



การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล
Cultivation of algae to be material for biodiesel production



ผศ. ดร. ดวงกมล เรือนงาม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

๖๐๐๒๖๘๙๓๖

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

(ภาษาอังกฤษ) Cultivation of algae to be material for biodiesel production

แหล่งทุนวิจัย งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559.....

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน.....50,000.....บาท

ระยะเวลาในการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559.....

หัวหน้าโครงการ.....ผศ. ดร. ดวงกมล เว็ณนงม.....สังกัด.....ภาควิชาชีววิทยา.....คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เพื่อนำผลผลิตที่ได้หรือน้ำมันที่ได้ไปผลิตไบโอดีเซลซึ่งทำการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 วัน ในอาหารสูตร BG-11 และสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงโดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร BG-11 ที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตสูงสุดโดยมีค่าอัตราการเจริญแบบจำเพาะ (Specific growth rate, μ) 0.4191 ต่อวัน มีจำนวนเซลล์สูงสุด 1.313×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 0.0007 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 และ 680 นาโนเมตร คือ 0.745 และ 0.958 ตามลำดับ และสภาวะภายใต้ร่มอ้ออากาศ ให้อากาศแบบสายยางปกติที่อัตราการไหลของอากาศ 190 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 22 วัน ในอาหารสูตร BG-11 และสูตร BG-11 ที่เติมกลูโคสความเข้มข้นเดียวกับข้างต้น พบว่า สูตรอาหารที่ทำให้สาหร่ายมีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ สูตรอาหาร BG-11 ที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการเจริญแบบจำเพาะ (Specific growth rate, μ) 0.2651 ต่อวัน มีจำนวนเซลล์สูงสุด 0.420×10^5 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*

Research Title:.....Cultivation of algae to be material for biodiesel production.....

Researcher:Assist. Prof. Dr. Duangkamol Ruen-ngam.....

Faculty:Science.....Department:.....Biology.....

ABSTRACT

This work aims to study the cultivation conditions of *Scenedesmus armatus* in order to produce oil yield for Biodiesel production. *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 μ /day. The highest number of cell was found to be 1.313×10^5 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 μ /day, cell number was 0.420×10^5 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

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อให้สามารถผลิตไขมันปริมาณสูงในการผลิตไบโอดีเซล ผู้ทำงานวิจัยขอขอบพระคุณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์ห้วเชื้อสาหร่ายเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยงบวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2559 คณะวิทยาศาสตร์ งานวิจัยนี้ได้ดำเนินงานให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ.2555-2559) ด้านความเข้มแข็งทางภาคการเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน และสอดคล้องกับหัวข้อการวิจัยของ สจล. ในการวิจัยด้านเกษตรและอาหาร งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานทางสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และเป็นองค์ความรู้ที่มีประโยชน์ซึ่งสามารถต่อยอดในเชิงพาณิชย์ได้

ผศ. ดร. ดวงกมล เรือนงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความหมายของสาหร่าย (Algae).....	4
2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย.....	4
2.3 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta).....	5
2.4 การเลี้ยงสาหร่าย.....	5
2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	5
2.4.1.1 ปัจจัยทางกายภาพ.....	6
2.4.1.2 ปัจจัยทางเคมี.....	6
2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย.....	6
2.5 การเก็บเกี่ยว (Algal Harvesting).....	7
2.6 การสกัดสาร.....	8
2.7 การผลิตไบโอดีเซล.....	8
2.8 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	8
2.8.1 ตัวเร่งปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	9
2.8.1.1 การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกริยา.....	9
2.8.1.2 การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกริยา.....	9
2.8.1.3 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกริยา.....	10
2.9 กรดไขมันและกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก.....	11
2.9.1 กรดไขมัน.....	10
2.9.1.1 กรดไขมันอิ่มตัว.....	11
2.9.1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว.....	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์กรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก.....	12
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล.....	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	19
3.1 หัวเชื้อ.....	19
3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้.....	19
3.3 แผนผังการทดลอง.....	21
3.4 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	65
เอกสารอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	74
ภาคผนวก ค.....	78



สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1	สูตรโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัว และแหล่งของอาหาร.....	10
2.2	สูตรโครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัว จำนวนพันธะคู่ และแหล่งอาหาร.....	21
2.3	ชนิดของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้มาจาก <i>Chlorella</i> sp.	13
2.4	ชนิดของกรดไขมันในสาหร่ายแต่ละชนิดที่นำมาทดลอง.....	14
2.5	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง เถ้า ไขมัน และองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก.....	14
2.6	องค์ประกอบของตัวอย่างไบโอดีเซลของสาหร่าย <i>Scenedesmus incrassatulus</i>	15
3.1	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร.....	16
3.2	สถานะของแก๊สโครมาโทกราฟี.....	33
4.1	น้ำหนักรเซลล์แห้งเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	40
4.2	จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	41
4.3	ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	42
4.4	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	42
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	43
4.6	การวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ (นาโนเมตร) โดยเทียบจากสีของตัวกรองแสง และสีของสารละลาย.....	44
4.7	ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	45
4.8	การนับจำนวนฟองอากาศที่นับได้ในเวลา 30 นาที และพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว.....	41
4.9	น้ำหนักรเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร.....	47
4.10	จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร.....	48
4.11	ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า	
4.12	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.13 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	51
4.14 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	52
4.15 น้ำหนักสาหร่ายแห้ง (กรัมต่อมิลลิเมตร) ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว.....	54
4.16 น้ำหนักของน้ำมันสาหร่ายหลังระเหยเอาเฮกเซนแล้ว.....	55
4.17 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1).....	56
4.18 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2).....	57
4.19 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1).....	58
4.20 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2).....	59
4.21 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว.....	60
4.22 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร กลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2).....	61
4.23 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1).....	61
4.24 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหารกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2).....	62
4.25 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 1).....	63
4.26 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในสภาวะอาหาร BG-11 (ซ้ำที่ 2).....	64

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ <i>Scenedesmus armatus</i>	5
2.2 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายจากสาหร่าย	7
2.3 โครงสร้างทางเคมีของ ก. กรดไขมันชนิดอิ่มตัว ข. กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว.....	11
3.1 การเก็บรักษาเชื้อด้วยเทคนิค Simple Streak.....	23
3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะเขย่า	24
3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่มีการให้อากาศในขวดโหล.....	24
3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Minicentifuge) (รูปซ้าย) และเครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง (รูปขวา).....	25
3.5 ลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของสไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer)	27
3.6 ตารางที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์จากภาพจริง และที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	27
3.7 บริเวณที่ใช้ับจำนวนเซลล์.....	27
3.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer).....	28
3.9 สีของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานหลังจากผ่านวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก.....	28
3.10 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน.....	29
3.11 สาหร่ายหลังจากผ่านการ Centifuge (รูปซ้าย) และตู้เก็บรักษาตัวอย่างสาหร่ายที่อุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส (รูปขวา).....	30
3.12 ลักษณะของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ผ่านขั้นตอนการ Freeze dry แล้ว.....	30
3.13 การสกัดสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> โดยใช้เฮกเซน	31
3.14 น้ำมันสาหร่ายที่ละลายในเฮกเซนหลังจากผ่านการกรองแล้ว.....	31
3.15 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporater).....	32
3.16 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography).....	34
3.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(N/N_0)$ กับวันที่เก็บตัวอย่าง บริเวณลูกศรสีแดงคือค่าที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase).....	35
3.18 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, μ).....	35
4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	40
4.2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	41
4.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	44
4.5 สาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (รูปซ้าย) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคส (รูปขวา).....	45
4.6 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	45
4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	47
4.8 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	49
4.9 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	51
4.10 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	52
4.11 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย <i>Scenedenmus armatus</i> ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง.....	53
4.12 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะบ่มอัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว.....	54
4.13 การวิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1).....	56
4.14 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2).....	57
4.15 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 1).....	58
4.16 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 2).....	59
4.17 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1).....	59
4.18 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2).....	60
4.19 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1).....	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.20 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่
ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2).....62
- 4.21 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11
(ซ้ำที่ 1).....63
- 4.22 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11
(ซ้ำที่ 2).....64



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นในทุกๆ ปี เนื่องจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้กำลังจะหมดไป และการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลก่อให้เกิดการสะสมของก๊าซที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจกในชั้นบรรยากาศและภาวะโลกร้อน ไบโอดีเซลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Martha และคณะ 2013) ซึ่งในปีที่ผ่านมาไบโอดีเซลได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก แหล่งไบโอดีเซลหรือ Fatty acid Methyl Esters (FAMES) ได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันที่ใช้แล้วจากการปรุงอาหาร และสาหร่าย (Mandotra 2014) ฯลฯ ในหลายๆ ประเทศจะมีการนำเอาพืชน้ำมันมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เช่น ถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม มะพร้าว เป็นต้น แต่การใช้พืชน้ำมันเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลจะส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์การผลิตทางการเกษตร พืชน้ำมันเหล่านี้จะสามารถผลิตน้ำมันออกมาได้ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย ดังนั้นสาหร่ายจึงได้รับการยอมรับว่าเป็นวัตถุดิบที่สามารถผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งจะแตกต่างจากพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เนื่องจากสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทุกที่ตามแหล่งน้ำในระบบปิด และน้ำเสีย สาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตน้ำมันได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งผลิตได้ตลอดทั้งปีและมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงดังนั้นสาหร่ายจึงเป็นหนึ่งในวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตไบโอดีเซลได้ดีกว่าวัตถุดิบอื่นนั่นเอง (Mandotra และคณะ 2014) และจากงานวิจัยของ Martinez และคณะ (1991) ที่พบว่า *Chlorella vulgaris* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาเนื่องจากกลูโคสมีผลโดยตรงต่อกระบวนการใช้คาร์บอนในเมตาบอลิซึม ขนาดของเซลล์ ความหนาแน่นของสารต่าง ๆ ที่สะสมอยู่ในเซลล์ เช่น แป้งและไขมัน รวมทั้งโปรตีน คลอโรฟิลล์ RNA และวิตามิน ดังนั้นกลูโคสจึงเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งในการเจริญเติบโตและผลิตไขมันที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้ทดลองครั้งนี้ก็เป็นหนึ่งในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเช่นกัน จึงน่าจะมีความสามารถในการเพิ่มไขมันที่สามารถใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ (Martha และคณะ 2013)

การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายมี 4 ขั้นตอน ดังนี้ การเจริญเติบโต การเก็บเกี่ยว การสกัด และการเปลี่ยนน้ำมันให้เป็นไบโอดีเซล สำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายควรจะต้องมีกระบวนการในการผลิตที่ถูกต้อง ดังนั้นการคัดกรองของสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก และจะต้องมีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลายได้ การใช้อาหารที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อมวลรวมชีวภาพและปริมาณไขมันของสาหร่าย การดัดแปลงพันธุกรรมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการสะสมของไขมันในสาหร่าย แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันจะทำให้ปริมาณมวลรวมชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องหาสภาวะในการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่สูงและมีอัตราการผลิตไขมันที่เหมาะสม (Mandotra และคณะ 2014 และกลุ่มพัฒนามาตรฐานน้ำมันเชื้อเพลิง 2557) นอกจากนี้สภาวะในการเลี้ยงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญได้แก่ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ แสง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปัจจัยทางเคมี เช่น แหล่งคาร์บอน (กลูโคส, ฟรุกโตส, อะซิเตรท) แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนีย, โซเดียมไนเตรท, ยูเรีย) และการเติมกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะทำให้สาหร่ายมีพลังงานเพียงพอต่อความต้องการใช้ในกิจกรรมของเซลล์ (Cerón García และคณะ 2005) เซลล์สาหร่ายจึงลดการสร้างคลอโรฟิลล์ที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการตรึงแสงเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน นอกจากนี้เซลล์ยังมีการสะสมไขมันไว้ภายในเม็ดไขมัน (lipid granule) ทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Wu และคณะ 1992) ซึ่งสามารถเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นจึงส่งผลให้ผลิตไบโอดีเซลได้เพิ่มขึ้น ในอดีตการสกัดน้ำมันพวกพืชน้ำมัน เช่น เมล็ดคาโนลาหรือถั่วเหลือง จะทำได้โดยการบด หลังจากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย และนำไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อให้ได้น้ำมันไบโอดีเซล

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

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในระบบเขย่าขนาด 100 มิลลิลิตร

1.2.2 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในระบบขยายขนาดเป็น 600 มิลลิลิตร ที่มีสายยางเป็นตัวให้อากาศ

1.2.3 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคสที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณชีวมวลของ *Scenedesmus armatus*

1.2.4 เพื่อศึกษาการทำไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่ายที่ได้ต่อเชื้อไว้จากงานวิจัยในปีก่อนหน้า
- กระบวนการเลี้ยงสาหร่ายดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการ และระบบที่ขยายขนาดขึ้นมากกว่า 4,000 มิลลิลิตร
- พิจารณาการสร้างกรดไขมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล
- สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เชื้อที่ได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เก็บสาหร่ายแห้งในรูปผงด้วยการนำสาหร่ายสดผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบระบบที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* เพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลและเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตสาหร่ายหรือการเลี้ยงสาหร่ายมีลักษณะคล้ายคลึงกับการเลี้ยงพืชชั้นสูง ต้องมีการจัดสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และที่สำคัญต้องมีการระวังการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นที่อาจจะเจริญไปพร้อมๆ กับสาหร่าย ซึ่งจะคอยแย่งอาหารหรืออาจผลิตสารที่เป็นพิษทำลายการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ ดังนั้นทุกขั้นตอนต้องดำเนินการภายใต้สภาวะ aseptic technique ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ได้แก่ สารอาหาร pH อุณหภูมิ แสง และ อากาศ เนื่องจากยังไม่สามารถเลี้ยงสาหร่ายในระบบใหญ่ได้ในทันทีช่วงเริ่มต้นจึงต้องดำเนินการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ขวดรูปชมพู่จากนั้นจึงขยายขนาดเพิ่มขึ้นจนมีขนาดใหญ่ และในปัจจุบันมีนักวิจัยทำการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้ถังปฏิกรณ์หลายรูปแบบ ได้แก่ ถังแบบคอลัมน์ และแบบอากาศยก (airlift contactor) ซึ่งระบบหลังสุดนี้มีการออกแบบเพื่อให้มีการหมุนเวียนของออกซิเจนในระบบที่ดีเพื่อให้สาหร่ายได้รับออกซิเจนรวมทั้งสารอาหารอย่างทั่วถึง (ดวงกมล เรืองงาม 2550 กิรติ อิศระพ่ายพ 2555) การทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีตจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อเป็นไปตามวัตถุประสงค์ ดังนั้นในบทนี้จะกล่าวถึงข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 ความหมายของสาหร่าย (Algae)

สาหร่าย เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะแหล่งน้ำทั้งน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม สาหร่ายดำรงชีวิตอยู่ได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นแพลงก์ตอน (plankton) ล่องลอยอยู่ในมวลน้ำ เรียกว่าแพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) และดำรงชีวิตแบบยึดติดกับพื้นทะเลหรือบนวัสดุอื่นๆ เช่น กลุ่มของสาหร่ายหลายเซลล์ที่เรียกรวมว่าสาหร่ายทะเล (seaweeds) นอกจากนี้สามารถพบสาหร่ายในสภาพแวดล้อมอื่นๆ อีก เช่น ในดิน หิมะ น้ำพุร้อน และสาหร่ายที่ใช้ชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในลักษณะความสัมพันธ์แบบพึ่งพา ตัวอย่างได้แก่ ไลเคน (Lichen) ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อาศัยร่วมกับรา และสาหร่าย *Zooxanthellae* ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของปะการังและหอยมือเสือ เป็นต้น

ทั่วโลกให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นในทุกๆปี เนื่องจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้ในปัจจุบันกำลังจะหมดไป และการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลก่อให้เกิดการสะสมของก๊าซที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจกในชั้นบรรยากาศ และภาวะโลกร้อน ในปีที่ผ่านมาไบโอดีเซลได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ไบโอดีเซลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนทางเลือกใหม่ของพลังงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไบโอดีเซล หรือ Fatty acid Methyl Esters (FAMES) สามารถหาได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันที่ใช้แล้วจากการปรุงอาหาร และสาหร่าย (S.K. Mandotra 2014)

2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย

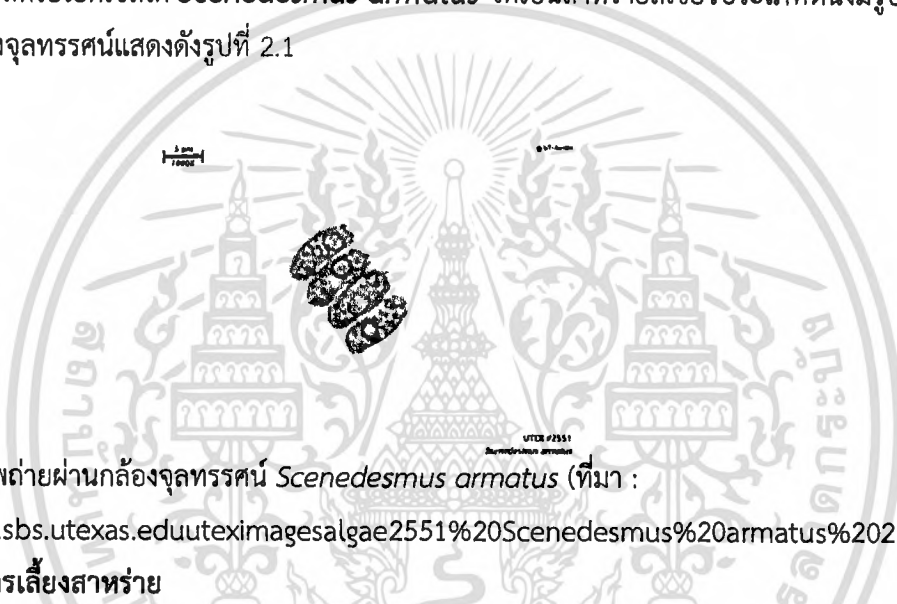
การคัดเลือกสายพันธุ์โดยมากกระทำโดยนำมาสเปคตรลงบนอาหารซึ่งโดยมากจะใช้สูตรอาหาร BG11 หรือบนสูตรอาหารที่มีความจำเพาะต่อสาหร่ายพันธุ์ที่ต้องการจากนั้นเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเมื่อโคโลนีแยกชัดเจนก็นำเข็มเขี่ยเชื้อเลือกเฉพาะโคโลนีที่คาดว่าจะจะเป็นสาหร่ายพันธุ์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารใหม่จนกว่าจะได้พันธุ์ที่ต้องการเพียงอย่างเดียวแล้วจึงถ่ายเชื้อลงบนหลอดอาหารวุ้นเอียง แต่ถ้าไม่ทราบพันธุ์สาหร่ายที่นำมาจากแหล่งธรรมชาติจะต้องทำการจำแนกสายพันธุ์ก่อนโดยพิจารณาจากลักษณะที่พบเห็นเมื่อมองส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แล้วจึงนำไปเทียบเคียงตามฐานข้อมูลสาหร่ายที่มี แล้วจึงค่อยทำการแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.3 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta)

สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) มีลักษณะเป็นสีเขียวเนื่องจากภายในคลอโรพลาสต์มีสารสีพวกคลอโรฟิลล์เอและบีเป็นจำนวนมาก ทำให้ดับขั้วสารสีอื่นๆ สีเขียวจึงเด่นชัดมากกว่าสารสีอื่น ซึ่งสารสีเหล่านี้มีบทบาทในการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย นอกจากนี้ยังพบสารประเภทไขมันซึ่งสามารถเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลได้ *Scenedesmus armatus* จัดเป็นสาหร่ายสีเขียวประเภทหนึ่งมีรูปร่างเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ *Scenedesmus armatus* (ที่มา :

<http://www.sbs.utexas.edu/utimagesalgae2551%20Scenedesmus%20armatus%202.jpg>)

2.4 การเลี้ยงสาหร่าย

การผลิตสาหร่ายหรือการเลี้ยงสาหร่ายมีลักษณะคล้ายกับการเลี้ยงพืชชั้นสูง ต้องมีการจัดสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ได้แก่ pH อุณหภูมิ แสง สารอาหาร และอากาศ ช่วงเริ่มต้นในการเลี้ยงสาหร่ายจะดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ขวดรูปชมพู่จากนั้นจึงขยายขนาดเพิ่มขึ้นจนมีขนาดใหญ่ และในปัจจุบันมีนักวิจัยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้ถังปฏิกรณ์หลายรูปแบบได้แก่ ถังแบบคอลัมน์ และแบบอากาศยาน (airlift contactor) ซึ่งระบบหลังสุดนี้มีการออกแบบเพื่อให้มีการหมุนเวียนของออกซิเจนในระบบที่ดีเพื่อให้สาหร่ายได้รับออกซิเจนรวมทั้งสารอาหารอย่างทั่วถึง (ดวงกมล เรืองงาม 2550 กิรติ อิศระพ่าย 2555)

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.4.1.1 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ แสงสว่าง ควรใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ในการให้แสงแก่สาหร่ายเพราะมีอุณหภูมิในการให้แสงน้อยกว่าหลอดไฟประเภทอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย และ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.2 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย ซึ่งขึ้นอยู่กับสารอาหารที่เลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายแต่ละชนิด ธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ซึ่งธาตุอาหารหลักเป็นสารเคมีที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต อย่างเช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แคลเซียม โซเดียม โพแทสเซียม คลอรีน และ แมกนีเซียม เป็นต้น ส่วนธาตุอาหารรองเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการในปริมาณที่น้อย หรือสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ สารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์จะได้แก่ เหล็ก โบรอน แมกนีเซียม ทองแดง สังกะสี โมลิบดีนัม ซิลิกา เป็นต้น และสารอินทรีย์ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เกลือ อินทรีย์หรือ สารประกอบอินทรีย์ และกลุ่มอาหารเสริม หากสาหร่ายขาดธาตุอาหารจะเกิดลักษณะที่สังเกตได้ อันได้แก่ ปริมาณสารสีที่ใช้สำหรับสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้เซลล์มีสีที่จางลง เซลล์จะมีการสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้น กว่าปกติ เช่น การสะสมแป้งและน้ำมัน เซลล์มีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนลดลง เนื่องจากเซลล์มีการสะสมแป้งและไขมันเพิ่มขึ้น

