

การคัดแยกและการแสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียวที่ผลิต  
น้ำมันโอเมก้า-3

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF OMEGA-3 OIL  
PRODUCING GREEN ALGAE



ณัฐนันท์ ปรีชาพลกุล

NATHANAN PREECHAPHONKUL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF OMEGA-3 OIL  
PRODUCING GREEN ALGAE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2023

KMITL-2023-SC-M-020-012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2023

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและการแสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 Isolation and characterization of omega-3 oil producing in algae
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐนันท์ ปรีชาพลกุล
รหัสประจำตัว	64605039
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

### บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ต่างๆที่มีประโยชน์ได้ไม่ว่าจะเป็น แคลโรทีนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ และน้ำมันโอเมก้า-3 ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการเนื่องจากในปัจจุบันแนวโน้มอุตสาหกรรมอาหารทางเลือกเพื่อสุขภาพกำลังได้รับความนิยม งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันทั้ง 3 วิธี ได้แก่ เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี เทคนิคการชั่งน้ำหนัก เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออไนเซชันมีความเหมาะสมที่สุด จากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวทั้ง 8 สายพันธุ์ที่มีในหน่วยวิจัย พบว่ามีสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวรหัส BNG2, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61 หลังจากนั้นทำการปรับวิธีการสกัดให้เหมาะสมต่อการสกัดน้ำมันโอเมก้า-3 พบว่าการสกัดโดยใช้การบดเซลล์ด้วยความร้อน 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เหมาะสมที่สุด และเมื่อทำการเทียบโปรไฟล์กรดไขมันที่ตรวจวัดได้จากเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออไนเซชัน พบว่า *Chlorella* sp. KLSc59 มีความแปรปรวนของกรดไขมันน้อยที่สุดจึงเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์นี้ไปปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อไป เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. KLSc59 ในอาหารปริมาตร 30 เปอร์เซ็นต์ของขวดเพาะเลี้ยงที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ให้ค่าน้ำมันโอเมก้า-3 เท่ากับ 21.74 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 18.43 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายหลังการปรับสภาวะ สาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. KLSc59 เป็นสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ถือเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในฐานะผู้ผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 สำหรับอาหารทางเลือกต่อไป

**คำสำคัญ:** น้ำมันโอเมก้า-3 ปรับสภาวะการผลิต การแสดงลักษณะ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Isolation and characterization of omega-3 oil producing in algae
<b>Students</b>	Miss Nathanan Preechaphonkul
<b>Student ID</b>	64605039
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Academic Year</b>	2023
<b>Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

### Abstract

Green algae can synthesize various useful metabolites, such as carotenoids, antioxidants, and omega-3 oil. As the trend towards healthy alternative food options grows, this research aims to study the comparison of 3 techniques for oil detection: Nile red fluorescence spectroscopy, gravimetry, and gas chromatography. The results showed that gas chromatography with flame ionization detector was the most suitable for detection. Three out of eight algal strains were found to have the ability to produce omega-3 oils, include BNG2, *Chlorella* sp. KLSc59, and *Chlorella* sp. KLSc61. Afterward, the extraction method was optimized for omega-3 oil extraction. It was found that the optimal extraction was an incubation the cell at 50°C for 30 min. When comparing the fatty acid profiles measured by gas chromatography with flame ionization, the result showed that *Chlorella* sp. KLSc59 consistent with fatty acid detection. This alga was selected for omega-3 oil production. The optimal culturing *Chlorella* sp. KLSc59 in a 30 percentage of flask volume with the addition of 10 mM calcium chloride, pH 6.0 and culture for five days. This study showed that *Chlorella* sp. KLSc59, a freshwater alga capable of producing omega-3 oil, is served as alternative producer of omega-3 oils.

