

การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีปริมาณลิพิดสูง
SCREENING OF HIGH LIPID ACCUMULATING
GREEN ALGAE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2561
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SCREENING OF HIGH LIPID ACCUMULATING GREEN ALGAE



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

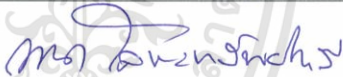
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในเท่านั้น อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีปริมาณลิพิดสูง Screening of high Lipid accumulating green algae
ชื่อนักศึกษา	ชลิตา หอมจันทร์ รหัสประจำตัว 58050874 ชุตินันท์ เมาลี รหัสประจำตัว 58050875 รุ่งทิพย์ ศิริพิพัฒน์ไพสิฐ รหัสประจำตัว 58050962
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีปริมาณลิพิดสูง		
ชื่อนักศึกษา	ชลิตา หอมจันทร์	รหัสประจำตัว	58050874
	ชุตินันท์ เมาลี	รหัสประจำตัว	58050875
	รุ่งทิพย์ ศิริพิพัฒน์ไพสิฐ	รหัสประจำตัว	58050962
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์		

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์ในการคัดกรองและคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการสะสมลิพิด และศึกษาผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) ต่อการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก จากการทดลองพบว่า ในจำนวนสาหร่ายสีเขียวทั้งหมด 22 สายพันธุ์ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. Cirgreen มีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงที่สุดทั้งภายใต้สภาวะปกติและภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจน สาหร่าย *Chlorella* sp. Cirgreen มีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 28.2 ± 0.6 และ 26.8 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ และ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าปริมาณลิพิดทั้งหมดของเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ 15-20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ อายุของเซลล์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณและการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียว สาหร่าย *Chlorella* sp. Cirgreen ที่มีอายุเซลล์ 96 ชั่วโมง มีการสะสมลิพิดทั้งหมดสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สาหร่าย *Chlorella* sp. Cirgreen มีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 31.6 ± 1.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และมีการสะสมลิพิดทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 0.281 ± 0.019 กรัมต่อลิตร ในเซลล์ที่มีอายุเซลล์ 96 ชั่วโมงและบ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ สุดท้าย ภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตรเจนและความเครียดจากความเค็ม สาหร่ายมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้น และมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวลดลงอย่างเห็นได้ชัด

คำสำคัญ : สาหร่ายสีเขียว, ลิพิด, การขาดไนโตรเจน, โซเดียมคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Screening of high Lipid accumulating green algae		
Students	Chalita	Homjun	Student ID 58050874
	Chutinun	Maolee	Student ID 58050875
	Rungtip	Siripipatpaisit	Student ID 58050962
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2018		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch		

Abstract

The purposes of this study were to screen and select the potential green algae for lipid accumulation and investigate the effect of ammonium chloride and sodium chloride concentrations in Tris acetate phosphate (TAP) medium on lipid accumulation of the selected green alga. The result showed that among 22 green algal strains, *Chlorella* sp. Cirgreen showed the highest lipid content under normal and nitrogen-deprived conditions. The highest total lipid content of *Chlorella* sp. Cirgreen with 28.2 ± 0.6 and 26.8 ± 0.2 % (w/w) was obtained in cells incubated in TAP containing 0.7 mM ammonium chloride and 1 M sodium chloride, respectively. These total lipid contents were 15-20 % higher than that of cells incubated in normal TAP medium. In addition, cell age is one of factors affecting lipid accumulation in green algae. *Chlorella* sp. Cirgreen with 96 h of cell age showed the highest total lipid content compared to cultures with 24, 48 and 72 h of cell ages. The highest lipid content and lipid accumulation with 31.6 ± 1.9 % (w/w) and 0.281 ± 0.019 g L⁻¹ were found in cells with 96 h of cell age incubated in TAP containing 0.7 mM ammonium chloride. Finally, an obvious increase in saturated fatty acid contents and a significant decrease in unsaturated fatty acid contents were found under nitrogen limitation and salt stress conditions.

Keywords : Green algae, Lipid, Nitrogen deprivation, Sodium Chloride

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้คงไม่อาจสำเร็จลงอย่างสมบูรณ์ได้ หากขาดความอนุเคราะห์จากท่าน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของข้าพเจ้า ทำให้ข้าพเจ้าได้หัวข้อในการทำโครงการพิเศษและให้ข้อมูลพร้อมคำแนะนำต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งตลอดจนการกำหนดกรอบเวลาในการนำเสนอความคืบหน้าของผลงาน ทั้งนี้ถือเป็นแรงกระตุ้นให้แก่วิชาพจนานุกรมยิ่งให้มีความกระตือรือร้นอยู่เสมอ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ด้านวิชาการ เพื่อเป็นแนวทางการศึกษา ให้คำชี้แนะและข้อสังเกตต่าง ๆ ทำให้รู้จักไตร่ตรองปัญหาอย่างรอบคอบมากยิ่งขึ้น ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนที่ร่วมทำโครงการพิเศษนี้ และเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงการพิเศษนี้ด้วย ที่คอยเป็นกำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุนซึ่งกันและกันมาตลอดระยะเวลา ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดา ที่มีอุปการะคุณ ซึ่งท่านช่วยสนับสนุนในด้านการศึกษแก่ข้าพเจ้า เป็นแรงผลักดันและเป็นกำลังใจหลักสำคัญ หากโครงการพิเศษฉบับนี้มีคุณค่าทางการศึกษาตลอดจนเป็นประโยชน์ทางการศึกษา ข้าพเจ้าขอยกความดีทั้งหมดแต่ท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ คณาจารย์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงการพิเศษทุกท่าน บิดาและมารดา ถ้าหากโครงการพิเศษฉบับนี้มีข้อผิดพลาดหรือบกพร่องประการใดไป ข้าพเจ้าขอน้อมรับความผิดพลาดไว้ ณ โอกาสนี้

ชลิตา หอมจันทร์
ชุตินันท์ เมาลี
รุ่งทิพย์ ศิริพิพัฒน์ไพสิฐ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 สาหร่ายสีเขียว	3
2.1.1 คุณลักษณะของสาหร่ายสีเขียว	3
2.1.2 การจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียว	4
2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	5
2.2.1 ปัจจัยทางกายภาพ	5
2.2.2 ปัจจัยทางเคมี	6
2.3 ลิพิด	7
2.3.1 ชนิดและการจัดจำแนกของลิพิด	8
2.3.2 ชนิดและการจัดจำแนกกรดไขมัน	9
2.3.3 กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว	10
2.4 การสกัดลิพิดจากสาหร่ายสีเขียว	11
2.5 ประโยชน์ของสาหร่ายสีเขียว	12
2.5.1 ผลิตเป็นอาหารเสริม	12
2.5.2 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร	13
2.5.3 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง	13
2.5.4 ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อม	14
2.5.5 ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร	14
2.5.6 ผลิตภัณฑ์และอาหารเสริมสุขภาพ	14
2.5.7 ผลิตเป็นน้ำมันเชื้อเพลิง	15
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง	18
3.2 สารเคมี	19
3.3 อุปกรณ์	20
3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว	21
3.5 วิธีการสกัดลิพิดจากสาหร่ายสีเขียว	21
3.6 วิธีการศึกษาคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวในสภาวะปกติและสภาวะการขาดไนโตรเจน	22
3.7 วิธีการศึกษาการเพิ่มปริมาณลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในสภาวะที่แปรผันปริมาณไนโตรเจนและโซเดียมคลอไรด์	22
3.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	22
3.9 วิธีการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน	23
3.10 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ	23
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	24
4.1 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีปริมาณลิพิดสะสมสูงภายใต้สภาวะปกติและสภาวะการขาดไนโตรเจน	24
4.2 ผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณลิพิดของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์	27
4.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก	29
4.4 ผลการศึกษาปริมาณการสะสมลิพิดของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่มีอายุเซลล์ต่างๆ	30
4.5 ผลการศึกษาปริมาณลิพิด ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในสภาวะที่คัดเลือก	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง	18
4.1 ปริมาณลิวติพิดและการสะสมลิวติพิดในสาหร่ายสีเขียวจำนวน 22 สายพันธุ์	24
4.2 ปริมาณลิวติพิดและการสะสมลิวติพิดในสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen, <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 และ <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ภายใต้สภาวะปกติและสภาวะการขาดไนโตรเจน	26
4.3 ปริมาณลิวติพิดและการสะสมลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ภายใต้สภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์	27
4.4 ปริมาณลิวติพิดและการสะสมลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ภายใต้สภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	28
4.5 ปริมาณลิวติพิดและการสะสมลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่มีอายุเซลล์แตกต่างกัน	30
4.6 ปริมาณลิวติพิดและการสะสมลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่มีอายุ 96 ชั่วโมง ในอาหารชนิดต่างๆ	31
4.7 พื้นที่ได้กราฟของกรดไขมันที่พบในสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่บ่มในอาหารชนิดต่างๆ	33
4.8 ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในหน่วยร้อยละที่พบในสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่บ่มในอาหารชนิดต่างๆ	33
4.9 ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมที่พบในสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่บ่มในอาหารชนิดต่างๆ	34
ข-1 ปริมาณการสะสมลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียว 22 สายพันธุ์ในอาหาร TAP ปกติ	42
ข-2 ปริมาณการสะสมลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในอาหาร TAP ปกติและ TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน	43
ข-3 ปริมาณลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ในสภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์	43
ข-4 ปริมาณลิวติพิดของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ในสภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	44
ข-5 ปริมาณการสะสมลิวติพิดของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่มีอายุเซลล์ต่างๆ	44
ข-6 ปริมาณการสะสมลิวติพิดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ในสภาวะอาหารที่คัดเลือก	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การสังเคราะห์กรดไขมันในเซลล์พืชและสาหร่าย	10
4.1 ปริมาณลิพิดในสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen, <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 และ <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในสภาวะปกติในอาหาร TAP และสภาวะการขาดไนโตรเจนในอาหาร TAP-N	26
4.2 ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	29
ง-1 โครมาโตแกรมของชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ในสภาวะอาหารปกติ	53
ง-2 โครมาโตแกรมของชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์	54
ง-3 โครมาโตแกรมของชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirGreen ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันเชื้อเพลิงและแหล่งพลังงานส่วนใหญ่ได้มาจากแหล่งของทรัพยากรธรรมชาติ ได้แก่ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ และ ปิโตรเลียม ฯลฯ ทรัพยากรธรรมชาติเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณที่จำกัดและกำลังจะหมดไปในไม่ช้านี้ นอกจากนี้ การเผาไหม้ของแหล่งพลังงานทางธรรมชาติเหล่านี้ยังปลดปล่อยมลพิษและก๊าซเรือนกระจก อันจะเกิดสภาวะโลกร้อน (Global warming) ด้วยเหตุนี้มนุษย์จึงจำเป็นต้องสรรหาแหล่งพลังงานประเภทอื่นเพื่อนำมาทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงดั้งเดิม พลังงานทดแทนที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก คือ ไบโอดีเซล (Biodiesel) ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงที่ผลิตได้จากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ อ้อย ข้าวโพด น้ำมันพืชใช้แล้ว รวมถึงจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ สาหร่าย ยีสต์และเชื้อรา ฯลฯ ชีวมวลของสาหร่ายเป็นแหล่งทรัพยากรหนึ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซล เนื่องจาก เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ได้จากพืช ชีวมวลของสาหร่ายมีข้อดีหลายประการ คือ สาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าการเพาะปลูกพืช นอกจากนี้ การนำชีวมวลของสาหร่ายมาใช้ยังไม่ส่งผลกระทบต่อแหล่งอาหารของมนุษย์ เนื่องจาก ชีวมวลของสาหร่ายเป็นแหล่งพลังงานที่มีความปลอดภัย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ได้

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียวสามารถพบเห็นได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป สาหร่ายสีเขียวมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีลิวคีนเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมมเบรน สาหร่ายสีเขียวบางสายพันธุ์สามารถสะสมน้ำมันไว้ที่ถุงเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสามารถสะสมได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของมวลเซลล์ ปริมาณน้ำมันจะแปรผันตามสารอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การลดปริมาณไนโตรเจนและการเพิ่มปริมาณคาร์บอนในอาหารเลี้ยงสาหร่ายส่งผลต่อปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในเซลล์และเป็นการเพิ่มปริมาณการสะสมลิวคีนในเซลล์สาหร่ายได้อีกด้วย ดังนั้น โครงการพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการสะสมลิวคีนในปริมาณสูง และศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสะสมลิวคีนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเพื่อประยุกต์นำลิวคีนที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลสำหรับผลิตเป็นพลังงานทดแทนในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการสะสมลิพิดในปริมาณสูง
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียว ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์และอายุของเซลล์

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมลิพิดในปริมาณสูงจากสาหร่ายสีเขียว 22 สายพันธุ์ โดยใช้วิธีการสกัดลิพิดเพื่อเปรียบเทียบปริมาณลิพิดของสาหร่ายทั้งหมด โดยในขั้นตอนนี้จะแบ่งวิธีการดำเนินงานออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

(1.) เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 22 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว Tris-acetate phosphate (TAP) สูตรปกติและสูตรที่ไม่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งของไนโตรเจน

(2.) วิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดจากสาหร่ายโดยใช้วิธีการสกัดขั้นตอนเดียว (Single-step) ซึ่งดัดแปลงจาก Axelsson และ Gentili (2014) และคำนวณหาปริมาณลิพิดทั้งหมด (Total lipid content)

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกโดยมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

(1.) นำสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์

(2.) นำสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะอาหารเหลว Tris-acetate phosphate (TAP) สูตรปกติ และศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

3. ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสะสมลิพิดได้ในปริมาณสูง
2. ทราบปัจจัยและสภาวะเหมาะสมที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพ
3. ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยสามารถนำไปวิจัยพัฒนากระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ จัดเป็นพืชชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์ แต่ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้นและใบ สาหร่ายสีเขียวมีขนาดตั้งแต่ เล็กมาก (Microalgae) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เดี่ยวที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ไปจนถึงที่มีขนาดใหญ่ (Macroalgae) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เป็นจำนวนมากและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สาหร่ายมีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง โดยมีส่วนที่คล้ายราก คล้ายลำต้น และคล้ายใบรวม เรียกว่า “ทาลัส (Thallus)” สาหร่ายสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในแหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำเค็มหรืออาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ตลอดจนมีบทบาทเป็นผู้ผลิตขั้นต้นของระบบนิเวศ สาหร่ายสามารถสังเคราะห์แสงและผลิตออกซิเจนให้กับบรรยากาศ ซึ่งออกซิเจนจำเป็นต่อการหายใจของสิ่งมีชีวิตบนโลก สาหร่ายสีเขียวประกอบไปด้วยโครงสร้าง 3 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ ผนังเซลล์ นิวเคลียส และไซโตพลาสซึม สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะรูปร่างหลากหลายแบบและมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สาหร่ายจัดจำแนกออกเป็น 9 ดิวิชัน คือ Cyanophyta, Chlorophyta, Charophyta, Chrysophyta, Cryptophyta, Euglenophyta, Phaeophyta, Pyrrophyta และ Rhodophyta ในปัจจุบัน มนุษย์นิยมนำเอาสาหร่ายมาบริโภค เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ให้พลังงานน้อย มีแร่ธาตุและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้ ยังมีการนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น ใช้เป็นยา ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตวุ้น อัลจิเนต และคาร์ราจีแนน ใช้บำบัดคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพและใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช เป็นต้น

