



ผลของไนเตรทในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซล
Effect of nitrate on algae cultivation to produce biodiesel



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ผลของไนเตรทในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซล

(ภาษาอังกฤษ) Effect of nitrate on algae cultivation to produce biodiesel

แหล่งทุนวิจัย งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ...2560.....

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

ระยะเวลาในการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 ตุลาคม 2560.....

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

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน อันได้แก่ โซเดียมไนเตรท ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* โดยใช้สูตรอาหารเป็น BG-11 โดยใช้ความเข้มข้นในช่วง 1.5 - 3.0 กรัม/ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (ปริมาณอาหาร 150 มิลลิลิตร) เขย่าด้วยความเร็วรอบเป็น 110 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 3 องศาเซลเซียส) ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของสาหร่าย (μ_{max}) เป็น 0.1340 ต่อวัน ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับการเพาะเลี้ยงในระบขขนาด 6 ลิตร (ปริมาณอาหาร 4 ลิตร) หัวฟันท่ออากาศแบบท่อตรงมีประสิทธิภาพการให้อากาศดีที่สุด สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบกรดไขมันชนิดปาล์มิติก (C16:0) และโอเลอิก (C18:1) มีประมาณ 0.05 และ 0.01 % (v/v) ตามลำดับ ซึ่งเป็นชนิดของกรดไขมันที่เหมาะสมจะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

คำสำคัญ : *Scenedesmus armatus* แหล่งไนโตรเจน ไบโอดีเซล

Research Title: Effect of nitrate on algae cultivation to produce biodiesel

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

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

ABSTRACT

This research focused on the effects of different nitrogen concentration in BG-11 medium base on cell growth of *Scenedesmus armatus*. The sodium nitrate concentrations of the medium were varied from 1.5 - 3.0 g/l. The culture was incubated at room temperature ($27\pm 3^{\circ}\text{C}$) in Erlenmeyer flask 250 ml. (medium volume 150 ml.) with circulate rate at 110 rpm with controlled light intensity at 3,400 Lux. Results showed the maximum cell growth of *S. armatus* in sodium nitrate concentration of 1.5 g/L with the maximum specific growth rate (μ_{max}) at 0.1340 per day and no significantly different with concentration of 2.5 g/l at significant level of 95%. In case of 6 liters cultivation (medium volume 4 l), the maximum specific growth rate was found by using straight tube sparger and results from gas chromatography analysis found the amount of palmitic acid (C16:0) and Oleic acid (C18:1) around 0.05 and 0.01 % (v/v), respectively which both fatty acid was good starter for biodiesel production.

Keywords : *Scenedesmus armatus*, Nitrogen source, Biodiesel

กิตติกรรมประกาศ

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

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยงบวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2560 คณะวิทยาศาสตร์ งานวิจัยนี้ได้ดำเนินงานให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาระบบเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 12 (พ.ศ.2560-2564) ยุทธศาสตร์การพัฒนาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานทางสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและเป็นองค์ความรู้ที่มีประโยชน์ซึ่งสามารถต่อยอดในเชิงพาณิชย์ได้

ผศ. ดร. ดวงกมล เรือนงาม



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ความหมายของสาหร่ายสีเขียว (Algae).....	3
2.2 สาหร่ายน้ำมัน.....	3
2.3 <i>Scenedesmus armatus</i>	4
2.4 การเลี้ยงสาหร่าย.....	5
2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	5
2.4.1.1 ปัจจัยทางกายภาพ.....	5
2.4.1.2 ปัจจัยทางเคมี.....	5
2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย.....	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	12
3.1 หัวเชื้อ.....	12
3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้.....	12
3.3 การเตรียมสาหร่ายและการหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสม.....	12
3.3.1 การคัดแยกสาหร่าย.....	12
3.3.2 การจัดจำแนกสาหร่าย.....	12
3.3.3 การหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสม.....	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและปริมาณไขมันของสาหร่าย	14
3.4.1 วิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้สไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer).....	14
3.4.2 วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD).....	14
3.4.3 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	14
3.4.4 ตรวจสอบปริมาณไขมันที่มีในเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีไนล์เรด.....	14
3.5 การสกัดและทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	15
3.5.1 การสกัดไขมันจากสาหร่าย.....	15
3.5.2 ทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไขมัน.....	15
3.6 การศึกษาปริมาณและชนิดของกรดไขมัน.....	15
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย	17
4.1 ผลการศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i>	17
4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน.....	20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	32
เอกสารอ้างอิง.....	34
ภาคผนวก.....	38

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ตัวแปรที่ทำการทดลองทั้งหมด	16
4.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และ อัตราการเพิ่มของเซลล์ (P) ในระบบ 800 มิลลิลิตร	18
4.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสาหร่ายที่สกัดด้วยวิธีการเขย่า และด้วยชุด soxhlet	22
4.3 กุทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีการเขย่า และชุด soxhlet	25
4.4 ปริมาณสาหร่ายแห้งที่ได้จากงานวิจัย.....	28
4.5 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> จากการคิดเทียบกับกรดไขมันที่ใช้เป็นมาตรฐาน.....	31
4.6 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> จากการ คิดเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟรวมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง.....	31



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ <i>Scenedesmus armatus</i>	5
2.2 แสดงการเพิ่มขึ้นของชีวมวลในแต่ละวันของความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	8
2.3 การเพิ่มขึ้นของชีวมวล, ผลได้ไขมัน และไขมันที่สะสมในเซลล์ ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน.....	9
4.1 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i>	18
4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i>	19
4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i>	19
4.4 แบบจำลองระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i>	20
4.5 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน	23
4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน	24
4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน	24
4.8 เซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ (Nikon ECLIPSE Ci) กำลังขยาย 40X ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ).....	26
4.9 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ)	27
4.10 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ใช้หัวฟ่นอากาศทั้ง 3 แบบ.....	29
4.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ใช้หัวฟ่นอากาศทั้ง 3 แบบ	29
4.12 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ใช้หัวฟ่นอากาศทั้ง 3 แบบ.....	30
4.13 หัวฟ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง ตามลำดับ	30

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไบโอดีเซลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก (Martha และคณะ 2013) แหล่งไบโอดีเซลหรือ Fatty acid Methyl Esters (FAMES) ได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันที่ใช้แล้วจากการปรุงอาหาร และสาหร่าย (Mandotra 2014) ฯลฯ ในหลายๆ ประเทศจะมีการนำเอาพืชน้ำมันมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เช่น ถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม มะพร้าว เป็นต้น แต่การใช้พืชน้ำมันเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลจะส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ทางเกษตร พืช น้ำมันเหล่านี้จะสามารถผลิตน้ำมันออกมาได้ในปริมาณน้อยต่อหน่วยพื้นที่เพาะปลูกเมื่อเทียบกับน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย และผลิตได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นสาหร่ายจึงได้รับการยอมรับว่าเป็นวัตถุดิบที่สามารถผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งจะแตกต่างจากพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ (Mandotra และคณะ 2014) สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้ทดลองครั้งนี้ก็เป็นหนึ่งในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีความสามารถในการเพิ่มไขมันที่สามารถใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ (Martha และคณะ 2013)

การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายมี 4 ขั้นตอน ดังนี้ การเจริญเติบโต การเก็บเกี่ยว การสกัด และการเปลี่ยนน้ำมันให้เป็นไบโอดีเซล สำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายจะต้องมีกระบวนการในการผลิตถูกที่สุด ดังนั้นการคัดกรองของสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก และจะต้องมีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลายได้ การใช้อาหารที่มีองค์ประกอบที่ต่างกันจะส่งผลต่อมวลรวมชีวภาพและปริมาณไขมันของสาหร่าย การดัดแปลงพันธุกรรมหรือการเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการสะสมของไขมันในสาหร่าย แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันจะทำให้ปริมาณมวลรวมชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องหาสภาวะในการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่สูงและมีอัตราการผลิตไขมันที่เหมาะสม (Mandotra และคณะ 2014 และ กลุ่มพัฒนามาตรฐานน้ำมันเชื้อเพลิง 2557) นอกจากนี้สภาวะในการเลี้ยงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ แสง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปัจจัยทางเคมี เช่น แหล่งคาร์บอน (กลูโคส, ฟรุกโตส, อะซิเตท) แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนีย, โซเดียมไนเตรท, ยูเรีย) และการเติมกลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้น จะทำให้สาหร่ายมีพลังงานเพียงพอต่อความต้องการใช้ในกิจกรรมของเซลล์ (Cerón García และคณะ 2005) เซลล์สาหร่ายจึงลดการสร้างคลอโรฟิลล์ที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการตรึงแสงเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน นอกจากนี้เซลล์ยังมีการสะสมไขมันไว้ในเม็ดไขมัน (lipid granule) ทำให้สีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Wu และคณะ 1992) ซึ่งสามารถเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นจึงส่งผลให้ผลิตไบโอดีเซลได้เพิ่มขึ้น ในอดีตการสกัดน้ำมันจากพืชน้ำมัน เช่น เมล็ดคาโนลาหรือถั่วเหลือง จะทำได้โดยการบด หลังจากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย และนำไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อให้ได้น้ำมันไบโอดีเซล

ในงานวิจัยนี้ทำการทดลองโดยเลือกปรับปรุงสูตรอาหาร BG-11 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยเติมแหล่งไนโตรเจน (โซเดียมไนเตรท) ที่ความเข้มข้น 1.5 g/L 2.0 g/L 2.5 3.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนลงไปในสูตรอาหาร BG-11 เนื่องจากในอาหารสูตรนี้มีแต่แหล่งอาหารที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของไนเตรทที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของไนเตรทที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันที่สาหร่ายผลิตขึ้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่ายที่ได้ที่ได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณบึงพระราม จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

- กระบวนการเลี้ยงสาหร่ายดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการ และระบบที่ขยายขนาดขึ้นมากกว่า 4,000 มิลลิลิตร

- กระบวนการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อขยายสายพันธุ์สาหร่ายบริสุทธิ์ดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบตั้งเดิม (เขย่า) ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร และระบบขวดโหล

- สภาวะที่ใช้ในการการเลี้ยงได้แก่ แปรค่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเป็น 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 g/L ทั้งหมดดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันมาก ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายขนาดต่อไป

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายของสาหร่ายสีเขียว (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

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

โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการวิจัยโดยใช้สาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus armatus* จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานว่า เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตน้ำมันเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลมาก

2.2 สาหร่ายน้ำมัน

สาหร่ายน้ำมันเป็นวัตถุดิบที่กำลังได้รับการสนใจจากทั่วโลก เนื่องจากสามารถผลิตไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้อัตราที่สูง โดยปริมาณไขมันอาจสูงถึงร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้ง น้ำมันที่กล่าวถึง ณ ที่นี้คือ ไบโอดีเซล สาหร่ายสามารถผลิตน้ำมันในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณสารอาหารจำกัด เป็นต้น ภายใต้สภาวะแวดล้อมดังกล่าว เซลล์สาหร่ายจะหยุดการแบ่งตัว และมีการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นน้ำมัน ส่งผลให้องค์ประกอบของน้ำมันในสาหร่ายเพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทยมีสาหร่ายน้ำมันที่หลากหลายสายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. เป็นต้น (เบญจพร และคณะ, 2555. ประกาศิต และคณะ, 2555. อชวาน และคณะ, 2556) ชีวมวลของสาหร่ายหลายสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันได้มากกว่าร้อยละ 35 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น ถั่วเหลือง ปาล์ม หรือ เรพซิด เป็นต้น เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ ประกอบด้วย กรดไขมัน (fatty acid) ชนิดต่างๆ 3 โมเลกุล และกลีเซอรอล 1 โมเลกุล สาหร่ายขนาดเล็กจะผลิตกรดไขมันซึ่งมีความยาวของคาร์บอนอยู่ระหว่าง 12-22 อะตอม โดยกรดไขมันพบทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว กรดไขมันที่พบมากที่สุดจะเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน C16 และ C18 ซึ่ง

จำนวนกรดไขมันทั้งหมดจะแปรผันตามระยะเวลาของการเจริญ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง โดยพบว่าในสภาวะที่ไนโตรเจนมีปริมาณจำกัด หรือขาดไนโตรเจน สาหร่ายจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือ แป้งมาทดแทน ทำให้สาหร่ายมีปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้น (นฤตวรรณ, 2556) การดึงไนโตรเจนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการสะสมของไขมันในสาหร่าย แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันจะทำให้ปริมาณมวลรวมชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องหาสภาวะในการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่สูงและมีอัตราการผลิตไขมันที่เหมาะสม (Mandotra และคณะ 2014)

2.3 *Scenedesmus armatus*

เมื่อจัดจำแนกสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) พบว่า *Scenedesmus armatus* จัดอยู่ใน

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

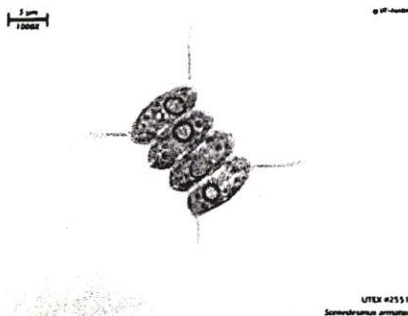
Order Chlorococcales

Family Scenedesmaceae

Genus *Scenedesmus*

Species *Scenedesmus armatus*

Scenedesmus armatus เป็นสาหร่ายสีเขียวที่อยู่กันหลายเซลล์ ประกอบด้วย 4 เซลล์หรือมากกว่านั้น เป็นที่รู้จักกันในอีกชื่อว่า *Desmodesmus armatus* เซลล์แต่ละเซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเซลล์ต่อเซลล์ตามความยาว และโคโลนิ่มันไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Non-motile) เป็นสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างได้ดี และง่ายต่อการนำมาเพาะเลี้ยง เป็นสายพันธุ์ที่ดีเยี่ยมเหมาะแก่การเริ่มงานวิจัยและผู้สนใจการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในปัจจุบันได้นำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล (Hanaa, 2012) สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ใช้ผลิตอาหารสัตว์ ใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมของมนุษย์ ใช้ทำปุ๋ย ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย *Scenedesmus* sp. ปกติจะเป็นตัวบ่งชี้สภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบสารอาหารและสารพิษที่เกิดจากมนุษย์ในการใช้แหล่งน้ำ *Scenedesmus* sp. เป็นสาหร่ายที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันในฐานะที่เป็นแหล่งของรงควัตถุ อันได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และลูทีน เพื่อเพิ่มปริมาณของรงควัตถุดังกล่าวจึงต้องทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ 2.1 ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ *Scenedesmus armatus* (ที่มา : <http://www.sbs.utexas.edu/uteximages/algae/2551%20Scenedesmus%20armatus%20.jpg>)

