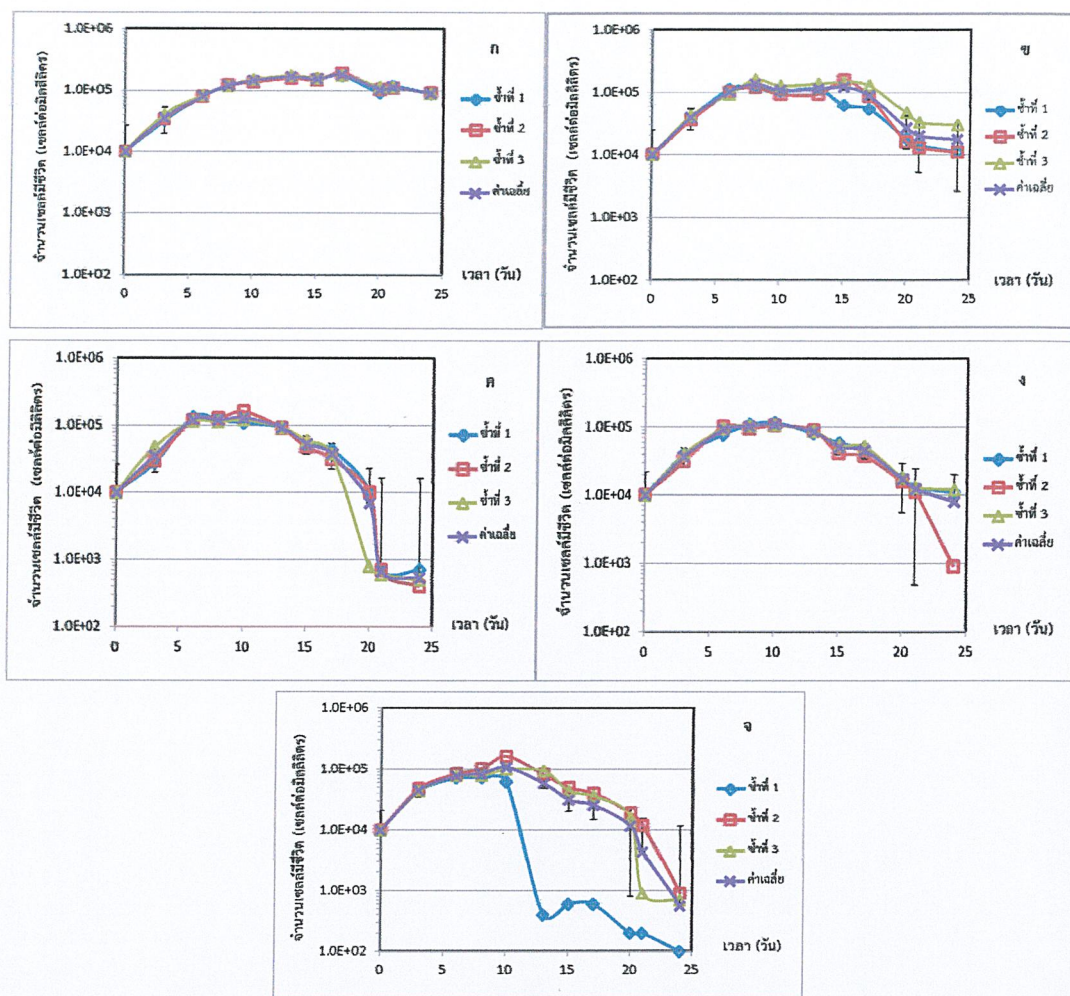
รูปที่ 4.3 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย (รูปที่ 2.3) แบ่งระยะการเจริญเติบโตออกเป็น 5 ระยะ แต่จากการทดลองจากรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ที่เห็นได้ชัดเจน คือ ช่วง 3 วันแรกของการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) หรือระยะที่เซลล์แบ่งตัวทวีคูณ ซึ่งเป็นระยะที่นำมาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ดังตารางที่ 4.3 พบว่า อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.4191, 0.4018, 0.383, 0.3636 และ 0.255 ต่อวัน รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 5, 20 กรัมต่อลิตร, อาหารสูตร BG-11 และที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นในวันที่ 6 เซลล์จะอยู่ในระยะเฉื่อย (Retardation phase) หลังจากวันที่ 6-17 เซลล์อยู่ในระยะคงที่ (Stationary phase) และหลังจากวันที่ 17 เซลล์มีจำนวนลดลงและเข้าสู่ระยะตาย (Death phase) ซึ่งระยะนี้จะเห็นความแตกต่างของแต่ละการทดลองได้ชัดเจนในทุกความเข้มข้นโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.4 (จ) ต่างจากอาหารสูตร BG-11 ที่ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน ดังรูปที่ 4.4 (ก)

จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 มีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 17 คือ  $1.8133 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์และระยะเวลาในการเจริญเติบโตสูงสุดในทุกสูตรอาหารที่ดัดแปลงสูตรแล้วทุกความเข้มข้น อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 8 คือ  $1.366 \times 10^5$ ,  $1.313 \times 10^5$ ,  $1.100 \times 10^5$  และ  $1.080 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อวัน)
BG-11	0.3636
Glucose 5 g/l	0.4018
Glucose 10 g/l	0.4191
Glucose 20 g/l	0.3837
Glucose 40 g/l	0.2550

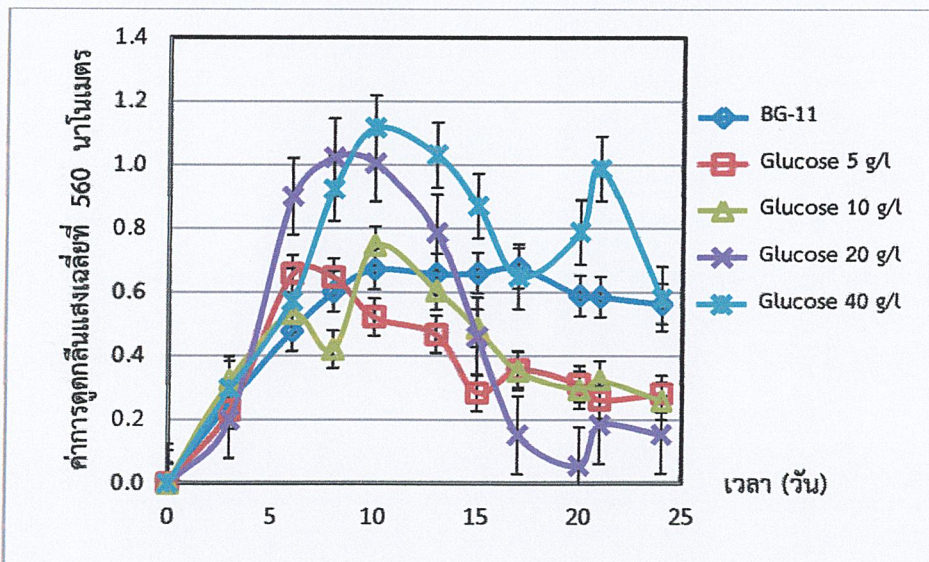


รูปที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีชีวิตของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การวัดค่าการดูดกลืนแสงนับได้ว่าเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ทำได้ง่าย เนื่องจากเป็นการวัดสีที่เกิดขึ้นโดยผ่านการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 และ 680 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

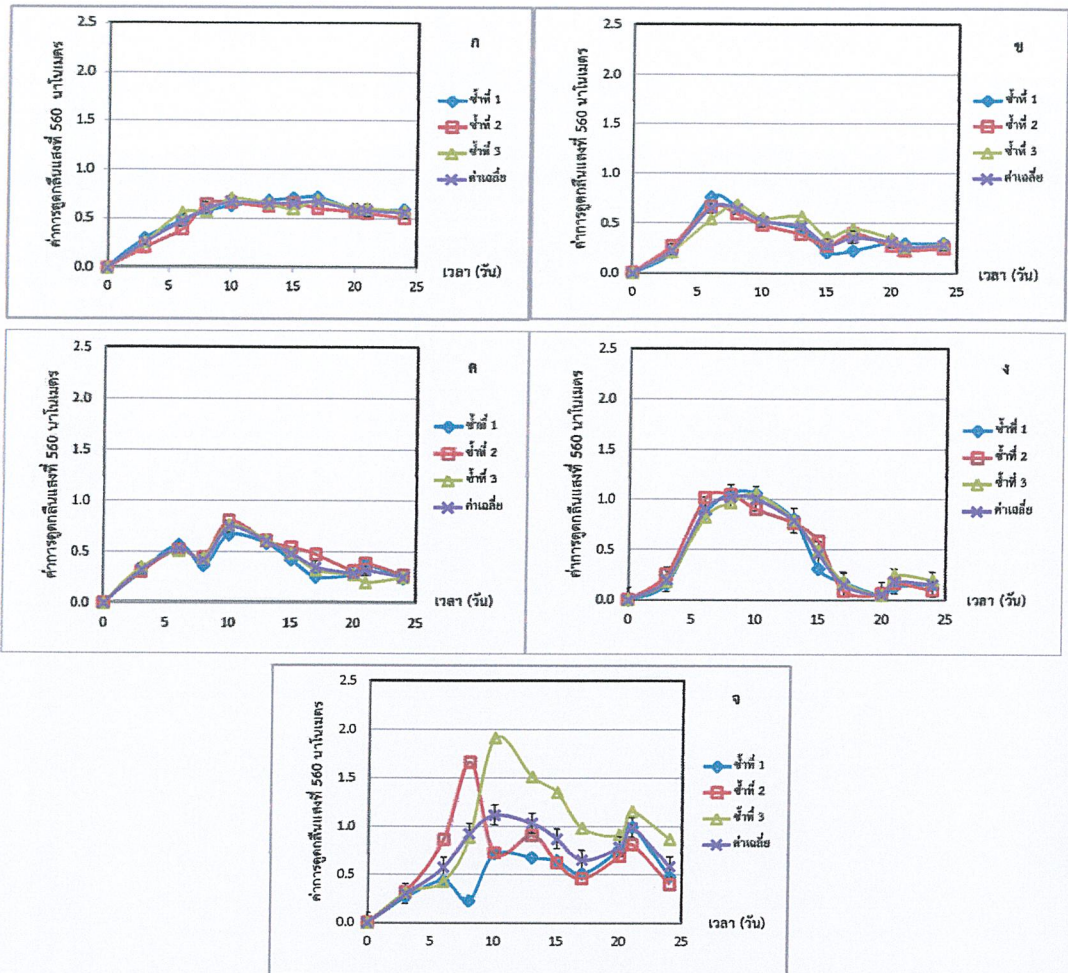
วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 560 นาโนเมตร				
	BG-11	Glucose 5 g/l	Glucose 10 g/l	Glucose 20 g/l	Glucose 40 g/l
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	0.2580	0.2287	0.3233	0.1987	0.2967
6	0.4773	0.6573	0.5320	0.9000	0.5727
8	0.6007	0.6460	0.4200	1.0240	0.9240
10	0.6713	0.5213	0.7453	1.0053	1.1167
13	0.6567	0.4673	0.6047	0.7860	1.0307
15	0.6593	0.2833	0.4870	0.4607	0.8700
17	0.6753	0.3573	0.3530	0.1507	0.6480
20	0.5883	0.3117	0.2933	0.0547	0.7880
21	0.5847	0.2607	0.3240	0.1823	0.9873
24	0.5627	0.2810	0.2580	0.1520	0.5793



รูปที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าหลังจาก 6 วันแรกของการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าอาหารสูตร BG-11 นั้น มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีลักษณะไปในทางเดียวกันกับการนับเซลล์คือ มีลักษณะเป็นเส้นกราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย (รูปที่ 2.3) นั่นคือมีช่วงระยะเซลล์คงที่ยาวกว่าอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ยิ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นยิ่งได้กราฟเหมือนรูปประฆังคว่ำที่สูงกว่ามากขึ้นเท่านั้น ทำให้มีช่วงระยะเซลล์คงที่สั้นกว่าอาหารสูตร BG-11

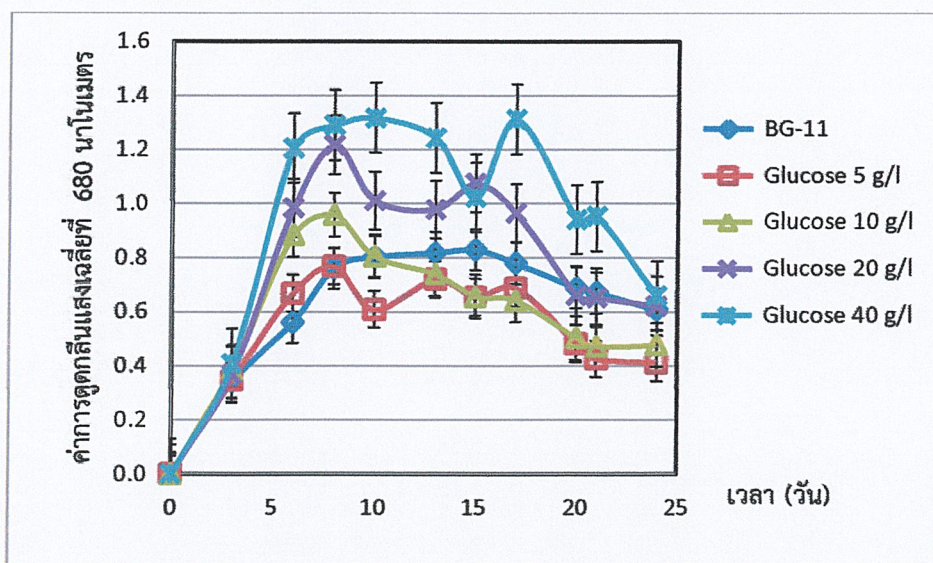
ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 17 คือ 0.6753 ส่วนอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 6 คือ 0.6573 น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 10 คือ 0.7453 และ 1.1167 ตามลำดับ และน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 8 คือ 1.0240 และน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในทุกสูตรอาหาร รูปที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง ค่าเฉลี่ย



