

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซัลเฟต
พอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก
BIOACTIVE COMPOUNDS OF SULFATE
POLYSACCHARIDE FROM MICROALGAE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ปีการศึกษา 2560

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและข้อมูลของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BIOACTIVE COMPOUNDS OF SULFATE
POLYSACCHARIDE FROM MICROALGAE



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

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MOMGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาระดับปริญญาตรีเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2017

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อเรื่อง การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์
จากสาหร่ายขนาดเล็ก

ชื่อนักศึกษา นางสาวเมวีญา โต๊ะถึง รหัสนักศึกษา 57050879
นางสาวอัญญา มานะ รหัสนักศึกษา 57050920

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2560
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. วนิดา ชูโชติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. จิตติ ท้าว ประธานกรรมการ	
ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
ผศ. วนิดา ชูโชติ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อเรื่อง	การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเมวียา โต๊ะถึง	รหัสนักศึกษา 57050879
	นางสาวอัญชญา มานะ	รหัสนักศึกษา 57050920
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. วีน่า ชูโชติ	

บทคัดย่อ

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 10 สายพันธุ์ โดยทำการคัดเลือก 3 สายพันธุ์ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ซึ่งพบว่า *Chlamydomonas* sp. P2 ผลิตซัลเฟตได้สูงสุด โดยมีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 5.618 ± 0.01 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ เท่ากับ 36.10 ± 1.77 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์มาศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช พบว่า *Scenedesmus* sp. S1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ร้อยละ 56.968 ± 7.29 สำหรับการศึกษาองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย พบว่าหมู่ฟังก์ชัน คือ ซัลเฟอร์ออกไซด์ และคาร์บอนิลซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบ และการทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารต้านมะเร็ง พบว่าสารสกัดของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ทดสอบในเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์ไตของลิง (Vero)

คำสำคัญ : ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ สาหร่ายขนาดเล็ก การต้านอนุมูลอิสระ การต้านมะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Bioactive Compounds of Sulfate Polysaccharide from Microalgae		
Students	MAYVEEYA TOTHUNG	Student ID	57050879
	ANCHANA MANA	Student ID	57050920
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang		
Academic Year	2017		
Advisor	Asst. Prof. Weena Choochote		

Abstract

Bioactivity of sulfated polysaccharides from ten microalgae strains were screened. Three microalgae strains : *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 and *Chlamydomonas* sp. P2 were studied for sulfated polysaccharides content. The results showed that, *Chlamydomonas* sp. P2 was the highest sulfated polysaccharides content, with values of 5.618 ± 0.01 in total sugar and 36.10 ± 1.77 g/l in total sulfated. FTIR spectrum data interpretation results showed that, the component of sulfated polysaccharides have sulfur oxide and carbonyl sulfide. The highest antioxidants of sulfated polysaccharides from *Scenedesmus* sp. S1 was $56.968 \pm 7.29\%$ in the DPPH. Sulfated polysaccharides of three microalgae strains exhibit have not been found to anticancer activity against the human colon adenocarcinoma (HT-29), human oral cavity carcinoma (KB) and african green monkey kidney fibroblast (Vero).

Keywords : Sulfated polysaccharides, Microalgae, Antioxidants activity, Anticancer activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ได้จัดทำตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. วีน่า ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ให้คำแนะนำและให้ความรู้ในการค้นคว้าและดำเนินงานวิจัย อีกทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เพื่อให้โครงการพิเศษสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. จิตติ ท่าไว และ ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทดลองในโครงการพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาที่ให้ความสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำโครงการพิเศษ พี่นักศึกษาปริญญาโท เพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความร่วมมือ และช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



เมวียา โต๊ะถึง
อัญชญา มานะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก	3
2.1.1 สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp.	4
2.1.2 สาหร่าย <i>Chlamydomonas</i> sp.	4
2.1.3 สาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp.	5
2.2 ระยะเวลาเจริญเติบโตของสาหร่าย	6
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย	7
2.3.1 แสง	7
2.3.2 ธาตุอาหาร	8
2.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์	8
2.3.4 ค่าความเป็นกรดต่าง	8
2.3.5 อุณหภูมิ	8
2.4 พอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย	8
2.5 การสกัดเซลล์พอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย	9
2.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	9
2.5.2 การสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง	9
2.6 สารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	10
2.6.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	11
2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งเซลล์มะเร็ง	12
2.7.1 dye exclusion	12
2.7.2 dye inclusion	12
2.7.3 fluorescein diacetate assay	12
2.7.4 MTT assay	13
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	17
3.1 สารเคมี	17
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	17
3.3 สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง	18
3.4 วิธีการดำเนินการ	19
3.4.1 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่าย	19
3.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง	20
3.4.3 การศึกษาการเจริญของสาหร่ายที่คัดเลือก	22
จากปริมาณผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง 3 สายพันธุ์	22
3.4.4 การศึกษาการสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	22
3.4.5 การศึกษาซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	23
3.4.6 การศึกษาองค์ประกอบซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค FTIR	23
3.4.7 การศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่าย	24
3.4.8 การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์	24
ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	24
3.4.8.1 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	24
3.4.8.2 การทดสอบการเป็นสารต้านมะเร็งด้วยวิธี MTT	24
3.4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	26
4.1 คัดแยกสายพันธุ์สาหร่าย	26
4.2 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์	28
ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์	28
4.2.1 วัฏจักรเจริญของสาหร่าย	28
4.2.2 ผลการศึกษาผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็ก	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ ของสาหร่ายขนาดเล็กที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง 3 สายพันธุ์	35
4.3.1 การวัดการเจริญของสาหร่าย	35
4.3.2 ผลการศึกษาการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก	37
4.3.3 ผลศึกษาองค์ประกอบซัลเฟตในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค ฟลูออริเมตริกอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์	41
4.4 วิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก	43
4.5 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	46
4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH	46
4.5.2 การทดสอบการเป็นสารต้านมะเร็ง	49
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	51
5.1 สรุปผลการวิจัย	51
5.2 ข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	61
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย	62
ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง	63
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลาย	70
ภาคผนวก ง ตารางแสดงผลการทดลอง	73
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.3 สายพันธุ์สำหรับรายขนาดเล็กทั้งหมดที่ใช้ศึกษา	18
4.1 ลักษณะเซลล์สำหรับรายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์	26
4.2 แสดงการเจริญเติบโตของสำหรับรายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์	32
4.3 แสดงการเจริญเติบโตของสำหรับรายขนาดเล็กทั้ง 3 สายพันธุ์	36
4.4 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสำหรับทั้ง 3 สายพันธุ์	40
4.5 แสดงองค์ประกอบภายในเซลล์ของสำหรับ 3 สายพันธุ์	44
4.6 แสดงความสัมพันธ์ของสารสำหรับ 3 สายพันธุ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	47
4.7 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสำหรับ	50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 2.1	แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Chlorella</i> sp.	4
รูปที่ 2.2	แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Chlamydomonas</i> sp.	5
รูปที่ 2.3	แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Scenedesmus</i> sp.	6
รูปที่ 2.4	ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย	6
รูปที่ 2.5	กลไกการเกิดปฏิกิริยา DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ	12
รูปที่ 2.6	แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay	13
รูปที่ 4.1	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 10 สายพันธุ์	30
รูปที่ 4.2	กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์	31
รูปที่ 4.3	กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์	31
รูปที่ 4.4	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณซัลเฟตของสาหร่าย 10 สายพันธุ์	34
รูปที่ 4.5	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	36
รูปที่ 4.6	กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	37
รูปที่ 4.7	กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	37
รูปที่ 4.8	แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ในถัง 6 ลิตร	38
รูปที่ 4.9	แสดงสาหร่ายที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการอบแห้ง	39
รูปที่ 4.10	สารสกัดส่วนใสของสาหร่ายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	39
รูปที่ 4.11	สารสกัดส่วนใส ที่ทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	39
รูปที่ 4.12	แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	40
รูปที่ 4.13	(ก) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากอาหารเหลว BG-11 (Control) (ข) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสารสกัดสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp. S1 (ค) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสารสกัดสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp.M14 (ง) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสารสกัดสาหร่าย <i>Chlamydomonas</i> sp. P2	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
รูปที่ 4.14	แสดงร้อยละขององค์ประกอบต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายแห้ง 3 สายพันธุ์	44
รูปที่ 4.15	แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ระดับความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์	48



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สาหร่ายขนาดเล็กพบได้ในแหล่งน้ำทุกประเภท มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ใช้เวลาในการเจริญเติบโตที่สั้นกว่าพืชชั้นสูง โดยสามารถเพิ่มปริมาณเป็นสองเท่าภายในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง (Chisti, 2007) สาหร่ายขนาดเล็ก เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีน พอลิแซคคาไรด์ ไขมัน วิตามิน และแคโรทีนอยด์ มีการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันมะเร็ง ป้องกันสภาวะไขมันในเลือดสูง ด้านการอักเสบ และมีฤทธิ์เสริมระบบภูมิคุ้มกัน (Qi and Kim , 2017)

ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ สามารถพบได้อย่างแพร่หลายในธรรมชาติ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่แล้วจะพบได้มาก ในสาหร่ายทะเล (สุวรรณี , 2557) ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์แต่ละชนิดมีลักษณะโครงสร้างและหน้าที่แตกต่างกัน เช่น อัลแวน (Ulvan) จากสาหร่ายสีเขียว กาแลกแตน (Galactan) และคาราจีแนน (Carrageenan) จากสาหร่ายสีแดง ฟุคอยแดน (Fucoidan) จากสาหร่ายสีน้ำตาล (Seema, 2012) ซึ่งซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่พบมีคุณสมบัติสำคัญ ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant) ด้านไวรัส ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และสารต้านอนุมูลอิสระ (Pereira *et al.*, 2005; Mohsen *et al.*, 2007)

ดังนั้นโครงการพิเศษที่ได้จัดทำขึ้นจึงมุ่งเน้นที่จะทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก เพื่อนำไปทดสอบการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1) เพื่อคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์
- 2) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง
- 3) เพื่อศึกษาองค์ประกอบของซัลเฟตในสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ทำการคัดแยกตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 2 สายพันธุ์ และจากห้องปฏิบัติการสาหร่ายจำนวน 8 สายพันธุ์ เพื่อเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์นำมาสกัดสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์โดยวิธีการสกัดด้วยน้ำ จากนั้นทำให้แห้งและทำการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการเป็นสารต้านมะเร็ง และสารต้านอนุมูลอิสระ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์
- 2) ทราบถึงประสิทธิภาพของสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งได้
- 3) เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่าย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่มีสีเขียวสด เหมือนสีใบไม้ เนื่องจากในเซลล์มีรงควัตถุพวก คลอโรฟิลล์ เอ และบี มากกว่ารงควัตถุชนิดอื่น รงควัตถุทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ สาหร่ายสีเขียวมีสมาชิกทั้งหมดราว 450 สกุล 7,500 ชนิด โดยประมาณร้อยละ 10 เป็นสาหร่ายทะเล ส่วนที่เหลือซึ่งเป็นส่วนใหญ่จะพบได้ในแหล่งน้ำจืด (สรฉัตร, 2560)

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทุกสภาวะแวดล้อม มีลักษณะโครงสร้างของเซลล์ มีการผลิตสารอินทรีย์หรืออาหารสะสมแตกต่างกัน โดยทั่วไปภายในเซลล์สาหร่าย ประกอบด้วยสารอาหารประเภทโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต สารสีและสารอื่นๆ ดังนั้นสาหร่ายขนาดเล็กจึงเป็นแหล่งผลิตสารสำคัญทางธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งในปัจจุบันมีการนำชีวมวลของสาหร่ายมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารสำหรับสัตว์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและอาหารเสริมสุขภาพ มีการนำสารสกัดจากสาหร่ายมาใช้ประโยชน์เช่น สารสีแคโรทีนอยด์ ไฟโคบิลิน กรดไขมัน พอลิแซ็กคาไรด์และวิตามิน (Gouveia *et al.*, 2007)

การใช้ประโยชน์ของสาหร่ายเขียวมีหลายรูปแบบ เช่น ประโยชน์ต่อระบบนิเวศ สาหร่ายดำรงชีวิตแบบออโตโทรฟิก เป็นสิ่งมีชีวิตที่ผลิตออกซิเจนให้แก่สิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ประมาณร้อยละ 50 ของออกซิเจนในน้ำเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยสาหร่าย นอกจากนี้สาหร่ายยังเป็นผู้ผลิต และเป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหารขั้นต้นของสิ่งมีชีวิตในน้ำ สาหร่ายที่สามารถใช้เพื่อการบริโภค ส่วนใหญ่พบว่าเซลล์จะมีการสะสม หรือผลิตสารต่างๆ เช่น เหล็ก โปแทสเซียม แคลเซียม และวิตามินบางชนิดสูง เช่น วิตามินบี 6 และ บี 12 ตัวอย่างเช่นสาหร่าย *Dunaliella* สามารถผลิตรงควัตถุในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยชนิดที่สำคัญคือ เบตาแคโรทีน เมื่อถูกย่อยสลายที่ดับแล้วจะได้วิตามินเอ ซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป คือช่วยในการเจริญเติบโตและการมองเห็น นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ซึ่งช่วยป้องกันโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคจอประสาทตาเสื่อม และความชราได้อีกด้วย (Burri, 1997) สาหร่ายยังสามารถนำมาใช้ผลิตเป็นพลังงานได้หลายแนวทางและที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบันคือ การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย (*Botryococcus*) ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและกรรมวิธีในการเพาะเลี้ยง และปัจจุบันมีการนำสาหร่ายหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลาย เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เครื่องสำอาง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 สาหร่าย *Chlorella* sp.

อนุกรมวิธาน (นริศรา, 2557)

Division Chlorophyta

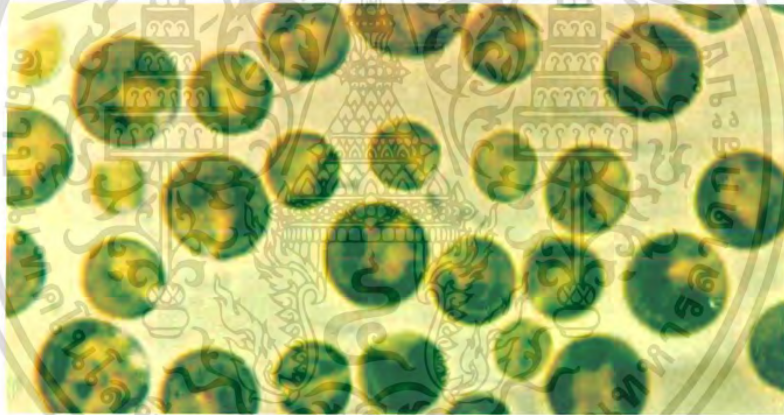
Class Trebouxiophyceae

Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

Chlorella sp. เป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยวมีขนาดเล็ก ประมาณ 1-10 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือรวมกันเป็นกลุ่มก้อน ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น ทรงกลม รูปไข่และรูปรีเซลล์มีหลายขนาดในสภาพแวดล้อมเดียวกัน *Chlorella* sp. มีคลอโรพลาสต์รูปร่างคล้ายถ้วยหรือระฆัง หรือเป็นแบบแถบข้าง (parietal) อาจมีหรือไม่มีเม็ดแป้ง ไม่มีแฟลกเจลลาและคอนแทรคไทล์แวคิวโอล (contractile vacuole) (Kumar and Singh, 1971) สารที่สำคัญที่สุดในเซลล์คือเบต้ากลูแคน ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน กำจัดอนุมูลอิสระ และลดไขมันในเลือด (Ramaraj *et al.*, 2017)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Chlorella* sp.

ที่มา : <https://www.theherbprof.com/hrbchlorella.htm>

2.1.2 สาหร่าย *Chlamydomonas* sp.

อนุกรมวิธาน (Kosei *et al.*, 2013)

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

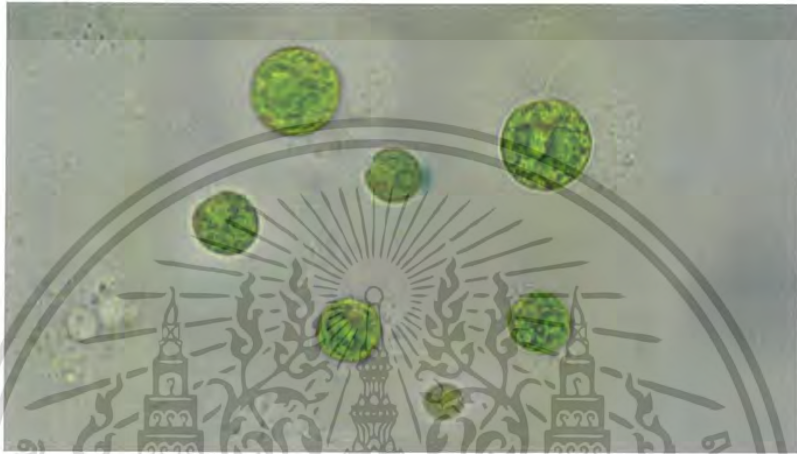
Order Volvocales

Family Chlamydomonadaceae

Genus *Chlamydomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlamydomonas sp. เป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดยาวประมาณ 10 ไมโครเมตรและกว้างประมาณ 3 ไมโครเมตรมีแฟลกเจลลา 2 สายทางด้านหน้าสำหรับการเคลื่อนที่มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่หนึ่งอันซึ่งกินเนื้อที่ ประมาณร้อยละ 40 ของเซลล์ และมีอายสปอตอยู่ที่ขอบด้านหนึ่งของคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ ช่วยรับแสงและทำให้เซลล์รับรู้ว่าจะเคลื่อนที่ไปยังทิศทางใด (Rochaix, 1995) มีประโยชน์ ในการนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในทางอุตสาหกรรมและการแพทย์ ยกตัวอย่างเช่น การผลิตพลังงานจากไฮโดรเจน การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอดีเซล (อัญชลี, 2555)



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Chlamydomonas* sp.

ที่มา : <http://botit.botany.wisc.edu/Resources/Botany/Chlorophyta/Chlamydomonas/Chlamydomonas.jpg.html>

2.1.3 สาหร่าย *Scenedesmus* sp.

อนุกรมวิธาน (Desikachary, 1959)

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

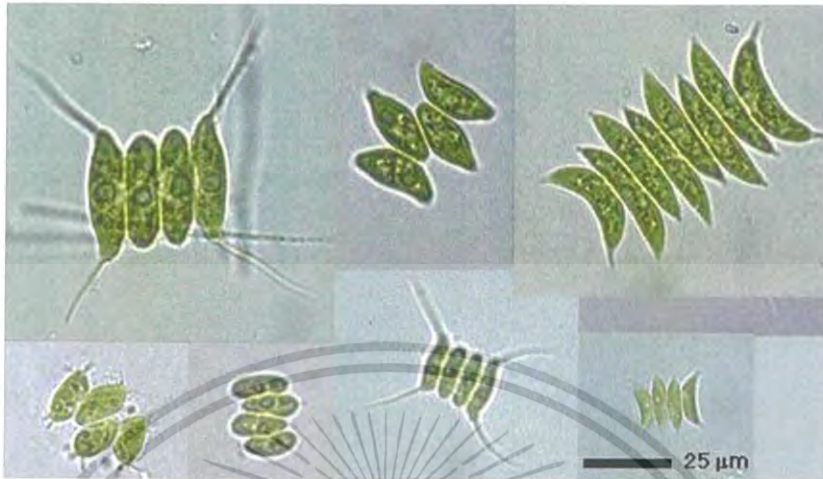
Order Chlorococcales

Family Scenedesmaceae

Genus *Scenedesmus*

Scenedesmus sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่พบมากในประเทศไทย พบในแหล่งน้ำนิ่งและน้ำ ไหล ดำรงชีวิตลอยล่องเป็นอิสระและแบบยึดเกาะ ส่วนมากมักพบเซลล์อยู่รวมกัน 2-32 เซลล์ มีลักษณะโค้ง รูปไข่หรือทรงกระบอก สาหร่ายชนิดนี้มีคุณสมบัติมากมายเนื่องจากเป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางอาหารสูงจึง สามารถใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมของมนุษย์และเป็นอาหารสัตว์ใช้ทำปุ๋ย ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย โดยประโยชน์ที่สำคัญและทำให้เกิดความสนใจคือสามารถผลิตสารให้เอ็กสตรัคทีฟประโยชน์แก่มนุษย์ได้ ได้แก่ คัลลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ไกลูทีน แอสต้าแซนทิน นิโอแซนทิน คาร์โบไฮเดรต และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน นอกจากนี้ยังใช้เป็น

เบต้าแคโรทีน วิโอลาแซนทิน และซีแซนทิน สารเหล่านี้มีคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระได้ นักวิจัยหลายท่านจึงพยายามสกัดสารเหล่านี้ออกมาจากสาหร่าย เพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพ ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ (Catarina *et al.*, 2013)

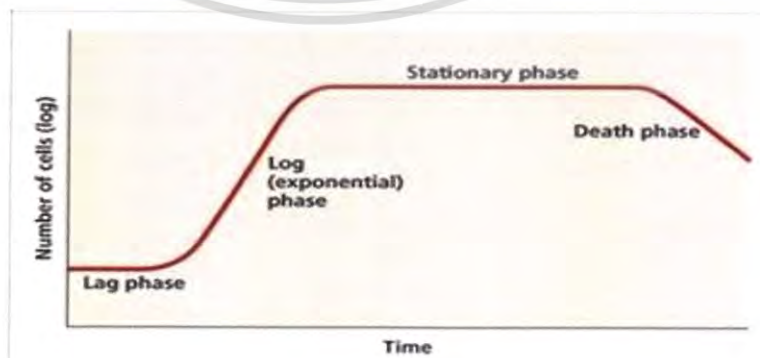


รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Scenedesmus* sp.