**Keywords:** omega-3 oil, optimization, characterization, green algae, *Chlorella* sp. KLSc59

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น และข้อเสนอแนะต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร. สุกฤต ศิริขวัญพงศ์ อาจารย์คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความกรุณาดูแล ช่วยเหลือ เอาใจใส่ ให้ความรู้ และคำปรึกษามากมายเกี่ยวกับการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ รวมถึงเป็นอาจารย์ผู้มีส่วนสำคัญในการทำให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ ถูกต้อง และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ (Gas Chromatography-Flame Ionization Detector, GC-FID) และสถานที่ในการตรวจวิเคราะห์น้ำมันและกรดไขมันตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์เสร็จสิ้น

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวรัตน์ จันทะโร ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิชัย วัฒนวิจารณ์ เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ช่วยตรวจทานให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ผู้เขียนขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนผู้ช่วยวิจัยและทุนผู้ช่วยสอน หลักสูตรบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2564 ที่ให้การสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และได้ให้โอกาสในการพัฒนา ส่งเสริมประสบการณ์ทางด้านการทำงานวิจัยและทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนในรายวิชาต่าง รวมถึงการสนับสนุนค่าใช้จ่ายรายเดือนตลอดจนจบการศึกษา

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการการทดลองและเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทดลองประจำภาควิชาโภชนาการอาหาร คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Fluorescence Spectrometer) และ เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS)

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ๆ และเพื่อนๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดระยะเวลาการดำเนินการ

ณัฐนันท์ ปรีชาพลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญรูป .....	ซ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย .....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 กรดไขมัน.....	5
2.1.1 กรดไขมันอิ่มตัว.....	5
2.2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว .....	6
2.2.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน .....	6
2.2 ผลของกรดไขมันต่อสุขภาพมนุษย์ .....	8
2.1.2 ปริมาณน้ำมันในสิ่งมีชีวิตอื่น .....	9
2.3 สาหรัยสี่เขี้ยว.....	10
2.2.1 รังควัตถุ.....	10
2.2.2 ผนังเซลล์.....	10
2.2.3 คลอโรพลาสต์ .....	11
2.2.4 อายุสปอต .....	11
2.2.5 แพลกเจลลัม .....	11
2.2.6 ออร์แกเนลล์อื่นๆ.....	11
2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันในสาหรัยสี่เขี้ยว .....	11
2.4.1 การสังเคราะห์กรดไขมัน .....	12
2.4.2 กาสังเคราะห์กรดไขมันโดยพอลิคีไทต์.....	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมน้ำมันและกรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว.....	14
2.5.1 สภาวะความเครียดจากการขาดสารอาหาร.....	14
2.5.2 สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิ .....	15
2.5.3.สภาวะความเครียดจากความเข้มแสง.....	15
2.5.4.สภาวะความเครียดจากเกลือ.....	15
2.5.5.สภาวะความเครียดจากการเติมโลหะหนัก .....	16
2.5.6.สภาวะความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงพีเอช.....	16
2.6 การสกัดน้ำมันในสาหร่ายสีเขียว.....	16
2.6.1 การใช้แรงเชิงกล .....	16
2.6.2 การสกัดโดยตัวทำละลาย.....	17
2.6.3 การสกัดแบบของไหลวิกฤตยิ่งยวด.....	17
2.6.4 การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก .....	17
2.7 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	17
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....</b>	<b>22</b>
3.1 สาหร่ายสีเขียว.....	22
3.2 สารเคมี.....	22
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	23
3.4 วิธีการทดลอง .....	25
3.4.1 การเพาะเลี้ยง.....	25
3.4.2 การตรวจวัดน้ำมันและกรดไขมัน .....	25
3.4.3 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3.....	28
3.4.4 การศึกษาวิธีการทำให้เซลล์แตกและการสกัด น้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว .....	29
3.4.5 การศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว.....	29
3.4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	31
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล .....</b>	<b>32</b>
4.1 ผลการศึกษาการคัดเลือกเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจวัด ไขมันในเซลล์สาหร่าย.....	32
4.1.1 เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี.....	32
4.1.2 เทคนิคการชั่งน้ำหนัก.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