รูปที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

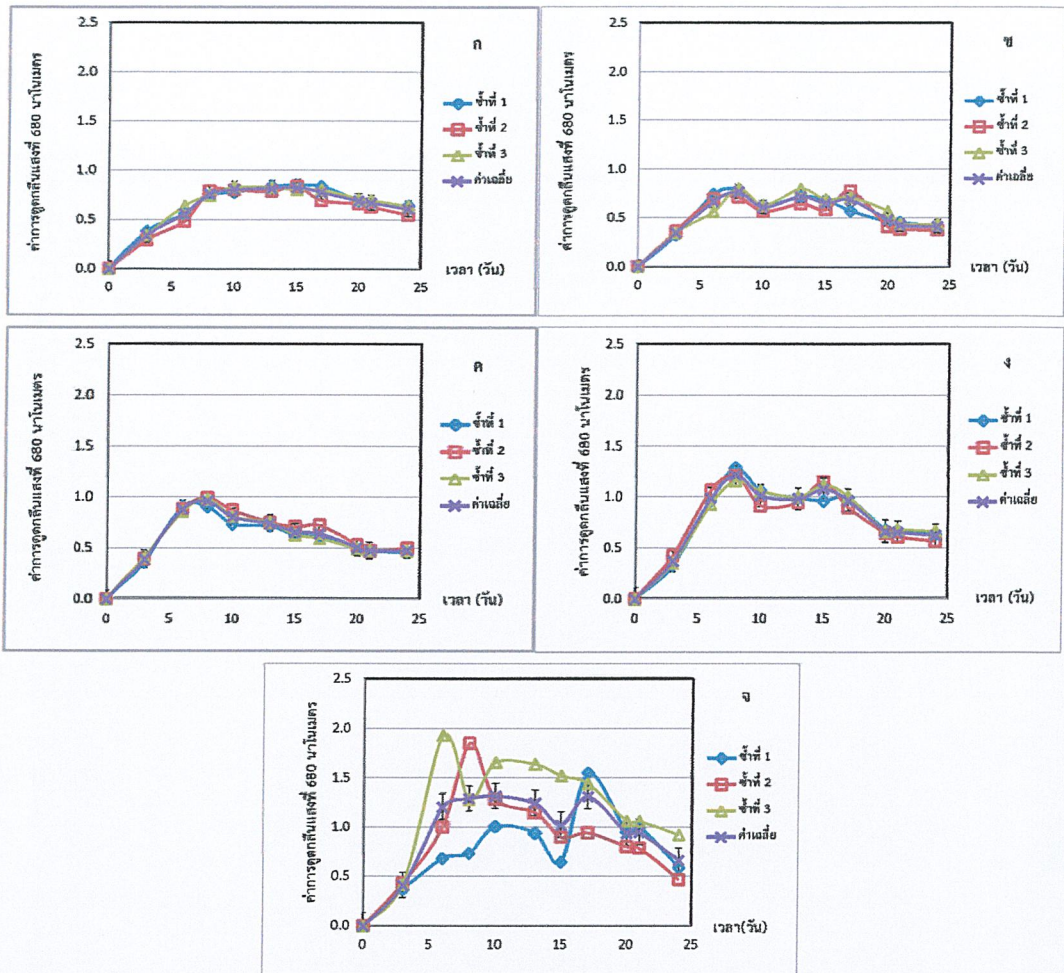
วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 680 นาโนเมตร				
	BG-11	Glucose 5 g/l	Glucose 10 g/l	Glucose 20 g/l	Glucose 40 g/l
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	0.3400	0.3460	0.3887	0.3687	0.4073
6	0.5600	0.6673	0.8820	0.9833	1.2053
8	0.7607	0.7670	0.9580	1.2167	1.2893
10	0.8027	0.6080	0.8040	1.0107	1.3173
13	0.8173	0.7200	0.7393	0.9780	1.2433
15	0.8280	0.6540	0.6553	1.0760	1.0227
17	0.7780	0.6873	0.6420	0.9640	1.3120
20	0.6880	0.4827	0.5033	0.6610	0.9413
21	0.6700	0.4260	0.4727	0.6520	0.9517
24	0.6080	0.4117	0.4773	0.6207	0.6587



รูปที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าหลังจาก 3 วันแรกของการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าอาหารสูตร BG-11 นั้น มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีลักษณะไปในทางเดียวกันกับการนับเซลล์คือ มีลักษณะเป็นเส้นกราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย (รูปที่ 2.3) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร กราฟเริ่มตกลงต่ำกว่า อาหารสูตร BG-11 ในวันที่ 10 และตกลงตลอดการทดลอง ส่วนอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า อาหารสูตร BG-11 ตลอดการทดลอง สรุปได้ว่าถ้ายังมีความเข้มข้นของน้ำตาลมากขึ้นเท่าไรจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้นเท่านั้น

ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 15 คือ 0.8280 ส่วนอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 8 คือ 0.7670, 0.9580 และ 1.2167 ตามลำดับ และน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 10 คือ 1.3173 น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยสูงสุดในทุกสูตรอาหาร และรูปที่ 4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง ค่าเฉลี่ย



รูปที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

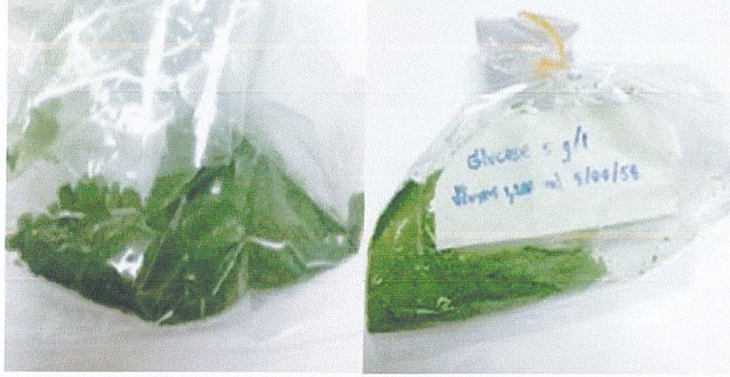
การวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งถือได้ว่าเป็นวิธีการวัดค่าแบบคร่าวๆ ที่ไม่แม่นยำเหมือนกับการนับเซลล์โดยตรง ในการทดลองนี้ไม่ได้วัดตัวอย่างที่สารละลายแล้ววัดที่ตัวเซลล์ ซึ่งเซลล์จะมีลักษณะสีเขียว และสีเขียวปนเหลือง จากตารางที่ 4.6 จึงเลือกวัดความยาวคลื่นที่สีของตัวกรองแสงแทนการวัดสีของสารละลาย และเลือกวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เนื่องจากความยาวคลื่นนี้อยู่ระหว่างสีเขียว และเขียวเหลืองซึ่งตรงกับตัวเซลล์ และมีงานวิจัยหลายๆ งานวิจัยเลือกวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรเช่นกัน (ขจรเกียรติ 2550, ชุตินันท์ และคณะ 2552, เบญจพร และคณะ 2555, อชวาน และคณะ 2556) และอีกความยาวคลื่นที่วัดใช้ คือ 680 นาโนเมตร (Mandotra 2014) ซึ่งเป็นช่วงที่สีของตัวกรองแสงมีสีแดงจึงไม่เหมาะสมกับสีของตัวอย่างที่ทดลอง แต่ถ้าเลือกตามสีของสารละลายแล้วจะอยู่ในช่วงสีเขียวน้ำเงิน ดังนั้นควรเลือกวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.6 การวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (นาโนเมตร) โดยเทียบจากสีของตัวกรองแสง และสีของสารละลาย (ที่มา :

<http://home.kku.ac.th/chuare/12/spectrophotometer.pdf>)

ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)	สีของตัวกรองแสง	สีของสารละลาย
380-435	ม่วง	เขียวเหลือง
435-480	น้ำเงิน	เหลือง
480-490	น้ำเงินเขียว	ส้ม
490-500	เขียวน้ำเงิน	แดง
500-560	เขียว	ม่วง
560-580	เขียวเหลือง	ม่วง
580-595	เหลือง	น้ำเงิน
595-650	ส้ม	น้ำเงินเขียว
650-780	แดง	เขียวน้ำเงิน

จากงานวิจัยของ Cerón García และคณะ (2005) พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Carteria* sp. AARL G045 และ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในอาหารสูตร AM ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะмикโครโทรฟิก พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Carteria* sp. AARL G045 โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายมีการเจริญสูงสุด ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ กลับพบว่ามีความต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส อีกสองความเข้มข้น (0.01 และ 0.02 โมลาร์) แต่ก็ยังมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบโพโตออโตโทรฟิกที่เป็นชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากการเสริมกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้สาหร่ายมีพลังงานเพียงพอต่อความต้องการใช้ในกิจกรรมของเซลล์ เซลล์สาหร่ายจึงลดการสร้างคลอโรฟิลล์ที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการตรึงแสงเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน นอกจากนี้เซลล์ยังมีการสะสมไขมันไว้ภายในเม็ดไขมัน (lipid granule) ทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Wu และคณะ 1992) จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทโฟมิเตอร์ใช้หลักการของแสง ซึ่งสัมพันธ์ต่อการดูดกลืนแสงอย่างมาก จากตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 เซลล์จะมีลักษณะสีเขียวกว่าที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น ที่ส่งผลให้เซลล์มีลักษณะสีเขียวออกเหลือง ดังรูปที่ 4.9

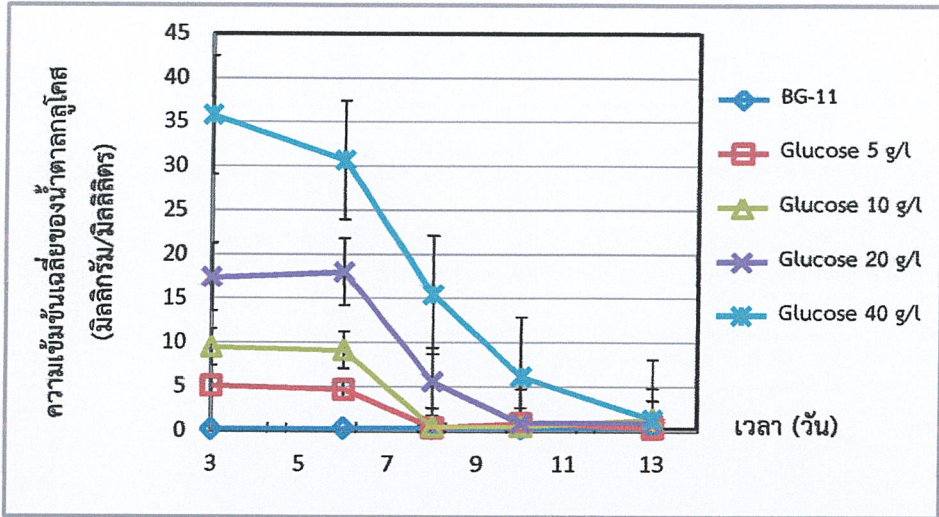


รูปที่ 4.9 สาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (รูปซ้าย) และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคส (รูปขวา)

การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งจะใช้ส่วนใส (ของเหลว) ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วมาหาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-Sulfuric Method) และเมื่อผ่านวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริกแล้วสารละลายตัวอย่างจะมีสีส้ม (รูปที่ 3.10) โดยเลือกวัดความยาวคลื่นที่ 490 นาโนเมตร เนื่องจากเลือกวัดตามสีของสารละลายดังตารางที่ 4.6 สีที่อยู่ระหว่างความยาวคลื่นนี้คือ สีส้ม และสีแดง และได้ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคส ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ (วัน)	ความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)				
	BG-11	Glucose 5 g/l	Glucose 10 g/l	Glucose 20 g/l	Glucose 40 g/l
3	1.0962	1.0357	0.6085	1.2591	0.7887
6	2.1306	1.3811	0.8046	2.3484	1.4973
8	2.8207	1.6107	0.9413	3.0744	1.9689
10	3.4642	1.8255	1.0283	3.7560	2.4108
13	4.4821	2.1666	1.2215	4.8283	3.1094

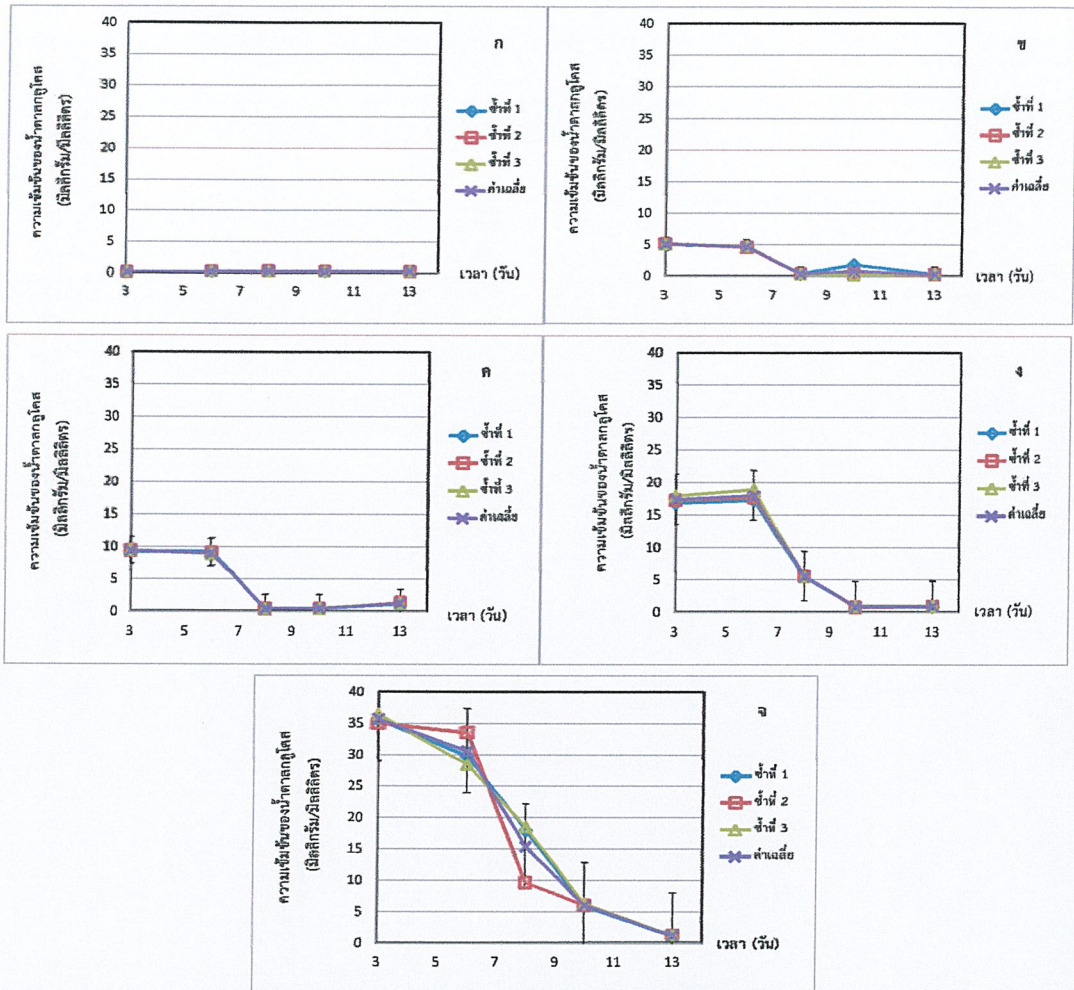


รูปที่ 4.10 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.10 แสดงว่าในอาหารสูตร BG-11 ไม่มีน้ำตาลกลูโคส แต่อาหารสูตร BG-11 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ถูกนำไปใช้จนหมดในวันที่ 8 อาหารสูตร BG-11 ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ถูกนำไปใช้จนหมดในวันที่ 10 อาหารสูตร BG-11 ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ถูกนำไปใช้จนหมดในวันที่ 13 ซึ่งเซลล์มีความสามารถในการนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตจนหมด และรูปที่ 4.11 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาลเฉลี่ย ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง

จากงานวิจัย Perez-Garcia และคณะ (2011) พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Carteria* sp. AARL G045 และ *Scenedesmus* sp. AARL G022 สาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีการเติมกลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายขนาดเล็กและจุลินทรีย์หลายๆ กลุ่มสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ทั้งนี้อาจเกิดจากกลูโคสจะให้พลังงานสูงกว่าสารอื่น เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากัน เช่น กลูโคสให้พลังงานงาน 2.8 กิโลจูลต่อโมล ขณะที่อะซิเตทให้พลังงาน 0.8 กิโลจูลต่อโมล (Boyle และ Morgan 2009) และ Hong-Yu Ren และคณะ (2013.) พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณไขมันรวมทั้งหมด เท่ากับ 43.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร จะลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 6 ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสจะเหลือ เท่ากับ 0.74 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่ากลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีผลต่อปริมาณไขมันรวมทั้งหมดถึง 92.6 เปอร์เซ็นต์ ในทางตรงกันข้ามกลูโคสที่มีความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร มีผลต่อปริมาณไขมันรวมทั้งหมด แค่ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ดังนั้นอัตราความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงของกลูโคสมีผลต่อการผลิต

น้ำมันไบโอดีเซลของสาหร่าย จากผลการทดลองครั้งนี้จึงคัดเลือกความเข้มข้นกลูโคสที่ 10 กรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะบ่มอัดอากาศต่อไป



รูปที่ 4.11 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง ก คือ อาหารสูตร BG-11, ข, ค, ง และ จ คือ อาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

#### 4.2 สภาวะภายใต้บ่มอัดอากาศและการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

จากผลการทดลองเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะการให้อากาศแบบสายยางปกติ และสามทางเจาะรู เป็นเวลา 3 วัน (ภาคผนวก ข-1) จะเห็นได้ว่าแบบสายยางปกติมีความเหมาะสมกับการทดลองของเรา เนื่องจากอัตราการไหลของอากาศมีความสัมพันธ์กับระดับน้ำที่ลดลง เพราะถ้าหากเราให้อัตราการไหลที่เร็ว จะทำให้ระดับน้ำลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน เราจึงเลือกการให้อากาศแบบสายยาง