ที่มา : <https://matome.naver.jp/odai/2138867606676084201/2138876608030764203>

2.2 ระยะเวลาเจริญเติบโตของสาหร่าย

เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของเซลล์สาหร่าย และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยใช้วิธีทำกราฟแสดงความสัมพันธ์โดยใช้สเกลธรรมดาจึงไม่เหมาะสม เพราะเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่เร็ว ดังนั้น การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ และเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงมักใช้ค่า logarithmic (log) ของจำนวนเซลล์สาหร่าย ดังนั้น หากมีการทำกราฟเพื่อแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แกน Y ของกราฟจะเป็นค่า log ของจำนวนเซลล์สาหร่าย ส่วนแกน X จะเป็นเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จำนวนของเซลล์สาหร่ายที่สัมพันธ์กับเวลาแสดงเป็น growth curve ดังรูปที่ 2.4 (อัจฉรา, 2550)



รูปที่ 2.4 ระยะเวลาเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเชิงพาณิชย์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา : <https://sites.google.com/site/cytogenetics222/bthna/sell>
 “ไม่ว่าใครเด็ก” พงศน อภิสิทธิ์ หามสเท็ดแบงเนอติ และตีตองยี่ ฉองเงงเงง ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเซลล์สาหร่าย ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวแล้วปรับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจนให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะพบว่าเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะเป็นไปตามรูปที่ 2.4 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆได้ 4 ระยะดังนี้

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่าย เริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ สาหร่ายจะมีการปรับตัวเองให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆของระยะนี้ เซลล์อาจมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยและพร้อมที่จะแบ่งตัว ระยะ lag phase นี้ อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

2. Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และขบวนการต่างๆตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยา เป็นไปในทางเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตแล้วเข้าสู่ระยะ Stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง จึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตอีกด้วย

4. Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มจำนวนขึ้น อาจเป็นเพราะอาหารอาจจะหมด หรือมีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตหรือการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงระดับใหญ่ขึ้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิดต่างๆ โดยปัจจัยที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ แสง ธาตุอาหาร คาร์บอนไดออกไซด์ ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และออกซิเจน (Junying *et al.*, 2013)

2.3.1 แสง มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยความสามารถในการดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของสาหร่าย (680 หรือ 700 นาโนเมตร) จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่ายแต่ละชนิด เช่น *Chlorella* จะมีความสามารถดูดซับแสงสีแดงและสีเหลือง ตามลำดับ โดยทั่วไป ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจะใช้แสงสว่างไม่มากจากธรรมชาติ เนื่องจากสเปกตรัมของแสงธรรมชาติมีประโยชน์ต่อสาหร่ายมากกว่าแสงประดิษฐ์ (เช่น

แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์) แต่แสงจากธรรมชาติจะควบคุมได้ยาก อาจแรงเกินไปในวันที่แดดจ้า หรือน้อยเกินไปในวันที่มีฝน

2.3.2 ธาตุอาหาร ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้มีอัตราการเติบโตที่เหมาะสม ต้องใช้อาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นในปริมาณเพียงพอ โดยทั่วไป ธาตุอาหารหลักของสาหร่าย ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โปแตสเซียม นอกจากนั้นเป็นเกลือแร่อื่นๆ เช่น โคบอลต์ โมลิบดีนัม แมงกานีส และวิตามินชนิดต่างๆ เช่น วิตามินบี12 เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไป แหล่งของคาร์บอนมาจากอากาศ และการใช้แหล่งสารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กลูโคส หรือ อะซีเตต จะสามารถให้สาหร่ายเร่งผลผลิตชีวมวลได้ดี แต่เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงให้สูงขึ้น (Joel and Niels, 1988) ส่วนไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และโปแตสเซียม ได้จากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

2.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นปัจจัยที่จำกัด (limiting factor) สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กและของพืชอื่นๆ โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วงความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างร้อยละ 1-5 (โดยปริมาตร)

2.3.4 ค่าความเป็นกรดต่าง ค่าความเป็นกรดต่างเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก เนื่องจากมีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอน (inorganic carbon) ในรูปต่างๆ

2.3.5 อุณหภูมิ สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์จะสามารถทนอุณหภูมิได้ในช่วงที่ต่างกัน โดยสาหร่ายน้ำจืด เช่น *Chlorella* และ *Scenedesmus* มีความสามารถในการปรับตัวได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 5-35 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25-30 องศาเซลเซียส

2.4 พอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย

พอลิแซคคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ที่มีสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักเกิดจากโมโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไปจนถึง 1,000 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก พอลิแซคคาไรด์ในธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่มีสี ไม่มีรส เมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายคอลลอยด์ พอลิแซคคาไรด์เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ไกลแคน (Glycan) ประเภทของพอลิแซคคาไรด์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามโครงสร้าง คือโฮโมพอลิแซคคาไรด์ เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส เป็นต้น และเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ที่มากกว่าหรือเท่ากับสองชนิดมาเชื่อมต่อกันได้แก่ เพกติน อินูลิน กัม และวุ้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังแบ่งพอลิแซคคาไรด์ได้เป็น 2 กลุ่มตามหน้าที่ได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน เช่น แป้ง และไกลโคเจน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอลิแซคคาไรด์ ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืช และเปลือกภายนอกของสัตว์ เช่น เซลลูโลส และไคติน (ศุภศิษย์, 2552)

ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ เป็นสารประกอบเคมีที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถพบทั้งในคน สัตว์และพืช แต่ส่วนใหญ่มีมากพบใน สาหร่ายทะเล เช่น ฟูแคน ฟুকอยแดน เฮพาริน และคาร์ราจีแนน เป็นต้น โครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ส่วนใหญ่ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ซัลเฟต ซึ่งถือเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (สุวรรณี, 2557)

2.5 การสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย

2.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไปมักใช้น้ำกับ สารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เช่น เมทานอล เอทานอล อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม การสกัดสาร ต้านอนุมูลอิสระนั้นชนิดของตัวทำละลายเป็นสิ่งสำคัญต่อการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสาร ตัวอย่างและจะมีผลต่อปริมาณสารสกัด สภาพะในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ระยะเวลาและ อุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารสกัด กล่าวคือ เมื่อใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมส่งผล ให้ได้ปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้นระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจาก ระยะเวลาที่มีผลต่อการแพร่ (diffuse) ของสารต้านอนุมูลอิสระออกจากเซลล์เมมเบรนเข้าสู่สารละลาย (Perez-Jimenez and Saura-Calixto, 2006)

ตัวอย่างวิธีการสกัด นำสาหร่ายแห้ง 500 กรัม ทำให้มีขนาดเล็กด้วยการบดและเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปแช่บนเครื่องกวนสารเป็นเวลา 5 ชั่วโมง และนำมาสกัดด้วย เครื่องมือ soxhlet apparatus นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองสารสกัด ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส และนำไปทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer และเก็บผงแห้งในขวดสีชาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป สารสกัดที่ได้ เรียกว่า สารสกัดน้ำ และเตรียมด้วยวิธีเดียวกันโดยใช้ตัวทำละลายคือ เอทานอลร้อยละ 95 สารสกัดที่ได้เรียกว่า สารสกัด เอทานอล (ฐิติพรรณ และคณะ, 2558)

2.5.2 การสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการสกัด เป็นวิธีที่ใช้คลื่น เสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิก (Ultrasonic) ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัดสารต้าน อนุมูลอิสระจากสาหร่าย เครื่องมือชนิดนี้มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกมีขนาดความยาวและมีคลื่น ความถี่ที่แตกต่างกันไป โดยจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพาซึ่งในที่นี้คือ น้ำหรือ ตัวทำละลายอินทรีย์กระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดฟองก๊าซซึ่งเกิดการหดตัวและขยายตัวเป็น เอกสารวัฏจักร เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในสาหร่ายออกมาละลายในตัวทำละลาย และในขณะที่ ใม่ว่าที่ฟองก๊าซแตกออกจะเกิดความดันและความร้อนอย่างมากในบริเวณนั้นซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อของ

สาหร่ายฉีกขาด ด้วยอนุมูลมีที่สูงขึ้นทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น การสกัดด้วยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยหลายประการได้แก่ ความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้ ถ้าใช้ความถี่สูงจะใช้เวลาน้อยในการสกัด สมบัติที่แตกต่างกันของตัวทำละลาย ได้แก่ ความดันไอ ตัวทำละลายที่มีความดันไอสูงสามารถสกัดได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีความดันไอต่ำ อนุมูลมีที่ใช้ซึ่งการสกัดเกิดได้ดี เมื่อมีอนุมูลมีสูงและความเข้มของคลื่นเสียงที่ใช้โดยทั่วไปวิธีนี้จะใช้สกัดสารกลุ่มเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) ของพืช วิธีนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทำให้สกัดสารได้ปริมาณมาก (ดวงกมล, 2557ข)

2.6 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) หมายถึง สารใดๆก็ตามซึ่งมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งอิเล็กตรอนในโมเลกุล อนุมูลอิสระเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดโรค โดยผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โปรตีนและโมเลกุลต่างๆ ที่สำคัญ (ปริญา และอมรรรัตน์, 2556) อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ถูกปล่อยออกมาในรูปของโมเลกุลที่ไม่ครบวงจรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีจึงพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลตัวอื่น มีการทำลายเนื้อเยื่อส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหายทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรค (Halliwell *et al.*, 1992)

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) หมายถึง ปฏิกิริยาที่อะตอมหรือโมเลกุลมีการสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันจัดเป็นครึ่งปฏิกิริยาของปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction reaction) ซึ่งหมายถึงปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการรับหรือส่งอิเล็กตรอนของอะตอมหรือโมเลกุลหนึ่งไปอีกอะตอมหรือโมเลกุลหนึ่ง (Raymond, 2005) ซึ่งผลของปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารประกอบที่ต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการรับอิเล็กตรอนมาไว้ในตัวเองและสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปได้อิสระ ถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิเดชันอนุมูลอิสระหรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
 ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (เจนจิรา และประสงค์, 2554)
 ไม่วากรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่

2.6.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butyl hydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorny *et al.*, 2001)

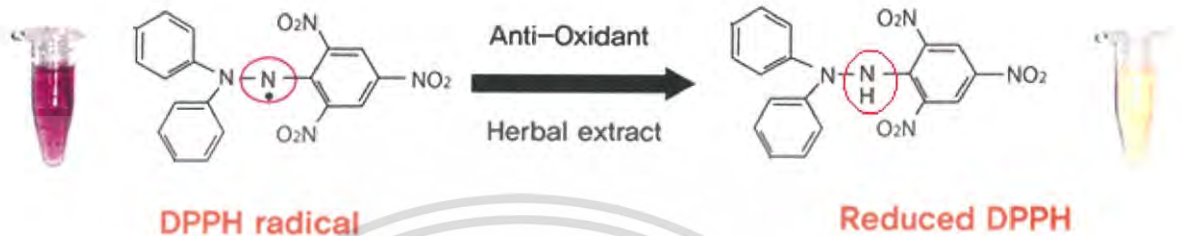
2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ซึ่งเป็นที่ตั้งของเอนไซม์วิตามินและสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไฮโดรฟิลาซิม วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน และกลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกัน อันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไฮโดรฟิลาซิมและเมมเบรน ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็น เอนไซม์ ได้แก่ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส กลูตาไธโอนรีดักเทส และกลูตาไธโอนทรานสเฟอเรส ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นออกซิเจนและน้ำ สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ และยูบิควิโนนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระ ออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (บุหรัน และคณะ, 2553)

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวัตถุดิบจากแหล่ง ธรรมชาติต่าง ๆ เช่น พืช ผลไม้ รวมไปถึงสาหร่าย ได้มี การศึกษากันอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากสาหร่ายจัดเป็นอีกแหล่งหนึ่งของสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ซึ่งสามารถสกัดได้โดยใช้ตัวทำละลาย อินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล เป็นต้น (Dai and Mumper, 2010) ในขณะที่การใช้น้ำร้อนในการสกัดสารสกัดจากสาหร่ายจะทำให้ได้สารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ (Jiao *et al.*, 2011) โดยประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสาร สกัดจากสาหร่ายที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ชนิดของพอลิแซคคาไรด์ รงควัสดุแคโรทีนอยด์ เช่น ฟุโคแซนทิน เป็นต้น รวมทั้ง โปรตีน ที่แตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด (Farvin and Jacoben, 2013) นอกจากนี้ ปริมาณและตำแหน่งของหมู่ซัลเฟตบนโครงสร้างน้ำตาลที่ แตกต่างกันของพอลิแซคคาไรด์ที่สารสกัดได้จากสาหร่าย ชนิดต่างๆ ยังมีผลต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Duarte *et al.*, 2001)

ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็น เอกลักษณ์เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า วิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด การทดสอบความสามารถใน ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลาย โดยอาศัยหลักการ คือ เมื่อ อนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายสีม่วงได้รับอิเล็กตรอนจากสารสกัดสาหร่าย จะกลายเป็นสารประกอบ DPPH ที่เสถียรขึ้น และไม่มีสีม่วงเหมือนกับอนุมูลอิสระ DPPH ทำให้ตรวจวัดความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากสาหร่ายได้ จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ที่ลดลง ซึ่ง DPPH ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Singh and Rajini, 2004)



รูปที่ 2.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยา DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา : <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>

2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งเซลล์มะเร็ง

วิธีการทดสอบ (วิชชุตา และคณะ, 2556)

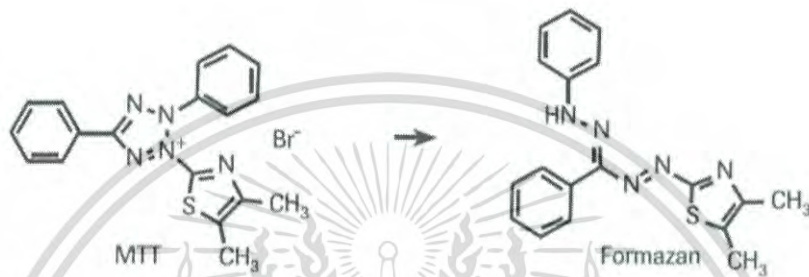
2.7.1 dye exclusion เช่น trypan blue, naphthalene black เป็นการย้อมเซลล์จากหลักการที่เซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมเนื่องจากเซลล์เมมเบรนยังทำหน้าที่ในการขับสีย้อมออกมา ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีย้อม เนื่องจากการเสื่อมสภาพของเซลล์เมมเบรน ข้อดีคือ รวดเร็ว และง่ายต่อการแปลผล ข้อจำกัดคือ อาจนับจำนวนของเซลล์ได้มากเกินจริง เนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้ว อาจยังมีเซลล์เมมเบรนที่ยังสามารถทำหน้าที่ได้อยู่

2.7.2 dye inclusion เช่น neutral red assay เป็นการตรวจสอบการมีชีวิตโดยอาศัยหลักการวัดปริมาณสีย้อมใน lysosomes ของเซลล์ด้วยการวิเคราะห์ด้วยค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometric analysis) ข้อดีคือ เป็นการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างแท้จริง ข้อจำกัดคือ จำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการบ่มและระยะเวลาที่ใช้ในเซลล์แต่ละชนิด เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดจะจับกับสีย้อมในปริมาณที่ไม่เท่ากัน

2.7.3 fluorescein diacetate assay อาศัยหลักการที่สารเรืองแสง (fluorescein diacetate) เข้าไปในเซลล์ และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ esterases และทำให้ไม่สามารถปล่อย fluorescein ออกมานอกเซลล์ได้เนื่องจากถูกป้องกันด้วยเซลล์เมมเบรนของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งสามารถตรวจสอบหาเซลล์ที่มี fluorescein ภายใต้แสง UV ข้อดีคือ รวดเร็ว ข้อจำกัดคือ ต้องใช้ UV เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

microscope ที่ตรวจหากรดนิวคลีอิก หรือ flow cytometry ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ลงสู่เซลล์ที่ผ่านการย้อมสารเรืองแสง

2.7.4 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นปฏิกิริยา MTT reduction วัดการเกิดสารที่ให้สีจากการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีของเซลล์ ข้อดีคือ วิเคราะห์ใน 96-well array โดยใช้ automatic plate readers สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างและรวดเร็ว ข้อจำกัดคือ อาจมีบางเซลล์ยับยั้งการแสดงของ MTT reduction ทำให้ได้ค่าต่ำซึ่งจะไม่สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต



รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay

ที่มา : <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>

หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้นที่สามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase เปลี่ยนสาร MTT ให้เป็น formazan ซึ่ง formazan ที่ได้จะมีสีม่วงน้ำเงินและมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 550-600 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสี formazan และปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (Mosmann, 1983 ; Denizot and Lang, 1986)

กลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์มีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ ปริมาณการแทนที่ของหมู่ซัลเฟต ขนาดโมเลกุล ตำแหน่งการแทนที่ ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบและชนิดของพันธะไกลโคซิดิก แต่ปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดได้แก่ ปริมาณการแทนที่ของหมู่ซัลเฟต (Duarte *et al.*, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ฐิติกานต์ (2550) รายงานว่า การศึกษาเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยใช้เอทานอล และน้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาหร่ายเตา *Spirogyra* จากผลการทดลองหาปริมาณสารสกัดจากสาหร่าย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในการทดลองการขจัดอนุมูล ABTS+ λ พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายเตาที่สกัดด้วยน้ำให้ปริมาณสารสกัด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และมีคุณสมบัติในการขจัดอนุมูล ABTS+ λ ได้สูงกว่าสารสกัดจากสาหร่ายเตาที่สกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีขั้วสูง จึงเป็นไปได้ว่าสารนี้จะละลายได้ในน้ำซึ่งมีความเป็นขั้วสูงกว่าเอทานอล จึงทำให้ได้ปริมาณสารฟีนอลิกที่มากกว่า

ดวงกมล (2557ก) รายงานว่า *Scenedesmus armatus* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 85.33 ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหรือคือวิตามินซีที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 135.33

ลินจง และคณะ (2554) รายงานว่า จากการนำสารสกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลร้อยละ 95 ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก จำนวน 10 สายพันธุ์ มาประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความสามารถในการแย่งจับเพอร์ร็อกไซด์ไอออน และความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน พบว่า โดยทั่วไปสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ โดยสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. W53 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 54.70 ± 2.97 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Monoraphidium* sp. W53 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด (EC50 เท่ากับ 1.1492 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอล จาก *Chlorella* sp. W54 มีความสามารถในการแย่งจับเพอร์ร็อกไซด์ไอออนที่ดี โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 0.3665 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วรรณณี และเพ็ญศรี (2558) รายงานว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ BHT (ร้อยละ) ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำ ในช่วงความเข้มข้น 5-3,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าให้ร้อยละการยับยั้งระหว่าง 16.64-57.41, 48.39-74.73 และ 48.84-76.29 ตามลำดับส่วน BHT ที่ใช้เป็นสาร มาตรฐานให้ร้อยละการยับยั้งระหว่าง 91.60-98.06 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ BHT ของสารสกัดทั้งสามตัวทำละลายพบว่าทุกความเข้มข้นมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ BHT ได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม หากใช้ขนาดความเข้มข้นที่สูงจึงจะมีค่ายับยั้งอนุมูลอิสระ BHT มากขึ้นใกล้เคียงกับกับ BHT (97.26) โดยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีร้อยละการยับยั้งสูงสุด (76.29+1.25) รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (74.73+2.76) น้อยที่สุดในสารสกัดด้วยเอทานอล (57.41+2.03) แสดงให้

เห็นว่าสารสกัดน้ำมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ได้ดีที่สุด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทั้งเอทิลอะซีเตตและน้ำได้ค่าฤทธิ์ต้านสูงกว่า แต่สารสกัดด้วยเอทานอลมีค่าต่ำกว่า จากการศึกษาพบว่ามีแนวโน้มว่าฤทธิ์ต้านดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดซึ่งจากศึกษาซึ่งพบ 0.721, 0.362 และ 7.09 มิลลิกรัมต่อกรัมของสาหร่ายแห้งในสารสกัดด้วยเอทานอล เอทิลอะซีเตต และน้ำ ตามลำดับ กล่าวคือ สารสกัดจากน้ำมีสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด

วสันต์ และคณะ (2556) รายงานว่า ปริมาณสารสกัดหยาบของสารสกัด จากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดได้แก่สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) จัดในกลุ่ม สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) สาหร่ายหุ่น (*Sargassum oligocystum*) จัดอยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) และสาหร่ายเขากวาง (*Gracilaria changii*) จัดในกลุ่มของสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) ที่ทำการสกัดด้วยตัวละลายที่แตกต่างกันได้ พบว่าการใช้น้ำร้อนในการสกัดให้ปริมาณสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดมากกว่าการใช้เอทานอลในการสกัด โดยในการใช้น้ำร้อนในการสกัดสาหร่ายเขากวางให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 55.53 ในขณะที่การสกัดสารจากสาหร่ายโดยใช้เอทานอล พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่นให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 17.46 ทั้งนี้การใช้ชนิดตัวทำละลายต่างกันในการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารสกัดของสาหร่ายที่ได้แตกต่างกัน

ศิริลักษณ์ และคณะ (2557) รายงานว่า ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายผสมนางสามารถสกัดโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และพบว่าสารสกัดที่ได้มีปริมาณร้อยละ 5.41 และ 9.66 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการสกัดโดยใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้การสกัดเกิดได้ดีกว่าการสกัดที่อุณหภูมิห้อง

สุวรรณี (2557) รายงานว่า การทดสอบร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ Hela เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก เมื่อทำการทดสอบด้วยสารที่มีความเข้มข้น 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของสารมากกว่า 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเทียบกับความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติพบว่าความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งไม่แตกต่างจากเซลล์ปกติ

Attachai and Anong (2010) รายงานว่า การใช้น้ำซึ่งจัดเป็นตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นสูง (ดัชนีความเข้มข้นเท่ากับ 10.2) ในการสกัดร่วมกับอุณหภูมิและความดัน ส่งผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้มากกว่าการใช้เอทานอลซึ่งจัดเป็นตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นระดับปานกลาง (ดัชนีความเข้มข้นเท่ากับ 5.1) โดยน้ำมีความสามารถในการสกัดสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ซึ่งจัดเป็นองค์ประกอบหลักที่พบได้มากในผนังเซลล์ของสาหร่ายขนาดใหญ่หลายชนิดและสามารถสกัดออกมาได้โดยการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Boonchum. *et al.* (2011) รายงานว่า สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายสีน้ำตาลได้แก่ *Sargassum binderi* และ *Turbinaria conoides* ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอล

Suresh. *et al.* (2013) รายงานว่า มีการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) และ A549 (Human epithelial lung carcinoma cell line) โดยการใช้ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดมาจาก *Sargassum plagiophyllum* พบว่า ปริมาณซัลเฟตเป็นปัจจัยที่สำคัญ ซึ่งการจับของหมู่ซัลเฟต 62 กับโมเลกุลของโปรตีนบนผิวเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

1. อาหารสูตร BG 11 สูตรอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก-1)
2. อาหารสูตร BG 11 สูตรอาหารเหลว (ภาคผนวก ก-2)
3. ฟีนอล (Phenol) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR
4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Sulfuric acid) ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR
5. แบเรียมคลอไรด์ (Barium chloride) ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR
6. สารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ; ยี่ห้อ Sigma-aldrich เกรด AR
7. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR
8. สารละลาย MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ยี่ห้อ molecular probes : AR
9. สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide : DMSO) ; ยี่ห้อ Loba : เกรด AR
10. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate : SDS) ; ยี่ห้อ Sigma-aldrich เกรด GC
11. ปีโตรเลียมอีเทอร์ ; ยี่ห้อ Penreac : เกรด ACS
12. เอทานอล (ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 95 ; ยี่ห้อ Merck : เกรด AR
13. กรดบอริก (Boric acid) ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR
15. โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate) ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR
16. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper II sulfate) ; ยี่ห้อ Ajax Finechem : เกรด AR

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright field microscope) ; Olympus : CH-30RF200
2. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยมสองตำแหน่ง ; Adventure : ARC120
3. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยมสี่ตำแหน่ง ; Sartorius : BSA224S
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ; Hermele : Z326HK
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) ; Eppendorf : 5415R
6. เครื่องเขย่า (Opbital shaker) ; Gallenkamp
7. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) ; Ultrabasic : UB-10
8. เครื่องย่อยโปรตีน ; Gerhardt : KB8S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 9. เครื่องกลั่นโปรตีน ; Gerhardt : Vapodest 30s
 ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. เครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporators) ; Heidolph
11. เครื่องวัดแสง (Lux meter) ; LX1010BS
12. เครื่องผสมสาร (Vortex) ; Vortex Mixer GENIE 2 : G560E
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ; Shimadzu : UV-1280
14. ตู้ปลอดเชื้อแบบไบโอฮาซาด ; M-Tech ; Cleanline BS-120
15. ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ (Hot air oven) 50 องศาเซลเซียส ; BINDER : ED53
16. ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ; Contherm : thermotec 2000
17. ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ; WTB Binder ; FD53
18. ตู้ดูดควัน (Fume Hood) ; Astercair : Astec
19. เตอบไมโครเวฟ ; Sumsung : m1913
20. โถดูดความชื้น ; Glaswerkwertim Duran : GL32 DN300
21. หม้อนึ่งความดันไอ ; Toomy : ES-315
22. ฮีมาไซโตมิเตอร์ ชนิด Improved neubauer ; BOECO Germany
23. เตาเผาอุณหภูมิสูง (Furnaces) ; Gallenkamp : FT01/150
24. เครื่องฟลูเรียทรานฟอร์มฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) (FTIR) ; Nicolet : 6700
25. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ; biochrom : EZ Read 2000
26. ตู้เก็บเชื้อ -80 องศาเซลเซียส ; TSU Series : TSU 500
27. เครื่องฟรีซดราย ; lyotab : 3000

3.3 สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กทั้งหมดที่ใช้ศึกษา

ตารางที่ 3.3.1 สายพันธุ์สาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

ลำดับที่	สายพันธุ์สาหร่าย	รหัส	แหล่งที่มา	วันที่เก็บตัวอย่าง
1	<i>Chlorella</i> sp.	T10	บ่อน้ำ คณะเกษตร สจล.	12/1/61
2	<i>Scenedesmus</i> sp.	S1	บ่อปลา ตึกพระเทพ สจล.	5/2/61

ตารางที่ 3.3.2 สายพันธุ์สาหร่ายจากห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะวิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ลำดับที่	สายพันธุ์สาหร่าย	รหัส	แหล่งที่มา
1	<i>Chlorella</i> sp.	5	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะวิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3.2 สายพันธุ์สาหร่ายจากห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะวิทยาศาสตร์
ภาคชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (ต่อ)

2	<i>Chlorella</i> sp.	N11	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะ วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.
3	<i>Chlorella</i> sp.	V55	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะ วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.
4	<i>Scenedesmus</i> sp.	F14	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะ วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.
5	<i>Scenedesmus</i> sp.	F15	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะ วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.
6	<i>Scenedesmus</i> sp.	M12	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะ วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.
7	<i>Scenedesmus</i> sp.	M14	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะ วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.
8	<i>Chlamydomonas</i> sp.	P2	ห้องปฏิบัติการสาหร่าย คณะ วิทยาศาสตร์ ภาคชีววิทยา สจล.