4.1.3 เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี.....	35
4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3.....	39
4.3 ผลการศึกษาคัดเลือกวิธีที่ทำให้เซลล์แตกโดยใช้แรงสั่นสะเทือนและความร้อน .....	40
4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3	
ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก.....	42
4.4.1 เปอร์เซ็นต์ปริมาณอาหารในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	43
4.4.2 ชนิดของเกลือ.....	45
4.4.3 ความเข้มข้นของเกลือที่เลือก .....	50
4.4.4 พีเอชและแสง.....	56
4.4.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง .....	60
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>66</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	66
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	67
เอกสารอ้างอิง.....	68
ภาคผนวก .....	75
ภาคผนวก ก.....	76
ภาคผนวก ข.....	78
ภาคผนวก ค.....	79
ประวัติผู้เขียน.....	98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณน้ำมันในสิ่งมีชีวิตต่างๆ.....	9
3.1 สถานะการวิเคราะห์น้ำมันด้วยเครื่อง GC-MS .....	27
3.2 สถานะการวิเคราะห์น้ำมันด้วยเครื่อง GC-FID .....	28
3.3 การปรับสถานะการสกัดน้ำมัน .....	29
4.1 เปอร์เซนต์พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS .....	36
4.2 เปอร์เซนต์พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-FID .....	38
4.3 ผลเปอร์เซนต์กาสกัดน้ำมันโดยดัดแปลงจาก Shim และคณะ (2020) ของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์.....	41
4.4 แสดงผลการตรวจวัดสัดส่วนกรดโอโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และ กรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (DHA) จากการเพาะเลี้ยง 11 ครั้งของสาหร่ายสีเขียว ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3.....	42
4.5 ตารางเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 กับสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ .....	64
4.6 ตารางที่ ก-1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP) .....	76
4.7 ตาราง ค-1 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova สัดส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 15 วัน.....	91
4.8 ตาราง ค-2 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 15 วัน.....	94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ส่วนแบ่งการตลาดของน้ำมันโอเมก้า-3 ในอุตสาหกรรมต่างๆ .....	4
2.2 แสดงโครงสร้างกรดไขมันสเตียริก .....	5
2.3 แสดงโครงสร้างกรดไขมันไลโอเลอิก .....	6
2.4 แสดงตำแหน่งโครงสร้างของกรดไขมันทั่วไป .....	6
2.5 แสดงโครงสร้างกรดไขมันไลโนเลอิก .....	7
2.6 แสดงโครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 .....	7
2.7 สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp.....	10
2.8 โครงสร้างคลอโรพลาสต์.....	11
2.9 แสดงวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว .....	13
2.10 แสดงวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโดยพอลิคีไทด์ .....	14
3.1 แสดงภาพรวมของงานในการคัดแยกและการแสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียว ในหน่วยวิจัยที่สามารถผลิตน้ำมันน้ำมันโอเมก้า-3 .....	25
4.1 แสดงภาพการสแกนสเปกตรัมการเรืองแสงใน 3 สภาวะ .....	34
4.2 แสดงน้ำหนักของน้ำมันและคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ในหน่วยวิจัย .....	35
4.3 แสดงผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการสะสม น้ำมันโอเมก้า-3 โดยใช้ GC-FID .....	40
4.4 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่มของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะ เลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20 30 40 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ .....	44
4.5 ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่มของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะ เลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20 30 40 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ .....	45
4.6 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ .....	47
4.7 ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ .....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8 สัตว์ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ และกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ .....	49
4.9 สัตว์ส่วนน้ำมัน DHA ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ .....	50
4.10 ปริมาณน้ำมัน DHA ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ .....	50
4.11 สัตว์ส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	52
4.12 ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	53
4.13 สัตว์ส่วนกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ .....	54
4.14 ปริมาณกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ .....	54
4.15 สัตว์ส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	55
4.16 ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	56
4.17 สัตว์ส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในพีเอชนอกเซลล์ (external pH) ) เป็นระยะเวลา 7 วัน .....	57
4.18 ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในพีเอชนอกเซลล์ (external pH) ) เป็นระยะเวลา 7 วัน .....	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.19 สัดส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง .....	59
4.20 ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง .....	60
4.21 สัดส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 15 วัน.....	62
4.22 ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 15 วัน.....	63
4.23 รูป ค-1 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ของสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่มของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20 30 40 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์.....	79
4.24 รูป ค-2 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ของปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่มของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20 30 40 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์.....	80
4.25 รูป ค-3 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์.....	81
4.26 รูป ค-4 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์.....	82
4.27 รูป ค-5 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova สัดส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดย เติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.28 รูป ค-6 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	84
4.29 รูป ค-7 สัดส่วนกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือ แคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	85
4.30 รูป ค-8 ปริมาณกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมความเข้มข้นเกลือ แคลเซียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	85
4.31 รูป ค-9 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova สัดส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	86
4.32 รูป ค-10 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 20 30 40 50 และ 75 มิลลิโมลาร์.....	87
4.33 รูป ค-11 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova สัดส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง ในพีเอชนอกเซลล์ (external pH) ) เป็นระยะเวลา 7 วัน.....	88
4.34 รูป ค-12 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง ในพีเอชนอกเซลล์ (external pH) ) เป็นระยะเวลา 7 วัน.....	89
4.35 รูป ค-13 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova สัดส่วนน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง.....	90
4.35 รูป ค-14 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one-way anova ปริมาณน้ำมัน 4 กลุ่ม ของ <i>Chlorella</i> sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง.....	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่สำคัญทางการค้าและเศรษฐกิจ เช่น น้ำมัน โพลีเมอร์ เม็ดสี วิตามิน สามารถสังเคราะห์ในสายสำหรับสีเขียวขนาดเล็กได้ โดยเฉพาะการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 และเม็ดสีแคโรทีนอยด์ที่มีคุณค่าสูงท่ามกลางสารพิษที่มีตัวอื่นๆ แนวโน้มความต้องการน้ำมันโอเมก้า-3 กำลังเพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ไม่ว่าจะเป็นในด้านโภชนาการหรืออุตสาหกรรมสัตว์น้ำ โดยคาดว่าในอนาคตความต้องการด้านการบริโภคอาหารเสริมและอาหารทางเลือก (plant-based food) มีอัตราการเติบโตที่สูงขึ้นเรื่อยๆ จากปี 2014 ประมาณ 20,000 ตัน และคาดการณ์ว่าในปี 2025 จะเพิ่มขึ้นเป็น 60,000 ตัน ตามคำแนะนำของสมาคมโรคหัวใจแห่งอเมริกา (American Heart Association, AHA) มนุษย์ควรบริโภคน้ำมันโอเมก้า-3 ในปริมาณ 3,500 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งเทียบเท่าการบริโภคน้ำมันโอเมก้า-3 ในปริมาณ 1.3 ล้านเมตริกตันต่อปี (Finco *et al.*, 2017) เนื่องจากการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 มักมาจากปลาทะเลเป็นส่วนใหญ่ เช่น แซลมอน ทูน่า เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม สิ้นเปลืองทรัพยากร รวมถึงผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ การทำประมงส่งผลให้ปลาหลายชนิดมีจำนวนลดลงและอาจสูญพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีความวิตกกังวลในคุณภาพของอาหารที่มาจากเนื้อสัตว์ในฟาร์มเลี้ยงอันอาจเกิดการปนเปื้อนจากสารเคมีตกค้างหรือฮอร์โมนเร่งต่างๆ ที่อาจจะมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคในระยะยาว อย่างไรก็ตามหากแนวโน้มการบริโภคอาหารมังสวิรัตหรืออาหารที่มาจากพืชเพิ่มขึ้น ประชากรกลุ่มนี้จะขาดน้ำมันโอเมก้า-3 ดังนั้นอาหารมังสวิรัตหรืออาหารที่มาจากพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการเทียบเท่าหรือดีกว่าจึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสม

น้ำมันโอเมก้า-3 เป็นกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) ซึ่งประกอบไปด้วย กรดแอลฟาไลโนเลอิก (Alpha-linolenic acid, ALA) กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid, EPA) กรดโดโคซะเฮกซาอีโนอิก (Docosahexaenoic acid, DHA) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้มีความจำเป็นต่อร่างกาย เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ การรับประทานจึงมีความสำคัญ น้ำมันโอเมก้า-3 เหล่านี้สามารถพบในอาหารจากปลาทะเล พืช และธัญพืชบางชนิด สายสำหรับเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่น่าสนใจในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 เนื่องจากมีการเจริญอย่างรวดเร็วและเป็นผู้ผลิตอันดับแรกในห่วงโซ่อาหาร จึงไม่ต้องกังวลในเรื่องการสะสมสารเคมีในห่วงโซ่อาหาร โดยทั่วไปสายสำหรับขนาดเล็กจะมีปริมาณน้ำมันอยู่ที่ 20-50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะแปรผันตามสภาวะการเลี้ยง มีรายงานหลายฉบับระบุว่าพบสายสำหรับในน้ำจืดบางสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ได้ เช่น สายพันธุ์ *Spirulina* sp. และ *Chlorella* sp. (Tao *et al.*, 2015).