2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย

J.F. Sanchez และคณะ ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตและปริมาณลูทีน ของ *Scenedesmus almeriensis* ซึ่งได้นำเสนอข้อมูลคุณลักษณะของสาหร่ายที่อุดมไปด้วยลูทีนเป็นครั้งแรก ซึ่ง *Scenedesmus almeriensis* เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากเรณูกระจกของเกษตรกร วัตถุประสงค์หลัก คือ การกำหนดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กนี้ และปัจจัยที่อาจเพิ่มปริมาณลูทีนได้ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดดำเนินครั้งแรกในการเพาะเลี้ยงแบบ batch ดังนั้น อิทธิพลของสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ, pH , culture medium , รังสีภายนอก และ ความเค็ม มีการดำเนินการอย่างต่อเนื่องภายใต้ข้อจำกัดที่ว่าอัตราการเจือจางเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของสาหร่าย ความสัมพันธ์ระหว่างรังสีและอุณหภูมิถูกศึกษาโดยวิธีวิเคราะห์การตอบสนองต่อพื้นผิว และสภาวะที่เหมาะสมของรังสีและอุณหภูมิ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอาหารที่เสนอโดย Mann JE และ Myers J ชื่อเรื่อง On pigments, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricornutum* ในวารสาร J Phycol 4 ปี 1968 หน้า 349-55 เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของสายพันธุ์นี้และการเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารช่วงเริ่มต้นไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยง pH ที่เหมาะสมพบว่าเป็น 8.0 พิจารณาจากอุณหภูมิที่สายพันธุ์นี้เติบโตได้ดีในช่วง 30-40°C

Zbigniew Tukaj และคณะได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเม็ดสีและศึกษาวงจรเซลล์จากกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armatus* โดยในงานวิจัยนี้ ศึกษา cell cycle และรูปแบบของรงควัตถุ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย จากช่วงที่ให้แสงในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ซึ่งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในการทดลองนี้ ได้คัดแยกจาก phytoplankton ที่พบทางตอนใต้ของทะเลบอลติก และเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal Bold medium (BBM) โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Batch

Lu Chen และคณะได้ศึกษาสภาวะและวิธีการต่างๆ ที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในระบบบ่อเปิด พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์ได้ถึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

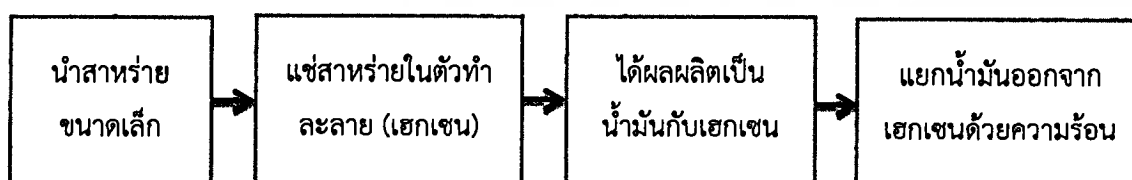
97.4% หลังจากปรับ pH เป็น 11.5 แล้วทิ้งไว้ 10 นาที โดยไม่ต้องเพิ่มสารรวมตะกอน สารรวมตะกอนชนิด FeCl_3 และไคโตซาน (Chitosan) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของตะกอนที่ดีในปริมาณ 0.15 และ 0.08 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยไม่ต้องปรับค่า pH ในการเพาะเลี้ยง เมื่อมีการปรับ pH เป็น 6 และเติมสารส้ม 0.1 กรัม/ลิตร พบว่าประสิทธิภาพของการเก็บเกี่ยวตะกอนเพิ่มขึ้นจาก 49.74% เป็น 90.63% และสังเกตได้ว่าหลังจากที่เพิ่ม $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ปริมาณ 0.1 กรัม/ลิตร ตามด้วยการปรับ pH ประสิทธิภาพของการเก็บเกี่ยวตะกอนจะเพิ่มขึ้นจาก 68.18% เป็น 92.84% ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่เหมาะสมที่สุด

2.5 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) การใช้อัลตราโซนิกร่วมด้วยในการสกัด โดยคลื่นเสียงจะทำให้สาหร่ายเกิดการสั่นจากนั้นน้ำมันหลุดออกมาละลายกับตัวทำละลาย (Ultrasonic-assisted Extraction) และ การใช้เทคนิคออสโมซิสโดยอาศัยความดันของน้ำเพื่อให้เซลล์แตก (Osmotic Shock)

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



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายจากสาหร่าย (ที่มา : พิจักษ์ และคณะ 2554)

2.6 การสกัดสาร

การสกัดสารสำคัญทางชีวภาพจากวัตถุดิบทางธรรมชาติและสาหร่ายมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีดั้งเดิมด้วยวิธีการสกัดด้วยชุด soxhlet การแช่หรือเขย่าด้วยสารอินทรีย์ การสกัดด้วยคลื่นเสียงช่วยในการสกัด การสกัดด้วยน้ำที่สภาวะกึ่งวิกฤติ การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยวดยิ่ง เป็นต้น วิธีการสกัดที่ให้ได้ปริมาณสารที่ต้องการในปริมาณมากที่สุดถือว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ต้องการสกัดนั้น

2.7 การผลิตไบโอดีเซล

ในหลายๆประเทศจะมีการนำเอาพืชน้ำมันมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เช่น ถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เป็นต้น แต่พืชน้ำมันเหล่านี้จะสามารถผลิตน้ำมันออกมาได้ในปริมาณน้อยมาก ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้แค่ผสมกับน้ำมันปิโตรเลียมเท่านั้น จึงส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างมาก สาหร่ายได้รับการยอมรับว่าเป็นวัตถุดิบที่สามารถในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งจะแตกต่างจากพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เนื่องจากสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทุกที่ตามแหล่งน้ำ ในระบบปิด และน้ำเสีย สาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตน้ำมันได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี และมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ดังนั้นสาหร่ายจึงมีความสามารถในการผลิตไบโอดีเซลได้ดีกว่าวัตถุดิบอื่นนั่นเอง

การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายมี 4 ขั้นตอนดังนี้ คือ การเจริญเติบโต การเก็บเกี่ยว การสกัด และการเปลี่ยนน้ำมันให้เป็นไบโอดีเซล สำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวมวลจากสาหร่ายควรจะต้องมีกระบวนการในการผลิตที่สูง ดังนั้นการคัดกรองของสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก และจะต้องมีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลายได้ การใช้อาหารที่มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อมวลรวมชีวภาพและปริมาณไขมันของสาหร่าย การดัดโนโตรเจนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการสะสมของไขมันในสาหร่าย แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันจะทำให้ปริมาณมวลรวมชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องหาสภาวะในการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่สูงและมีอัตราการผลิตไขมันที่เหมาะสม (Mandotra และคณะ 2014) นอกจากนี้สภาวะในการเลี้ยง และปัจจัยที่สำคัญ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และพีเอช

ในสมัยก่อนการสกัดน้ำมันพวกพืชน้ำมัน เช่น เมล็ดคาโนลาหรือถั่วเหลือง จะทำได้โดยการบดหลังจากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ในกรณีของสาหร่ายการบดจะทำได้ยากเนื่องจากผนังเซลล์ของสาหร่ายมีลักษณะหนา กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่สำคัญมากในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย ในสมัยก่อนกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะทำหลังจากการสกัดน้ำมันแล้วแต่จอห์นสันและเหวิน ได้แสดงให้เห็นว่าการทำกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยตรงซึ่งไม่ผ่านการสกัดก่อนนั้นจะทำให้ได้กรดไขมันที่เพิ่มขึ้น (Mandotra และคณะ 2014)

2.8 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกนำน้ำมันพืชหรือไตรกลีเซอไรด์ (TG) ทำปฏิกิริยากับเมทานอล (ROH) เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ (ME) หรือไบโอดีเซลกับดกลีเซอไรด์ (DG) จากนั้นไตรกลีเซอไรด์ (DG) ทำปฏิกิริยากับเมทานอลเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์กับโมโนกลีเซอไรด์ และในขั้นตอนสุดท้ายโมโนกลีเซอไรด์ (MG) ทำปฏิกิริยากับเมทานอล เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์กับกลีเซอไรด์ ดังนั้นในการผลิตไบโอดีเซล เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ จะสามารถควบคุมปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ดักลิเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ ไม่ให้หลงเหลือในไบโอดีเซลเกินที่มาตรฐานกำหนดไว้



ที่มา: ัญญารัตน์ และคณะ 2553.

2.8.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

2.8.1.1 การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดช้ากว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานมากกว่า 3 ชั่วโมงถึงจะเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์

กรดที่ใช้กันทั่วไปคือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะทำให้ได้ผลผลิตคือ น้ำมันไบโอดีเซลในปริมาณมากแต่ปฏิกิริยาเกิดช้ามาก อาจใช้เวลามากกว่า 1 วัน ปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ แต่ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ใช้ได้กับกลีเซอไรด์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและน้ำในปริมาณสูงได้ เช่น น้ำมันที่ใช้แล้ว (Fukuda และคณะ 2005)

2.8.1.2 การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ซึ่งควรใช้ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือ เอทานอล โดยน้ำมันที่ใช้จะเป็นชนิดใดก็ได้ เช่น น้ำมันดิบ หรือน้ำมันที่ใช้แล้วก่อนทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันควรเปลี่ยนจากรูปเบสไปเป็นในรูปของสารประกอบอัลคอกซี (Alcoxy) ก่อน

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อีกทั้งยังทำให้ได้ไบโอดีเซลปริมาณสูง (Ma และคณะ 1999) ส่วนข้อจำกัดตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสคือ น้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันดิบถ้ามีน้ำ

และปริมาณกรดไขมันอิสระอยู่ในระบบของการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณมากจะทำให้มีสบู่เกิดขึ้นแทนที่จะได้น้ำมันไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ (Agarwal 2006)

2.8.1.3 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การนำไฮโดรไลติกส์เอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ แต่ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันยังใช้เอนไซม์กันไม่แพร่หลาย ปัจจัยที่ศึกษาทั่วไปเช่น ตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของเอนไซม์ ปัจจัยเหล่านี้ต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตามเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา และผลผลิตที่ได้ยังน้อยกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส

เอนไซม์ที่ใช้คือเอนไซม์ไลเปส มีข้อดีคือ เป็นปฏิกิริยาที่สามารถควบคุมได้ เกิดในสภาวะไม่รุนแรงไม่มีสารพิษในของเสียจากปฏิกิริยาสามารถกำจัด กลีเซอรอลออกได้ง่าย และถ้าเป็นเอนไซม์ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่ข้อเสียคือราคาค่อนข้างแพง

2.9 กรดไขมันและกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก

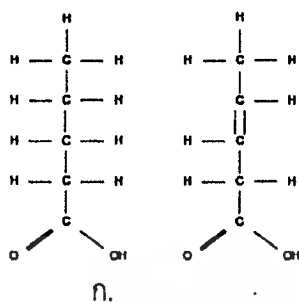
กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยมักจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 2 อะตอมขึ้นไป มีสูตรทั่วไป คือ $R-COOH$ ลักษณะสูตรโครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เรียกว่าคาร์บอกซิล ($COOH$) ซึ่งมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมตัวกันอยู่ อีกส่วนหนึ่งเรียกว่า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

2.9.1 กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

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

2.9.1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated Fatty Acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีคาร์บอนในโมเลกุลมีไฮโดรเจนน้อยกว่าชนิดอิ่มตัว โดยที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 2 อะตอมจับกันเองด้วยพันธะคู่ (=) การมีพันธะคู่ 1 แห่ง จะทำให้มีไฮโดรเจนน้อยลงกว่าชนิดอิ่มตัว 2 อะตอม การมีพันธะคู่อาจมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง กรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้พบมากในไขมันพืช ยกเว้นน้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม การมีพันธะคู่อยู่มากจะทำให้ไขมันเหม็นหืนได้ง่ายเมื่อตั้งทิ้งไว้ในอากาศ แต่พบว่าไขมันสัตว์มีกลิ่นหืนเร็วกว่าไขมันพืชทั้ง ๆ ที่ไขมันพืช

มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่า ทั้งนี้เพราะน้ำมันพืชมีวิตามินอีซึ่งเป็นสารป้องกันการเติมออกซิเจนอยู่แล้วตามธรรมชาติ ตัวอย่างกรดไขมันชนิดนี้ ได้แก่ กรดไลโนเลอิก



รูปที่ 2.3 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
กรดเบฮีนิก (Behenic acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{20} \text{COOH}$	น้ำมันถั่วลิสง
กรดลิโนซีริก (Lignoceric acid)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{22} \text{COOH}$	เนย (Butter fat)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 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)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=(\text{CHCH}_2\text{CH})_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	4	เลซิทิน (Lecithin)

2.9.2 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), กรดสเตอริก (Stearic acid methyl ester) และกรดเดคาโนอิก (Decanoic acid methyl ester) ดังที่แสดงในตารางที่ 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 ₁₅ H ₃₀ O ₂	25.9
Methyl decanoate	Methyl caprate	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1.1
Methyl dodecanoate	Methyl lurate	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	5.9
Methyl undecanoate		C ₁₂ H ₂₄ O ₂	17.7
Methyl hexadecanoate	Methyl pamitate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	23.6
Methyl heptadecanoate	Methyl margarate	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2.1
Methyl octadecanoate	Methyl sterrate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	12.8
Methyl pentadecanoate		C ₁₆ H ₃₂ O ₂	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 หลังจากการวิเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายแต่ละชนิดพบว่าสาหร่ายทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาสามารถผลิตกรดโอเลอิก (18:1) ได้ ยกเว้น *Amphora* sp. นอกจากนี้สาหร่ายทั้ง 6 สายพันธุ์ ยังสามารถที่จะผลิตโอเมก้า 3 ได้ ส่วนกรดปาล์มิติก (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

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 2.4 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

ตารางที่ 2.5 ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง เกล็ด ไขมัน และองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก (ที่มา : Isik และคณะ 1999)

องค์ประกอบของสาหร่าย	สายพันธุ์สาหร่าย		
	<i>Scenedesmus abundans</i>	<i>Monoraphidium munitum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
น้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง (ร้อยละ)	11.70	14.98	19.61
เกล็ด (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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Martha และคณะ (2013) การผลิตไบโอดีเซลผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันพืช (ไตรเอคิลกลีเซอรอล) กับเมทานอลเป็นส่วนผสมของเมทิลเอสเทอร์ของไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวโซยาว (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 แล้วข้ามมากมีค่าสูงสุด 71.7 ± 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นต่อไปเวลาที่เกิดปฏิกิริยาจาก 6 ถึง 24 ชั่วโมงทำให้เกิดผลกระทบน้อยลงในการเปลี่ยนแปลงของน้ำมัน *S. incrassatus* ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า ผลต่างของ FAMES สูงสามารถเกิดขึ้นได้ในเวลาที่เกิดปฏิกิริยาล้นลง

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของตัวอย่างไบโอดีเซลของสาหร่าย *Scenedesmus incrassatus* (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. incrassatus* เป็น FAMES โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเอนไซม์ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในไบโอดีเซลจากน้ำมัน *S. incrasatulus* 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* โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida* sp. 99-125 (Li และคณะ 2007)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล

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 และเฟอริคคลอไรด์) 30-200 มิลลิกรัมต่อลิตร และพีเอช 6-10 2. ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการตกจมสาหร่าย 3. ศึกษาชนิดของกรดไขมันจากสารที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Thin layer chromatography (TLC) และเครื่อง Gas chromatography–Flame ionization detector (GC-FID) และ 4. ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และเอสเทอริฟิเคชัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายด้วยอลูมิเนียมซัลเฟต คือ ความเข้มข้น 152 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6 เวลาในการตกจม 60 นาที และเฟอริคคลอไรด์ 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 และการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และเอสเทอริฟิเคชัน พบว่ามีร้อยละเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้น แต่ค่าที่ได้ยังต่ำกว่าค่ามาตรฐานอยู่มาก หากพิจารณาคุณลักษณะทางกายภาพ พบว่าการใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีผลทำให้การแยกชั้นในขั้นตอนการล้างน้ำทำได้ยากกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากวัตถุดิบตั้งต้นมีร้อยละกรดไขมัน เท่ากับ 20.95 ดังนั้นการผลิตไบโอดีเซลจึงควรทำปฏิกิริยาแบบ 2 ขั้นตอน คือทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันเพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระ แล้วตามด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การสกัดสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีดั้งเดิมจะมีหลักการที่เกี่ยวข้อง 2 หลักการที่สำคัญคือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction) เช่น ทำการสกัดไขมันด้วยคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ (1:2:0.8 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้วิธีการของ Bligh และ Dyer (Molina Grima และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1994) ผสมกันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดแยกชีวมวลออกจากสารไขมันที่เหลืออยู่ในชีวมวลของสาหร่ายจะถูกสกัดอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำของเหลวที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ผสมกัน นำสารละลายที่ผสมกันมาแยกด้วยคลอโรฟอร์ม และน้ำผสมกับเมทานอลเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น ในอัตราส่วนสุดท้ายของคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ เป็น 1:1:0.9 ชั้นบน (เมทานอลผสมกับน้ำ) เป็นชั้นที่ถูกกำจัดออก และชั้นของคลอโรฟอร์มเป็นชั้นที่ไขมันละลายอยู่และทำการวัดน้ำหนัก (Gravimetric Determination) โดยนำไขมันที่ได้มาซึ่งน้ำหนัก แสดงผลเป็นร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบ (Crude Extractions) ที่ได้มาทำการแยกไขมันที่เป็นกลาง และทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin-layer Chromatography, TLC) โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas Chromatography, GC) หรือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) แต่การดำเนินการด้วยวิธีนี้ยังมีปัญหาที่สำคัญคือ ใช้เวลาและใช้แรงงานมากทำให้ยากต่อการคัดแยกสาหร่ายที่มีจำนวนมาก อีกทั้งยังต้องศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายที่อาจจะส่งผลต่อไขมันที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่าย เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) เป็นผลให้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านสนใจถึงการวัดแหล่งกำเนิดของไขมันด้วยวิธีอื่นๆ (Bligh และ Dyer 1959, Cooksey และคณะ 1987, Eltgroth และคณะ 2005, Izard และ Liberberger 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 กรดโดโคซาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (docosanoic acid methyl ester) กรดเตตราเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (tetradecanoic acid methyl ester) กรดเฮกซะเดคะโมอิกเมทิลเอสเทอร์ (hexadecanoic acid methyl ester) และกรดโนนาระอิกเมทิลเอสเทอร์ (nonanoic acid methyl ester)

สุวิมล (2553) ได้ศึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์กับเมทานอล โดยใช้โนโวไซม์ 435 ตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อผลิตไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เบดบรรจุผลการศึกษาพบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดของการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เบดบรรจุเป็นการบรรจุคอลัมน์แบบผสมโนโวไซม์ 435 และเม็ดแก้วอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลเป็น 1 : 1 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา เท่ากับ 50 องศาเซลเซียสอัตราการไหลของสารละลายผสมของสารตั้งต้น เท่ากับ 0.20 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.5 กรัม โดยมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของปริมาณโนโวไซม์ 435 ต่อเม็ดแก้วเป็น 1 : 4 หลังจากนั้นทดสอบการผลิต ไบโ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเซลโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เบดบรรจุ 3 คอลัมน์ ซึ่งกำหนดอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลเป็น 1 : 1 ในแต่ละคอลัมน์ โดยใช้ปัจจัยทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นเป็นปัจจัยควบคุมพบว่า 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) ปฏิบัติการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์จะดำเนินการในหลอดทดลองที่บรรจุสาร 170 มิลลิกรัมของน้ำมัน *S. incrassatulus* Novozym 435 ปริมาณ 39 มิลลิกรัม (23 เปอร์เซ็นต์) และอัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1 : 6 โมลาร์ ให้ความร้อนแก่น้ำมันจาก *S. incrassatulus* ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายร้อนใส่เอนไซม์ไลเปส และเมื่อเริ่มเกิดปฏิกิริยาใส่สารละลายเมทานอลเข้าไปในระบบสารละลายเมทานอลที่ใส่เข้ามาใน 3 ขั้นตอนต่อเนื่อง (1ต่อ3 ของเวลาทั้งหมดในแต่ละครั้ง) เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งของเอนไซม์ (Shimada และคณะ1999) 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 ผลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเป็นไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กจะแสดงเป็นร้อยละน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAMES) กับร้อยละน้ำหนักของน้ำมัน การดำเนินการทดลองทั้งหมดได้ทำการทดลองหลายซ้ำ และมีรายงานผลเป็น \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 หัวข้อ

สาขาที่ได้พัฒนามาจากทุนวิจัยงบประมาณรายได้ปี 2557 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทำการเก็บมาเพิ่มเติมจากแหล่งน้ำ 2 แหล่ง ในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

- 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 1ต่อ10 มิลลิเมตร, Germany)
- 3.1.12 เดซิเคเตอร์ (Desiccator) (DURAN, Vackuumfest, England)
- 3.1.13 คิวเวทท์ (Cuvette) (VWR, Germany)
- 3.1.14 ตัวต่อปรับปริมาตรอากาศ และตัวต่อสายยางแบบ 3 ทาง
- 3.1.15 กระจกบอทดวง (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 กระจกบอคนิทยา ขนาด 5 มิลลิลิตร (Nipro, Thailand)
- 3.1.21 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares) (Pyrex, Germany)
- 3.1.22 เครื่องบีบอัดอากาศ (บีบเล็ก) กำลังไฟ 58 วัตต์ แรงลม 70 ลิตรต่อนาที แรงดันลม 0.028 โมลปราศาล (Yamano, AP-40, china) และเครื่องบีบอัดอากาศ (บีบใหญ่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