3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1 คัดแยกสายพันธุ์สาหร่าย

3.4.1.1 คัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ จากนั้นนำมาคัดแยกด้วยวิธี Spread - plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร BG-11 ให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสงเท่ากับ 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 7-14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำโคโลนีที่แยกได้มาแยกให้ได้สายพันธุ์สาหร่ายที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร BG-11 นำสายพันธุ์สาหร่ายที่แยกได้ มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อศึกษารูปร่าง ลักษณะ ชนิดของสาหร่าย จากนั้นนำเชื้อสาหร่ายที่บริสุทธิ์ถ่ายลงในหลอดอาหารเลี้ยง และนำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.1.2 สาหร่ายจากห้องปฏิบัติการสาหร่าย

นำสาหร่ายจากห้องปฏิบัติการสาหร่ายมาเพาะเลี้ยง 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. 5

Chlorella sp. N11, *Chlorella* sp. V55, *Scenedesmus* sp. F14, *Scenedesmus* sp. F15, *Scenedesmus* sp. M12, *Scenedesmus* sp. M14, *Chlamydomonas* sp. P2 และ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่าย 2 สายพันธุ์ที่แยกได้ คือ *Chlorella* sp. T10 , *Scenedesmus* sp. S1 ที่เก็บในตู้เย็น ออกมาให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสงเท่ากับ 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อให้สาหร่ายมีการปรับตัว จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงสูตร BG-11 ภายใต้การให้แสงอย่างต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสงเท่ากับ 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถผลิตซิลิเกตพอลิแซคคาไรด์สูง

3.4.2.1 การวัดการเจริญของสาหร่าย

ตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติก 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องมือที่ความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการถ่ายเชื้อสาหร่ายจากหลอดอาหารเลี้ยงลงในพลาสติกอาหารเหลว BG-11 จำนวน 1-2 ลูกบาศก์ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และนำพลาสติกอาหารเหลวที่ได้รับการถ่ายเชื้อแล้ว มาเพาะเลี้ยงในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.3

ตอนที่ 2 การวัดการเจริญของสาหร่าย

เตรียมอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 150 มิลลิลิตรในพลาสติก 250 มิลลิลิตร นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากตอนที่ 1 ซึ่งหัวเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร) ใส่ในพลาสติกที่มีอาหารเหลว 150 มิลลิลิตร ในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยทำการวัดการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ทุกๆ 2 วัน ซึ่งในการวัดการเจริญของสาหร่ายมีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข-1) นับจำนวนเซลล์ (ภาคผนวก ข-2) หาหน้าหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข-3) และอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่าย (ภาคผนวก ข-4) จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์มากที่สุด

ตอนที่ 1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

นำสาหร่ายจากห้องปฏิบัติการสาหร่ายมาเพาะเลี้ยง 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp.5, *Chlorella* sp.N11, *Chlorella* sp.V55, *Scenedesmus* sp.F14, *Scenedesmus* sp.F15, *Scenedesmus* sp.M12, *Scenedesmus* sp.M14, *Chalmydomonas* sp.P2 และสาหร่าย 2 สายพันธุ์ที่แยกได้ คือ *Chlorella* sp.T10, *Scenedesmus* sp.S1 ปริมาตรทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารสกัดส่วนใส ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงด้วยตัวทำละลายน้ำ จากนั้นนำสารสกัดไปตรวจสอบการเป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก ในอัตราส่วนสารสกัด 1 มิลลิลิตร : ฟีนอล 1 มิลลิลิตร : กรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัด เทียบจากกราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงในรูป ค-1 (ภาคผนวก ค)

ตอนที่ 2 วิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธีตกตะกอนแบเรียมคลอไรด์

นำสารสกัดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแล้ว ใสในแอฟเฟิลดรอปขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟต โดยตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ (ความเข้มข้นร้อยละ 4) ที่อัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักตะกอน และบันทึกน้ำหนักตะกอน

ตอนที่ 3 ทำการวิเคราะห์ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายทั้ง 10 สายพันธุ์

ทำกราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณน้ำตาล และปริมาณซัลเฟต และทำการเลือกสาหร่ายที่มีปริมาณน้ำตาลและปริมาณซัลเฟตสูงที่สุด 3 สายพันธุ์ เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การศึกษาการเจริญของสาหร่ายที่คัดเลือกจากปริมาณการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ สูงสุด 3 สายพันธุ์

3.4.3.1 วัฏการเจริญของสาหร่าย

ตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์เวลา 15 นาที แล้วทำการถ่ายเชื้อสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จากหลอดอาหารเอียงลงในอาหารเหลว BG-11 จำนวน 1-2 ลูบ และนำสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 3-5 วัน ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.3

ตอนที่ 2 การวัฏการเจริญของสาหร่าย

เตรียมอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 600 มิลลิลิตรในขวดแก้วขนาด 700 มิลลิลิตร จำนวน 20 ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งความดันสูงที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารทะเลสกัดน้ำพลาสติกขนาด 6 ลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยการแช่แอลกอฮอล์ จากนั้นลวกด้วยน้ำร้อน และเจาะฝาขวดและต่อสายยางเพื่อให้อากาศ โดยใส่อาหารเหลวถึงละ 4 ลิตร (สายพันธุ์ละ 3 ขวด) แต่ละถังใส่หัวเชื้อสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงสุด ซึ่งหัวเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.3 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร) จากนั้นนำถังต่อเข้ากับอุปกรณ์ให้อากาศ ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ ทำการวัฏการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ทุกๆ 2 วัน โดยวัฏการเจริญของสาหร่าย ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ และหาหน้าหนักเซลล์แห้ง หาปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธีตกตะกอนแบเรียมคลอไรด์ และวัดปริมาณน้ำตาลของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

3.4.4 การสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์

นำสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงสุดพันธุ์ ที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ปิดเครื่องให้อากาศและตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้สาหร่ายปล่อยสารจำพวกพอลิแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำออกมานอกเซลล์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารสกัดส่วนใส ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องไมวากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้สารสกัดในรูปของของเหลวชั้นหนืดสีเหลือง (สารสกัดลดลงจากเดิม 10 เท่า) (จิรพันธ์, 2555) นำสารสกัดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อระเหยน้ำส่วนเกิน และเพื่อให้สารสกัดมีน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำสารสกัดไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.4.5 การศึกษาซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ (Total sugar) ด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน (Dubois *et al.*, 1956)

นำสารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงสุด ไปตรวจสอบการเป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก ในอัตราส่วน สารสกัด 1 มิลลิลิตร : ฟินอล 1 มิลลิลิตร : กรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัด โดยคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานกลูโคส แสดงในรูปที่ ค-1 (ภาคผนวก ค)

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจากณัฐภูมิ, 2555)

นำสารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงสุด มาวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ (ความเข้มข้นร้อยละ 4) ที่อัตราส่วน 1: 1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รินสารสกัดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักตะกอน และบันทึกน้ำหนักตะกอน

3.4.6 วิเคราะห์องค์ประกอบซัลเฟตในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค FTIR (Fimbres-Olivarria *et al.* , 2018)

นำสารสกัดที่ทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ไปใส่ที่แท่นวางตัวอย่างของเครื่อง FTIR Spectrometer ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในช่วงคลื่น 4,000-400 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์หรือหมู่ฟังก์ชันที่มีอยู่ในโมเลกุลสารสกัดที่ต้องการตรวจสอบ ทำการใช้ software ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง เครื่องจะทำการสแกน จนกระทั่งได้ความถี่ตำแหน่งของพีคออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์บุรีรัมย์ ขอสงวนสิทธิ์ในเนื้อหาและข้อมูลทั้งหมด ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.7 การศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงสุด 3 สายพันธุ์

นำเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในข้อที่ 3.4.4 มาทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้อบลมร้อน จากนั้นนำไปทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และบันทึกน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดที่ได้ จากนั้นนำเซลล์แห้งดังกล่าวไปใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้ การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเถ้า ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณความชื้น และปริมาณคาร์โบไฮเดรต

3.4.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์

3.4.8.1 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของอนุภาคของสาร DPPH โดยจะเจือจางสีของสาร DPPH ให้มีความเข้มข้น 0.16 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอลร้อยละ 95 ในที่มืด นำสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.16 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที วัดการดูดกลืนสีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการจับอนุมูลอิสระ DPPH (kumar และคณะ, 2008) (ภาคผนวก ค-4)

3.4.8.2 การทดสอบการเป็นสารต้านมะเร็งด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

ตอนที่ 1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

นำสารสกัดในรูปของของเหลวชั้นหนืดสีเหลือง ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศมาทำให้สารสกัดแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารสกัดแบบผง

ตอนที่ 2 วิธีการละลายตัวอย่าง

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 0.1 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อเพื่อเตรียมเป็น stock จากนั้นทำการละลายตัวอย่างเพื่อเตรียมเป็น stock ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเติมสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffer saline, pH 7.4) ให้มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นกรองสารขนาด 0.45 ไมโครเมตร

เก็บเป็น stock เพื่อเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ทดสอบต่อไป

ตอนที่ 3 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ปลูกเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29), เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และ เซลล์ไตของลิง (L929) จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่ม เซลล์ครบ 24 ชั่วโมง เติมนสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการบ่มเซลล์ในสารละลายตัวอย่างนาน 20 ชั่วโมง จากนั้นเติมนสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ ใน MTT ครบ 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ที่ทิ้ง และเติมนสารละลายสำหรับละลายผลึกฟออร์มาซาน ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (ร้อยละ 100) : สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate ร้อยละ 10) อัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยตั้งโปรแกรมเขย่า 5 นาทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (เก็บตัวอย่างการทดลองละ 3 ซ้ำ) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางเดียวด้วยวิธี One-Way ANOVA และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC version 11 และ Microsoft windows excel 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 คัดแยกสายพันธุ์สาหร่าย

จากการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธี Spread plate จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสูตร BG-11 ได้สาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. T10 และ *Scenedesmus* sp. S1 และสาหร่ายจากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp.5, *Chlorella* sp.N11 *Chlorella* sp. V55, *Scenedesmus* sp.F14, *Scenedesmus* sp.F15, *Scenedesmus* sp.M12 *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp.P2 พบว่าสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะดังนี้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์

สาหร่ายสายพันธุ์	ภาพเซลล์สาหร่ายที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า	ลักษณะของเซลล์
1. <i>Chlorella</i> sp. T10		ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรี ผนังเซลล์ค่อนข้างบาง คลอโรพลาสต์เป็นแบบแถบ ข้างเซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีแฟลกเจลลัม
2. <i>Chlorella</i> sp. 5		ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรี ผนังเซลล์ค่อนข้างบาง คลอโรพลาสต์เป็นแบบแถบ ข้างเซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีแฟลกเจลลัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. <i>Chlorella</i> sp. N11		ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรี ผนังเซลล์ค่อนข้างบาง คลอโรพลาสต์เป็นแบบแถบข้าง เซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีแฟลกเจลลัม
4. <i>Chlorella</i> sp. V55		ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรี ผนังเซลล์ค่อนข้างบาง คลอโรพลาสต์เป็นแบบแถบข้าง เซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีแฟลกเจลลัม
5. <i>Scenedesmus</i> sp. S1		ลักษณะมีรูปร่างกลมรี เรียงต่อกันประมาณ 2 หรือ 4 เซลล์ มีไฟรีนอยด์และนิวเคลียสอยู่ในเซลล์
6. <i>Scenedesmus</i> sp. F14		ลักษณะมีรูปร่างกลมรี เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เรียงต่อกันประมาณ 4 เซลล์ มีไฟรีนอยด์และนิวเคลียสอยู่ในเซลล์
7. <i>Scenedesmus</i> sp. F15		ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว มีคลอโรพลาสต์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีแฟลกเจลลัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. <i>Scenedesmus</i> sp. M12		ลักษณะรูปร่างคล้ายกระสวยปลายมน บางครั้งพบคลอโรพลาสต์ไม่เป็นแผ่นเต็มเซลล์ มีไฟรีนอยด์และนิวเคลียส
9. <i>Scenedesmus</i> sp. M14		ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงจ่อกัน 4 เซลล์ แต่ละเซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีไฟรีนอยด์ 1 อัน
10. <i>Chlamydomonas</i> sp. P2		ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกระจุก มีรูปร่างทรงกลมหรือวงรี เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา 2 เส้น มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย มีไฟรีนอยด์ 1 อัน

4.2 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

4.2.1 วัฏการเจริญของสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T10, *Chlorella* sp. 5, *Chlorella* sp. N11, *Chlorella* sp. V55, *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. F14, *Scenedesmus* sp. F15, *Scenedesmus* sp. M12, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ โดยทำการวัฏการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ทุกๆ 2 วัน ซึ่งในการวัฏการเจริญของสาหร่ายมีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข-1) นับจำนวนเซลล์ (ภาคผนวก ข-2) และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข-3) และอัตราการเจริญไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเด็ดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเพาะของสาหร่าย (ภาคผนวก ข-4) จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (ภาคผนวก ง) พบว่าสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1-4.3)

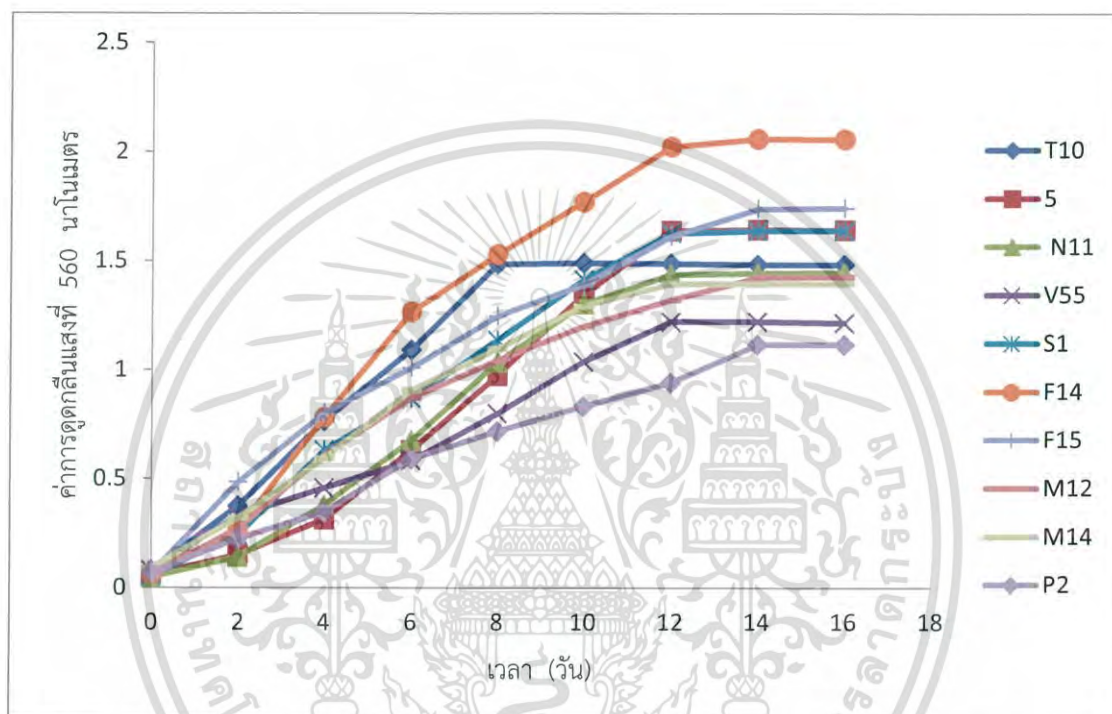
จากผลการทดลองตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. T10 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 3.38 และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.87 กรัมต่อลิตร รองมาคือ *Chlorella* sp. N 11 และ *Chlorella* sp. 5 โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 2.62 และ 2.31 ตามลำดับ และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.87 และ 0.70 ตามลำดับ เนื่องจากความสัมพันธ์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจำนวนเซลล์มีความสอดคล้องกัน *Chlorella* sp. จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ค่าของน้ำหนักแห้งสูงตามไปด้วย ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของทวีทรัพย์ และคณะ (2559) ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิแซคคาไรด์ 3 สายพันธุ์ พบว่าผลผลิตของน้ำหนักเซลล์แห้งมีผลแปรผันตรงกับค่าการเจริญจำเพาะสูงสุด ซึ่งแสดงการอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งที่เหมาะสมแก่การนำไปเพิ่มปริมาณ

สอดคล้องกับงานวิจัยของ วินา และคณะ (2557) เรื่องการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูง จากการศึกษาการเจริญ ในระดับพลาสม่า ทำการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอด ฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ พบว่าส่วนใหญ่สาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์ คือ *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. ED54, *Scenedesmus* sp. W53, *Chlorella* sp. RW54, *Chlorella vulgaris* เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ใน วันที่ 10 ของการทดลอง ยกเว้น *Chlorella* sp.ED54 และ *Scenedesmus* sp. W53 เข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 12 และ 32 ของการทดลองตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กของ *Scenedesmus* sp. S1 *Scenedesmus* sp. F15, *Scenedesmus* sp. M12 ซึ่งเข้าสู่ระยะคงที่ช้าสุด ในวันที่ 14 และจากงานวิจัยของกัญญานันท์ และคณะ (2559) ศึกษาการเจริญและการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็ก ในอาหารเหลว สูตร N-8 ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที พบว่า *Chlorella* sp.5 และ *Chlorella* sp.N11 เข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 8 และ 10 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กของ *Chlorella* sp. 5 และ *Chlorella* sp. N11 จะเข้าสู่ระยะคงที่ช้ากว่า ซึ่งจะเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ในวันที่ 12 แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายอาจจะใช้สารอาหารในการเจริญน้อยหรือสูตรอาหาร BG-11 ไม่เหมาะต่อการเจริญจึงทำให้ระยะเวลาที่เข้าสู่ระยะคงที่นานกว่าสายพันธุ์อื่น นอกจากนั้นการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สาหร่ายและสภาวะการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ (Chisti, 2007)

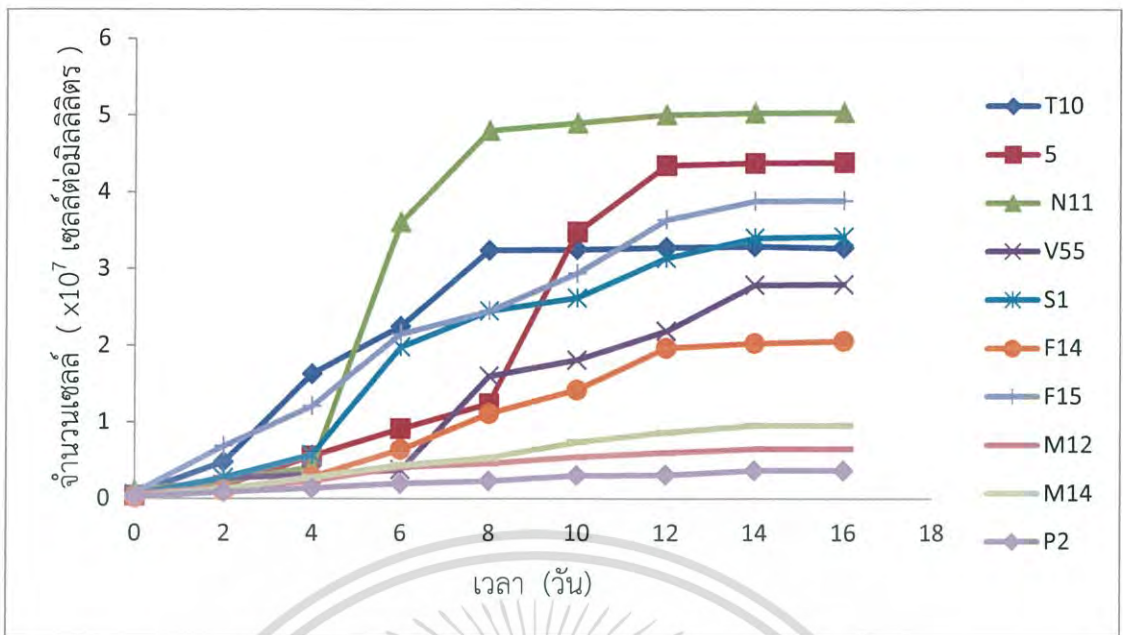
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า *Scenedesmus* sp. M12 และ *Chlamydomonas* sp. P2 เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่วันที่ 12 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ในสภาวะการให้แสงไฟด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของกัญญาณ์ท์ และคณะ (2559) ที่ศึกษาการคัดแยกสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์และฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าในสภาวะการให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้องสาหร่าย 2 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. M12 และ *Chlamydomonas* sp.P2 จะเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่วันที่ 12

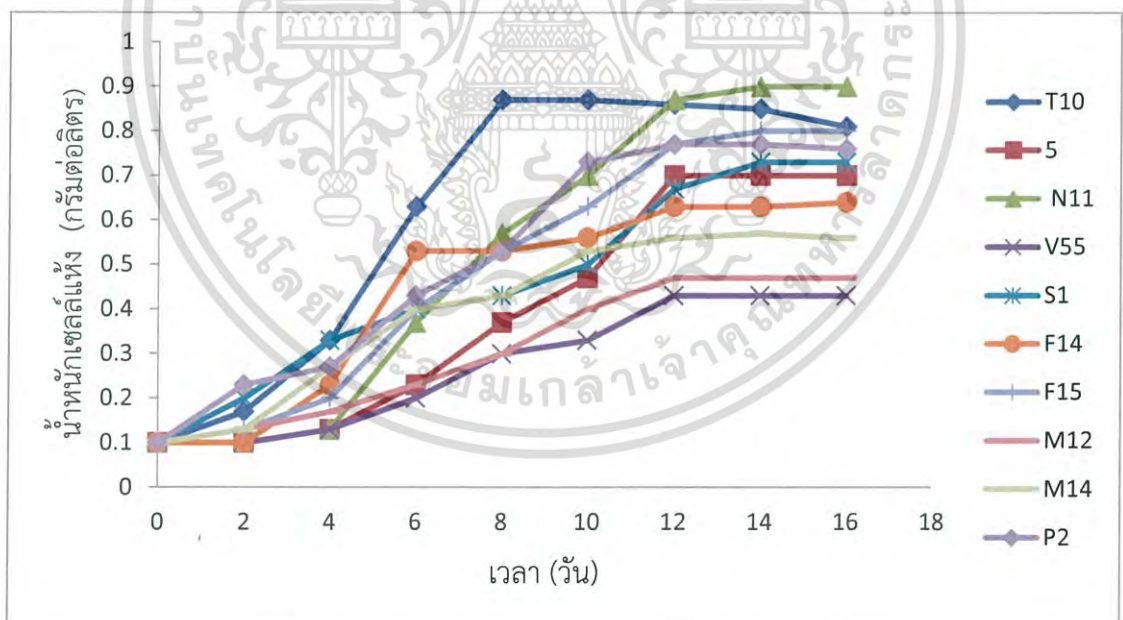


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T10 *Scenedesmus* sp. S1, *Chlorella* sp. 5, *Chlorella* sp. N11, *Chlorella* sp. V55 *Scenedesmus* sp. F14, *Scenedesmus* sp. F15, *Scenedesmus* sp. M12 *Scenedesmus* sp. M14, *Chlamydomonas* sp. P2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T10, *Scenedesmus* sp. S1, *Chlorella* sp. 5, *Chlorella* sp. N11, *Chlorella* sp. V55, *Scenedesmus* sp. F14, *Scenedesmus* sp. F15, *Scenedesmus* sp. M12, *Scenedesmus* sp. M14, *Chlamydomonas* sp. P2



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. T10, *Scenedesmus* sp. S1, *Chlorella* sp. 5, *Chlorella* sp. N11, *Chlorella* sp. V55, *Scenedesmus* sp. F14, *Scenedesmus* sp. F15, *Scenedesmus* sp. M12, *Scenedesmus* sp. M14, *Chlamydomonas* sp. P2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการเจริญเติบโตของ ผลการผลิตน้ำตาล และการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

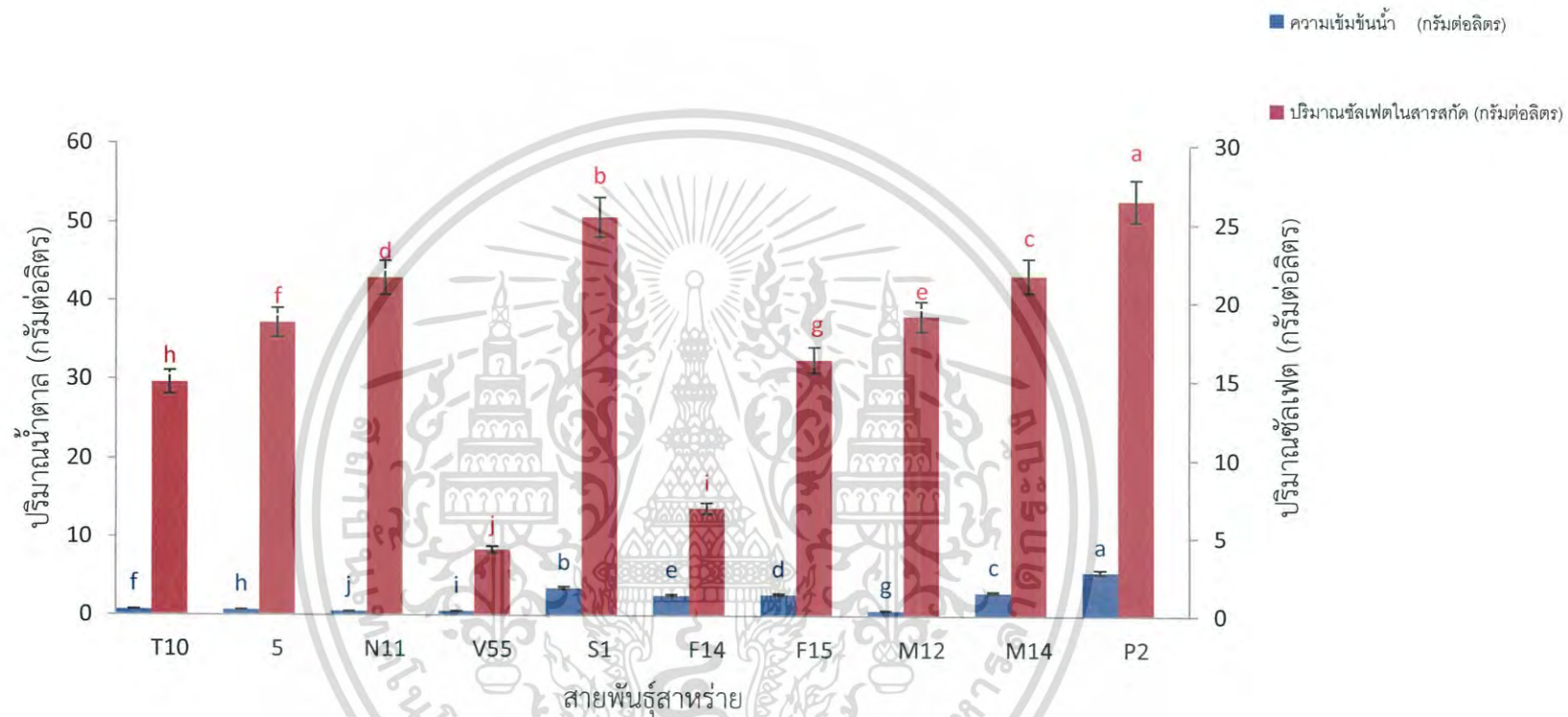
สายพันธุ์สาหร่าย	วันที่เข้าสู่ ระยะการ เจริญเติบโต คงที่	ค่าการดูดกลืน แสงที่ 560 นา โนเมตร	จำนวนเซลล์ ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (กรัมต่อ ลิตร)	อัตราการเจริญ จำเพาะต่อวัน	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)
<i>Chlorella</i> sp. T10	8	1.485±0.06	$3.24 \times 10^7 \pm 0.05$	0.87±0.01	3.38	0.709±0.01	14.80±0.02
<i>Chlorella</i> sp. 5	12	1.639±0.02	$4.35 \times 10^7 \pm 0.02$	0.70±0.01	2.31	0.653±0.03	18.60±0.16
<i>Chlorella</i> sp. N11	12	1.438±0.02	$5.01 \times 10^7 \pm 0.01$	0.87±0.09	2.62	0.487±0.13	21.50±0.09
<i>Chlorella</i> sp.V55	12	1.221±0.08	$2.19 \times 10^7 \pm 0.03$	0.43±0.05	2.22	0.521±0.09	4.20±0.52
<i>Scenedesmus</i> sp. S1	14	1.637±0.01	$3.40 \times 10^7 \pm 0.01$	0.73±0.10	1.95	3.468±0.11	25.40±0.22
<i>Scenedesmus</i> sp.F14	12	2.024±0.01	$1.97 \times 10^7 \pm 0.02$	0.63±1.70	2.29	2.572±0.26	6.90±0.10
<i>Scenedesmus</i> sp.F15	14	1.737±0.02	$3.88 \times 10^7 \pm 0.10$	0.80±1.02	1.92	2.681±0.01	16.30±0.04
<i>Scenedesmus</i> sp.M12	14	1.425±0.16	$0.652 \times 10^7 \pm 0.01$	0.47±0.02	1.82	0.663±0.02	19.10±0.31
<i>Scenedesmus</i> sp.M14	12	1.395±0.01	$0.868 \times 10^7 \pm 0.05$	0.56±0.02	2.21	2.968±0.01	21.70±0.25
<i>Chlamydomonas</i> sp.P2	12	0.942±0.02	$0.313 \times 10^7 \pm 0.01$	0.77±0.01	2.12	5.591±0.06	26.50±0.08

4.2.2 ผลการศึกษาผลิตเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ จนเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ นำสาหร่ายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารสกัดส่วนใสไปทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงด้วยตัวทำละลายน้ำ และนำสารสกัดที่ทำให้เข้มข้นขึ้นไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก และวิเคราะห์หาเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. P2 มีปริมาณน้ำตาลและปริมาณเซลล์เพดสูงที่สุด โดยมีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 5.591 ± 0.06 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 26.50 ± 0.08 กรัมต่อลิตร รองมาคือสาหร่าย *Scenedesmus* sp. S1 และ *Scenedesmus* sp. M14 มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 3.468 ± 0.11 กรัมต่อลิตร และ 2.968 ± 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และมีปริมาณเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 25.40 ± 0.22 และ 21.70 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.4)

ซึ่งผลการทดลองข้างต้นมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ จิรพันธ์ (2555) ศึกษาโมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซคคาไรด์ ที่สะสมในภายในเซลล์ พบว่าส่วนใหญ่เป็นกลูโคส และสาหร่าย *Chlamydomonas debaryana* Chr-WD3 สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้สูงที่สุด และได้ทำการทดสอบพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก โดยรายงานว่ถ้าสารสกัดที่ได้ทำปฏิกิริยากับสารฟีนอลและกรดซัลฟูริกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือสีน้ำตาล ซึ่งสามารถบอกได้ว่าสารสกัดที่ได้นั้นเป็นสารประเภทน้ำตาล ซึ่งงานวิจัยของศิริลักษณ์ และคณะ (2557) ศึกษาสารสกัดเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria fisheri*) ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการสกัดเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย *G. fisheri* ด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถสกัดเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์ได้ ร้อยละ 5.41 และ 9.66 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ พบว่ามีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลัก และมีปริมาณเซลล์เพดอยู่ร้อยละ 6.86 และ 8.95 ของสารสกัดที่อุณหภูมิห้องและที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าสารสกัดที่ได้มีปริมาณเซลล์เพดสูง (ร้อยละ 8.95) และจากงานวิจัยของ Majdoub. et al. (2009) ที่กล่าวไว้ว่าวิธีการสกัด การเตรียมตัวอย่าง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงรวมถึงสภาวะต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อโมเลกุลของน้ำตาลและปริมาณเซลล์เพดที่พบในสารสกัด ในทางตรงกันข้ามองค์ประกอบของน้ำตาลที่ต่างกันของสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิด จะมีผลต่อการสร้างชนิดของเซลล์เพดพอลิแซคคาไรด์ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ : a, b, c, d, e, f, g, h, i, j ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และปริมาณซัลเฟต (กรัมต่อลิตร) สารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ของ *Chlorella* sp. T10, *Chlorella* sp. 5, *Chlorella* sp. N11, *Chlorella* sp. V55, *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. F14, *Scenedesmus* sp. F15, *Scenedesmus* sp. M12, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2

4.3 ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายขนาดเล็ก ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง จำนวน 3 สายพันธุ์

4.3.1 การวัดการเจริญของสาหร่าย

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 4 ลิตร ในถังขนาด 6 ลิตร จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ซึ่งในการวัดการเจริญของสาหร่ายมีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่าย วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ และวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ได้ผลดังนี้

จากการทดลองพบว่า *Scenedesmus* sp. S1 เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่วันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวันที่มีการเจริญสูงสุด มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 1.655 ± 0.05 จำนวนเซลล์เท่ากับ $1.90 \times 10^7 \pm 0.02$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.93 ± 0.05 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 2.28 ต่อวัน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ และวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 4.763 ± 0.02 และ 30.40 ± 2.05 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

จากการทดลองพบว่า *Scenedesmus* sp. M14 เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่วันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวันที่มีการเจริญสูงสุด มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 1.515 ± 0.01 จำนวนเซลล์เท่ากับ $1.07 \times 10^7 \pm 0.02$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.90 ± 0.10 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 1.90 ต่อวัน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลของซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์ และวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 3.818 ± 0.03 และ 29.50 ± 0.66 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

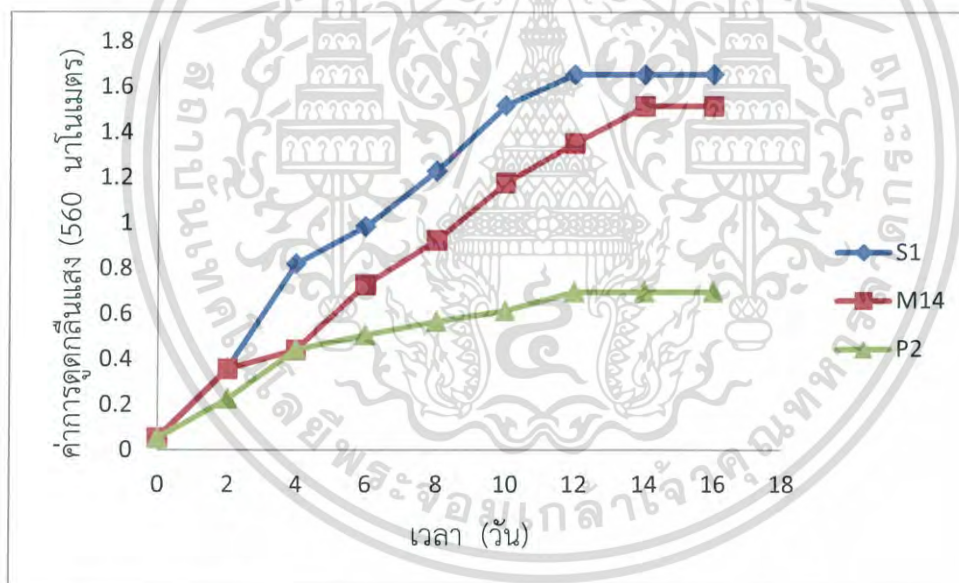
จากการทดลองพบว่า *Chlamydomonas* sp. P2 เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่วันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวันที่มีการเจริญสูงสุด มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.697 ± 0.07 จำนวนเซลล์เท่ากับ $0.363 \times 10^7 \pm 0.02$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.67 ± 0.05 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 2.12 ต่อวัน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลของซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์ และวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 36.10 ± 1.77 และ 5.618 ± 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงการเจริญของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ในถังขนาด 6 ลิตร ในวันที่เข้าสู่ อัตราการเจริญคงที่

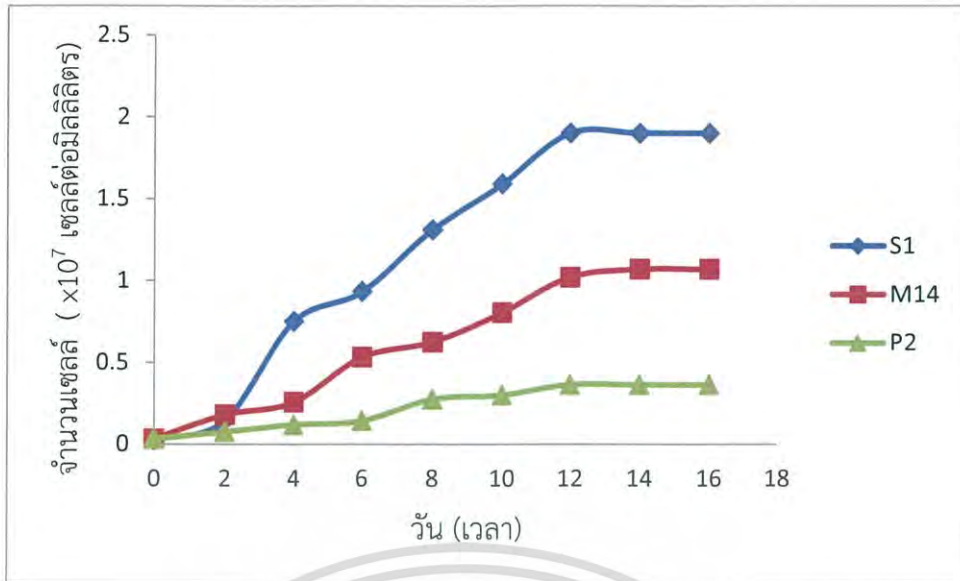
รายละเอียดข้อมูล	สายพันธุ์สาหร่าย		
	S1	M14	P2
วันที่เข้าระยะการเจริญเติบโตคงที่	12 วัน	14 วัน	12 วัน
ค่าการดูดกลืนแสง (560นาโนเมตร)	1.655 ± 0.05^a	1.515 ± 0.01^b	0.697 ± 0.07^c
จำนวนเซลล์ ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	$1.90 \times 10^7 \pm 0.02^a$	$1.07 \times 10^7 \pm 0.02^b$	$0.36 \times 10^7 \pm 0.02^c$
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	0.93 ± 0.05^a	0.90 ± 0.10^a	0.67 ± 0.05^b
อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อวัน)	2.28	1.90	2.12
ปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	30.40 ± 2.05^b	29.50 ± 0.66^b	36.10 ± 1.77^a
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	4.763 ± 0.02^b	3.818 ± 0.03^c	5.618 ± 0.01^a

หมายเหตุ : a,b,c ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

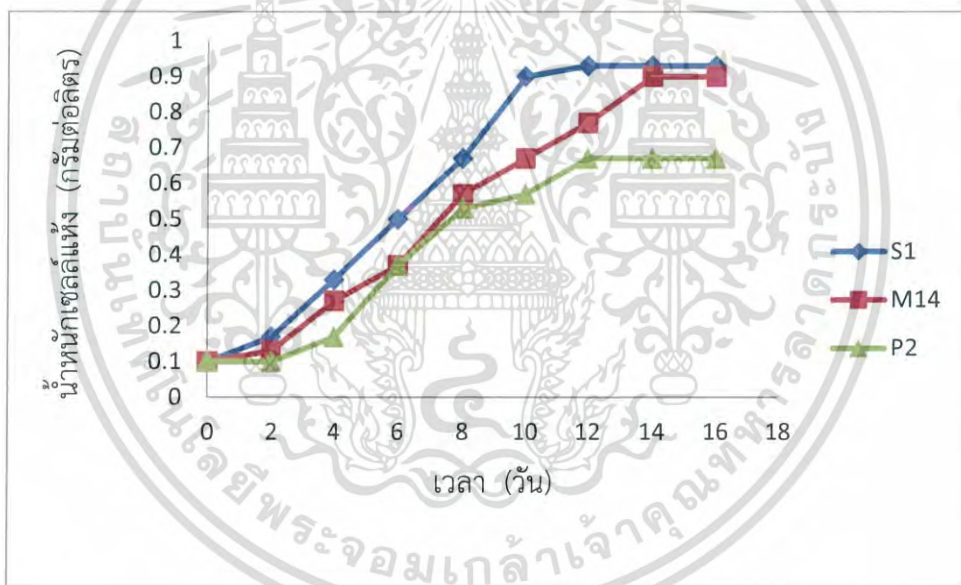


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ในถังขนาด 6 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ในถังขนาด 6 ลิตร



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ในถังขนาด 6 ลิตร

4.3.2 ผลการศึกษาการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกว่ามีการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 4 ลิตร ในถังขนาด 6 ลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ (รูปที่ 4.8) จนเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ และวิเคราะห์ปริมาณ

ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ของการเพาะเลี้ยงโดยทำการปิดเครื่องให้อากาศ และตั้งทิ้งไว้หนึ่งคืน ทำการเก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำตะกอนเซลล์สาหร่ายไปทำให้แห้ง โดยวิธีการอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.9) เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสาหร่ายต่อไป และนำสารสกัดส่วนใส (รูปที่ 4.10) ไปเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (รูปที่ 4.11) เมื่อศึกษาการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสารสกัด โดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอลซัลฟูริก และหาปริมาณซัลเฟตโดยวิธีการตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ พบว่า *Chlamydomonas* sp.P2 มีปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยมีปริมาณน้ำตาล 5.618 ± 0.01 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 36.10 ± 1.77 กรัมต่อลิตร และรองมาคือสาหร่าย *Scenedesmus* sp.S1 และ *Scenedesmus* sp.M14 โดยมีปริมาณน้ำตาล เท่ากับ 4.763 ± 0.02 และ 3.818 ± 0.03 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และมีปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 30.40 ± 2.05 และ 29.50 ± 0.66 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

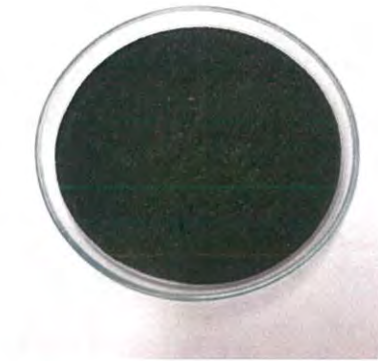
ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shao. *et al.* (2013) ที่รายงานว่ามีปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียว *Ulva fasciata* (UFP) สาหร่ายสีแดง *Gloiopeltis furcata* (GFP) และสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum henslowianum* (SHP) ที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสัมพันธ์กับปริมาณซัลเฟตที่ได้ ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิตได้จะมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับผลงานวิจัยของ Nguyen. *et al.* (2009) ที่พบว่าการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 ในการย่อยสลายชีวมวลสาหร่ายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 95 นอกจากนี้ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในการย่อยสลายแป้งของ *Chlamydomonas reinhardtii* ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเกือบร้อยละ 100 จากผลการทดลองดังกล่าว อาจเป็นไปได้การปรับสภาพด้วยกรดความเข้มข้นสูงกว่า ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลมากกว่า เพราะมีผลทำให้ย่อยสลายผนังเซลล์ได้มากกว่า



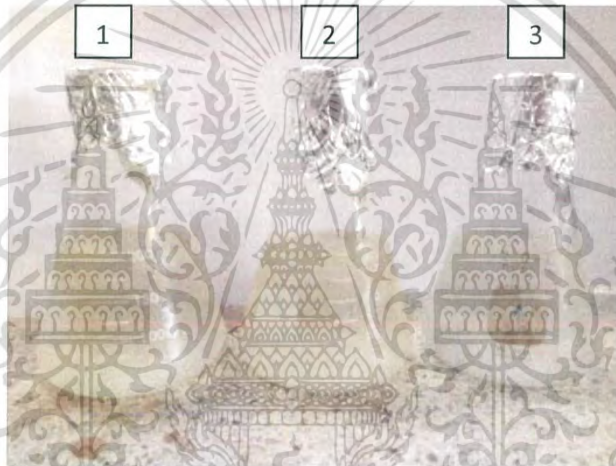
รูปที่ 4.8 แสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ทำการเพาะเลี้ยงในถังน้ำพลาสติกขนาด 6 ลิตร ที่มีการต่อเข้ากับอุปกรณ์ให้อากาศ ในสภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออ-

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่าในรูปแบบใด ๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นที่พิมพ์โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาเพื่อประโยชน์ของสังคม

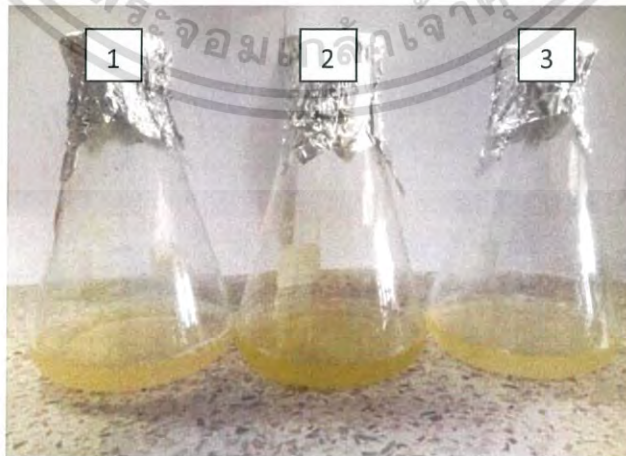
ไม่มีการบันทึกชื่อผู้แต่งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงสาหร่ายที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 สารสกัดส่วนใสของสาหร่ายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ของสาหร่าย (1) *Scenedesmus* sp. S1, (2) *Chlamydomonas* sp. P2 และ (3) *Scenedesmus* sp. M14

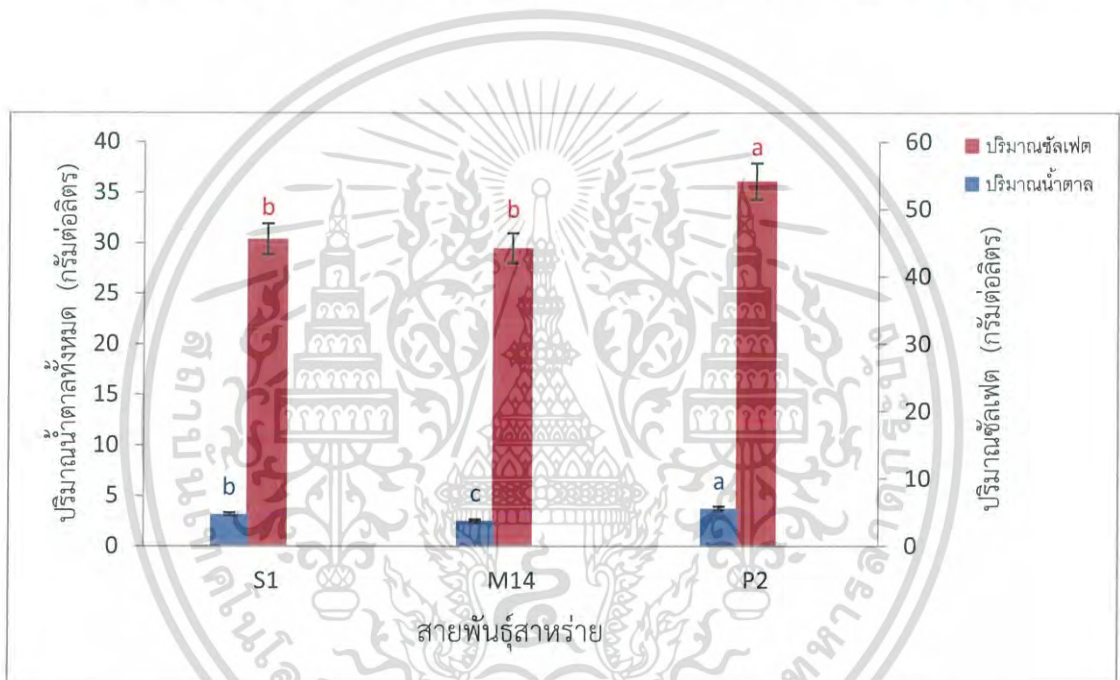


รูปที่ 4.11 สารสกัดส่วนใสที่ทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศของสาหร่าย
เอกสารเป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับโครงการงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าเห็นเป็นประโยชน์ในด้านการค้า
(1) *Scenedesmus* sp. S1, (2) *Chlamydomonas* sp. P2 และ (3) *Scenedesmus* sp. M14
“ไม่ว่ากรณีใดๆ พงษ์พันธ์ อภิสิทธิ์ รับผิดชอบเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงชื่อของเอกสารทุกครั้งหากมีนำไปใช้”

ตารางที่ 4.4 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2

สายพันธุ์สาหร่าย	องค์ประกอบทางเคมีของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์	
	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)
<i>Scenedesmus</i> sp. S1	4.763 ± 0.02 ^b	30.40 ± 2.05 ^b
<i>Scenedesmus</i> sp. M14	3.818 ± 0.03 ^c	29.50 ± 0.66 ^b
<i>Chlamydomonas</i> sp. P2	5.618 ± 0.01 ^a	36.10 ± 1.77 ^a

หมายเหตุ : a,b,c ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)



หมายเหตุ : a,b,c ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์คือ *Scenedesmus* sp.S1, *Scenedesmus* sp.M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลศึกษาองค์ประกอบซัลเฟตในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิคฟลูออรีเมตริกอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

จากผลการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ จากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ด้วยเทคนิคฟลูออรีเมตริกอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ โดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของซัลเฟตในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ โดยใช้อาหารเลี้ยงสาหร่าย BG-11 (รูปที่ 4.13 (ก)) เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า

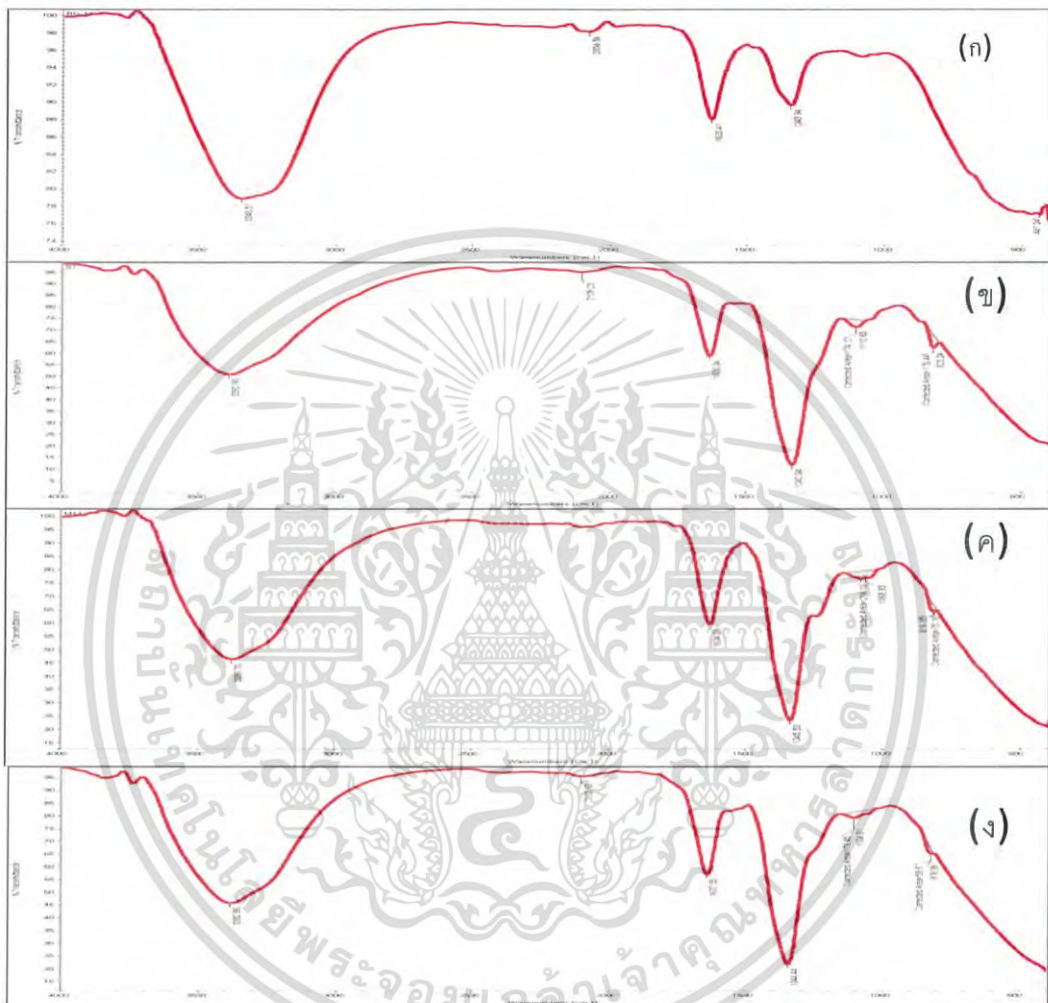
สารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. S1 พบหมู่ฟังก์ชันของซัลเฟตในรูปของซัลเฟอร์ออกไซด์ (S=O) และหมู่คาร์บอนิลซัลไฟด์ (C-O-S) ในช่วงความถี่ 1110.65 และ 823.24 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) ตามลำดับ และทำการหาปริมาณของหมู่ฟังก์ชันซัลเฟตที่พบด้วยการคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟมีค่าเท่ากับ 174.12 และ 170.44 ตามลำดับ (รูปที่ 4.13 (ข))

สารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. M14 พบหมู่ฟังก์ชันของซัลเฟตในรูปของซัลเฟอร์ออกไซด์ (S=O) และหมู่คาร์บอนิลซัลไฟด์ (C-O-S) ในช่วงความถี่ 1068.93 และ 816.35 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) ตามลำดับ และทำการหาปริมาณของหมู่ฟังก์ชันซัลเฟตที่พบด้วยการคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟมีค่าเท่ากับ 216.13 และ 75.18 ตามลำดับ (รูปที่ 4.13 (ค))

สารสกัดจากสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. P2 พบหมู่ฟังก์ชันของซัลเฟตในรูปของซัลเฟอร์ออกไซด์ (S=O) และหมู่คาร์บอนิลซัลไฟด์ (C-O-S) ในช่วงความถี่ 1104.31 และ 818.38 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร (cm^{-1}) ตามลำดับ และทำการหาปริมาณของหมู่ฟังก์ชันซัลเฟตที่พบด้วยการคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟมีค่าเท่ากับ 176.45 และ 59.61 ตามลำดับ (รูปที่ 4.13 (ง))

ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ กัญญาณัท และคณะ (2559) ที่รายงานว่า หมู่ฟังก์ชันทางเคมีของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่วิเคราะห์ด้วยฟลูออรีเมตริกอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ พบว่า *Chlamydomonas* sp. P2 และ *Scenedesmus* sp. M14 พบหมู่ฟังก์ชันของซัลเฟตในรูปของซัลเฟอร์ออกไซด์ (S=O) ที่ความถี่ 1076 และ 1077 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ปริมาณของหมู่ฟังก์ชันซัลเฟตเท่ากับ 740.39 และ 273.07 ตามลำดับ และพบหมู่คาร์บอนิลซัลไฟด์ (C-O-S) ที่ความถี่ 988 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร เท่ากัน และปริมาณของหมู่ฟังก์ชันซัลเฟตเท่ากับ 139.74 และ 37.52 ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Fimbres-Olivarria, et al. 2018 รายงานว่า ตรวจพบความยาวคลื่นที่ 832-818 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร ซึ่งมีลักษณะตรงกับการสั่นสะเทือนของพันธะของหมู่คาร์บอนิลซัลไฟด์ และจากการรายงานของ Zhongshan, et al. (2010) พบว่า *Laminaria japonica*, *Porphyra haitanensis* and *Ulva pertusa*, *Enteromorpha linza* และ *Bryopsis plumose* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบช่วงความถี่ 820-850, 1220-1260 และ 1640-1650 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร เนื่องจากการสั่นของพันธะ หมูคาร์บอนิลซัลไฟด์ (C=O-S) ของซัลเฟต ซึ่งพบการสั่นแบบยืดของซัลเฟอร์ออกไซด์ของซัลเฟต และพันธะ C-O ของกรดยูโรนิก ตามลำดับ และช่วงคลื่นที่ 3420-3450 และ 1050-1070 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร ตรงกับลักษณะการสั่นของพันธะของหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) และ พันธะ C-O ตามลำดับ



- รูปที่ 4.13 (ก) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากอาหารเหลว BG-11 (Control)
- (ข) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสารสกัดสาหร่าย *Scenedesmus* sp. S1
- (ค) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสารสกัดสาหร่าย *Scenedesmus* sp. M14
- (ง) แสดงช่วงคลื่นของหมู่ซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสารสกัดสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. P2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 วิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp.S1, *Scenedesmus* sp.M14 และ *Chlamydomonas* sp.P2 ที่เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่โดยนำไปปั่นเหวี่ยง และนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แห้งดังกล่าวไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบภายในเซลล์ พบว่า

สาหร่ายที่มีปริมาณความชื้นมากที่สุดคือ *Scenedesmus* sp.M14 รองลงมาคือ *Scenedesmus* sp.S1 และ *Chlamydomonas* sp.P2 มีปริมาณความชื้นร้อยละ 3.46 ± 0.37 , 1.88 ± 0.08 และ 1.20 ± 0.10 ตามลำดับ

สาหร่ายที่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ *Scenedesmus* sp.S1 รองลงมาคือ *Scenedesmus* sp.M14 และ *Chlamydomonas* sp.P2 มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 7.09 ± 0.17 , 5.50 ± 0.19 และ 6.25 ± 0.25 ตามลำดับ

สาหร่ายที่มีปริมาณไขมันมากที่สุดคือ รองลงมาคือ *Scenedesmus* sp.M14 *Scenedesmus* sp.S1 และ *Chlamydomonas* sp.P2 มีปริมาณไขมันร้อยละ 5.63 ± 0.15 , 5.41 ± 0.08 และ 3.38 ± 0.29 ตามลำดับ

สาหร่ายที่มีปริมาณเถ้ามากที่สุดคือ *Chlamydomonas* sp.P2 รองลงมาคือ *Scenedesmus* sp.M14 และ *Scenedesmus* sp.S1 มีปริมาณเถ้าร้อยละ 9.01 ± 0.09 , 7.39 ± 0.28 และ 5.18 ± 0.32 ตามลำดับ

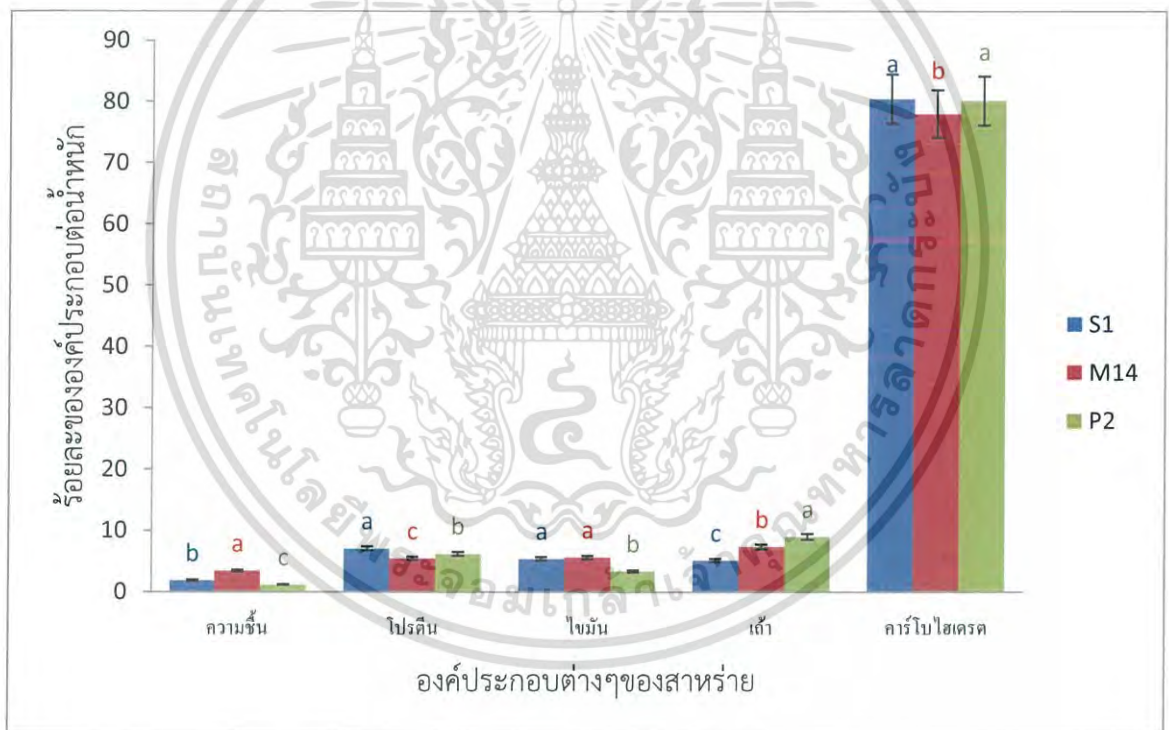
สาหร่ายที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุดคือ *Scenedesmus* sp.S1 รองลงมาคือ *Chlamydomonas* sp.P2 และ *Scenedesmus* sp.M14 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 80.44 ± 0.40 , 80.16 ± 0.40 และ 78.00 ± 0.32 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ตารางแสดงองค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงสุด คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 วันที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

สายพันธุ์สาหร่าย	ร้อยละความชื้น	ร้อยละของโปรตีน	ร้อยละไขมัน	ร้อยละเถ้า	ร้อยละคาร์โบไฮเดรต
<i>Scenedesmus</i> sp. S1	1.88±0.08 ^b	7.09±0.17 ^a	5.41±0.08 ^a	5.18±0.32 ^c	80.44±0.40 ^a
<i>Scenedesmus</i> sp. M14	3.46±0.37 ^a	5.50±0.19 ^c	5.63±0.15 ^a	7.39±0.28 ^b	78.00±0.32 ^b
<i>Chlamydomonas</i> sp. P2	1.20±0.10 ^c	6.25±0.25 ^b	3.38±0.29 ^b	9.01±0.09 ^a	80.16±0.40 ^a

หมายเหตุ : a,b,c ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)



หมายเหตุ : a,b,c ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

รูปที่ 4.14 แสดงร้อยละขององค์ประกอบต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิจัยของ Wang. *et al.* (2013) ได้กล่าวถึงประโยชน์ของสารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ ไขมัน ซึ่งสำหรับส่วนใหญ่มีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 30-60 สามารถนำโปรตีนใช้ประโยชน์เป็นปุ๋ยอินทรีย์ อาหารสัตว์ หรืออาหารเสริมของคนได้ซึ่งคาร์โบไฮเดรตสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักไปโอเอทานอลได้ ส่วนไขมันจะนำมาผลิตน้ำมันไบโอดีเซล (Chisti, 2007)

จากผลการศึกษาค้นคว้าประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Miao and Wu (2004) ในการเปรียบเทียบการผลิตไขมัน *Chlorella photothecoides* โดยการเลี้ยงแบบใช้แสง และมีคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน พบว่าสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานจะมีปริมาณไขมันสูง และมีปริมาณโปรตีนน้อย ซึ่งตรงกันข้ามกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งจะมีปริมาณไขมันน้อย และมีปริมาณโปรตีนสูง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณไขมันจะแปรผกผันกับปริมาณโปรตีน

จากการทดลองนี้พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีความสัมพันธ์กับปริมาณไขมันในเซลล์ของสาหร่าย คือถ้าปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง จะมีปริมาณไขมันสูงเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ho. *et al.* (2012) ที่รายงานว่า สาหร่าย *Scenedesmus obliquus* CNW-N มีปริมาณไขมัน และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 22.4 และ 46.65 ตามลำดับ ซึ่งไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กประกอบด้วยกรดไขมันชนิด C16 และ C18 ปริมาตรร้อยละ 90 ซึ่งเหมาะสมต่อกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และคาร์โบไฮเดรตที่พบในมวลชีวภาพของสาหร่าย ส่วนใหญ่คือ กลูโคสประมาณร้อยละ 77-80 แสดงให้เห็นว่า *Scenedesmus* sp. S1 ที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด แต่มีปริมาณซัลเฟตน้อยกว่า *Chlamydomonas* sp. P2 อาจจะเป็นเนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยน้ำตาลมากกว่า ปริมาณของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์พบว่า *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 มีปริมาณไขมันมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พนิดา (2558) กระบวนการต้นน้ำถึงปลายน้ำเพื่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยในกระบวนการต้นน้ำ ได้คัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติและได้สายพันธุ์ที่มีน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Scenedesmus acutus* PPNK1, *Scenedesmus incrassulatus* PPAY1 และ *Chlorococcum* sp. PPUD1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าความเข้มข้นของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

ความเข้มข้นของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาหร่ายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ *Scenedesmus* sp. S1 รองลงมาคือ *Chlamydomonas* sp. P2 และ *Scenedesmus* sp. M14 ที่ร้อยละ 45.569±7.50, 36.379±20.96 และ 30.515±7.95 ตามลำดับ

ความเข้มข้นของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาหร่ายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ *Scenedesmus* sp. S1 รองลงมาคือ *Chlamydomonas* sp. P2 และ *Scenedesmus* sp. M14 ที่ร้อยละ 47.754±1.99, 41.252±13.18 และ 45.751±13.47 ตามลำดับ

ความเข้มข้นของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาหร่ายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ *Scenedesmus* sp. S1 รองลงมาคือ *Chlamydomonas* sp. P2 และ *Scenedesmus* sp. M14 ที่ร้อยละ 56.968±7.29, 50.005±6.15 และ 46.662±16.53 ตามลำดับ

จากผลการทดลองการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดสูงที่สุดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าความเข้มข้นต่ำ และ *Scenedesmus* sp. S1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด และมีฤทธิ์มากกว่า *Chlamydomonas* sp. P2 ที่มีปริมาณซัลเฟตสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กัญญาณ์ท์ และคณะ (2559) ที่รายงาน ว่า *Scenedesmus* sp. M10 ปริมาณซัลเฟตค่อนข้างต่ำ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุดที่ร้อยละ 47.194±0.19 ซึ่งมากกว่า *Chlamydomonas* sp. P2 ที่มีปริมาณซัลเฟตสูงสุด

จากผลการทดลองการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ได้พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าความเข้มข้นต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ จันทนา และอนงค์ (2552) ที่รายงานว่าการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้น ตามการเพิ่มของความเข้มข้นของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

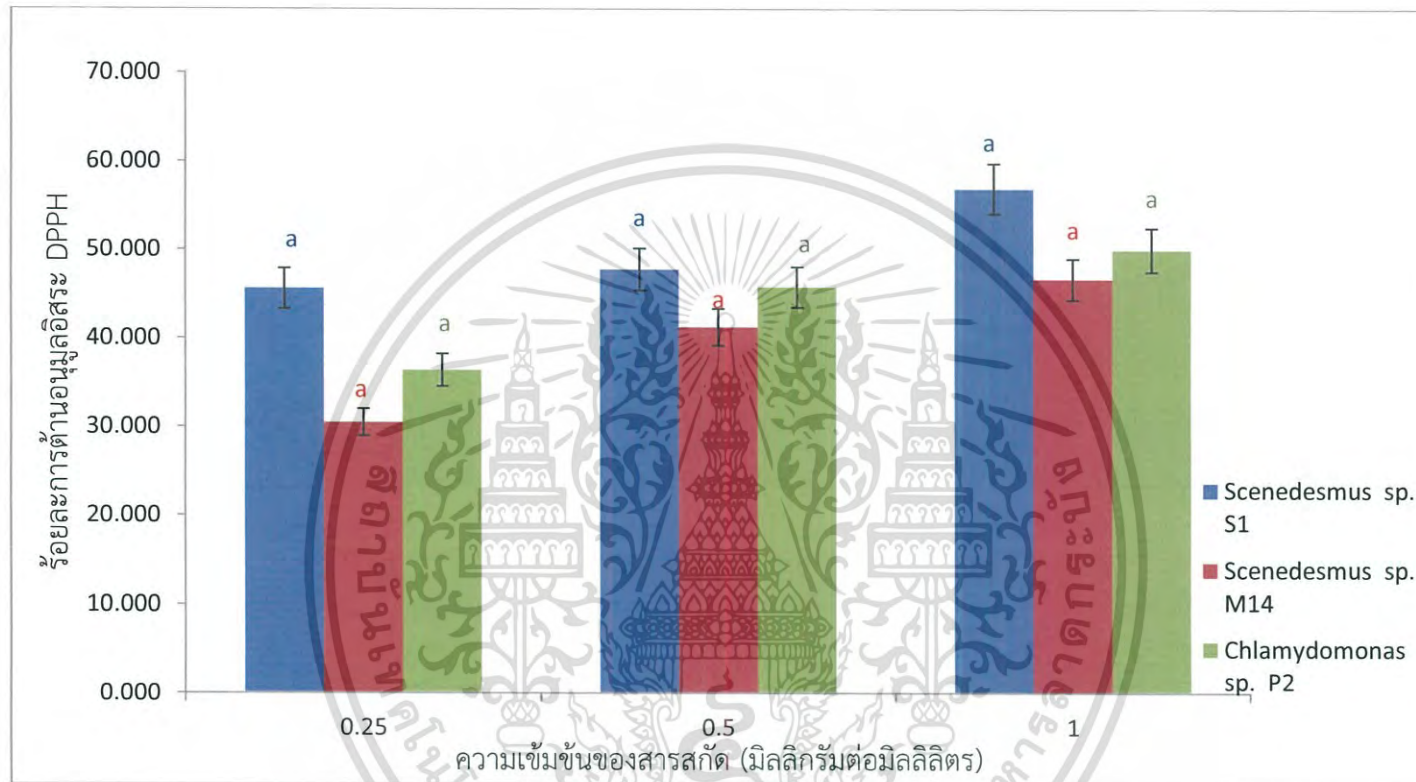
Shao. *et al.* (2013) รายงานว่า ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์มีผลในการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งผลในการยับยั้งโดยสารพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์คือ *Ulva fasciata* *Gloiopeltis furcata* และ *Sargassum henslowianum* พบว่า ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระอยู่ที่ 37.63, 23.49 และ 14.14 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

สายพันธุ์สาหร่าย	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	0.25	0.50	1.00
<i>Scenedesmus</i> sp. S1	45.569±7.50 ^a	47.754±1.99 ^a	56.968±7.29 ^a
<i>Scenedesmus</i> sp. M14	30.515±7.95 ^a	41.252±13.18 ^a	46.662±16.53 ^a
<i>Chlamydomonas</i> sp. P2	36.379±20.96 ^a	45.751±13.47 ^a	50.005±6.15 ^a

หมายเหตุ : a ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ : a ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

รูปที่ 4.15 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ระดับความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp.S1, *Scenedesmus* sp.M14 และ *Chlamydomonas* sp.P2

4.6.2 การทดสอบการเป็นสารต้านมะเร็ง

ผลการทดสอบการเป็นสารต้านมะเร็งของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29), เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB), เซลล์ไตของลิง (Vero) ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบ เนื่องจากค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าร้อยละ 50 ซึ่งค่าที่มีความเป็นพิษมากกว่าร้อยละ 50 จะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถต้านมะเร็งได้ ดังที่ Asma. *et al.* (2017) รายงานว่า ได้ทำการศึกษาสาหร่าย *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. ที่สกัดได้และปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอด (A549), เซลล์มะเร็งผิวหนัง (MDA MB-435) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (LNCap) ด้วยวิธี MTT assay โดยตรวจสอบจากร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ พบว่า *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. ต่อด้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ร้อยละ 61.66 และ 63.97 ตามลำดับ เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอด (A549) ร้อยละ 74.98 และ 79.78 ตามลำดับ เซลล์มะเร็งผิวหนัง (MDA MB-435) ร้อยละ 63.52 และ 73.73 ตามลำดับ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (LNCap) ร้อยละ 17.78 และ 9.85 ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Maria. *et al.* (2013) ที่ศึกษาผลการต้านมะเร็งของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่แยกได้จากสาหร่ายทะเล จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum vulgare* ในส่วน (SV1) ที่มีปริมาณน้ำตาลและซัลเฟตสูง และส่วน (PSV1) ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ พบว่ามี SV1 and PSV1 มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง โดยส่วน PSV1 ที่ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 71.4 และ ส่วน SV1 ที่ 100 ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตรมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 75.9 แสดงให้เห็นว่าซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์เหล่านี้ สามารถต่อต้านการก่อมะเร็งได้

Shao. *et al.* (2013) รายงานว่า ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์คือ *Ulva fasciata*, *Gloiopeltis furcata* และ *Sargassum henslowianum* สำหรับการต่อต้านเซลล์มะเร็งในกระเพาะอาหาร (MKN45) ที่ความเข้มข้น 0.125 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของ *Sargassum henslowianum* มีปริมาณซัลเฟตและปริมาณกรดยูโรนิกต่ำที่สุด แต่มีการต้านมะเร็งที่สูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเซลล์เฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย *Scenedesmus* sp.S1, *Scenedesmus* sp.M14 และ *Chlamydomonas* sp.P2 ต่อ เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29), เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB), เซลล์ไตของลิง (Vero)

No.	รายละเอียดของสาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% Cytotoxicity (24 h.)		
			เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29)	เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB)	เซลล์ไตของลิง (Vero)
1	<i>Scenedesmus</i> sp. S1	1,000	5.296	9.274	14.972
2	<i>Scenedesmus</i> sp. M14	1,000	16.523	13.359	14.535
3	<i>Chlamydomonas</i> sp. P2	1,000	3.224	7.544	14.410



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 คัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ 10 สายพันธุ์ พบว่า *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 ซึ่งอัตราการเจริญจำเพาะและปริมาณซัลเฟตไม่มีความสัมพันธ์กัน พบว่า สาหร่ายที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ *Scenedesmus* sp. S1 ที่ 2.28 ต่อวัน รองลงมาคือ *Chlamydomonas* sp. P2 และ *Scenedesmus* sp. M14 ที่ 2.12 และ 1.90 ต่อวัน ตามลำดับ แต่สาหร่ายที่ผลิตซัลเฟตสูงสุดคือ *Chlamydomonas* sp. P2 มีปริมาณซัลเฟต 36.10 ± 1.77 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *Scenedesmus* sp. S1 และ *Scenedesmus* sp. M14 มีปริมาณซัลเฟต 30.40 ± 2.05 และ 29.50 ± 0.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

5.1.2 ศึกษาการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า *Scenedesmus* sp. S1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดร้อยละ 56.968 ± 7.29 รองลงมาคือ *Chlamydomonas* sp. P2 และ *Scenedesmus* sp. M14 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50.005 ± 6.15 และ 30.515 ± 7.95 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับการทดสอบการเป็นสารต้านมะเร็งโดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29), เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์ไตของลิง (Vero) พบว่า สารสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าร้อยละ 50

5.1.3 ศึกษาองค์ประกอบซัลเฟตในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิคฟลูออรีเมตริกอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. S1, *Scenedesmus* sp. M14 และ *Chlamydomonas* sp. P2 พบหมู่ฟังก์ชันของซัลเฟตในรูปของซัลเฟอร์ออกไซด์ (S=O) ในช่วงความถี่ 1110.65, 1068.93 และ 1104.31 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ปริมาณหมู่ฟังก์ชันจากพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 174.12, 216.13 และ 176.45 ตามลำดับ และพบหมู่คาร์บอนิลซัลไฟด์ (C=O-S) ในช่วงความถี่ 823.24, 816.35 และ 818.38 ลูกคลื่นต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ปริมาณหมู่ฟังก์ชันจากพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 170.44, 75.18 และ 59.61 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรคัดเลือกสาหร่ายชนิดอื่นๆ เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีน้ำตาล หรือสาหร่ายทะเลที่มีการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ปริมาณสูง มาศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง และสามารถสกัดสารเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้

5.2.2 ควรทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยการเพิ่มสารอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายเพื่อให้สาหร่ายมีการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ในปริมาณสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กัญญาณ์ท์ ศรีเทียน, จิตชาดา เมฆวะทัต และชลาลัย พูนพอกสิน. 2559. “การคัดแยกสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์และฤทธิ์ทางชีวภาพ.” โครงการงานพิเศษ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จันทนา ไพรบูรณ์ และอนงค์ จีระภัทร์. 2552. “ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยตัวทำละลายจากสาหร่ายทะเล.” รายงานการวิจัยของศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพสาหร่าย ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 11 หน้า.
- จิรพันธ์ เปรมสุริยา. 2555. “การคัดเลือกและจัดจำแนกสายพันธุ์จุลสาหร่ายน้ำจืดและการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโพลีแซคคาไรด์.” ปรินญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีทานาม. 2554. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ.” วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1 (1) : 59-70.
- ชินอรส ศรีศิริ, ยิ่งยศ ลับภู, ประสงค์ วงศ์วิชา และกันยรัตน์ โหละสุต. 2551. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายท้องถิ่นเซลล์เดี่ยว.” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิตติกันต์ ปัญญาใหญ่. 2550. “กิจกรรมต้านออกซิเดชันของสาหร่ายเตา.” การค้นคว้าแบบอิสระ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิตติพรรณ, วรรณญา วรรณลังกา และสุภาวดี เจนเกตุกร. 2558. “การศึกษาพฤษเคมี ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและกรดไขมันของสาหร่ายมงกุฏหนามจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ประเทศไทย.” การประชุมวิชาการวิจัยรำไพพรรณี ครั้งที่ 9. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ณัฐวุฒิ เชิงชั้น. 2555. “การหาปริมาณของซัลเฟตโดยให้ตกตะกอนในรูปของแบเรียมซัลเฟต.” เอกสารประกอบการสอนปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ 1, กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดวงกมล เรือนงาม. 2557ก. “การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ประสิทธิภาพสูง.” กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ดวงกมล เรือนงาม. 2557ข. “การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ.” วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 23 (2) : 20-139.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 “ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้”

- ทวีทรัพย์ แสงนุภาพ, ทูตยากร อุ่เจริญ และบุษกร เจริญสุข. 2559. “การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดที่มีศักยภาพในการผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์.” โครงการพิเศษ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นริศรา สุวรรณโชติ. 2557. “การศึกษาผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญเติบโตของคลอเรลลา (*Chlorella vulgaris*).” สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ, ไมตรี สุทธิจิตต์ และสุพัตรา พวงบางโพ. 2553. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่า เพกา และมะระขี้นก ในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.” รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.
- ปริญญา มุลสิน และอมรรัตน์ วงษ์กลม. 2556. “การศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง.” รายงานผลการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี. 101 หน้า.
- พัชรา นวลเพชร. 2555. “การตรวจวิเคราะห์หัตถ์ย้อมสีทางนิติวิทยาศาสตร์โดยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry และเทคนิค Attenuated Total Refection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR).” วิทยานิพนธ์ สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พนิดา รัตนพลที . 2558. “กระบวนการต้นน้ำถึงปลายน้ำเพื่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก.” วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลินจง สุขลำภู, วีณา ชูโชติ และดวงใจ โอชัยกุล. 2554. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก และการประยุกต์ใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มเซลลูโลสเพื่อชะลอการเหม็นหืนในผลิตภัณฑ์เนื้อ.” งานวิจัยเชิงบูรณาการและเชิงพาณิชย์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ลินจง สุขลำภู. 2555. “การวัดคุณลักษณะของอาหารด้วยวิธีทางตรง : การวัดด้วยวิธีทางเคมี.” เอกสารประกอบการสอนเรื่องการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์. กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรรณณี จันทร์แก้ว และเพ็ญศรี เพ็ญประไพ. 2558. “การแพร่กระจายและการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายสีแดงน้ำจืดในพื้นที่ต้นน้ำเขตจังหวัดนครศรีธรรมราช.” วารสารแก่น-เกษตร. 43 (1) : 215-223.