2.1.1. คุณลักษณะของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) จัดอยู่ในอาณาจักรพืช สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ดิวิชัน Chlorophyta ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีความคล้ายคลึงกับพืชมากที่สุด บางชนิดอยู่ร่วมกับราเป็นไลเคนส์ (Lichens) และ ดิวิชัน Charophyceans ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวชั้นสูง และมีวิวัฒนาการต่อไปเป็นพืช โดยมีโครงสร้างที่ซับซ้อน โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะคล้ายพืชในแง่ของโครงสร้าง ผนังเซลล์และส่วนประกอบของสารสี คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ บี และแคโรทีน ส่วนใหญ่พบสาหร่ายสีเขียวในแหล่งน้ำจืดมากกว่าแหล่งน้ำเค็ม สาหร่ายสีเขียวใช้แฟลกเจลลา 2 เส้น ในการเคลื่อนที่ ลักษณะที่สำคัญของสาหร่ายสีเขียวมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การจัดเรียงตัวของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว เป็นแบบเซลล์เดี่ยว เป็นกลุ่มเซลล์ และต่อกันเป็นเส้นสาย

2. สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่มีผนังเซลล์ 2 ชั้น (แต่บางคลาสก็ไม่มีผนังเซลล์แต่มีเยื่อหุ้มแทนผนังชั้นนอกประกอบด้วยสารจำพวกเพคติน ส่วนผนังชั้นในประกอบด้วยสารจำพวกเซลลูโลส

3. สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นสารสีชนิดเดียวกับที่พบในกลุ่มพืชชั้นสูง

4. สาหร่ายสีเขียวมีแฟลกเจลลาอยู่ด้านหน้าของเซลล์ มีลักษณะคล้ายไส้ โดยมักพบในพวกที่เคลื่อนที่ได้เท่านั้น

5. สาหร่ายสีเขียวเก็บสะสมอาหารในรูปของแป้งไว้ในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่า “ไพเรโนยด์ (Pyrenoid)” แต่ถ้าหากไม่มีไพเรโนยด์สาหร่ายจะเก็บในรูปของน้ำมัน

6. ตำแหน่งของสารสีจะอยู่ในออร์แกเนลที่มีรูปร่างแน่นอนที่เรียกว่า “คลอโรพลาสต์” โดยคลอโรพลาสต์จะมีลักษณะรูปร่างต่างๆ เช่น รูปถ้วย รูปเกือกม้า เส้นตาข่าย เป็นวงรอบเซลล์ ขดเป็นเกลียว มีแฉกรูปดาว หรือเป็นแถบข้างเซลล์

2.1.2 การจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียว

Hossain และคณะ (2008) ศึกษาหลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกสาหร่ายออกเป็นหมวดหมู่โดยพิจารณาจากลักษณะต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ องค์ประกอบผนังเซลล์ (Cell wall) รังควัตถุ (Pigment) อาหารที่ถูกเก็บสะสมภายในเซลล์ (Stored food) และที่อยู่อาศัยนอกจากนี้ ยังจัดจำแนกสาหร่ายตามขนาด โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae) จัดเป็นกลุ่มสาหร่ายที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ เช่น สาหร่ายสีเขียว *Spirogyra* (สาหร่ายไถ) และสาหร่ายสีน้ำตาล *Macrocystis* ซึ่งสาหร่ายขนาดใหญ่ส่วนมากจะเป็นสาหร่ายทะเลที่ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงมากกว่า

2. สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) จัดเป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีขนาดเล็กมากๆ ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า จึงจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ในการมอง เช่น สาหร่ายสีเขียว *Spirulina* sp. และ *Chlorella* sp. สาหร่ายขนาดเล็กมีประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงคล้ายพืช เจริญเติบโตได้เร็วทั้งในน้ำเค็มและน้ำจืด มีวงจรชีวิตสั้นและใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย กลุ่มสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กมีความหลากหลายมาก ซึ่งสามารถจัดแบ่งตามลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ ดังนี้

(1.) สาหร่ายเซลล์เดี่ยว (Unicellular algae) สาหร่ายเซลล์เดี่ยวสามารถพบลอยในน้ำเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า น้ำเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “แพลงก์ตอนพืช” มีลักษณะเซลล์รูปร่างวงรีจนถึงทรงกลม มีคลอโรฟิลล์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบต่างๆ อยู่ภายในเซลล์ อาจมีแฟลกเจลลาหลายเส้นใช้ในการเคลื่อนที่ มีความหลากหลายมากที่สุดในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ตัวอย่างของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว ได้แก่ สาหร่าย *Chlamydomonas* sp.

ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่นำมาใช้ในการศึกษาด้านชีววิทยาโมเลกุลเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาและการเพิ่มจำนวนพันธุ์กรรมในคลอโรพลาสต์ และสาหร่าย *Chlorella* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่เก็บสะสมโปรตีนไวสูง จึงถูกนำมาใช้ผลิตเป็นอาหารเสริม

(2.) สาหร่ายที่มีลักษณะการอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (Colonial algae) สาหร่ายชนิดนี้

เกิดจากการรวมกันของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิดเดียวกัน หลากๆ เซลล์ มาเกาะกลุ่มกันเป็นโคโลนีในรูปทรงต่างๆ เช่น สาหร่าย *Gonium* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Volvox* sp. เป็นต้น

(3.) สาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Filamentous algae) สาหร่ายชนิดนี้สามารถ

พบลอยในแหล่งน้ำหรือยึดเกาะอยู่กับสิ่งใต้น้ำ มีลักษณะเป็นเส้นสาย เกิดจากการนำเซลล์เดี่ยวของสาหร่ายมาเรียงต่อกันเป็นสายยาว สาหร่ายสีเขียวดังกล่าวจะมีคลอโรพลาสต์รูปร่างแตกต่างกันไป

2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

ปัจจุบัน มนุษย์ให้ความสนใจศึกษาสาหร่ายมากขึ้น เนื่องจากการนำสาหร่ายสีเขียวนาขนาดเล็กไปประยุกต์ก่อให้เกิดประโยชน์ในหลายด้านๆ เช่น เป็นแหล่งพลังงานทดแทน เป็นอาหารเสริมสุขภาพ ผลิตปุ๋ยชีวภาพ บำบัดน้ำเสีย ตลอดจนผลผลิตสาหร่ายเป็นแปรรูปผลิตภัณฑ์อื่นๆ มีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวนาขนาดเล็กมากขึ้น สาหร่ายที่นิยมเพาะเลี้ยง เช่น *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* และ *Botryococcus* เป็นต้น การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็นแหล่งของน้ำมันนั้น ควรนำสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ให้ปริมาณน้ำมันสูงและง่ายต่อการเก็บเกี่ยว ปริมาณลิพิดและกรดไขมันของสาหร่าย แปรผันตามปริมาณสารอาหารและสภาวะในการเลี้ยงสาหร่าย

2.2.1 ปัจจัยทางกายภาพ (Juneja et al., 2013)

ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว มีดังนี้

1. แสง แสงเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อสาหร่ายได้รับแสงที่มีความเข้มสูงเกินจุดอิ่มตัว ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานในคลอโรพลาสต์และการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ พลังงานของแสงมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ในเซลล์สาหร่ายเช่นกัน แสงสีน้ำเงินช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ แสงสีแดงช่วยมีส่วนร่วมในการสังเคราะห์สารประเภทคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ในกรณีที่ รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 215 – 400 นาโนเมตร สร้างความเสียหาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยรังสี UV-B ที่ความยาวคลื่น 215-380 นาโนเมตร มีผลโดยตรงต่อโครงสร้างดีเอ็นเอของเซลล์

2. อุณหภูมิ อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโต การดูดซึมธาตุอาหารและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ตลอดจนกิจกรรมต่างๆ ส่งผลต่อโครงสร้างขององค์ประกอบภายในเซลล์โดยเฉพาะ โปรตีนและไขมัน อุณหภูมิมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยับยั้งของแสง (Photoinhibition) ที่อุณหภูมิต่ำ สาหร่ายมีการขนส่งอิเล็กตรอนลดลง ทำให้อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้การดูดซึมธาตุอาหารของสาหร่ายเพิ่มขึ้นแต่หากอุณหภูมิสูงเกินไป จะจำกัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย รวมถึงลดประสิทธิภาพของการดูดซึมคาร์บอนและไนโตรเจนอีกด้วย

3. น้ำ น้ำมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย กล่าวคือสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำจะมีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำนิ่ง เนื่องจากไอออนสามารถผ่านและแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้แต่ต้องขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของธาตุอาหารด้วย

4. พีเอช พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เนื่องจากพีเอชเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ รวมถึงสารอาหารที่จำเป็น พีเอชสามารถส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของสาหร่าย เมื่อมีการดูดซึมอนินทรีย์คาร์บอนจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าพีเอชเป็นกลาง การปรับเปลี่ยนค่าพีเอชอาจจะส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของสาหร่าย ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น จะลดความสามารถของการใช้คาร์บอนและยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย นอกจากนี้ ยังมีผลทำให้การแลกเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดช้าลง ในกรณีที่ค่าพีเอชมีความเป็นเบสจะเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับผนังเซลล์ สภาวะความเป็นเบสส่งผลกระทบต่อการสะสมไตรกลีเซอไรด์และการผลิตในชั้นผนังเซลล์ได้น้อยกว่า

2.2.2 ปัจจัยทางเคมี

ปัจจัยทางเคมีเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการหรือความเข้มข้นของธาตุอาหาร ถ้าสาหร่ายอยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารสูงๆ จะทำให้สามารถเพิ่มอัตราการดูดซึมของธาตุอาหารได้มากขึ้น ปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวมีดังนี้

1. คาร์บอน คาร์บอนเป็นสารอาหารสำคัญที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของสาหร่าย คาร์บอนที่ได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจและเป็นโครงสร้างของเซลล์สำหรับการแบ่งเซลล์ สาหร่ายจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งอาจใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนเนตและไบคาร์บอนเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ไนโตรเจน ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโปรตีน โปรตีนบางชนิดมีหน้าที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง บางชนิดสร้างรงควัตถุและบางชนิดช่วยเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ไนโตรเจนคิดเป็นร้อยละ 7-20 ของน้ำหนักแห้ง เมื่อขาดแหล่งไนโตรเจน สาหร่ายจะสร้างสารประกอบคาร์บอนอื่นขึ้นมาทดแทน เช่น สังเคราะห์และสะสมลิพิดหรือแป้งเพิ่มขึ้น

3. ฟอสฟอรัส โดยทั่วไป สาหร่ายขนาดเล็กมีฟอสฟอรัส 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ฟอสฟอรัสเกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน กระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิกของสาหร่าย ถ้าขาดฟอสฟอรัสจะให้ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์เอ อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินลดลง การจำกัดปริมาณฟอสฟอรัสทำให้สาหร่ายเกิดการสะสมของลิพิดมากขึ้น

4. เหล็กไอออน เหล็กไอออนทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุ การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการหายใจ ถ้าขาดเหล็กไอออนจะทำให้การสังเคราะห์แสงและปริมาณอาหารสะสมลดลง (Lin *et al.*, 2012)

5. ความเค็ม ในสภาวะเครียดจากเกลือ สาหร่ายเกิดการสะสมลิพิดมากขึ้น จากรายงาน พบว่า ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ ช่วยเพิ่มปริมาณการสะสมลิพิดและไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์ของสาหร่ายได้โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นถึง 67 เปอร์เซ็นต์และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Takagi *et al.*, 2006)

2.3 ลิพิด

ลิพิด (Lipid) คือ สารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน และอาจมีธาตุอื่นอีกคือไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยทั่วไป ลิพิดจะไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar) เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และลิพิดที่ละลายน้ำได้จะประกอบด้วยสารจำพวกที่มีขั้ว (Polar) เนื่องจากลิพิดบางชนิดมีโมเลกุลเป็นเส้นตรงอะลิฟาติก (Aliphatic) ในขณะที่ ลิพิดบางชนิดมีโครงสร้างเป็นวงแหวนที่เรียกว่า อะโรมาติก (Aromatic) ดังที่กล่าวไปข้างต้น โมเลกุลของลิพิดมีสองส่วนทั้งแบบที่มีขั้วและแบบไม่มีขั้ว จึงทำให้ลิพิดสามารถละลายได้ดีทั้งในตัวทำละลายมีขั้ว เช่น น้ำ และละลายในไม่มีขั้ว เช่น น้ำมัน โมเลกุลของลิพิดที่ประกอบด้วยมีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกันเหล่านี้นี้เรียกว่า Amphiphilic นอกจากนี้ ลิพิดยังทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียและพืชชั้นสูง (McDonald *et al.*, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ชนิดและการจัดจำแนกของลิพิด (นัยนา, 2553)

ลิพิดสามารถจัดจำแนกเป็น 4 ชนิด ดังนี้

1. ลิพิดเชิงเดี่ยว (Simple lipid) คือ ลิพิดที่ประกอบด้วยกรดไขมันและแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปจะพบลิพิดอย่างง่ายในรูปไตรกลีเซอไรด์มากที่สุด ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ประกอบด้วยกรดไขมัน 3 โมเลกุล และกลีเซอรอลที่เป็นสารประเภทแอลกอฮอล์ 1 โมเลกุล ไตรกลีเซอไรด์มีทั้งสถานะของแข็งและของเหลวที่อุณหภูมิห้อง โดยไตรกลีเซอไรด์ที่มีสถานะของแข็งจะพบในรูปของไขมัน (Fat) ที่ได้จากสัตว์ และไตรกลีเซอไรด์ที่มีสถานะของเหลวจะพบในรูปของน้ำมัน (Oil) ที่ได้มาจากพืช เมื่อกรดไขมันรวมตัวกับแอลกอฮอล์ที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนและเป็นสายยาวจะได้ลิพิดที่ไม่ละลายน้ำ เรียกว่า ไช (wax) หรือ ขี้ผึ้ง ซึ่งพบได้ตามผิวหนัง ผลไม้และใบไม้บางชนิด ไชมีลักษณะแข็งเมื่อเย็น และอ่อนตัวได้หากได้รับความร้อน

2. ลิพิดเชิงประกอบ (Compound lipid) คือ ลิพิดที่มีสารประกอบอื่นเข้ามาในโมเลกุลของลิพิด นอกเหนือจากกรดไขมันและแอลกอฮอล์ ลิพิดเชิงประกอบสามารถแบ่งได้ 3 ชนิดใหญ่ๆ ดังนี้