2.4 การเลี้ยงสาหร่าย

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

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

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

2.4.1.2 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย ซึ่งขึ้นอยู่กับสารอาหารที่เลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายแต่ละชนิด ธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ซึ่งธาตุอาหารหลักเป็นสารเคมีที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต อย่างเช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แคลเซียม โซเดียม โพแทสเซียม คลอรีน และแมกนีเซียม เป็นต้น ส่วนธาตุอาหารรองเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการในปริมาณที่น้อย หรือสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ สารอนินทรีย์จะได้แก่ เหล็ก โบรอน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โมลิบดินัม ซิลิกา เป็นต้น และสารอินทรีย์ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เกลือ อินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ และกลุ่มอาหารเสริม หากสาหร่ายขาดธาตุอาหารจะเกิดลักษณะที่สังเกตได้ อันได้แก่

ปริมาณสารสีที่ใช้สำหรับสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้เซลล์มีสีที่จางลง เซลล์จะมีการสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ เช่น การสะสมแป้งและน้ำมัน เซลล์มีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนลดลง เนื่องจากเซลล์มีการสะสมแป้งและไขมันเพิ่มขึ้น

2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย

J.F. Sanchez และคณะ ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตและปริมาณลูทีนของ *Scenedesmus almeriensis* ซึ่งได้นำเสนอข้อมูลคุณลักษณะของสาหร่ายที่อุดมไปด้วยลูทีนเป็นครั้งแรก ซึ่ง *Scenedesmus almeriensis* เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากเรือนกระจกของเกษตรกร วัตถุประสงค์หลัก คือ การกำหนดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กนี้ และปัจจัยที่อาจเพิ่มปริมาณลูทีนได้ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดดำเนินการครั้งแรกในการเพาะเลี้ยงแบบ batch ดังนั้น อิทธิพลของสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ, pH, culture medium, รังสีภายนอก และ ความเค็ม มีการดำเนินการอย่างต่อเนืองภายใต้ข้อจำกัดที่ว่าอัตราการเจริญเติบโตสูงเป็นครั้งหนึ่งของอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของสาหร่าย ความสัมพันธ์ระหว่างรังสีและอุณหภูมิถูกศึกษาโดยวิธีวิเคราะห์การตอบสนองต่อพื้นผิวและสภาวะที่เหมาะสมของรังสีและอุณหภูมิ 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* โดยในงานวิจัยนี้ศึกษา 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 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 $A_2(SO_4)_3$ ปริมาณ 0.1 กรัม/ลิตร ตามด้วยการปรับ pH ประสิทธิภาพของการเก็บเกี่ยวตะกอนจะเพิ่มขึ้นจาก 68.18% เป็น 92.84% ซึ่งในการศึกษารั้งนี้ทำให้ทราบถึงวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่เหมาะสมที่สุด

Damiani และคณะ, (2010) ศึกษาการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยทำการศึกษาในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดต่างเป็นกลาง ให้อากาศ และให้แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยสภาวะการให้แสงเป็นชั่วโมงสว่างต่อมืดคือ 12:12 ได้ปริมาณไขมันเท่ากับ ร้อยละ 34.85 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Cheirsilp และ Torpee, (2012) สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีความต้องการความเข้มแสงไม่เท่ากัน จากรายงานวิจัยจะศึกษาผลกระทบของความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายทะเล *Chlorella* sp. และ *Nannochloropsis* sp. โดยจะพบว่า *Chlorella* sp. มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นร้อยละ 44 การผลิตไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 15 จากความเข้มแสงที่เพิ่มจาก 2,000 ถึง 8,000 ลักซ์ ส่วน *Nannochloropsis* sp. จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นร้อยละ 128 และมีการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 68 จากความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้น 2,000 ถึง 10,000 ลักซ์ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อความเข้มแสงสูงสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ดี แต่ผลิตไขมันได้น้อย ถ้าความเข้มแสงต่ำสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้น้อย แต่ผลิตไขมันได้มาก

Prokash Rai และคณะ, (2016) วิจัยศึกษาผลกระทบความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย และการผลิตไขมันของเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus abundans* โดยให้ความเข้มแสงแตกต่างกัน 27, 40.5, 54 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ที่ความเข้มแสง 40.5 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จะมีชีวมวลสูงสุด 1.342 กรัม/ลิตร ผลิตไขมันได้ 0.644 กรัม/ลิตร และมีไขมันสะสมภายในเซลล์ร้อยละ 48 เมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 54 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ความหนาแน่นของเซลล์จะเพิ่มขึ้น แต่จะผลิตไขมันได้ลดลง ซึ่งผลิตไขมันได้ 0.358 กรัม/ลิตร มีไขมันสะสมภายในเซลล์ร้อยละ 29.6 ที่ความเข้มแสง 27 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จะมีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันต่ำกว่าความเข้มแสงอื่น มีไขมันสะสมภายในเซลล์ร้อยละ 33

Cao และคณะ, (2014) ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อ *Chlorella minutissima* UTEX 2341 จะพบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะมีผลได้ไขมันสูงสุด 1.32 กรัม/ลิตร แต่จะผลิตไขมันได้ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส สันนิษฐานว่าที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงจะทำให้ lipid metabolic pathway เปลี่ยนไป รวมทั้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่ *Chlorella minutissima* UTEX 2341 มีไขมันสะสมในเซลล์สูงสุด แต่จะมีการสะสมไขมันลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส

Converti และคณะ, (2009) จะพบว่า *C. vulgaris* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและผลิตไขมันจะอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับการแยก *Dunaliella* sp. จาก Great Salt Lake

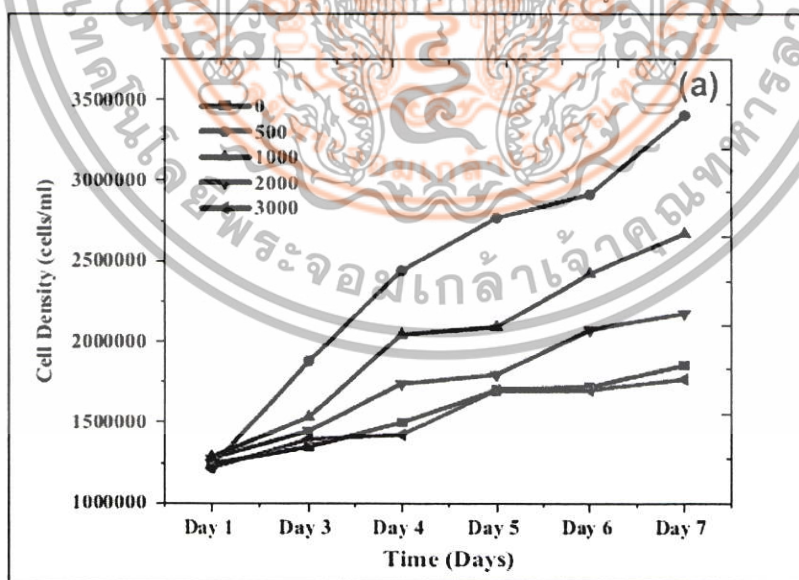
พิมพ์ปวีณ์ และคณะ, (2557) ศึกษาเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อการผลิตมวลชีวภาพของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เลี้ยงในวันที่ 0-9 ของการทดลอง ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.54×10^4 เซลล์/มิลลิลิตร/วัน หรือ 1.73 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน และหลังจากวันที่ 9 ของการทดลองพบว่าผลผลิตมวลชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น โดยหากเลี้ยงที่ 27 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงที่สุดถึง 11.53 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน รองลงมาคือการเลี้ยงที่ 25 และ 10 องศาเซลเซียส ที่มีผลผลิตมวลชีวภาพเท่ากับ 5.78 และ 1.80 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหากย้ายสาหร่ายจาก 25 องศา

เซลล์เซียส ไปเลี้ยงที่ 27 องศาเซลเซียส จะสามารถส่งเสริมการเติบโตของสาหร่ายได้ดี ในขณะที่การย้ายเซลล์เลี้ยงที่ 10 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่ายจะมีการเติบโตต่ำลง

ความเป็นกรด-เบส หรือค่า pH เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก เนื่องจากมีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอน (inorganic carbon) ในรูปต่างๆ (ZHU และคณะ, 2013) เมื่อค่าความเป็นกรด-ต่างต่ำกว่า 5 รูปของ DIC (dissolved inorganic carbon ; DIC) ส่วนใหญ่คือ CO_2 เมื่อค่าความเป็นกรด-ต่างเป็น 6.6 จะมี DIC ในรูปของ CO_2 และ HCO_3^- ในปริมาณเท่าๆ กัน และเมื่อค่าความเป็นกรด-ต่างสูงถึง 8.3 รูปของ DIC เกือบทั้งหมดจะเป็น HCO_3^- ดังนั้นการควบคุมค่าความเป็นกรด-ต่าง จึงมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เพื่อให้สาหร่ายขนาดเล็กสามารถดูดซึมและนำ CO_2 มาใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น (นุชนาถ, 2557)

Yeh และคณะ, (2012) รายงานวิจัยศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ESP-31 โดยทำการทดลองให้ pH ต่างกัน ดังนี้ 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 จะพบว่าที่ pH 7.5 จะผลิตชีวมวลได้สูงสุด 2.39 ± 0.10 กรัม/ลิตร และที่ pH 7 จะผลิตไขมันได้มากที่สุด คือ 986 ± 15 มิลลิกรัม/ลิตร

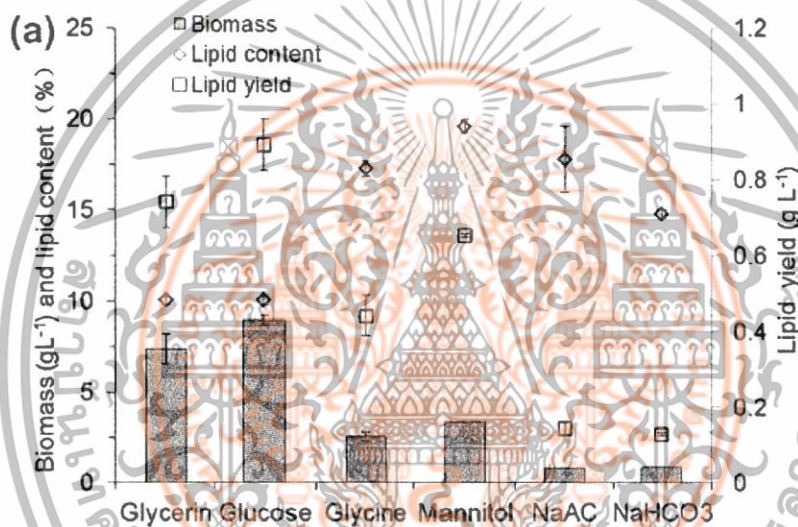
Chandra และคณะ, (2014) ศึกษาผลกระทบของกลูโคสที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยจะมีความเข้มข้นของกลูโคส 5 ระดับคือ 0, 500, 1000, 2000, 3000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสามารถผลิตชีวมวลได้ 2.06, 3.44, 3.32, 2.71, 2.47 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีความหนาแน่นเซลล์ 18.5×10^5 , 34.5×10^5 , 25.5×10^5 , 20×10^5 , 15.5×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสมากขึ้นมันจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic ซึ่งจะกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยแสง และคาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดลองนี้จะแสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.2 แสดงการเพิ่มขึ้นของชีวมวลในแต่ละวันของความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ที่มา: Chandra และคณะ, 2014)

Yamane และคณะ, (2011) สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., Diatoms จะพบว่า ATP ที่ได้เกิดจากปฏิกิริยา photochemical เพราะแรงการเผาผลาญน้ำตาลกลูโคสในการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นอินทรีย์คาร์บอนหรืออนินทรีย์คาร์บอนก็ได้ ซึ่งสามารถทำให้ผลิตชีวมวลสูงในระยะการเจริญเติบโตใน growth phase

Cao และคณะ, (2014) ศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก จะพบว่า glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ตามด้วย glycerin, mannitol และ glycine ผลการเพิ่ม glucose จะทำให้ชีวมวลสูงสุดเป็น 8.98 กรัม/ลิตร ผลได้ไขมัน 0.89 กรัม/ลิตร และไขมันที่สะสมในเซลล์ร้อยละ 10.10 ส่วนการเพิ่ม glycerin ชีวมวลและไขมันที่สะสมในเซลล์เท่ากับ 7.4 กรัม/ลิตร และร้อยละ 10.06 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองจะสามารถแสดงได้ตามรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.3 การเพิ่มขึ้นของชีวมวล, ผลได้ไขมัน และไขมันที่สะสมในเซลล์ ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน (ที่มา: Cao และคณะ, 2014)

ชรินทร์ และคณะ, (2557) ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. แบบเฮเทอโรทรอฟด้วยน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่ผลิตจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน เพื่อทดแทนอาหารสังเคราะห์สูตร N8 และทำการเปรียบเทียบปริมาณไขมันในสาหร่ายระหว่างการเลี้ยงด้วยน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน อาหารสังเคราะห์สูตร N8 อาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกลูโคส และอาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 วัน จากการทดลองพบว่า การเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกลูโคส ให้ผลผลิตดีที่สุด กล่าวคือ ให้ค่าความเข้มข้นเซลล์สูงสุด ปริมาณของไขมันและอัตราการผลิตไขมันเชิงปริมาตร เท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร 0.35 กรัมต่อลิตร และ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ รองลงมาคือ การเลี้ยงสาหร่ายด้วยน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ให้ค่าความเข้มข้นเซลล์สูงสุด ปริมาณของไขมัน และอัตราการผลิตไขมันเชิงปริมาตร เท่ากับ 2.80 กรัมต่อลิตร 0.23 กรัมต่อลิตร และ

0.005 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกลูโคส จึงสามารถใช้ทดแทนอาหารสังเคราะห์ได้ แต่การจะให้ประสิทธิภาพ ผลดีที่สูงสุดจะต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนลงไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วย

ชมพูท, (2543) การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารคาร์บอนอินทรีย์ ที่มีผลต่อการเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 (สายพันธุ์แยกจากอ่าวไทย) ผลของการเปรียบเทียบแหล่งของคาร์บอนต่อการเติบโตพบว่า *A. delicatissima* เติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth) และสาหร่ายจะมีอัตราการเติบโตสูงขึ้นอีก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นอีกเป็น 8, 12 และ 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร กลับทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลง

ปริมาณไนโตรเจนจะมีผลต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย โดยปกติไนโตรเจน มีหน้าที่หลักในการสังเคราะห์แสง เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารหลายชนิดภายในเซลล์ เช่น โปรตีน คลอโรฟิลล์ กรดนิวคลีอิก สังเคราะห์รงควัตถุ ช่วยในกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (สุนิรัตน์, 2549) ในสภาวะที่มีการขาดไนโตรเจนหรือมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน จะส่งผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุของเซลล์ ในส่วนของอาหารสะสมจะเกิดการสะสมของสารประกอบคาร์บอนในปริมาณเพิ่มขึ้น เช่น พอกไขมันหรือโพลีแซคคาไรด์ เป็นผลให้เกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Hammond และ Glatz, 1988)

Xin และคณะ, (2010) ใช้สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อปริมาณไขมัน โดยมีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ($\text{NO}_3\text{-N}$) แตกต่างกันว่า 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 25.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีระดับความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้นที่ 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารสูตร BG-11 ระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมิดในอัตรา 14:10 ชั่วโมง ความเข้มแสง 55-60 ไมโครโมลโปรตอน/ตารางเมตร/วินาที พบว่าที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ปริมาณไขมันสูงสุดถึงร้อยละ 30

Converti และคณะ, (2009) ได้ทดลองลดความเข้มข้น NaNO_3 ในการเลี้ยง *C. vulgaris* ในสภาวะ NaNO_3 ที่ 1.500, 0.750 และ 0.375 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในสูตรอาหาร Bold's Basal Medium โดยนำไปเลี้ยงใน Erlenmeyer flask 2 ลิตร นาน 14 วัน ให้ความเข้มแสง 70.0 ไมโคร อิเล็กตรอน/ตารางเมตร/วินาที จากผลจะพบว่าระดับ NaNO_3 ที่ 0.375 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ *C. vulgaris* มีปริมาณไขมันสูงที่สุดคือ 15.31 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์ เพราะเมื่อ NaNO_3 ลดลงทำให้สาหร่ายเกิดความเครียด จึงทำให้มีปริมาณไขมันสูงและไขมันที่มาจากขบวนการ metabolism โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนอาหารสะสมจากแป้งเป็นไขมันแทน เมื่อเทียบกับการทดลองลดความเข้มข้น NaNO_3 ในการเลี้ยง *Nannochloropsis oculata* ในสภาวะ NaNO_3 ที่ 0.300, 0.150 และ 0.075 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในสูตรอาหาร Guillard นำไปเลี้ยงใน Erlenmeyer flask 2 ลิตร นาน 14 วัน ให้ความเข้มแสง 70.0 ไมโครอิเล็กตรอน/ตารางเมตร/วินาที ผล

พบว่าระดับ NaNO_3 ที่ 0.075 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ *N. oculata* มีปริมาณไขมันสูงสุดคือ 15.86 ± 0.59 เปอร์เซ็นต์ เพราะเมื่อ NaNO_3 ลดลงทำให้สาหร่ายเกิดความเครียดจะทำให้มีปริมาณไขมันสูงและไขมันที่มาจากขบวนการ metabolism โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนอาหารสะสมจากแป้งเป็นไขมันแทน แต่สาเหตุที่ในการทดลองลดปริมาณไนโตรเจนที่ 100 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไขมันดีที่สุด คาดว่า *Hapalosiphon* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งมี heterocyst ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศเองได้ ดังนั้นเมื่อมีการลดปริมาณไนโตรเจนลงจึงไม่มีผลต่อปริมาณไขมันใน *Hapalosiphon* sp.

Cao และคณะ, (2014) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยง *C. minutissima* UTEX 2341 ภายใต้สภาวะขาดไนโตรเจน 6 วันแรกจะเพาะเลี้ยงแบบปกติ ส่วน 3 วันหลังจะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน พบว่าเมื่อขาดไนโตรเจนจะมีไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 29.19 ของน้ำหนักแห้งของสาหร่าย ผลได้ไขมัน 2.45 กรัม/ลิตร และผลได้สัมพันธ์คาร์บอนเป็น 0.09 กรัม/กรัม

James และคณะ, (2011) เมื่อเวลาการเจริญเติบโตสั้นจะไปลดการสะสมไขมัน และเป็นสาเหตุทำให้เซลล์หยุดชะงักได้ และผลิตน้ำมันต่ำเช่นกัน และการเพาะเลี้ยง *Chlamydomonas reinhardtii* พบการสังเคราะห์น้ำมันสูงสุดระหว่างวันที่ 2 และ 3 เมื่อมีการขาดไนโตรเจน

Chen และคณะ, (2011) พบว่าอัตราการเจริญสูงสุดของ *Dunaliella tertiolecta* พบที่ความเข้มข้น 23 มิลลิโมล/ลิตรของโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) และอัตราการเจริญไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทเป็น 46 มิลลิโมล/ลิตร

Wu และ Miao, (2014) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* และ *Scenedesmus obliquus* ศึกษาการเจริญเติบโตในความเข้มข้นของไนเตรทที่ต่างกันคือ 0, 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.5 กรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้นไนเตรท 0 กรัม/ลิตร มีชีวมวลของ *Chlorella pyrenoidosa* และ *Scenedesmus obliquus* เท่ากับ 0.42 กรัม/ลิตร และ 0.55 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การจำกัดไนโตรเจนมีผลให้การเจริญเติบโตลดลง เพราะในอาหารที่มีไนโตรเจนไม่เพียงพอ ทำให้ขาดโมเลกุลของไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จากการทดลองพบว่าชีวมวลสูงสุดของ *Chlorella pyrenoidosa* เท่ากับ 2.03 กรัม/ลิตร และ *Scenedesmus obliquus* เท่ากับ 2.70 กรัม/ลิตร ของความเข้มข้นไนเตรท 0.9 กรัม/ลิตร และ 0.6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่มีความเข้มข้นไนเตรท 0 กรัม/ลิตร *Chlorella pyrenoidosa* มีอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุด (P_{max}) เท่ากับ 0.471 กรัม/ลิตร/วัน และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.747 ต่อวัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 0.6 กรัม/ลิตร *Scenedesmus obliquus* มีอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุด (P_{max}) เท่ากับ 0.379 กรัม/ลิตร/วัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 0.3 กรัม/ลิตร และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.542 ต่อวัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 0.9 กรัม/ลิตร

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 หัวเชื้อ

เชื้อสาหร่ายคัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณบึงพระราม จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งแยกได้แล้วจากปีก่อนหน้า

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (Super Clean, 120BS, Thailand)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (TOMY, ES-315, Japan)
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (WTB binder, ED53, Germany)
เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง (AND, GF-800, Japan)
เครื่องเขย่า (Shaker)
เครื่องผสมสาร (Vortex) (VORTEX-Genie2, G560E, USA)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (HERMLE, Z326K, Germany)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10S UV-VIS, USA)
เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter) (Takemura, DM-28, Japan)
เครื่องบ่มอัดอากาศ กำลังไฟ 58W แรงลม 70 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.028 Mpa (Yamano, AP-40, China)
เครื่องบ่มอัดอากาศ กำลังไฟ 47W แรงลม 70/40 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.038/0.044 Mpa (Atman, HP-8000)
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus, CH30, Japan)
สไลด์นับเซลล์ ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
เดซิเคเตอร์ (Desiccator)
คิวเวต (Cuvette) ขนาด 1 มิลลิลิตร
เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
กระบอกตวง (Graduated cylinder)
ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
ไมโครปิเปต (Micropipette)
ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ขนาด 0.8-1.2 ลิตร
สายยางขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร
หัวทรายทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร ยาว 2.5 เซนติเมตร

หัวทรายทรงกลม เส้นรอบวง 10 เซนติเมตร

ตัวต่อสายยางแบบ 3 ทาง และ 4 ทาง

ตัวต่อปรับปริมาณอากาศ

ท่อ PVC ขนาดต่างๆ และข้อต่อท่อ PVC

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ฟรีซทราย, freeze dry)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10S UV-VIS, USA)

เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer) (Heto, Lyolab 3000, Denmark)

เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (HERMLE, Z36HK, Germany) พร้อมขวดปั่นเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร

ตู้เย็นแช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (SANYO, Japan)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND, GF-800, Japan)

เครื่อง microplate reader (MF A062780, Labsystems, model)

สารเคมีที่ใช้

สำหรับเตรียมอาหาร BG11 (Blue-Green medium) (ภาคผนวก ก)

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 magnesium salt Na_2CO_3 Trace element Agar (สำหรับเตรียมอาหารแข็ง) น้ำกลั่น

3.3 การเตรียมสาหร่ายและการหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสม

3.3.1 การคัดแยกสาหร่าย

นำตัวอย่างที่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาสเปรด (spread) บนอาหารแข็งสูตรที่ต้องการ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่มีความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ เมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตจนเห็นโคโลนีชัดเจน นำไปคัดแยกต่อโดยการใช้ลวดเขี่ยแยกเอาโคโลนีเดี่ยวๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจานใหม่ ทำการแยกซ้ำจนโคโลนีสาหร่ายที่ได้มีลักษณะเหมือนกัน และไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ จากนั้นถ่ายลงเลี้ยงในหลอดอาหารวันเอียง (slant) เพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป

3.3.2 การจัดจำแนกสาหร่าย

การจัดจำแนกทำโดยถ่ายสาหร่ายจากหลอดอาหารวันเอียงลงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ต้องการ โดยใช้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่มีความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ และให้อากาศโดยเขย่า เมื่อสาหร่ายเจริญนำมาดูรูปร่างลักษณะผ่านกล้องจุลทรรศน์และจัดจำแนกสาหร่าย

3.3.3 การหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสม

การเตรียมอาหารเหลว BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่ง

ธาตุอาหารปริมาณต่างๆ ตามสูตรอาหาร BG-11 ในภาคผนวก ก-1 โดยมีความเข้มข้น NaNO_3 เป็น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 กรัม/ลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น บรรจุอาหารเหลวปริมาณ 150 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และเก็บไว้ในที่สะอาด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป การถ่ายเชื้อทำได้โดยนำพลาสติกอาหารเหลวที่เตรียมได้ และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เข้าตู้ถ่ายเชื้อ เปิดแสง UV เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายที่มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ $\times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรมีค่า 0.3-0.6 เติมนลงในอาหารเหลว BG-11 ที่มี NaNO_3 ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า 110 รอบ/นาที ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง (27 ± 3 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบผลการเจริญเติบโตด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง และการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการตรวจสอบทุก 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน (11 ครั้ง) และทำการวิเคราะห์ผลที่ได้

3.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและปริมาณไขมันของสาหร่าย

3.4.1 วิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้สไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)

หยดตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการนับลงบนสไลด์นับเชื้อ (ฮีมาไซโตมิเตอร์) 1 หยด ในช่องใส่ตัวอย่าง (load port) ที่มีกระจกปิดสไลด์เปิดอยู่ วางสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เซลล์สาหร่ายจมลงสู่พื้นสไลด์ วางสไลด์บนแท่นวางสไลด์ของกล้องจุลทรรศน์ ปรับกล้องโดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำสุดไปกำลังขยายที่สูงขึ้น นับจำนวนเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำกรนับและนำไปคูณด้วย 2.5×10^5 จะได้จำนวนปริมาณเซลล์ในหน่วย เซลล์/มิลลิลิตร

3.4.2 วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD)

ใส่ตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการวัดลงในควีเวต นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

3.4.3 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำหลอดเซนตริฟิวส์ขนาดเล็ก (eppendorf) ออบในตู้อบลมร้อน 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักหลอดด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกน้ำหนักที่ได้ เก็บตัวอย่างสาหร่ายปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาดเล็ก และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง mini centrifuges (spin down) เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างเซลล์ นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหลอดที่อบแห้งใส่ในเดซิเคเตอร์ ให้เย็นลง ประมาณ 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักที่ได้ และรายงานผลเป็น น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (กรัม/ลิตร)

3.4.4 ตรวจสอบปริมาณไขมันที่มีในเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีไนล์เรด

เก็บตัวอย่างสาหร่ายจากทุกๆ ฟลาสก์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง mini centrifuges (spin down) เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนมาเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ย้อมด้วยสีไนล์เรด (Nile Red) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปตรวจปริมาณไขมันด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ถ้ามีไขมันจะเห็นการเรืองแสงสีเหลือง

3.5 การสกัดและทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

3.5.1 การสกัดไขมันจากสาหร่าย (ดัดแปลงจาก Ahmad และคณะ, 2013)

เซลล์สาหร่ายแห้ง น้ำหนัก 0.3 กรัม ผสมกับคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 22.72:45.45 มิลลิลิตร นำไป sonicated เป็นเวลา 25 นาที ผสมบนเครื่องคนสาร (magnetic stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.5 นำกากที่กรองได้ไปสกัดซ้ำอีกครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างไขมันแห้งที่ได้ และเก็บไว้ทรานเอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป

3.5.2 ทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไขมัน (Ahmad และคณะ, 2013)

ซึ่งน้ำหนักไขมัน 10 มิลลิกรัม ละลายในเฮกเซน 2 มิลลิลิตร และเติม 200 ไมโครลิตร ของ 2 M methanolic KOH (ตัวเร่งปฏิกิริยา) ผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2-5 นาที และตามด้วยการปั่นเหวี่ยงสั้นๆ เก็บชั้นบนของเฮกเซนไว้วิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) ต่อไป

3.6 การศึกษาปริมาณและชนิดของกรดไขมัน

นำเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์ของสาหร่ายโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) (Shimadzu GC-2014, Japan) ที่ประกอบด้วยดีเทคเตอร์ FID (flame ionization detector) และคอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m) (J&W 122-7032) สภาวะของการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3.1 การเทียบชนิดของกรดไขมันโดยใช้กราฟมาตรฐาน FAME ของ David และคณะ, (2005) (รูปที่ ข.40) (ภาคผนวก ข-5) และใช้กรดไขมันโอเลอิก (Oleic Acid (Ph. Eur.) pure, pharma grade) ที่ความเข้มข้น 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% (วิธีเตรียมในภาคผนวก ก-5) เป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาปริมาณของกรดไขมัน

ตารางที่ 3.1 สภาวะการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME)

Inlet temperature	250°C
Injection volume	1 µl
Split ratio	1/50
Carrier gas	Hydrogen
Head pressure	53 kPa constant pressure (36 cm/s at 50°C)
Oven temperature	50°C, 1 min, 25°C/min to 200°C, 3°C/min to 230°C, 18 min.
Detector temperature	280°C
Detector gases	Hydrogen: 40 mL/min; Air: 450 mL/min; Helium make-up gas: 30 mL/min.