วิษชุดา จริยะพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร และกนิษฐา ภูวนาถนรานูบาล. 2556. แนวทางการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิดสำเร็จรูปทางห้องปฏิบัติการ. นนทบุรี : full forse.

วีณา ชูโชติ, กิตติคุณ สุคันโธวงศ์, ธนียา แซ่อ๊อ้ว และสันติสุข ขวัญศิริวณิช. 2557. “การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูง.” วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 8 (1) : 84-92.

วสันต์ สุมินทิลี, ปนิตา บรรจงสินศิริ, จันทนา ไพรบุรณ์ และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. 2556. “กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงอุ้ง (Caulerpa lintillifera) สาหร่ายทุ่น (Sargassum oligocystum) และสาหร่ายเขากวาง (Gracilaria changii).” วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. 9 (1) : 63-75.

วงศ์เทวัญ แสนไชย, สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ, ขนวัฒน์ นิตศน์วิจิตร, และ จตุรภัทร วาฤทธิ. 2559. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายเตาโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิคร่วม.” การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 40 : 388-395.

ศุภศิษฐ์ อรุณรุ่งสวัสดิ์. 2552. หนังสือชีวเคมีพื้นฐาน. กรุงเทพฯ : ท้อป.

ศิริลักษณ์ อิ่มจงใจรัก, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, ภัทรว ฝาสอน, รัตติยา แววนุกุล, ณีฐฐา เลาทกุล-จิตต์ และกนก รัตน์กนกชัย. 2557. “สารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็คคาไรด์จากสาหร่ายสีแดง (Gracilaria fisheri) ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.” วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรศาสตร์ 45 (2) : 325-328.

สรฉัตร เทียมดาว. 2560. เอกสารประกอบการสอนสาหร่ายวิทยา Phycology BIO5201. คณะ-วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

สุวรรณี ทองมาลี. 2557. “การใช้วิธีทางเคมีในการลดขนาดและเติมหมู่ซัลเฟตในอัลจินเตพอลิเมอร์เพื่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. จุลชีววิทยา. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ภาพพิมพ์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัญชลี ศิริขจรกิจ. 2555. “สาหร่ายเซลล์เดียวแคลมิดโมแนส (*Chlamydomonas reinhardtii*) กับงานวิจัยทางพันธุศาสตร์.” วารสารวิชาการ Thai Journal of Genetic. 4 (1) : 9-21.

อุ้นเรื่อน เพชรวัลย์ และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2555. การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ :โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

AOAC. 2000. American society of analytical chemistry and preparation method. Washington D.C. 999 : 10.

Asma, J., Brandon, R., Soleiman, H., Salman, A., Naeema, A.D., Sinan, B. and Sulaiman, A.Z. 2017. “Effect of enzymatic pre-treatment of microalgae extracts on their anti-tumor activity.” Biomedical Journal. 40 (1) : 339-346.

Attachai, K. and Anong, C. 2010. “Components and antimicrobial activity of polysaccharides extracted from thai brown seaweed.” Kasetsart Journal Natural Science. 44 (1) : 220-233.

Baky, A.A., Hanaa, E.B.K.F. and Latife, S.A. 2013. “Induction nitrogen concentration and its biological evaluation.” Aquaculture Research and Development. 5 (1) : 1-8.

Boonchum, W., Peerapompisal, Y., Vacharapiyasophon, P., Pekkoh, J., Pumas, C., Jamjai, U., Amornlerdpison, D., Noiraksar, T. and Kanjanapothi, D. 2011. “Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand.” International Journal Agriculture Biology. 13 (1) : 95-99.

Burri, B.J. 1997. “Beta-carotene and human health : a review of current research”. Nutrition Research. 17 (1) : 547-580.

Catarina, G.A., Maria, G.S., Ana, M.A., Ana, N.V.M., Manuela, P.E., Catarina, D.M.M. and Xavier, M.F. 2013. “Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *S. obliquus* for use in food processing.” Journal of Food Engineering. 116 (1) : 478-482.

Chisti, Y. 2007. “Biodiesel from microalgae.” Biotechnology Advances. 25 (1) : 294-306.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dai, J. and Mumper, R.J. 2010. "Plant phenolic extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties." *Pharmaceutical Sciences*. 15 (1) : 7313-7352.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *Journal of Immunological Methods*. 89 (1) : 271-277.
- Desikachary, T.V. 1959. *Cyanophyta*. Indian council of agricultural research. New Delhi.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Colourimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical Chemistry*. 28 (1) : 350-356.
- Duarte, M.E.R., Cardoso, M.A., Nosedá, M.D. and Cerezo, A.S. 2001. "Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*." *Carbohydrate Research*. 333 (1) : 281-293.
- Ellefson, W. 1993. "Method of analysis for nutrition labeling." *Journal of AOAC International*. 1 : 8.
- FAO. 2003. Food and agriculture organization. Rome, Italy.
- Farvin, K.H.S. and Jacobsen C. 2013. "Phenolic compounds and antioxidant activities of species of seaweeds from Danish Coast." *Food Chemistry*. 138 (1) : 1670-1681.
- Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H. and Liang, M. 2004. "Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants." *Fitoterapia*. 75 (1) : 14-23.
- Fimbres-Olivarria, D., Carvajal-Millan, E., AntonioLopez-Elias, J., Martinez-Robinson, K., Miranda-Baeza, A., Cordova, L.R.F, Enriquez-Ocaña, F. and EduardoValdez-Holguin, J. 2018. "Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp." *Food Hydrocolloids*. 75 (1) : 229-236.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F.M., Mrejen, S., Cardosp, M.T., Palavra, A.F. and Mendes, R.L. 2007. "Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂." *Food Chemistry*. 101 (1) : 717-723.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Cross, C.E. 1992. "Free radicals, antioxidants and human disease : Where are we now?." *Journal Laboratory Clinical Medicine*. 119 (1) : 598-620.
- Ho, S.H., Chen, W.M and Chang, J.S. 2012. " *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production." *Journal of Bioresource Technology*. 101 (22) : 8725-3000.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. and Ewart, H.S. 2011. "Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharide from marine algae." *Marine Drugs*. 9 (1) : 196-223.
- Joel, de la N., and Niels, de P. 1988. "The potential of microalgal, Biotechnology : A review of production and uses of microalgae." *Biotechnology Advances*. 6 (1) : 725-770.
- Junying, Z., Junfeng, R. and Baoning, Z. 2013. "Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel." *Chinese Journal of Catalysis*. 34 (1) : 80-100.
- Kosei, Y., Fumie, K., and Masanobu, K. 2013. "Taxonomic re-examination of *Chlamydomonas* strains maintained in the NIES-Collection." *Microbial Culture Collection*. 291 (1) : 1-12.
- Kumar, H.D. and Singh, H.N. 1971. *A textbook on algae*. Affiliated east-west press PVT. Ltd. New Delhi, India.
- Kumar, S.P., Ganesan, R. and Rao, S.P.V. 2008. "Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed." *Food Chemistry*. 107 (1) : 289-295.
- Leduy, A. and Therien, N. 1977. "An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue alga *Spirulina maxima*." *Biotechnology and Bioengineering*. 19 : 1219-1224.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Maria, C., Dorea, G., Gabriela, M., Alves, F., Nednaldo, D.S., Katarina, A.K.M.C., Barros, R., Jonathan, G.C.A., Guimarães, A., Helena B.N. and Leitea, L.E. 2013. "Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed." *Microvascular Research*. 88 : 12-18.
- Majdoub, H., Mansour, B.M., Chaubet, F., Roudesli, M.S. and Maaroufi, R.M. 2009. "Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790 : 1377–1381.
- Miao, X. and Wu, O. 2004. "High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*." *Journal Biotechnology*. 110 (1) : 85-93.
- Mohsen, M.S.A., Sahera, F.M., Ali, F.M. and Osama, H.E. 2007. "Chemical structure and antiviral activity of water-soluble sulfate polysaccharides from *Sargassum latifolium*." *Journal of Applied Science Research*. 3 (10) : 1178-1185.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods*. 65 (1) : 55-63.
- Nguyen, M.T., Choi, S.P., Lee, J., Lee, J.H. and Sim, S.J. 2009. "Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19 (2) : 161-166.
- Olesya, SV., Svetlana, P.E. and Tatyana, N.Z. 2011. "Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida* : isolation, structural characteristics, and antitumor activity." *Carbohydrate Research*. 346 (17) : 2769-2776.
- Pereira, M.G., Benevides, N.M., Melo, M.R., Valente, A.P., Melo, F.R. and Mourao, P.A. 2005 "Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?." *Carbohydrate Research*. 340 (12) : 2015-2023.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Perez-Jimenez, J and Saura-Calixto, F. 2006. "Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays." *Food Research International*. 39 (1) : 791-800.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001. "Antioxidants in food." *Practical Applications*, CRC Press. New York.
- Qi, J. and Kim, S.M. 2017. "Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*." *International Journal of Biological Macromolecules* 95 : 106–114.
- Ramaraj, S., Ramalingam, R., Abeer, H.E. and Allah, F.A. 2017. "Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine." *Saudi Journal of Biological Sciences*. 1-14.
- Raymond, C. 2005. *Chemistry*. 8th edit. McGraw-Hill Companies, New York.
- Rochaix, J.D. 1995. "*Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthesis yeast." *Annual Reviews of Genetics*. 29 (1) : 209-300.
- Seema, P. 2012. "Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds : updating the recent findings." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2 : 171-185.
- Shao, P., Chen, X. and Sun, P. 2013. "In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae." *International Journal of Biological Macromolecules*. 62 (1) : 155-161.
- Singh, N. and Rajini, P.S. 2004. "Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel." *Food Chemistry*. 85 (1) : 611-616.
- Suresh, V., Senthilkumar, N., Thangam, R., Rajkumar, M., Anbazhagan, C., Rengasamy, R., Gunasekaran, P., Kannan, S. and Palani, P. 2013. "Separation, purification and preliminary characterization of sulfated polysaccharides from *Sargassum plagiophyllum* and its in vitro anticancer and antioxidant activity." *Process Biochemistry*. 48 (2) : 364-373.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A. and Motilva, V. 2015. "Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer." *Marine Drugs*. 13 (10) : 6152–6209.

Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M. and Hu, Q. 2013. "A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid." *Journal of Bioresource Technology*. 129 (1) : 289-295.

Zhao, X., Xue, C.H. and Li, B.F. 2008. "Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*." *Journal of Applied Phycology*. 20 (4) : 431-436.

Zhongshan, Z., Feng, W., Xiaomei, W., Xiaolei, L., Yun, H. and Quanbin, Z. 2010. "Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro." *Carbohydrate Polymers*. 82 (1) : 118-121.

ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2552 การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่าย.

[online]. Available : <http://fishtech.mju.ac.th>.

Chlorella sp. [online]. Available : <http://www.theherbprof.com/hrbchlorella.htm>

Chlamydomonas sp. [online]. Available :

<http://botit.botany.wisc.edu/Resources/Botany/Chlorophyta/Chlamydomonas/Chlamydomonas.jpg.html>.

Scenedesmus sp. [online]. Available :

<https://matome.navejp/odai/2138867606676084201/2138876608030764203>.

ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย.

[online]. Available : <https://sites.google.com/site/cytogenetics222/bthna/sell>

DPPH assay [online]. Available : <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>.

MTT assay [online]. Available : <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ก-1 อาหารสูตร BG-11 สูตรอาหารเหลว

NaNO ₃	1.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.040	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ammonium ferric citrate	0.006	กรัม
EDTANa ₂ Mg	0.001	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
Trace element mixture*	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

* Trace element mixture

HBO ₃	2.860	กรัม
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.810	กรัม
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222	กรัม
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.390	กรัม
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079	กรัม
Co(NO ₃) ₂ · 5H ₂ O	0.0494	กรัม

ปรับค่าพีเอช เป็น 6.8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก-2 อาหารสูตร BG-11 สูตรอาหารแข็ง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง

ข-1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) (Leduy and Therien, 1977)

1. เก็บตัวอย่างสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวทท์ (cuvett)
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
3. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวอย่าง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย (แกน Y) เพื่อวัดการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

ข-2 การนับจำนวนเซลล์ (cell counting : hemacytometer) (ขจรเกียรติ, 2552)

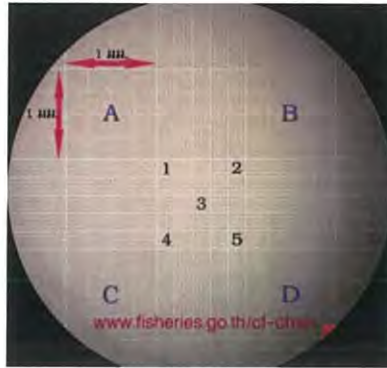
1. เก็บตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการนับเซลล์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่างของฮีมาโตมิเตอร์
2. วางสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้สาหร่ายจมสู่พื้นสไลด์
3. ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำสุดไปกำลังขยายสูงสุด
4. นับเซลล์สาหร่ายบนช่องสี่เหลี่ยมตรงกลาง (25 ช่องใหญ่ ภายในมีตารางขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง)
5. บันทึกจำนวนเซลล์ของตัวอย่างสาหร่าย นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณเซลล์ จากสูตร
 ปริมาณเซลล์สาหร่าย (cell / ml) = $\frac{\text{จำนวนเซลล์}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \frac{1}{4} \times 10^6$
6. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (แกน X) กับจำนวนเซลล์สาหร่าย (แกน Y) เพื่อวัดค่าเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์



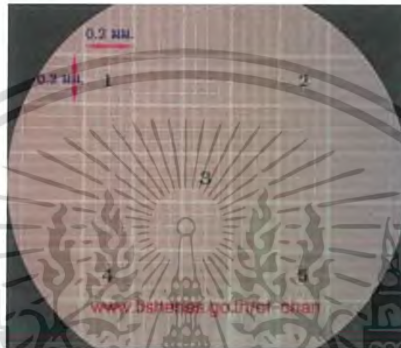
รูปที่ ข-1 แสดงลักษณะของ Hemacytometer

ที่มา : <https://www.graymed.com.au/haemacytometer-haemacytometers>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-2 แสดงตารางนับจำนวนเซลล์จากภาพจริง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า
ที่มา : <https://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/hema.htm>



รูปที่ ข-3 แสดงตารางนับจำนวนเซลล์จากภาพจริง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
ที่มา : <https://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/hema.htm>

ข-3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) (ดัดแปลงจาก ดวงกมล, 2557)

1. เก็บตัวอย่างเซลล์สำหรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสและบันทึกน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งแล้ว) โดยเก็บตัวอย่างละ 3 ซ้ำ
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รินส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงอีก 1 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์
3. นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ชั่งน้ำหนักหลอดที่มีเซลล์แห้งของสาหร่ายด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รายงานผลเป็น น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (กรัมต่อลิตร) จากสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์แห้งของสาหร่าย} - \text{น้ำหนัก}$$

หลอดเริ่มต้น

5. นำค่าน้ำหนักเซลล์ที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

สาหร่าย (แกน X) กับน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย (แกน Y) เพื่อวัดค่าเจริญของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-4 อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) (ซีโนรส และคณะ, 2551)

นำจำนวนเซลล์ในช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (Log phase) มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะโดยคำนวณจากสูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ } (\mu) = \frac{\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)}{t}$$

เมื่อ μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (วัน⁻¹)

N คือ ความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายวันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

N_0 คือ ความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายวันแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

t คือ เวลา (วัน)

ข-5 การสกัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย (ดัดแปลงจากจิริพันธ์, 2555 และวงศ์เทวีญ และคณะ, 2559)

1. เก็บเซลล์สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. จะได้สารละลายที่มีสีเหลืองหนืด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและปริมาณซัลเฟต

ข-6 การศึกษาการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย

ข-6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ด้วยวิธีฟินอลซัลฟิวริก (Dubois และคณะ, 1956)

1. เซลล์สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมฟินอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาทีในตู้ดูดควัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. นำสารละลายที่ได้มาเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
5. จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด โดยคำนวณจากกราฟเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (mg/L) = $A_{490} \times \text{อัตราการเจือจาง} / \text{ความเข้มข้นของ}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารภาพมาตรฐานกลูโคส ซึ่งงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. บันทึกผลที่ได้ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสาหร่ายที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูงที่สุด 3 สายพันธุ์

ข-6.2 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์โดยตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) (ดัดแปลงจาก ญรัฐวุฒิ , 2555)

1. เซลล์สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นรินส่วนใสทิ้ง
4. นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักตะกอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักตะกอนที่แน่นอน
5. คำนวณน้ำหนักของซัลเฟต จากสูตร
ตะกอนซัลเฟต (กรัมต่อลิตร) = น้ำหนักหลอดเริ่มต้น - (น้ำหนักหลอด + ตะกอนหลังอบ)
6. บันทึกผลที่ได้ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสาหร่ายที่มีปริมาณซัลเฟตสูงที่สุด 3 สายพันธุ์

ข-6.3 คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงที่สุด 3 สายพันธุ์

นำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากข้อ ข-6.1 และค่าปริมาณซัลเฟต (กรัมต่อลิตร) จาก ข-6.2 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างสายพันธุ์สาหร่าย (แกน X) กับปริมาณน้ำตาลและปริมาณซัลเฟต (แกน Y) โดยพิจารณาสายพันธุ์สาหร่ายที่มีปริมาณน้ำตาลและปริมาณซัลเฟตสูงที่สุด เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงที่สุด 3 สายพันธุ์

ข-7 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

1. อบถัวยอลูมิเนียม (Moisture) อุณหภูมิ 100-120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. ชั่งตัวอย่างสาหร่าย 1 กรัม เกลี่ยให้ทั่วแล้วอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝาขณะอบ นำไปวางให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสาหร่าย จากนั้นคำนวณตามสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ ร้อยละความชื้น
$$= \frac{W_1 - W_2}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}} \times 100$$
 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักถ้วยพร้อมฝา และตัวอย่างก่อนอบ (g)

W_2 คือ น้ำหนักถ้วยพร้อมฝา และตัวอย่างหลังอบ (g)

ข-8 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

1. อบครุชชีเบล (crucible) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. ชั่งสำหรับแห้ง 1 กรัม ใส่ครุชชีเบลนำไปเผาโดยเครื่องให้ความร้อน (Hot plate) เผาจนกระทั่งควันดำหมด
3. นำไปเผาที่เตาเผาด้วยอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวอย่างเป็นผงสีขาวหรือสีเทา จากนั้นนำไปวางให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง นำค่าที่ได้คำนวณตามสูตร

$$\text{ร้อยละเถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักครุชชีเบล+เถ้า (g)} - \text{น้ำหนักครุชชีเบลเปล่า (g)}}{\text{น้ำหนักสำหรับแห้ง (g)}} \times 100$$

ข-9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

ตอนที่ 1 เตรียมสารตัวอย่าง

โดยชั่งสำหรับแห้ง 1 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยสาร (Digestion tube) เติมหิวโปรตีน (โพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต ในอัตราส่วน 9:1) 5 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

ตอนที่ 2 การย่อยสาร

นำหลอดย่อยสารเข้าเครื่องย่อยสาร (Block digester) ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียสแล้วสวมเครื่องดักจับไอกรดบริเวณส่วนบนของหลอดย่อยสาร เปิดสวิสช์เครื่องดักจับไอกรดเป็นเวลา 10 นาที เครื่องจะทำการย่อยเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำหลอดย่อยสารมาวางไว้ให้เย็น ปิดสวิสช์เครื่องย่อยสารแต่เปิดเครื่องดักจับไอกรดไว้เพื่อดักจับไอกรดที่เหลืออยู่

ตอนที่ 3 การกลั่น

เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อยสารปริมาณ 20 มิลลิลิตร เติมนิโคเตียมฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่แล้วหยดอินดิเคเตอร์ (เมทิลเรด 0.1 กรัม) และโบรโมคลีโซลกรีน 0.1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร) 2 หยดให้สารละลายมีสีชมพู่อ่อน นำหลอดย่อยสารประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น พร้อมวางขวดรูปชมพู่บริเวณ Platform ให้แห้งแก้วจุ่มลงในกรดบอริก เครื่องกลั่นจะเริ่มทำการกลั่นเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำขวดรูปชมพู่และหลอดย่อยสารออกจากเครื่อง

ตอนที่ 4 การไทเทรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายสีเขียวในขวดรูปชมพู่ไทเทรตด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตและนำมาใช้คำนวณค่า จากสูตรปริมาณโปรตีน = (ปริมาณ HCl ที่ไทเทรตตัวอย่าง - ปริมาณ HCl ที่ไทเทรตแบลนด์) × 0.1 × 1.4 × 6.25

ข-10 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี soxhlet (AOAC, 2000)

1. นำพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่จะใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง
2. ชั่งสาหร่ายแห้ง 1 กรัมใส่ในทิมเบิล (thimble) เต็มปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตรลงในพลาสติกสกัดไขมัน
3. วางพลาสติกลงในเครื่องสกัดไขมัน ทำการสกัดประมาณ 2 ชั่วโมง
4. แยกเอาพลาสติกออกจากเครื่องสกัดไขมัน ใช้คีมคีบทิมเบิลที่ใส่ตัวอย่างสาหร่ายออกจากพลาสติก
5. นำพลาสติกไประเหยเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออก โดยอบที่ 100 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวทำละลายจะระเหยหมด จากนั้นทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง คำนวณหาร้อยละไขมันจากสูตร

$$\text{ร้อยละไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

ข-11 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (FAO, 2003)

ปริมาณร้อยละคาร์โบไฮเดรตคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละคาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\text{ร้อยละความชื้น} + \text{ร้อยละเถ้า} + \text{ร้อยละโปรตีน} + \text{ร้อยละไขมัน})$$

ข-12 การใช้เครื่องฟลูออริเมตริทรานฟอรั่มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (รุ่น Nicolet 6700) (พัชรา, 2555)

1. ส่วนประกอบของเครื่องมืออินฟราเรด
 - 1.1 แหล่งกำเนิดแสง (light source)
 - 1.2 เซลล์บรรจุสาร (sample cell)
 - 1.3 โมโนโครโมเตอร์ (monochromoter)
 - 1.4 อุปกรณ์วัดสัญญาณ (detector)
 - 1.5 ตัวขยายสัญญาณ (amplifier)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมตัวอย่าง
กรณีตัวอย่างเป็น สารละลายเตรียมโดยฉีดตัวอย่างตรงช่องฉีดของเซลล์บรรจุสาร
3. ใช้รูปแบบ Attenuated Reflection Infrared Spectroscopy (ATR) เป็นเทคนิคอินฟราเรดในอีกรูปแบบหนึ่ง มีกลไกคือแสงอินฟราเรดจะตกกระทบสารตัวอย่างซึ่งวางทาบอยู่บนเซลล์บรรจุสารซึ่งถ้ามุมที่แสงตกกระทบมีค่าน้อยกว่า 90 องศาเซลเซียส แสงจะเดินทางทะลุเข้าไปในผิวตัวอย่างได้เพียงไม่กี่ไมโครเมตรและแสงส่วนที่เหลือจากการถูกดูดกลืนโดย พอลิเมอร์ที่ผิวจะสะท้อนออกมา เพื่อเข้าสู่อุปกรณ์วัดสัญญาณ สัญญาณที่ได้จะมีปริมาณมากขึ้นและพีคที่ได้จะมีความสูงมากขึ้น หากสามารถทำการวัดความเข้มของแสงที่ได้จากการสะท้อนหลายๆ ครั้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลาย

ค-1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ตอนที่ 1 ชั่งสารละลายกลูโคส 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตอนที่ 2 เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายกลูโคสให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดังตาราง 1