ปกติ มาใช้ในการทดลองโดยใช้สภาวะ 2 สภาวะคือ บั้มให้อากาศขนาดใหญ่ และบั้มให้อากาศขนาดเล็ก ตามลำดับ ซึ่งวัดอัตราการไหลของอากาศได้ 190 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นทำการนับจำนวนฟองอากาศ และวัดขนาดฟองอากาศเพื่อดูพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การนับจำนวนฟองอากาศที่นับได้ในเวลา 30 นาที และพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว

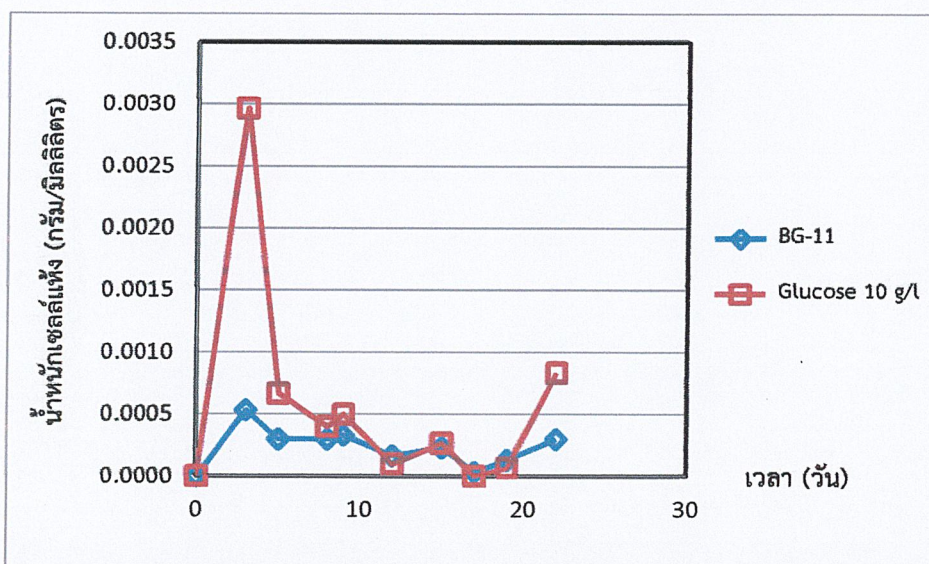
ขนาดบั้ม	จำนวนฟองอากาศ (ฟอง)	พื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว (เซนติเมตร)
บั้มใหญ่	34,920	12.34
บั้มเล็ก	36,000	19.44

จากตารางที่ 4.8 แสดงการนับจำนวนฟองอากาศ และวัดขนาดฟองอากาศโดยใช้สภาวะ 2 สภาวะ คือ บั้มให้อากาศขนาดใหญ่ และบั้มให้อากาศขนาดเล็ก ตามลำดับ ให้อากาศแบบสายยาวปกติ ที่อัตราการไหล 190 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะเห็นได้ว่า บั้มให้อากาศขนาดใหญ่ได้จำนวนฟองอากาศทั้งหมด 34,920 ฟอง และพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลวเท่ากับ 12.34 เซนติเมตร ส่วนบั้มให้อากาศขนาดเล็ก ได้จำนวนฟองอากาศทั้งหมด 36,000 ฟอง และพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลวเท่ากับ 19.44 เซนติเมตร จากผลการทดลองจะเห็นว่าบั้มให้อากาศขนาดเล็กให้จำนวนฟองอากาศ และค่าเฉลี่ยพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลวที่มากกว่าบั้มให้อากาศขนาดใหญ่ เนื่องจากบั้มให้อากาศขนาดเล็กมีกำลังไฟฟ้าที่มากกว่า บั้มให้อากาศขนาดใหญ่จึงทำให้ได้งานที่มากกว่า รวมถึงพื้นที่ของท่อที่ให้อากาศก็มีขนาดเล็กกว่าจึงส่งผลให้เกิดแรงดันที่มากทำให้เกิดฟองอากาศที่มากกว่าบั้มให้อากาศขนาดใหญ่ จากนั้นนำบั้มให้อากาศขนาดใหญ่ไปเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะอาหาร BG-11 และนำบั้มให้อากาศขนาดเล็กไปเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะอาหาร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะแสดงให้เห็นในตารางที่ 4.9

การเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในโหลเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะบั้มอัดอากาศ ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในขวดโหลเพาะเลี้ยงขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ให้อากาศแบบสายยาวปกติที่ระดับ 190 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สาหร่ายเริ่มต้น (หัวเชื้อ)  $10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 23 กุมภาพันธ์-16 มีนาคม 2558 รวม 22 วัน และนำไปวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิเมตร)	
	BG-11	Glucose 10 g/l
0	0.0000	0.0000
3	0.0005	0.0030
5	0.0003	0.0007
8	0.0003	0.0004
9	0.0003	0.0005
12	0.0002	0.0001
15	0.0002	0.0003
17	0.0000	0.0000
19	0.0001	0.0001
22	0.0003	0.0008



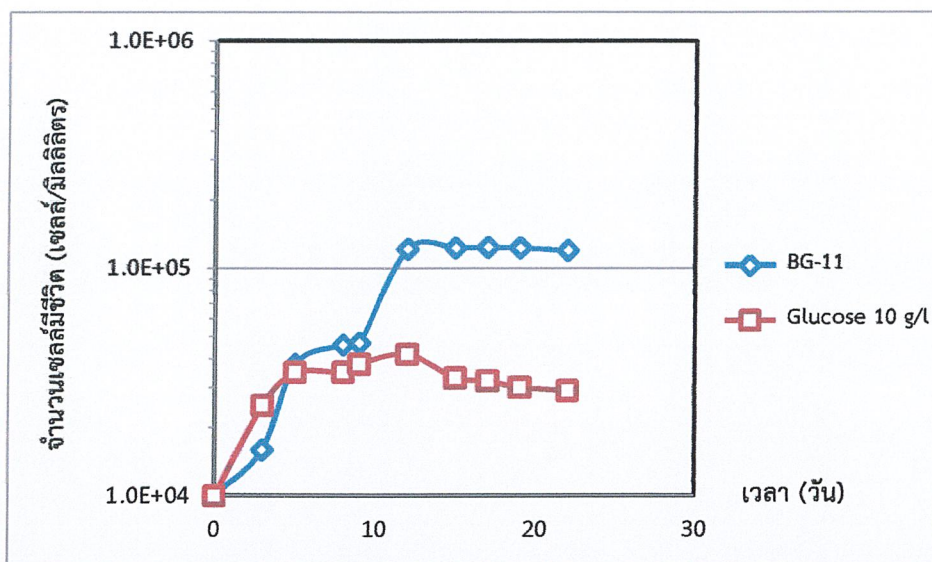
รูปที่ 4.12 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ภายใต้สภาวะบ่มอีกอากาศ ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุดใน

วันที่ 3 คือ 0.0030 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 อยู่ 0.0020 กรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของกลูโคสจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จึงทำให้สาหร่ายที่ถูกเลี้ยงในสภาวะอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเจริญเติบโตได้ดีกว่านั่นเอง (Martinez และคณะ 1991) จากนั้นทำการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* โดยใช้การนับจำนวนด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์เฉลี่ย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	BG-11	Glucose 10 g/l
0	10,000	10,000
3	16,000	25,000
5	38,000	35,000
8	46,000	35,000
9	47,000	38,000
12	122,000	42,000
15	123,000	33,000
17	124,000	32,000
19	123,000	30,000
22	120,000	29,000



รูปที่ 4.13 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร กักระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ภายใต้สภาวะบ่มอีกอากาศ ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในช่วงวันที่ 1 - 3 สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว มีจำนวนเซลล์สิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตได้ดีกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 คือ  $0.250 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ  $0.160 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่า อาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

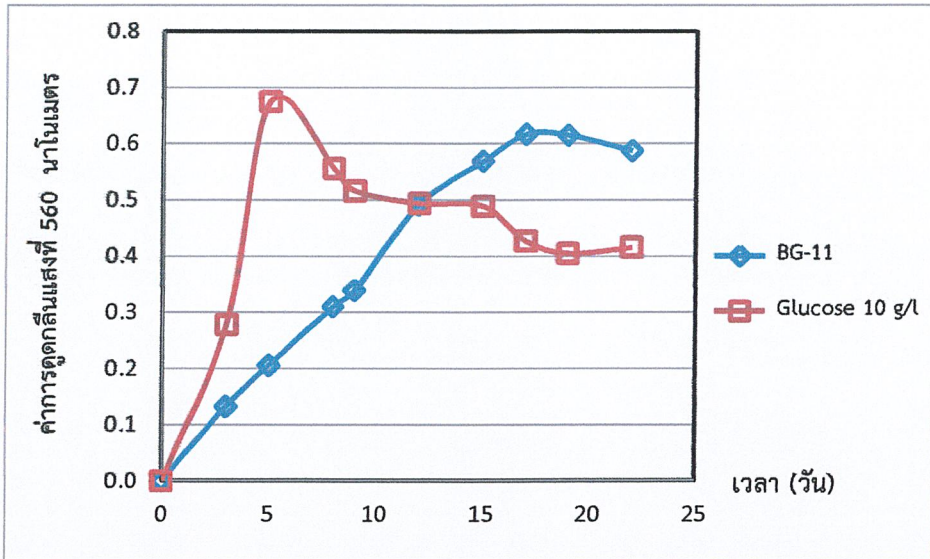
สูตรอาหาร	ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อวัน)
BG-11	0.1656
Glucose 10 g/l	0.2651

จากตารางที่ 4.11 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth

rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (0.2651 ต่อวัน) มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (0.1656 ต่อวัน) เนื่องจากกลูโคสมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายทำให้สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 นั้นเอง จากนั้นเราจึงทำการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (นาโนเมตร) ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 560 นาโนเมตร	
	BG-11	Glucose 10 g/l
0	0.000	0.000
3	0.133	0.278
5	0.206	0.675
8	0.310	0.556
9	0.339	0.516
12	0.492	0.494
15	0.569	0.489
17	0.617	0.427
19	0.615	0.405
22	0.587	0.416

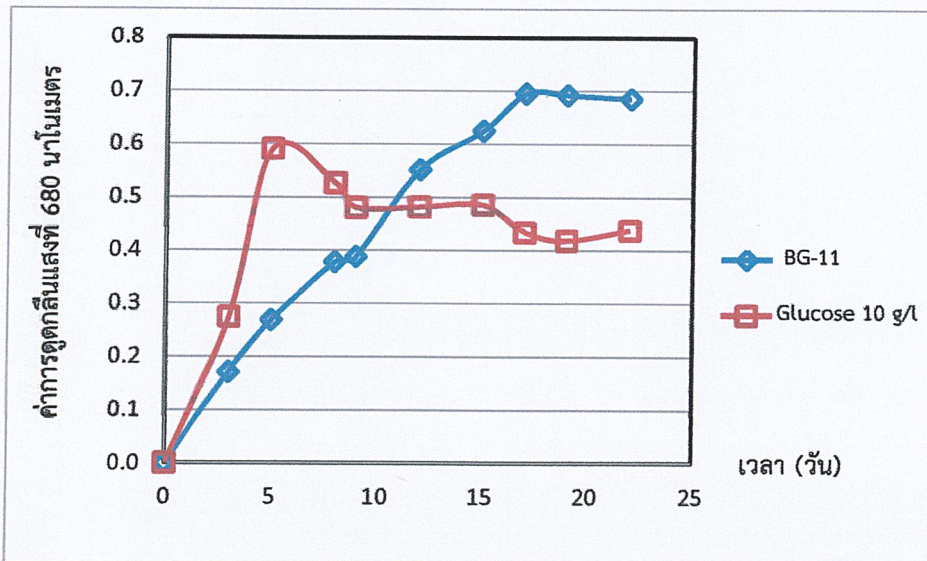


รูปที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 (สูงสุดในวันที่วันที่ 17 คือ 0.617) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (สูงสุดในวันที่วันที่ 5 คือ 0.675) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น สีของอาหารก็จะเข้มมากยิ่งขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นตามไปด้วย

ตารางที่ 4.13 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 680 นาโนเมตร	
	BG-11	Glucose 10 g/l
0	0.000	0.000
3	0.172	0.275
5	0.269	0.591
8	0.378	0.527
9	0.388	0.481
12	0.552	0.482
15	0.625	0.486
17	0.695	0.434
19	0.692	0.418
22	0.685	0.438



รูปที่ 4.15 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

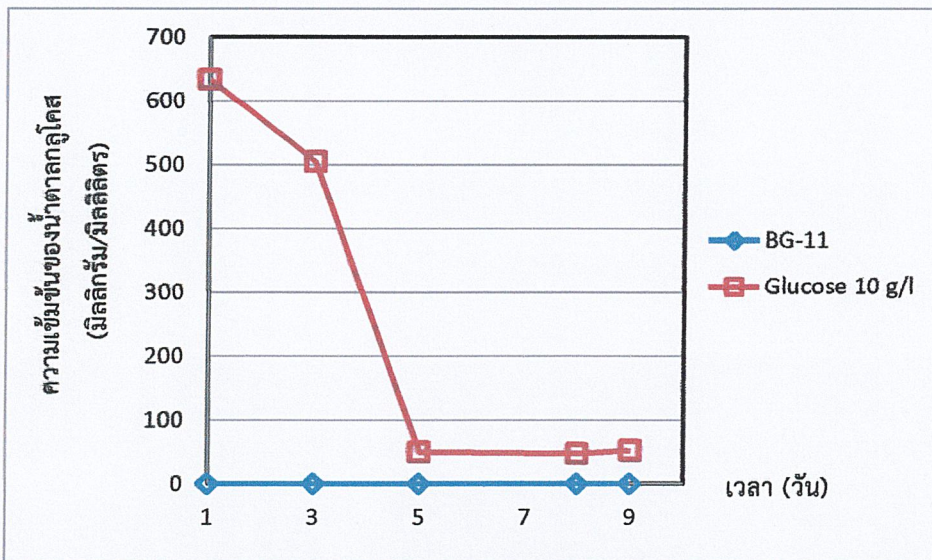
จากรูปที่ 4.15 แสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 (สูงสุดในวันที่วันที่ 17 คือ 0.695) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (สูงสุดในวันที่วันที่ 5 คือ 0.591)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น สีของอาหารก็จะเข้มมากยิ่งขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นตามไปด้วย

การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และสีของน้ำตาล

วันที่เก็บ (วัน)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	BG-11	Glucose 10 g/l
1	0.29003	7.71148
3	0.28852	6.140483
5	0.321752	0.615559
8	0.273414	0.587613
9	0.216012	0.64577



รูปที่ 4.16 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.16 แสดงให้เห็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอาหารสูตร BG-11 ไม่มีน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหาร จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่วนในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลง คือในวันที่ 1 และวันที่ 3 อาหารยังคงมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลเหลืออยู่ คือ 7.7114 และ 6.14048 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 5 และวันที่ 9 ไม่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลเหลืออยู่ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ในวันที่ 1 และวันที่ 3 ที่ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงก็เนื่องจากสาหร่ายมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโต และปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลหมดในวันที่ 5

#### 4.3 การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายระหว่างสภาวะเขย่ากับบ่มอัดอากาศ

จากการทดลองวัดการเจริญเติบโตของทั้ง 2 สภาวะ พบว่า ในสภาวะเขย่าหัวข้อที่ (4.1) มีจำนวนเซลล์มีชีวิต และค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสภาวะบ่มอัดอากาศหัวข้อที่ (4.2) แต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าเนื่องจากในสภาวะบ่มอัดอากาศ กมลพรรณ (2548) มีการเพิ่มอากาศลงไปในการอาหารทำให้สาหร่ายมีการกระจายตัวสม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นผลทำให้สาหร่ายได้รับสารอาหารอย่างทั่วถึง ทำให้สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มมากขึ้นซึ่งมากกว่าแบบการเลี้ยงโดยไม่เพิ่มอากาศลงไปหรือในสภาวะเขย่านั่นเอง และจากการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* ในสภาวะเขย่า และบ่มอัดอากาศดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำการเก็บตัวอย่างในระยะคงที่ คือวันที่ 14 มาทำการ Freeze Dry เพื่อให้สาหร่ายอยู่ในรูปผงแห้ง ซึ่งง่ายต่อการเก็บรักษา และการนำไปสกัดต่อไป