(ที่มา: David และคณะ, 2005)

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เป็นการวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่ากลางระหว่างประชากรโดยการวิเคราะห์ผ่านค่าความแปรปรวน (Variance) เราเรียกว่า “Analysis of Variance “ หรือเรียกง่ายๆ ว่า ANOVA ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของประชากรได้พร้อมกันมากกว่า 2 ประชากร ซึ่งถ้าเราใช้ T-Test จะทำได้มากที่สุดแค่ 2 ประชากรเท่านั้น และวิเคราะห์ได้มากกว่า 1 ปัจจัย (Factor) ซึ่ง T-Test จะทำได้เพียงปัจจัยเดียวเท่านั้น ซึ่งในวิเคราะห์ค่าทางสถิติของผลการทดลองการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จะใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 วิธีการใช้งานโปรแกรมดังแสดงในภาคผนวก จ-1

บทที่ 4 ผลการวิจัย

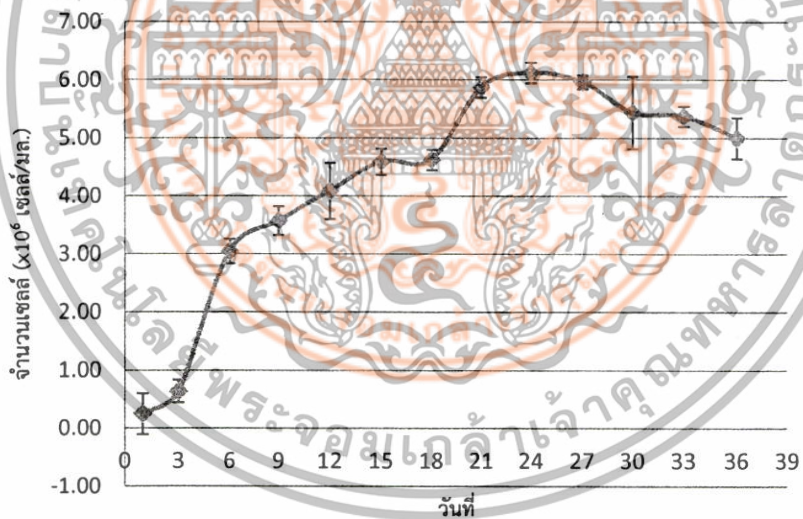
4.1 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 (NaNO_3 1.5 กรัม/ลิตร) การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ผลดังตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญดังรูปที่ 4.1-4.3 พบว่าสาหร่ายมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเริ่มคงที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5.88×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ผลของค่า OD พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่วันที่ 21 มีค่าการดูดกลืนแสง 1.682 และการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าในวันที่ 1 ถึงวันที่ 9 เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และเพิ่มสูงขึ้นหลังจากวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง และเริ่มคงที่ในวันที่ 21 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.35 กรัม/ลิตร หลังจากวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตที่ลดลง และมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) เท่ากับ 0.0453 ต่อวัน จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณเซลล์มากที่สุด แต่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน เมื่อเทียบกับ *Ankistrodesmus* sp. W53 และ *Chlorella vulgaris* ที่เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และ *Chlorella* sp. ED54 เข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เข้าสู่ระยะคงที่ช้ากว่าสายพันธุ์อื่น อาจเนื่องจากการใช้สารอาหารในการเจริญน้อยหรือสูตรอาหาร BG-11 ไม่เหมาะต่อการเจริญจึงทำให้ระยะเวลาที่เข้าสู่ระยะคงที่นานกว่าสายพันธุ์อื่น

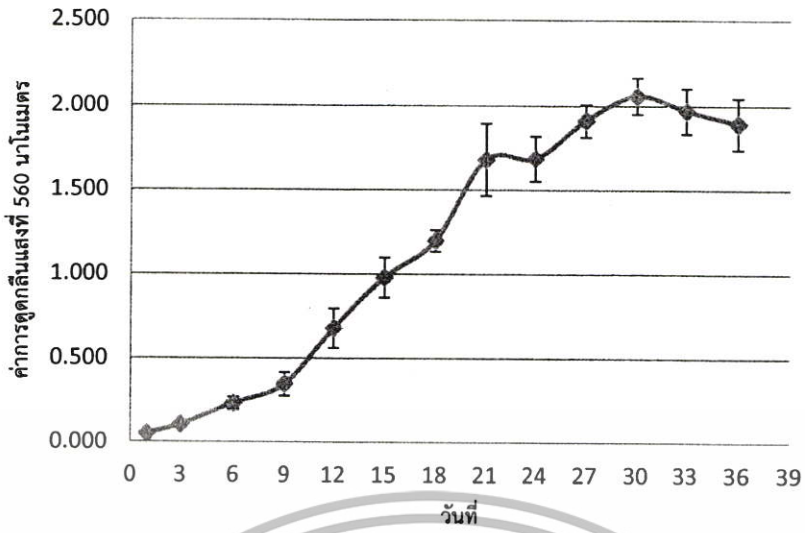
จากผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นในรูปที่ 4.1-4.3 สามารถนำมาสร้างแบบจำลองระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ดังรูปที่ 4.4 จากรูปในช่วงของ 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะอยู่ในช่วงของการปรับตัว (lag phase) ให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อม จึงมีการเพิ่มจำนวนเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นสาหร่ายจะเข้าสู่ระยะการแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) เพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมีจำนวนเซลล์มากที่สุด และจะเริ่มคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง อาจเนื่องมาจากสารอาหารเริ่มน้อยลง ทำให้การเจริญเติบโตช้าขึ้น และมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย และหลังจากนั้นสาหร่ายจะเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) ซึ่งอาจเป็นผลจากสารอาหารที่หมดลง และของเสียที่สาหร่ายสร้างขึ้นไปยับยั้งการเจริญเติบโต

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

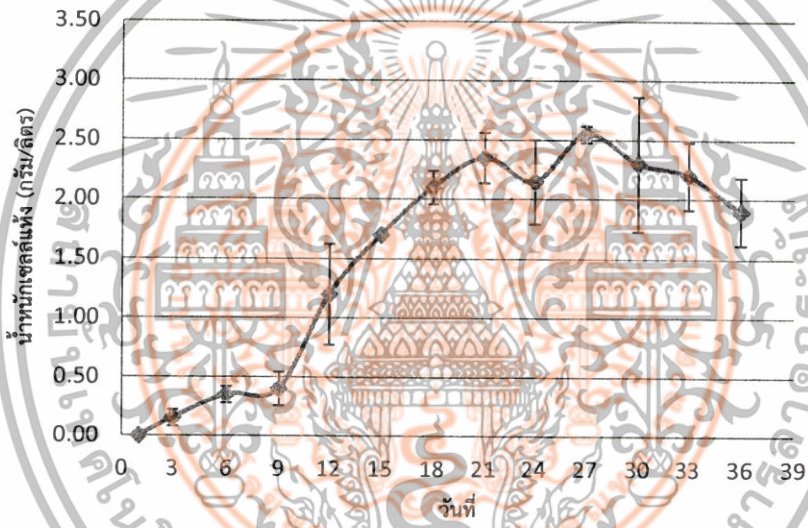
วันที่/ครั้งที่	การวัดการเจริญ		
	จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)	OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1/1	0.25±0.35	0.050±0.00	0.00±0.00
3/2	0.64±0.19	0.104±0.01	0.15±0.07
6/3	3.05±0.21	0.232±0.04	0.35±0.07
9/4	3.58±0.24	0.347±0.07	0.40±0.14
12/5	4.09±0.48	0.678±0.12	1.20±0.42
15/6	4.59±0.22	0.979±0.12	1.70±0.00
18/7	4.63±0.17	1.199±0.06	2.10±0.14
21/8	5.88±0.17	1.682±0.21	2.35±0.21
24/9	6.13±0.17	1.687±0.13	2.20±0.35
27/10	5.97±0.12	1.913±0.10	2.60±0.07
30/11	5.44±0.62	2.059±0.11	2.30±0.56
33/12	5.38±0.17	1.971±0.13	2.20±0.28
36/13	5.00±0.35	1.896±0.15	1.90±0.28



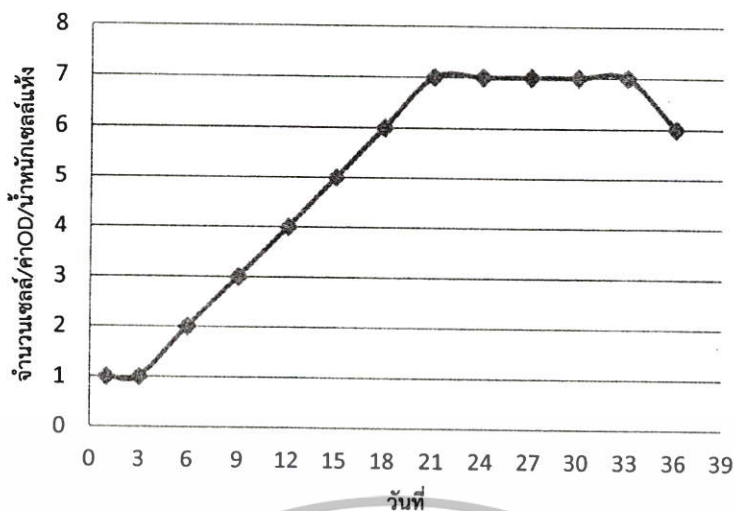
รูปที่ 4.1 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*



รูปที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*



รูปที่ 4.3 น้ำหนักรเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*



รูปที่ 4.4 แบบจำลองระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) ต่างกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 นำค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จากตารางที่ 4.2 ไปสร้างกราฟการเจริญดังรูปที่ 4.5-4.7 การวัดการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเซลล์สาหร่าย พบว่าจำนวนเซลล์ในสามวันแรกของการเพาะเลี้ยงมีจำนวนใกล้เคียงกัน และในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร และมีจำนวนเซลล์เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 27 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 3.92×10^6 เซลล์/มล. การวัดค่าการดูดกลืนแสงมาพล็อตกราฟได้ดังรูปที่ 4.6 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 1 ถึงวันที่ 9 มีค่าใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท และในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทอื่นๆ รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 2.5, 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด วัดการเจริญโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้งได้ผลดังตารางที่ 4.2 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและระยะเวลาการเจริญ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงในทุกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท โดยความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทที่ 1.5 กรัม/ลิตร มีค่ามากที่สุด คือเท่ากับ 1.05 กรัม/ลิตร

จากอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด ซึ่งมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยเป็น 0.1340 ต่อวัน รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 2.5, 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยเป็น 0.1154, 0.0982 และ 0.0876 ต่อวัน ตามลำดับ และเมื่อนำไปหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีความ

แตกต่างกันมีนัย สำคัญกับอัตราการเจริญจำเพาะที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 95 กับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัม/ลิตร ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร จึงมีความเหมาะสมที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย

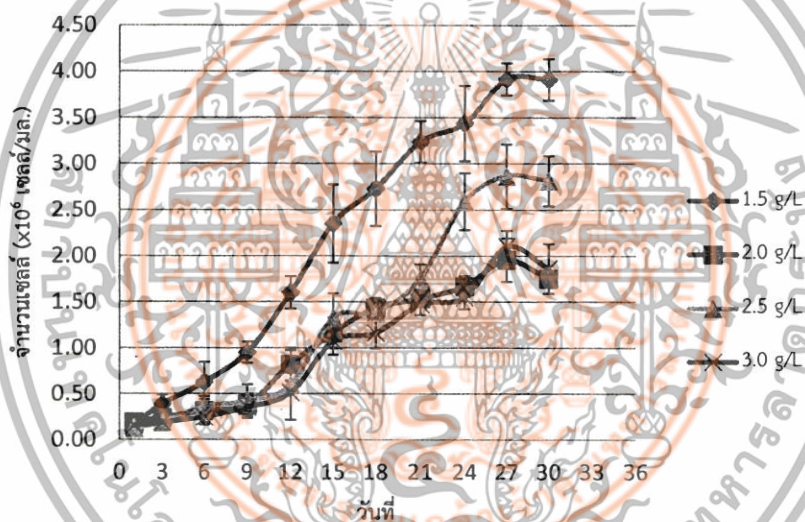
นอกจากนี้ในการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร พบว่าเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร มีลักษณะรูปร่างกลมรี เป็นกลุ่มเซลล์เกาะติดกัน 2 เซลล์ และ 4 เซลล์ แต่ที่ความเข้มข้น 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร พบกลุ่มเซลล์เกาะติดกัน 2 เซลล์และพบที่เป็น 4 เซลล์จำนวนน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทที่สูงเกินไป ดังแสดงในรูปที่ 4.8

จากความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย พบว่าที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากธาตุอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งธาตุไนโตรเจนเป็นสารอาหารชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งหากเพิ่มธาตุไนโตรเจนจะสามารถส่งเสริมให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นได้ ในทางตรงกันข้ามเมื่อลดธาตุไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงลงจะทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำลง แต่จะสามารถเพิ่มการสะสมไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายได้เช่นกัน และจากการทดลองเพิ่มธาตุอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นคือโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) จากผลการทดลองที่ได้พบว่า การเพิ่มโซเดียมไนเตรทให้สูงขึ้น ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตให้สาหร่ายมีจำนวนเซลล์ที่มากขึ้นได้ อาจเนื่องมาจากสัดส่วนของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งมักถูกใช้เป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยง โดยหากสัดส่วนระหว่างธาตุดังกล่าวสูงเกินไป แสดงว่าปริมาณของฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไป และในทางตรงกันข้าม หากสัดส่วนมีค่าต่ำเกินไป ควรเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (บุชนาถ, 2557) อีกเหตุผลที่เป็นไปได้คือสาหร่ายเติบโตอย่างรวดเร็วกับไนโตรเจนที่อุดมสมบูรณ์ซึ่งฟอสฟอรัสเริ่มหมดลงและทำให้อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสไม่สมดุลกัน (Kolber และคณะ, 1988) ในการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและจะลดลง แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่สูงจะยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตได้ (Wang และคณะ, 2010 และ Yin และคณะ, 2008) ดังนั้นอัตราส่วนของสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงมีความสำคัญในการเพิ่มชีวมวลของสาหร่ายรวมถึงการสะสมไขมันของสาหร่ายด้วยเช่นกัน