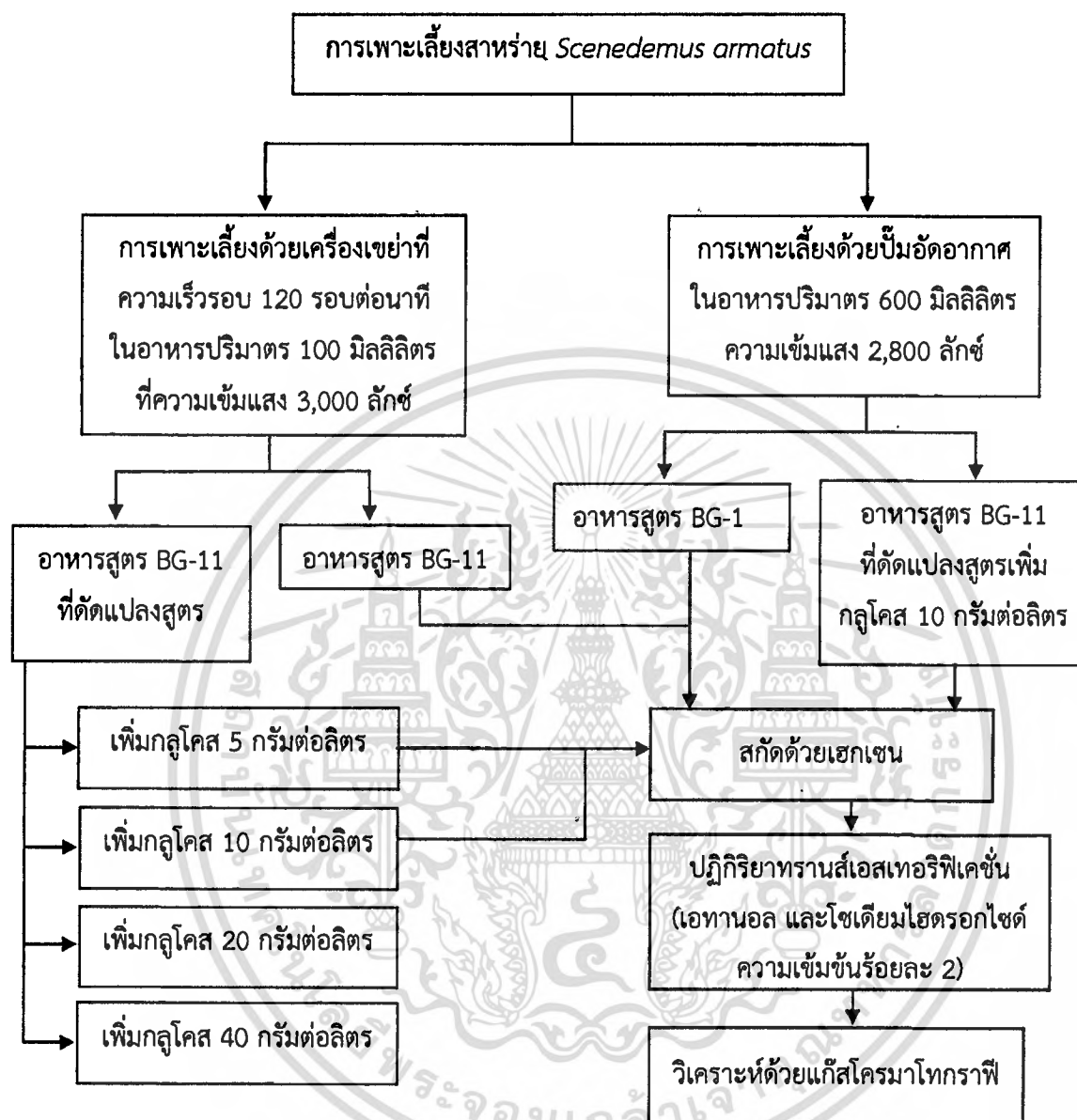
กำลังไฟ 47 วัตต์ แรงลม 70ต่อ40 ลิตรต่อนาที แรงดันลม 0.038/0.044 โมลปราศกาล
(Atman, HP-80000, china)

- 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)
- 3.1.27 อาหารสูตร BG-11 – สูตรอาหารเหลว (ภาคผนวก ก-1)
- 3.1.28 อาหารสูตร BG-11 – สูตรอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก-2)
- 3.1.29 เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 95
- 3.1.30 ซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 98
- 3.1.31 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.1.32 กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)
- 3.1.33 ฟีนอล (Phenol)
- 3.1.34 เฮกเซน (Hexane)
- 3.1.35 น้ำกลั่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 แผนผังการทดลอง



3.4 วิธีการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.4.1 การเตรียมอาหารเหลว BG11 เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์

3.4.1.1 เติมหาตุอาหารสูตร BG-11 (ภาคผนวก ก-1) ดังกล่าวลงในน้ำกลั่น

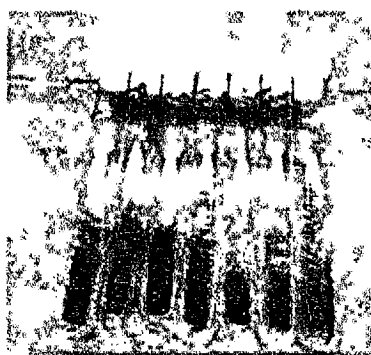
3.4.1.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3.4.1.3 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้สารละลาย HCL 0.1 โมล และ NaOH 0.1 โมล

3.4.1.4 บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วยจุกสำลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.1.5 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
- 3.4.1.6 ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อทดสอบว่าอาหารไม่มีการปนเปื้อน
- 3.4.1.7 เก็บอาหารไว้ในที่สะอาด สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป
- 3.4.2 การเตรียมอาหารแข็ง BG-11 ในหลอดเอียง
- 3.4.2.1 เติมหาตุอาหารตามสูตร BG-11 (ภาคผนวก ก-2) ในน้ำกลั่น
- 3.4.2.2 เติมน้ำลงไปตามสูตรอาหาร
- 3.4.2.3 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร
- 3.4.2.4 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้สารละลาย HCl 0.1 โมล และ NaOH 0.1 โมล
- 3.4.2.5 ทำให้วุ้นละลายโดยการอุ่นในไมโครเวฟ
- 3.4.2.6 ใช้ปิเปตดูดอาหารลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยจุกสำลี
- 3.4.2.7 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยไอน้ำที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 3.4.2.8 รอให้อาหารเย็นลงเล็กน้อย จากนั้นเอียงหลอดอาหาร โดยให้ด้านบนของหลอด สูงกว่าด้านล่างหลอดเล็กน้อย เพื่อให้มีบริเวณพื้นผิวหน้าของอาหารมากขึ้น
- 3.4.2.9 ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารในหลอดเย็นตัวลงจนแข็ง
- 3.4.2.10 ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อทดสอบว่าอาหารไม่มีการปนเปื้อน
- 3.4.2.11 เก็บอาหารไว้ในที่สะอาด สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป
- 3.4.3 การเก็บรักษาเชื้อในอาหาร BG-11
- 3.4.3.1 นำหลอดอาหารที่ไม่มีการปนเปื้อนมาถ่ายเชื้อในตู้ถ่ายเชื้อ ที่มีการเปิดยูวีทิ้งไว้แล้ว 30 นาที
- 3.4.3.2 นำหลอดอาหารที่มีเชื้อขึ้นและไม่มีการปนเปื้อน มาทำการคัดเลือกโคโลนีเดียว (เพียงหนึ่งโคโลนีต่อหนึ่งหลอดอาหาร) เพื่อถ่ายลงในหลอดอาหารเอียงด้วยเทคนิค Simple streak ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานหลายสัปดาห์หรืออาจเป็นเดือนๆ หรืออาจจะเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโตทำให้สามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น
- 3.4.3.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 26-30 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 1600-1800 ลักซ์ ซึ่งวัดความเข้มแสงด้วยเครื่องลักซ์มิเตอร์
- 3.4.3.4 หลังจากสาหร่ายเจริญเติบโตแล้วสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อยืดการเจริญเติบโตได้



รูปที่ 3.1 การเก็บรักษาเชื้อด้วยเทคนิค Simple Streak

3.4.4 การลงเชื้อในพลาสติกอาหารเหลว

3.4.4.1 นำพลาสติกอาหารเหลว ที่ไม่มีการปนเปื้อนมาถ่ายเชื้อในตู้ถ่ายเชื้อ ที่มีการเปิดยูวีไว้แล้ว 30 นาที

3.4.4.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม เขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียง BG11 ที่มีเชื้อเจริญอยู่ และไม่มีการปนเปื้อน แล้วใส่ลงหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน

3.4.4.3 จากนั้นทำการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และดูดเชื้อให้มีเซลล์เริ่มต้น 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในพลาสติกอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร

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 เติมหอาหารสูตร BG11 ที่เตรียมไว้แล้ว ลงในพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหาร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสตามความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

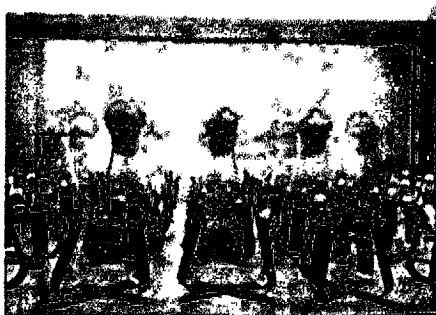
3.4.5.4 ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ ลงในพลาสติก

3.4.5.5 ปิดปากพลาสติกด้วยจุกสำลี

3.4.5.6 นำพลาสติกวางลงในเครื่องเขย่า เปิดเครื่องให้เครื่องเริ่มทำงานที่ 120 รอบต่อนาที

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 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในขวดโหลแบบบีม้อัดอากาศ

3.4.6.1 นำขวดโหลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.4.6.2 เปิดแสงยูวีของตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนการใช้งานในขั้นต่อไป

3.4.6.3 เติมอาหารสูตร BG11 ที่เตรียมไว้แล้ว ลงในขวดโหลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหาร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสตามความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

3.4.6.4 ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ ลงในขวดโหล

3.4.6.5 ต่อสายยางจ่ายอากาศที่ฝาปิดขวดโหล (ที่ประดิษฐ์ขึ้น) นำไปต่อกับบีม้อัดอากาศที่อัตราการไหลของอากาศ 190 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4.6.6 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 26-30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์

3.4.6.7 ทำการตรวจผลการเจริญทุกๆ 2 วัน ด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การหาปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส และนำค่าที่ได้มาเขียนผลกราฟ



รูปที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่มีการให้อากาศในขวดโหล (รูปซ้าย) และการให้อัตราการไหลของอากาศ (รูปขวา)

3.4.7 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

- 3.4.7.1 นำหลอดเซนตริฟิวส์ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวางไว้ในเดซิกเคเตอร์ 15 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักหลอดเซนตริฟิวส์ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.4.7.2 เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยง แล้วรินส่วนใสทิ้ง
- 3.4.7.3 เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงเหมือนใน 3.4.8.2 ทำซ้ำสองครั้งเพื่อเป็นการล้างเซลล์
- 3.4.7.4 นำหลอดไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน
- 3.4.7.5 นำหลอดเซนตริฟิวส์ที่อบแห้งแล้วใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาที
- 3.4.7.6 ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.4.7.7 รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Minicentrifuge) (รูปซ้าย) และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (รูปขวา)

3.4.8 การนับจำนวนเซลล์ (Cell Counting : Hemacytometer) (ดัดแปลงจากกิตติคุณ และคณะ 2554)

- 3.4.8.1 ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 3.4.8.2 หยดตัวอย่างสาหร่ายลงบนสไลด์นับเซลล์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การนับจำนวนเซลล์แบ่งการนับออกเป็น 2 แบบคือ

- การนับเซลล์ภายในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่จะทำการนับ 4 ช่อง (ช่อง 1, 2, 3, และ 4 ในรูปที่ 3.6) แล้วนำค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคูณด้วย $\frac{1}{4} \times 10^4$ จากนั้นได้ปริมาตรเซลล์ของสาหร่ายในหน่วย เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับจำนวนเซลล์สาหร่าย 2 ตาราง ดังรูปที่ 3.6 บริเวณวงกลมสีแดงทั้ง 2 วง สมมตินับได้ n และ m เซลล์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 3.6) แล้วนำค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้มาเฉลี่ยให้เหลือเพียง 1 ช่องเล็ก จากนั้นนำไปคูณด้วย $\frac{1}{4} \times 10^6$ จากนั้นได้ปริมาตรเซลล์ของสาหร่ายในหน่วย เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือคำนวณปริมาณสาหร่ายจากสูตร

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

เมื่อ C = จำนวนสาหร่ายที่นับได้

A = พื้นที่ของ grids เท่ากับ 0.04 มิลลิเมตร²

D = ความลึกของพื้นที่ที่นับ เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร

F = จำนวนช่องหรือตารางที่นับ

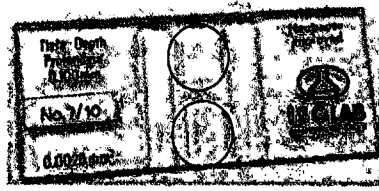
หมายเหตุ เหมาะสำหรับสาหร่ายที่เป็นพวกเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก และไม่สามารถนับพวกที่อยู่เป็นโคโลนีได้

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

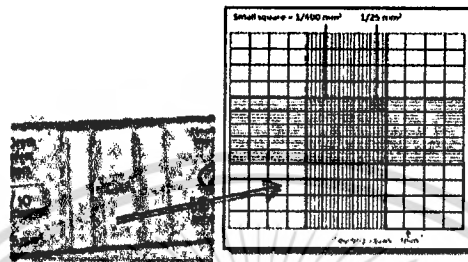
3.4.8.3 จากนั้นบันทึกผลการทดลอง นำจำนวนเซลล์ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่ทำการเพาะเลี้ยงกับจำนวนเซลล์ เพื่อวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ข้อเสนอแนะ และการเลือกวิธีนับจำนวนเซลล์

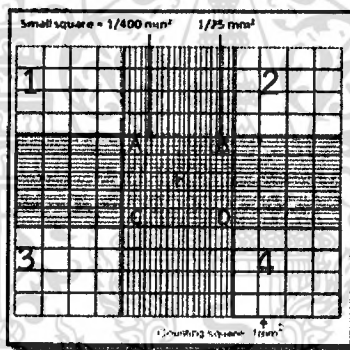
1. การเลือกนับช่องใหญ่จะให้ค่าที่แม่นยำกว่าการเลือกนับด้วยช่องเล็กเนื่องจากช่องมีพื้นที่มากกว่า
2. สาหร่ายบางชนิดที่เป็นเส้นสายหรือมีขนาดใหญ่มาก จำเป็นต้องนับด้วยช่องใหญ่ เนื่องจากหากนับด้วยช่องเล็กเส้นสายของสาหร่ายมักจะเลยขอบช่องเล็ก
3. หากสาหร่ายมีความหนาแน่นต่ำควรเลือกนับด้วยช่องใหญ่
4. ในกรณีที่ตัวอย่างสาหร่ายที่นับมีความหนาแน่นสูงมาก การนับช่องใหญ่อาจใช้เวลา มากก็สามารถเลือกนับช่องเล็กได้



รูปที่ 3.5 ลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของสไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer)



รูปที่ 3.6 ตารางที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์จากภาพจริง และที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ที่มา: <http://dtc.pima.edu/blc/181/Lessons/L3/3step3/3step3page7a.htm>)



รูปที่ 3.7 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>)

3.4.9 การวัดผลการเจริญด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.4.9.1 นำตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการวัดค่าการดูดกลืนแสงใส่ในคิวเวทท์

3.4.9.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (ขจรเกียรติ 2550, ชุตินันท์ และคณะ 2552)

3.4.9.3 บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.4.10 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-Sulfuric Method)

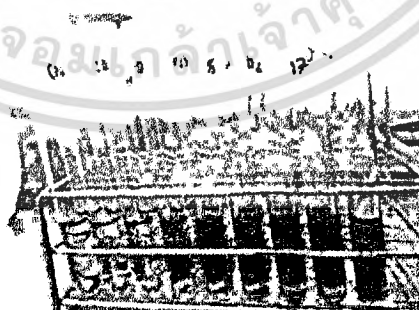
3.4.10.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 มิลลิลิตร

3.4.10.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปทีละหยดของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆ ปล่อยกรดลงที่ข้างหลอด

3.4.10.3 ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที จะเห็นสีน้ำตาลกลูโคสเป็นสีส้ม ดังแสดงในรูป 3.8

3.4.10.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ส่วนน้ำตาลเพนโทส และกรดยูโรนิกนั้นวัดที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

3.4.10.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเขียนกราฟกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 3.9 และคำนวณเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

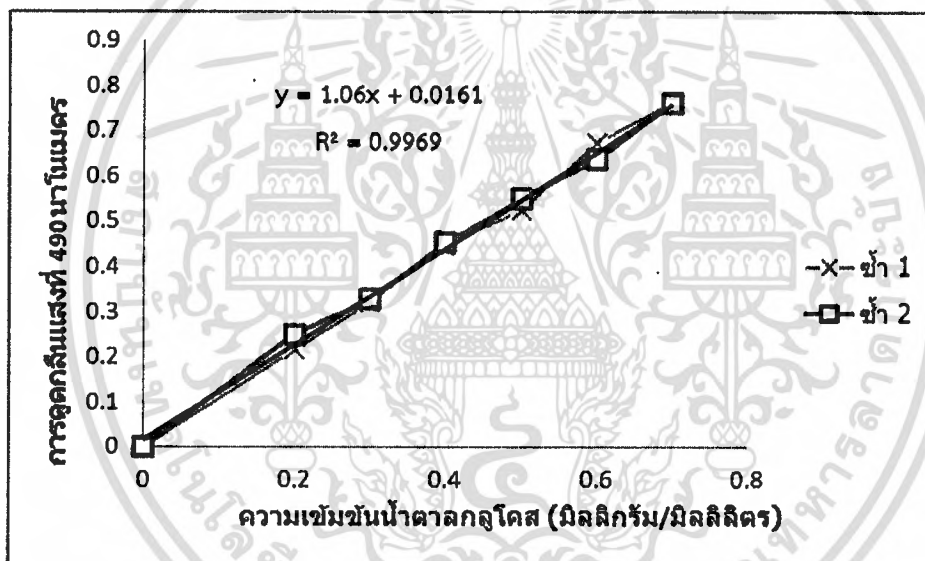


รูปที่ 3.9 สีของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานหลังจากผ่านวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 3.10 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

3.4.10.6 คำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

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

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารสูตร BG-11 ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรได้ = 0.543 ที่อัตราการเจือจาง = 50

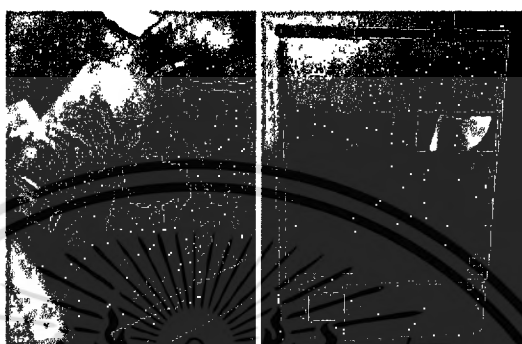
$$\begin{aligned} \text{จากความชันของกราฟมาตรฐาน } x &= \frac{y - 0.0161}{1.06} \\ \text{ดังนั้น ได้ค่าความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} &= \frac{(0.543 - 0.0161) \times (50)}{1.06} \\ &= 24.854 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.11 การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย

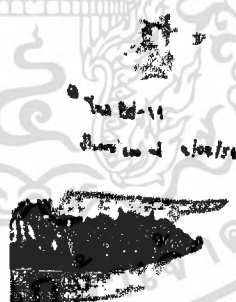
3.4.11.1 นำสาหร่ายที่พร้อมเก็บเกี่ยว ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.4.11.2 เทสารละลายใสส่วนบนออก นำส่วนเซลล์ของสาหร่ายใส่ภาชนะที่เตรียม และนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.11 สาหร่ายหลังจากผ่านการ Centifuge (รูปซ้าย) และตู้เก็บรักษาตัวอย่างสาหร่ายที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (รูปขวา)

3.4.11.3 นำตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวได้ไปเข้าเครื่อง freeze dry เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดน้ำมันสาหร่ายต่อไป

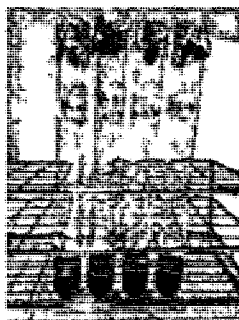


รูปที่ 3.12 ลักษณะของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ผ่านขั้นตอนการ Freeze dry แล้ว

3.4.12 การสกัดน้ำมันสาหร่าย และกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริเฟเคชัน

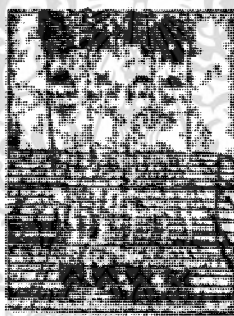
3.4.12.1 นำสาหร่ายที่ผ่านขั้นตอนการ Freeze dry แล้ว 0.3 กรัม

3.4.12.2 ใส่ตัวทำละลายเฮกเซน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในสาหร่ายในข้อที่ 3.4.12.1 ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที



รูปที่ 3.13 การสกัดสาหร่าย *Scenedesmus armatus* โดยใช้เฮกเซน

3.4.12.3 ทำการกรองแยกกากและของเหลวออกจากกัน (ใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 จำนวน 2 ชั้น) และนำกากที่เหลือจากการกรองไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.14 น้ำมันสาหร่ายที่ละลายในเฮกเซนหลังจากผ่านการกรองแล้ว