ตารางที่ 4.15 น้ำหนักสาหร่ายแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว

สภาวะที่เพาะเลี้ยง	สูตรอาหาร	น้ำหนักสาหร่ายแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)
เขย่า	BG-11	0.00030
	กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร	0.00029
	กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	0.00029
บ่มอัดอากาศ	BG-11	0.00046
	กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	0.00035

จากตารางที่ 4.15 พบว่า การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะบ่มอัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำหนักสาหร่ายแห้ง คือ 0.00046 และ 0.00035 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่าในทุกสูตรอาหาร คือ 0.00030, 0.00029 และ 0.00029 กรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่

ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในอาหารสูตร BG-11 ของทั้งสองสภาวะก็มีปริมาณน้ำหนักรายแห้งที่สูงกว่าอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว ของทุกความเข้มข้น

จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการ Freeze Dry แล้วของทั้งสองสภาวะ และทุกสูตรอาหารไปทำการสกัดน้ำมันต่อไป ยกเว้นสภาวะปืม้อัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เนื่องจากตัวอย่างที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว มีลักษณะเป็นแผ่นๆ ไม่เป็นผงเหมือนตัวอย่างอื่นๆ ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว ดังรูปที่ 17



รูปที่ 4.17 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปืม้อัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว

#### 4.4 การสกัดและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชัน

นำสาหร่ายที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาสกัดตามวิธีในข้อ 3.4.13 จะได้น้ำมันสาหร่าย ดังตารางที่ 4.16 พบว่าปริมาณไขมันในอาหารสูตร BG-11 (เขย่า) มีปริมาณน้อยกว่าในอาหารสูตร BG-11 (ขวดโหล) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมน้ำตาล 5 และ 10 กรัมต่อลิตร (เขย่า) จากนั้นนำน้ำมันสาหร่ายที่ได้ไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชันเพื่อเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล และนำไปวิเคราะห์ด้วยด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีต่อไป

ตารางที่ 4.16 น้ำหนักของน้ำมันสาหร่ายหลังระเหยเอาเฮกเซนแล้ว

สูตรอาหาร	น้ำหนักน้ำมันสาหร่าย (กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
BG-11 (เขย่า)	0.03
BG-11 (ขวดโหล)	0.07
กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (เขย่า)	0.13
กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (เขย่า)	0.13

Reed และคณะ (2011) ปริมาณกลูโคสที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0.01, 0.02 และ 0.05 โมล ซึ่งเท่ากับปริมาณ 1.8, 3.6 และ 9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า กลูโคสความเข้มข้น 0.05 โมล ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดในการทดลองนี้ ส่งเสริมให้สาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 มีชีวมวลสูงสุด ดังนั้นจึงควรมีการทดลองต่อไปเพื่อให้ทราบความเข้มข้นของกลูโคสสูงสุดที่จะสามารถส่งเสริมชีวมวลของสาหร่ายให้ได้สูงขึ้น เนื่องจากความเข้มข้น

ของกลูโคสจะส่งผลต่อ การเจริญของสาหร่าย หากมีปริมาณมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและการสะสมไขมันของสาหร่าย และจากงานวิจัยของชินอริส และคณะ (2551) เลี้ยงสาหร่ายทองถิ่นสายพันธุ์คลอเรลลาโดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง Watanabe โดยมีการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนที่ต่ำพบว่า สาหร่ายมีการผลิตปริมาณไขมันสูงขึ้นและมีการเพิ่มสารประกอบอื่น เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วย เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กลูโคส และเหล็กที่อยู่ในรูปสารประกอบเพอร์ริคคลอไรด์ เป็นต้น ซึ่งพบว่า กลูโคสที่สาหร่ายได้รับไปนั้นจะกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันภายในเซลล์ ส่วนสภาวะที่ไม่มีการเติมกลูโคสแต่มีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์ต่ำ

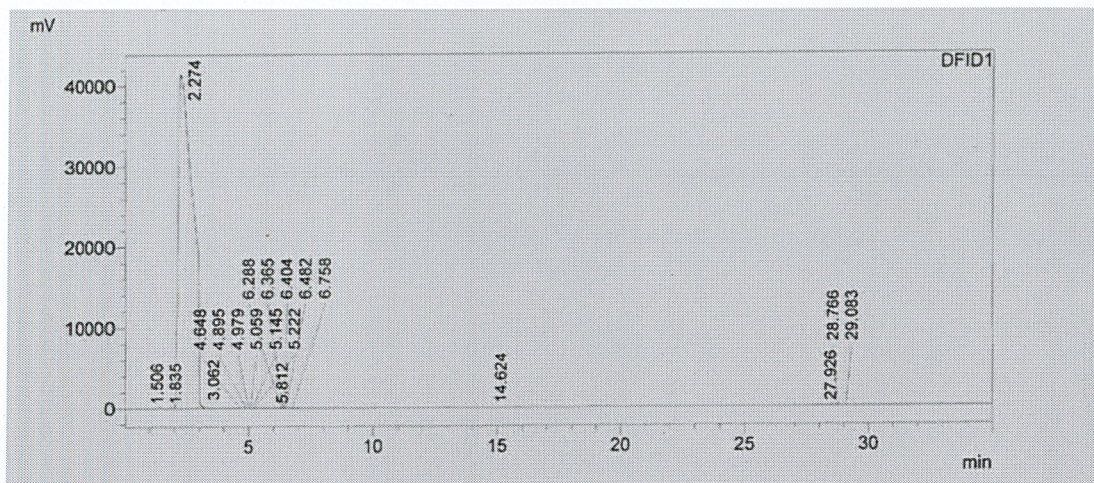
จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น ที่พบว่าความเข้มข้นของกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร มีส่วนในการเพิ่มปริมาณไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายมากกว่าในอาหารสูตร BG-11 ที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส

#### 4.5 การวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

จากปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ข้างต้นมีปริมาณน้อยมาก จึงใช้เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ภายใต้สภาวะตามวิธีการข้อ 3.4.16 แต่เนื่องจากการทดลองนี้ไม่มีสารตัวอย่างมาตรฐานของไบโอดีเซล หรือ Fatty acid Ethyl Esters (FAEEs) จึงไม่สามารถบอกได้ว่า กราฟที่วิเคราะห์ได้เป็นกรดไขมันหรือไบโอดีเซลชนิดไหน

จากงานวิจัยการศึกษาศักยภาพของน้ำมันสาหร่าย *Scenedenmus incrassatulus* เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่าย *Scenedenmus incrassatulus* และไขมันที่ได้ในระหว่างการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีการสังเคราะห์แสงร่วมกับการให้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ (Mixotrophic) เป็น 1.8 กรัมต่อลิตร และ  $19.5 \pm 1.5$  ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ องค์ประกอบที่สำคัญของไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันสาหร่าย *Scenedenmus incrassatulus* คือ Methyl Palmitate (26 เปอร์เซ็นต์) และ Methyl Linoleate (49 เปอร์เซ็นต์) (Martha และคณะ 2013) ดังนั้น สาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่นำมาทดลองนี้ก็สามารถผลิตน้ำมันได้เช่นเดียวกัน

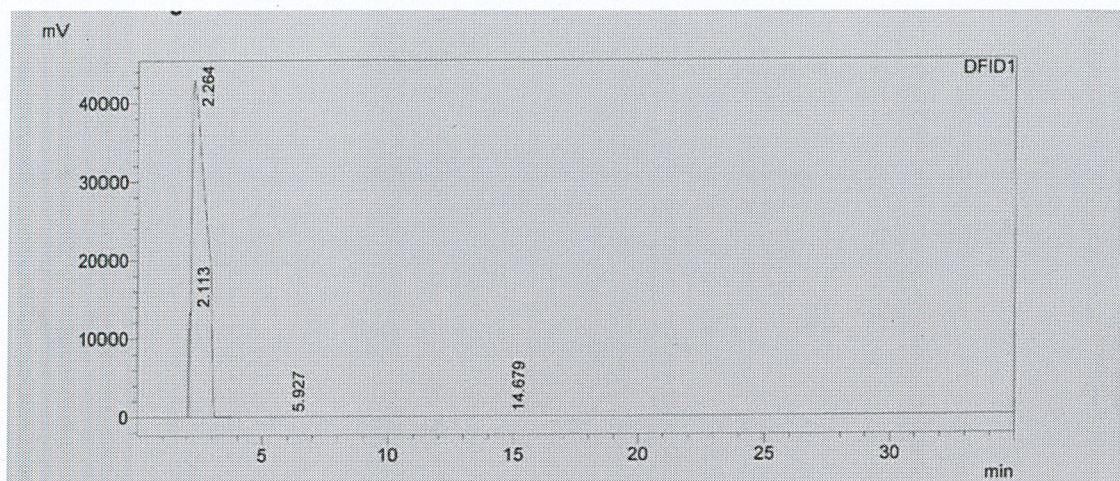
4.5.1 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้ผล ดังรูปที่ 4.18 และรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.18 การวิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ 4.17 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1)

เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.51	6,064
1.83	13,136
2.28	1,591,229,986
3.06	594,180
4.65	18,840
4.9	86,737
4.98	60,932
5.06	51,961
5.14	39,694
5.22	118,837
5.81	344,744
6.29	22,301
6.37	13,902
6.4	17,793
6.49	31,280
6.76	330,839
14.62	26,087
27.93	6,786
28.77	9,834
29.08	6,698
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	1,593,030,631

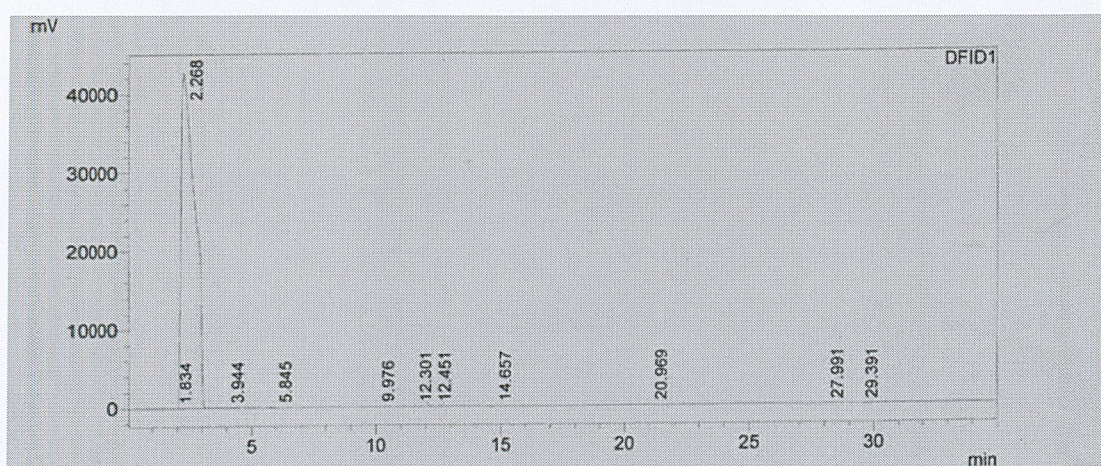


รูปที่ 4.19 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ 4.18 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2)

เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
2.11	53,637,104
2.26	1,596,354,946
5.93	9,404
14.68	13,394
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	1,650,014,848

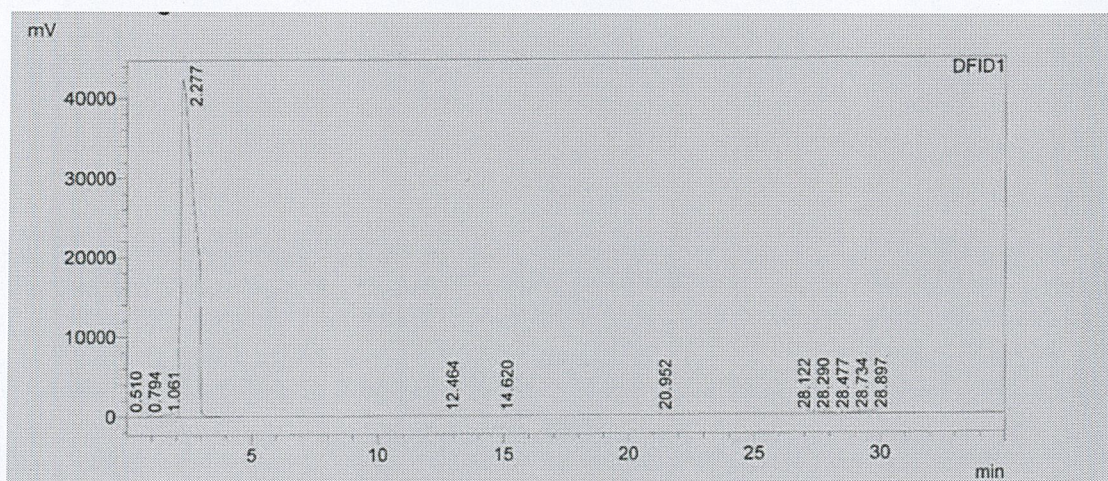
4.5.2 ตัวอย่างน้ำมันสาหร่ายในสภาวะเขย่าที่ผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันแล้ววิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้ผลดังรูปที่ 4.20-4.25



รูปที่ 4.20 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ 4.19 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 1)

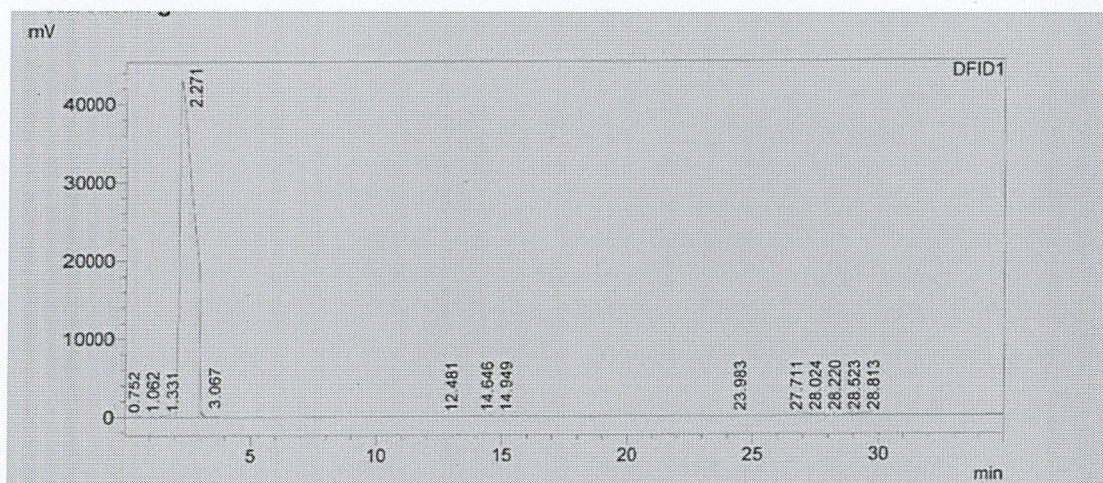
เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
2.14	53,088,070
2.23	1,285,109,333
3.28	5,552
3.59	10,459
4.25	3,838
4.65	4,502
5.46	10,624
5.51	10,491
5.57	13,287
6.11	3,597
6.8	4,937
6.86	3,089
7.14	9,061
9.52	3,073
9.9	3,259
14.15	1,872,090
17.31	8,896
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	1,340,164,158



รูปที่ 4.21 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ 4.20 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 2)