2.1 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) คือ เป็นลิพิดที่มีโครงสร้างคล้ายกับไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยไขมันธรรมดา รวมอยู่กับการเพิ่มฟอสเฟต ฟอสโฟลิพิดส่วนใหญ่สามารถพบในเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชและสัตว์ ฟอสโฟลิพิดมีหลายชนิด เช่น ฟอสฟาติดีลโคลีน ฟอสฟาติดีลเลทาโนลามีน เป็นต้น

2.2 ไกลโคลิพิด (Glycolipid) คือ ลิพิดที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลรวมอยู่ด้วย ตัวอย่างชนิดที่สำคัญ เช่น เซเรโบไรด์ แองกลิโอไซด์ ซึ่งพบมากในเยื่อหุ้มเซลล์สมอง เนื้อเยื่อประสาท

2.3 ลิพิดเชิงประกอบชนิดอื่นๆ คือ สารประกอบเชิงซ้อนของลิพิดและสารอื่นๆ เช่น ลิโปโปรตีน (Lipoprotein) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของลิพิดและโปรตีน ซัลโฟลิพิด (Sulfolipid) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของลิพิดและซัลเฟอร์ เป็นต้น

3. อนุพันธุ์ลิพิด (Derived lipid) คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของลิพิดอย่างง่ายหรือลิพิดเชิงประกอบซึ่งยังคงมีคุณสมบัติของความเป็นลิพิดอยู่ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล มอนอกลิเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ รวมไปถึงแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

4. ลิพิดอื่นๆ (Miscellaneous lipid) คือ ลิพิดที่ไม่สามารถจัดจำแนกเข้ากับกลุ่มอื่นได้ ได้แก่ สเตอรอยด์ (Steroid) เทอร์พีน (Terpene) วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี วิตามินเค ไอโคซานอยด์ (Eicosanoid) พรอสตาแกลนดิน (Prostaglandin) โดยสเตอรอยด์เป็นองค์ประกอบของฮอร์โมนเพศหญิงและเพศชาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ชนิดและการจัดจำแนกกรดไขมัน

กรดไขมัน (Fatty Acid) เป็นสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนแบบไม่มีขั้ว (Non-polar) ที่มีจำนวนคาร์บอน 4 – 24 อะตอม ปลายข้างหนึ่งของกรดไขมันเป็นหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) (R-COOH) กรดไขมันที่พบในลิพิดของพืชและสัตว์ชั้นสูงมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ อยู่ระหว่าง 14 – 22 อะตอม โดยเฉพาะ C16 และ C18 พบมากที่สุด โดยอาจเป็นโซ่ยาวที่อิ่มตัว ไม่มีพันธะคู่ (Saturated fatty acid) หรือไม่อิ่มตัว คือ มีพันธะคู่ 1 คู่ (Monounsaturated fatty acid) หรือมากกว่า 1 พันธะ (Polyunsaturated fatty acid) ซึ่งแต่ละชนิดมีความยาวของสายโซ่ ตำแหน่ง และจำนวนของพันธะเดี่ยวหรือคู่แตกต่างกันจึงมีความอิ่มตัวไม่เท่ากัน ในเซลล์จะไม่พบกรดไขมันอยู่ในรูปอิสระแต่จะอยู่รวมกันเป็นลิพิดด้วยพันธะโควาเลนต์ พันธะเหล่านี้จะสลายด้วยเอนไซม์หรือใช้สารเคมี

กรดไขมัน สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามความจำเป็นของร่างกาย คือ

1. กรดไขมันไม่จำเป็น (Nonessential fatty acid, NFA) คือ กรดไขมันที่ร่างกายสัตว์สังเคราะห์ขึ้นได้เอง เช่น Palmitoleic acid และ Oleic acid พบมากที่สุดในไขมันสัตว์ โดยสังเคราะห์จากโคเอนไซม์และเอนไซม์ของกรดไขมันอิ่มตัวที่ตับและเนื้อเยื่อไขมัน

2. กรดไขมันจำเป็น (Essential fatty acid, EFA) คือ กรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้แต่มีความสำคัญต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ ได้แก่ Linoleic acid, Linolenic acid และ Arachidonic acid (กลุ่มโอเมกา-3 หรือ โอเมกา-6) พบมากในน้ำมันพืช ยกเว้นน้ำมันมะพร้าวและในน้ำมันปลา

กรดไขมันมีคุณสมบัติดังนี้

1. กรดไขมันในสัตว์(ยกเว้นปลา) จะมีความอิ่มตัวสูงและมีโคเลสเตอรอล ส่วนในพืช (ยกเว้นน้ำมันมะพร้าว) จะมีความอิ่มตัวต่ำและไม่มีโคเลสเตอรอล

2. พันธะคู่ในกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะอยู่ในคอนฟิगरชันแบบซิส ถ้ามีตั้งแต่ 2 พันธะขึ้นไปจะเป็นแบบนอนคอนจูเกต (Nonconjugated double bond, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) ซึ่งมีหมู่เมทิลีน (CH_2) คั่นกลาง

3. กรดไขมันไม่อิ่มตัวมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่ากรดไขมันอิ่มตัว จุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะสูงขึ้นเมื่อความยาวโซ่เพิ่มขึ้น

4. กรดไขมันอิ่มตัวมีเฉพาะพันธะเดี่ยวที่มีการหมุนเสรี (Freedom of rotation) ทำให้มีโครงสร้างแบบซิกแซกในแนวตรง ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ที่ หมุนไม่ได้ ทำให้สายโซ่แข็งเกร็ง คอนฟิगरชันแบบซิสของพันธะคู่ทำให้สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนงอและหดสั้นลง คอนฟิกละชันแบบทรานส์มีโครงสร้างเหมือนกรดไขมันอิ่มตัว และคอนฟิगरชันแบบซิสเสถียรน้อยกว่าแบบทรานส์ ถ้าให้ความร้อนและมีตัวเร่งปฏิกิริยาจะสามารถเปลี่ยนเป็นแบบทรานส์ได้

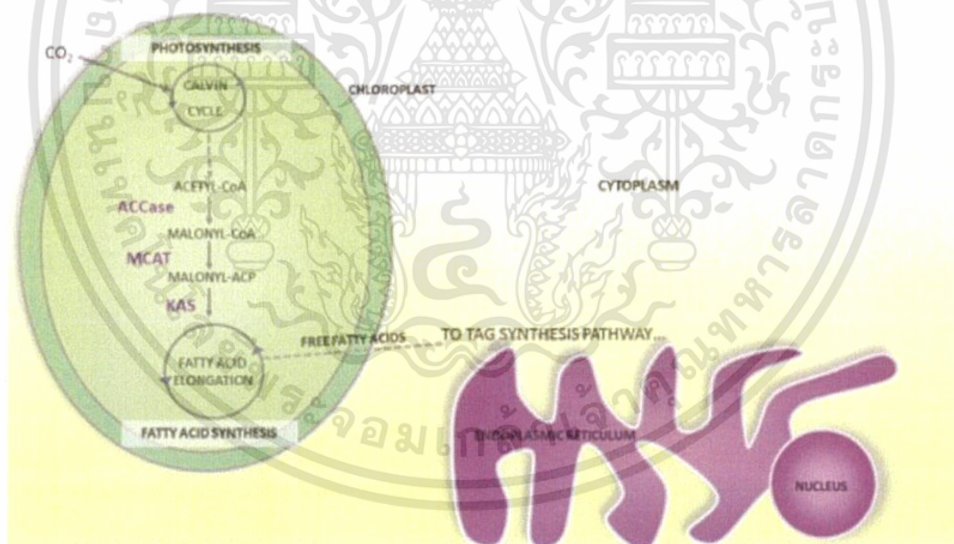
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาว C16 – C18 ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่เกลือโซเดียมและเกลือโพแทสเซียมของกรดไขมันจะเรียกว่าสบู่ กรดไขมันสามารถสร้างไมเซลล์ (Micelle) ในน้ำได้ด้วยแรง Hydrophobic

6. กรดไขมันในสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในรูปเอสเทอร์ (Ester) หรือเอไมด์ (Amide) และกรดไขมันอิสระมีค่า pKa ประมาณ 4.85 จึงสามารถแตกตัวได้ที่พีเอชที่พบในสิ่งมีชีวิตพบปริมาณน้อยในพลาสมาและสามารถจับกับโปรตีนอัลบูมินได้

2.3.3 กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายมีอาหารสะสมเป็นแป้ง ลิพิดและกลีเซอรอล ซึ่งลิพิดส่วนใหญ่สะสมในรูปไตรเอซิลกลีเซอไรด์ เซลล์พืชจะสังเคราะห์กรดไขมันในคลอโรพลาสต์ การสังเคราะห์กรดไขมันจะใช้สารตัวกลางที่สำคัญคือ อะซีทิล โคเอ (Acetyl CoA) ซึ่งได้มาจากการย่อยสลายสารประเภทคาร์โบไฮเดรตจากวิถีไกลโคไลซิส นอกจากนี้ อะซีทิล โคเอ ยังได้มาจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) ผ่านสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซิส คือ 3-ฟอสโฟกลีเซอเรต (3-phosphoglycerate) การสังเคราะห์กรดไขมันในพืชสรุปได้ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์กรดไขมันในเซลล์พืชและสาหร่าย (Bilbao, 2017)

โดยทั่วไป การสังเคราะห์กรดไขมันเริ่มต้นจากสารตั้งต้น อะซีทิล โคเอ ที่ได้มาจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในวัฏจักรไกลโคไลซิส นอกจากนี้ ในพืชยังได้อะซีทิล โคเอ มาจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัฏจักรคัลวิน การสังเคราะห์กรดไขมันเริ่มที่ Acetyl CoA ซึ่งมีคาร์บอน 2 อะตอม ทำปฏิกิริยากับ Malonyl CoA ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งสร้างมาจาก Acetyl CoA ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไฮโดรเจนคาร์บอนเตตระและเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Acetyl CoA

Carboxylase (ACCase) เมื่อ Acetyl CoA ทำปฏิกิริยากับ Malonyl CoA จะมีการปลดปล่อยคาร์บอนอะตอมจำนวน 1 อะตอมในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโมเลกุลของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 4 อะตอม ในรอบที่ 2 กรดไขมันที่มีคาร์บอน 4 อะตอมจะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น Malonyl CoA อีก 1 โมเลกุลและปลดปล่อยคาร์บอนอะตอมออกมาในรูปคาร์บอนไดออกไซด์และได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 6 อะตอม การสังเคราะห์กรดไขมันจะดำเนินเป็นรอบๆจนกว่าจะได้กรดไขมันที่มีคาร์บอนอะตอมตามที่ต้องการ (สร้อยญา, 2557) ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวจะได้กรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 18 อะตอมและไม่มีพันธะคู่ในโมเลกุล กลไกทั้งหมดส่วนมากเกิดขึ้นที่คลอโรพลาสต์ของเซลล์สาหร่าย นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการกรดไขมันมีคาร์บอนมากกว่า 18 อะตอม และอาจมีการกรดไขมันที่มีพันธะคู่หลากหลายชนิด (Hu *et al.*, 2004)

โดยทั่วไปแล้ว สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น สารอาหาร ความเค็ม แสง และอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย แสงและสารอาหารมีผลต่อชนิดและการสังเคราะห์กรดไขมัน (Lang *et al.*, 2011) กรดไขมันที่พบเป็นองค์ประกอบที่พบในสาหร่ายสีเขียวประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบ ได้แก่ Docosahexaenoic acid (DHA), Eicosapentaenoic acid (EPA) สาหร่ายกลุ่ม Dinophyta, Haptophyta และ Euglenoids มีปริมาณกรดไขมัน DHA ที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียว กลุ่ม Chlorophyta กรดไขมัน EPA พบในสาหร่ายกลุ่ม Eustigmatophyceae, Glaucophyta, Xanthophyceae และ Rhodophyta ส่วนกรดไขมัน Arachidonic acid (ARA) พบมากที่สุดในกลุ่มสาหร่าย Rhodophyta โดยมีปริมาณ ARA มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมัน γ -Linolenic acid (GLA) เป็นกรดไขมันที่พบมากในสาหร่ายกลุ่ม Prasinophytes และ Streptophyta และสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม Chlorophyceae โดยพบกว่า 29.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม Chlorophyceae ได้แก่ สาหร่าย *Chlorella* sp. โดยให้แสงสลับกับเพาะเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบองค์ประกอบของกรดไขมัน คือ Palmitic acid, Linoleic acid, α -Linolenic acid แต่ไม่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายพันธะ (Highly unsaturated fatty acids) (Pratoomyot *et al.*, 2005)

2.4 การสกัดลิพิดจากสาหร่ายสีเขียว

การสกัดลิพิดจากสาหร่ายนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการสกัดลิพิดโดยใช้ตัวทำละลาย ซึ่งสามารถแบ่งตามชนิดของตัวทำละลายได้ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วิธี Folch (Folch *et al.*, 1956)

วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมโดยให้ผลการสกัดลิพิดที่มีประสิทธิภาพแต่การสกัดวิธีนี้อาจจะมีสารอื่นปนมาด้วย โดยจะใช้ 0.9 เปอร์เซนต์ของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้สารที่ไม่ใช่ลิพิดแยกชั้นก่อน แล้วจึงสกัดไขมันด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1

2. วิธี Bligh and dyer (Bligh *et al.*, 1959)

วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและใช้เวลารวดเร็วโดยสามารถทำได้ในเวลาประมาณ 10 นาที การสกัดวิธีนี้ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยเหมาะกับตัวอย่างที่ปริมาณลิพิดสูง โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ ตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2

3. วิธี Soxhlet (Krishan *et al.*, 2014)

วิธีการสกัดแบบซ็อกเล็ตเป็นอีกวิธีที่นิยมใช้ในการสกัด โดยใช้วิธีการแยกสารจากการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม วิธีนี้เป็นการสกัดสารที่ต้องการออกของผสม นิยมใช้สกัดลิพิดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายภายใต้ความร้อน ข้อเด่นของวิธีนี้คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดจะใช้ซ้ำไปมาอย่างต่อเนื่อง เป็นการประหยัดตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน และเอทานอล จากการทดลองในการสกัดลิพิดตามเวลาที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1 ถึง 5 ชั่วโมง การวิเคราะห์พบว่า เมื่อใช้คลอโรฟอร์ม เฮกเซน และเอทานอลเป็นตัวทำละลายพบว่า การสกัดลิพิดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวให้ประสิทธิภาพในการสกัดลิพิดได้มากกว่า 10 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ เมื่อใช้ตัวทำละลายผสมจะทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้น โดยตัวทำละลายผสมที่ให้ผลดีที่สุดคือตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์มและเอทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

4. วิธีการสกัดไขมันขั้นตอนเดียว (Single-step procedure) (Axelsson *et al.*, 2014)