- 3.4.12.4 นำของเหลวที่กรองได้ไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ทำการจดบันทึกปริมาณที่ได้ จากนั้นนำเข้ากระบวนการทรานส์เอสเตอร์ริฟิเคชัน
- 3.4.14.5 นำเอทานอลใส่ลงในน้ำมันสาหร่ายที่ได้จากข้อ 3.4.14.4 ในอัตราส่วน 10:1 (เอทานอล:น้ำมันสาหร่าย)
- 3.4.14.6 จากนั้นใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 และ 2 โดยน้ำหนัก ลงไปในของเหลวที่ได้จากข้อ 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 การระเหยสารสกัดจากสาหร่ายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

3.4.15.1 เติมน้ำลงไปให้อ่างให้ความร้อน

3.4.15.2 เปิด สวิตช์ ส่วนให้ความร้อน ในส่วนของอ่างให้ความร้อน ตั้งค่าอุณหภูมิตามต้องการ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับ ชนิดตัวทำละลายที่ต้องการระเหยออก

3.4.15.3 เปิด สวิตช์ ส่วนควบคุมอุณหภูมิภายในระบบ ตั้งค่าอุณหภูมิล้อเย็นของ เฮกเซนที่ต้องการระเหยออก

3.4.15.4 เมื่อได้อุณหภูมิตามต้องการให้ใส่ตัวอย่างสาหร่ายลงไป ใน Evaporating flask ซึ่งจะอยู่ในส่วนให้ความร้อน โดยปากขวดจะต่อกับส่วนหมุน ส่วนกันขวดจะอยู่ในอ่างให้ความร้อน

3.4.15.5 เปิดสวิตช์ ส่วนหมุน จากนั้นปรับอัตราการหมุน

3.4.15.6 เปิดสวิตช์ ส่วนทำสุญญากาศ pump เริ่มทำงาน

3.4.15.7 เปิดสวิตช์ ชุดควบคุมความดันแบบอิเล็กทรอนิกส์ ตั้งค่าความดัน โดย set ค่าได้จากหน้าจอที่ปรากฏ โดยการตั้งค่าความดันจะขึ้นอยู่กับชนิดตัวทำละลายที่ต้องการระเหยออก จากนั้นสั่ง start จากปุ่มหน้าจอ

3.4.15.8 เมื่อเฮกเซนระเหยได้ตามที่ต้องการ ให้เอาสารออกจาก Evaporating flask และนำเฮกเซนที่ระเหยออกมาได้ใน Receiving flask ไปเก็บไว้ใช้ในงานอื่นๆต่อไป และเติมน้ำในอ่างที่ให้ความร้อนทิ้งไป

3.4.15.9 ปิดระบบ โดยปิดระบบย้อนศรกลับจากวิธีการเปิดระบบ



รูปที่ 3.15 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporater)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.16 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Shimadzu GC-2014)

3.4.16.1 เปิดเครื่อง GC โดยเริ่มต้นจากการเปิดปั๊ม เปิดแก๊สไฮโดเจน 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 ให้ทำการให้ความร้อนแก่คอลัมน์ เพื่อเป็นการทำความสะอาดสารของเราที่อาจตกค้างอยู่ออกไป โดยให้ตั้งอุณหภูมิสูงสุดที่ใช้ในการวิเคราะห์คอลัมน์เป็นเวลา 20-30 นาที เมื่อครบเวลาให้กด System off เพื่อหยุดการให้ความร้อน จากนั้นให้ปิดปั๊ม และแก๊สไฮโดรเจนก่อน แต่ยังไม่สามารถปิดเครื่อง GC ได้ ต้องรอให้อุณหภูมิของคอลัมน์ ตัวอย่าง และดีเทคเตอร์ อยู่ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส ระหว่างที่รออุณหภูมิลงให้ทำการล้างเข็มฉีดสารตัวอย่างด้วยน้ำอูตราเพียว หลังจากนั้นให้ปิดเครื่อง GC คอมพิวเตอร์ แก๊สไนโตรเจน และฮีเลียม ตามลำดับ



รูปที่ 3.16 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (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)

3.4.18 การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, μ) (ยศวดี 2547)

ถ้าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) เป็นอัตราที่เซลล์แบ่งตัว มีค่าเท่ากับจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นหารด้วยเวลา ถ้าหากไม่มีการตายเกิดขึ้นเลยปริมาณในการสะสมในการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ที่ระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase) จะได้ดังสมการ

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

เมื่อ μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

N = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

N_0 = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันสุดแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

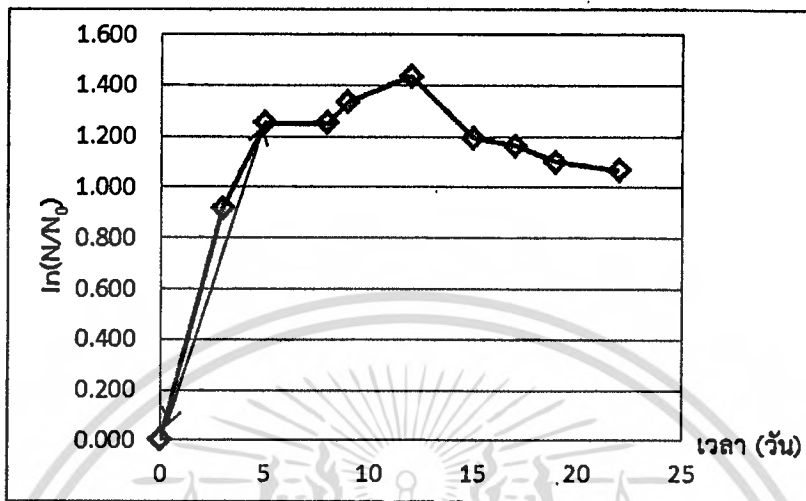
t = เวลา (วัน)

3.4.18.1 นำค่าการนับเซลล์สาหร่ายที่นับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ที่บันทึกไว้มาคำนวณค่าและเขียนกราฟระหว่างค่า $\ln(N/N_0)$ และวันที่เก็บตัวอย่าง

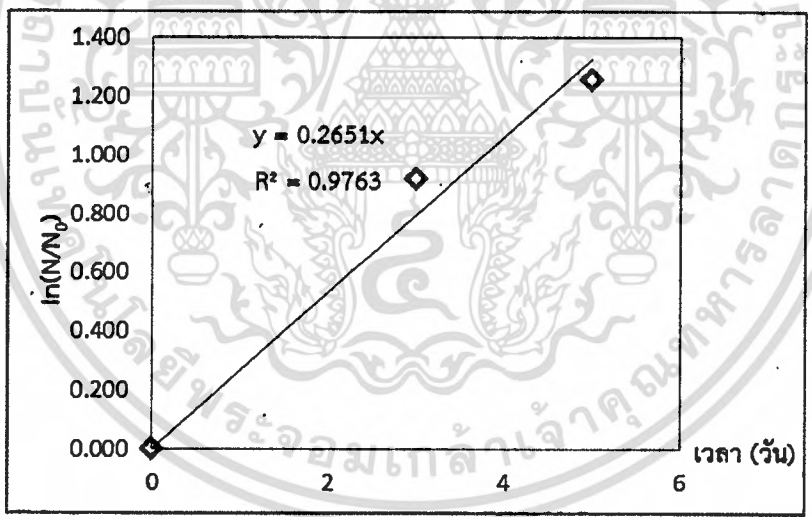
3.4.18.2 เลือกค่าที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase) ดังรูปที่

3.16

3.4.18.3 เขียนกราฟเฉพาะค่าที่เลือก จนได้เป็นกราฟเส้นตรง ให้เพิ่มจัดรูปแบบเส้นแนว
 โนม์ เลือกเชิงเส้น แสดงจุดตัดบนแกน สมการบนแผนภูมิ และค่า R-square
 บนแผนภูมิ ดังรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.47 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(N/N_0)$ กับวันที่เก็บตัวอย่าง บริเวณลูกศรสีแดงคือค่าที่อยู่ใน
 ระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase)



รูปที่ 3.18 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, μ) คือ 0.2651

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อ

ในช่วงต้นได้ทำการต่อเชื้อเดิมที่เคยมีและได้ทำการเก็บตัวอย่างมาเพิ่มเติมจากธรรมชาติ 2 แห่ง ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง บริเวณหน้าคณะครุศาสตร์ แหล่งน้ำบ่อบัวคณะเกษตร แหล่งน้ำบริเวณคณะเกษตรมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยก จากการทดลองนำน้ำจากตัวอย่างน้ำที่ได้นำมาใส่อาหาร N-8 จำนวน 1 หยด เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเพื่อง่ายต่อการนำไปคัดแยกบนเพลทอาหาร เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 7 วันภายใต้แสงจากหลอดไฟ ที่อุณหภูมิห้องพบว่าเกิดตะไคร่น้ำขึ้นจำนวนมาก เมื่อนำไปส่องดูเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบเซลล์สาหร่าย พบเพียงแต่เซลล์ของตะไคร่น้ำที่เพิ่มขึ้นจำนวนมาก เหตุที่พบตะไคร่น้ำอาจเป็นผลมาจากในช่วงที่เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝน มีสภาพอากาศแปรปรวน อุณหภูมิและแสงแดดไม่คงที่ และน้ำฝนที่ตกลงมาถูกชะล้างสู่แหล่งน้ำทำให้สภาพแวดล้อมภายในแหล่งน้ำอยู่ในช่วงการเปลี่ยนแปลงเป็นผลให้สาหร่ายอาจจะไม่เจริญเติบโตเนื่องจากสภาพอากาศไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงนำหัวเชื้อที่คัดแยกไว้แล้วในปีก่อนมาทำการเลี้ยงต่อเพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์

4.2 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 อาหารปริมาตร 100 มิลลิตร ใช้เซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (หัวเชื้อ) 10^5 เซลล์ต่อมิลลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงรวม 24 วัน และนำไปวัดการเจริญเติบโต ได้ผลน้ำหนักเซลล์แห้งดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

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

การนับเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตโดยตรงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้วัดการเจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แสดงผลดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 แสดงจำนวนเซลล์มีชีวิตจากการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์นอกจากนี้ยังทำให้เห็นลักษณะภายนอกของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* อีกด้วย กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยทั่วไปแบ่งระยะการเจริญเติบโตออกเป็น 5 ระยะ แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองจากรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะที่เห็นได้ชัดเจน คือ ช่วง 3 วันแรกของการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอ็กซีโพเนนเชียล (Exponential phase) หรือระยะที่เซลล์แบ่งตัวทวีคูณ ซึ่งเป็นระยะที่นำมาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) 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 ซึ่งต่างจากอาหารสูตร BG-11 ที่ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน (ไม่ได้กราฟ ณ ที่นี้) จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 มีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 17 คือ 1.8133×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์และระยะเวลาในการเจริญเติบโตสูงสุดในทุกสูตรอาหารที่ดัดแปลงสูตรแล้วทุกความเข้มข้น อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 8 คือ 1.366×10^5 , 1.313×10^5 , 1.100×10^5 และ 1.080×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 10 ตามลำดับ

การวัดค่าการดูดกลืนแสงนับได้ว่าเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ทำได้ง่าย เนื่องจากเป็นการวัดสีที่เกิดขึ้นโดยผ่านการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 และ 680 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าหลังจาก 6 วันแรกของการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าอาหารสูตร BG-11 นั้น มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีลักษณะไปในทางเดียวกันกับการนับเซลล์คือ มีลักษณะเป็นเส้นกราฟการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยทั่วไป นั่นคือมีช่วงระยะเซลล์คงที่ยาวกว่าอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ยังมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นไปอีกกราฟเหมือนรูปประฆังคว่ำที่สูงกว่ามากขึ้นเท่านั้น 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าหลังจาก 3 วันแรกของการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าอาหารสูตร BG-11 นั้น มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีลักษณะไปในทางเดียวกันกับการนับเซลล์คือ มีลักษณะเป็นเส้นกราฟการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยทั่วไปและอาหารสูตร 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 *Scenedesmus 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

การวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องสโปกโทโรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งถือได้ว่าเป็นวิธีการวัดปริมาณทางอ้อมโดยเทียบจากปริมาณสารสีเขียว และเขียนป็นเหลือของสารคลอโรฟิว จากตารางที่ 4.6 จึงเลือกวัดความยาวคลื่นที่สีของตัวกรองแสงแทนการวัดสีของสารละลาย และเลือกวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เนื่องจากความยาวคลื่นนี้อยู่ระหว่างสีเขียว และเขียวเหลืองซึ่งตรงกับตัวเซลล์ และมีงานวิจัยหลายๆ งานวิจัยเลือกวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรเช่นกัน (ขจรเกียรติ 2550, ชุตินันท์ และคณะ 2552, เบญจพร และคณะ 2555, อัจฉาน และคณะ 2556) และอีกความยาวคลื่นที่วัดใช้คือ 680 นาโนเมตร (Mandotra 2014) ซึ่งเป็นช่วงที่สีของตัวกรองแสงมีสีแดงจึงไม่เหมาะสมกับสีของตัวอย่างที่ทดลอง แต่ถ้าเลือกตามสีของสารละลายแล้วจะอยู่ในช่วงสีเขียวน้ำเงิน ดังนั้นควรเลือกวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

จากงานวิจัยของ Cerón García และคณะ (2005) พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Carteria* sp. AARL G045 และ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในอาหารสูตร AM ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก พบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Carteria* sp. AARL G045 โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายมีการเจริญสูงสุด ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ กลับพบว่ามีค่าต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส อีกสองความเข้มข้น (0.01 และ 0.02 โมลาร์) แต่ก็มีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตโทรฟิกที่เป็นชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากการเสริมกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้สาหร่ายมีพลังงานเพียงพอต่อความต้องการใช้ในกิจกรรมของเซลล์ เซลล์สาหร่ายจึงลดการสร้างคลอโรฟิลล์ที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการตรึงแสงเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

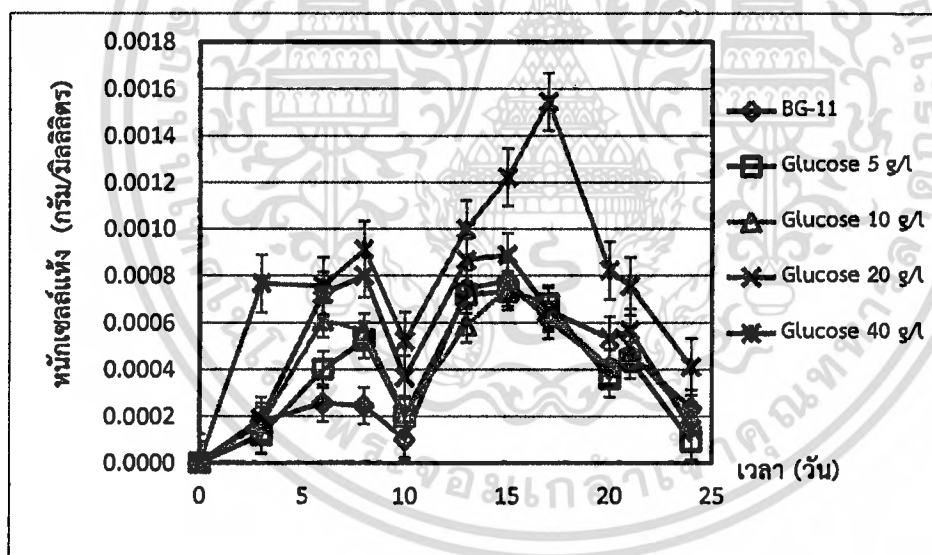
นอกจากนี้เซลล์ยังมีการสะสมไขมันไว้ภายในเม็ดไขมัน (lipid granule) ทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Wu และคณะ 1992) จากงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์ใช้หลักการของแสง ซึ่งสีมีผลต่อการดูดกลืนแสงอย่างมาก จากตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 เซลล์จะมีลักษณะสีเขียวกว่าที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น ที่ส่งผลให้เซลล์มีลักษณะสีเขียวออกเหลือง ดังรูปที่ 4.7

การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์ ซึ่งจะใช้ส่วนใส (ของเหลว) ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วมาหาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-Sulfuric Method) และเมื่อผ่านวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริกแล้วสารละลายตัวอย่างจะมีสีส้ม (ตามหัวข้อที่ 3) โดยเลือกวัดความยาวคลื่นที่ 490 นาโนเมตร เนื่องจากเลือกวัดตามสีของสารละลายดังตารางที่ 4.6 สีที่อยู่ระหว่างความยาวคลื่นนี้คือ สีส้ม และสีแดง และได้ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคส ดังตารางที่ 4.7. จากรูปที่ 4.8 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

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 ดังนั้นอัตราความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงของกลูโคสมีผลต่อการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลของสาหร่าย จากผลการทดลองครั้งนี้จึงคัดเลือกความเข้มข้นกลูโคสที่ 10 กรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะบ่มอัดอากาศต่อไป

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

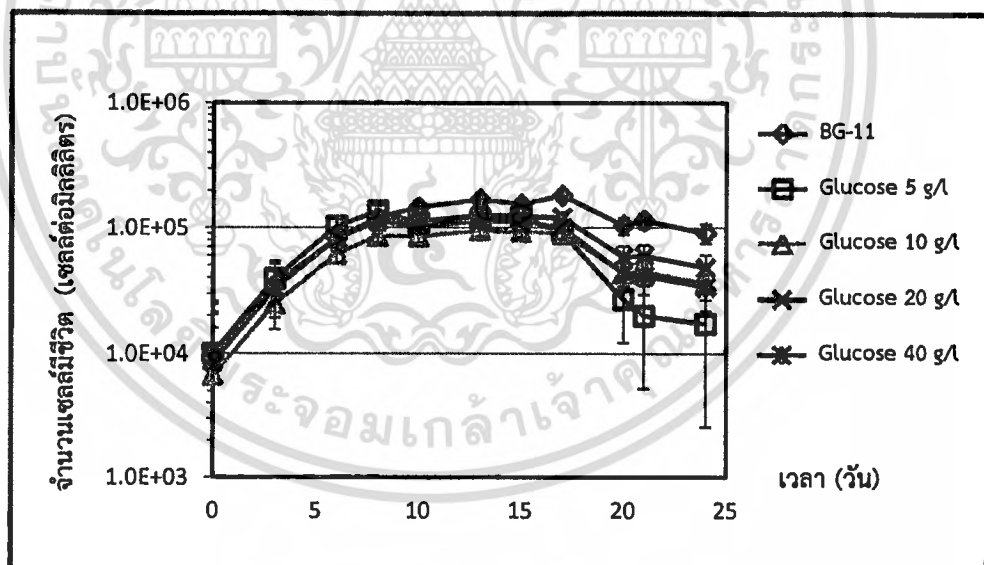
วันที่เก็บ	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อมิลลิลิตร)				
	BG-11	Glucose 5 g/l	Glucose 10 g/l	Glucose 20 g/l	Glucose 40 g/l
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	0.0002	0.0001	0.0002	0.0002	0.0008
6	0.0003	0.0004	0.0006	0.0007	0.0008
8	0.0002	0.0005	0.0006	0.0008	0.0009
10	0.0001	0.0002	0.0002	0.0004	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 *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

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

วันที่เก็บ	จำนวนเซลล์สาหร่ายเฉลี่ย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				
	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 4.2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

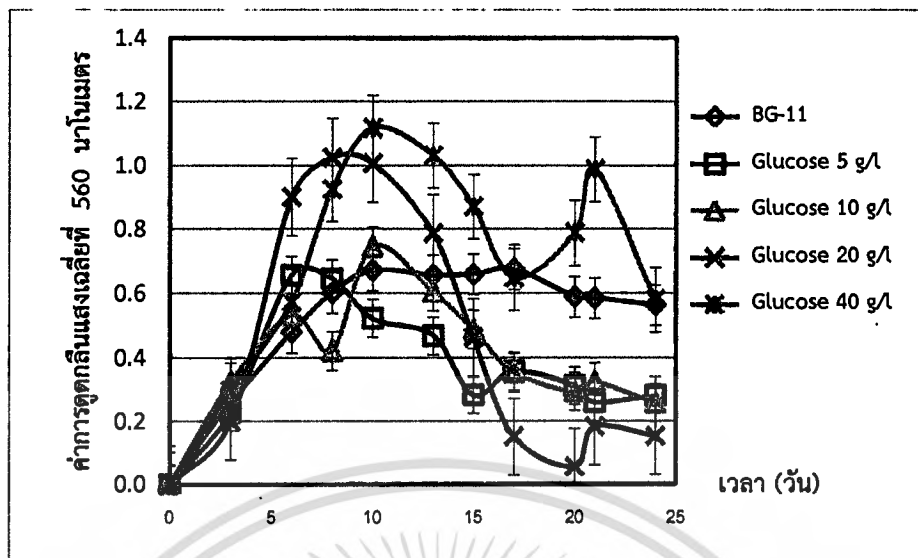
ตารางที่ 4.3 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

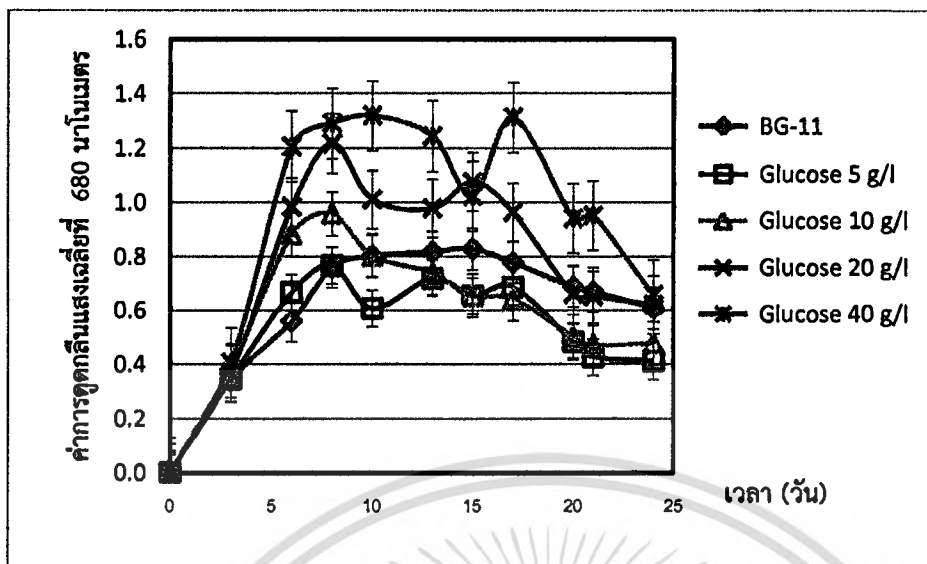


รูปที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กัระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