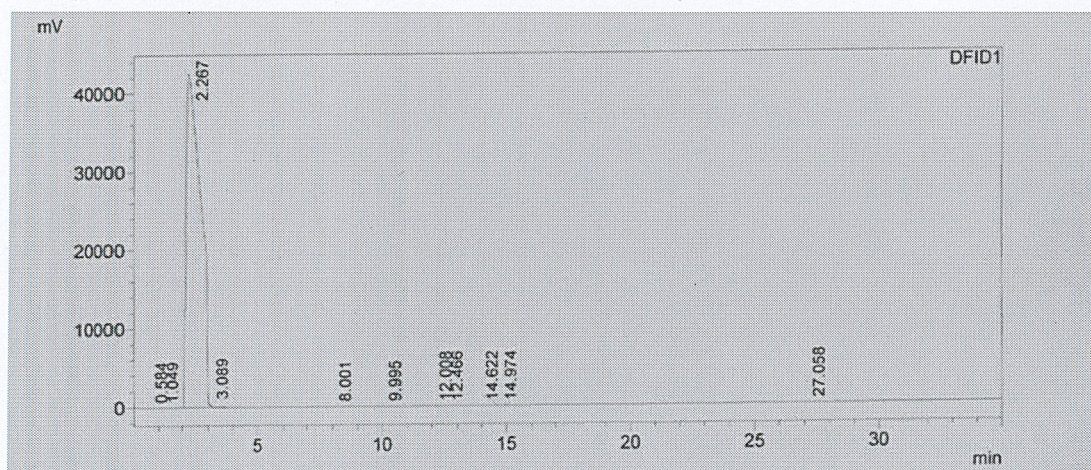
เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.07	56,604
1.52	57,055
1.65	28,147
1.89	20,959
2.28	920,373,134
7.95	2,180
11.18	2,837
14.3	118,788
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	920,659,704



รูปที่ 4.22 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ 4.21 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหาร

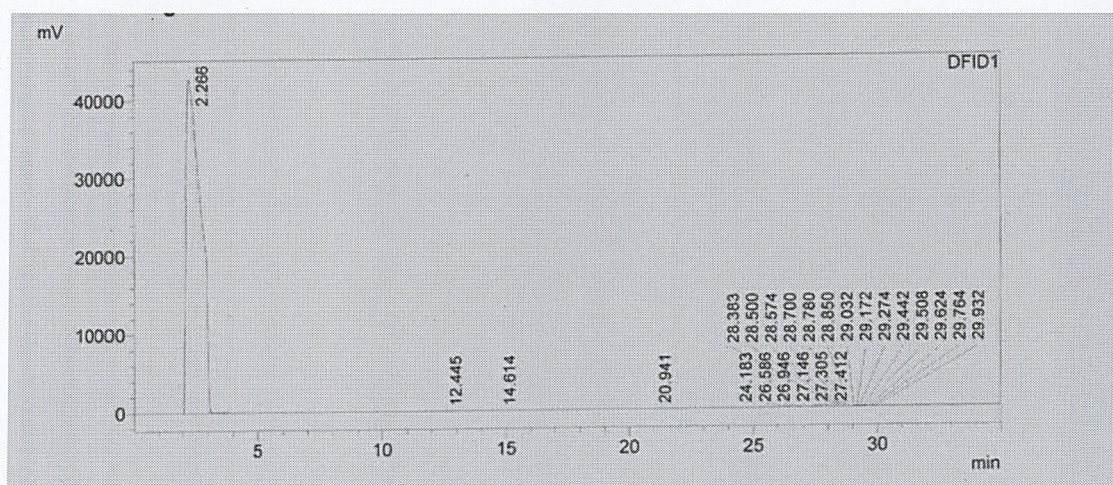
เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.07	13,580
1.34	2,066
2.27	818,715,156
3.1	460,364
3.42	2,212
6.01	3,724
6.72	2,572
9	2,597
12.15	2,224
14.29	180,444
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	819,384,939



รูปที่ 4.23 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ 4.22 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในสภาวะอาหารกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2)

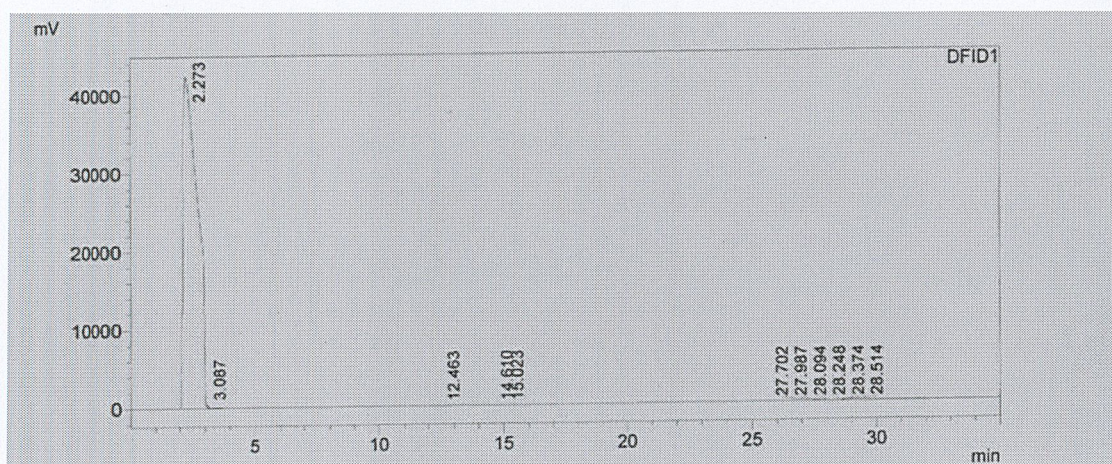
เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
2.27	784,478,349
3.47	10,176
3.66	19,360
3.82	3,400
4.07	2,244
4.7	3,494
4.96	2,072
7.5	4,531
7.63	2,061
7.85	3,020
12.19	2,926
14.31	120,772
20.86	5,768
27.88	2,604
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	784,660,777



รูปที่ 4.24 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ 4.23 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในสภาวะอาหาร กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1)

เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.07	7,294
2.27	810,,148,563
4.19	2,795
4.32	2,971
5.75	2,985
6.29	2,216
14.31	148,169
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	810,314,993

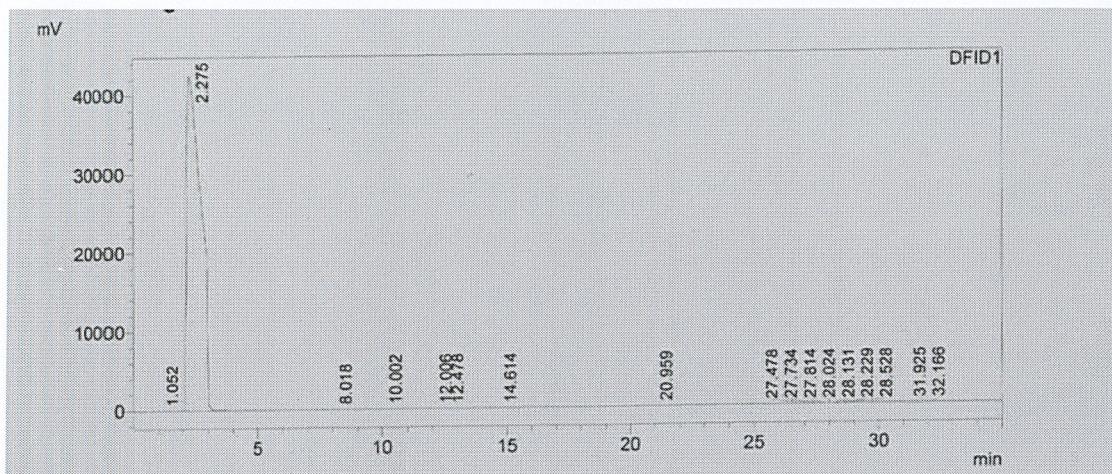


รูปที่ 4.25 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ 4.24 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในสภาวะอาหาร กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2)

เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.06	18,758
1.48	3,517
2.28	827,372,351
3.06	253,427
6.11	5,832
14.34	80,751
20.93	3,085
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	827,737,721

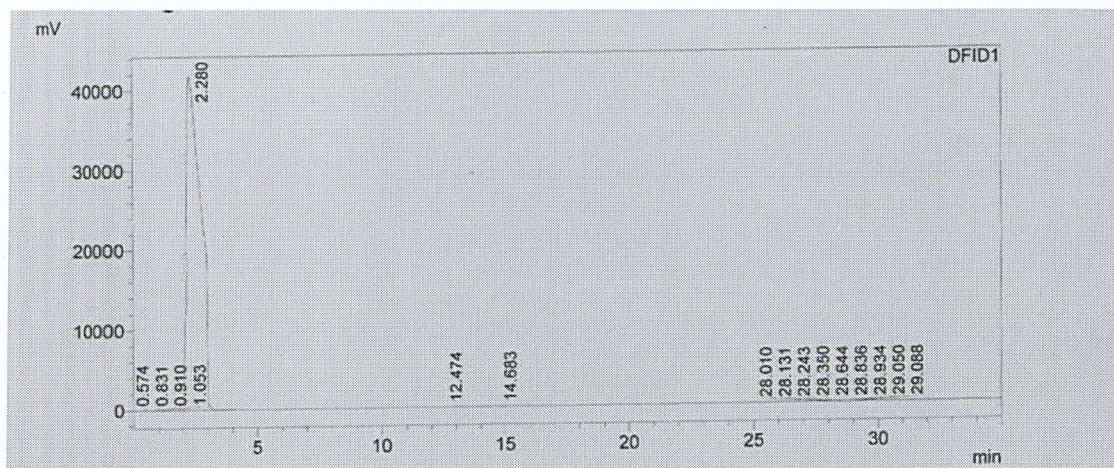
4.5.3 ตัวอย่างน้ำมันสาหร่ายในสภาวะป้อนอากาศที่ผ่านการทำปฏิกิริยา  
ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแล้ววิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้ผลดังรูปที่ 4.26-4.27



รูปที่ 4.26 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ 4.25 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 1)

เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.06	9,578
2.35	907,228,143
3.07	549,569
3.53	3,581
3.6	7,094
3.72	5,818
3.79	3,968
4.14	30,755
4.3	10,575
4.38	9,260
5.39	5,376
5.62	3,740
14.24	331,239
28.42	3527
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	908,202,223



รูปที่ 4.27 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ 4.26 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 2)

เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.05	8,262
2.29	844,581,825
14.34	76,207
19.05	2,430
23.31	2,734
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	844,671,458

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลงานวิจัย

จากการทดลองทำการศึกษาสภาวะการเลี้ยงสำหรับ *Scenedenmus armatus* เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันในสาหร่าย ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมน้ำตาลกลูโคส 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ พบว่า ในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอาหาร BG-11 สูตรที่ไม่ดัดแปลง และช่วงระยะเวลาในการเจริญเติบโตนั้นสั้นกว่าทำให้สามารถย่นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงได้ และจากการทดลองจะเห็นได้ว่า อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงแล้ว โดยการเติมน้ำตาลกลูโคส 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5, 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลูโคสจะลดลงเรื่อยๆ และหมดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดโหล ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อัตราการไหลของอากาศ 190 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า ในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอาหาร BG-11 สูตรที่ไม่ดัดแปลง และช่วงระยะเวลาในการเจริญเติบโตนั้นสั้นกว่าทำให้สามารถย่นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงได้ อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลูโคสจะลดลงเรื่อยๆ และหมดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 การศึกษาเรื่องเดียวกันสามารถที่จะนำอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ แต่อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น สภาวะเขย่าอาจมีการให้ความเข้มแสงที่ต่างกันในแต่ละรอบของการเพาะเลี้ยงเพื่อดูว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ความเข้มแสงใด

5.2.2 การใช้สภาวะภายใต้บีม้อัดอากาศอาจเพิ่มหัวจ่ายอากาศที่ต่างกันเพื่อดูว่าหัวจ่ายอากาศแบบไหนที่ให้อากาศได้ดีที่สุด และเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมากที่สุด หรืออาจให้อัตราการไหลของอากาศที่ต่างกันแล้วเปรียบเทียบดูว่าอัตราการไหลของอากาศไหนที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

## บรรณานุกรม

- กมลพรรณ แก้วปิ่นทอง. 2548. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluviialis*. ในถึงปฏิกรณ์  
ชีวภาพแบบอวกาศยก. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. คณะวิศวกรรมศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.  
หน้า 110-113.
- กิตติคุณ สุกันโธวงศ์, ธนียา แซ่โอ้ว และสันติสุข ขวัญศิริวนิช. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูงด้วยวิธีอ้อมสีในสไลด์เรด. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. คู่มือปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algal Culture). คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ชนิษฐา ไชเจริญ, วิไลลักษณ์ จำรูญ และสาธิต โกวิทวที. 2547. ปริมาณโปรตีนในสาหร่าย 4 ชนิด *Chlorella sp.*, *Kirchneriella sp.*, *Navicula sp.* และ *Coccomyxa sp.* ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ เรื่องเต็มประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 : สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. หน้า 224-229.
- จิรัตน์ พรหมนารถ และสุนิรัตน์ เรืองสมบุรณ์. 2556. ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus*. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. ปีที่ 7 ฉบับที่ S1.
- ชินอรส ศรีศิริ, ยิ่งยศ ลับภู, ประสงค์ วงศ์วิชา และกันยรัตน์ โหละสุด. 2551. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายทองถิ่นเซลล์เดี่ยว. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชุตินันท์ ทองสุขา, เนตรนภา แก้วกุล และภริสา ตันเจริญ. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธัญญารัตน์ ธรรมไพศาล, อัจฉราภรณ์ จงมีสุข และอุทัยวรรณ มากศิริ. 2553. การเลี้ยงเซลล์ยีสต์เพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม. หน้า 3-11.
- ชนะพันธ์ พิริยานาสิน, ธาดา ระพันธ์วีรุต และรัชวัฒน์ ตั้งตระกูลพิพัฒน์. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- นฤตชวรรณ สัญญาโณ. 2556. การเก็บเกี่ยวและผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก. วิศวกรรมศาสตร์ มหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เบญจพร สุขอุ้ม, เสาวลักษณ์ อาดำ และเจี๊ญริดา เวาะเลง. 2555. การศึกษาการเจริญงอกประกอบของ เซลล์และการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประกาศิต สีเที่ยงธรรม และอนุพันธ์ เดชจบ. 2555. การคัดเลือกและศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการผลิตไขมันสูง. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- พนิดา รัตนพลที. 2552. การประยุกต์ใช้สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตไบโอดีเซล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พิจักษ์ ภัทรสุปรดี, ชัชวาล ทองวุฒิสักดิ์ และปานจิตร ศรีสุรา. 2554. การผลิตน้ำมันและจำหน่าย น้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายคลอเรลล่า. โครงการทางธุรกิจ หลักสูตรบริหารธุรกิจมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- แพรวพิลาศ ดุจจานุทัศน์ และผกาวดี แก้วกันเนตร. 2553. การใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร เป็นแหล่งอาหารให้สาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล. วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18(2) หน้า 10-14.
- มรกต ตันติเจริญ. 2554. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย : การวิจัยการผลิตน้ำมันจากสาหร่าย. วารสาร The TRF Forum 2.7 หน้า 29-32.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2556. สาหร่ายวิทยาน้ำจืดในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ยศวดี สวัสดิรักษา. 2557. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำทิ้ง จากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- รัตนภรณ์ ลีสิงห์. 2551. ไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 35 หน้า 135-143.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. แพลงก์ตอน. : บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย (Review of Biodiversity Research in Thailand). โครงการพัฒนาองค์ความรู้ และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. หน้า 1-20