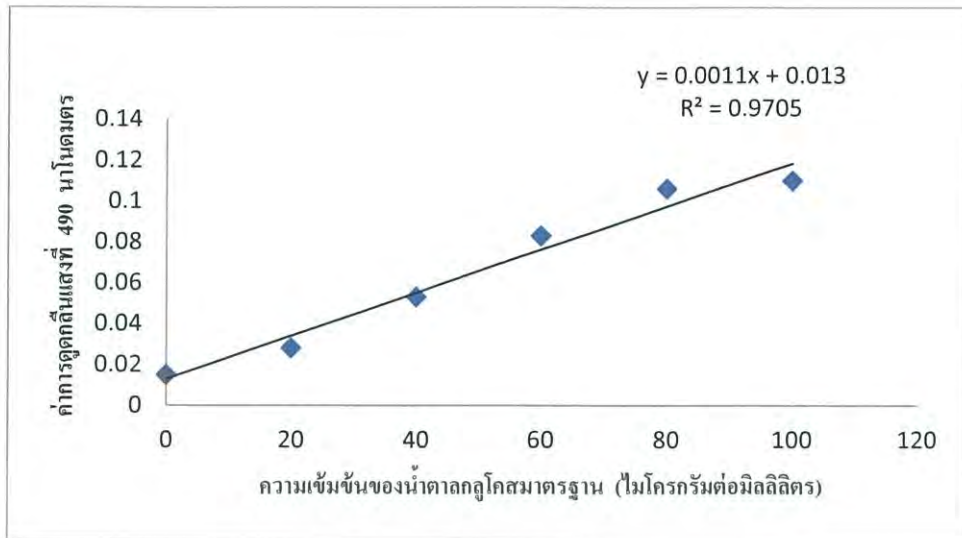
ตาราง ค-1 อัตราส่วนการเจือจางสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

หลอดที่	สารละลายกลูโคส เข้มข้น 100 µg/ml (ml)	ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้น สารละลายมาตรฐาน กลูโคส µg/ml
1	0	5.0	0
6	1.0	4.0	20
3	2.0	3.0	40
4	3.0	2.0	60
5	4.0	1.0	80
6	5.0	0	100

ค-2 การสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

นำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากตาราง ค-1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ในตู้ดูดควัน นำสารละลายที่ได้มาเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกลูโคส (แกน x) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) ดังรูปที่ ค-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-1 แสดงกราฟมาตรฐานความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค-3 การเตรียมสารละลายแบเรียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 4

ชั่งแบเรียมคลอไรด์ (BaCl_2) 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ค-4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย

ตอนที่ 1 การเตรียมสารละลาย DPPH ด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging (ดัดแปลงจากวิธีของ Fenglin และคณะ, 2004)

1. การเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.16 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร โดยชั่ง DPPH มา 0.0394 กรัม ละลายด้วยเอทานอลในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ทำโดยชั่งสารสกัดสาหร่าย 1 กรัมละลายในเอทานอล 20 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางสารสกัดสาหร่ายให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายสารสกัดตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม ที่มีสารละลาย DPPH (0.16 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ใช้เอทานอลแทนสารละลายตัวอย่างเป็นสารละลายแบลนด์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา คำนวณหาร้อยละประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ร้อยละประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{A_0 - (A - A_b)}{A_0} \times 100$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่เติมสารละลาย DPPH

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่เติมสารละลาย DPPH

A_b = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติมสารละลาย DPPH



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ง แสดงผลระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย 10 สายพันธุ์

ตารางที่ ง 1-1 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. T 10

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.087	0.073	0.080	0.080 ± 0.01	6.50 × 10 ⁵	5.00 × 10 ⁵	6.00 × 10 ⁵	5.83 ± 0.76 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.322	0.340	0.466	0.376 ± 0.08	4.50 × 10 ⁶	4.70 × 10 ⁶	5.30 × 10 ⁶	4.83 ± 0.42 × 10 ⁶	0.10	0.20	0.20	0.17 ± 0.06
4	0.714	0.723	0.857	0.765 ± 0.08	1.51 × 10 ⁷	1.58 × 10 ⁷	1.79 × 10 ⁷	1.63 ± 0.15 × 10 ⁷	0.30	0.30	0.40	0.33 ± 0.06
6	1.057	1.098	1.121	1.092 ± 0.03	2.13 × 10 ⁷	2.22 × 10 ⁷	2.41 × 10 ⁷	2.25 ± 0.14 × 10 ⁷	0.70	0.60	0.60	0.63 ± 0.06
8	1.475	1.433	1.546	1.485 ± 0.06	3.23 × 10 ⁷	3.06 × 10 ⁷	3.42 × 10 ⁷	3.24 ± 0.18 × 10 ⁷	0.90	0.90	0.80	0.87 ± 0.06
10	1.478	1.434	1.549	1.490 ± 0.06	3.24 × 10 ⁷	3.08 × 10 ⁷	3.43 × 10 ⁷	3.25 ± 0.18 × 10 ⁷	0.90	0.80	0.90	0.87 ± 0.06
12	1.481	1.430	1.552	1.487 ± 0.06	3.26 × 10 ⁷	3.12 × 10 ⁷	3.45 × 10 ⁷	3.28 ± 0.17 × 10 ⁷	0.80	0.80	0.90	0.83 ± 0.06
14	1.472	1.428	1.550	1.483 ± 0.06	3.24 × 10 ⁷	3.19 × 10 ⁷	3.43 × 10 ⁷	3.29 ± 0.13 × 10 ⁷	0.80	0.80	0.90	0.83 ± 0.06
16	1.473	1.428	1.547	1.482 ± 0.06	3.22 × 10 ⁷	3.17 × 10 ⁷	3.43 × 10 ⁷	3.27 ± 0.14 × 10 ⁷	0.80	0.80	0.80	0.80 ± 0.00

ตารางที่ ง 1-2 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. 5

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.056	0.059	0.058	0.058 ± 0.00	3.00 × 10 ⁵	5.00 × 10 ⁵	4.00 × 10 ⁵	4.00 ± 1.00 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.130	0.139	0.189	0.153 ± 0.03	1.25 × 10 ⁶	1.90 × 10 ⁶	2.00 × 10 ⁶	1.72 ± 0.41 × 10 ⁶	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
4	0.275	0.284	0.387	0.315 ± 0.06	5.20 × 10 ⁶	5.65 × 10 ⁶	5.90 × 10 ⁶	5.58 ± 0.35 × 10 ⁶	0.10	0.20	0.10	0.13 ± 0.06
6	0.444	0.676	0.774	0.631 ± 0.17	8.60 × 10 ⁶	9.00 × 10 ⁶	9.85 × 10 ⁶	9.15 ± 0.64 × 10 ⁶	0.20	0.30	0.20	0.23 ± 0.06
8	0.864	1.025	1.033	0.974 ± 0.10	1.18 × 10 ⁷	1.24 × 10 ⁷	1.30 × 10 ⁷	1.24 ± 0.06 × 10 ⁷	0.30	0.40	0.40	0.37 ± 0.06
10	1.284	1.436	1.321	1.347 ± 0.08	3.27 × 10 ⁷	3.56 × 10 ⁷	3.60 × 10 ⁷	3.48 ± 0.18 × 10 ⁷	0.40	0.50	0.50	0.47 ± 0.06
12	1.680	1.700	1.536	1.639 ± 0.09	4.26 × 10 ⁷	4.96 × 10 ⁷	3.83 × 10 ⁷	4.35 ± 0.57 × 10 ⁷	0.70	0.70	0.70	0.70 ± 0.00
14	1.684	1.705	1.540	1.643 ± 0.09	4.62 × 10 ⁷	5.10 × 10 ⁷	4.16 × 10 ⁷	4.63 ± 0.47 × 10 ⁷	0.70	0.70	0.70	0.70 ± 0.00
16	1.679	1.707	1.538	1.641 ± 0.09	4.60 × 10 ⁷	5.09 × 10 ⁷	4.14 × 10 ⁷	4.61 ± 0.48 × 10 ⁷	0.70	0.70	0.60	0.67 ± 0.06

ตารางที่ ง 1-3 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. N11

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.051	0.050	0.047	0.049 ± 0.00	1.25 × 10 ⁶	1.10 × 10 ⁶	1.00 × 10 ⁶	1.12 ± 0.13 × 10 ⁶	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.123	0.153	0.150	0.142 ± 0.02	2.25 × 10 ⁶	2.45 × 10 ⁶	2.30 × 10 ⁶	2.33 ± 0.10 × 10 ⁶	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
4	0.358	0.400	0.381	0.380 ± 0.02	4.00 × 10 ⁶	4.80 × 10 ⁶	4.45 × 10 ⁶	4.12 ± 0.40 × 10 ⁶	0.10	0.20	0.10	0.13 ± 0.06
6	0.663	0.677	0.687	0.676 ± 0.01	3.55 × 10 ⁷	3.60 × 10 ⁷	3.67 × 10 ⁷	3.61 ± 0.06 × 10 ⁷	0.30	0.40	0.40	0.37 ± 0.06
8	1.012	1.023	1.072	1.036 ± 0.03	4.62 × 10 ⁷	4.79 × 10 ⁷	4.98 × 10 ⁷	4.80 ± 0.19 × 10 ⁷	0.40	0.60	0.70	0.57 ± 0.15
10	1.298	1.315	1.296	1.303 ± 0.01	4.87 × 10 ⁷	4.85 × 10 ⁷	4.98 × 10 ⁷	4.90 ± 0.07 × 10 ⁷	0.60	0.70	0.80	0.70 ± 0.10
12	1.431	1.462	1.422	1.438 ± 0.02	5.03 × 10 ⁷	4.92 × 10 ⁷	5.07 × 10 ⁷	5.01 ± 0.08 × 10 ⁷	0.80	0.90	0.90	0.87 ± 0.06
14	1.436	1.473	1.420	1.443 ± 0.03	5.06 × 10 ⁷	5.01 × 10 ⁷	5.04 × 10 ⁷	5.03 ± 0.03 × 10 ⁷	0.80	1.00	0.90	0.90 ± 0.10
16	1.445	1.470	1.424	1.446 ± 0.02	5.05 × 10 ⁷	5.02 × 10 ⁷	5.05 × 10 ⁷	5.04 ± 0.02 × 10 ⁷	0.80	1.00	0.90	0.90 ± 0.10

ตารางที่ ง 1-4 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. V55

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.082	0.082	0.075	0.080 ± 0.00	7.00 × 10 ⁵	5.50 × 10 ⁵	5.00 × 10 ⁵	5.83 ± 1.04 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.358	0.303	0.329	0.330 ± 0.03	2.95 × 10 ⁶	2.45 × 10 ⁶	2.70 × 10 ⁶	2.70 ± 0.25 × 10 ⁶	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
4	0.486	0.427	0.460	0.458 ± 0.03	3.35 × 10 ⁶	3.00 × 10 ⁶	3.10 × 10 ⁶	3.15 ± 0.18 × 10 ⁶	0.20	0.10	0.10	0.13 ± 0.06
6	0.593	0.581	0.578	0.584 ± 0.01	4.05 × 10 ⁶	3.85 × 10 ⁶	3.50 × 10 ⁶	3.80 ± 0.28 × 10 ⁶	0.20	0.20	0.20	0.20 ± 0.00
8	0.794	0.808	0.799	0.800 ± 0.01	1.53 × 10 ⁷	1.64 × 10 ⁷	1.63 × 10 ⁷	1.60 ± 0.06 × 10 ⁷	0.30	0.30	0.30	0.30 ± 0.00
10	1.072	1.034	1.004	1.037 ± 0.03	1.95 × 10 ⁷	1.77 × 10 ⁷	1.70 × 10 ⁷	1.81 ± 0.13 × 10 ⁷	0.30	0.40	0.30	0.33 ± 0.06
12	1.273	1.266	1.123	1.221 ± 0.08	2.25 × 10 ⁷	2.22 × 10 ⁷	2.11 × 10 ⁷	2.19 ± 0.07 × 10 ⁷	0.40	0.50	0.40	0.43 ± 0.06
14	1.308	1.289	1.222	1.273 ± 0.05	2.91 × 10 ⁷	2.80 × 10 ⁷	2.65 × 10 ⁷	2.79 ± 0.13 × 10 ⁷	0.40	0.50	0.40	0.43 ± 0.06
16	1.305	1.300	1.221	1.275 ± 0.05	2.90 × 10 ⁷	2.78 × 10 ⁷	2.66 × 10 ⁷	2.78 ± 0.12 × 10 ⁷	0.40	0.50	0.40	0.43 ± 0.06

ตารางที่ 1-5 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. S1

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.056	0.057	0.054	0.056 ± 0.00	4.50×10^5	6.00×10^5	4.00×10^5	$4.83 \pm 1.04 \times 10^5$	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.235	0.242	0.254	0.244 ± 0.01	2.60×10^6	2.65×10^6	3.05×10^6	$2.77 \pm 0.25 \times 10^6$	0.20	0.20	0.20	0.20 ± 0.00
4	0.635	0.612	0.647	0.631 ± 0.02	5.25×10^6	5.95×10^6	6.05×10^6	$5.75 \pm 0.44 \times 10^6$	0.30	0.30	0.40	0.33 ± 0.06
6	0.874	0.846	0.883	0.868 ± 0.02	1.97×10^7	1.91×10^7	2.05×10^7	$1.98 \pm 0.07 \times 10^7$	0.40	0.40	0.40	0.40 ± 0.00
8	1.145	1.124	1.139	1.136 ± 0.01	2.51×10^7	2.35×10^7	2.48×10^7	$2.45 \pm 0.09 \times 10^7$	0.40	0.50	0.40	0.43 ± 0.06
10	1.419	1.437	1.383	1.413 ± 0.03	2.63×10^7	2.68×10^7	2.56×10^7	$2.62 \pm 0.06 \times 10^7$	0.50	0.50	0.50	0.50 ± 0.00
12	1.637	1.661	1.580	1.626 ± 0.04	3.11×10^7	3.32×10^7	2.99×10^7	$3.14 \pm 0.17 \times 10^7$	0.70	0.70	0.60	0.67 ± 0.06
14	1.641	1.685	1.586	1.637 ± 0.05	3.45×10^7	3.51×10^7	3.23×10^7	$3.40 \pm 0.15 \times 10^7$	0.80	0.80	0.60	0.73 ± 0.12
16	1.645	1.679	1.589	1.638 ± 0.05	3.46×10^7	3.53×10^7	3.26×10^7	$3.42 \pm 0.14 \times 10^7$	0.60	0.90	0.70	0.73 ± 0.15

ตารางที่ ง 1-6 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. F14

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.071	0.064	0.065	0.067 ± 0.00	1.00 × 10 ⁵	2.50 × 10 ⁵	3.00 × 10 ⁵	2.17 ± 1.04 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.213	0.228	0.362	0.268 ± 0.08	1.05 × 10 ⁶	1.00 × 10 ⁶	1.00 × 10 ⁶	1.02 ± 0.03 × 10 ⁶	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
4	0.733	0.808	0.805	0.782 ± 0.04	2.95 × 10 ⁶	2.55 × 10 ⁶	3.15 × 10 ⁶	2.88 ± 0.31 × 10 ⁶	0.20	0.30	0.20	0.23 ± 0.06
6	1.257	1.288	1.255	1.267 ± 0.02	6.45 × 10 ⁶	6.65 × 10 ⁶	6.00 × 10 ⁶	6.43 ± 0.33 × 10 ⁶	0.50	0.60	0.50	0.53 ± 0.06
8	1.496	1.503	1.589	1.529 ± 0.05	1.07 × 10 ⁷	1.02 × 10 ⁷	1.23 × 10 ⁷	1.11 ± 0.11 × 10 ⁷	0.50	0.60	0.50	0.53 ± 0.06
10	1.734	1.743	1.835	1.771 ± 0.06	1.40 × 10 ⁷	1.39 × 10 ⁷	1.47 × 10 ⁷	1.42 ± 0.04 × 10 ⁷	0.50	0.60	0.60	0.56 ± 0.06
12	2.024	2.012	2.037	2.024 ± 0.01	1.90 × 10 ⁷	1.96 × 10 ⁷	2.06 × 10 ⁷	1.97 ± 0.08 × 10 ⁷	0.60	0.70	0.60	0.63 ± 0.06
14	2.028	2.039	2.110	2.059 ± 0.04	1.98 × 10 ⁷	2.00 × 10 ⁷	2.11 × 10 ⁷	2.03 ± 0.07 × 10 ⁷	0.60	0.70	0.70	0.66 ± 0.06
16	2.018	2.045	2.108	2.057 ± 0.05	1.99 × 10 ⁷	2.01 × 10 ⁷	2.19 × 10 ⁷	2.06 ± 0.11 × 10 ⁷	0.60	0.70	0.70	0.66 ± 0.06

ตารางที่ ง 1-7 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. F15

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.065	0.068	0.069	0.067 ± 0.00	6.50 × 10 ⁵	7.50 × 10 ⁵	9.50 × 10 ⁵	7.83 ± 1.53 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.504	0.481	0.471	0.485 ± 0.02	8.00 × 10 ⁶	6.50 × 10 ⁶	6.20 × 10 ⁶	6.90 ± 0.96 × 10 ⁶	0.20	0.10	0.10	0.13 ± 0.06
4	0.832	0.781	0.790	0.801 ± 0.03	1.28 × 10 ⁷	1.12 × 10 ⁷	1.22 × 10 ⁷	1.21 ± 0.08 × 10 ⁷	0.20	0.20	0.20	0.20 ± 0.00
6	1.044	0.983	1.000	1.009 ± 0.03	2.23 × 10 ⁷	2.08 × 10 ⁷	2.15 × 10 ⁷	2.15 ± 0.08 × 10 ⁷	0.40	0.40	0.40	0.40 ± 0.00
8	1.274	1.222	1.243	1.246 ± 0.03	2.56 × 10 ⁷	2.36 × 10 ⁷	2.43 × 10 ⁷	2.45 ± 0.10 × 10 ⁷	0.60	0.50	0.50	0.53 ± 0.06
10	1.365	1.425	1.383	1.391 ± 0.03	2.72 × 10 ⁷	3.10 × 10 ⁷	3.00 × 10 ⁷	2.94 ± 0.20 × 10 ⁷	0.70	0.60	0.60	0.63 ± 0.06
12	1.612	1.608	1.620	1.613 ± 0.01	3.57 × 10 ⁷	3.63 × 10 ⁷	3.71 × 10 ⁷	3.64 ± 0.07 × 10 ⁷	0.70	0.80	0.80	0.77 ± 0.06
14	1.733	1.709	1.770	1.737 ± 0.03	3.88 × 10 ⁷	3.81 × 10 ⁷	3.96 × 10 ⁷	3.88 ± 0.08 × 10 ⁷	0.80	0.80	0.80	0.80 ± 0.00
16	1.731	1.713	1.783	1.742 ± 0.04	4.15 × 10 ⁷	4.38 × 10 ⁷	4.70 × 10 ⁷	4.41 ± 0.28 × 10 ⁷	0.80	0.80	0.80	0.80 ± 0.00

ตารางที่ 1-8 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. M12

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.049	0.051	0.071	0.057 ± 0.01	4.00 × 10 ⁵	5.00 × 10 ⁵	7.00 × 10 ⁵	5.33 ± 1.53 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.234	0.245	0.342	0.274 ± 0.06	1.00 × 10 ⁶	1.45 × 10 ⁶	1.90 × 10 ⁶	1.45 ± 0.45 × 10 ⁶	0.10	0.10	0.20	0.13 ± 0.06
4	0.620	0.598	0.604	0.607 ± 0.01	2.60 × 10 ⁶	2.10 × 10 ⁶	2.30 × 10 ⁶	2.33 ± 0.25 × 10 ⁶	0.10	0.20	0.20	0.17 ± 0.06
6	0.856	0.818	0.941	0.872 ± 0.06	4.10 × 10 ⁶	3.80 × 10 ⁶	4.55 × 10 ⁶	4.15 ± 0.38 × 10 ⁶	0.20	0.20	0.30	0.23 ± 0.06
8	0.978	1.037	1.117	1.044 ± 0.07	4.40 × 10 ⁶	4.55 × 10 ⁶	4.90 × 10 ⁶	4.62 ± 0.26 × 10 ⁶	0.20	0.30	0.40	0.30 ± 0.10
10	1.149	1.199	1.253	1.200 ± 0.05	5.00 × 10 ⁶	5.45 × 10 ⁶	5.90 × 10 ⁶	5.45 ± 0.45 × 10 ⁶	0.30	0.40	0.50	0.40 ± 0.10
12	1.280	1.334	1.353	1.322 ± 0.04	5.60 × 10 ⁶	6.00 × 10 ⁶	6.50 × 10 ⁶	6.03 ± 0.45 × 10 ⁶	0.40	0.50	0.50	0.47 ± 0.06
14	1.386	1.458	1.431	1.425 ± 0.04	6.15 × 10 ⁶	6.75 × 10 ⁶	6.65 × 10 ⁶	6.52 ± 0.32 × 10 ⁶	0.40	0.50	0.50	0.47 ± 0.06
16	1.389	1.460	1.434	1.427 ± 0.04	6.18 × 10 ⁶	6.79 × 10 ⁶	6.68 × 10 ⁶	6.55 ± 0.33 × 10 ⁶	0.50	0.40	0.50	0.47 ± 0.06

ตารางที่ ง 1-9 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. M14

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.100	0.090	0.085	0.092 ± 0.01	3.50 × 10 ⁵	2.50 × 10 ⁵	2.00 × 10 ⁵	2.67 ± 0.76 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.356	0.328	0.281	0.322 ± 0.04	1.70 × 10 ⁶	1.20 × 10 ⁶	1.00 × 10 ⁶	1.30 ± 0.36 × 10 ⁶	0.20	0.10	0.10	0.13 ± 0.06
4	0.717	0.540	0.525	0.594 ± 0.11	3.50 × 10 ⁶	2.55 × 10 ⁶	2.40 × 10 ⁶	2.82 ± 0.60 × 10 ⁶	0.40	0.20	0.20	0.27 ± 0.12
6	1.025	0.861	0.834	0.907 ± 0.10	5.75 × 10 ⁶	3.85 × 10 ⁶	3.65 × 10 ⁶	4.42 ± 1.16 × 10 ⁶	0.50	0.40	0.30	0.40 ± 0.10
8	1.233	1.048	1.008	1.096 ± 0.12	7.05 × 10 ⁶	4.70 × 10 ⁶	4.20 × 10 ⁶	5.32 ± 1.52 × 10 ⁶	0.50	0.40	0.40	0.43 ± 0.06
10	1.394	1.268	1.218	1.293 ± 0.09	8.10 × 10 ⁶	7.20 × 10 ⁶	6.90 × 10 ⁶	7.40 ± 0.62 × 10 ⁶	0.70	0.50	0.40	0.53 ± 0.15
12	1.469	1.367	1.348	1.395 ± 0.07	9.70 × 10 ⁶	8.30 × 10 ⁶	8.05 × 10 ⁶	8.68 ± 0.89 × 10 ⁶	0.70	0.60	0.40	0.56 ± 0.15
14	1.450	1.373	1.361	1.395 ± 0.05	9.95 × 10 ⁶	9.15 × 10 ⁶	9.60 × 10 ⁶	9.57 ± 0.40 × 10 ⁶	0.60	0.60	0.50	0.57 ± 0.06
16	1.452	1.370	1.371	1.397 ± 0.05	9.97 × 10 ⁶	9.16 × 10 ⁶	9.61 × 10 ⁶	9.58 ± 0.41 × 10 ⁶	0.70	0.60	0.40	0.56 ± 0.15

ตารางที่ 1-10 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. P2

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.088	0.065	0.061	0.071 ± 0.01	4.00 × 10 ⁵	2.50 × 10 ⁵	2.00 × 10 ⁵	2.83 ± 1.04 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.212	0.222	0.244	0.226 ± 0.02	8.50 × 10 ⁵	9.00 × 10 ⁵	9.50 × 10 ⁵	9.00 ± 0.50 × 10 ⁵	0.30	0.20	0.20	0.23 ± 0.06
4	0.358	0.299	0.386	0.348 ± 0.04	1.40 × 10 ⁶	1.10 × 10 ⁶	1.65 × 10 ⁶	1.38 ± 0.28 × 10 ⁶	0.30	0.20	0.30	0.27 ± 0.06
6	0.584	0.564	0.623	0.590 ± 0.03	2.15 × 10 ⁶	1.80 × 10 ⁶	2.10 × 10 ⁶	2.02 ± 0.19 × 10 ⁶	0.40	0.30	0.60	0.43 ± 0.15
8	0.734	0.673	0.748	0.718 ± 0.04	2.50 × 10 ⁶	2.05 × 10 ⁶	2.40 × 10 ⁶	2.32 ± 0.24 × 10 ⁶	0.50	0.40	0.70	0.53 ± 0.15
10	0.816	0.822	0.862	0.833 ± 0.03	2.90 × 10 ⁶	3.00 × 10 ⁶	3.25 × 10 ⁶	3.05 ± 0.18 × 10 ⁶	0.70	0.70	0.80	0.73 ± 0.06
12	0.915	0.942	0.968	0.942 ± 0.03	3.00 × 10 ⁶	3.05 × 10 ⁶	3.35 × 10 ⁶	3.13 ± 0.19 × 10 ⁶	0.70	0.80	0.80	0.77 ± 0.06
14	1.113	1.156	1.079	1.116 ± 0.04	3.55 × 10 ⁶	4.10 × 10 ⁶	3.45 × 10 ⁶	3.70 ± 0.35 × 10 ⁶	0.80	0.80	0.70	0.77 ± 0.06
16	1.112	1.157	1.078	1.116 ± 0.04	3.54 × 10 ⁶	4.11 × 10 ⁶	3.44 × 10 ⁶	3.70 ± 0.36 × 10 ⁶	0.90	0.90	0.50	0.77 ± 0.23