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

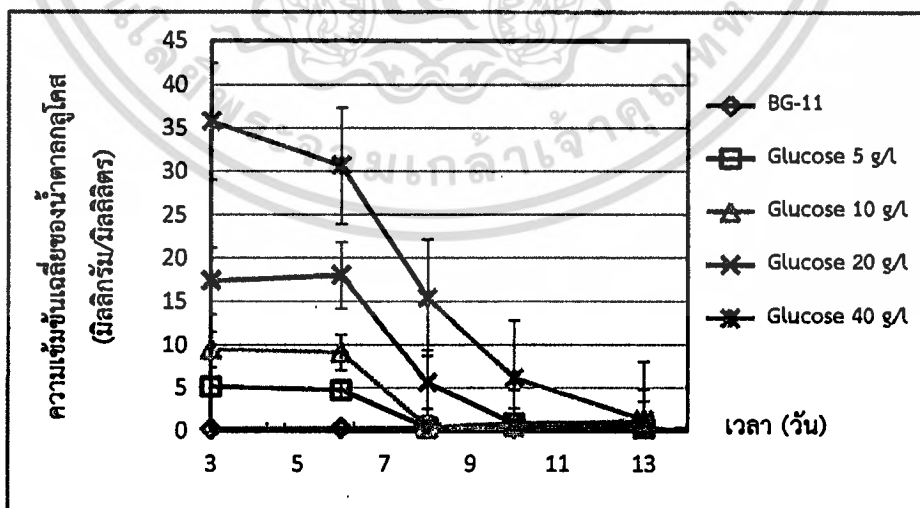
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 สาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (รูปซ้าย) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคส (รูปขวา)

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว 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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

4.2 สภาวะภายใต้ปั๊มอัดอากาศและการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedenmus armatus*

จากผลการทดลองเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะการให้อากาศแบบสายยางปกติ และสามทางเจาะรู เป็นเวลา 3 วัน (ภาคผนวก ข-1) จะเห็นได้ว่าแบบสายยางปกติมีความเหมาะสมกับการทดลองของเรา เนื่องจากอัตราการไหลของอากาศมีความสัมพันธ์กับระดับน้ำที่ลดลง เพราะถ้าหากเราให้อัตราการไหลที่เร็ว จะทำให้ระดับน้ำลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน เราจึงเลือกการให้อากาศแบบสายยางปกติ มาใช้ในการทดลองโดยใช้สภาวะ 2 สภาวะคือ ปั๊มให้อากาศขนาดใหญ่ และปั๊มให้อากาศขนาดเล็ก ตามลำดับ ซึ่งวัดอัตราการไหลของอากาศได้ 190 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นทำการนับจำนวนฟองอากาศ และวัดขนาดฟองอากาศเพื่อดูพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การนับจำนวนฟองอากาศที่นับได้ในเวลา 30 นาที และพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว

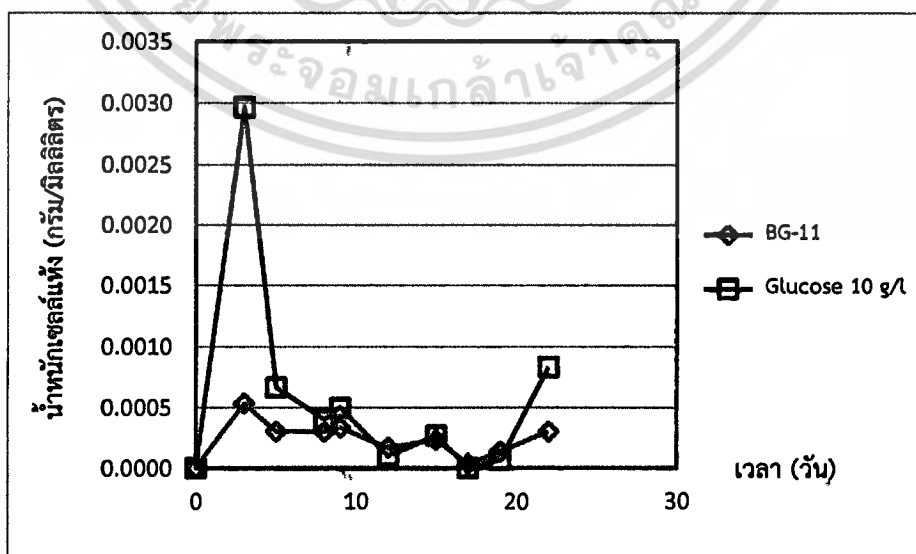
ขนาดปั๊ม	จำนวนฟองอากาศ (ฟอง)	พื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลว (เซนติเมตร)
ปั๊มใหญ่	34,920	12.34
ปั๊มเล็ก	36,000	19.44

จากตารางที่ 4.8 แสดงการนับจำนวนฟองอากาศ และวัดขนาดฟองอากาศโดยใช้สภาวะ 2 สภาวะ คือ ปั๊มให้อากาศขนาดใหญ่ และปั๊มให้อากาศขนาดเล็ก ตามลำดับ ให้อากาศแบบสายยางปกติ ที่อัตราการไหล 190 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะเห็นได้ว่า ปั๊มให้อากาศขนาดใหญ่ ได้จำนวนฟองอากาศทั้งหมด 34,920 ฟอง และพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลวเท่ากับ 12.34 เซนติเมตร ส่วนปั๊มให้อากาศขนาดเล็ก ได้จำนวนฟองอากาศทั้งหมด 36,000 ฟอง และพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลวเท่ากับ 19.44 เซนติเมตร จากผลการทดลองจะเห็นว่าปั๊มให้อากาศขนาดเล็กให้จำนวนฟองอากาศ และค่าเฉลี่ยพื้นที่ผิวในการถ่ายโอนออกซิเจนไปสู่อาหารเหลวที่มากกว่าปั๊มให้อากาศขนาดใหญ่ เนื่องจากปั๊มให้อากาศขนาดเล็กมีกำลังไฟฟ้าที่มากกว่า ปั๊มให้อากาศขนาดใหญ่จึงทำได้งานที่มากกว่า รวมถึงพื้นที่ของท่อที่ให้อากาศก็เล็กกว่าจึงส่งผลให้เกิดแรงดันที่มากทำให้เกิดฟองอากาศที่มากกว่าปั๊มให้อากาศขนาดใหญ่ จากนั้นนำปั๊มให้อากาศขนาดใหญ่ไปเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะอาหาร BG-11 และนำปั๊มให้อากาศขนาดเล็กไป

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะอาหาร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะแสดงให้เห็นในตารางที่ 4.9

การเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในโหลเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะบ่มอัดอากาศ ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในขวดโหลเพาะเลี้ยงขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ให้อากาศแบบสายยางปกติที่ระดับ 190 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สาหร่ายเริ่มต้น (หัวเชื้อ) 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยง รวม 22 วัน และนำไปวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง ตารางที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร

วันที่เก็บ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร)	
	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



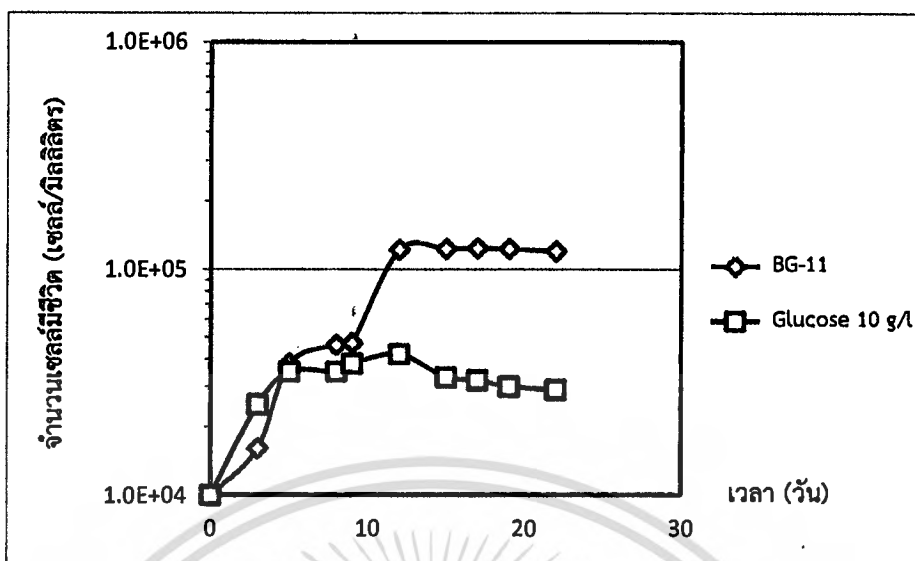
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ภายใต้สภาวะป้อนอากาศ ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุดในวันที่ 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 4.8 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ภายใต้สภาวะบ่มอ็อกอากาศ ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในช่วงวันที่ 1 - 3 สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว มีจำนวนเซลล์สิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตได้ดีกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 คือ 0.250×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 0.160×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่า อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 4.11 จากตารางที่ 4.11 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (0.2651 ต่อวัน) มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 (0.1656 ต่อวัน) เนื่องจากกลูโคสมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายทำให้สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 นั้นเอง จากนั้นเราจึงทำการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดังตารางที่ 4.12. จากรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่

560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 (สูงสุดในวันในวันที่ 17 คือ 0.617) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (สูงสุดในวันในวันที่ 5 คือ 0.675) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น สีของอาหารก็จะเข้มมากยิ่งขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นตามไปด้วย

จากรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 (สูงสุดในวันในวันที่ 17 คือ 0.695) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (สูงสุดในวันในวันที่ 5 คือ 0.591) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น สีของอาหารก็จะเข้มมากยิ่งขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นตามไปด้วย

การหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.14

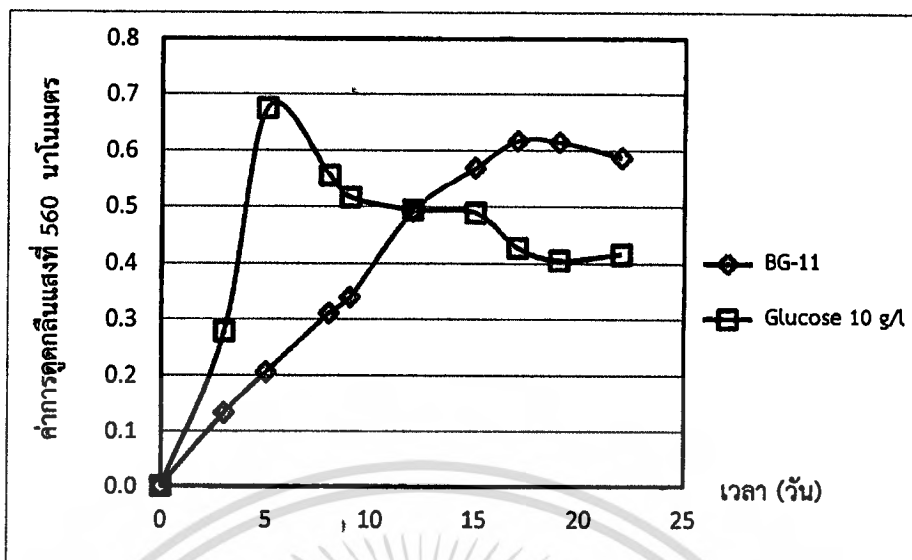
ตารางที่ 4.11 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) ของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

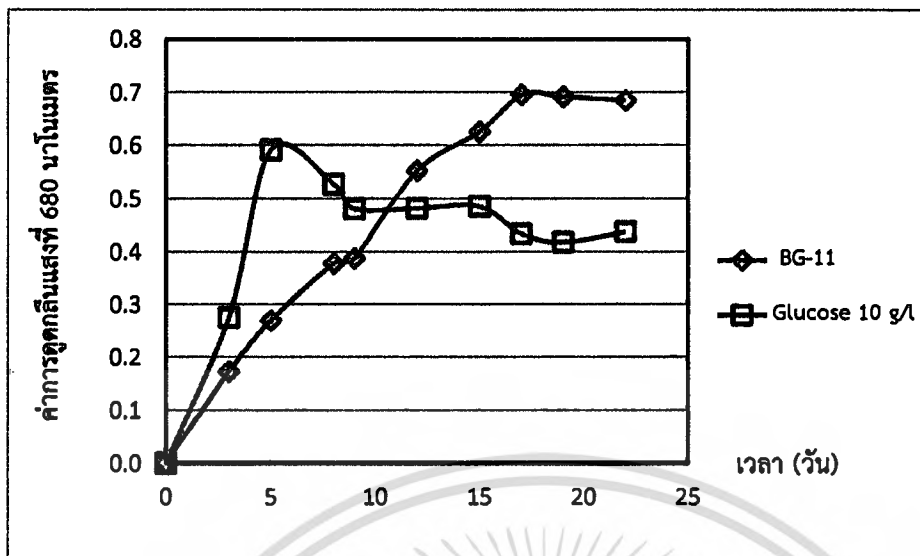


รูปที่ 4.9 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ 560 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 4.13 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ตัดแปลงสูตรแล้ว 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

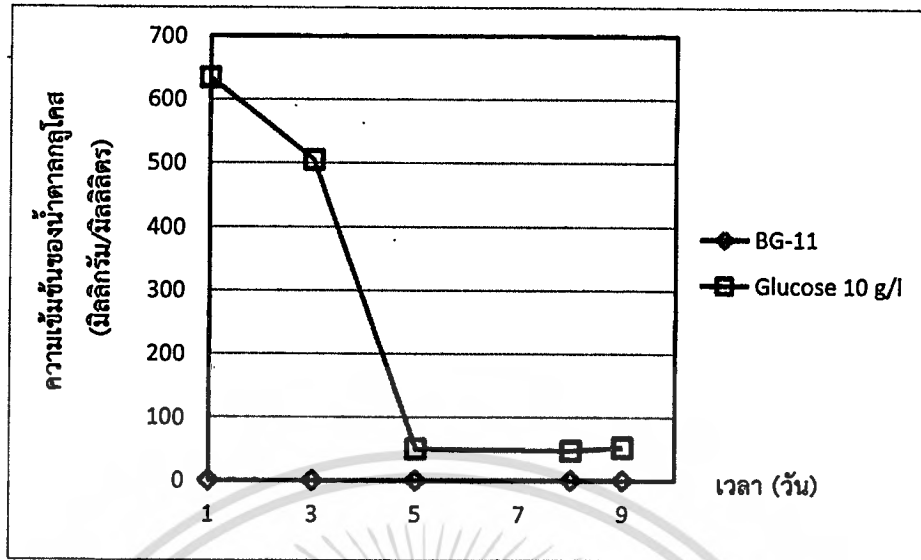


รูปที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ 680 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 4.14 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การวัดปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรกับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสของสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองจะเห็นว่าอาหารสูตร 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 การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายระหว่างสภาวะเขย่ากับบีม้อัดอากาศ

จากการทดลองวัดการเจริญเติบโตของทั้ง 2 สภาวะ พบว่า ในสภาวะเขย่าหัวข้อที่ (4.1) มีจำนวนเซลล์มีชีวิต และค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสภาวะบีม้อัดอากาศหัวข้อที่ (4.2) แต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าเนื่องจากในสภาวะบีม้อัดอากาศ กมลพรรณ (2548) มีการเพิ่มอากาศลงไปในอาหารทำให้สาหร่ายมีการกระจายตัวสม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นผลทำให้สาหร่ายได้รับสารอาหารอย่างทั่วถึง ทำให้สาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มมากขึ้นซึ่งมากกว่าแบบการเลี้ยงโดยไม่เพิ่มอากาศลงไปหรือในสภาวะเขย่านั่นเองและจากการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* ในสภาวะเขย่า และบีม้อัดอากาศดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำการเก็บตัวอย่างในระยะเวลาที่ คือวันที่ 14 มาทำการ Freeze Dry เพื่อให้สาหร่ายอยู่ในรูปผงแห้ง ซึ่งง่ายต่อการเก็บรักษา และการนำไปสกัดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.15 พบว่า การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะบ่มอัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำหนักรายแห้งแห้ง 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 โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในอาหารสูตร BG-11 ของทั้งสองสภาวะก็มีปริมาณน้ำหนักรายแห้งสูงกว่าอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว ของทุกความเข้มข้น

จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการ Freeze Dry แล้วของทั้งสองสภาวะ และทุกสูตรอาหารไปทำการสกัดน้ำมันต่อไป ยกเว้นสภาวะบ่มอัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เนื่องจากตัวอย่างที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว มีลักษณะเป็นแผ่นๆ ไม่เป็นผงเหมือนตัวอย่างอื่นๆ ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว ดังรูปที่ 14

ตารางที่ 4.15 น้ำหนักรายแห้งแห้ง (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว

สภาวะที่เพาะเลี้ยง	สูตรอาหาร	น้ำหนักรายแห้งแห้ง (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



รูปที่ 4.12 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะบ่มอัดอากาศในอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการ Freeze Dry แล้ว

4.4 การสกัดและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

นำสารละลายที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาสกัดตามวิธีในข้อ 3 จะได้น้ำมันสารละลาย ดังตารางที่ 4.16 พบว่าปริมาณไขมันในอาหารสูตร BG-11 (เขย่า) มีปริมาณน้อยกว่าในอาหารสูตร BG-11 (ขวดโหล) และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้ว โดยการเติมน้ำตาล 5 และ 10 กรัมต่อลิตร (เขย่า) จากนั้นนำน้ำมันสารละลายที่ได้ไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปวิเคราะห์ด้วยด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีต่อไป 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 เนื่องจากความเข้มข้นของกลูโคสจะส่งผลต่อ การเจริญของสาหร่าย หากมีปริมาณมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและการสะสมไขมันของสาหร่าย และจากงานวิจัยของจิโนรส และคณะ (2551) เลี้ยงสาหร่ายทองถิ่นสายพันธุ์คลอเรลลาโดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง Watanabe โดยมีการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนที่ต่ำ พบว่า สาหร่ายมีการผลิตปริมาณไขมันสูงขึ้นและมีการเพิ่มสารประกอบอื่น เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วย เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กลูโคส และเหล็กที่อยู่ในรูปสารประกอบเพอร์ริคคลอไรด์ เป็นต้น ซึ่งพบว่า กลูโคสที่สาหร่ายได้รับไปนั้นจะกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันภายในเซลล์ ส่วนสภาวะที่ไม่มีการเติมกลูโคสแต่มีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์ต่ำ

จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น ที่พบว่าความเข้มข้นของกลูโคส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร มีส่วนในการเพิ่มปริมาณไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายมากกว่าในอาหารสูตร BG-11 ที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส

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

4.5 การวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

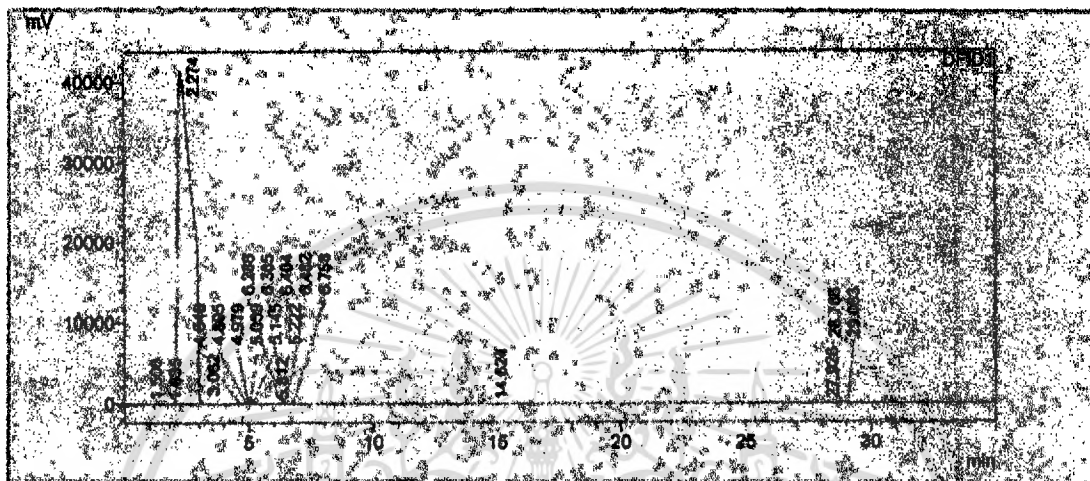
จากปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ข้างต้นมีปริมาณน้อยมาก จึงใช้เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ภายใต้สภาวะตามวิธีการข้อ 3.4.16 แต่เนื่องจากการทดลองนี้ไม่มีสารตัวอย่างมาตรฐานของไบโอดีเซล หรือ Fatty acid Ethyl Esters (FAEEs) จึงไม่สามารถบอกได้ว่า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

จากงานวิจัยการศึกษาศักยภาพของน้ำมันสาหร่าย *Scenedesmus incarnatus* เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus incarnatus* และไขมันที่ได้ในระหว่างการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีการสังเคราะห์แสงร่วมกับการให้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ (Mixotrophic) เป็น 1.8 กรัมต่อลิตร และ 19.5 ± 1.5 ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ องค์ประกอบที่สำคัญของไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันสาหร่าย *Scenedesmus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

incrasatulus คือ Methyl Palmitate (26 เปอร์เซ็นต์) และ Methyl Linoleate (49 เปอร์เซ็นต์) (Martha และคณะ 2013) ดังนั้น สาหร่าย *Scenedenmus armatus* ที่นำมาทดลองนี้ก็ยังสามารถผลิตน้ำมันได้เช่นเดียวกัน