- วรวิฑูมิ เกิดปราง. 2555. การใช้สาหร่ายขนนก *Caulerpa sertulaeioides* เพื่อกระตุ้นการลอกคราบของปูหิน. สาขาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง.
- สุวิมล ทรัพย์ทวีฑูมิ. 2553. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่เร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสตรึงรูป. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อาภรณ์ บัวหลวง, สมบัติ คงวิทยา และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. 2556. แนวทางการใช้ประโยชน์จากตะไคร่น้ำ. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้.
- อชวาน เจอะอาแวง, วันเฉลิม สังข์ทอง และสินทิพย์ ด้านสุวรรณเมฆ. 2556. การคัดเลือกสายพันธุ์ การเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Agarwal R, Ping SJ, Andersen MJ and Saha C., 2006. Home Blood Pressure Monitoring Improve the Diagnosis of Hypertension in Hemodialysis Patients. *Kidney International*. 69(5) : 900-906.
- Allen. M.M., 1968. Simple condition for growth of unicellular blue-green algae on plates *Journal of Phycology*. 4 : 1-3.
- Anderson Mary P., 2005. Heat as a Ground Water Tracer. Article first published 1745-6584.
- Amini S.R., Nujafabady, Mobasher M.A, Alhashemi S.H. and Ghasemi, Y., 2011. *Chlorella* sp. : A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *Applied Energy*. 88 : 3354-3356.
- Barsanti and Paolo Gualtieri., 2006. *Algae : anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- Boyle Nanette R. and Morgan John A., 2011. Computation of metabolic fluxes and efficiencies for biological carbon dioxide fixation. *Metabolic Engineering* 13(2) : 150-158.
- Camacho Rubio F, Sánchez Mirón A, Cerón García MC, García Camacho F, Molina Grima E and Chisti Y., 2006 Mixing in bubble columns. a new approach for characterizing dispersion coefficients. *Chem Eng* 59 : 4369-4376.
- Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X., Wang, J., 2012. Biodiesel production from algae

- oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresour. Technol.* 111 : 208–214.
- Chisti Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25 : 294–306.
- Cooksey K.E., Guckert J.B., Williams S.A. and Callis P.R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid-content of microalgal cells using Nile red. *J. Microbiol. Meth.* 6 : 333–345.
- Eltgroth M.L., Watwood R.L. and Wolfe G.V., 2005. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliana huxleyi*. *J. Phycol.* 41 : 1000–1009.
- Demirbas M. F., 2011. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy.* 88 : 3473-3480.
- Fei-Fei Chu., Pei-Na Chu., Xiao-Fei Shen., Paul K.S. Lam and Raymond J. Zeng., 2014. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology* 152 : 241–246.
- Fukuda K. and Kikuchi Y., 2005. Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification. *Development, Growth & Differentiation* 47(6) : 343-355.
- Guschina I.A. and Harwood J.L., 2006. Lipids and Lipid Metabolism in Eukaryotic Algae. *Progress in Lipid Research*, 45 : 160-186.
- Ho S.H., Chen W.M. and Chang, J.S., 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101 : 8725–8730.
- Ho S.H., Chen C.Y. and Chang, J.S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 113 : 244–252.
- Hong-Yu Ren., Bing-Feng Liu., Fanying Kong., Lei Zhao., Guo-Jun Xie. and Nan-Qi Ren., 2014. Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresource Technology* 169 : 763–767.

- Illman, W. A. and P. J. Alvarez., 2009. Performance assessment of bioremediation and natural attenuation, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(4) : 209-270.
- Isik O., Sarihan E., Kusvuran E., Gul O. and Erbatur O., 1999. Comparison of the fatty acid composition of the freshwater fish larvae *Tilapia zillii*, the rotifer *Brachionus calyciflorus*, and the microalgae *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minutum* and *Chlorella vulgaris* in the algae-rotifer-fish larvae food chains. *Aquaculture*. 174 : 299-311.
- Izard J. and Limberger R.J., 2003. Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of Microbiological Methods*. 55 : 411-418.
- Knothe G., 2009. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci*. 2 : 759-766.
- Latreille MT, Mirande M. and Martinez R., 1991. A PMR2 tandem repeat with a modified C-terminus is located downstream from the KRS1 gene encoding lysyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 227(1) : 149-154.
- Li X., Xu H. and Wu Q., 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng*. 98 (4) : 764-771.
- Li X., Hu H.Y. and Zhang Y.P., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol*. 102 : 3098-3102.
- Mandotra S.K., Pankaj Kumar., Suseela M.R. and Ramteke P.W., 2014. Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: A potential feedstock for high quality biodiesel production. *Bioresource Technology* 156 : 42-47.
- MA., Rieger M., Heesen S., Ram AF., Ende H., Aebi M. and Klis FM., 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* CWH8 gene is required for full levels of dolichol-linked oligosaccharides in the endoplasmic reticulum and for efficient N-glycosylation. *Glycobiology* 9(3) : 243-53.
- Martha T., Arias-Penaranda., Eliseo Cristiani-Urbina., Carmen Montes-Horcasitas.,

- Fernando Esparza-García, Giuseppe Torzillo. and Rosa Olivia Canizares-Villanueva., 2013. *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-Si01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production. *Bioresource Technology* 140 : 158–164.
- Molina Grima E., Sfinchez Pérez J.A., Garcla Camacho F., Garcla Sfinchez J.L., Ación Ferngmdex F.G. and Alonso D. López b., 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor. *Biotechnology* 37 : 159-166.
- Morowwat M., Rasoul-Amini S. and Ghasemi Y., 2010. *Chlamydomonas* as a new organism for biodiescl production. *Bioresour Technol* 101 : 2059-2062.
- On-Anong., Kanjama Prosit. and Suvilai., 1976. Growth comparion of *Senedesmus* sp. and *Chlorella* sp. The prodation and utilization of algae as a protein soure in Thailand. : 63-72.
- Perez-Garcia A., Romero D. and de Vicente A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr Opin Biotechnol.* 22 : 187–193.
- Qiang Lin., Na Gu. and Junda Lin., 2012. Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. *Bioresource Technology* 112 : 242–247.
- Rao S.C. ; Northup B. K., Phillips, W. A. and Mayeux H. S., 2007. Interseeding novel cool-season annual legumes to improve bermudagrass paddocks. *Crop Sci.*, 47(1) : 168-173.
- Reed R., Wilkinson S., Bilos A. and Schulte K.W.A., 2011. Comparison of international sustainable building tools—an update. In : *The 17th Annual Pacific Rim Real Estate Society Conference.* Gold Coast. : 16–19.
- Shimada T., Kawai T., Takeda K., Matsumoto M., Inoue J., Tatsumi Y., Kanamaru A. and Akira S., 1999. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. 11(8) : 1357-62.
- Talebi A.F., Mohtashami S.K., Tabatabaei M., Tohidfar M., Bagheri A., Zeinalabedine M., Mirzaei H.H., Mirzajanzadeh M., Shafaroudi S.M. and Bakhtiari S., 2013. Fatty acids

profiling : A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*. 2 : 258-267.

Tang D., Han W., Li P., Miao X. and Zhou J., 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Secenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresour Technol*. 102 : 3071-3076.

Widjaja A., Chien C. and Ju Y., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40 : 13-20.

Wu KK., Sanduja R., Tsai A-L., Ferhanoglu B. and Loose-Mitchell DS., 1991. Aspirin inhibits interleukin 1-induced prostaglandin H synthase expression in cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 2384-2387.

[Online]. Available : [http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal\\_biofuel\\_mar57.pdf](http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal_biofuel_mar57.pdf)  
(09 November 2013)

[Online]. Available : <http://tar.thailis.or.th/bitstream/123456789/251/1/d53.pdf> (09 November 2013)

[Online]. Available : <http://ipesp.ac.th/learning/biocheme/html/bt4.pdf> (24 April 2014)

[Online]. Available : [http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2556/amicro40356dd\\_ch5.pdf](http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2556/amicro40356dd_ch5.pdf) (04 June 2015)

[Online]. Available : [http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2556/amicro40356dd\\_ch5.pdf](http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2556/amicro40356dd_ch5.pdf) (04 June 2015)

[Online]. Available : <http://home.kku.ac.th/chuare/12/spectrophotometer.pdf>  
(16 June 2015)

ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย**

**ก-1 อาหารสูตร BG-11 สูตรอาหารเหลว (Allen 1968)**

โซเดียมไนเตรท (NaNO <sub>3</sub> )	1.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.04	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.075	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	0.036	กรัมต่อลิตร
กรดซิตริก (Citric acid)	0.006	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียเฟอร์ริกซิเตรท (Ammonium ferric citrate)	0.006	กรัมต่อลิตร
โซเดียมเอทิลีน ไดอะมีน เตตระอะซิก (EDTANa <sub>2</sub> )	0.001	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0.02	กรัมต่อลิตร
Trace element	1	กรัมต่อลิตร

**Trace element**

กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	2.86	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O)	1.81	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.02	กรัมต่อลิตร
โซเดียมโมลิบเดต (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O)	0.39	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O)	0.08	กรัมต่อลิตร
โคบอลท์ ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต (Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O)	0.05	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าพีเอชเป็น 7.1 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

**ก-2 อาหารสูตร BG-11 สูตรอาหารแข็ง**

อาหารเหลว BG-11	100	มิลลิลิตร
วุ้น (Agar)	1.5	กรัม

## ภาคผนวก ข

### การวัดอากาศและความเข้มแสง

#### ข-1 การวัดระดับน้ำจากขวดโหลเพาะเลี้ยงที่ให้อัตราการไหลของอากาศต่างกัน

ตารางที่ ข-1 การวัดระดับน้ำจากการให้อากาศแบบสายยางปกติ สามทางเจาะรู และอัตราการไหลขออากาศที่ 190, 340, 600, 160, 330 และ640 มิลลิลิตรต่ออนาที เป็นเวลา 3 วัน

หัวข้อ	สามทางเจาะรู			สายยางปกติ		
	1	3	5	2	4	6
อัตราการไหลของอากาศ (มิลลิลิตรต่ออนาที)	190	340	600	160	330	640
ความสูงของน้ำเริ่มต้น (เซนติเมตร)	6	6	6	6	6	6
ความสูงของน้ำที่ลดลง (เซนติเมตร)	0.2	1.2	1.8	0.5	1.4	1.9
ความสูงของน้ำที่เหลือ (เซนติเมตร)	5.8	4.8	4.2	5.5	4.6	4.1



รูปที่ ข-1 การวัดระดับน้ำจากการให้อัตราการไหลของอากาศที่แตกต่างกัน

## ข-2 การวัดและนับฟองอากาศในสภาวะป้อนให้อากาศขนาดใหญ่และขนาดเล็ก

ตารางที่ ข-2 การวัดฟองอากาศในสภาวะป้อนให้อากาศขนาดใหญ่ จำนวน 20 ฟอง

ฟองที่	ขนาดฟองอากาศที่วัดได้		ขนาดฟองอากาศจริง		พื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจน ไปสู่อาหารเหลว
	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (เซนติเมตร)	ความยาว (เซนติเมตร)	
1	3.99	3.70	1.000000	0.927318	12.57143
2	3.99	3.70	1.000000	0.927318	12.57143
3	3.70	3.00	0.927318	0.75188	10.81041
4	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
5	5.29	3.99	1.325815	1.000000	22.09786
6	3.99	3.99	1.000000	1.000000	12.57143
7	3.99	3.99	1.000000	1.000000	12.57143
8	3.99	3.99	1.000000	1.000000	12.57143
9	3.00	3.00	0.75188	0.75188	7.106919
10	3.99	3.99	1.000000	1.000000	12.57143
11	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
12	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
13	2.93	2.65	0.734336	0.66416	6.779132
14	3.99	3.99	1.000000	1.000000	12.57143
15	3.99	1.99	1.000000	0.498747	12.57143
16	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
17	3.99	3.99	1.000000	1.000000	12.57143
18	3.99	1.99	1.000000	0.498747	12.57143
19	3.99	3.99	1.000000	1.000000	12.57143
20	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143



รูปที่ ข-2 ป้อนให้อากาศขนาดใหญ่



รูปที่ ข-3 การวัดขนาดฟองอากาศ (ป้อนใหญ่)

ตารางที่ ข-3 การวัดฟองอากาศในสภาวะบีบให้อากาศขนาดเล็ก จำนวน 20 ฟอง

ฟองที่	ขนาดฟองอากาศที่วัดได้		ขนาดฟองอากาศ		พื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจน ไปสู่อาหารเหลว
	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (เซนติเมตร)	ความยาว (เซนติเมตร)	
1	6.00	3.99	1.503759	1.000000	28.42767
2	6.00	3.99	1.503759	1.000000	28.42767
3	6.99	4.99	1.75188	1.250627	38.58275
4	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
5	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
6	4.99	3.00	1.250627	0.75188	19.66255
7	6.00	3.99	1.503759	1.000000	28.42767
8	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
9	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
10	4.99	3.99	1.250627	1.000000	19.66255
11	4.99	3.99	1.250627	1.000000	19.66255
12	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
13	4.99	3.00	1.250627	0.75188	19.66255
14	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143
15	4.99	3.72	1.250627	0.932331	19.66255
16	4.99	3.99	1.250627	1.000000	19.66255
17	4.99	3.99	1.250627	1.000000	19.66255
18	4.99	3.99	1.250627	1.000000	19.66255
19	4.99	3.99	1.250627	1.000000	19.66255
20	3.99	3.00	1.000000	0.75188	12.57143



รูปที่ ข-4 บีบให้อากาศขนาดเล็ก



รูปที่ ข-5 การวัดขนาดฟองอากาศ (ปั๊มเล็ก)

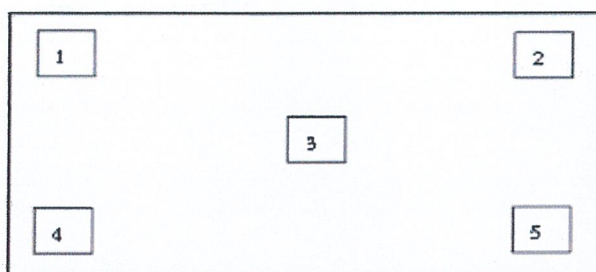
ตารางที่ ข-4 การนับฟองอากาศในเวลา 30 นาที

สภาวะการให้อากาศ	เวลาในการนับ (นาที)	จำนวนฟองอากาศที่นับได้	เฉลี่ยขนาดฟองอากาศ (ซม.)
ปั๊มขนาดใหญ่	30	34,920	12.34
ปั๊มขนาดเล็ก	30	36,000	19.44

ข-3 การวัดแสงด้วยเครื่องลักซ์มิเตอร์

ตารางที่ ข-5 ค่าการวัดแสงด้วยเครื่องลักซ์มิเตอร์ บนเครื่องเขย่า กว้าง 70 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร ที่ติดไฟจำนวน 3 หลอด

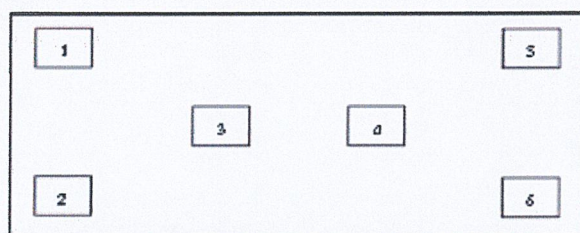
ตำแหน่งที่	1	2	3	4	5	
ค่าการวัดแสง (ลักซ์)	ซ้ำที่ 1	3090	2530	4480	2210	2800
	ซ้ำที่ 2	2150	2800	4470	2940	2610
	ค่าเฉลี่ย	2,620	2,665	4,475	2,575	2,705
รวมค่าเฉลี่ยทั้งหมด (ลักซ์)	3,008					
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	8.27E+02					



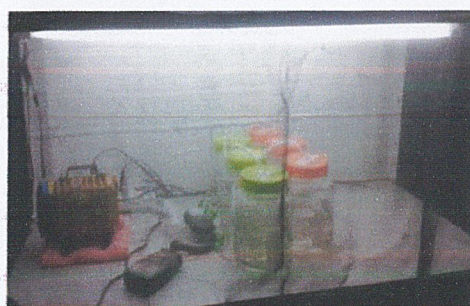
รูปที่ ข-6 ตำแหน่งการให้แสงบนเครื่องเขย่า