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์

ตารางที่ 2-1 แสดงความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ที่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase)

สายพันธุ์	วันที่เข้าระยะการเจริญคงที่	อัตราเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (µg/ml)	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (g/L)
T10	8	1	0.780	709.091	0.709
5	12	1	0.719	653.636	0.653
N11	12	1	0.536	487.273	0.487
V55	12	1	0.574	521.818	0.521
S1	14	5	0.763	3468.181	3.468
F14	12	5	0.566	2572.272	2.572
F15	14	5	0.590	2681.818	2.681
M12	14	1	0.730	663.636	0.663
M14	12	5	0.653	2968.182	2.968
P2	12	10	0.615	5590.909	5.591

หมายเหตุ ใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 เป็นตัวควบคุม (control)

ตารางที่ 2-2 แสดงปริมาณซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ที่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)

สายพันธุ์	วันที่เข้าระยะการเจริญคงที่ (วัน)	ปริมาณของตะกอนซัลเฟต (g/ml)			ปริมาณซัลเฟตในสารสกัด (กรัมต่อลิตร)
		น้ำหนักหลอด + ฝา ก่อนซั่ง	น้ำหนักหลอด + ฝา + ตะกอน หลังซั่ง	น้ำหนักหลังซั่ง - น้ำหนักก่อนซั่ง	
T10	8	1.0784	1.0932	0.0148	14.80
5	12	1.0933	1.1119	0.0186	18.60
N11	12	1.0887	1.1102	0.0215	21.50
V55	12	1.0760	1.0802	0.0042	4.20
S1	14	1.0844	1.1098	0.0254	25.40
F14	12	1.0826	1.0895	0.0069	6.90
F15	14	1.0888	1.1051	0.0163	16.30
M12	14	1.0888	1.1079	0.0191	19.10
M14	12	1.0381	1.0598	0.0217	21.70
P2	12	1.0659	1.0924	0.0265	26.50

หมายเหตุ ใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG 11 เป็นตัวควบคุม (control)

ตารางที่ ง 3 ผลการศึกษาระยะเวลาเจริญเติบโตของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังขนาด 6 ลิตร และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรเหลว BG-11 ปริมาตร 4 ลิตร

ตารางที่ ง 3-1 แสดงระยะเวลาเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. S1

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.062	0.054	0.046	0.054 ± 0.01	2.50 × 10 ⁵	2.50 × 10 ⁵	2.00 × 10 ⁵	2.33 ± 0.29 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.350	0.384	0.346	0.360 ± 0.02	1.75 × 10 ⁶	2.40 × 10 ⁶	1.45 × 10 ⁶	1.43 ± 0.49 × 10 ⁶	0.20	0.20	0.10	0.17 ± 0.06
4	0.787	0.892	0.780	0.820 ± 0.06	7.45 × 10 ⁶	8.15 × 10 ⁶	6.90 × 10 ⁶	7.50 ± 0.63 × 10 ⁶	0.30	0.40	0.30	0.33 ± 0.06
6	0.964	1.053	0.934	0.984 ± 0.06	9.50 × 10 ⁶	9.95 × 10 ⁶	8.50 × 10 ⁶	9.32 ± 0.74 × 10 ⁶	0.50	0.60	0.40	0.50 ± 0.10
8	1.344	1.245	1.099	1.229 ± 0.12	1.50 × 10 ⁷	1.23 × 10 ⁷	1.19 × 10 ⁷	1.31 ± 0.17 × 10 ⁷	0.70	0.70	0.60	0.67 ± 0.06
10	1.680	1.448	1.427	1.518 ± 0.14	1.85 × 10 ⁷	1.51 × 10 ⁷	1.42 × 10 ⁷	1.59 ± 0.23 × 10 ⁷	1.00	0.90	0.80	0.90 ± 0.10
12	1.712	1.644	1.609	1.655 ± 0.05	1.89 × 10 ⁷	1.88 × 10 ⁷	1.93 × 10 ⁷	1.90 ± 0.03 × 10 ⁷	1.00	0.90	0.90	0.93 ± 0.06
14	1.732	1.762	1.748	1.747 ± 0.02	1.92 × 10 ⁷	1.96 × 10 ⁷	1.94 × 10 ⁷	1.94 ± 0.02 × 10 ⁷	1.00	0.90	0.90	0.93 ± 0.06
16	1.731	1.763	1.749	1.748 ± 0.02	1.94 × 10 ⁷	1.95 × 10 ⁷	1.96 × 10 ⁷	1.95 ± 0.01 × 10 ⁷	1.00	0.80	0.90	0.90 ± 0.10

ตารางที่ ง 3-2 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus sp.* M14

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.049	0.048	0.060	0.052 ± 0.01	3.00 × 10 ⁵	2.50 × 10 ⁵	4.00 × 10 ⁵	3.17 ± 0.76 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.292	0.391	0.387	0.357 ± 0.06	1.20 × 10 ⁶	2.35 × 10 ⁶	1.85 × 10 ⁶	1.80 ± 0.58 × 10 ⁶	0.10	0.10	0.20	0.13 ± 0.06
4	0.427	0.452	0.446	0.440 ± 0.01	2.05 × 10 ⁶	3.00 × 10 ⁶	2.65 × 10 ⁶	2.57 ± 0.48 × 10 ⁶	0.20	0.30	0.30	0.27 ± 0.06
6	0.641	0.825	0.714	0.727 ± 0.09	4.25 × 10 ⁶	6.25 × 10 ⁶	5.50 × 10 ⁶	5.33 ± 1.01 × 10 ⁶	0.30	0.40	0.40	0.37 ± 0.06
8	0.840	0.911	1.020	0.924 ± 0.09	5.75 × 10 ⁶	6.25 × 10 ⁶	6.75 × 10 ⁶	6.25 ± 0.50 × 10 ⁶	0.60	0.50	0.60	0.57 ± 0.06
10	1.238	1.023	1.268	1.176 ± 0.13	8.10 × 10 ⁶	7.00 × 10 ⁶	9.05 × 10 ⁶	8.05 ± 1.03 × 10 ⁶	0.70	0.50	0.80	0.67 ± 0.15
12	1.342	1.311	1.401	1.351 ± 0.05	1.02 × 10 ⁷	1.00 × 10 ⁷	1.04 × 10 ⁷	1.02 ± 0.02 × 10 ⁷	0.80	0.60	0.90	0.77 ± 0.15
14	1.515	1.526	1.504	1.515 ± 0.01	1.05 × 10 ⁷	1.10 × 10 ⁷	1.07 × 10 ⁷	1.07 ± 0.03 × 10 ⁷	0.80	1.00	0.90	0.90 ± 0.10
16	1.513	1.528	1.500	1.514 ± 0.01	1.07 × 10 ⁷	1.18 × 10 ⁷	1.11 × 10 ⁷	1.12 ± 0.06 × 10 ⁷	0.90	1.00	0.90	0.93 ± 0.06

ตารางที่ ง 3-3 แสดงระยะการเจริญของสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. P2

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.051	0.055	0.054	0.053 ± 0.00	3.00 × 10 ⁵	3.00 × 10 ⁵	4.00 × 10 ⁵	3.33 ± 0.58 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
2	0.237	0.226	0.214	0.226 ± 0.01	8.50 × 10 ⁵	7.50 × 10 ⁵	6.50 × 10 ⁵	7.50 ± 1.00 × 10 ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10 ± 0.00
4	0.456	0.449	0.421	0.442 ± 0.02	1.30 × 10 ⁶	1.25 × 10 ⁶	1.00 × 10 ⁶	1.18 ± 0.16 × 10 ⁶	0.20	0.20	0.10	0.17 ± 0.06
6	0.533	0.501	0.486	0.507 ± 0.02	1.60 × 10 ⁶	1.70 × 10 ⁶	1.00 × 10 ⁶	1.43 ± 0.38 × 10 ⁶	0.40	0.40	0.30	0.37 ± 0.06
8	0.554	0.606	0.538	0.566 ± 0.04	2.50 × 10 ⁶	3.00 × 10 ⁶	2.75 × 10 ⁶	2.75 ± 0.20 × 10 ⁶	0.60	0.50	0.50	0.53 ± 0.06
10	0.573	0.667	0.542	0.94 ± 0.07	2.70 × 10 ⁶	3.35 × 10 ⁶	2.95 × 10 ⁶	3.00 ± 0.27 × 10 ⁶	0.60	0.60	0.50	0.57 ± 0.06
12	0.660	0.785	0.647	0.697 ± 0.08	3.85 × 10 ⁶	3.60 × 10 ⁶	3.45 × 10 ⁶	3.63 ± 0.16 × 10 ⁶	0.70	0.70	0.60	0.67 ± 0.06
14	0.657	0.760	0.668	0.695 ± 0.06	3.35 × 10 ⁶	3.91 × 10 ⁶	3.58 × 10 ⁶	3.61 ± 0.23 × 10 ⁶	0.70	0.70	0.60	0.67 ± 0.06
16	0.659	0.757	0.663	0.693 ± 0.06	3.20 × 10 ⁶	4.15 × 10 ⁶	3.41 × 10 ⁶	3.59 ± 0.41 × 10 ⁶	0.70	0.60	0.70	0.67 ± 0.06

ตารางที่ ง ผลการศึกษาการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์

ตารางที่ ง 4-1 แสดงความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase)

สายพันธุ์	วันที่เข้าระยะการเจริญคงที่	อัตราการเงืงจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด (g/L)
S1	12	10	0.524	4763.633	4.763 ± 0.02
M14	16	5	0.840	3818.181	3.818 ± 0.03
P2	12	10	0.618	5618.182	5.618 ± 0.01

ตารางที่ ง 4-2 แสดงปริมาณซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบในซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)

สายพันธุ์	วันที่เข้าระยะการเจริญคงที่ (วัน)	ปริมาณของตะกอนซัลเฟต (g/ml)			ปริมาณซัลเฟตในสารสกัด (กรัมต่อลิตร)
		น้ำหนักหลอด + ฝาก่อนซัง	น้ำหนักหลอด + ฝา + ตะกอนหลังซัง	น้ำหนักหลังซัง - น้ำหนักก่อนซัง	
S1	12	1.0713	1.1017	0.0304	30.40 ± 2.05
M14	16	1.0521	1.0816	0.0295	29.50 ± 0.66
P2	12	1.0844	1.1205	0.0361	36.10 ± 1.77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 5 ผลการศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่มีการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์สูง

ตารางที่ ง 5-1 ผลการศึกษาหาปริมาณความชื้นในเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp.S1 , *Scenedesmus* sp.M14
Chlamydomonas sp. P2

สายพันธุ์	ชุดการทดลอง	น้ำหนักสาหร่าย (กรัม)	น้ำหนักของ ภาชนะ อลูมิเนียมพร้อม ฝาปิด (กรัม)	น้ำหนักของภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด และตัวอย่าง (กรัม)			ร้อยละของ ความชื้น	ค่าเฉลี่ยร้อยละ ของความชื้น
				ก่อนอบ	หลังอบ	ก่อนอบ -หลังอบ		
S1	1	1.0014	14.0319	15.0333	15.0135	0.0198	1.98	1.88±0.08
	2	1.0036	14.0452	15.0258	15.0076	0.0182	1.81	
	3	1.0027	14.0438	15.0314	15.0129	0.0185	1.85	
M14	1	1.0042	14.7763	15.7805	15.7462	0.0343	3.42	3.46±0.37
	2	1.0049	14.7645	15.7743	15.7355	0.0388	3.86	
	3	1.0053	14.7752	15.7772	15.7459	0.0313	3.11	
P2	1	1.1842	16.6485	17.6424	17.6271	0.0153	1.29	1.20±0.10
	2	1.1756	14.3112	15.3217	15.3076	0.0141	1.20	
	3	1.1749	16.6410	17.6512	17.6383	0.0129	1.10	

ตารางที่ ง 5-2 ผลการศึกษาหาปริมาณโปรตีนในเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp.S1 , *Scenedesmus* sp.M14 *Chlamydomonas* sp. P2

สายพันธุ์	ชุดการทดลอง	น้ำหนักสาหร่าย (กรัม)	ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตแบลงค์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ร้อยละของไนโตรเจน	ร้อยละของโปรตีน	ค่าเฉลี่ยร้อยละของโปรตีน
			ปริมาณที่ใช้	ปริมาณที่ใช้			
S1	1	1.0189	0.20	8.30	1.11	6.94	7.09±0.17
	2	1.0192	0.20	8.60	1.15	7.19	
	3	1.0153	0.20	8.50	1.14	7.13	
M14	1	1.0091	0.30	6.40	0.85	5.31	5.50±0.19
	2	1.0112	0.30	6.90	0.91	5.69	
	3	1.0064	0.30	6.70	0.89	5.56	
P2	1	1.0107	0.30	7.20	0.96	6.00	6.25±0.25
	2	1.0081	0.30	7.80	1.04	6.50	
	3	1.0103	0.30	7.50	1.00	6.25	

ตารางที่ ง 5-3 ผลการศึกษาหาปริมาณไขมันในเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp.S1 , *Scenedesmus* sp.M14 *Chlamydomonas* sp. P2

สายพันธุ์	ชุดการทดลอง	น้ำหนักสาหร่าย (กรัม)	น้ำหนักไขมันที่สกัดได้			ร้อยละของไขมัน	ค่าเฉลี่ยของร้อยละไขมัน
			น้ำหนักขูดรูปชมพู ก่อนอบ	น้ำหนักขูดรูปชมพู + ไขมันหลังอบ	น้ำหนักหลังอบ - น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)		
S1	1	2.0097	103.1137	103.2215	0.1078	5.36	5.41±0.08
	2	2.0128	104.574	104.682	0.1080	5.37	
	3	2.0056	103.0745	103.1851	0.1106	5.51	
M14	1	2.0361	108.2687	108.3868	0.1181	5.80	5.63±0.15
	2	2.0348	108.3457	108.4578	0.1121	5.51	
	3	2.0357	108.2842	108.3975	0.1133	5.57	
P2	1	2.0542	105.0927	105.1684	0.0757	3.69	3.38±0.29
	2	2.0504	105.0981	105.1663	0.0682	3.33	
	3	2.0492	106.0822	106.1459	0.0637	3.11	

ตารางที่ ง 5-4 ผลการศึกษาหาปริมาณไส้ทั้งหมดของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp.S1 , *Scenedesmus* sp.M14
Chlamydomonas sp. P2

สายพันธุ์	ชุดการทดลอง	น้ำหนักสาหร่าย (กรัม)	น้ำหนักของครุชีเบิล			ร้อยละของไส้ทั้งหมด	ค่าเฉลี่ยร้อยละของไส้ทั้งหมด
			ก่อนเผา	หลังเผา	หลังเผา-ก่อนเผา		
S1	1	1.0148	30.3372	30.3892	0.0520	5.12	5.18±0.32
	2	1.0167	30.2448	30.2945	0.0497	4.89	
	3	1.0152	30.4126	30.4687	0.0561	5.53	
M14	1	1.0050	26.8035	26.8807	0.0772	7.68	7.39±0.28
	2	1.0115	27.0123	27.0842	0.0719	7.11	
	3	1.0283	23.4212	23.4971	0.0759	7.38	
P2	1	1.0354	25.9742	26.0672	0.0930	8.98	9.01±0.09
	2	1.0144	24.2251	24.3176	0.0925	9.12	
	3	1.0289	25.9874	26.0793	0.0919	8.93	

ตารางที่ ง 5-5 ผลการศึกษาหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1 , *Scenedesmus* sp. M14 *Chlamydomonas* sp. P2

สายพันธุ์	ชุดการทดลอง	ร้อยละของความชื้น	ร้อยละของโปรตีน	ร้อยละของไขมัน	ร้อยละของเถ้าทั้งหมด	ร้อยละของคาร์โบไฮเดรต	ค่าเฉลี่ยของร้อยละคาร์โบไฮเดรต
S1	1	1.98	6.94	5.36	5.12	80.60	80.44±0.40
	2	1.81	7.19	5.37	4.89	80.74	
	3	1.85	7.13	5.51	5.53	79.98	
M14	1	3.42	5.31	5.80	7.68	77.79	78.00±0.32
	2	3.86	5.69	5.51	7.11	77.83	
	3	3.11	5.56	5.57	7.38	78.38	
P2	1	1.29	6.00	3.69	8.98	80.04	80.16±0.40
	2	1.20	6.50	3.33	9.12	79.85	
	3	1.10	6.25	3.11	8.93	80.61	

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จ-1 ผลการวิเคราะห์สถิติของอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์

ผลอัตราการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ คือ *Scenedesmus* sp. S1 , *Scenedesmus* sp. M14 *Chlamydomonas* sp. P2 ซึ่งในวัฏการเจริญของสาหร่ายมีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ หนาแน่นเซลล์แห่ง จนกระทั่งเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

ตารางที่ จ-1.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	1.65500	.052374	.030238	1.52490	1.78510	1.609	1.712
M14	3	1.51500	.011000	.006351	1.48767	1.54233	1.504	1.526
P2	3	.69733	.076199	.043994	.50804	.88662	.647	.785
Total	9	1.28911	.450367	.150122	.94293	1.63529	.647	1.712

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.605	2	.803	277.724	.000
Within Groups	.017	6	.003		
Total	1.623	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P2	3	.69733		
M14	3		1.51500	
S1	3			1.65500
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-1.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนเซลล์ ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	1.90000	.026458	.015275	1.83428	1.96572	1.880	1.930
M14	3	1.07333	.025166	.014530	1.01082	1.13585	1.050	1.100
P2	3	.36333	.020207	.011667	.31314	.41353	.345	.385
Total	9	1.11222	.666362	.222121	.60001	1.62443	.345	1.930

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.549	2	1.774	3056.402	.000
Within Groups	.003	6	.001		
Total	3.552	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P2	3	.36333		
M14	3		1.07333	
S1	3			1.90000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-1.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	.93333	.057735	.033333	.78991	1.07676	.900	1.000
M14	3	.90000	.100000	.057735	.65159	1.14841	.800	1.000
P2	3	.66667	.057735	.033333	.52324	.81009	.600	.700
Total	9	.83333	.141421	.047140	.72463	.94204	.600	1.000

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.127	2	.063	11.400	.009
Within Groups	.033	6	.006		
Total	.160	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P2	3	.66667	
M14	3		.90000
S1	3		.93333
Sig.		1.000	.604

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-2 ผลการวิเคราะห์สถิติของการผลิตซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์

ผลการศึกษาซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ของสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1 , *Scenedesmus* sp. M14 , *Chlamydomonas* sp. P2 โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก และการวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแบเรียมคลอไรด์ ที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด

ตารางที่ จ-2.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	4.76333	.021502	.012414	4.70992	4.81675	4.742	4.785
M14	3	3.81833	.038004	.021942	3.72393	3.91274	3.775	3.846
P2	3	5.61800	.018193	.010504	5.57281	5.66319	5.597	5.629
Total	9	4.73322	.779964	.259988	4.13369	5.33276	3.775	5.629

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.862	2	2.431	3259.386	.000
Within Groups	.004	6	.001		
Total	4.867	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
M14	3	3.81833		
S1	3		4.76333	
P2	3			5.61800
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-2.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	30.40667	2.051245	1.184287	25.31109	35.50224	28.406	32.505
M14	3	29.50767	.667286	.385258	27.85004	31.16530	28.814	30.145
P2	3	36.10167	1.771607	1.022838	31.70075	40.50258	34.058	37.202
Total	9	32.00533	3.396781	1.132260	29.39434	34.61633	28.406	37.202

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	76.722	2	38.361	14.770	.005
Within Groups	15.583	6	2.597		
Total	92.305	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
M14	3	29.50767	
S1	3	30.40667	
P2	3		36.10167
Sig.		.520	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

จ-3 ผลการวิเคราะห์สถิติขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์

ผลการศึกษาขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1 , *Scenedesmus* sp. M14 *Chlamydomonas* sp. P2 โดยการวิเคราะห์ปริมาณร้อยละความชื้น ปริมาณร้อยละโปรตีน ปริมาณร้อยละไขมัน ปริมาณร้อยละเถ้า และปริมาณร้อยละคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด

ตารางที่ จ-3.1 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณร้อยละความชื้นสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	1.88000	.088882	.051316	1.65921	2.10079	1.810	1.980
M14	3	3.46333	.376873	.217588	2.52713	4.39954	3.110	3.860
P2	3	1.19667	.095044	.054874	.96056	1.43277	1.100	1.290
Total	9	2.18000	1.026499	.342166	1.39096	2.96904	1.100	3.860

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.112	2	4.056	76.541	.000
Within Groups	.318	6	.053		
Total	8.430	8			

Duncan^a

		Subset for alpha = 0.05		
สายพันธุ์	N	1	2	3
P2	3	1.19667		
S1	3		1.88000	
M14	3			3.46333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-3.2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณร้อยละโปรตีนสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์

Descriptives

สายพันธุ์	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	7.08667	.130512	.075351	6.76246	7.41088	6.940	7.190
M14	3	5.52000	.193132	.111505	5.04023	5.99977	5.310	5.690
P2	3	6.25000	.250000	.144338	5.62897	6.87103	6.000	6.500
Total	9	6.28556	.700091	.233364	5.74742	6.82369	5.310	7.190

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.687	2	1.844	47.341	.000
Within Groups	.234	6	.039		
Total	3.921	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
M14	3	5.52000		
P2	3		6.25000	
S1	3			7.08667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-3.3 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณร้อยละไขมันสำหรับยั้ง 3 สายพันธุ์

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	5.41333	.083865	.048419	5.20500	5.62167	5.360	5.510
M14	3	5.62667	.153080	.088380	5.24640	6.00694	5.510	5.800
P2	3	3.37667	.292803	.169050	2.64930	4.10403	3.110	3.690
Total	9	4.80556	1.089061	.363020	3.96843	5.64268	3.110	5.800

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.256	2	4.628	119.484	.000
Within Groups	.232	6	.039		
Total	9.488	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P2	3	3.37667	
S1	3		5.41333
M14	3		5.62667
Sig.		1.000	.233

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-3.4 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณร้อยละสำหรับยี่ห้อ 3 สายพันธุ์

Descriptives

สายพันธุ์	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	5.18000	.324191	.187172	4.37466	5.98534	4.890	5.530
M14	3	7.39000	.285132	.164621	6.68169	8.09831	7.110	7.680
P2	3	9.01000	.098489	.056862	8.76534	9.25466	8.930	9.120
Total	9	7.19333	1.679643	.559881	5.90225	8.48442	4.890	9.120

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.177	2	11.089	169.638	.000
Within Groups	.392	6	.065		
Total	22.570	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
S1	3	5.18000		
M14	3		7.39000	
P2	3			9.01000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

ตารางที่ จ-3.5 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณร้อยละคาร์โบไฮเดรตสำหรับทั้ง 3 สายพันธุ์

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	80.44000	.404475	.233524	79.43523	81.44477	79.980	80.740
M14	3	78.00000	.329697	.190351	77.18099	78.81901	77.790	78.380
P2	3	80.16667	.395517	.228352	79.18415	81.14918	79.850	80.610
Total	9	79.53556	1.203132	.401044	78.61075	80.46037	77.790	80.740

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.723	2	5.361	37.515	.000
Within Groups	.857	6	.143		
Total	11.580	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
M14	3	78.00000	
P2	3		80.16667
S1	3		80.44000
Sig.		1.000	.410

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

ฉ-4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารร้ายทั้ง 3 สายพันธุ์

ผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเซลล์เฟตพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Scenedesmus* sp. S1 , *Scenedesmus* sp. M14 , *Chlamydomonas* sp. P2 ที่ ความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

ตารางที่ ฉ-4.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารร้ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	45.56967	7.508563	4.335071	26.91736	64.22197	38.775	53.631
M14	3	30.51533	7.954556	4.592565	10.75512	50.27555	25.180	39.658
P2	3	36.37933	20.964239	12.103709	-15.69872	88.45739	21.951	60.427
Total	9	37.48811	13.526766	4.508922	27.09052	47.88570	21.951	60.427

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	345.482	2	172.741	.927	.446
Within Groups	1118.306	6	186.384		
Total	1463.787	8			

Duncan^a

		Subset for alpha = 0.05	
สายพันธุ์	N	1	
M14	3	30.51533	
P2	3	36.37933	
S1	3	45.56967	
Sig.		.239	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ฉ-4.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารห่วยทั้ง3 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	47.75467	1.990632	1.149292	42.80966	52.69967	46.206	50.000
M14	3	41.25233	13.184673	7.612175	8.49979	74.00488	26.056	49.650
P2	3	45.75100	13.470056	7.776941	12.28953	79.21247	31.298	57.955
Total	9	44.91933	9.905897	3.301966	37.30499	52.53368	26.056	57.955

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66.533	2	33.267	.278	.767
Within Groups	718.481	6	119.747		
Total	785.014	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05
		1
M14	3	41.25233
P2	3	45.75100
S1	3	47.75467
Sig.		.507

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๓-4.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารยี่ห่วยทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
S1	3	56.96833	7.298324	4.213689	38.83829	75.09838	50.364	64.804
M14	3	46.66267	16.539789	9.549252	5.57555	87.74978	32.026	64.606
P2	3	50.00533	6.159174	3.556001	34.70510	65.30557	43.243	55.294
Total	9	51.21211	10.579430	3.526477	43.08004	59.34418	32.026	64.804

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	165.864	2	82.932	.682	.541
Within Groups	729.531	6	121.589		
Total	895.395	8			

Duncan^a

สายพันธุ์	N	Subset for alpha = 0.05
		1
M14	3	46.66267
P2	3	50.00533
S1	3	56.96833
Sig.		.310

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.