4.5.1 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้ผล ดังรูปที่ 4.15 และรูปที่ 4.16



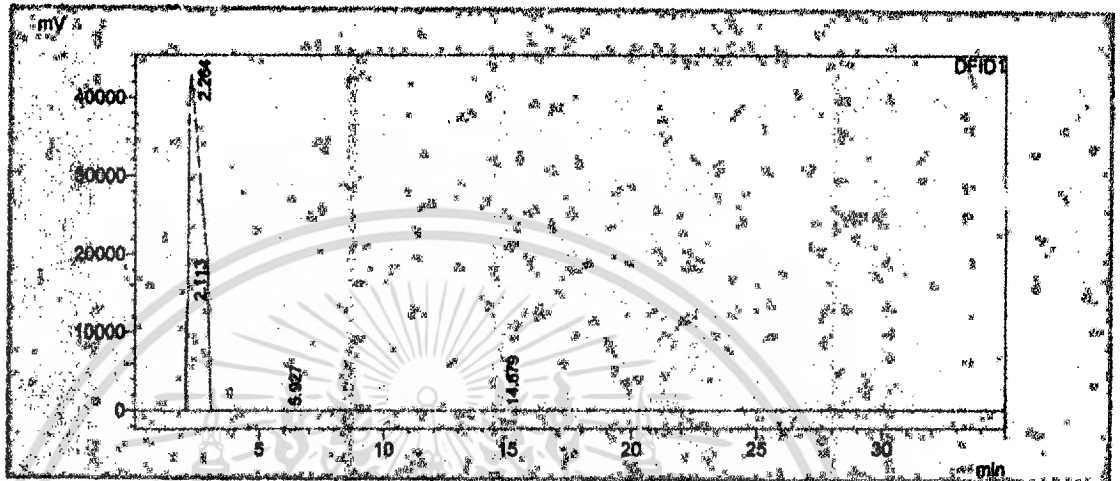
รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 1)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27.93	6,786
28.77	9,834
29.08	6,698
รวมพื้นที่ได้กราฟทั้งหมด	1,593,030,631

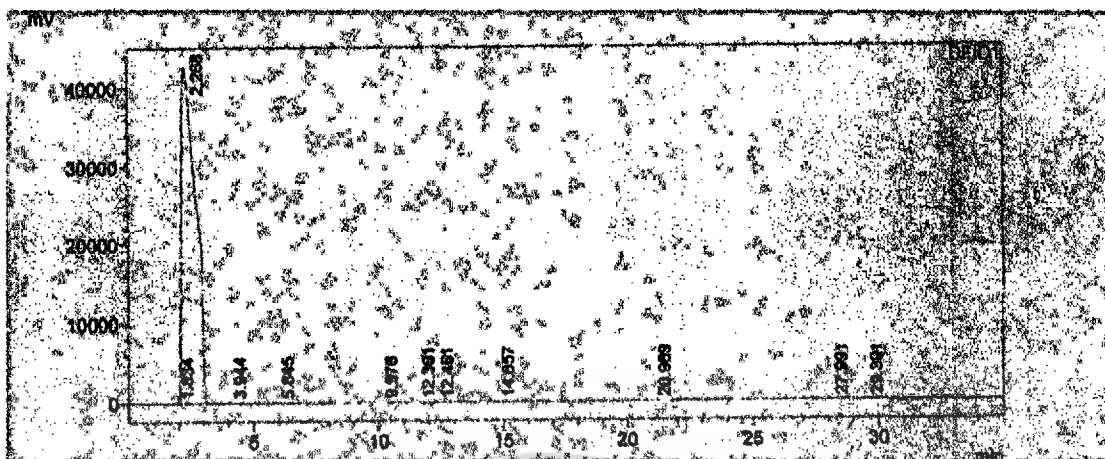


รูปที่ 4.14 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ 4.18 วิเคราะห์เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ซ้ำที่ 2)

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

4.5.2 ตัวอย่างน้ำมันสาหร่ายในสภาวะเขย่าที่ผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชั่น แล้ววิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้ผลดังรูปที่ 4.17-4.24

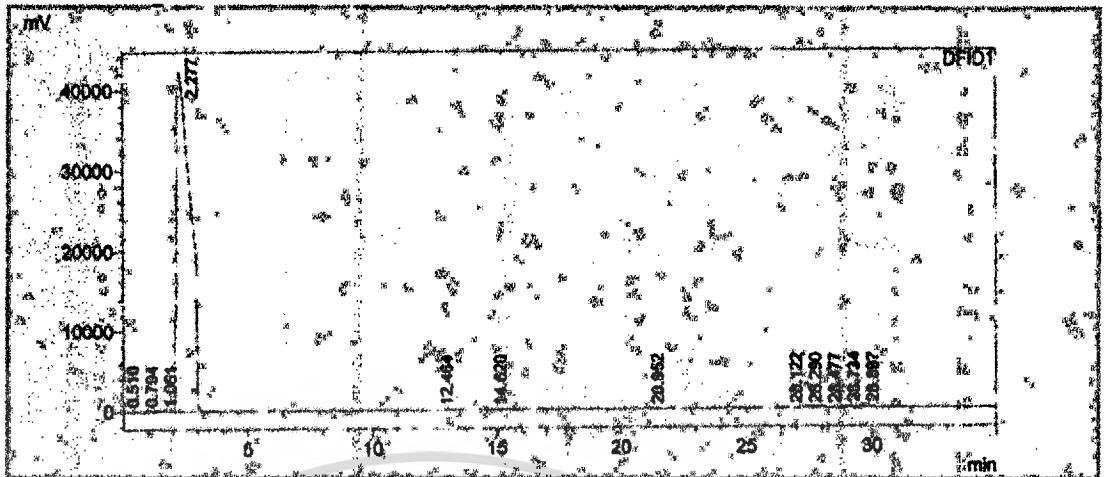


รูปที่ 4.15 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 1)

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

เวลา	พื้นที่ได้กราฟ
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
รวมพื้นที่ได้กราฟทั้งหมด	1,340,164,158

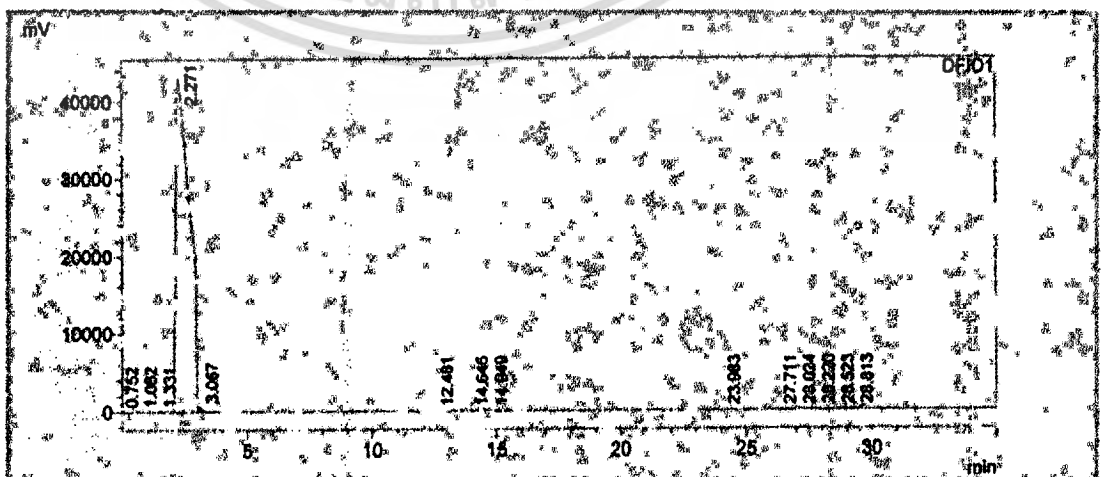
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 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

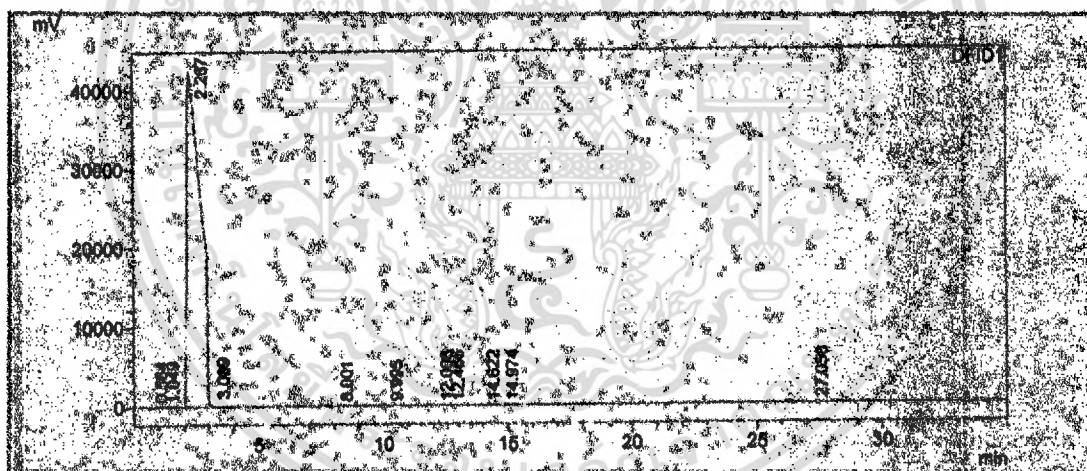


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.17 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ 4.21 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหาร

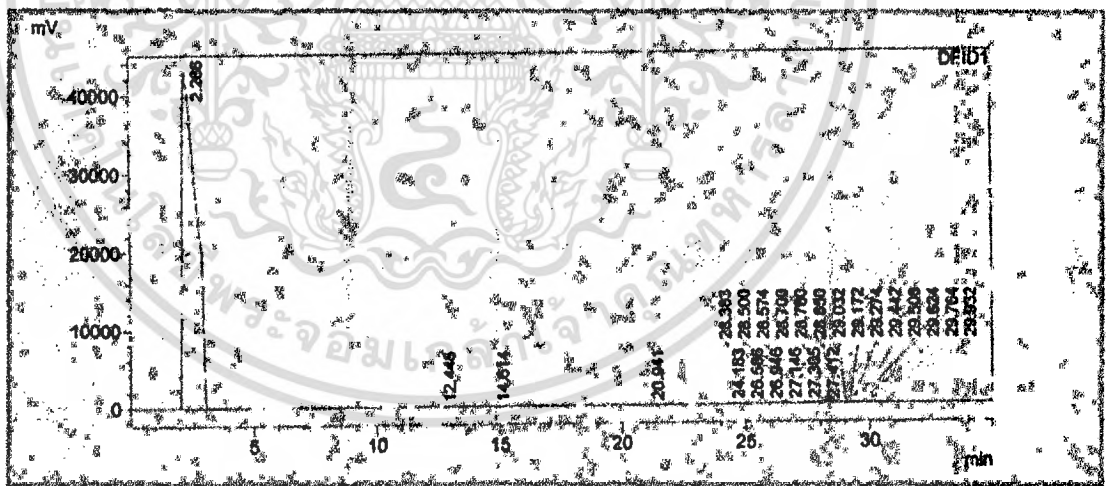
เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.07	13,580
1.34	2,066
2.27	818,715,156
3.1	460,364
3.42	2,212
6.01	3,724
6.72	2,572
9	2,597
12.15	2,224
14.29	180,444
รวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด	819,384,939



รูปที่ 4.12 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ 4.22 น้ำมันสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* ในสภาวะอาหาร กลูโคส 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



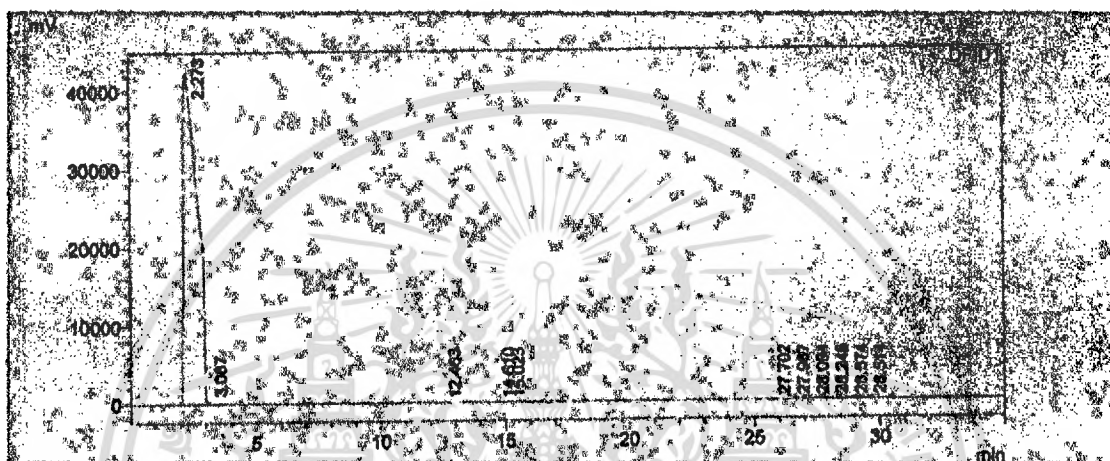
รูปที่ 4.13 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหาร เพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 1)

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

เวลา	พื้นที่ใต้กราฟ
1.07	7,294

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
รวมพื้นที่ได้กราฟทั้งหมด	810,314,993



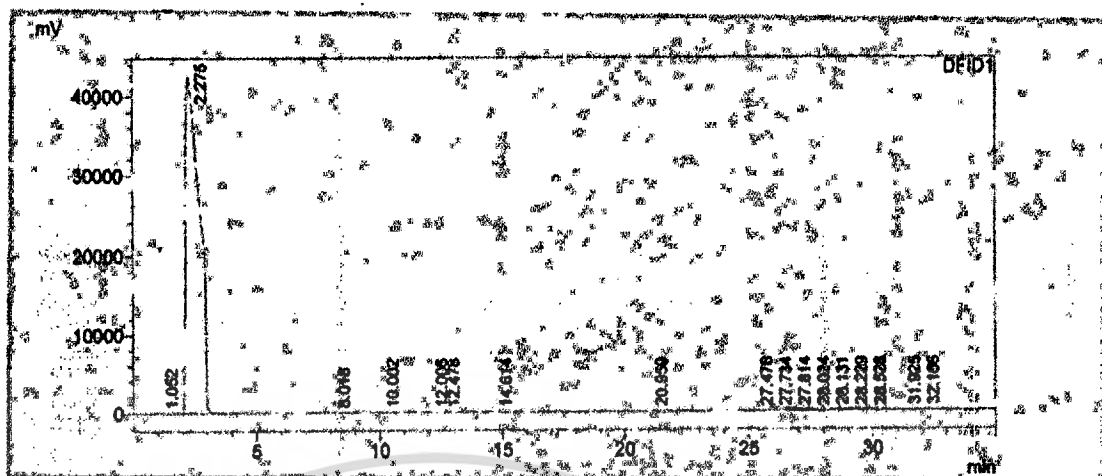
รูปที่ 4.4 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรแล้วโดยเติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร (ซ้ำที่ 2)

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

เวลา	พื้นที่ได้กราฟ
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
รวมพื้นที่ได้กราฟทั้งหมด	827,737,721

4.5.3 ตัวอย่างน้ำมันสาหร่ายในสภาวะบ่มอัดอากาศที่ผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันแล้ววิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้ผลดังรูปที่ 4.26-4.27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

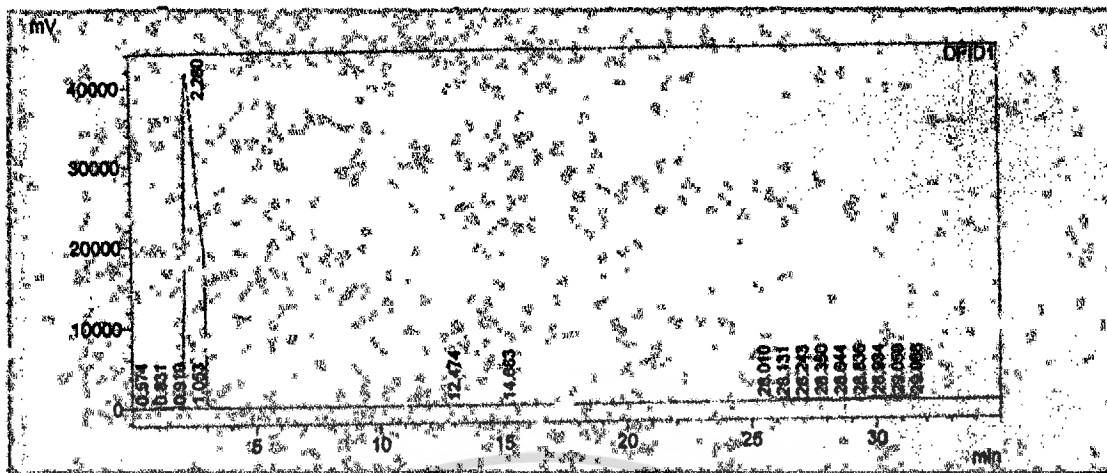


รูปที่ 4.5 ชนิดของกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 (ซ้ำที่ 1)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลงานวิจัย

จากการทดลองทำการศึกษาสภาวะการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedenmus armatus* เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันที่สามารถผลิตเป็นไบโอดีเซลได้ โดยทำการทดลองในอาหารสูตร BG-11 และอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงสูตรด้วยการเติมน้ำตาลกลูโคส 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในระบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 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

ควรระบุชนิดน้ำมันที่ได้

เอกสารอ้างอิง

- กมลพรรณ แก้วปิ่นทอง. 2548. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis*. ในดังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอวกาศยก. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. คณะวิศวกรรมศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 110-113.
- กิตติคุณ สุคันธวงศ์, ธนียา แซ่โอ้ว และสันติสุข ขวัญศิริวนิช. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูงด้วยวิธีย้อมสีไนล์เรด. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. คู่มือปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algal Culture). คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ชนิษฐา ไชเจริญ, วิไลลักษณ์ จำรูญ และสาธิต โกวิทวาทิ. 2547. ปริมาณโปรตีนในสาหร่าย 4 ชนิด *Chlorella* sp., *Kirchneriella* sp., *Navicula* sp. และ *Coccomyxa* sp. ที่ระยะเวลาการเลี้ยงต่างๆ เรื่องเต็มประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 : สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. หน้า 224-229.
- จิรรัตน์ พรหมนารด และสุนิรัตน์ เรืองสมบุรณ์. 2556. ผลของความเข้มข้นไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus*. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. ปีที่ 7 ฉบับที่ S1.
- จิโนรส ศรีศิริ, ยິงยศ ลับภู, ประสงค์ วงศ์วิชา และกันยรัตน์ โทละสุด. 2551. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายทองถิ่นเซลล์เดียว. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชุตินันท์ ทองสุขา, เนตรนภา แก้วกุล และภริสา ต้นเจริญ. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธัญญารัตน์ ธรรมไพศาล, อัจฉราภรณ์ จงมีสุข และอุทัยวรรณ มากศิริ. 2553. การเลี้ยงเซลล์ยีสต์เพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม. หน้า 3-11.
- ชนะพันธ์ พิธิยาธนาสิน, ธาดา ระพันธ์วิรุฑ และรัชวัฒน์ ตั้งตระกูลพิพัฒน์. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นฤตชวรรณ สัญญาโณ. 2556. การเก็บเกี่ยวและผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก. วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- เบญจพร สุขอุ่ม, เสาวลักษณ์ อาดำ และเจี๊ยะนุรีดา เวาะเลง. 2555. การศึกษาการเจริญงอกประกอบของเซลล์และการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก. โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประกาศิต สีเที่ยงธรรม และอนุพนธ์ เดชจบ. 2555. การคัดเลือกและศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการผลิตไขมันสูง. โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- พนิดา รัตนพลที. 2552. การประยุกต์ใช้สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตไบโอดีเซล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พิงษ์ ภัทรสุปรีย์, ชัชวาล ทองวุฒิศักดิ์ และปานจิตร ศรีสุรา. 2554. การผลิตน้ำมันและจำหน่ายน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายคลอเรลล่า. โครงการทางธุรกิจ หลักสูตรบริหารธุรกิจมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- แพรวพิลาศ ดุจจานุทัศน์ และผกาวิดี แก้วกันเนตร. 2553. การใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรเป็นแหล่งอาหารให้สาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล. 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* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- รัตนภรณ์ สีสิงห์. 2551. ไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 35 หน้า 135-143.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. แพลงก์ตอน. : บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย (Review of Biodiversity Research in Thailand). โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. หน้า 1-20
- วรวิมล เกิดปราง. 2555. การใช้สาหร่ายขนนก *Caulerpa sertulaeioides* เพื่อกระตุ้นการลอกคราบของปูหิน. สาขาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง.