ตารางที่ ข-6 ผลการวัดแสงด้วยเครื่องลักซ์มิเตอร์ บนชั้นที่ใช้เลี้ยง กว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร ที่ติดไฟจำนวน 3 หลอด

ตำแหน่งที่	1	2	3	4	5	6	
ค่าการวัดแสง (ลักซ์)	ซ้าที่ 1	2,270	2,330	4,450	2,150	1,940	4,170
	ซ้าที่ 2	2,250	2,340	4,520	2,010	2,050	3,890
	ค่าเฉลี่ย	2,260	2,335	4,485	2,080	1,995	4,030
รวมค่าเฉลี่ยทั้งหมด (ลักซ์)	2,864						
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.05E+03						



รูปที่ ข-7 ตำแหน่งการวัดแสงบนชั้นเพาะเลี้ยง



รูปที่ ข-8 การวัดแสงด้วยลักซ์มิเตอร์บนชั้นเพาะเลี้ยง

## ภาคผนวก ค

### ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในสภาวะต่างๆ

#### ค-1 สภาวะเขย่าและการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedenmus armatus*

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ทำการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้เซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (หัวเชื้อ)  $10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 11 กุมภาพันธ์-6 มีนาคม 2558 รวม 24 วัน

ค-1.1 การวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ ค-1 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11

วันที่เก็บ	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์ แห้ง	ค่าเปรียบเทียบ มาตรฐาน
	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.00E+00
3	1.0030	1.0037	0.0007	1.0028	1.0030	0.0002	1.0107	1.0114	0.0007	0.00053	2.89E-04
6	1.0027	1.0037	0.0010	1.0166	1.0171	0.0005	1.0117	1.0125	0.0008	0.00077	2.52E-04
8	1.0170	1.0176	0.0006	1.0119	1.0125	0.0006	1.0118	1.0128	0.0010	0.00073	2.31E-04
10	1.0079	1.0082	0.0003	1.0120	1.0122	0.0002	1.0168	1.0172	0.0004	0.00030	1.00E-04
13	1.0149	1.0172	0.0023	1.0070	1.0091	0.0021	1.0100	1.0123	0.0023	0.00223	1.15E-04
15	1.0100	1.0124	0.0024	1.0045	1.0069	0.0024	1.0156	1.0178	0.0022	0.00233	1.15E-04
17	1.0028	1.0045	0.0017	1.0028	1.0049	0.0021	1.0110	1.0127	0.0017	0.00183	2.31E-04
20	1.0140	1.0152	0.0012	1.0117	1.0128	0.0011	1.0096	1.0110	0.0014	0.00123	1.53E-04
21	1.0024	1.0038	0.0014	1.0079	1.0092	0.0013	1.0056	1.0071	0.0015	0.00140	1.00E-04
24	0.9206	0.9214	0.0008	0.9137	0.9143	0.0006	0.9237	0.9244	0.0007	0.0007	1.00E-04

ตารางที่ ค-2 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตรกนูโคส 5 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์ แห้ง	ค่าเปรียบเทียบ มาตรฐาน
	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)		
	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
3	1.0123	1.0129	0.0006	1.0038	1.0040	0.0002	1.0030	1.0034	0.0004	0.00036	2.00E-04
6	1.0081	1.0095	0.0014	1.0158	1.0170	0.0012	1.0126	1.0137	0.0011	0.00120	1.53E-04
8	1.0161	1.0174	0.0013	1.0164	1.0177	0.0013	1.0054	1.0074	0.0020	0.00158	4.04E-04
10	1.0021	1.0027	0.0006	1.0052	1.0060	0.0008	1.0112	1.0116	0.0004	0.00060	2.00E-04
13	1.0145	1.0173	0.0028	1.0110	1.0123	0.0013	1.0159	1.0186	0.0027	0.00216	8.39E-04
15	1.0084	1.0104	0.0020	1.0156	1.0177	0.0021	1.0022	1.0046	0.0024	0.00220	2.08E-04
17	1.0138	1.0154	0.0016	1.0052	1.0072	0.0020	1.0078	1.0101	0.0023	0.00204	3.51E-04
20	1.0163	1.0173	0.0010	1.0127	1.0135	0.0008	1.0081	1.0095	0.0014	0.00108	3.06E-04
21	1.0080	1.0092	0.0012	1.0095	1.0106	0.0011	1.0160	1.0176	0.0016	0.00132	2.65E-04
24	0.9135	0.9141	0.0006	0.9147	0.9147	0.0000	0.9216	0.9220	0.0004	0.00028	3.06E-04

ตารางที่ ค-3 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตรเกลือโคส 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์ แห้ง	ค่าเปรียบเทียบ มาตรฐาน
	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)		
	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
3	1.0128	1.0131	0.0003	1.0094	1.0100	0.0006	1.0056	1.0062	0.0006	0.00050	1.73E-04
6	1.0167	1.0184	0.0017	1.0170	1.0184	0.0014	1.0020	1.0044	0.0024	0.00183	5.13E-04
8	1.0173	1.0187	0.0014	1.0092	1.0111	0.0019	1.0055	1.0073	0.0018	0.00170	2.65E-04
10	1.0164	1.0167	0.0003	1.0035	1.0040	0.0005	1.0034	1.0045	0.0011	0.00063	4.16E-04
13	1.0129	1.0147	0.0018	1.0114	1.0134	0.0020	1.0069	1.0084	0.0015	0.00177	2.52E-04
15	1.0023	1.0045	0.0022	1.0084	1.0107	0.0023	1.0045	1.0067	0.0022	0.00223	5.77E-05
17	1.0120	1.0137	0.0017	1.0070	1.0096	0.0026	1.0140	1.0155	0.0015	0.00193	5.86E-04
20	1.0169	1.0180	0.0011	1.0033	1.0045	0.0012	1.0060	1.0074	0.0014	0.00123	1.53E-04
21	1.0124	1.0139	0.0015	1.0109	1.0123	0.0014	1.0055	1.0069	0.0014	0.00143	5.77E-05
24	0.9137	0.9144	0.0007	0.9144	0.9150	0.0006	0.9233	0.9237	0.0004	0.00057	1.53E-04

ตารางที่ ค-4 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตรกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์ แห้ง	ค่าเปรียบเทียบ มาตรฐาน
	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.00000	0.00E+00
3	1.0117	1.0124	1.0120	1.0122	1.0052	1.0060	0.0008	0.00057	3.21E-04
6	1.0166	1.0182	1.0031	1.0056	1.0078	1.0102	0.0024	0.00217	4.93E-04
8	1.0177	1.0198	1.0165	1.0189	1.0080	1.0107	0.0027	0.00240	3.00E-04
10	1.0164	1.0178	1.0165	1.0174	1.0031	1.0041	0.0010	0.00110	2.65E-04
13	1.0153	1.0178	1.0128	1.0155	1.0083	1.0109	0.0026	0.00260	1.00E-04
15	1.0110	1.0137	1.0152	1.0177	1.0155	1.0183	0.0028	0.00267	1.53E-04
17	1.0022	1.0046	1.0038	1.0048	1.0162	1.0187	0.0025	0.00197	8.39E-04
20	1.0164	1.0180	1.0026	1.0043	1.0165	1.0180	0.0015	0.00160	1.00E-04
21	1.0120	1.0139	1.0171	1.0188	1.0079	1.0094	0.0015	0.00170	2.00E-04
24	0.9237	0.9243	0.9157	0.9159	0.9202	0.9207	0.0005	0.00043	2.08E-04

ตารางที่ ค-5 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตรกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย น้ำหนักเซลล์ แห้ง	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)	น้ำหนัก หลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอด แห้ง+เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อ3 มิลลิลิตร)		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.00E+00
3	1.0087	1.0095	0.0008	1.0117	1.0123	0.0006	1.0095	1.0150	0.0055	0.00230	2.77E-03
6	1.0028	1.0045	0.0017	1.0086	1.0106	0.0020	1.0095	1.0126	0.0031	0.00227	7.37E-04
8	1.0111	1.0131	0.0020	1.0028	1.0054	0.0026	1.0155	1.0191	0.0036	0.00273	8.08E-04
10	1.0092	1.0099	0.0007	1.0111	1.0123	0.0012	1.0133	1.0161	0.0028	0.00157	1.10E-03
13	1.0071	1.0095	0.0024	1.0155	1.0185	0.0030	1.0099	1.0135	0.0036	0.00300	6.00E-04
15	1.0210	1.0250	0.0040	1.0049	1.0081	0.0032	1.0101	1.0139	0.0038	0.00367	4.16E-04
17	1.0164	1.0222	0.0058	1.0052	1.0074	0.0022	1.0111	1.0170	0.0059	0.00463	2.11E-03
20	1.0125	1.0152	0.0027	1.0163	1.0183	0.0020	1.0052	1.0079	0.0027	0.00247	4.04E-04
21	1.0158	1.0176	0.0018	1.0053	1.0076	0.0023	1.0057	1.0084	0.0027	0.00227	4.51E-04
24	0.9105	0.9115	0.0010	0.9171	0.9180	0.0009	0.9206	0.9224	0.0018	0.00123	4.93E-04

ค-1.2 การวัดการเจริญเติบโตโดยวิธีการนับฮีมาไซโตมิเตอร์

ตารางที่ ค-6 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์สาหร่าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0	10,000	10,000	10,000	10,000	0.00E+00
3	32,000	34,000	40,000	35,333	4.16E+03
6	80,000	80,000	84,000	81,333	2.31E+03
8	120,000	122,000	120,000	120,667	1.15E+03
10	146,000	138,000	152,000	145,333	7.02E+03
13	172,000	158,000	176,000	168,667	9.45E+03
15	154,000	148,000	160,000	154,000	6.00E+03
17	174,000	192,000	178,000	181,333	9.45E+03
20	93,000	105,000	115,000	104,333	1.10E+04
21	118,000	110,000	114,000	114,000	4.00E+03
24	89,000	93,000	90,000	90,667	2.08E+03

ตารางที่ ค-7 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตรกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์สาหร่าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0	10,000	10,000	10,000	10,000	0.00E+00
3	40,000	36,000	42,000	39,333	3.06E+03
6	112,000	102,000	94,000	102,667	9.02E+03
8	128,000	120,000	162,000	136,667	2.23E+04
10	106,000	94,000	128,000	109,333	1.72E+04
13	114,000	94,000	138,000	115,333	2.20E+04
15	62,000	160,000	148,000	123,333	5.35E+04
17	54,000	86,000	130,000	90,000	3.82E+04
20	18,000	16,000	47,000	27,000	1.73E+04
21	14,000	13,000	33,000	20,000	1.13E+04
24	11,000	11,000	30,000	17,333	1.10E+04

ตารางที่ ค-8 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตรกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์สาหร่าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0	10,000	10,000	10,000	10,000	0.00E+00
3	28,000	30,000	48,000	35,333	1.10E+04
6	134,000	120,000	116,000	123,333	9.45E+03
8	120,000	128,000	114,000	120,667	7.02E+03
10	110,000	162,000	122,000	131,333	2.72E+04
13	94,000	92,000	94,000	93,333	1.15E+03
15	52,000	48,000	60,000	53,333	6.11E+03
17	44,000	32,000	38,000	38,000	6.00E+03
20	10,000	10,000	800	6,933	5.31E+03
21	700	700	600	667	5.77E+01
24	700	400	500	533	1.53E+02

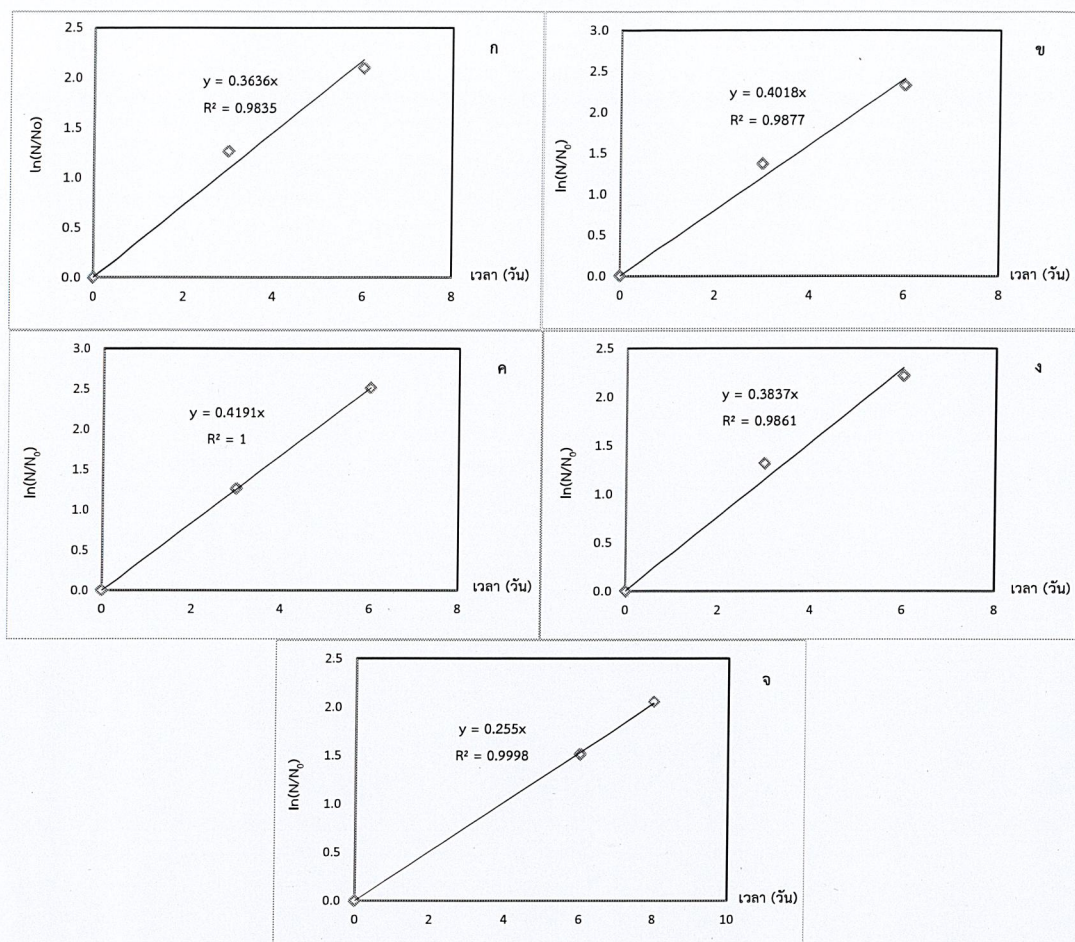
ตารางที่ ค-9 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตรกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์สาหร่าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0	10,000	10,000	10,000	10,000	0.00E+00
3	40,000	32,000	40,000	37,333	4.62E+03
6	78,000	102,000	96,000	92,000	1.25E+04
8	108,000	96,000	104,000	102,667	6.11E+03
10	116,000	106,000	108,000	110,000	5.29E+03
13	82,000	90,000	88,000	86,667	4.16E+03
15	58,000	42,000	54,000	51,333	8.33E+03
17	48,000	38,000	52,000	46,000	7.21E+03
20	18,000	16,000	18,000	17,333	1.15E+03
21	13,000	11,000	13,000	12,333	1.15E+03
24	11,000	900	12,000	7,967	6.14E+03

ตารางที่ ค-10 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตรกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์สาหร่าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0	10,000	10,000	10,000	10,000	0.00E+00
3	44,000	48,000	44,000	45,333	2.31E+03
6	72,000	84,000	78,000	78,000	6.00E+03
8	72,000	102,000	78,000	84,000	1.59E+04
10	62,000	162,000	100,000	108,000	5.05E+04
13	400	82,000	94,000	58,800	5.09E+04
15	600	50,000	44,000	31,533	2.70E+04
17	600	40,000	36,000	25,533	2.17E+04
20	200	19,000	16,000	11,733	1.01E+04
21	200	12,000	900	4,367	6.62E+03
24	100	900	700	567	4.16E+02