วิธีการนี้เป็นวิธีที่พัฒนามาเพื่อสกัดลิพิดทั้งหมดจากสาหร่ายสีเขียวด้วยขั้นตอนเดียว (Single-step procedure) วิธีการสกัดไขมันขั้นตอนเดียว พัฒนามาจากวิธีการของ Folch และคณะ (1957) และเป็นวิธีที่ให้เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยว (% Recovery) ของปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด วิธีการสกัดลิพิดขั้นตอนเดียวจะเติมตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.73 เปอร์เซนต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g เป็นเวลา 2 นาที แล้วเก็บส่วนที่อยู่ด้านล่างไปวิเคราะห์ปริมาณลิพิดทั้งหมดต่อไป วิธีการสกัดลิพิดขั้นตอนเดียวเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่สามารถสกัดลิพิดจากตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ 1 ตัวอย่างจะต้องสกัดซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง

2.5 ประโยชน์ของสาหร่ายสีเขียว

2.5.1 ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

มีรายงาน พบการผลิตกรดไขมันในสาหร่าย *Schizochytrium* sp. สาหร่ายชนิดนี้เป็นสาหร่ายทะเลขนาดเล็กที่มีการเพาะเลี้ยงกันในระดับอุตสาหกรรมมานานและอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ

ไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน Decosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3) และ Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) เซลล์แห้งของสาหร่ายชนิดนี้ มี DHA ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ น้ำหนัก ทำให้เป็นวัตถุดิบที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สาหร่ายชนิดนี้ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ในกลุ่ม โอเมก้า 3 โดยเฉพาะ DHA ในปริมาณสูง ผลิตกรดไขมันจากสาหร่ายยังเป็นทางเลือกหนึ่งในการ ทดแทนการผลิตกรดไขมันจากสัตว์ทะเล เนื่องจากสาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว สามารถเลี้ยง เพื่อขยายและคัดเลือกพันธุ์ในห้องปฏิบัติการได้และมีราคาถูกกว่ากรดไขมันที่ได้จากปลาทะเลต่างๆ นอกจากนี้ การผลิต DHA จาก *Schizochytrium* sp. สามารถทำได้ตลอดปีโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล สภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิประเทศ (food standard, 2016)

2.5.2 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

มนุษย์รู้จักนำสาหร่ายมาใช้เป็นอาหาร ในประเทศจีนและญี่ปุ่น ใช้สาหร่ายสีน้ำตาล กลุ่ม *Laminaria* และสาหร่ายสีแดงกลุ่ม *Porphyra* หรือที่เรียกกันว่า จิฉ่าย นำมาทำอาหารพวก แกงจืด จีนได้นำ *Chlorella* ผสมลงในชาซูบ น้ำผลไม้ บะหมี่และไอศกรีม ส่วนพวกสาหร่ายวุ้น สาหร่ายผมนางในบางจังหวัด นำมาบริโภคสดหรือลวกจิ้มน้ำพริก เป็นที่นิยมทั้งในแง่เป็นผักสลัดและ ส่วนประกอบในการปรุงอาหารอื่นๆ เนื่องจากมีรสชาติที่น่ารับประทาน ผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายที่สำคัญ ชนิดหนึ่งคือวุ้น (Agar) ซึ่งสกัดได้จากสาหร่ายสีแดง ประโยชน์ของวุ้นในอุตสาหกรรมอาหาร คือ ใช้เป็นอาหารได้โดยตรง หรือใช้ผสมในอาหารอื่นเพื่อปรับคุณภาพของอาหารนั้น หรือเป็นส่วนประกอบในการใช้ทำปlokของไส้กรอก ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความเสถียร ใช้เป็นส่วนผสมใน ไอศกรีม เนยแข็ง ครีมชีส มัสตาร์ด มายองเนส โยเกิร์ต พุดดิ้ง เชอร์เบต และมิลล์เชค ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความหนืดในซุบ แยม หรือเยลลี่ หรือใส่ในเบียร์ ไวน์ กาแฟ น้ำผลไม้เพื่อให้เกิดความใส ใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบต่างๆ เช่น ทำคุกกี้ ทำหน้าครีม แต่งหน้าเค้กหรือพาย ทำผิวเคลือบโดนัท หรือขนมอื่นๆ เพื่อป้องกันการระเหยแห้งของขนม นอกจากนี้ ใช้ผสมในลูกกวาด ท็อฟฟี่ หรือผลไม้ แช่อิ่มบางชนิด สำหรับประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหารของผลิตภัณฑ์สาหร่ายทะเลอื่นๆ ได้แก่ Carrageenan, Furcellaran และ Alginates สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางทั้ง ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ขนมปัง ผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาและแปะเปิดไก่ ตลอดจนอาหารแช่แข็งอื่นๆ

2.5.3 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

สาหร่ายสายพันธุ์ *Arthrospira* และ *Chlorella* เป็นสายพันธุ์ที่คุ้นเคยมากที่สุดในกลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลผิว สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องสำอางหลายชนิด เช่น ครีมลดริ้วรอย ผลิตภัณฑ์ดูแลความอ่อนเยาว์ ครีมกันแดดและผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม สาหร่ายบางสายพันธุ์ *Spirulina* ช่วยในการรักษาโรคผิวหนังได้ จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น เอกสารพบว่า เครื่องสำอางที่ผสมสาหร่ายและสารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทองช่วยให้ผิวพรรณดีขึ้นค่า ไม่่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริษัทหลายแห่งในประเทศไทยใช้สาหร่ายเกลียวทองเป็นเครื่องสำอางในรูปครีมบำรุงผิว ทั้งนี้สาหร่ายยังผลิตสาร Sporopollenin, Scytonemin และ Mycosporine เพื่อช่วยป้องกันรังสียูวีได้อีกด้วย สารสกัดที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหน้าและผิวพรรณต่างๆ ชนิดทั่วไปที่พบในสาหร่าย *Chondrus crispus*, *Alaria esculenta*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* และ *Dunaliella salina* ถูกนำมาใช้ในเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ความงามที่หลากหลาย (Spolaore et al., 2006)

2.5.4 ใช้ในด้านสิ่งแวดล้อม

การใช้สาหร่ายในการกำจัดน้ำเสียร่วมกับแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียจะทำการย่อยสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ที่มีอยู่ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ให้เป็นสารประกอบอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม ไนเตรต คาร์บอนไดออกไซด์ และเกลือแร่ต่างๆ ในสภาพการเกิดที่มีอากาศ (Aerobic) หรือไม่มีอากาศ (Anaerobic) จากนั้น สาหร่ายจะใช้สารประกอบเหล่านี้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ สำหรับสาหร่ายที่ได้จากกระบวนการกำจัดน้ำเสียอาจนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ยพืชสด หรือใช้ในการทำก๊าซชีวภาพได้ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เพาะเลี้ยงในมูลหมูผสมมูลไก่ที่มีการหมุนเวียนของสารอาหารแตกต่างกัน การผลิตสาหร่ายเกลียวทองจากน้ำทิ้ง โรงงานแปรงมันสำปะหลัง การเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทองจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำอัดลม เป็นต้น

2.5.5 ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวเป็นที่รู้จักกันดีอย่างแพร่หลายในแง่ของการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ จากงานวิจัยของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในน้ำข้าวบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียม ทำให้ข้าวเจริญเติบโต ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบในประเทศและให้ผลผลิตดี มีชื่อว่า *Anabaena siamensis*

2.5.6 ผลิตภัณฑ์และอาหารเสริมสุขภาพ

นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ทดลองใช้สาหร่ายเกลียวทองในการป้องกันรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคกระเพาะอาหาร ฯลฯ ปัจจุบัน *Spirulina* sp. (สาหร่ายเกลียวทอง) เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางในรูปของอาหารเสริมสุขภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่น คือ มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโปรตีนประกอบไปด้วย กรดอะมิโนที่จำเป็นกระจายอยู่ในเซลล์อย่างได้สัดส่วน มีวิตามินเกลือแร่และสารให้สีธรรมชาติจำนวนมาก นอกจากนี้ข้อดีไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสาหร่ายเกลียวทอง นอกจากมีเซลล์ขนาดใหญ่ เก็บเกี่ยวได้ง่าย ผนังเซลล์บางจึงถูกย่อย และดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว

2.5.7 ผลิตภัณฑ์น้ำมันเชื้อเพลิง

เนื่องจาก ราคาน้ำมันปิโตรเลียมในตลาดโลกในปัจจุบันเกิดความผันผวน รัฐบาลตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว ได้เพิ่มการแสวงหาแหล่งและการผลิตพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานชีวมวล แก๊สชีวภาพ เอทานอล และไบโอดีเซล เข้าเป็นหนึ่งในแผนยุทธศาสตร์หลักเพื่อพัฒนาประเทศ และหนึ่งในนั้นคือ ไบโอดีเซล ที่จะได้รับการส่งเสริมให้มีการผลิตกันอย่างแพร่หลายไปทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งนี้เพราะประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงเอื้อต่อการนำผลิตผลทางการเกษตรชนิดต่างๆ โดยเฉพาะพืชที่ให้น้ำมัน เช่น ปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง มะพร้าว ทานตะวัน และสบู่ดำ เพื่อนำมาใช้ในผลิตไบโอดีเซล หากกล่าวถึงสาหร่ายแล้ว คนส่วนใหญ่มักจะนึกถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเป็นอาหารของสัตว์หรือเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมของคน ปัจจุบันสาหร่ายจัดเป็นพืชอีกชนิดหนึ่ง ที่มีศักยภาพสูงในการนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล สาหร่ายมีลักษณะเด่นที่ทำให้แตกต่างจากพืชให้น้ำมันชนิดอื่นๆ หลายอย่าง เช่น มีความว่องไวในการสะสมพลังงานภายในเซลล์ โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงให้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมัน ถ้ามีการเพาะเลี้ยงอย่างเหมาะสมนอกจากนั้น การเลี้ยงสาหร่ายก็ไม่ยุ่งยากและสามารถเติบโตได้ อย่างรวดเร็วในทุกฤดูกาล อีกทั้งยังต้องการพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย ดังนั้นการนำน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายมาผลิตเป็นไบโอดีเซลอาจจะมีศักยภาพพอที่จะขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป (พนิดา และ ผกาวัช, 2551)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Thompson และคณะ (1996) พบว่า ปริมาณลิพิดในสาหร่ายสามารถเหี่ยวมาได้ โดยการเหี่ยวนำด้วยสารอาหาร แรงดันออสโมติก โดยสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโต หรือสภาวะเครียด (Stress condition) สามารถเปลี่ยนเมแทบอลิซึมของการสังเคราะห์ลิพิดไปเป็นการสะสมลิพิดแทน ทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อไปได้

Huerlimann และคณะ (2010) พบว่า ปริมาณลิพิดสะสมของสาหร่ายที่อยู่ในระยะ exponential phase ส่วนใหญ่สะสมในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol ;TAG) และทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เช่น Phospholipid ในระยะ stationary phase สาหร่ายจะหยุดแบ่งเซลล์ พลังงานที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงจะถูกใช้ในสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลแทน

Subhasha และคณะ (2011) ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและสะสมลิพิดของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* โดยใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เมื่อแหล่งคาร์บอนไม่จำกัด ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนลดลงครึ่งหนึ่ง ปริมาณลิพิดเพิ่มขึ้นจาก 15 เปอร์เซ็นต์ เป็น 18 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้นที่ 0.05 กรัมต่อลิตร การสะสมลิพิดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากัน ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาเจริญของสาหร่าย พบว่า สาหร่ายในระยะการเจริญคงที่ (Stationary phase) สะสมลิพิดมากกว่าระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (Exponential phase)

Feng และคณะ (2012) ศึกษาผลของไนโตรเจนและฟอสเฟตต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* พบว่า ปริมาณลิพิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน (65.1 เปอร์เซ็นต์) หรือขาดฟอสเฟต (44.7 เปอร์เซ็นต์) ของสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติ (33.5 เปอร์เซ็นต์) จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า การขาดไนโตรเจนสามารถส่งเสริมการสะสมของไขมันในสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* ได้อย่างมีนัยสำคัญ

Griffiths และคณะ (2012) พบว่า การจำกัดแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสะสมของไขมันและกรดไขมัน แต่การจำกัดไนโตรเจนก็มีผลให้การเจริญเติบโตลดลงเช่นกัน อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ทำได้ง่ายและมีต้นทุนการดำเนินการที่ถูกกว่าวิธีอื่นๆ Fatty acid methyl ester (FAME) ที่พบมากในสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ C16:0 และ C18:1 เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม Chlorophyta ในอาหาร BBM ที่จำกัดปริมาณไนโตรเจน พบการเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน C18:1 และพบการลดลงของกรดไขมัน C16:0, C18:2 และ C18:3 โดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. และ *Chlorella vulgaris* สามารถเจริญเติบโตและผลิตลิพิดได้ดีในสภาวะที่จำกัดไนโตรเจน ซึ่ง *C. vulgaris* มีปริมาณลิพิดสะสมสูงสุด

Duan และคณะ (2012) ศึกษา การเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* แบบแบทช์โดยมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปรวมกับการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดการผลิตลิพิด จากการทดลองพบว่า หลังจากการเลี้ยง 180 ชั่วโมง ได้ผลผลิตลิพิดถึง 3.16 กรัมต่อลิตร ปริมาณลิพิดที่สะสมในเซลล์เท่ากับ 58.6 เปอร์เซ็นต์ โดยเพิ่มขึ้นจาก 21.1 เปอร์เซ็นต์ เป็น 22.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสาหร่ายที่เลี้ยงเป็นตัวควบคุม

Church และคณะ (2017) ศึกษาการเจริญเติบโตโดยการกำจัดธาตุอาหารในน้ำเสียและความเค็มสูงของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่า ความเค็มส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลงและทำให้สาหร่ายมีปริมาณลิพิดเพิ่มขึ้นจาก 11.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 16.1 เปอร์เซ็นต์ (192 ชั่วโมง) ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการกำจัดไนโตรเจนในน้ำเสียของสาหร่าย และพบว่ากรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบประกอบไปด้วย Palmitic acid (C16:0), Oleic acid (C18:1n9c), Linoleic acid (C18:2n6c) และ Linolenic acid (C18:3n3) โดยกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้นจาก 17.0 เปอร์เซ็นต์ เป็น 21.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สาหร่าย *C. vulgaris* สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ในปริมาณน้อยและผลิตกรดไขมันอิ่มตัวได้ในปริมาณที่สูงกว่า จึงส่งผลให้ได้ไบโอดีเซลคุณภาพสูงเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในความเค็มน้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cha และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตลิพิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในระยะเวลาเจริญช่วง Stationary phase ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella sorokiniana* ที่แปรผันระดับความเข้มข้นของไนเตรท จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตลิพิดได้สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นไนเตรทในช่วง 0.18-0.66 มิลลิโมลาร์ โดยสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ผลิตลิพิดได้ร้อยละ 10.20 - 11.34 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* สามารถผลิตลิพิดได้ร้อยละ 15.44 - 17.32 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และกรดไขมันหลักที่พบ ได้แก่ Palmitic acid (C16:0), Stearic acid (C18:0), Oleic acid (C18:1), Linoleic acid (C18:2 หรือ $\omega 6$) และ Alpha-linolenic acid (C18:3 หรือ $\omega 3$) อย่างไรก็ตาม การผลิตไบโอดีเซลขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายด้วยเช่นกัน ควรทำการผสมกรดไขมันสาหร่ายที่ต่างกันเข้าด้วยกันจะได้กรดไขมันที่มีคุณภาพเป็นผลให้ผลิตไบโอดีเซลได้คุณภาพมากยิ่งขึ้น