- สุวิมล ทรัพย์ทวีภูมิ. 2553. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่เร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสตรึงรูป. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อาภรณ์ บัวหลวง, สมบัติ คงวิทยา และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. 2556. แนวทางการใช้ประโยชน์จากตะไคร่น้ำ. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้.
- อชวาน เจอะอาแว, วันเฉลิม สังข์ทอง และสินทิพย์ ด้านสุวรรณเมฆ. 2556. การคัดเลือกสายพันธุ์ การเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก. โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. 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 CO₂ 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 CO₂ 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.
- Morowvat 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 Zhoug J., 2011. CO₂ biofixtion and fatty acid compostion of *Secenedesmus obiquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresoure Technology*. 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

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

[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 (04

[Online].Available : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2556/amicro40356dd_ch5.pdf (04

[Online].Available : <http://home.kku.ac.th/chuare/12/spectrophotometer.pdf>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

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

โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)	1.5	กรัมต่อลิตร
ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.04	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.075	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.036	กรัมต่อลิตร
กรดซิตริก (Citric acid)	0.006	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียเฟอร์ริกซิเตรท (Ammonium ferric citrate)	0.006	กรัมต่อลิตร
โซเดียมเอทิลีน ไดอะมีน เตตระอ็อกซิ (EDTANa ₂)	0.001	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	0.02	กรัมต่อลิตร
Trace element	1	กรัมต่อลิตร
Trace element		
กรดบอริก (H_3BO_3)	2.86	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.81	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.02	กรัมต่อลิตร
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.39	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.08	กรัมต่อลิตร
โคบอลท์ ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	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
การวัดอากาศและความชื้นแสง

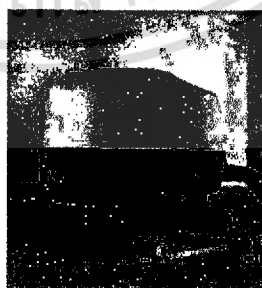
ข-1 การวัดระดับน้ำจากขวดโหลเพาะเลี้ยงที่ให้อัตราการไหลของอากาศต่างกัน

ตารางที่ ข-1 การวัดระดับน้ำจากการให้อากาศแบบสายยางปกติ สามทางเจาะรู และอัตราการไหลของอากาศที่ 190, 340, 600, 160, 330 และ 640 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

หัวที่	สามทางเจาะรู			สายยางปกติ		
	1	3	5	2	4	6
อัตราการไหลของอากาศ (มิลลิลิตรต่อนาที)	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

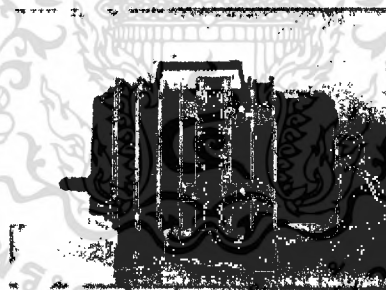


รูปที่ ข-2 บีมให้อากาศขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-3 การวัดขนาดฟองอากาศ (บีมใหญ่)



รูปที่ ข-4 บีมให้อากาศขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-5 การวัดขนาดฟองอากาศ (บีมเล็ก)

ตารางที่ ข-4 การนับฟองอากาศในเวลา 30 นาที

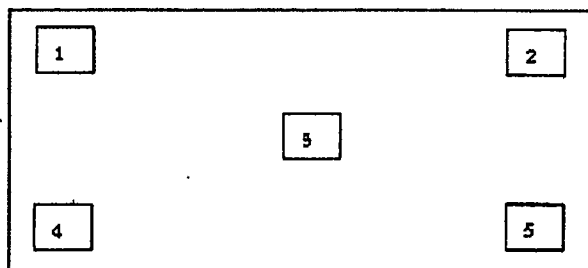
สภาวะการให้อากาศ	เวลาในการนับ (นาที)	จำนวนฟองอากาศที่นับได้	เฉลี่ยขนาดฟองอากาศ (ซม.)
บีมขนาดใหญ่	30	34,920	12.34
บีมขนาดเล็ก	30	36,000	19.44

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				

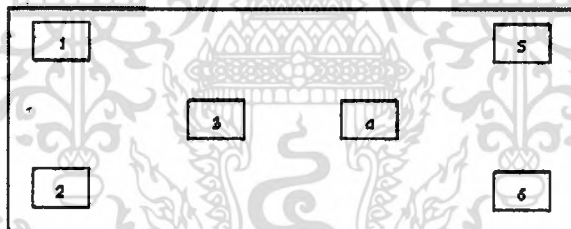
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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)	ซ้ำที่ 1	2,270	2,330	4,450	2,150	1,940	4,170
	ซ้ำที่ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* และ
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัด**
**Optimal Condition for Cultivation of *Scenedesmus Armatus* Cultivation and
Antioxidant Activity of Its Extract**

ดวงกมล เรืองงาม*
Duangkamol Ruen-ngam*

บทคัดย่อ

Scenedesmus armatus เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีสำคัญในฐานะผู้ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและไบโอดีเซล งานวิจัยมีเพื่อศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus armatus* อันได้แก่ ศึกษาเรื่องสูตรอาหาร ศึกษาประเภทของหัวพ่นอากาศรูปแบบต่างๆ ศึกษาความเข้มแสง โดยเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการทดลองในระบบขนาด 800 mL และจากนั้นจะทำการขยายขนาดในระบบ 5,000 mL โดยใช้ปริมาณอาหาร 400 mL และอาหาร 4,000 mL ตามลำดับ จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดสารต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมในระบบอาหาร 400 mL ความเข้มแสง 3,400 lux อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ศึกษาได้แก่ BG11 N-8 และ BBM พบว่า BG11 สามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ความเข้มข้นเซลล์มากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ และอาหารชนิดนี้จะนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป ผลของความเข้มแสงระหว่าง 2,700 และ 3,400 lux พบว่า 3,400 lux เหมาะสมกับการเลี้ยงสาหร่าย เปรียบเทียบหัวพ่นอากาศที่แตกต่างกัน 5 แบบ ได้แก่ หัวพ่นอากาศที่พิจารณาได้แก่ ท่อยางซิลิโคนตรง ท่อยางซิลิโคนดัดวงกลมเจาะรู ซิลิโคน 3 ทางเจาะรู หัวทรายทรงกลม และหัวทรายทรงกระบอก โดยนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงแบบเขย่า ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายพิจารณาจากปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ ปริมาณเซลล์มีชีวิตวัดที่ความยาวคลื่น 560 nm และ น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าหัวทรายทรงกลมสามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ปริมาณมากที่สุดคือ 6×10^6 cell/mL และ $3.34 \text{ g}_{\text{dried weight}}/\text{L}$ นอกจากนี้ได้ศึกษาในระบบขยายขนาด 5,000 mL พบว่าหัวพ่นอากาศแบบซิลิโคน 3 ทางเจาะรูให้ความเข้มข้นของเซลล์มากที่สุด คือปริมาณ 8.7×10^6 cell/mL และ 5 g/L ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ และบี เบตาแคโรทีน และไลโคปีน เป็น 28.61 11.02 8.24 และ 7.08 mg/100 mL ตามลำดับ สารสกัดที่ได้สามารถเจือจางสีของสารละลาย DPPH ได้และได้ค่าประสิทธิภาพในด้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละ 85.33 ใกล้เคียงกับเมื่อเทียบกับวิตามินซีที่ความเข้มข้น 1 g/100 mL ที่มีค่าเป็น ร้อยละ 135.33

ABSTRACT

Scenedesmus armatus is an important green microalgae for biodiesel and antioxidant producer. This research has focused on optimal condition for *Scenedesmus armatus* cultivation that covered with feed formular, type of sparger, light intensity. Preliminary test for the optimal condition investigation has done in 800 mL photoreactor then was used in large scale as 5,000 mL with medium volume of 400 mL and 4,000 mL, respectively. The production was then harvested and extracted for antioxidant compound and tested for its antioxidant ability. Preliminary tested for optimum medium in 400 mL cultivation system with light intensity of 3,400 lux. The investigated mediums were BG11, N-8 and BBM. Among the different medium, cells grown in BG11 medium showed the highest cell concentration compared with the others and then was further used in the next step. Effect of light intensity has been further investigated at 2,700 and 3,400 lux in 800 mL system. The result showed that 3,400 lux was enough for algae cultivation. The aeration system with five different air-sparger types (silicone tube, annulus sparger, three-way silicone, circular sand, cylindrical sand sparger) was then investigated and compared with ordinary shaker. The results of each condition were demonstrated in terms of cell concentration, viable cell density (OD 560 nm) and dried cell weight. The cultivation with the spherical sand sparger revealed the highest amount of algae cells with 6×10^6 cell/mL and $3.34 \text{ g}_{\text{dried weight}}/\text{L}$. The large scale cultivation of 5,000 mL system was also studied in this research. The three-way silicone tube with ream showed the highest amount of cell concentration of 8.7×10^6 cell/mL and 5 g/L. The concentration of chlorophyll a, b, β -carotene and lycopene were 28.61, 11.02, 8.24 and 7.08 mg/100 mL. The crude extract could decrease the color of DPPH and got the antioxidant inhibition was 85.33% which was comparable to Vitamin C at 1 g/100 mL was 135.33%.

คำสำคัญ: *Scenedesmus armatus* สารต้านอนุมูลอิสระ หัวพ่นอากาศ

Keywords: *Scenedesmus armatus*, green algae, sparger

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modelieba@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

Scenedesmus sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่พบมากในประเทศไทย พบในแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหล ดำรงชีวิตสองลอยเป็นอิสระและแบบยึดเกาะ ส่วนมากมักพบเซลล์อยู่รวมกัน 2-32 เซลล์มีลักษณะโค้งรูปไข่หรือทรงกระบอก สาหร่ายชนิดนี้มีคุณประโยชน์มากมายเนื่องจากเป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางอาหารสูงจึงสามารถใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมของมนุษย์และเป็นอาหารสัตว์ใช้ทำปุ๋ย ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย โดยประโยชน์ที่สำคัญและทำให้เกิดความสนใจคือสามารถผลิตสารให้คุณประโยชน์แก่มนุษย์ได้ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ลูทีน แอสตาแซนทิน นีโอแซนทิน เบต้าแคโรทีน วิตามินซี และซีแซนทิน สารเหล่านี้มีคุณสมบัติด้านสารอนุมูลอิสระได้ นักวิจัยหลายท่านจึงพยายามสกัดสารเหล่านี้ออกมาจากสาหร่าย เพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ [1-3] และเป็นแหล่งไขมันที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เป็นต้น

โดยทั่วไปแล้ว ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้นมีหลากหลายปัจจัย อันได้แก่ สารอาหาร อากาศ แสง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Arumugam และคณะ (2013) [4] ที่ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบการเจริญของชีวมวลสาหร่าย *Scenedesmus* sp. จากผลการทดลองพบว่าไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ชีวมวลเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือยูเรีย แต่ในงานวิจัยของ Xin และคณะ (2010) [5] พบว่าการใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายสีเขียวในปริมาณสูงที่สุด นอกจากปัจจัยทางด้านสารอาหารแล้ว อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. LX1 มีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและไขมัน

คือ 20 องศาเซลเซียส ส่วนในการทดลองของ Ho และคณะ (2014) [6] ทำการศึกษาปัจจัยของแสงที่ส่งผลต่อการผลิตลูทีนของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* FSP-3 โดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ต่างๆ ได้แก่ T55, T8, หลอด Helix ที่มีความเข้มแสงตั้งแต่ 30-600 $\mu\text{Mphoton}/\text{m}^3.\text{s}$ และพบว่าการใช้หลอดไฟ LED สีขาวทำให้สาหร่ายผลิตลูทีนได้ดีกว่าการใช้หลอดไฟ LED สีอื่น ในงานวิจัยของ Yin-Hu และคณะ (2016) [7] ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. LX1 ใช้ความเข้มแสงในช่วง 1,000 – 5,000 lux มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ในช่วง 10^6 - 6×10^6 cells/mL และพบว่าที่ความเข้มแสง 4,000 lux มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ในหน่วย cell/mL.d มากกว่าการเลี้ยงที่ความเข้มแสง 2,500 lux ถึง 2.67 เท่า และการศึกษาของ Abd El Baky และคณะ (2012) [8] ได้ทำการผสมคาร์บอนไดออกไซด์เข้ากับอากาศในปริมาณต่างๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* โดยพบว่าสาหร่ายมีการสะสมไขมันร้อยละ 38 เมื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 12 และสะสมไขมันร้อยละ 28 และเสริมด้วย Fe^{3+} ปริมาณ 10 mg/L ลงในอาหาร

จากงานวิจัยข้างต้นพบว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นงานวิจัยมีเพื่อศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus armatus* อันได้แก่ ศึกษาเรื่องสูตรอาหาร ศึกษาประเภทของหัวพันอากาศรูปแบบต่างๆ ศึกษาความเข้มแสง โดยเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการทดลองในระบบขนาด 800 mL และ 5,000 mL โดยใช้ปริมาตรอาหาร 400 mL และอาหาร 4,000 mL

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. สารเคมี

NaNO_3 K_2HPO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Citric acid Ferric ammonium citrate EDTA disodium

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

magnesium salt Na_2CO_3 Agar Disodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Monopotassium phosphate (KH_2PO_4) Potassium nitrate (KNO_3) Ferric Ethylene diaminetetraacetic Acid (FeEDTA) Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$) Calcium chloride (CaCl_2) Trace element NaNO_3 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ K_2HPO_4 KH_2PO_4 NaCl Trace element (TCl, Thailand) น้ำกลั่น

2. การถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

นำฟลasks บรรจุเชื้อ *S. armatus* ที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณสวนสาธารณะบึงพระราม

จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำมาทำการคัดเลือกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนจานอาหารแข็ง BG11 ใช้เทคนิค cross streak ภายใต้ตู้ถ่ายเชื้อ (Super Clean, 120BS, Thailand) ปุ่มที่อุณหภูมิห้อง และให้ความเข้มแสง 1,700-1,800 lux วัดโดยเครื่องวัดความเข้มแสงหรือ Lux meter (Takemura, DM-28, Japan) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จากนั้นเลือกจานอาหารที่มีเชื้อเจริญขึ้นและไม่เกิดการปนเปื้อนทำการคัดเลือกโคโลนีเดียวเพื่อถ่ายลงในหลอดอาหารแข็งซึ่งเตรียมเหมือนข้างต้น โดยใช้เทคนิค simple streak (คัดเลือก 1 colony/1 slant) เพื่อเก็บไว้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

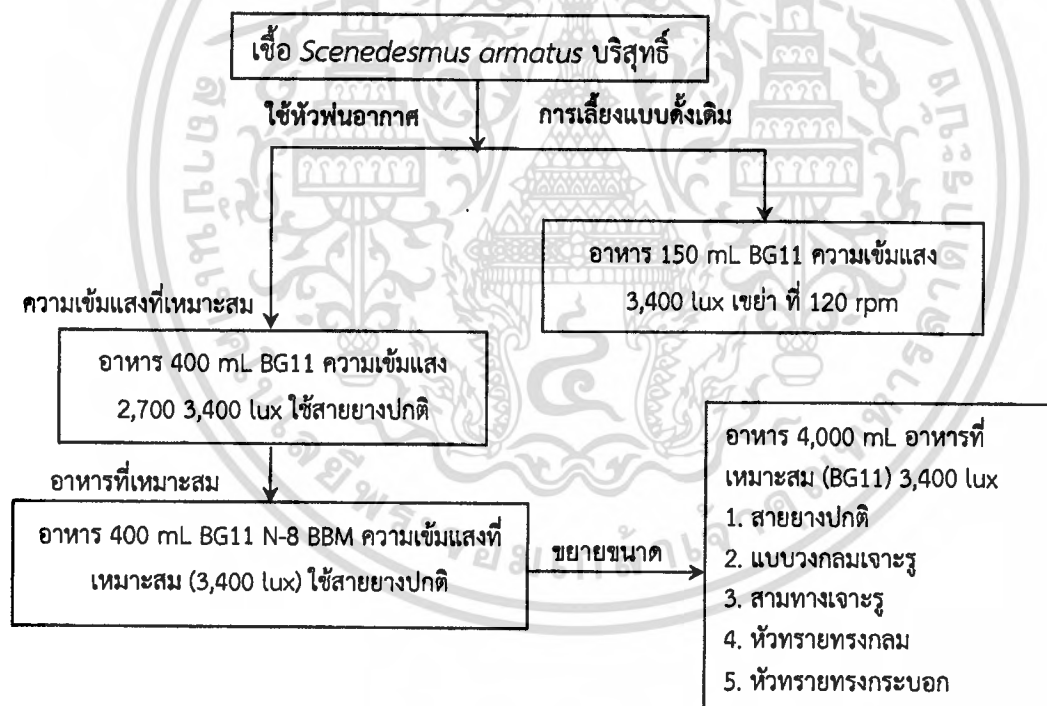


Figure 1 Flow diagram

3. การเลี้ยงแบบดั้งเดิม

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* ในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากหัวช็อกก่อนหน้าโดยเลี้ยงในฟลask ขนาด 250 mL โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 150

mL ใช้เครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,400 lux และทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน ดังแสดงใน Figure 1

* duangkamoLru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

4. การเลี้ยงด้วยหัวฟ่นอากาศ

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ ในระบบขนาด 800 และ 5,000 mL คือ มีอาหาร 400 และ 4,000 mL ตามลำดับ ป้อนอากาศผ่านหัวฟ่นอากาศแบบต่างๆ ที่ประดิษฐ์ขึ้น ได้แก่ A = สายยางปกติ B = แบบวงกลมเจาะรู (จำนวน 4 รู แต่ละรูห่างกัน 1 cm สายยางยาว 11 cm) C = แบบสามทางเจาะรู (สายยางยาว ด้านละ 2.5 cm สายยางแนวอนเจาะรูด้านละ 1 รู แนวตั้งเจาะ 2 รู ด้านตรงข้ามกัน ปิดปลายสายยางทั้ง 3 ด้านด้วยการลนไฟ) และ D = แบบหัวทรายทรงกลม (ขนาดเส้นรอบวง 10 cm) และ E = แบบหัวทรายทรงกระบอก (ขนาด

เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm ยาว 2.5 cm) แสดงใน Figure 2 โดยใช้เครื่องปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 47W (Atman, HP-8000) และเครื่องปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 58W (Yamano, AP-40, China) ในระบบอาหาร 400 mL จะให้ปริมาณอากาศ 80 mL/min และระบบขยายขนาดให้ปริมาณอากาศเป็น 1,500 mL/min การเลี้ยงในระบบขยายขนาดต้องมีการถ่ายเชื้อจากระบบการเลี้ยงแบบเขย่าในห้องปฏิบัติการ (ขนาด 250 mL) ไปสู่ระบบขนาดใหญ่โดยต้องมีความเข้มข้นของเซลล์ในระบบใหม่อยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 cell/mL ดังแสดงแผนผังการทดลองใน Figure 1

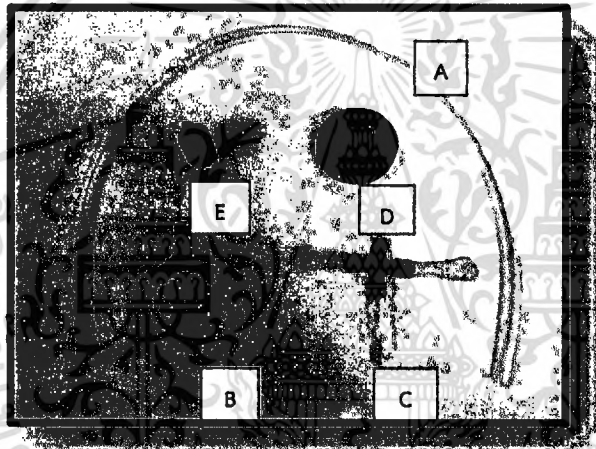


Figure 2 Different type of sparger: A = silicone tube, B = annulus sparger, C = three-way silicone sparger, D = circular sand sparger, E = cylindrical sand sparger

5. การเลี้ยงด้วยความเข้มแสงต่างๆ

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ โดยใช้หัวฟ่นอากาศแบบสายยางปกติ ในอาหารสูตร BG11 ในระบบอาหาร 400 mL ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 lux ทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

ความเป็นกรด-ด่าง แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องมือนี้ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave, TOMY, ES-315, Japan) โดยทดสอบในระบบอาหาร 400 mL ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,400 lux ด้วยหัวฟ่นอากาศแบบสายยางปกติ ทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

6. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอัดอากาศ โดยใช้หัวฟ่นอากาศแบบสายยางปกติ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารทั้ง 3 สูตร ได้แก่ BG11 N-8 medium และ BBM ปรับปริมาตร ปรับค่า

7. การวัดการเจริญของเซลล์สาหร่าย

7.1 วิธีการหาค่าหน้าเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 mL ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 rpm (4,100 g) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (HERMLE,

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

หน้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Z326K, Germany) เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเซลล์แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (WTB binder, ED53, Germany) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักทุกครั้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND, GF-800, Japan) รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (g/L) จากผลที่ได้นำไปคำนวณประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตซึ่งแสดงด้วยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ โดยใช้สูตร [9]

$$\mu_{max} = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ x คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาการเลี้ยงที่ 1 และ 2 (g/L) และค่าอัตราการเพิ่มของเซลล์ (Biomass productivity, P) ดังสูตร [9] และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$P \text{ (mg dried weight/l. day)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}_x - \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}_1}{T_x - T_1}$$

เมื่อ T_x คือ เวลาสุดท้าย และ T_1 คือเวลาเริ่มต้น

7.2 วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์ Haemocytometer

การนับเซลล์ทำได้โดยใช้สไลด์นับเซลล์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, CH30, Japan) เมื่อดูตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาหร่ายและนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ จะพบตาราง 25 ช่องใหญ่ ภายในมีตารางขนาดเล็ก 16 ช่อง ในการนับเซลล์ถ้าจำนวนเซลล์หนาแน่นมากอาจสุ่มนับ 5 ช่อง แต่ผลที่ได้ต้องคูณ 5 ทำการนับ 2 ซ้ำ คำนวณตามสูตรและหาค่าเฉลี่ย

$$\text{cell/mL} = \frac{C \times D \times 1000}{A \times d \times F}$$

เมื่อ C = จำนวนสาหร่ายที่นับได้ A = พื้นที่ของ grids เท่ากับ 0.04 mL^2 d = ความลึกของพื้นที่ที่นับ เท่ากับ 0.1 mL F = จำนวนช่องหรือตารางที่นับ D = ค่าการเจือจาง

7.3 วิธีการวัดความหนาแน่นโดยอาศัยแสง (Optical Density; OD)

นำตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการหาความหนาแน่นใส่ในคิวเวต แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10S UV-VIS, USA) ที่ความยาวคลื่น 560 nm บันทึกค่า OD ที่วัดได้