นำระยะเอ็กโปเนนเชียล (Exponential phase) หรือระยะที่เซลล์แบ่งตัวทวีคูณ มาเขียนความสัมพันธ์ระหว่าง  $\ln(N/N_0)$  กับวันที่เก็บตัวอย่าง เพื่อหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ดังรูปที่ ค-1



รูปที่ ค-1 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ก อาหารสูตร BG-11 และข, ค, ง และจ อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ค-1.3 การวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (นาโนเมตร)

ตารางที่ ค-11 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 ที่ 560 และ 680 นาโนเมตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร						ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
0	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00		0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00	
3	0.304	0.210	0.260	0.25800	4.70E-02		0.384	0.294	0.342	0.34000	4.50E-02	
6	0.478	0.392	0.562	0.47733	8.50E-02		0.558	0.484	0.638	0.56000	7.70E-02	
8	0.578	0.648	0.576	0.60067	4.10E-02		0.748	0.790	0.744	0.76067	2.55E-02	
10	0.636	0.668	0.710	0.67133	3.71E-02		0.776	0.800	0.832	0.80267	2.81E-02	
13	0.686	0.626	0.658	0.65667	3.00E-02		0.840	0.786	0.826	0.81733	2.80E-02	
15	0.712	0.662	0.604	0.65933	5.40E-02		0.844	0.836	0.804	0.82800	2.12E-02	
17	0.722	0.608	0.696	0.67533	5.97E-02		0.838	0.694	0.802	0.77800	7.49E-02	
20	0.593	0.573	0.599	0.58833	1.36E-02		0.693	0.661	0.710	0.68800	2.49E-02	
21	0.591	0.557	0.606	0.58467	2.51E-02		0.684	0.629	0.697	0.67000	3.61E-02	
24	0.598	0.508	0.582	0.56267	4.80E-02		0.641	0.548	0.635	0.60800	5.20E-02	

ตารางที่ ค-12 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ที่ 560 และ 680 นาโนเมตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร						ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
0	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00		
3	0.206	0.268	0.212	0.22867	3.42E-02	0.334	0.374	0.352	0.35333	2.00E-02		
6	0.762	0.668	0.542	0.65733	1.10E-01	0.844	0.772	0.660	0.75867	9.27E-02		
8	0.656	0.596	0.686	0.64600	4.58E-02	0.782	0.714	0.835	0.77700	6.07E-02		
10	0.526	0.484	0.554	0.52133	3.52E-02	0.626	0.576	0.782	0.66133	1.07E-01		
13	0.442	0.390	0.570	0.46733	9.26E-02	0.732	0.652	0.782	0.72200	6.56E-02		
15	0.212	0.274	0.364	0.28333	7.64E-02	0.690	0.602	0.674	0.65533	4.69E-02		
17	0.226	0.398	0.448	0.35733	1.16E-01	0.584	0.710	0.656	0.65000	6.32E-02		
20	0.315	0.274	0.346	0.31167	3.61E-02	0.477	0.424	0.546	0.48233	6.12E-02		
21	0.297	0.227	0.258	0.26067	3.51E-02	0.495	0.393	0.432	0.44000	5.15E-02		
24	0.299	0.251	0.293	0.28100	2.62E-02	0.432	0.381	0.438	0.41700	3.13E-02		

ตารางที่ ค-13 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตร กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ที่ 560 และ 680 นาโนเมตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร						ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
0	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00		0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00	
3	0.310	0.310	0.350	0.32333	2.31E-02		0.310	0.310	0.350	0.32333	2.31E-02	
6	0.566	0.520	0.510	0.53200	2.99E-02		0.566	0.520	0.510	0.53200	2.99E-02	
8	0.368	0.446	0.446	0.42000	4.50E-02		0.368	0.446	0.446	0.42000	4.50E-02	
10	0.668	0.804	0.764	0.74533	6.99E-02		0.668	0.804	0.764	0.74533	6.99E-02	
13	0.586	0.610	0.618	0.60467	1.67E-02		0.586	0.610	0.618	0.60467	1.67E-02	
15	0.426	0.546	0.489	0.48700	6.00E-02		0.426	0.546	0.489	0.48700	6.00E-02	
17	0.256	0.478	0.325	0.35300	1.14E-01		0.256	0.478	0.325	0.35300	1.14E-01	
20	0.285	0.315	0.280	0.29333	1.89E-02		0.285	0.315	0.280	0.29333	1.89E-02	
21	0.380	0.388	0.204	0.32400	1.04E-01		0.380	0.388	0.204	0.32400	1.04E-01	
24	0.246	0.274	0.254	0.25800	1.44E-02		0.246	0.274	0.254	0.25800	1.44E-02	

ตารางที่ ค-14 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ที่ 560 และ 680 นาโนเมตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร						ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร								
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00
3	0.160	0.254	0.182	0.19867	4.92E-02	0.160	0.254	0.182	0.19867	4.92E-02	0.160	0.254	0.182	0.19867	4.92E-02
6	0.860	1.014	0.826	0.90000	1.00E-01	0.860	1.014	0.826	0.90000	1.00E-01	0.860	1.014	0.826	0.90000	1.00E-01
8	1.060	1.044	0.968	1.02400	4.92E-02	1.060	1.044	0.968	1.02400	4.92E-02	1.060	1.044	0.968	1.02400	4.92E-02
10	1.058	0.904	1.054	1.00533	8.78E-02	1.058	0.904	1.054	1.00533	8.78E-02	1.058	0.904	1.054	1.00533	8.78E-02
13	0.802	0.764	0.792	0.78600	1.97E-02	0.802	0.764	0.792	0.78600	1.97E-02	0.802	0.764	0.792	0.78600	1.97E-02
15	0.312	0.582	0.488	0.46067	1.37E-01	0.312	0.582	0.488	0.46067	1.37E-01	0.312	0.582	0.488	0.46067	1.37E-01
17	0.178	0.092	0.182	0.15067	5.08E-02	0.178	0.092	0.182	0.15067	5.08E-02	0.178	0.092	0.182	0.15067	5.08E-02
20	0.049	0.062	0.053	0.05467	6.66E-03	0.049	0.062	0.053	0.05467	6.66E-03	0.049	0.062	0.053	0.05467	6.66E-03
21	0.132	0.167	0.248	0.18233	5.95E-02	0.132	0.167	0.248	0.18233	5.95E-02	0.132	0.167	0.248	0.18233	5.95E-02
24	0.159	0.098	0.199	0.15200	5.09E-02	0.159	0.098	0.199	0.15200	5.09E-02	0.159	0.098	0.199	0.15200	5.09E-02

ตารางที่ ค-15 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ที่ 560 และ 680 นาโนเมตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร						ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร					
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
0	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00		0.000	0.000	0.000	0.00000	0.00E+00	
3	0.262	0.316	0.312	0.29667	3.01E-02		0.262	0.316	0.312	0.29667	3.01E-02	
6	0.432	0.866	0.420	0.57267	2.54E-01		0.432	0.866	0.420	0.57267	2.54E-01	
8	0.224	1.664	0.884	0.92400	7.21E-01		0.224	1.664	0.884	0.92400	7.21E-01	
10	0.712	0.724	1.914	1.11667	6.91E-01		0.712	0.724	1.914	1.11667	6.91E-01	
13	0.672	0.908	1.512	1.03067	4.33E-01		0.672	0.908	1.512	1.03067	4.33E-01	
15	0.640	0.620	1.350	0.87000	4.16E-01		0.640	0.620	1.350	0.87000	4.16E-01	
17	0.506	0.456	0.982	0.64800	2.90E-01		0.506	0.456	0.982	0.64800	2.90E-01	
20	0.761	0.689	0.914	0.78800	1.15E-01		0.761	0.689	0.914	0.78800	1.15E-01	
21	0.992	0.814	1.156	0.98733	1.71E-01		0.992	0.814	1.156	0.98733	1.71E-01	
24	0.473	0.397	0.868	0.57933	2.53E-01		0.473	0.397	0.868	0.57933	2.53E-01	

ค-1.4 การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ตารางที่ ค-16 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11  
 ฝั่ง 3 ซ้ำการทดลอง

วันที่เก็บ (วัน)	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ค่าการ ดูดกลืนแสง (OD)	การเจือ จาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการ ดูดกลืนแสง (OD)	การเจือ จาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการ ดูดกลืนแสง (OD)	การเจือ จาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
3	0.108	2	0.163	0.107	2	0.162	0.120	2	0.181	0.1687	1.0928E-02
6	0.159	2	0.240	0.168	2	0.254	0.151	2	0.228	0.2407	1.2847E-02
8	0.185	2	0.279	0.195	2	0.295	0.180	2	0.272	0.2820	1.1537E-02
10	0.155	2	0.234	0.168	2	0.254	0.153	2	0.231	0.2397	1.2303E-02
13	0.179	2	0.270	0.161	2	0.243	0.183	2	0.276	0.2633	1.7702E-02

ตารางที่ ค-17 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง

วันที่เก็บ (วัน)	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
3	0.538	10	4.063	0.550	10	4.154	0.543	10	4.101	4.1062	4.5527E-02
6	0.498	10	3.761	0.488	10	3.686	0.511	10	3.860	3.7689	8.7104E-02
8	0.078	5	0.295	0.209	2	0.316	0.092	5	0.347	0.3192	2.6611E-02
10	0.990	2	1.495	0.245	2	0.370	0.121	2	0.183	0.6828	7.1001E-01
13	0.180	2	0.272	0.327	1	0.247	0.220	2	0.332	0.2837	4.3887E-02

ตารางที่ ค-18 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง

วันที่เก็บ (วัน)	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
3	0.497	20	7.508	0.502	20	7.583	0.505	20	7.628	7.5730	6.1049E-02
6	0.492	20	7.432	0.482	20	7.281	0.477	20	7.205	7.3061	1.1537E-01
8	0.102	5	0.385	0.251	2	0.379	0.105	5	0.397	0.3870	8.8189E-03
10	0.272	2	0.411	0.262	2	0.396	0.279	2	0.421	0.4094	1.2906E-02
13	0.262	5	0.989	0.301	5	1.137	0.282	5	1.065	1.0637	7.3649E-02

ตารางที่ ค-19 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง

วันที่เก็บ (วัน)	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)		
3	0.358	50	13.520	0.367	50	13.860	0.381	50	14.388	13.9225	4.3770E-01
6	0.367	50	13.860	0.376	50	14.199	0.402	50	15.181	14.4134	6.8637E-01
8	0.586	10	4.426	0.596	10	4.502	0.588	10	4.441	4.4562	3.9966E-02
10	0.185	5	0.699	0.282	3	0.639	0.201	5	0.759	0.6989	6.0046E-02
13	0.195	5	0.736	0.491	2	0.742	0.206	5	0.778	0.7520	2.2612E-02

ตารางที่ ค-20 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ซ้ำการทดลอง

วันที่เก็บ (วัน)	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	การเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)		
3	0.378	100	28.550	0.372	100	28.097	0.387	100	29.230	28.6254	5.7023E-01
6	0.317	100	23.943	0.356	100	26.888	0.302	100	22.810	24.5468	2.1053E+00
8	0.955	20	14.426	1.028	10	7.764	0.981	20	14.819	12.3364	3.9643E+00
10	0.633	10	4.781	0.645	10	4.872	0.670	10	5.060	4.9043	1.4257E-01
13	0.270	5	1.020	0.276	5	1.042	0.279	5	1.054	1.0385	1.7306E-02

**ค-2** สภาวะภายใต้ปมอัดอากาศและการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedenmus armatus*

การเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในโหลเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปมอัดอากาศที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในขวดโหลเพาะเลี้ยงขนาด 1,000 มิลลิตร ปริมาตร 600 มิลลิตร ให้อากาศแบบสายยางปกติที่ระดับ 190 มิลลิตรต่อ นาที โดยใช้สาหร่ายเริ่มต้น (หัวเชื้อ)  $10^5$  เซลล์ต่อมิลลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 23 กุมภาพันธ์ - 16 มีนาคม 2558 รวม 22 วัน

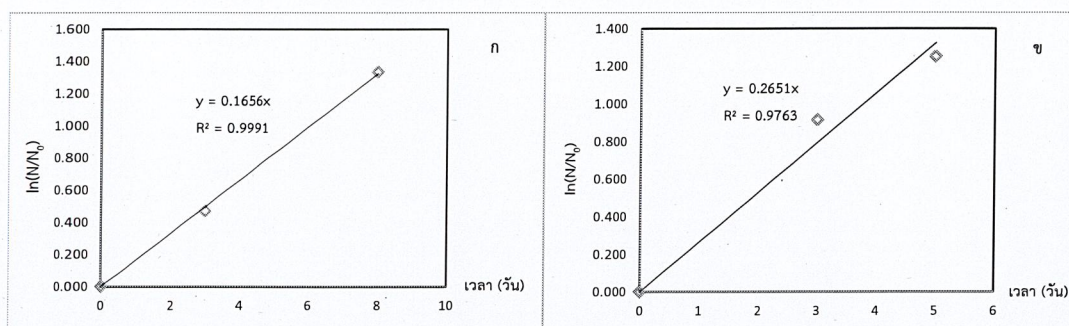
**ค-2.1** การวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ ค-21 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	BG-11					Glucose 10 g/l				
	น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอดแห้ง+ เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัม)	น้ำหนักหลอดแห้ง+ เซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	1.0015	1.0031	0.0016	0.0005	1.0026	1.0115	0.0089	0.0030	0.0030	0.0030
5	1.0050	1.0059	0.0009	0.0003	1.0039	1.0059	0.0020	0.0007	0.0007	0.0007
8	1.0164	1.0173	0.0009	0.0003	1.0081	1.0093	0.0012	0.0004	0.0004	0.0004
9	1.0164	1.0174	0.0010	0.0003	1.0079	1.0094	0.0015	0.0005	0.0005	0.0005
12	0.9171	0.9176	0.0005	0.0002	0.9159	0.9162	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001
15	0.9148	0.9155	0.0007	0.0002	0.9207	0.9215	0.0008	0.0003	0.0003	0.0003
17	0.9182	0.9183	0.0001	0.0000	0.9152	0.9152	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19	0.9112	0.9116	0.0004	0.0001	0.9143	0.9145	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001
22	1.0026	1.0035	0.0009	0.0003	1.0077	1.0102	0.0025	0.0008	0.0008	0.0008

### ค-2.2 การวัดการเจริญเติบโตโดยวิธีการนับฮีมาไซโตมิเตอร์

นำระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) หรือระยะที่เซลล์แบ่งตัวทวีคูณ มาเขียนความสัมพันธ์ระหว่าง  $\ln(N/N_0)$  กับวันที่เก็บตัวอย่าง เพื่อหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ดังรูปที่ ค-2



รูปที่ ค-2 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ก อาหารสูตร BG-11 และข อาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

### ค-2.3 การวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (นาโนเมตร)

ตารางที่ ค-22 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 และ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	ค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			
	BG-11		Glucose 10 g/l	
	560	680	560	680
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.133	0.172	0.278	0.275
5	0.206	0.269	0.675	0.591
8	0.310	0.378	0.556	0.527
9	0.339	0.388	0.516	0.481
12	0.492	0.552	0.494	0.482
15	0.569	0.625	0.489	0.486
17	0.617	0.695	0.427	0.434
19	0.615	0.692	0.405	0.418
22	0.587	0.685	0.416	0.438

ค-2.4 การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ตารางที่ ค-23 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ (วัน)	BG-11				Glucose 10 g/l			
	ค่าการดูดกลืนแสง 490 นาโนเมตร	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สีของ น้ำตาล	ค่าการดูดกลืนแสง 490 นาโนเมตร	ค่าการเจือจาง (เท่า)	ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สีของ น้ำตาล
1	0.192	2	0.29003	เขียว	0.786	13	7.71148	ส้ม
3	0.213	2	0.28852	เขียว	0.813	10	6.140483	ส้ม
5	0.181	2	0.321752	เขียว	0.163	5	0.615559	ม่วง
8	0.143	2	0.273414	เขียว	0.389	2	0.587613	ม่วง
9	0.211	2	0.216012	เขียว	0.285	3	0.64577	ม่วง