Pandit และคณะ (2017) ศึกษาศักยภาพในการสะสมลิพิดภายใต้การแปรผันความเค็มของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Acutodesmus obliquus* การเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ทำให้สาหร่ายสองสายพันธุ์ผลิตลิพิดได้สูง โดยสาหร่าย *C. vulgaris* สะสมลิพิดเพิ่มขึ้นจาก 31.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 49 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่าย *A. obliquus* สะสมลิพิดเพิ่มขึ้นจาก 23 เปอร์เซ็นต์ เป็น 43 เปอร์เซ็นต์

Kumar และคณะ (2019) เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะเครียดจะพบการสะสมลิพิดมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารอาหารเพียงพอ โดยทั่วไป มักทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเครียดด้วยการจำกัดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในสาหร่าย *Chlorella* sp. พบการสะสมลิพิดสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยการจำกัดไนโตรเจน กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่มีพันธะคู่ในโครงสร้างจัดเป็นสารประกอบมูลค่าสูงในอุตสาหกรรมอาหาร

Scragg และคณะ (2003) ศึกษาแหล่งเชื้อเพลิงที่ยั่งยืนสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลพบว่า สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* เป็นสาหร่ายที่มีลักษณะเซลล์เดี่ยว เซลล์มีขนาด 5-10 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลม ผนังเซลล์บาง ไม่มีแฟลกเจลลา มีรงควัตถุอยู่ในคลอโรพลาสต์ที่เป็นรูปถ้วยอยู่ริมเซลล์ ช่วยสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์เอและบี พบทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และโดยเฉลี่ยลิพิดที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์คิดเป็น 22 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลองนี้มีจำนวน 19 สายพันธุ์ โดยได้มาจากการคัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืดและน้ำในนาข้าวของประเทศไทย หรือซื้อมาจาก Chlamydomonas Resource

ตารางที่ 3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
1	<i>C. reinhardtii</i> CC-124	ซื้อมาจาก Chlamydomonas Resource
2	<i>C. reinhardtii</i> CC-125	ซื้อมาจาก Chlamydomonas Resource
3	<i>C. reinhardtii</i> CC-503	ซื้อมาจาก Chlamydomonas Resource
4	<i>Chlorella</i> sp. 2TKS 2.2	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำนาข้าว จังหวัดนครสวรรค์
5	<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
6	<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดชัยนาท
7	<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดชัยนาท
8	<i>Chlorella</i> sp. CirGreen	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
9	<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว หาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี
10	<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8260	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด กรุงเทพมหานคร
11	<i>Chlorella</i> sp. WTK-W3.1	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด อุทยานวังตะไคร้ จังหวัดนครนายก
12	<i>Coelastrum</i> sp. TISTR 8562	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
13	<i>Coelastella</i> sp. CH	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ลำดับที่	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
14	<i>Coelastella</i> sp. SD	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
15	<i>Micractinium</i> sp. A25.1	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำนาข้าว จังหวัดชัยนาท
16	<i>Micractinium</i> sp. 1SinS1.1	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
17	<i>Monoraphidium</i> sp. TISTR 8553	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร
18	<i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8546	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร
19	<i>Scenedesmus</i> sp. L	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
20	<i>Scenedesmus</i> sp. OvalG	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
21	<i>Tetraspora</i> sp. TT	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี
22	<i>Tetraspora</i> sp. TTS	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก)
- 3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 3.2.2.1 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂)
 - 3.2.2.2 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂)
 - 3.2.2.3 แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄)
 - 3.2.2.4 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO₄.7H₂O)
 - 3.2.2.5 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO₄.7H₂O)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
3.2.2.6 กรดบอริก (H₃BO₃)
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.2.7 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 3.2.2.8 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 3.2.2.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 3.2.2.10 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 3.2.2.11 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 3.2.2.12 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
- 3.2.2.13 กรดอะซิติก (CH_3COOH)
- 3.2.2.14 ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)
- 3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณลิพิด
 - 3.2.3.1 คลอโรฟอร์ม (CHCl_3)
 - 3.2.3.2 เมทานอล (CH_3OH)
 - 3.2.3.3 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation, Japan)
- 3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.3.6 ตู้ดูดควันสารเคมี (Protector laboratory hood)
- 3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z38K, Germany)
- 3.3.8 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Heidolph, Germany)
- 3.3.9 เครื่องวัด Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS)
- 3.3.10 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.3.11 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.12 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.3.13 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.3.14 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.16 ลูปเปียเชื้อ (loop)
- 3.3.17 ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.3.18 อุปกรณ์สำหรับวางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.3.19 กระดาษกรอง (GF/C)

3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น (Starter) เริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนจานอาหารแข็ง Tris-acetate phosphate (TAP) จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเซลล์สาหร่ายบนจานอาหารแข็ง 1 โคโลนีไปเพาะเลี้ยงต่อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปวางบนเครื่องเขย่าและเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำหัวเชื้อตั้งต้นที่เก็บเกี่ยวได้มาเพาะเลี้ยงต่อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP 100 มิลลิลิตร โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นของเซลล์ให้มีค่าประมาณ 0.1 จากนั้น นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที

3.5 วิธีการสกัดลิพิดจากสาหร่าย

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อที่ 3.4 จนเซลล์ของสาหร่ายเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) คือประมาณชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ของสาหร่ายโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิธีการที่ใช้ในการสกัดลิพิดจากตัวอย่างสาหร่ายดัดแปลงมาจากวิธีการสกัดลิพิดขั้นตอนเดียว (Single-step procedure) ของ Axelsson และ Gentili (2014) วิธีการสกัดไขมันทำได้โดยชั่งตัวอย่างสาหร่ายแห้ง 20-30 มิลลิกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นเติมตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เขย่าหลอดอย่างรุนแรง และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.73 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้น แยกชั้นของคลอโรฟอร์มที่อยู่ด้านล่างของหลอดซึ่งเป็นสารสกัดหยาบของไขมันไปใส่ยังหลอดใหม่ ทำการเติมตัวทำละลายผสมสำหรับการสกัดรอบใหม่ลงไปในหลอดที่กล่าวมาข้างต้น ทำการสกัดไขมันทั้งหมด 5 รอบต่อ 1 ตัวอย่าง ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ ให้เหลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปใช้ในการเผยแพร่หรือใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร

ทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้น นำหลอดไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำหลอดไปทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้น (Desiccator) ก่อนที่จะนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณลิพิดทั้งหมดที่สกัดได้

3.6 วิธีการศึกษาคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวในสภาวะปกติและสภาวะการขาดไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 22 สายพันธุ์ในอาหาร Tris-acetate phosphate (TAP) สูตรปกติ หลังจาก 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เก็บเกี่ยวเซลล์และนำไปบ่มต่อในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารเหลว TAP-N เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่ได้ นำมาสกัดลิพิด ในหัวข้อ 3.5 คัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายที่มีปริมาณลิพิดสะสมมากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

3.7 วิธีการศึกษาการเพิ่มปริมาณลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในสภาวะที่ แปรผันปริมาณไนโตรเจนและโซเดียมคลอไรด์

นำสาหร่ายที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tris-acetate phosphate (TAP) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP ที่มีการแปรผัน ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0, 0.7, 1.5, 3.6 ถึง 7.3 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2 ถึง 3 โมลาร์ ทำการบ่มต่อไปอีก 24 ชั่วโมง บนเครื่อง เขย่าที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่ได้และนำไปสกัดลิพิดด้วยวิธีการในหัวข้อ 3.5

3.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

นำสาหร่ายที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tris-acetate phosphate (TAP) โดยทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวัดปริมาณ คลอโรฟิลล์และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงเวลาที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 และ 96 ของการเจริญเติบโต จากนั้น นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟการเจริญ (Growth curve) ในส่วนของวิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ใช้วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของ Lee และคณะ (2004) มีโดยนำตัวอย่างสาหร่าย 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม ตัวทำละลายเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (Vortex) นำไปบ่มใน เครื่องให้ความร้อน (block heater) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์

3.9 วิธีการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

ส่งตัวอย่างน้ำมันที่สกัดจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ไปวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันไปที่ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS) และมีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ ใช้คอลัมน์ DB (ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 เมตร เคลือบสารหนา 0.25 ไมโครเมตร) อุณหภูมิ ณ จุดฉีดสาร 230 องศาเซลเซียส ฉีดสารปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร Split ratio 100:1 โปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 100 องศาเซลเซียส คงที่ 3 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 100 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 140 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 230 องศาเซลเซียส คงที่ 20 นาที และ scan parameter มวลต่ำที่สุด 30 และสูงที่สุด 500

3.10 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณลิพิดสะสมในแต่ละสายพันธุ์ของสาหร่ายภายใต้สภาวะต่างๆ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ $P\text{-value} < 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีปริมาณลิพิดสะสมสูงภายใต้สภาวะปกติและสภาวะการขาดไนโตรเจน

จากการนำสาหร่ายสีเขียวทั้ง 22 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP มาทำการสกัดลิพิดและวิเคราะห์ปริมาณลิพิด พบว่า สาหร่ายสีเขียวทั้งหมดจำนวน 22 สายพันธุ์ มีปริมาณลิพิดตั้งแต่ 6.5 ± 0.3 ถึง 25.2 ± 0.4 เปอร์เซ็นต์ และมีการสะสมลิพิดตั้งแต่ 0.030 ± 0.005 ถึง 0.248 ± 0.005 กรัมต่อลิตร โดยมีสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. CirGreen, *Chlorella* sp. ChiW1 และ *C. reinhardtii* CC-124 ที่ให้ปริมาณลิพิดสูง โดยมีปริมาณลิพิดเท่ากับ 25.2 ± 0.4 , 24.1 ± 0.4 และ 23.5 ± 1.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการสะสมลิพิดเท่ากับ 0.248 ± 0.005 , 0.222 ± 0.004 และ 0.210 ± 0.002 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียวจำนวน 22 สายพันธุ์

ลำดับที่	Green algal strains	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)
1	<i>C. reinhardtii</i> CC-124	23.5 ± 1.2^b	0.210 ± 0.002^b
2	<i>C. reinhardtii</i> CC-125	10.0 ± 0.3^i	0.051 ± 0.000^i
3	<i>C. reinhardtii</i> CC-503	13.7 ± 0.2^h	0.085 ± 0.005^{gh}
4	<i>Chlorella</i> sp. 2TKS 2.2	14.1 ± 0.1^h	0.073 ± 0.006^h
5	<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	10.5 ± 0.6^i	0.086 ± 0.009^{gh}
6	<i>Chlorella</i> sp. Chiw1	24.1 ± 0.4^{ab}	0.222 ± 0.004^b
7	<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	23.4 ± 0.5^b	0.181 ± 0.001^c
8	<i>Chlorella</i> sp. CirGreen	25.2 ± 0.4^a	0.248 ± 0.005^a
9	<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	15.6 ± 0.4^{fg}	0.074 ± 0.008^h

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียวจำนวน 22 สายพันธุ์ (ต่อ)

ลำดับที่	Green algal strains	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)
10	<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8260	18.4 ± 1.4 ^{de}	0.129 ± 0.012 ^{de}
11	<i>Chlorella</i> sp. WTK-W3.1	6.5 ± 0.3 ^k	0.030 ± 0.005 ^j
12	<i>Coelastrum</i> sp. 8562	16.2 ± 1.4 ^f	0.073 ± 0.009 ^h
13	<i>Coelastella</i> sp. CH	19.5 ± 0.6 ^d	0.133 ± 0.012 ^d
14	<i>Coelastrum</i> sp. SD	14.8 ± 0.4 ^{gh}	0.074 ± 0.013 ^h
15	<i>Micractinium</i> sp. 1SinS1.1	10.2 ± 1.1 ⁱ	0.054 ± 0.005 ⁱ
16	<i>Micractinium</i> sp. A25.1	7.8 ± 0.3 ^j	0.057 ± 0.003 ⁱ
17	<i>Monoraphidium</i> sp. 8553	11.0 ± 0.7 ⁱ	0.107 ± 0.002 ^f
18	<i>Scenedesmus</i> sp. 8546	18.1 ± 0.7 ^e	0.118 ± 0.007 ^{ef}
19	<i>Scenedesmus</i> sp. L	23.1 ± 0.7 ^b	0.092 ± 0.009 ^g
20	<i>Scenedesmus</i> sp. OvalG	14.2 ± 0.3 ^h	0.050 ± 0.005 ⁱ
21	<i>Tetraspora</i> sp. TT	21.5 ± 1.0 ^c	0.138 ± 0.014 ^d
22	<i>Tetraspora</i> sp. TTS	15.8 ± 0.6 ^{fg}	0.110 ± 0.005 ^f

หมายเหตุ: a,b,c,d,e,f,g,h,i แสดงค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

จากผลการทดลองนี้ จึงได้ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ไปทำการศึกษาปริมาณลิพิดภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจน เนื่องจากการจำกัดแหล่งไนโตรเจนเป็นการทำให้เซลล์สาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียด ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการสะสมของลิพิดและกรดไขมัน (Griffiths *et al.*, 2012) จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตลิพิดได้สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารสภาวะปกติเล็กน้อย โดย *Chlorella* sp. CirGreen, *Chlorella* sp.