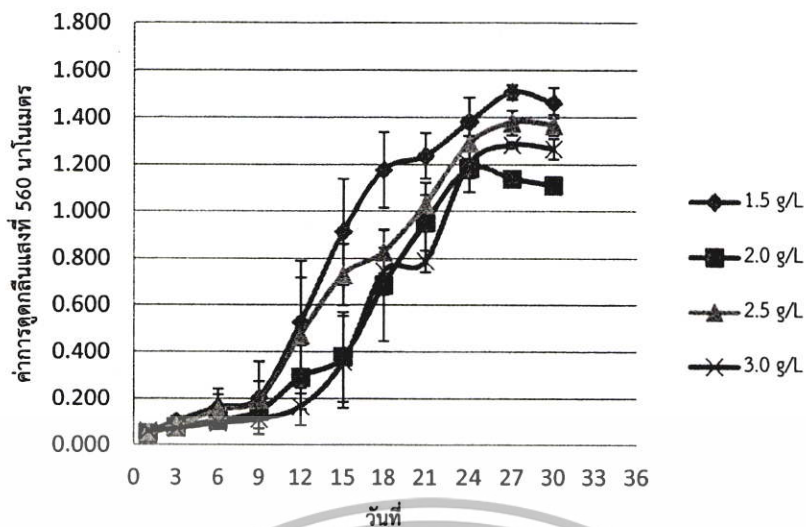
ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน

วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้น NaNO ₃ (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ		
		จำนวนเซลล์ x 10 ⁶ (เซลล์/มล.)	OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1/1	1.5	0.16±0.03	0.052±0.00	0.23±0.05
	2.0	0.19±0.01	0.049±0.00	0.28±0.10
	2.5	0.13±0.04	0.054±0.00	0.23±0.10
	3.0	0.16±0.01	0.061±0.01	0.23±0.10
3/2	1.5	0.39±0.10	0.101±0.02	0.33±0.05
	2.0	0.24±0.09	0.076±0.00	0.40±0.08
	2.5	0.19±0.05	0.081±0.02	0.25±0.13
	3.0	0.19±0.03	0.070±0.02	0.28±0.13
6/3	1.5	0.63±0.22	0.161±0.08	0.40±0.14
	2.0	0.31±0.13	0.104±0.00	0.40±0.08
	2.5	0.36±0.12	0.148±0.07	0.38±0.15
	3.0	0.24±0.08	0.094±0.03	0.35±0.13
9/4	1.5	0.95±0.12	0.203±0.16	0.30±0.08
	2.0	0.38±0.11	0.145±0.03	0.23±0.10
	2.5	0.43±0.18	0.195±0.08	0.28±0.10
	3.0	0.35±0.12	0.112±0.04	0.20±0.12
12/5	1.5	1.60±0.17	0.526±0.26	0.43±0.17
	2.0	0.82±0.18	0.291±0.14	0.20±0.08
	2.5	0.59±0.23	0.471±0.25	0.35±0.13
	3.0	0.51±0.17	0.166±0.08	0.20±0.08
15/6	1.5	2.35±0.42	0.913±0.23	0.45±0.24
	2.0	1.16±0.17	0.379±0.19	0.28±0.13
	2.5	1.33±0.26	0.730±0.13	0.35±0.13
	3.0	1.08±0.15	0.357±0.20	0.40±0.08
18/7	1.5	2.73±0.40	1.177±0.16	0.58±0.36
	2.0	1.44±0.10	0.686±0.24	0.43±0.10
	2.5	1.39±0.09	0.828±0.09	0.45±0.10
	3.0	1.16±0.17	0.745±0.10	0.50±0.08
21/8	1.5	3.24±0.23	1.238±0.10	1.05±0.19
	2.0	1.54±0.03	0.952±0.12	0.75±0.19
	2.5	1.75±0.16	1.030±0.09	1.00±0.08

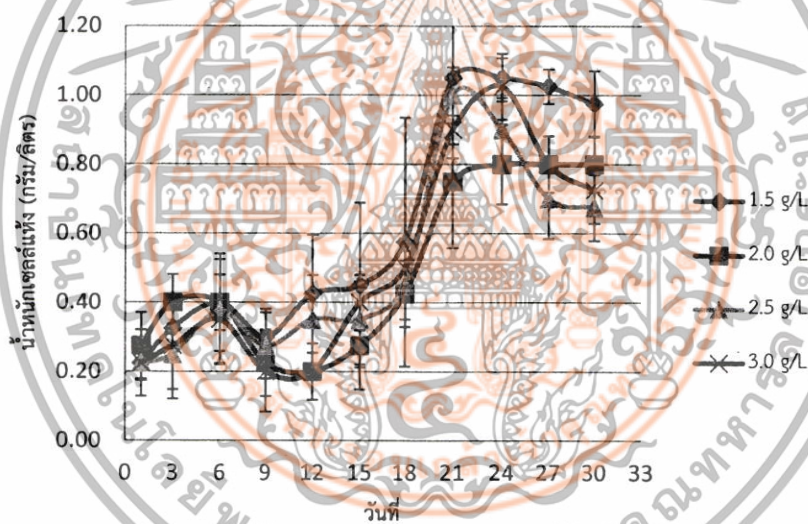
	3.0	1.48±0.12	0.788±0.05	0.90±0.08
24/9	1.5	3.44±0.41	1.382±0.10	1.05±0.06
	2.0	1.67±0.11	1.184±0.04	0.80±0.12
	2.5	2.59±0.31	1.292±0.11	0.90±0.08
	3.0	1.55±0.13	1.203±0.12	1.03±0.09
27/10	1.5	3.92±0.17	1.509±0.03	1.03±0.05
	2.0	1.96±0.23	1.139±0.04	0.08±0.08
	2.5	2.87±0.35	1.379±0.05	0.70±0.12
	3.0	2.10±0.17	1.284±0.01	0.80±0.08
30/11	1.5	3.91±0.23	1.462±0.07	0.98±0.10
	2.0	1.75±0.06	1.110±0.02	0.80±0.08
	2.5	2.82±0.27	1.369±0.04	0.68±0.10
	3.0	1.86±0.27	1.267±0.04	0.73±0.10



รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรดความเข้มข้นต่างกัน



รูปที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน

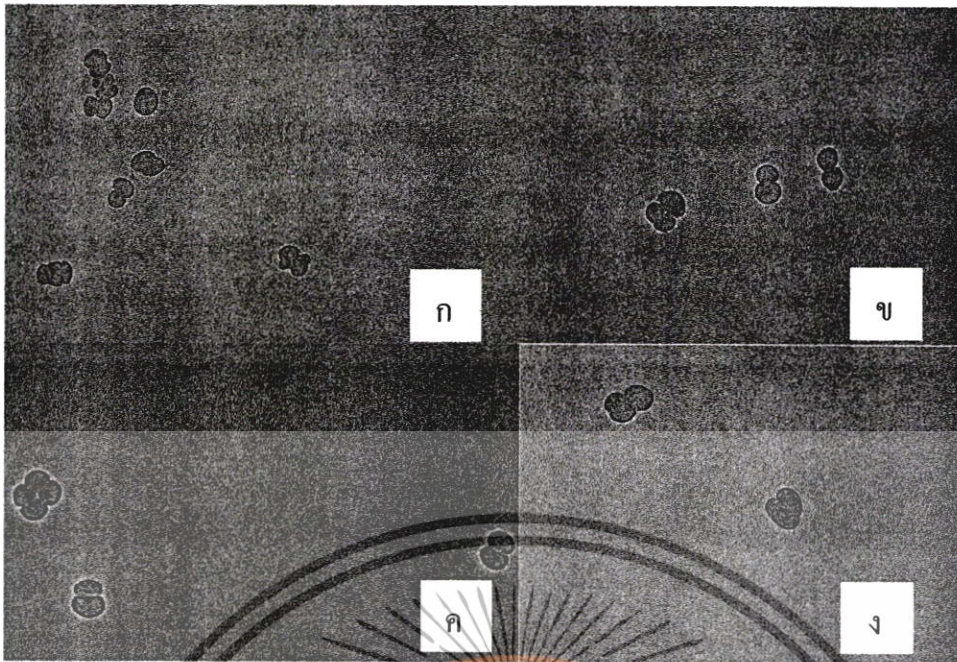


รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน

ตารางที่ 4.3 อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรดต่างกัน

ความเข้มข้น NaNO_3 (กรัม/ลิตร)	ซ้ำที่	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) (ต่อวัน)
1.5	1	0.1438
	2	0.1224
	3	0.1542
	4	0.1157
	เฉลี่ย	0.1340 ± 0.02^a
2.0	1	0.1107
	2	0.1092
	3	0.0803
	4	0.0924
	เฉลี่ย	0.0982 ± 0.01^b
2.5	1	0.1136
	2	0.1353
	3	0.1163
	4	0.0965
	เฉลี่ย	0.1154 ± 0.02^{ab}
3.0	1	0.1086
	2	0.1061
	3	0.0514
	4	0.0842
	เฉลี่ย	0.0876 ± 0.02^b

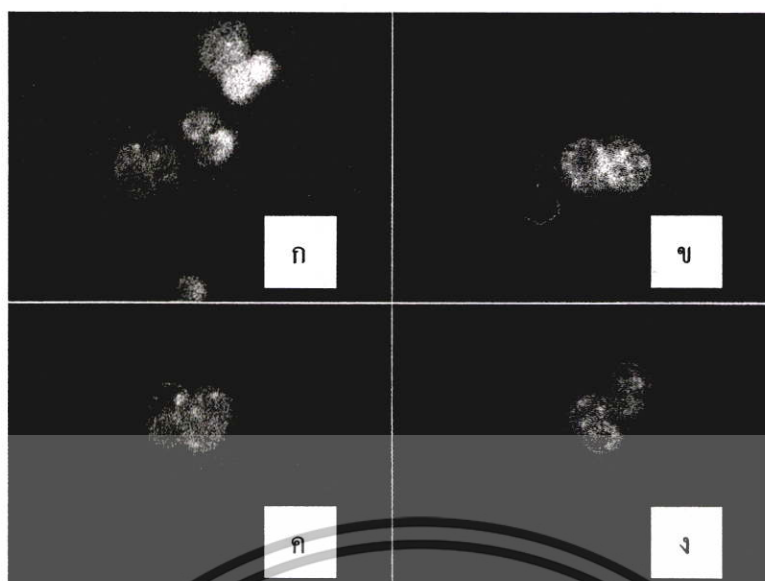
หมายเหตุ: a,b หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.8 เซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ (Nikon ECLIPSE Ci) กำลังขยาย 40X ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ)

4.3 ผลการตรวจสอบปริมาณไขมันที่มีในเซลล์ของสาหร่าย

จากการตรวจสอบปริมาณไขมันในเซลล์ของสาหร่าย จากการตรวจสอบพบว่าทุกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท เริ่มเห็นการเรืองแสงของหยดไขมันในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และมีหยดไขมันเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่เพิ่มขึ้น และพบว่าจะมีหยดไขมันหนาแน่นมากขึ้นในเซลล์เมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงตัวในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งการสะสมของไขมันจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง อาทิเช่น สารอาหาร สายพันธุ์ของสาหร่าย อุณหภูมิ แสงสว่าง เป็นต้น จากการเพาะเลี้ยงโดยเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทในอาหารให้มากขึ้น เพื่อส่งเสริมให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ซึ่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของสาหร่าย หากขาดไนโตรเจนสาหร่ายจะเจริญเติบโตน้อยลงและมีการสะสมไขมันมากขึ้น แต่จากการเพาะเลี้ยงพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่มากเกินไป จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้มีจำนวนเซลล์น้อยและสาหร่ายเกิดความเครียด จึงส่งผลให้มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นในเซลล์ ซึ่งจะสังเกตเห็นหยดไขมันในเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 3.0 กรัม/ลิตร มีหยดไขมันจำนวนมากในเซลล์ ดังรูปการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเซลล์สาหร่ายแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นไซโตยิมโนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ)

4.4 ผลการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร อัตราการให้อากาศ 1,500 มิลลิลิตร/นาที่ โดยใช้หัวพ่นอากาศที่ตั้งกัน คือ หัวทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 และดังรูปที่ 4.10-4.12 พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบท่อตรงมีค่าจำนวนเซลล์ ค่าการดูดกลืนแสง และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง มีค่ามากที่สุดอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและสามทางเจาะรู ข้อดีของการใช้หัวพ่นแบบท่อตรงในการให้อากาศ พบว่าอากาศที่พ่นลงไปในช่วงสามารถกระจายได้ทั่วถึงกันขวด เกิดการกวนของอาหารเพาะเลี้ยงได้อย่างทั่วถึง ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งการฆ่าเชื้อสามารถทำได้ง่ายโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ดังนั้นการใช้หัวพ่นอากาศแบบท่อตรงจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขนาดการเพาะเลี้ยงที่ใหญ่ขึ้น การใช้หัวทรายทรงกลมในการเพาะเลี้ยง จะให้ฟองอากาศที่ละเอียดพุ่งขึ้นด้านบน ทำให้เซลล์สาหร่ายตกตะกอน เนื่องจากโดยทั่วไปหัวทรายทรงกลมมักนิยมใช้ให้อากาศในตู้เลี้ยงปลา ซึ่งต้องการให้ออกซิเจนในตู้ปลาและไม่ต้องการให้น้ำขุ่นเนื่องจากการพ่นอากาศออกจากหัวทรายทรงกลม การนำหัวทรายทรงกลมมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงประสบกับปัญหาเซลล์สาหร่ายตกตะกอนและเจริญเติบโตได้ไม่ดี อีกทั้งการใช้หัวทรายทรงกลมจะทำการฆ่าเชื้อได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากไม่สามารถนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ได้ อีกทั้งยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ง่าย การใช้หัวพ่นแบบสามทางเจาะรูให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย พบว่าสามทางเจาะรู เมื่อใส่ลงไปในช่วงเพาะเลี้ยงจะลอยขึ้นจากกันขวด และบังคับทิศทางค่อนข้างยาก เนื่องจากมีน้ำหนักเบา และต้องใช้กำลังลมที่