7.4 การเก็บสาหร่ายแห้ง

นำตะกอนสาหร่ายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer, Heto, Lyolab 3000, Denmark) เพื่อกำจัดน้ำออกในระดับเซลล์แล้วเก็บสาหร่ายแห้งไว้ที่ตู้เย็นแช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (SANYO, Japan) เพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป

8. การสกัดสารและการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ อันได้แก่ เบตาแคโรทีน และลิโคปีน หาได้จากการใช้การดูดกลืนแสงของสารสกัด การสกัดสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการเขย่า และการใช้ชุด soxhlet นำสาหร่ายแห้งที่ได้จากหัวข้อก่อนหน้า สกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธีการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราส่วนสาหร่ายต่อเอทานอลเป็น 1:134 (g/mL) และด้วยวิธีการสกัดด้วยชุด soxhlet โดยใช้ ethanol ปริมาตร 150 mL จากนั้นนำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศให้เหลือปริมาณสารละลายเอทานอล 20 mL จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ที่พิจารณาและคำนวณปริมาณแต่ละองค์ประกอบดังสมการ [10] และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (mg/100 mL)} = 0.999A_{663} - 0.0989A_{645}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (mg/100 mL)} = -0.328A_{663} + 1.77A_{645}$$

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

หน้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณเบตาแคโรทีน (mg/100 mL)} &= 0.216A_{663} \\ &- 1.22A_{645} - 0.034A_{505} + 0.452A_{453} \\ \text{ปริมาณลิโคปีน (mg/100 mL)} &= (-0.0458A_{663}) + \\ &0.204A_{645} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453} \end{aligned}$$

9. การตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระจะใช้วิธี DPPH assay ซึ่งเตรียมให้มีความเข้มข้น 0.35 mM ในเอทานอล ร้อยละ 95 ในที่มีด นำสารละลาย DPPH ผสมกับสารละลายที่สกัดได้ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในที่มีด 30 นาที วัดการดูดกลืนสีที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (MF A062780, Labsystems, model) จากนั้นคำนวณฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant inhibition) ดังสมการ

$$\begin{aligned} \text{ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (\%)} \\ = \left(\frac{1 - A_e}{A_o} \right) \times 100 \end{aligned}$$

เมื่อ A_o คือค่าการดูดกลืนของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง A_e คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อสารละลาย DPPH ถูกเจือจางสีด้วยตัวอย่างสารสกัด

ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. ผลของสูตรอาหาร

จากข้อมูลน้ำหนักแห้งและการนับเซลล์ พบว่าอาหารทั้ง 3 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณสาหร่ายได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนการวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm พบว่าการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ในครั้งที่ 1-8 (ช่วงวันที่ 1-15) ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารทั้ง 3 สูตรนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่การวัดค่า OD ในครั้งที่ 12 (วันที่ 23) เป็นต้นไปเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน BBM มีค่า OD ต่ำกว่าอาหาร BG11 และ N-8 อย่างเห็นได้ชัด ส่วน

ค่า OD ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ N-8 นั้นยังไม่มี ความแตกต่างกันตั้งแต่การวัดผลครั้งที่ 1-11 (ช่วงวันที่ 1-21) โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 มีกราฟการเจริญสูงกว่าอาหาร N-8 ในการวัดผลครั้งที่ 12 (วันที่ 23) เป็นต้นไป จากการพิจารณาผลการทดลองโดยพิจารณาจากตัวแปร 3 ค่า พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างของผลการทดลองอย่างเห็นได้ชัด แต่เนื่องจากเซลล์สาหร่าย *S. armatus* ที่เจริญในอาหาร BG11 นั้นมีลักษณะตัวใหญ่กว่าที่เลี้ยงในอาหาร N-8 และ BBM ดังนั้นจึงใช้ BG11 ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. ผลของความเข้มแสง

จากข้อมูลน้ำหนักแห้งและการนับเซลล์ของทั้ง 2 ความเข้มแสง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสาหร่ายได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนการวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะหรือความชันตลอดช่วงการเจริญเติบโตมากกว่าเมื่อใช้ความเข้มแสง 3,400 lux ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yin-Hu และคณะ [7, 11] พบว่าที่ความเข้มแสง 4,000 lux มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในหน่วย cell/mL.d มากกว่าการเลี้ยงที่ความเข้มแสง 2,500 lux ถึง 2.67 เท่า ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงใน Table 1

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

Table 1 Specific growth Rate (μ) and Biomass productivity of the 800 mL cultivation system with different sparger types and light intensity

Conditions	Specific Growth Rate, μ^* ($g_{dried\ weight}/L.day$)	Biomass Productivity, P^* ($mg_{dried\ weight}/L.day$)
A	0.0599 \pm 0.008	0.1629 \pm 0.022
B	0.0695 \pm 0.011	0.1486 \pm 0.020
C	0.0653 \pm 0.009	0.1484 \pm 0.021
D	0.0731 \pm 0.012	0.2344 \pm 0.042
E	0.0731 \pm 0.011	0.184 \pm 0.018
G	0.0313 \pm 0.007	0.1208 \pm 0.017
L	0.0317 \pm 0.007	0.1566 \pm 0.018

Remark: *average \pm SD, A = silicone tube, B = annulus sparger, C = three-way silicone sparger, D = circular sand sparger, E = cylindrical sand sparger with 3,400 lux, G = shake with 120 rpm and L = silicone with 2,700 lux

3. การเลี้ยงสาหร่ายในระบบขนาด 800 มิลลิลิตร

Figure 3 เป็นการแสดงการวัดผลด้วยการนับจำนวนเซลล์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่วงแรก คือ ครั้งที่ 1-2 (วันที่ 1-4) ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนการนับเซลล์ในครั้งที่ 3-6 (วันที่ 7-16) นั้นหัวฟ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกัน แต่การนับเซลล์ในครั้งที่ 7 (วันที่ 19) เป็นต้นไปหัวฟ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงกว่าหัวฟ่นอากาศแบบอื่นอย่างเห็นได้ชัด โดยรวมแล้วพบว่าหัวฟ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงสุดเมื่อเทียบกับหัวฟ่นอากาศแบบอื่นๆ ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการวัดปริมาณด้วยค่า OD และการวัดด้วยน้ำหนักแห้ง หัวฟ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกัน และเจริญได้ดีกว่าหัวฟ่นแบบอื่นๆ ซึ่งยืนยันได้จากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะได้ผลดัง Table 1 ส่วนระบบการเลี้ยงแบบเขย่า สาหร่ายเจริญเติบโตได้น้อยที่สุดเนื่องมาจากว่าการเพาะเลี้ยงแบบเขย่านั้นไม่มีการให้อากาศลงในพลาสติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยตรง

สาหร่ายเจริญเติบโตได้โดยใช้เพียงแค่อากาศจากภายนอกที่ซึมผ่านลำลึกลงไปในพลาสติกเท่านั้นและการเขย่าถึงแม้จะช่วยให้อากาศสามารถใช้อากาศได้ดียิ่งขึ้น แต่การเขย่าทำให้เกิดการวนของน้ำในลักษณะวอร์เท็กซ์ (vortex) ทำให้สาหร่ายได้รับอากาศน้อยกว่าการฟ่นอากาศลงในขวดเพาะเลี้ยงโดยตรงซึ่งโดยมากใช้วิธีนี้เป็นวิธีอ้างอิงในการออกแบบระบบการเลี้ยงเซลล์แบบต้องการอากาศ [12] ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าหัวฟ่นอากาศที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* ในระบบขนาด 800 mL คือ หัวฟ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม ซึ่งสาเหตุที่หัวฟ่นอากาศแบบนี้ทำให้มีการเจริญสูงสุดนั้นน่าจะเป็นเพราะหัวทรายนั้นมีรูพรุนเล็กๆ จำนวนมาก ทำให้ฟองอากาศที่ออกมามีขนาดเล็กและมีปริมาณมาก ซึ่งจะให้อากาศกระจายอย่างทั่วเต็มขวดทดลอง และสาหร่ายได้รับอากาศอย่างทั่วถึงกว่าหัวฟ่นของอากาศลักษณะอื่นที่ฟองอากาศมีขนาดใหญ่และกระจายอากาศได้ไม่ทั่วถึง อย่างไรก็ตามหัวทรายมีข้อเสียคือเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายเพราะการฆ่าเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้ทำได้ยาก

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebeg@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

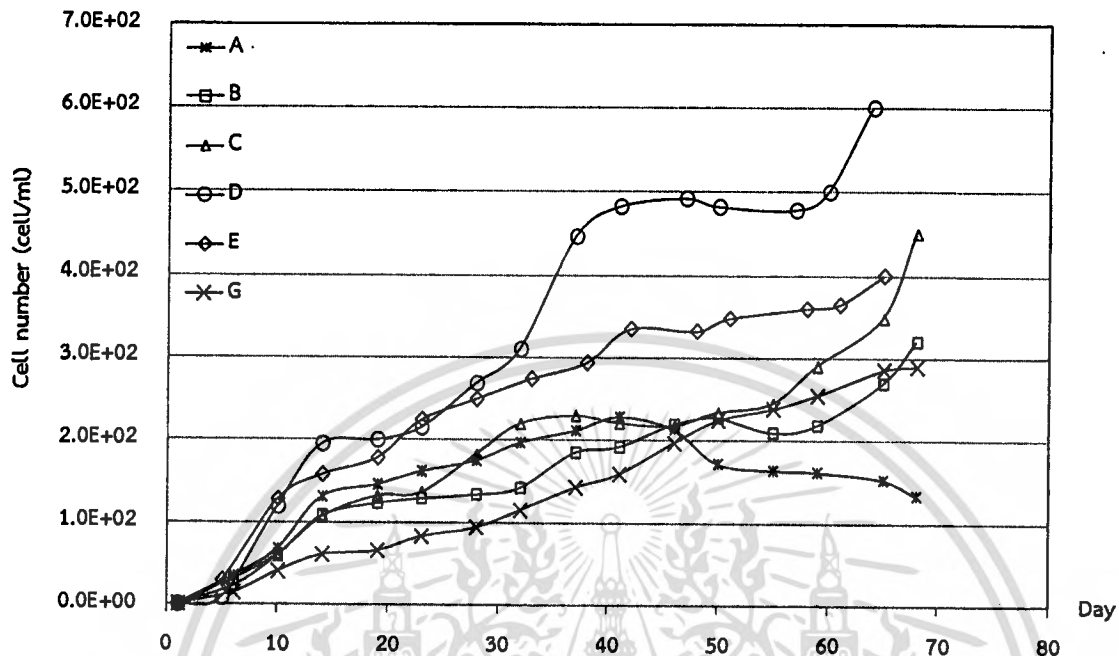


Figure 3 Cell number of *S. amartus* in differnt conditions: A = silicone tube, B = annulus sparger, C = three-way silicone sparger, D = circular sand sparger, E = cylindrical sand sparger with 3,400 lux, G = 120 rpm

4. การเลี้ยงสาหร่ายในระบบขนาด 5,000 มิลลิลิตร

Figure 4 แสดงปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์และการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของการเพาะเลี้ยงด้วยบีม้อัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยบีม้อัดโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการวัดผลการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ และวัดค่า OD สาเหตุที่หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีนั้น อาจจะเป็นเพราะว่าหัวพ่นอากาศมีรูถึง 4 รู โดยแต่ละรูอยู่ในระดับแตกต่างกันและอยู่ตรงข้ามกันจึงทำให้อากาศถูกปล่อยออกมาทุกทิศทาง สาหร่ายจึงได้รับอากาศอย่างทั่วถึง นอกจากนี้ความกว้างของสายยางซิลิโคนจากฝั่งซ้ายและขวารอบคลุมพื้นที่ภายในขวดเพาะเลี้ยงได้ทั่วถึง แต่ในการทดลองขนาดเล็กที่ใช้ปริมาตรอาหาร 400 mL ที่พบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรง

กลมมีประสิทธิภาพดีที่สุดนั้นอาจเนื่องมาจากว่าหัวทรายทรงกลมพ่นอากาศมาใช้เพาะเลี้ยงในขวดโหลใหญ่แล้วมีขนาดเล็กเกินไป ถึงแม้ว่าฟองอากาศจะมีขนาดเล็กและมีปริมาณมากแต่ไม่สามารถกระจายไปได้ทั่วถึงเท่าหัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรู อย่างไรก็ตามเมื่อข้อมูลเหล่านี้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ใน Table 2 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของหัวทรายทรงกระบอกมากกว่าแบบสามทางเจาะรูและหัวทรายทรงกลมตามลำดับแต่ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นการใช้หัวทรายทรงกลมและทรงกระบอกในการเลี้ยงในระบบขนาด 5,000 mL เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์สาหร่ายแต่จะทำให้ปลดเชื้อได้ยากและจะควบคุมทิศทางการให้อากาศได้ยากอีกทั้งประยุกต์ใช้ในระบบขยายขนาดได้ยาก ดังนั้นการใช้หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูจึงเป็นทางเลือกที่ดีและเหมาะสมในการพัฒนาระบบการเลี้ยงแบบขยายขนาดต่อไป

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

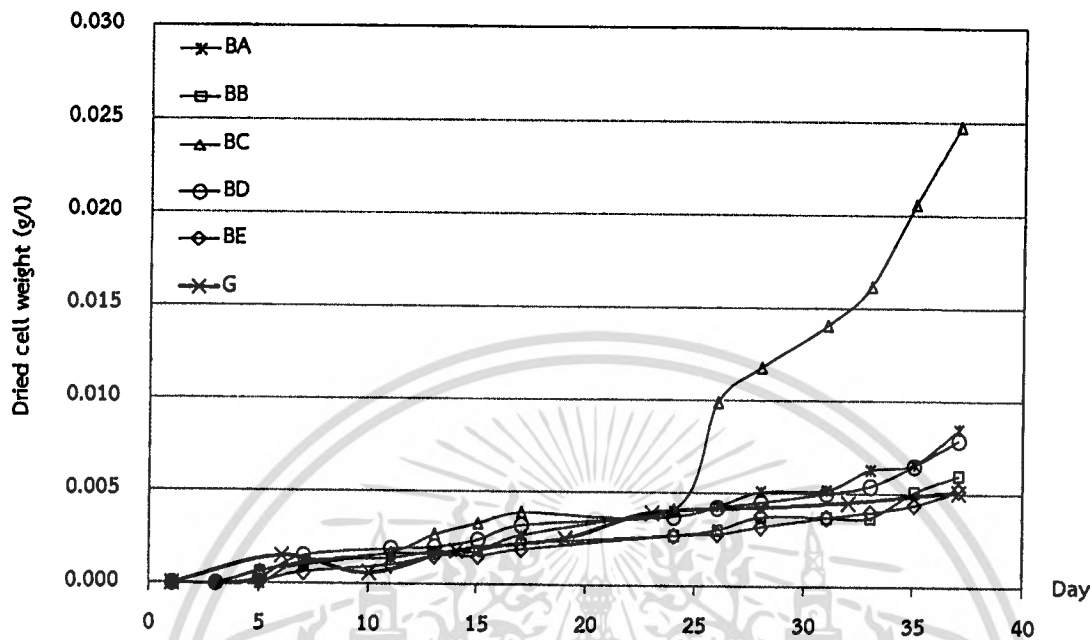


Figure 4 Dried cell weight of *S. armatus* in different conditions: BA = silicone tube, BB = annulus sparger, BC = three-way silicone sparger, BD = circular sand sparger, BE = cylindrical sand sparger with 3,400 lux in 5,000 mL, G = shake with 120 rpm with 3,400 lux in 800 mL system

Table 2 Specific growth Rate (μ) and Biomass productivity in 800 and 5,000 mL systems

Conditions	Specific Growth Rate, μ^* ($\text{g}_{\text{dried weight}}/\text{L}\cdot\text{day}$)	Biomass Productivity, P^* ($\text{mg}_{\text{dried weight}}/\text{L}\cdot\text{day}$)
BA	0.0653 ± 0.010	0.2361 ± 0.040
BB	0.0720 ± 0.013	0.1667 ± 0.017
BC	0.1115 ± 0.028	0.6889 ± 0.089
BD	0.1022 ± 0.015	0.2194 ± 0.035
BE	0.1235 ± 0.018	0.1444 ± 0.031
G	0.0313 ± 0.007	0.1208 ± 0.023

Remark: *average \pm SD, BA = silicone tube, BB = annulus sparger, BC = three-way silicone sparger, BD = circular sand sparger, BE = cylindrical sand sparger with 3,400 lux in 5,000 mL, G = shake with 120 rpm with 3,400 lux in 800 mL system

5. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสามารถวัดได้ด้วยการวัดค่า OD ได้ผลปริมาณดัง Table 3 พบว่าได้ปริมาณ

สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการมากกว่าเมื่อสกัดด้วยวิธี soxhlet แต่เมื่อมาทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระใน Table 4 พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิห้องสามารถสกัดสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า และ

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้โดยทั่วไป (vitamin C) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสำหรับ *S. armatus* สามารถเป็นแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ [3, 13] จากงานวิจัยในอดีตยังไม่มียานวิจัยใดที่ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านทานอนุมูลอิสระที่สกัดได้ แต่ได้

มีการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สะสมอยู่ในระยะต่างๆ ของการเลี้ยงเซลล์สำหรับ พบว่าได้ปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุดปริมาณ 2.0%DW หรือสามารถเก็บเกี่ยวได้ 20 mg/L.d [14]

Table 3 Amount of chlorophyll a, b, β -carotene, lycopene of cultivated *S. armatus* extracted by 2 methods

Antioxidant compounds	Content (mg/100 mL)	
	Shaking	Soxhlet
Chlorophyll a	1.46±0.08	28.61±1.9
Chlorophyll b	0.58±0.08	11.02±1.3
β -Carotene	0.80±0.07	8.24±0.8
lycopene	0.02±0.01	7.08±1.2

Table 4 Antioxidant inhibition of crude extract from *S. armatus* extracted by shaking and soxlet and standard Vitamin C

Antioxidant compounds	Antioxidant Inhibition (%)
Crude extract from <i>S. armatus</i> extracted by shaking	85.33±2.5
Crude extract from <i>S. armatus</i> extracted by soxhlet	25.72±1.9
Vitamin C (1 g/100 mL))	135.33±1.0

สรุปผล

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 สูตร (BG11 N8 และ BBM) พบว่าไม่แตกต่างกันแต่ BG11 ให้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าสูตรอาหารอื่นๆ ความเข้มแสงที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดำเนินการเปรียบเทียบที่ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 lux พบว่าการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ความเข้มแสงนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากเมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ 3,400 lux ชนิดของหัวฟ่นอากาศรูปแบบต่างๆ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยดำเนินการ

ทดสอบที่มีปริมาตรอาหาร 400 mL ปริมาณอากาศ 80 mL/min ที่ความเข้มแสง 3,400 lux พบว่าหัวฟ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ในขณะที่ระบบเพาะเลี้ยงปริมาตรอาหาร 4,000 mL ปริมาณอากาศ 1,500 mL/min พบว่าหัวฟ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ทั้งสองระบบมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าระบบการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดหัวฟ่นอากาศมีความสัมพันธ์กับขนาดระบบที่ใช้เลี้ยง จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์สาหร่าย *S. armatus* ในสภาวะที่ดีที่สุดปริมาตรอาหาร 7,000 mL ได้เซลล์สาหร่าย *S. armatus* ที่ผ่านการทำ freeze drying มีน้ำหนักเท่ากับ

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

9.5106 กรัม นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายที่ได้ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหรือคือวิตามินซี ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. armatus* เป็นทางเลือกหนึ่งของแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติและสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการเพิ่มทั้งปริมาณและคุณภาพและพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ทีมวิจัยดำเนินการภายใต้ ทุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2557 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เอกสารอ้างอิง

- [1] Catarina, G.A., Maria, G.S., Ana, M.A., Ana, N., V.M., Manuela, P.E., Catarina, D.M.M. and Xavier, M.F. (2013). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *S. obliquus* for use in food processing. *Journal of Food Engineering*. 116: 478-482.
- [2] Hong-Wei, Y., Wei-Cheng, C. and Cheng-Hsiung, S. (2012). Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. *Bioresource Technology*. 43: 53-57.
- [3] Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. and Montero, O. (2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*. 77: 947-952.
- [4] Arumugama, M., Agarwal, A., Chandra, M.A. and Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *S. bijugatus*. *Bioresource Technology*. 131: 246-249.
- [5] Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. and Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 101: 5494-5500.
- [6] Ho, S.H., Chan, M.C., Liu, C.C., Chen, C.Y., Lee, W.L., Lee, D.J. and Chang, J.S. (2014). Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource Technology*. 152: 275-282.
- [7] Yin-Hu, W., Yin, Y., Hong-Ying, H. and Lin-Lan, Z. (2016). Effects of cultivation conditions on the production of Soluble Algal Products (SAPs) of *Scenedesmus* sp. LX1. *Algal Research*. 16: 376-382.
- [8] Abd El Baky, H.H., El-Baroty, G.S., Bouaid, A., Martinez, M. and Aracil, J. (2012). Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 119: 429-432.
- [9] Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., Wang, Z. and Fan, L. (2014). Characterization of *Chlorococcum pamirum* a potential biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*. 162: 115-122.

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

- [10] Nagata, M. and Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. [Online]. Available: <http://cse.naro.affrc.go.jp/mnagata/pigment2.pdf>.
- [11] Yin-Hua, W., Yin, Y., Xin, L., Hong-Ying, H. and Zhen-Feng, S. (2012). Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresource Technology*. 112: 192-198.
- [12] Kulkarni, A.V. and Joshi, J.B. (2011). Design and selection of sparger for bubble column reactor. Part I: Performance of different spargers. *Chemical Engineering Research and Design*. 89: 1972–1985.
- [13] Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., Pavasant, P., Machmudah, S. and Goto, M. (2012). Selective extraction of lutein from alcohol-treated *Chlorella vulgaris* by supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering & Technology*. 35: 255-260.
- [14] Přebý, P., Pilný, J., Cepák, V. and Kaštánek, P. (2016). The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Algal Research*. 16: 69-75.

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า