ChiW1 และ *C. reinhardtii*.CC-124 มีปริมาณลิพิด เท่ากับ 30.2 ± 0.6, 25.1 ± 0.8 และ 28.6 ± 1.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสะสมลิพิดในอาหารสภาวะไม่จำกัด

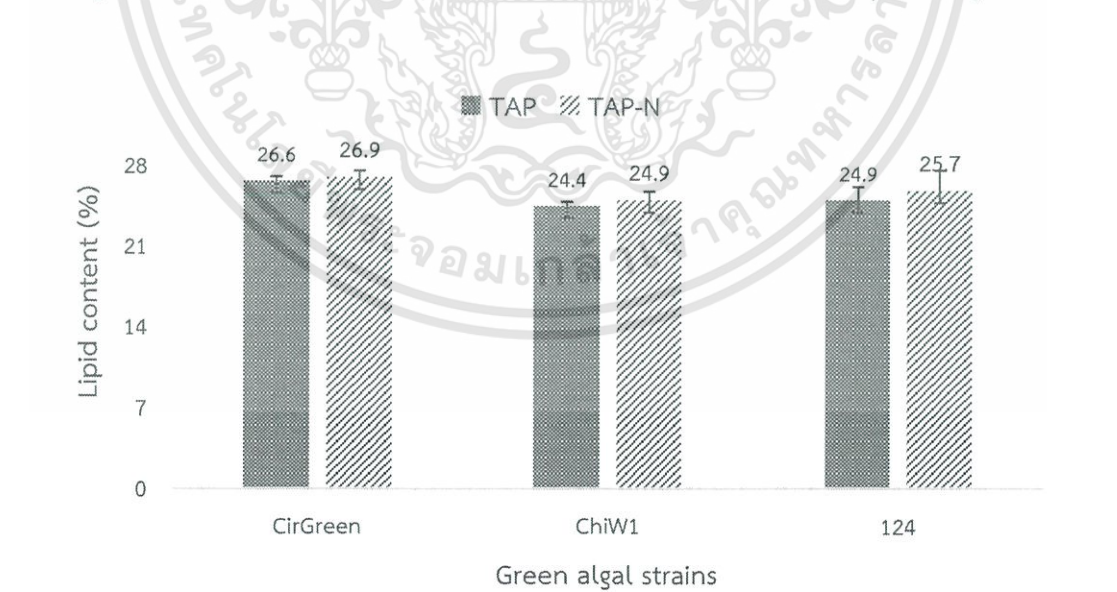
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ข้อมูลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ปกติและสภาวะที่ขาดไนโตรเจนพบว่า *Chlorella* sp. CirGreen มีปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดสูงสุด (รูปที่ 4.1) ผลการศึกษานี้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Feng และคณะ (2012) ที่พบว่าสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน มีปริมาณลิพิดสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติ ดังนั้น จากผลการทดลองจึงได้คัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดต่อไป

ตารางที่ 4.2 ปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen, *Chlorella* sp. ChiW1 และ *C. reinhardtii* CC-124 ภายใต้สภาวะปกติและสภาวะการขาดไนโตรเจน

Green algal strains	สภาวะปกติ		สภาวะการขาดไนโตรเจน	
	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)
<i>Chlorella</i> sp. CirGreen	26.6 ± 0.4 ^a	0.222 ± 0.013 ^a	26.9 ± 0.4 ^a	0.197 ± 0.009 ^a
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	24.4 ± 0.5 ^b	0.214 ± 0.004 ^a	24.9 ± 0.3 ^b	0.111 ± 0.003 ^b
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	24.9 ± 0.9 ^b	0.209 ± 0.010 ^a	25.7 ± 0.9 ^{ab}	0.110 ± 0.007 ^b

หมายเหตุ: a,b แสดงค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test



รูปที่ 4.1 ปริมาณลิพิดในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen, *Chlorella* sp. ChiW1 และ *C. reinhardtii* CC-124 ในสภาวะปกติในอาหาร TAP และสภาวะการขาดไนโตรเจนในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณลิพิดของสาหร่ายสีเขียวในสถานะที่แปรผันของแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์

จากการนำสาหร่ายสีเขียวยสายพันธุ์ *Chlorella* sp. CirGreen มาบ่มในอาหาร TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งจัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ ดังนี้ 0, 0.7, 1.5, 3.6 และ 7.3 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณลิพิดสูงสุดเท่ากับ 28.2 ± 0.6 เปอร์เซ็นต์และมีการสะสมลิพิดสูงสุดเท่ากับ 0.206 ± 0.003 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.3) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์อื่นๆ

ตารางที่ 4.3 ปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ภายใต้สถานะที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

NH ₄ Cl concentration (mM)	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)
0	26.4 ± 1.0^{ab}	0.191 ± 0.008^b
0.7	28.2 ± 0.6^a	0.206 ± 0.003^a
1.5	25.3 ± 0.5^{ab}	0.185 ± 0.008^{bc}
3.6	23.4 ± 0.4^c	0.125 ± 0.013^d
7.3	23.3 ± 0.4^c	0.173 ± 0.002^c

หมายเหตุ: a, b, c, d แสดงค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เมื่อลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน จนมีความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายสีเขียวยสายพันธุ์ *Chlorella* sp. CirGreen มีปริมาณและสะสมลิพิดสูงที่สุด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Hsieh และ Wu (2009) ซึ่งทำการบ่มสาหร่ายสีเขียวยขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* sp. โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่ได้รับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่ำที่สุด จะให้ปริมาณลิพิดสูงสุด เนื่องด้วยในสถานะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวที่ช้าลง เมื่ออยู่ในสถานะที่สารอาหารไม่เพียงพอ เซลล์จึงเปลี่ยนไปสะสมอาหารในรูปของลิพิดแทน โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ลิพิดจะมีความสามารถทนทานต่อการขาดไนโตรเจนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต จากการนำสาหร่ายสีเขียวยสายพันธุ์ *Chlorella* sp. CirGreen มาบ่มในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ดังนี้ 0, 0.7, 1.5, 3.6 และ 7.3 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณลิพิดสูงสุดเท่ากับ 28.2 ± 0.6 เปอร์เซ็นต์และมีการสะสมลิพิดสูงสุดเท่ากับ 0.206 ± 0.003 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.3) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์อื่นๆ

0, 0.5, 1, 2 และ 3 โมลาร์ พบว่า ในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 และ 1 โมลาร์ สาหร่ายสะสมลิพิดเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณลิพิดเท่ากับ 24.8 ± 1.0 , 26.8 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ สาหร่ายมีการสะสมลิพิดเท่ากับ 23.3 ± 0.4 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียด เป็นผลให้สาหร่ายสะสมลิพิดเพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Battah และคณะ (2014) พบว่า ความเค็มส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือจะไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้การเจริญของเซลล์ลดลงและเซลล์จะสะสมพลังงานเพื่อสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์อย่างลิพิดมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นสูงเกินไป ซึ่งไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต สาหร่ายจะเจริญเติบโตได้น้อยลง ทำให้ปริมาณลิพิดสะสมลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ สังเกตได้จากปริมาณลิพิดที่ลดลงเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 และ 3 โมลาร์ ซึ่งมีปริมาณลิพิดเท่ากับ 18.4 ± 0.7 และ 17.0 ± 0.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ภายใต้สภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

NaCl concentration (M)	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)
0	23.3 ± 0.4^c	0.173 ± 0.002^a
0.5	24.8 ± 1.0^b	0.119 ± 0.006^c
1	26.8 ± 0.2^a	0.157 ± 0.004^b
2	18.4 ± 0.7^d	0.088 ± 0.004^d
3	17.0 ± 0.3^e	0.059 ± 0.003^e

หมายเหตุ: a, b, c, d, e แสดงค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

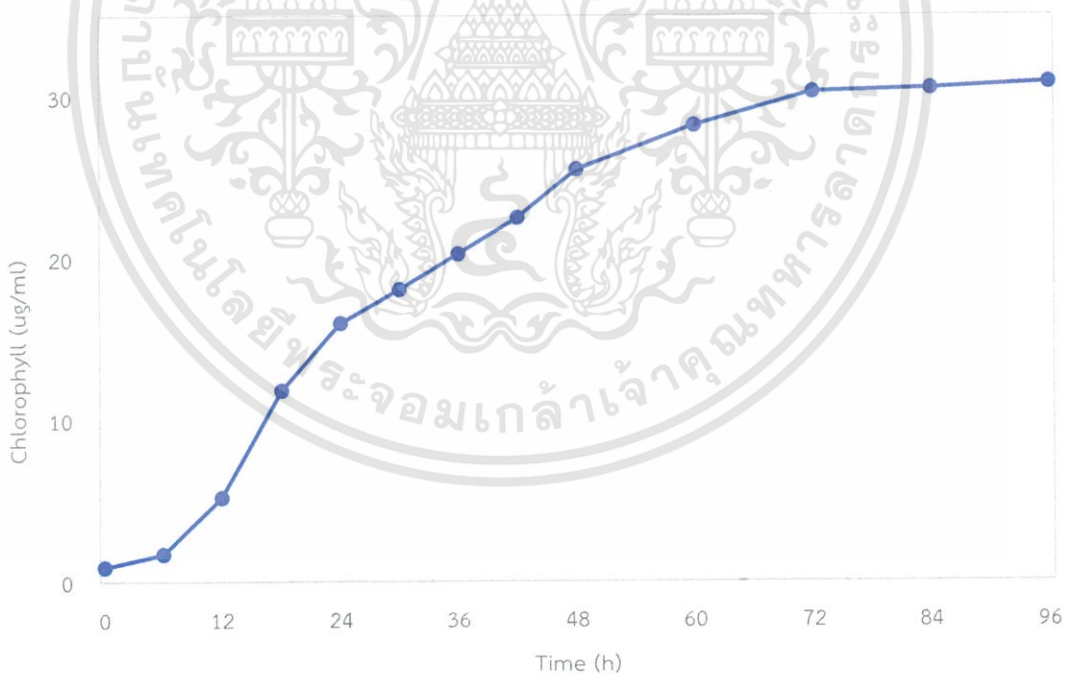
ทั้งนี้แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมาก แต่สาหร่ายบางชนิดก็สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากภายใต้สภาวะ Hypertonic เซลล์จะปรับตัวโดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความหนืดและมีแรงดันของเหลวมากขึ้น เป็นการปรับตัวเพื่อรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ด้วยการทำให้แรงดันออสโมติกภายในเซลล์สูงกว่าของเหลวรอบเซลล์ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์นั้นสูญเสียน้ำ สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดจึงสามารถทนต่อความเค็มและสามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดอย่างเหมาะสมได้ (Walsby, 1982) การปรับตัวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายเป็นสำคัญสาหร่าย สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า และ *C. reinhardtii* สามารถทนต่อความเครียดภายใต้สภาวะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในระดับไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ผลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ต่ำเท่านั้น และสาหร่ายชนิดอื่น เช่น *Dunaliella salina* สามารถตอบสนองต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ในระดับสูงได้เป็นอย่างดี (Pandit *et al.*, 2017)

4.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

จากการนำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. CirGreen มาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจากการวัดความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร Tris-acetate phosphate (TAP) สภาวะปกติ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ในระยะ 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายมีการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากมีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวในสภาวะอาหารและสภาวะทางกายภาพใหม่ โดยจัดอยู่ในระยะ lag phase หลังจาก 6 ชั่วโมง สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยเซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น จนถึง ชั่วโมงที่ 48 ระยะนี้คือระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายหรือ Logarithmic phase หลังจาก ชั่วโมงที่ 48 เซลล์สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะ Stationary phase เนื่องจากอาหารหมดลง ทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลง ในระหว่างชั่วโมงที่ 72 ถึง 96 สาหร่ายจะหยุดการเจริญเติบโต สังเกตจากปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ไม่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาปริมาณการสะสมลิพิดของสาหร่าย *Chlorella* sp. CirGreen ที่มีอายุเซลล์ต่างๆ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen มาศึกษาผลของอายุเซลล์ต่อการสะสมลิพิด โดยนำสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มาวัดปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปกติ พบว่า สาหร่ายมีปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดมากขึ้น เมื่อเซลล์มีอายุเซลล์มากขึ้น โดยสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 96 ชั่วโมง มีปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดสูงสุดเท่ากับ 26.7 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 0.246 ± 0.004 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่มีอายุเซลล์แตกต่างกัน

Cell age (h)	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)
24	22.3 ± 0.7^c	0.178 ± 0.006^d
48	24.3 ± 0.4^b	0.206 ± 0.004^c
72	25.2 ± 0.4^b	0.227 ± 0.003^b
96	26.7 ± 0.5^a	0.246 ± 0.004^a

หมายเหตุ: a, b, c แสดงค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Qiao และ Wang (2009) ที่พบว่า เซลล์ในระยะ Early stationary phase จะมีการสะสมลิพิดเพิ่มขึ้นจากระยะ Logarithmic phase ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจาก เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ Stationary phase เซลล์จะลดอัตราการเจริญเติบโตลง ปริมาณสารอาหารลดลง เซลล์ไม่มีความจำเป็นต้องใช้พลังงานหรือสารรีดิวซ์ไปในกระบวนการแบ่งเซลล์และใช้ในเมแทบอลิซึมอื่นๆ เซลล์จึงหันไปเก็บสะสมลิพิด เอาไว้ใช้ภายในเซลล์

4.5 ผลการศึกษาปริมาณลิพิด ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในสภาวะที่คัดเลือก

4.5.1 ผลการศึกษาปริมาณลิพิดในสภาวะที่คัดเลือก

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2 และ 4.4 พบว่า สภาวะที่สาหร่ายมีปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดสูง คือ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์และอายุเซลล์ 96 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกสภาวะเหล่านี้มาศึกษาปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิด รวมทั้งศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน จากผลการทดลองนำเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. CirGreen ที่มีอายุ 96 ชั่วโมง มาบ่มในอาหาร 3 ชนิด คือ อาหาร TAP สูตรปกติ ที่เสริมด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์และอาหาร TAP ที่เสริมด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายที่มีอายุ 96 ชั่วโมงที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ จะมีปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดสูงสุด เท่ากับ 31.6 ± 1.9 เปอร์เซ็นต์และ 0.281 ± 0.019 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่มีอายุ 96 ชั่วโมงในอาหารชนิดต่างๆ

Medium	Lipid content (%)	Lipid accumulation (g/L)
TAP (Control)	26.5 ± 1.3^b	0.245 ± 0.012^b
TAP + 0.7 mM NH ₄ Cl	31.6 ± 1.9^a	0.281 ± 0.019^a
TAP + 1 M NaCl	26.8 ± 1.8^b	0.278 ± 0.016^a

หมายเหตุ: a, b แสดงค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test

ทั้งนี้เนื่องจากในชั่วโมงที่ 96 สาหร่ายเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (Stationary phase) สาหร่ายจะเริ่มหยุดการแบ่งเซลล์ เนื่องจากปริมาณสารอาหารที่จำกัด ทำให้ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต พลังงานที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงจะถูกใช้ในการสังเคราะห์ Triglyceride (TAG) เพื่อสะสมลิพิดไว้ภายในเซลล์แทน (Huerlimann *et al.*, 2010) ดังนั้น จึงสรุปว่าเซลล์ที่มีอายุ 96 ชั่วโมง เป็นอายุของเซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen

4.5.2 ผลการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในสภาวะที่คัดเลือก

จากการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันโดยทำการส่งตัวอย่างลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่คัดเลือก ไปวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันโดยใช้เครื่องมือ Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่า จากโครมาโตแกรม พบกรดไขมันชนิดต่างๆรวม 6 ชนิด คือ Myristic acid, Palmitic acid, Palmitoleic acid, Oleic acid, Stearic acid และ Linoleic acid และมีพื้นที่ใต้กราฟแสดงในตารางที่ 4.7 จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟไปหาปริมาณกรดไขมันในหน่วยเปอร์เซ็นต์และมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ได้ผลดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ จากการทดลอง พบว่า สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 7.3 มิลลิโมลาร์และความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณ Palmitic acid สูงสุด รองลงมาคือ Oleic acid และ Stearic acid ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่ำจะมีการเพิ่มปริมาณ Palmitic acid และ Stearic acid และลดปริมาณ Oleic acid และ Palmitoleic acid อย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่ำ สาหร่ายจะเพิ่มปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและลดปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวลง นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่ำ มักไม่พบ α -linoleic acid (C18:3n3) เนื่องจาก ยีน $\Delta 15$ -desaturases ถูกยับยั้งในภาวะที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่ำ (Cha *et al.*, 2011) ส่วนสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ จะมีการเพิ่มปริมาณของ Palmitic acid และ Stearic acid และลดปริมาณ Oleic acid อย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่า ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง สาหร่ายจะเพิ่มปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและลดปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิดลง ผลการทดลองนี้ คล้ายคลึงกับผลการสะสมลิพิดภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจน มีรายงานพบว่า ในสภาวะที่ความเค็มสูง สาหร่าย *Chlorella* sp. ผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณน้อยและผลิตกรดไขมันอิ่มตัวในปริมาณที่สูงกว่า (Church *et al.*, 2017) นอกจากนี้ ผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Battah และคณะ (2014) ที่พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ สาหร่าย *Chlorella vulgaris* สะสมกรดไขมันอิ่มตัว ได้แก่ Myristic acid, Palmitic acid และ Stearic acid เพิ่มขึ้น ในขณะที่สะสม Linoleic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนลดลง

ตารางที่ 4.7 พื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันที่พบในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่บ่มในอาหารชนิดต่างๆ

Fatty acid	Time	Sample name (area)		
		TAP (control)	TAP + 0.7 mM NH ₄ Cl	TAP + 1 M NaCl
Myristic acid (C14:0)	20.987	16428	37664	26219
Palmitic acid (C16:0)	24.781	283797	625124	765204
Palmitoleic acid (C16:1)	27.068	62375	15593	202124
Oleic acid (C18:1)	29.453	260472	18832	182874
Stearic acid (C18:0)	31.169	146562	381149	628132
Linoleic acid (C18:2)	34.924	118965	173317	191613

ตารางที่ 4.8 ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในหน่วยร้อยละที่พบในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่บ่มในอาหารชนิดต่างๆ

Fatty acid	Fatty acid content (%)		
	TAP (Control)	TAP + 0.7 mM NH ₄ Cl	TAP + 1 M NaCl
Myristic acid (14:0)	1.8	3.0	1.3
Palmitic acid (16:0)	31.9	49.9	38.3
Palmitoleic acid (16:1)	7.0	1.2	10.1
Stearic acid (18:0)	16.5	30.5	31.5
Oleic acid (18:1)	29.3	1.5	9.2
Linoleic acid (18:2)	13.4	13.8	9.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมที่พบในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ที่ป้อนในอาหารชนิดต่างๆ

Fatty acid	Fatty acid content (mg/g)		
	TAP (Control)	TAP + 0.7 mM NH ₄ Cl	TAP + 1 M NaCl
Myristic acid (14:0)	1.63	2.67	1.17
Palmitic acid (16:0)	28.24	44.34	34.37
Palmitoleic acid (16:1)	6.21	1.11	9.06
Stearic acid (18:0)	14.58	27.04	28.27
Oleic acid (18:1)	25.92	1.34	8.26
Linoleic acid (18:2)	11.84	12.29	8.62



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการนำสาหร่ายสีเขียวจำนวน 22 สายพันธุ์ มาคัดเลือกสาหร่ายที่มีศักยภาพในการสะสมลิพิดสูง โดยใช้วิธีการสกัดลิพิดโดยดัดแปลงมาจากวิธีการสกัดไขมันขั้นต้นเดียว (Single-step procedure) ของ Axelsson และ Gentili (2014) ในอาหาร Tris-acetate phosphate ปกติและที่ขาดแหล่งไนโตรเจน สรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen มีศักยภาพในการสะสมลิพิดสูงที่สุด โดยในสภาวะอาหารปกติและสภาวะการขาดไนโตรเจน มีปริมาณลิพิดเท่ากับ 25.2 ± 0.4 และ 26.9 ± 0.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการศึกษาปริมาณลิพิดและการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ในสภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร Tris-acetate phosphate (TAP) สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิด คือ 0.7 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิด คือ 1 โมลาร์ โดยสาหร่ายสะสมลิพิดเพิ่มขึ้น 21 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาอายุของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกต่อการสะสมลิพิด สรุปได้ว่า อายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิด คือ อายุเซลล์ 96 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์จะอยู่ในระยะการเจริญคงที่ (stationary phase)

เมื่อศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของลิพิดที่พบในสาหร่ายเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมงภายใต้สภาวะอาหารที่คัดเลือก พบว่า สาหร่ายมีแนวโน้มสะสมกรดไขมันอิ่มตัวมากขึ้น และสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อยลง โดย Palmitic acid เป็นกรดไขมันหลักที่พบ ทั้งนี้การประยุกต์นำลิพิดจากสาหร่ายเพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซล ชนิดของกรดไขมันมีผลโดยตรงกับความหนืดและคุณสมบัติของไบโอดีเซล กรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง ส่งผลให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีความหนืดและมีค่าซีเทนของไบโอดีเซลที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น ถึงแม้ว่าสาหร่ายขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มศักยภาพการสะสมลิพิดได้ดี แต่เนื่องจากปัจจัยในการเพาะเลี้ยงต่างๆ ด้วยลักษณะของสาหร่ายขนาดเล็กมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม จึงถือเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่ง คุณภาพของลิพิดที่สม่ำเสมอ จะช่วยให้คุณภาพของเชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเหมาะสมและเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด

เอกสารอ้างอิง

- นัยนา บุญทยี่วัฒน. 2553. ชีวเคมีทางโภชนาการ. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์เจริญดีมั่นคงการพิมพ์. กรุงเทพฯ. จำนวน 424 หน้า.
- พนิดา รัตนพลที และ ผกาวดี แก้วกันเนตร. 2551. ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก. วารสารศูนย์บริการวิชาการ ปีที่ 16 มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 1, 9-13.
- ยุวดี อินสำราญ. 2543. ผลของสารตกตะกอนที่มีต่อการเก็บเกี่ยวสาหร่ายและการเจริญหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สรัญญา พันธุ์พฤษ. 2558. เมตาบอลิซึมของไขมัน. เอกสารคำสอนชีวเคมี 2. กรุงเทพมหานคร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 95-102.
- Axelsson, M. and Gentili, F. 2014. A single-step method for rapid extraction of total lipids from Green Microalgae. The Public Library of Science One, 9(2), 1-6.
- Battah, M.G., El-Ayoty, Y.M., Esmael, A.E. and Abd El-Ghany, S.E. 2014. Effect of different concentrations of sodium nitrate, sodium chloride, and ferrous sulphate on the growth and lipid content of *Chlorella Vulgaris*. International Journal of Agricultural Technology, 10, 339-353.
- Bilbao P. 2017, Fatty acids from microalgae: Targeting the accumulation of Triacylglycerides. Integrated Computing Technology, 7, 119 – 141.
- Bligh, E.G. Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8), 911-917.
- Cha, T.S., Chen, J.W., Goh, E.G., Aziz, A. and Losh, S.H. 2011. Differential regulation of fatty acid biosynthesis in two *Chlorella* species in response to nitrate treatments and the potential of binary blending microalgae oils for biodiesel application. Bioresource Technology, 102, 10633-10640
- Chisti Y. 2007, Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advance, 25, 294 – 306.
- Church, J., Hwang, J.H., Kim, K.T., McLean, R., Oh, Y.K., Nam, B., Joo, J.C. and Lee W.H. 2017. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. Bioresource Technology, 243, 147-153.
- Duan, X., Ren, G.Y., Liu, L. and Zhu, W.X. 2012. Salt-induced osmotic stress for lipid overproduction in batch culture of *Chlorella vulgaris*. African Journal of Biotechnology, 11(27), 7072-7078.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Feng, P., Deng, Z., Fan, L., and Hu, Z. 2012. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114:4, 405-410.
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the Isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Food Standards Australia New Zealand. 2016. Alternative DHA-rich Algal Oil for Infant Formula Products, [Online]. Available : <https://www.legislation.gov.au/Details/F2017L00586>
- Griffiths, M.J., Hill, R.P. and Harrison, S.T. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of applied phycology*, 24, 989-1001
- Guihe neuf, F. and Stengel, D.B. 2013. LC-PUFA-enriched oil production by microalgae: accumulation of lipid and triacylglycerols containing n-3 LC-PUFA is triggered by nitrogen limitation and inorganic carbon availability in the marine haptophyte *Pavlova lutheri*. *Marine Drugs*, 11, 4246–4266.
- Hossain, S., Aishah, S., Amru, N.B., Partha, C. and Mokd. N. 2008. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Bitechology*, 4(3), 250-254
- Hsieh, C. and Wu, W. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 100, 3921-3926.
- Huerlimann, R., Nys, R.D. and Heimann, K. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and Bioengineering*, 107, 245-257.
- Illman, A.M., Scragg, A.H. and Shales S.W. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 631-635.
- Juneja A., Ceballos R. M., Murthy G. S. 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6, 4607–4638.
- Khotimchenko, S.V. and Yakovleva, I.M. 2014. Effect of solar irradiance on lipids of the green alga *Ulva fenestrata* Postels et Ruprecht. *Botanica Marina*, 47, 395–401.

เอกสารนี้เป็นเอกสารทูลงวนเวลาหรับการใชงานเพื่การศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใชประโยชน์ดานการค้า

ไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิใหัดัดแปลงเนื้อหาและตองอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

- Kumar, B.R., Deviram, G., Mathimani, T., Duc P.A. and Pugazhendhi, A. 2019. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 583-588.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T. and Feussner, L. 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *Biomedcentral Plant Biology*, 11:124, 1-16.
- Lee YK, Shen H, Basic culturing techniques. In *Handbook of microalgal culture* (Richmond, A., editor), 2004 IS Press.
- McDonald, P., Edwards R. A., Greenhalgh. J.F.D., Morgan, C. A., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G. 2011. *Animal Nutrition* (seventh edition). 392-397
- Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Gorelova, O.A., Reshetnikova, I.V., Solovchenko, A.E., Khozin- Goldberg, I. and Cohen, Z. 2007. 'Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* Trebouxioephyceae, Chlorophyta. *Journal of Phycology*, 43, 833–843.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C., Kebede-Westhead, E. 2008. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology*, 99, 8137–8142.
- National Research Council. 2007. *Nutrient requirements of small ruminants*, Washington, DC, National Academy Press.
- Pandit, P.R., Fulekar, M.H. and Karuna, M.S.L. 2017. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 13437–13451.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P. and Noiraksar, T. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27, 1179-1187
- Qiao, H. and Wang G. 2009. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27, 762-768.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ramluckan, K., Moodley, K.G. and Bux, F. 2014. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from agal biomass by the Soxhlet extraction method. *Fuel*, 116, 103-108
- Scragg, A. H., Morrison, J. and Shales, S.W. 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 884-889.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.
- Stolz, P. and Obermayer, B. 2005. Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries*, 120, 99-106.
- Takagi, M. and Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 223-226.
- Walsby, A.E. 1982. Cell-water and cell-solute relations. *The Biology of Cyanobacteria* The Biology of Cyanobacteria, 237-262.
- Xiong W., Li, X., Xiang, J. and Wu, Q. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 29-36

ภาคผนวก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

Tris-Acetate-Phosphate (TAP) 1 ลิตร

Stock solution (SL)	Volume	Component	Concentration in SL
		$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	
Tris base	2.42 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	2.42 M
		NH_4Cl	16.00 M
2X Filner's	25.00 ml	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.00 M
Beijerinck solution		$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.00 M
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00 M
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.40 M
		H_3BO_3	2.30 M
Trace mineral solution	5.00 ml	$\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.00 M
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.03 M
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.03 M
		$\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.14 M
Glacial Acetic acid	1.00 ml	CH_3COOH	1.00 M (ml · L ⁻¹)
1M Potassium phosphate	1.00 ml	-	1.00 M (ml · L ⁻¹)
Agar	15.00 g	-	15.00 M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ข-1 ปริมาณการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียว 22 สายพันธุ์ในอาหาร TAP ปกติ

สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	Lipid content (%)			Lipid accumulation (g/L)		
	ครั้งที่	ครั้งที่	ครั้งที่	ครั้งที่	ครั้งที่	ครั้งที่
	1	2	3	1	2	3
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	24.4	23.9	22.2	0.210	0.209	0.212
<i>C. reinhardtii</i> CC-125	9.8	10.2	-	0.051	0.051	-
<i>C. reinhardtii</i> CC-503	13.5	13.9	13.7	0.089	0.087	0.080
<i>Chlorella</i> sp. 2TKS 2.2	14.2	14.0	14.1	0.077	0.076	0.067
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	11.2	10.4	10.0	0.092	0.089	0.076
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	23.8	24.5	24.0	0.225	0.217	0.223
<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	22.8	23.6	23.8	0.183	0.180	0.180
<i>Chlorella</i> sp. CirGreen	25.6	24.8	25.1	0.244	0.254	0.248
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	15.4	16.1	15.3	0.082	0.075	0.066
<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8260	19.6	18.8	16.8	0.138	0.133	0.115
<i>Chlorella</i> sp. WTK-W3.1	6.2	6.8	6.5	0.037	0.027	0.028
<i>Coelastrum</i> sp. 8562	17.4	16.5	14.7	0.080	0.075	0.063
<i>Coelastella</i> sp. CH	20.1	19.4	19.0	0.146	0.133	0.121
<i>Coelastrum</i> sp. SD	14.6	15.1	14.4	0.072	0.088	0.061
<i>Micractinium</i> sp. A25.1	8.1	7.7	7.6	0.058	0.055	0.060
<i>Micractinium</i> sp. 1SinS1.1	11.0	9.4	-	0.058	0.051	-
<i>Monoraphidium</i> sp. 8553	11.3	11.5	10.2	0.106	0.105	0.109
<i>Scenedesmus</i> sp. 8546	17.6	17.8	19.0	0.110	0.124	0.119
<i>Scenedesmus</i> sp. L	22.5	22.9	23.9	0.101	0.092	0.083
<i>Scenedesmus</i> sp. OvalG	14.0	14.6	14.0	0.054	0.052	0.044
<i>Tetraspora</i> sp. TT	20.9	22.7	20.9	0.139	0.125	0.151
<i>Tetraspora</i> sp. TTS	15.5	15.4	16.5	0.115	0.104	0.111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2 ปริมาณการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในอาหาร TAP ปกติและ TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน