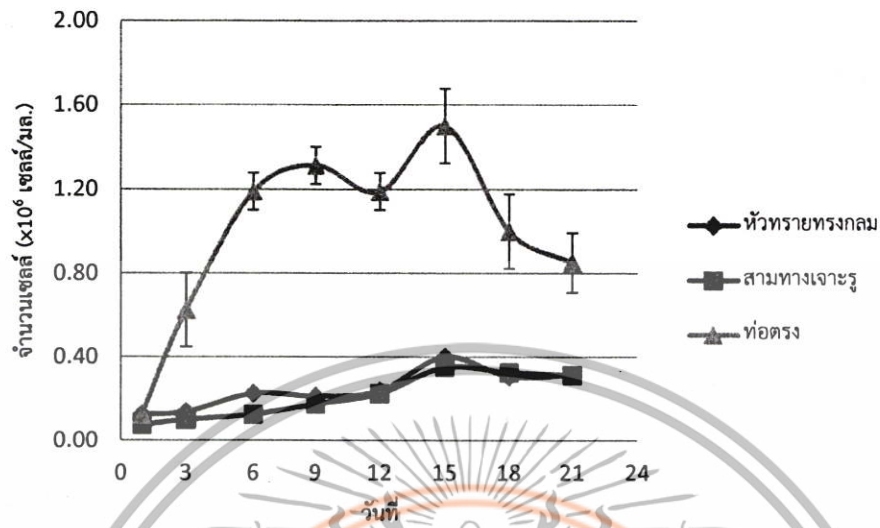
มากในการพ่นอากาศเข้าไปเพื่อให้อากาศออกมาครบทุกทาง และยังทำให้เซลล์สาหร่ายอีกฝั่งของขวดที่อากาศพ่นไปไม่ถึงตกตะกอนและเติบโตไม่ดี ลักษณะการให้อากาศของหัวพ่นอากาศทั้ง 3 แบบ แสดงดังรูปที่ 4.20

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 4,000 มิลลิลิตร ด้วยอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบท่อตรง เพาะเลี้ยงแบบแบทช์ (Batch cultivation) คือการเก็บเกี่ยวครั้งเดียวหลังจากการเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ทำการวัดการเจริญเติบโตพบว่ามีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 3.125×10^6 เซลล์/มล. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 1.150 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.95 กรัม/ลิตร

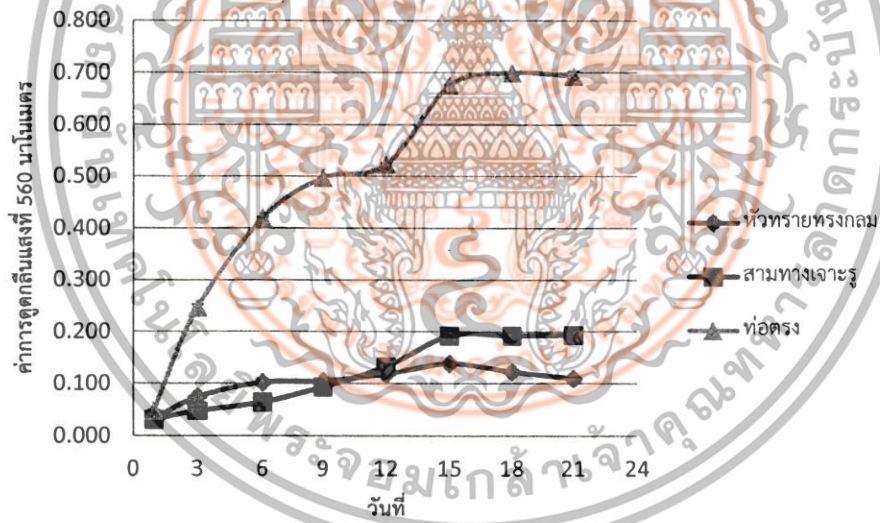
ตารางที่ 4.4 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ด้วยหัวพ่นอากาศ 3 แบบ

วันที่/ครั้งที่	ชนิดของหัวพ่นอากาศ	การวัดการเจริญ		
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)	OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1/1	หัวทรายทรงกลม	0.13±0.00	0.032±0.00	0.05±0.07
	สามทางเจาะรู	0.08±0.00	0.031±0.00	0.00±0.00
	ท่อตรง	0.13±0.00	0.048±0.00	0.05±0.07
3/2	หัวทรายทรงกลม	0.14±0.02	0.074±0.01	0.10±0.00
	สามทางเจาะรู	0.10±0.00	0.048±0.00	0.05±0.07
	ท่อตรง	0.63±0.18	0.246±0.01	0.10±0.00
6/3	หัวทรายทรงกลม	0.23±0.03	0.102±0.00	0.05±0.07
	สามทางเจาะรู	0.13±0.00	0.064±0.00	0.10±0.00
	ท่อตรง	1.19±0.09	0.420±0.00	0.35±0.07
9/4	หัวทรายทรงกลม	0.21±0.02	0.105±0.00	0.10±0.00
	สามทางเจาะรู	0.18±0.00	0.094±0.00	0.10±0.00
	ท่อตรง	1.31±0.09	0.497±0.00	0.40±0.00
12/5	หัวทรายทรงกลม	0.24±0.02	0.118±0.00	0.10±0.00
	สามทางเจาะรู	0.23±0.03	0.133±0.00	0.15±0.07
	ท่อตรง	1.19±0.09	0.523±0.00	0.55±0.07
15/6	หัวทรายทรงกลม	0.40±0.00	0.139±0.00	0.10±0.00
	สามทางเจาะรู	0.35±0.03	0.192±0.00	0.20±0.00
	ท่อตรง	1.50±0.18	0.676±0.00	0.60±0.14
18/7	หัวทรายทรงกลม	0.31±0.01	0.123±0.00	0.10±0.00
	สามทางเจาะรู	0.33±0.00	0.192±0.00	0.15±0.07
	ท่อตรง	0.81±0.09	0.700±0.00	0.50±0.14
21/8	หัวทรายทรงกลม	0.31±0.00	0.110±0.00	0.10±0.00

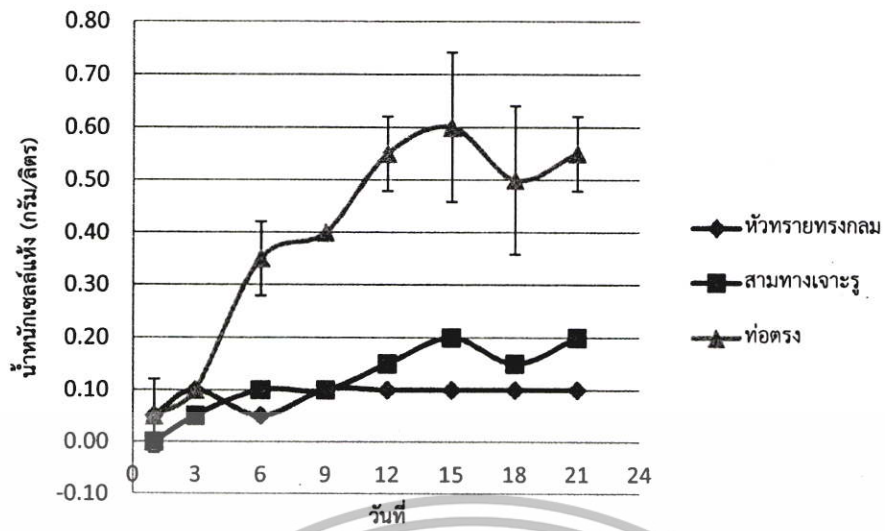
	สามทางเจาะรู	0.31 ± 0.02	0.194 ± 0.00	0.20 ± 0.00
	ท้อตรง	0.75 ± 0.00	0.694 ± 0.01	0.55 ± 0.07



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้หัวพ่นอากาศทั้ง 3 แบบ



รูปที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้หัวพ่นอากาศทั้ง 3 แบบ



รูปที่ 4.12 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้หัวพ่นอากาศทั้ง 3 แบบ



รูปที่ 4.13 หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง ตามลำดับ

4.5 ผลการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)

ผลการวิเคราะห์น้ำมันจากสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร โดยนำน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายมาผ่านกระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) โดยมีเบส (KOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) นำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์ของสาหร่ายโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (Shimadzu GC-2014, Japan) ที่ประกอบด้วยดีเทคเตอร์ FID (flame ionization detector) และคอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m) จากผลการวิเคราะห์พบว่าสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดที่มีจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม ซึ่งเป็นกรดไขมันที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดที่พบดังแสดงในตารางที่ 4.5 และตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จากการคิดเทียบกับกรดไขมันที่ใช้เป็นมาตรฐาน

ลำดับที่	ชนิดกรดไขมัน	%v/v
1	Myristic acid (C14:0)	0.01
2	Palmitic acid (C16:0)	0.05
3	Palmitoleic acid (C16:1)	0.01
4	Stearic acid (C18:0)	0.05
5	Oleic acid (C18:1)	0.01
6	Linoleic acid (C18:2)	0.01

ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จากการคิดเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟรวมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง

ลำดับที่	ชนิดกรดไขมัน	%v/v
1	Myristic acid (C14:0)	0.79
2	Palmitic acid (C16:0)	41.99
3	Palmitoleic acid (C16:1)	0.21
4	Stearic acid (C18:0)	4.05
5	Oleic acid (C18:1)	42.94
6	Linoleic acid (C18:2)	10.01

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน ($\text{NaNO}_3 = 1.5, 2.0, 2.5$ และ 3.0 กรัม/ลิตร) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 0.1340 ต่อวัน และมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ *Scenedesmus armatus* ที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร จึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และให้ชีวมวลสูงสุด ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์ของสายพันธุ์พบว่าจะหนาแน่นขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง

จากการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเป็น $6,000$ มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร $4,000$ มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น $3,400$ ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 3 องศาเซลเซียส) อัตราการให้อากาศ $1,500$ มิลลิลิตร/นาที่ โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบต่างๆ คือ หัวทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง พบว่าหัวพ่นอากาศแบบท่อตรงมีประสิทธิภาพการให้อากาศดีที่สุด มีชีวมวลสูงสุด และมีการกระจายของอากาศได้ทั่วถึง เกิดการกวนของอาหารเพาะเลี้ยงและไม่ทำให้เซลล์สายพันธุ์ตกตะกอน จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป

การศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในเซลล์สายพันธุ์ *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16 และคาร์บอน 18 อะตอม ซึ่งเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลจากสายพันธุ์น้ำมันได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงสายพันธุ์จะใช้สารเคมีหลายชนิด ซึ่งสารบางชนิดเมื่อมารวมกันจะไม่ละลายและตกตะกอน ดังนั้นจึงควรแยกสารเคมีแต่ละตัวและหลอมละลายให้สารละลายจนหมดก่อนแล้วจึงนำมารวมกันและนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
2. การฆ่าเชื้อขวดพลาสติกขนาดใหญ่เพื่อใช้เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ ไม่สามารถนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้ (Autoclave) เนื่องจากจะทำให้พลาสติกละลาย จึงต้องฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% และต้องล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลายๆ ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีแอลกอฮอล์ตกค้างอยู่ภายในขวดที่จะนำไปเพาะเลี้ยงสายพันธุ์

3. การใช้หัวทรายทรงกลม และสามทางเจาะรูในการให้อากาศในขวดเพาะเลี้ยงไม่สามารถฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้ จึงต้องใช้แอลกอฮอล์ในการฆ่าเชื้อและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ง่าย เนื่องจากแอลกอฮอล์ตกค้างและหัวทรายทรงกลมมีลักษณะขรุขระทำให้การทำความสะอาดให้ปราศจากจุลินทรีย์ทำได้ยาก
4. การตรวจสอบปริมาณไขมันด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red) จะต้องทำด้วยความรวดเร็ว เนื่องจากสารละลายไนล์เรดจะไวต่อแสงยูวีและต้องหลีกเลี่ยงการโดนแสงให้น้อยที่สุด



เอกสารอ้างอิง

1. กীরติ อิศระพ่าย 2555 ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกเชิงแสงแบบแผ่นเรียบขนาดใหญ่ เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เวเจตาที่ความหนาแน่นสูงของฮีมาโทคอคคัส พลูเวียลิส วิทยานิพนธ์ในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ดร. สรวิต เผ่าทองสุข 2543 สหรัย คักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย เอกสารเผยแพร่ชุดโครงการ “อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ” สกว. ชุดที่ 2 ISBN 974-346-878-1
3. ดวงมล เรืองงาม 2550 อุทกพลศาสตร์และการถ่ายเทมวลในถังสัมผัสแบบอากาศยกชนิดไหลวนภายในด้วยตัวกระจายอากาศรูปวงแหวนในน้ำเค็ม วิทยานิพนธ์ในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. พงศ์ธร เครือวณิชธรรม 2550 ความหลากหลายของสายพันธุ์สาหร่ายเขียวที่ผลิตสารสีแคโรทีนอยด์จากนำตกกระทิงและน้ำตกป่าละอู วิทยานิพนธ์ในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
5. ยุวดี พิรพรพิศาล 2549 สาหร่ายวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 2 เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6. Antonio Box, Antoni Sureda, Jorge Terrados, Antoni Pons, Salud Deudero, 2008. Antioxidant response and caulerpenyne production of the alien *Caulerpa taxifolia* (Vahl) epiphytized by the invasive algae *Lophocladia lallemandii* (Montagne), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 364, 24–2.
7. Bing-Chung Liao, Chun-Ting Shen, Fong-Ping Liang, Siang-En Hong, Shih-Lan Hsu, Ting-Ting Jong and Chieh-Ming Chang, J. 2010; “Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity.” *The Journal of Supercritical Fluids* 55: 169-175.
8. Campanella L., Martini E., Tomassetti M., 2005. Antioxidant capacity of the algae using a biosensor method, *Talanta* 66, 902-911.
9. Catarina Guedes, A., Maria Gião, S., Ana Matias, A., Ana Nunes, V.M., Manuela Pintado, E., Catarina Duarte, M.M. and Xavier Malcata, F. 2013. “Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing.” *Journal of Food Engineering* 116: 478-482.
10. Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant, *Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis*, *Separation Science and Technology* 46 (2011) 1-7

11. Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk, Prasert Pavasant, Siti Machmudah, and Motonobu Goto, Selective Extraction of Lutein from Alcohol-treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical Carbon Dioxide, *Chemical Engineering & Technology* 35 (2012) 255-260
12. Felix Nwosu, Jennifer Morris, Victoria A. Lund, Derek Stewart, Heather A. Ross, Gordon J. McDougall, 2011. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae, *Food Chemistry* 126, 1006–1012.
13. Hanaa, H., Abd El Baky, Gamal, S., El-Baroty, Abderrahim Bouaid, Mercedes Martinez and José Aracil. 2012. “Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by Optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production.” *Bioresource Technology* 119: 429-432.
14. Hong-Wei Yen, Wei-Cheng Chiang and Cheng-Hsiung Sun. 2012. “Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor.” *Bioresource Technology* 43: 53-57.
15. I-Chuan Sheih, Tung-Kung Wu., Fang Tony J., 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems, *Bioresource Technology* 100, 3419–3425.
16. Jiang-Gong Liu, Chien-Wei Hou, Shin-Yi Lee, Yaju Chuang, Chih-Cheng Lin, 2011. Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina*(*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria, *Process Biochemistry* 46, 1405–1410.
17. Li Xin, Hu Hong-ying, Gan Ke and Sun Ying-xue. 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.
18. Li Xin, Hu Hong-ying, Gan Ke and Yang Jia. 2010. “Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources.” *Bioresource Technology* 36: 379-381.
19. Li X., Xu H., Wu Q., 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98 (4), 764–771.
20. Liang Wang, Yunguang Li, Milton Sommerfeld and Qiang Hu. 2013. “A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid.” *Bioresource Technology* 129: 289-295.