สายพันธุ์ สาหร่าย สีเขียว	อาหาร	Lipid content (%)			Lipid accumulation (g/L)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	TAP (control)	26.7	24.3	25.5	0.219	0.199	0.209
	TAP (-N)	30.3	28.7	26.7	0.117	0.111	0.103
<i>Chlorella sp.</i> ChiW1	TAP (control)	25.0	24.3	24.0	0.219	0.213	0.211
	TAP (-N)	30.2	24.5	25.6	0.126	0.102	0.106
<i>Chlorella sp.</i> CirGreen	TAP (control)	27.8	25.4	35.5	0.208	0.190	0.266
	TAP (-N)	28.8	30.5	31.4	0.188	0.199	0.205

ตารางที่ ข-3 ปริมาณลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* CirGreen ในสภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

NH ₄ Cl concentration (mM)	Lipid content (%)			Lipid accumulation (g/L)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	25.6	26.1	27.5	0.196	0.194	0.182
0.7	27.6	28.3	28.7	0.203	0.205	0.209
1.5	25.1	24.9	25.9	0.177	0.185	0.194
3.6	23.8	23.5	22.9	0.110	0.129	0.136
7.3	23.0	23.2	23.7	0.171	0.175	0.173

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-4 ปริมาณลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ในสภาวะที่แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

NaCl concentration (M)	Lipid content (%)			Lipid accumulation (g/L)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	23.0	23.2	23.7	0.171	0.175	0.173
0.5	24.4	24.1	25.9	0.114	0.119	0.125
1	27.0	26.6	26.8	0.158	0.153	0.161
2	18.7	18.9	17.7	0.092	0.084	0.087
3	17.3	17.0	16.7	0.057	0.062	0.059

ตารางที่ ข-5 ปริมาณการสะสมลิพิดของสาหร่าย *Chlorella* sp. CirGreen ที่มีอายุเซลล์ต่างๆ

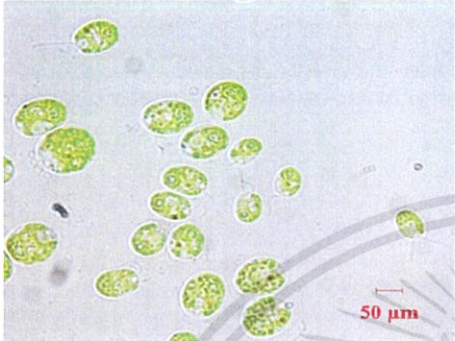
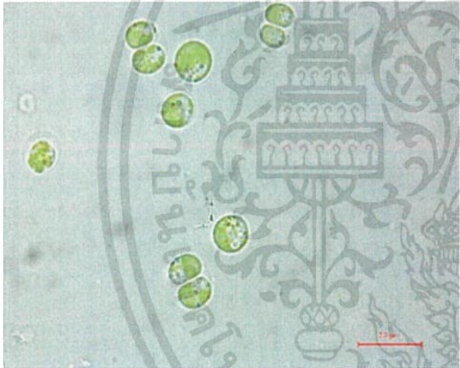
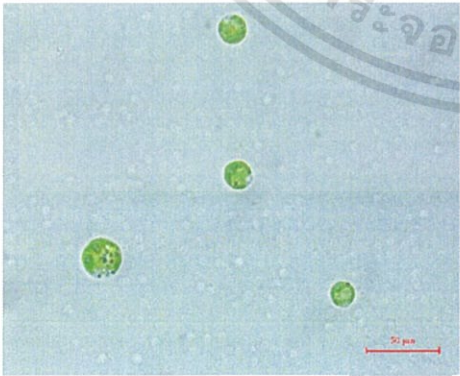
อายุเซลล์ (ชั่วโมง)	Lipid content (%)			Lipid accumulation (g/L)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
24	22.5	21.5	22.9	0.180	0.172	0.183
48	23.9	24.7	24.5	0.202	0.208	0.207
72	25.6	25.1	24.9	0.230	0.226	0.224
96	27.1	26.9	26.2	0.250	0.248	0.241

ตารางที่ ข-6 ปริมาณการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. CirGreen ในสภาวะอาหารที่คัดเลือก

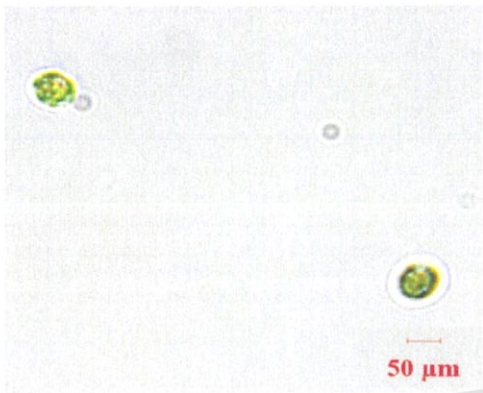
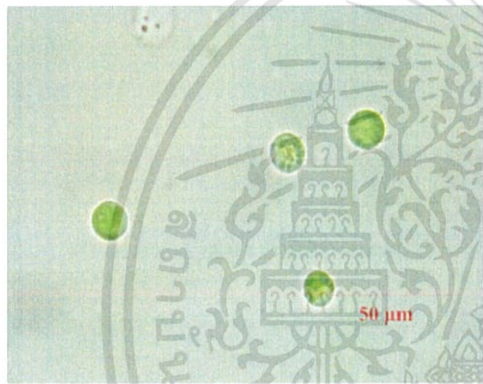
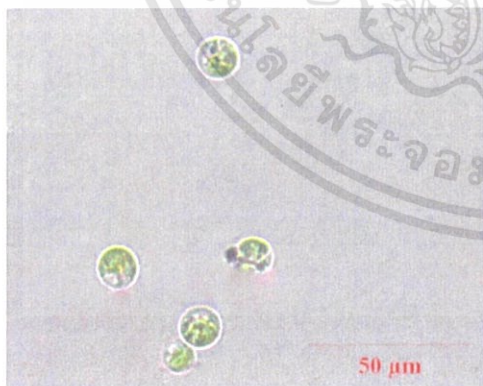
ชนิดของอาหาร	Lipid content (%)			Lipid accumulation (g/L)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
TAP	26.7	27.8	25.1	0.247	0.257	0.232
TAP + 0.7 mM NH ₄ Cl	30.0	31.9	33.3	0.264	0.281	0.293

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

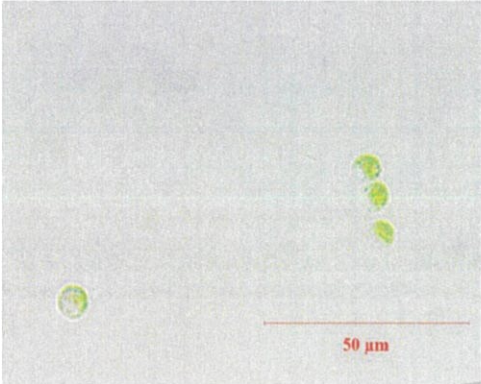
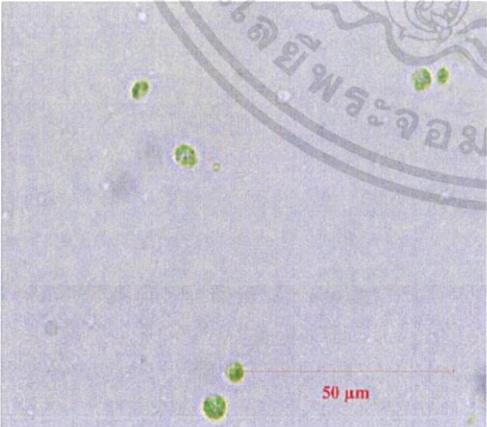
ภาคผนวก ค
สำหรับสีเขียวที่ใช้ในการศึกษา

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>C. reinhardtii</i> CC-124	Chlamydomonas Resource
	<i>C. reinhardtii</i> CC-125	Chlamydomonas Resource
	<i>C. reinhardtii</i> CC-503	Chlamydomonas Resource

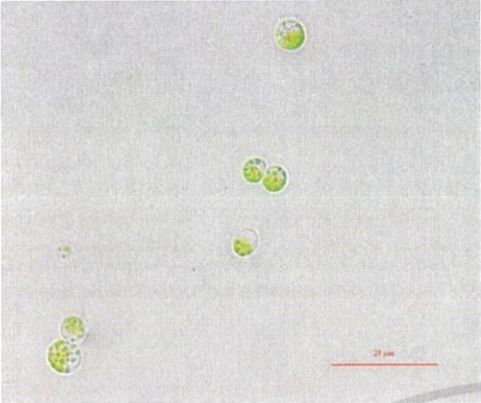
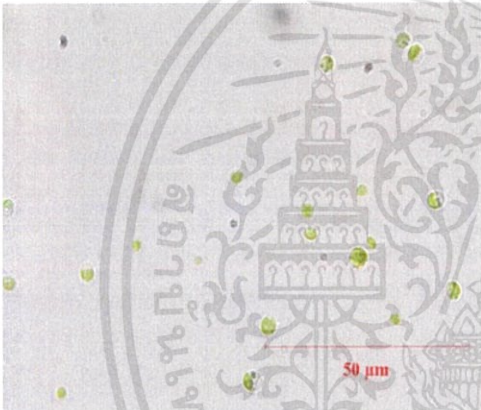
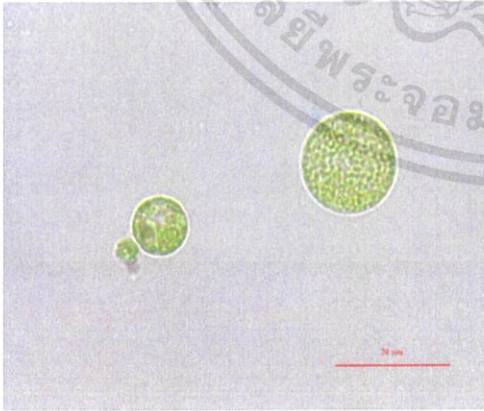
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>Chlorella</i> sp. 2TKS 2.2	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว อำเภอตากลี จังหวัดนครสวรรค์
	<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
	<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดชัยนาท

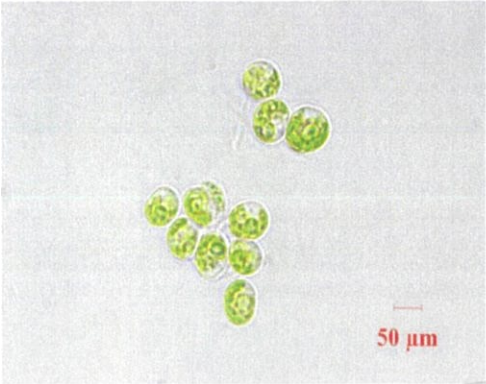
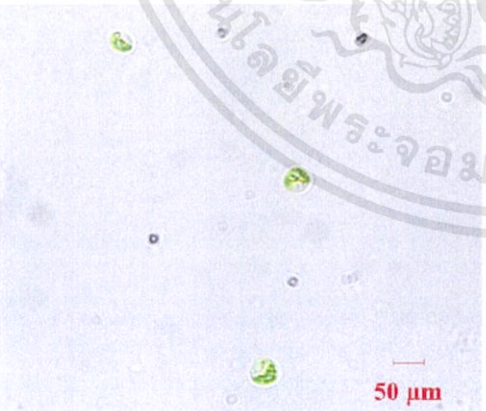
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดชัยนาท
	<i>Chlorella</i> sp. CirGreen	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
	<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว หาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี

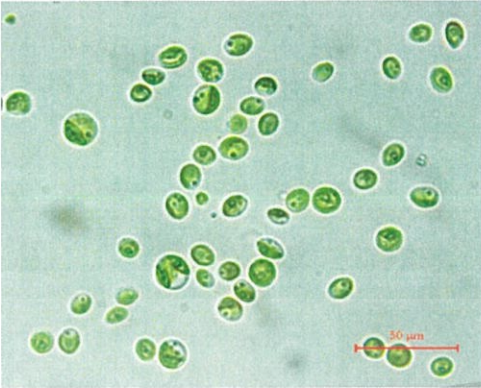
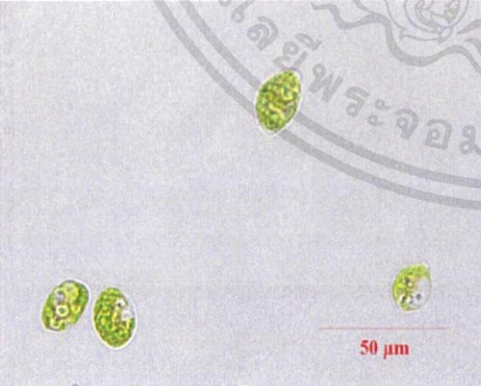
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8260	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
	<i>Chlorella</i> sp. WTK-W3.1	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด อุทยานวังตะไคร้ จังหวัดนครนายก
	<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8562	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร

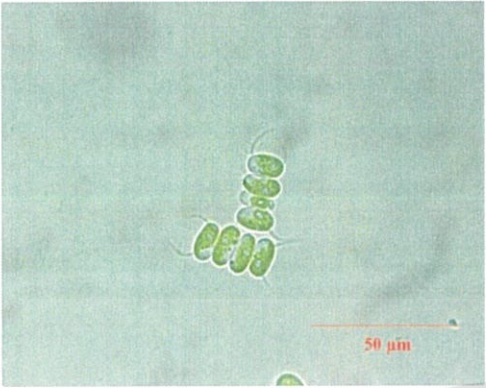
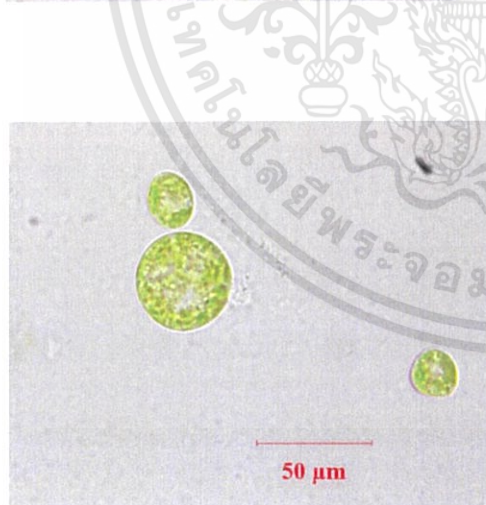
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>Coelastella</i> sp. CH	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
	<i>Coelastella</i> sp. SD	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
	<i>Micractinium</i> sp. A25.1	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดชัยนาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>Micractinium</i> sp. 1SinS1.1	คัดแยกมาจากน้ำนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
	<i>Monoraphidium</i> sp. TISTR 8553	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร
	<i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8546	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>Scenedesmus</i> sp. L	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
	<i>Scenedesmus</i> sp. OvalG	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด สจล. กรุงเทพมหานคร
	<i>Tetraspora</i> sp. TT	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพประกอบ	สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียว	แหล่งที่มา
	<i>Tetraspora</i> sp. TTS	คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
วิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน
ด้วยเครื่องมือ Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS)



รูปที่ ง-1 โครมาโตแกรมของชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ในสภาวะอาหารปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง-2 โครมาโตแกรมของชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง-3 โครมาโตแกรมของชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirGreen ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้