21. Lingzhao Wang, Bao Yang, Binlun Yan and Xingcun Yao. 2012. "Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluviialis* and its antioxidant potential in sunflower oil." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 13: 120-127.
22. Lu chen, Cunwen Wang, Weiguo Wang and Jiang Wei. 2013. "Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. Cultivated in an open-pond system." *Bioresource Technology* 133: 9-15.
23. Macías-Sánchez, M.D., Fernandez-Sevilla, J.M., Acien Fernández, F.G., Cerón García, M.C. and Molina Grima, E. 2010. "Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*." *Food Chemistry* 123: 928-935.
24. 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.
25. Mandotra S.K., Pankaj Kumar, M.R. Suseela, P.W.Ramteke., 2014. Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: A potential feedstock for high quality biodiesel production. *Bioresource Technology* (156), 42-47.
26. Martha T.A., Eliseo C., Carmen M., Fernando E., Giuseppe T., Rosa O.C., 2013. *Scenedesmus incrassatulus* CLHE-SI01: A potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production. *Bioresource Technology* (140), 158-164.
27. Ming-Chang Chan, Shin-Hsin Hoa, Duu-Jong Lee, Chun-Yen Chen, Chieh-Chen Huang and Jo-Shu Chang. 2013. "Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N." *Biochemical Engineering Journal* 78: 24-31.
28. Muthu Arumugama, Ankur Agarwal, Mahesh Chandra Arya and Zakwan Ahmed. 2013 "Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*." *Bioresource Technology* 131: 246-249.
29. Nagata, M. and I. Yamashita. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and Carotenoids in tomato fruit. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology* 39: 925-928.
30. Onofrejšová L., Vašíčková J., Klejdus B., Stratil P., Mišurcová L., Kráčmar S., Kopecký J., Vacek J. 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 464-470.

31. Plaza M., Santoyo S., Jaime L., García-Blairsy G. 2010. Screening for bioactive compounds from algae: Short communication, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 450-455.
32. Ratih Pangestuti, Se-Kwon Kim, 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae, *Journal of Functional Foods* 3, 255–266.
33. Sa´nchez, J.F., Fern´andez, J.M., Acie´n, F.G., Rueda, A., Pe´rez-Parra, J. and Molina, E. 2008. “Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*.” *Process Biochemistry* 43: 398-405.
34. Shih-Hsin Ho, Chun-Yen Chen and Jo-Shu Chang. 2012. “Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N.” *Bioresource Technology* 113: 244-252.
35. Shih-Hsin Ho, Ming-Chang Chan, Chen-Chun Liu, Chun-Yen Chen, Wen-Lung Lee, Duu-Jong Lee and Jo-Shu Chang. 2014. “Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies.” *Bioresource Technology* 152: 275-282.
36. Takashi Kuda, Tomoko Hishi, Sayuri Maekawa, 2006. Antioxidant properties of dried product of “haba-nori”, an edible brown alga, *Petalonia binghamiae* (J. Agaradh) Vinogradova, *Food Chemistry* 98, 545-550.
37. Victor Abrahamsson, Irene Rodriguez-Meizoso and Charlotta Turner. 2012. “Determination of carotenoids in microalgae using supercritical fluid extraction and chromatography.” *Journal of Chromatography A* 1250: 63-68.
38. Wu Yin-Hua, Yu Yin, Li Xin, Hu Hong-Ying and Su Zhen-Feng. 2012. “Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition.” *Bioresource Technology* 112: 192-198.
39. Zbigniew Tukaj, Krystyna Matusiak-Mikulin, Justyna Lewandowska and Janusz Szurkowski. 2003. “Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga *Scenedesmus armatus*.” *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 337-344.
40. *Scenedesmus armatus* [online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Scenedesmus>
41. *Scenedesmus armatus* [online]. Available: <http://www.algaedepot.org/algae-reference/algae->

ภาคผนวก

BG-11

NaNO_3	1.5	กรัม
K_2HPO_4	0.040	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036	กรัม
EDTA	0.001	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม
Na_2CO_3	0.020	กรัม
Trace element mixture**	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
** Trace element mixture		
H_3BO_3	2.860	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.810	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.220	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.390	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.080	กรัม
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.050	กรัม

ปรับค่า pH เป็น 7.1 เติมน้ำ (agar) 1.5 กรัม ในปริมาตร 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็ง

งานวิจัยนี้ได้แนะนำให้เสนอไปเสนอผลงานทางวิชาการ ได้แก่

Duangkamol Ruen-ngam*, *Optimum Condition for Nitrate Content in Scenedesmus armatus Cultivation for Biodiesel Production*, TSB 2016, The 8th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Frontier in applied Biotechnology, Swissotel Le Concorde hotel, Bangkok, Thailand, 23-25 November, 2017, (Proceeding) (Poster presentation)



Optimum Condition for Nitrate Content in *Scenedesmus armatus* Cultivation for Biodiesel Production

Duangkamol Ruen-ngam^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of
Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

*E-mail: duangkamol.ru@kmitl.ac.th

ABSTRACT

This research has focused on effect of sodium nitrate content (0 - 3.00 g/ml) in base medium, BG-11 on the growth of *Scenedesmus armatus*. The culture was cultivated in 250 ml flask with medium volume 150 ml, shaking speed of 110 rpm at room a temperature (27±3°C), the light intensity of 3,400 lux. The oil content was measured by two methods; radiation of light under fluorescent microscope and GC. Firstly *Scenedesmus armatus* was cultivated in basic BG-11. The growth model was predicted from growth curve by three methods; cell count, OD value and dry cell weight. Log phase occurred on the 3th to 21st day of cultivation. When the cultivation medium as applied by sodium nitrate (NaNO₃), the maximum of the cell was little bit shifted to the 27th day of cultivation. The NaNO₃ concentration of 1.5 g/l got the highest yield with μ_{max} of 0.1340 per day and had significantly different compared to other concentration by getting counted cell was 5.88×10^6 cell/l, 1.682 absorbance value, dry cell weight was 1.05 g/l. The oil derived from algae was analyzed for the type of oil by GC. It has expected that the oil that can be used to produce biodiesel is C16 (Palmitic acid) and C18 (Stearic acid).

Keywords: *Scenedesmus armatus*, sodium nitrate source, biodiesel

INTRODUCTION

Nowadays many country have problem on energy shortage and the price of import energy is high therefore the alternative energy like biodiesel is interesting to solve the energy crisis. Many types of biomass can be used to make biodiesel for example palm, castor bean, soybean, etc. However the cultivation per area is quit low therefore the raw material which has high yield per area such as algae is recently interesting. Moreover the algae can produce oil which is suitable for biodiesel production.

Cultivation condition is quite important for yield in biodiesel production. Many researchers have done on the optimum condition for getting the high yield of oil to produce biodiesel. Examples of condition are type of cultivation, size, air, temperature, light intensity and nutrient. All parameters affects to the oil content in algae (Atilio et al., 2009, Wu and Miao, 2014, Lin and Wu, 2015, Pancha et al., 2015). However there has still limited for effect of medium on *Scenedesmus armatus* cultivation for biodiesel production.

To obtain the high yield of oil content in *Scenedesmus armatus* cultivation therefore this research has been conducted by focusing on the macro nutrient such as sodium nitrate in BG-11 medium.

MATERIALS AND METHODS

Materials

NaNO₃ K₂HPO₄ MgSO₄·7H₂O CaCl₂·2H₂O Citric acid Ferric ammonium citrate EDTA disodium magnesium salt Na₂CO₃ Agar Disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄·2H₂O) Monopotassium phosphate (KH₂PO₄) Potassium nitrate (KNO₃) Ferric Ethylenediaminetetraacetic Acid (FeEDTA) Magnesium sulfate (MgSO₄·18H₂O) Calcium chloride (CaCl₂) Trace element NaNO₃ CaCl₂·2H₂O MgSO₄·7H₂O K₂HPO₄ KH₂PO₄ NaCl Trace element (TCI, Thailand)

Medium preparation

BG-11 medium was modified by varying amount of NaNO₃ concentration range of 1.5, 2.0, 2.5 and 3 g/l. BG-11 with 1.5 g/l of NaNO₃ was used to be controlled. The medium was prepared and sterile in 250 ml with 150 ml. Left it 1 day for checking contamination. Ten percent of strain

medium with concentration 10^6 cell/ml was inoculated to the sterile medium to obtain OD at 560 nm around 0.3-0.6. The flask was then placed in stirred with circulation rate of 110 rpm with light intensity 3,400 lux at room temperature $27\pm 3^\circ\text{C}$. The cultivation has been conducted for 30 days with taking sample every 3 days interval.

Inoculation of pure strain

Mixed culture was collect from Bungpraram pond, Pranakornsriayutthaya province. Screening for pure culture was conducted by cross streak technique on BG-11-soild medium in laminar clean bench (Super Clean, 120BS, Thailand). The culture was then incubated at room temperature (25°C) with light intensity 1,700-1,800 lux (Takemura, DM-28, Japan) for 1-2 weeks. The single colony, which was already screened type, was then transferred to BG-11 slant by simple streak (1 colony/1 slant) for further experiment.

Growth determination

The growth of the algae was determined by 3 methods; cell count, OD (optical density determination) and dry cell weight determination. The cell count was done by using haemocytometer then calculated the cell per medium volume. The optical density of the algal cell was measure the OD by spectrophotometer at $\lambda=560$ nm. The dry cell weight was done by drying the cell under 70°C for 24 h or until it has constant in weight then calculate to dimension of g/l.

Lipid extraction and transesterification

The algal extraction method was modified from Ahmad al., 2013, Chen et al., 2014 and Cheng et al., 2014. In brief, the dried algal was extracted by mixing solvent of Chloroform:methanol with ratio 22.72:45.45 (v/v) then sonicated for 25 minutes and continually mixed by magnetic stirrer for 2 hours. The mixture of solid and liquid was then filtered through No.5-Whatman filter paper and then the liquid phase was removed under vacuum condition by rotary evaporator at temperature of 40°C . This step can get oil for further tranesterification step. Transesterification step was modified from (Ahmad al., 2013, Chen et al., 2014 and Cheng et al., 2014). In brief, oil was

dissolve in hexane and then well mixed with methanolic KOH (catalyst) for 2-5 minutes. The upper solution of fatty acid-contained hexane was kept for Fatty Acid Methyl Ester, FAME determination by Gas Chromatography.

Lipid content determination

Preliminary test for lipid content determination was done by adding 25% (v/v) Dimethyl sulfoxide (DMSO) and dyed with 0.1 mg/ml of Nile Red and keep for 10 minutes and checked yellow-light radiation of oil under fluorescent microscope. Specific type of fatty Acid Methyl Ester, FAME was determined by Gas chromatography, GC (Shimadzu GC-2014, Japan) with flame ionization detector, FID and DB-Wax (30 m x0.25 mm ID, 0.25 µm) (J&W 122-7032) under the condition; inlet temperature = 250°C, carrier gas = hydrogen, head pressure= 53 kPa constant pressure (36 cm/s at 50°C), oven temperature=50°C, 1 min, 25°C/min to 200°C, 3°C/min to 230°C, 18 min, detector temperature= 280°C, detector gas, Hydrogen: 40 ml/min; Air: 450 mL/min; Helium make-up gas: 30 ml/min. Peak of FAME was compared to FAME standard of David et al., (2005) and the quantities were calculated in two forms; percent of each type of fatty acid content in sample based on the area under the peak and amount of fatty acid in percent based on the oleic acid standard (Oleic Acid (Ph. Eur.) pure, pharma grade) which was prepared in range of 2-10% in ethanol. Percent of fatty acid content in sample was calculated as follow;

$$\text{Fatty acid content(i) \%} = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100$$

Where A_i is area under the peak of fatty acid i component

Amount of fatty acid in percent was calculated based on the standard curve of each type of fatty acid which used Oleic Acid as standard.

Statistic Analysis

All experiments have been done for quadruple and then analysis of variance by ANOVA (IBM SPSS Statistics 22)

RESULTS AND DISCUSSION

Growth curve of *Scenedesmus armatus* under BG-11 medium

All results were demonstrated in 3 form; cell count, OD and dry cell weight that showed in Fig. 1. The cell count sharply increased to the maximum value of 5.88×10^6 cell/ml at the cultivation day of 21st. The trend was the same as occurring in OD and dry cell weight with 1.682 and 2.35 g/l, respectively. After 30 days cultivation, all results gradually dropped down. Cultivation model can be predicted from all results and got the growth model with lag, exponential, stationary and lag phase as shown in Fig. 1(D). *Scenedesmus armatus* was cultivated for longer time than other types of algae such as *Ankistrodesmus* sp. W53 and *Chlorella vulgaris* that reached to stationary phase on the 10th day of cultivation and *Chlorella* sp. ED54 reached to stationary on the 12th day of cultivation.

Growth curve of *Scenedesmus armatus* under various NaNO₃ concentrations

When the BG-11 was modified by adding with various NaNO₃ concentrations, results were little changed. Cell count gradually increased with time until cultivation day of 9th then sharply increased with high growth rate and reached to the maximum of cell count on 27th cultivation. Comparison among various NaNO₃ concentrations, 1.5 g/l of NaNO₃ had the highest values in all types of results. The trends were the same in all types of the results with the maximum cell count, OD and dry cell weight were 3.92×10^6 cell/ml, 1.509 and 1.05 g/l.

The results of cell count were then calculated specific maximum growth rate (μ_{max}) and the numbers were shown in Table 1. The maximum specific growth rate obtained at 1.5 g/l of NaNO₃ with value of 0.1340 per day and got the highest value compare other concentrations at significant level of 95%. The sodium nitrate of 2.5, 2.0 and 3.0 g/l got around 0.1154, 0.0982 and 0.0876 per day. Moreover the observation under microscope found that *Scenedesmus armatus* duplicated cells were found much in 1.5 g/ml of NaNO₃ medium compared other concentrations shown in Fig. 2.4.

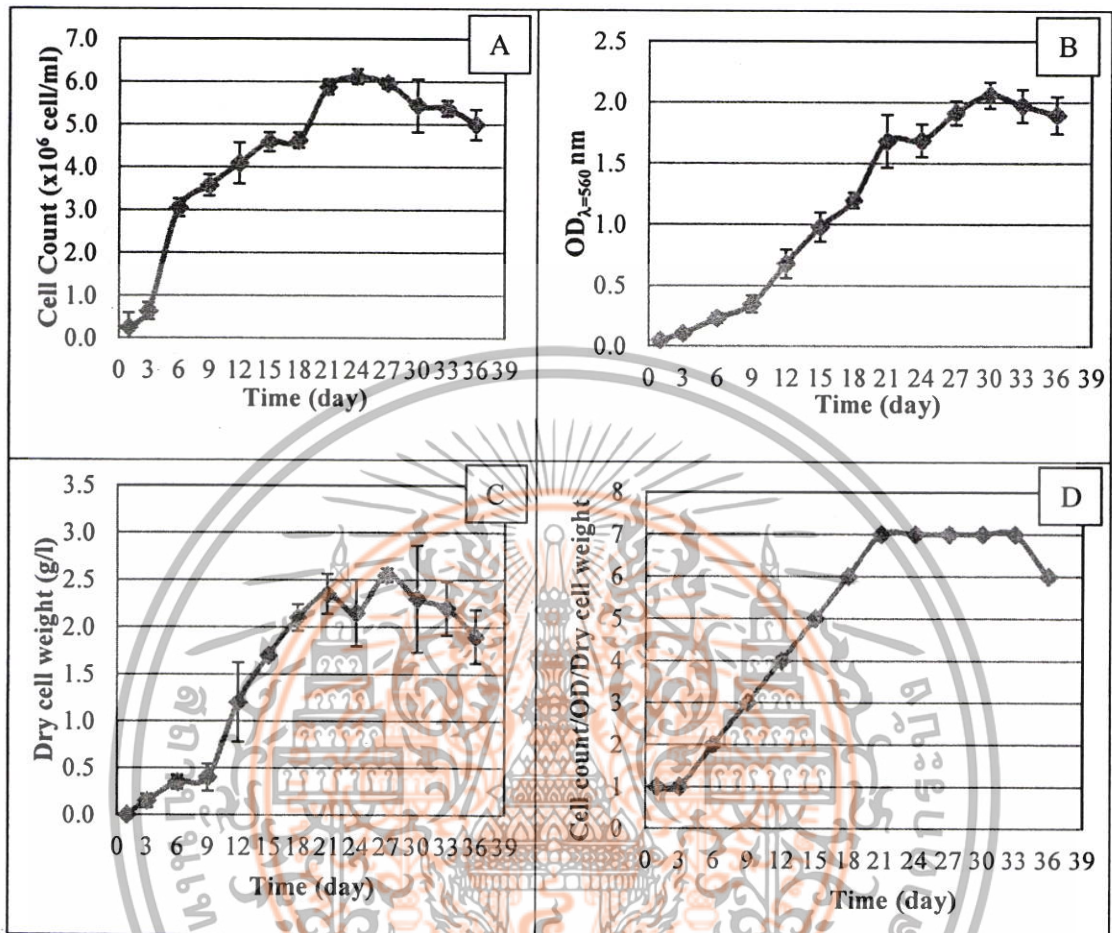


Figure 1. Growth curve of *Scenedesmus armatus* (A) Cell count (B) Optical density at $\lambda=560 \text{ nm}$ (C) Dry cell weight (D) Growth model

Nitrate is important on algal cell growth; however, it affects to oil content in cell. The factor which is predominant on cell growth is nitrogen and phosphorus ratio. The balance on nitrogen and phosphorus ratio has affected on cell growth (Kim et al., 2015). The cell growth increased at the initial then dropped at the last of the growth curve, it might be that the high content of nitrate might affect to the growth of the cell. (Yin et al., 2008 and Wang et al., 2013)

Table 1. Maximum specific growth rate (μ_{max}) of *Scenedesmus armatus* in BG-11 modified with various sodium nitrate concentration

Concentration NaNO ₃ (g/l)	Maximum specific growth rate (μ_{max}) (per day)
1.5	0.1340±0.02 ^a
2.0	0.0982±0.01 ^b
2.5	0.1154±0.02 ^{ab}
3.0	0.0876±0.02 ^b

Note: Different alphabet means significant difference at level of 95 percent

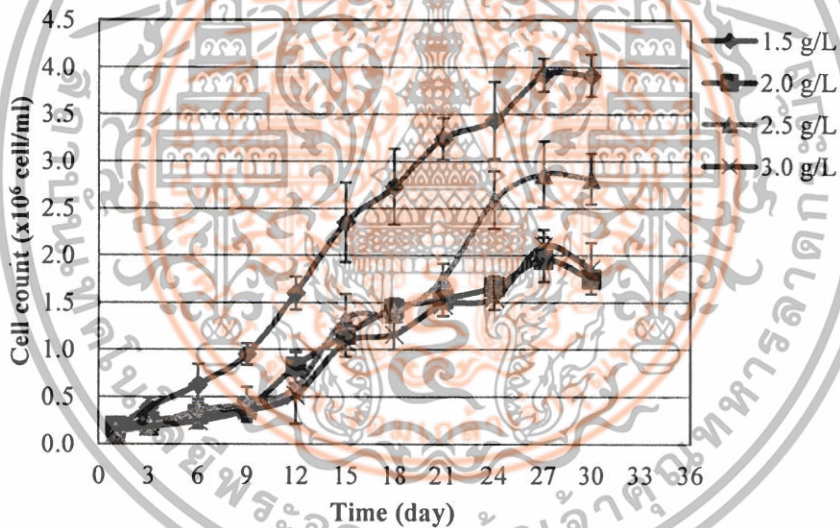


Figure 2. Cell count of *Scenedesmus armatus* in BG-11 medium with various sodium nitrate concentration; 1.5 - 3.0 g/l

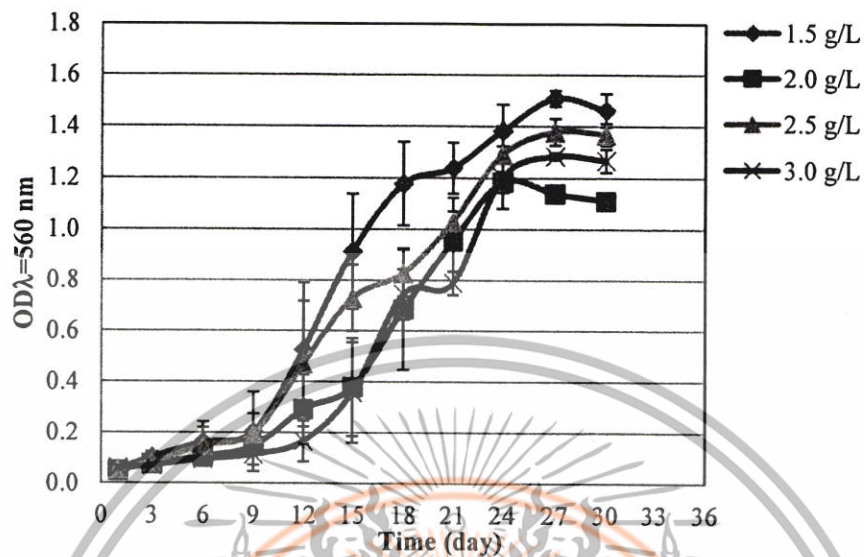


Figure 3. Optical density of *Scenedesmus armatus* at $\lambda=560$ nm cultivated in BG-11 medium modified with various sodium nitrate concentration; 1.5 - 3.0 g/l

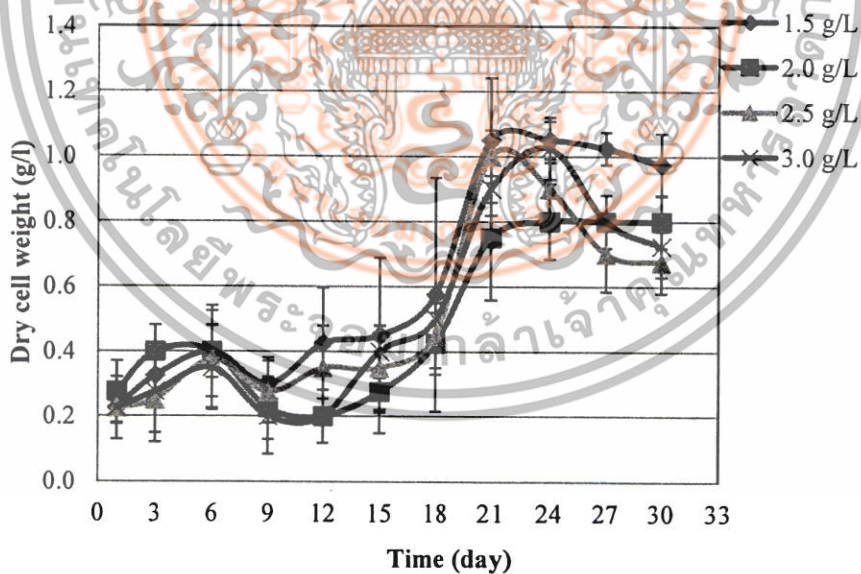


Figure 4. Dry cell weight of *Scenedesmus armatus* cultivated in BG-11 medium modified with various sodium nitrate concentration; 1.5 - 3.0 g/l

Lipid content by Nile red and GC

The yellow-light radiation has been found initially on 12th day of cultivation then appeared in large amount of such oil on 21st day. The amount of lipid increases with amount of NaNO₃ added to BG-11 and correlates with cell growth. The results of lipid contained in cell were shown in Figure 5. Because of the starvation condition of NaNO₃ made the algae kept the oil inside the cell for living; however, the lower number of cell count has found in too high of NaNO₃ concentration. The result of oil content in cell of 3.0 g/l NaNO₃ was demonstrated in Figure 5 (D).

The best condition for cell growth and oil content in algae was the BG-11 modified with 1.5 g/l NaNO₃. The algae from such condition were then rechecked by GC. Results shows in Table2, fatty acid which was found the most in algae were C16 and C18 fatty acid that found the same in *Chlorella* sp. Y8-1 (Lin and Wu, 2015)

Table 2. Lipid content in *Scenedesmus armatus*

No.	Type of fatty acid	Based on peak area (%)	Based on standards (%)
1	Myristic acid (C14:0)	0.79	0.01
2	Palmitic acid (C16:0)	41.99	0.05
3	Palmitoleic acid (C16:1)	0.21	0.01
4	Stearic acid (C18:0)	4.05	0.05
5	Oleic acid (C18:1)	42.94	0.01
6	Linoleic acid (C18:2)	10.01	0.01

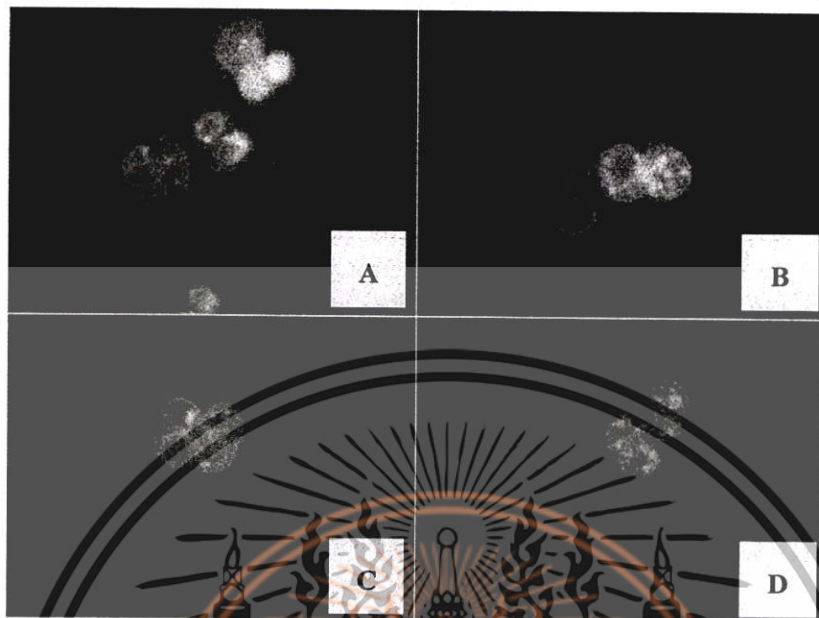


Figure 5. Liquid content in *Scenedesmus armatus* cultivated in various sodium nitrate concentrations; 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 g/l at 21st of cultivation (A, B, C, D respectively) (Fluorescent 100X)

CONCLUSIONS

The research focused on the effect of various concentration of NaNO_3 in range of 1.5-3.0 g/l and has been found that NaNO_3 with concentration of 1.5 g/l has the highest μ_{max} value of 0.1340 per day at significant level of 95%. Moreover such condition has the high content in algae cell that plenty of C16 and C18 free fatty acid with the highest level on 21st day of cultivation.

ACKNOWLEDGEMENT

The author would like to thank Faculty of Science, KMITL for research fund.

REFERENCES

- Ahmad I., Fatma Z., Yazdani S. and Kumar S. (2013). DNA barcode and lipid analysis of new marine algae potential for biofuel. *Algal Research*. 2: 10-15.

- Attilio C., Casazza A., Ortri E.Y., Perego P., Borghi M.D. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochlorosis ocular* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*. 48: 1146-1151.
- Chen C., Change Jo-Shu., Huang C., Ho Kao-Chai. (2014). A novel biodiesel production method consisting of oil extraction and transesterification from wet microalgae. *Energy Procedia*. 61: 1294-1297.
- Cheng J., Huang Rui., Li Tao., Zhou Junhu., Cen Kefa. (2014). Biodiesel from wet microalgae: Extraction with hexane after the microwave-assisted transesterification of lipids. *Bioresource Technology*. 170: 69-75.
- David F., Sandra P., and Vickers A.K. (2005). Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-3760EN.pdf>
- Kim Ga-Yeong., Yun Yeo-Myeong., Shin Hang-Sik., Kim Hee-Sik., Jong-In Han. (2015). *Scenedesmus*-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. *Bioresource Technology*. 196: 235-240.
- Lin T., Wu Jane-Y. (2015). Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology*. 184: 100-107.
- Pancha I., Chokshi K., Mishra S. (2015). Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*. 179: 565-572.
- Wang L., Li Y., Sommerfeld M., Hu Q. (2013). A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology*. 129: 289-295.

The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference
November 23-25, 2017 Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand

- Wu H., Miao X. (2014). Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource Technology*. 170: 421-427.
- Ying L.M., Kang-Sen, Shi-Chun S., Dao-Zhan Y. (2001). Effect of light intensity on the total lipid and fatty acid composition of six strains of Marine diatoms. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 19: 249-254.