เนื่องจากคณะผู้วิจัยอยู่ในหน่วยวิจัยที่มีการเก็บสายสำหรับสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดแยกได้จากในประเทศไทยรวม 20 สายพันธุ์ จึงทำให้ผู้วิจัยมีความคิดที่จะศึกษาวิจัยเพื่อตามหาและสกัดน้ำมันเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอเมก้า-3 จากสาหร่ายต่างๆ ที่มีในหน่วยวิจัยฯ และนอกจากนั้นแล้วในการศึกษาวิจัยอาจจะสามารถค้นพบน้ำมันอื่นๆ ที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่อร่างกายจากสาหร่ายดังกล่าวอีกด้วย การเลี้ยงสาหร่ายที่แยกได้จากในประเทศย่อมเหมาะสมต่อสภาพสิ่งแวดล้อมในประเทศเช่นกัน การเพาะเลี้ยงสาหร่ายระดับใหญ่ในอนาคตจะทำให้ช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเทคนิคการตรวจวัดน้ำมันและกรดไขมันจากเซลล์สาหร่าย
2. เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีในหน่วยวิจัยที่ผลิตน้ำมันโอเมก้า-3
3. เพื่อปรับสภาวะที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 จากสาหร่ายที่เลือกใช้

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. การคัดเลือกเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจวัดน้ำมันและกรดไขมันในเซลล์สาหร่าย ได้แก่ เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปี เทคนิคการชั่งน้ำหนัก และเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี
2. การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3 จากสาหร่าย 8 สายพันธุ์ในหน่วยวิจัยโดยใช้วิธี Relative proportion of fatty acid เทียบกับค่าความขุ่น ซึ่งในการคัดเลือกจะแบ่งออกเป็นสองขั้นตอน ดังต่อไปนี้
  - 2.1 ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว 8 สายพันธุ์ เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความขุ่นเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)
  - 2.2 ทำการสกัดและการทำให้เซลล์แตกตามข้อ (2) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออไนเซชัน (Gas-chromatography flame Ionization Detector, FID)
3. การคัดเลือกสภาวะในการทำให้เซลล์แตกของสาหร่ายโดยใช้แรงสั่นสะเทือนด้วยเสียงและความร้อน ซึ่งดัดแปลงจาก Archer *et al.* (2019) และ Shim *et al.* (2020)
4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3 ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้โดยมีสภาวะทั้งหมด 6 สภาวะ ได้แก่
  - 4.1 ศึกษาเปอร์เซ็นต์ปริมาณอาหารในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ 20, 30, 40, 50, 60 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน วัดค่าความขุ่นในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์สัดส่วนน้ำมันโอเมก้า-3 ทั้งหมด มาเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเปอร์เซ็นต์ปริมาณอาหารเหมาะสม แล้วจึงนำไปศึกษาต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.2 ศึกษาอิทธิพลของเกลือแต่ละชนิด ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ แมงกานีสคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับสถานะที่เลี้ยงในอาหาร TAP ปกติ
- 4.3 ศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมในการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3
- 4.4 ศึกษาอิทธิพลของพีเอช (external pH) ต่อการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3
- 4.5 ศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3
- 4.6 ศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

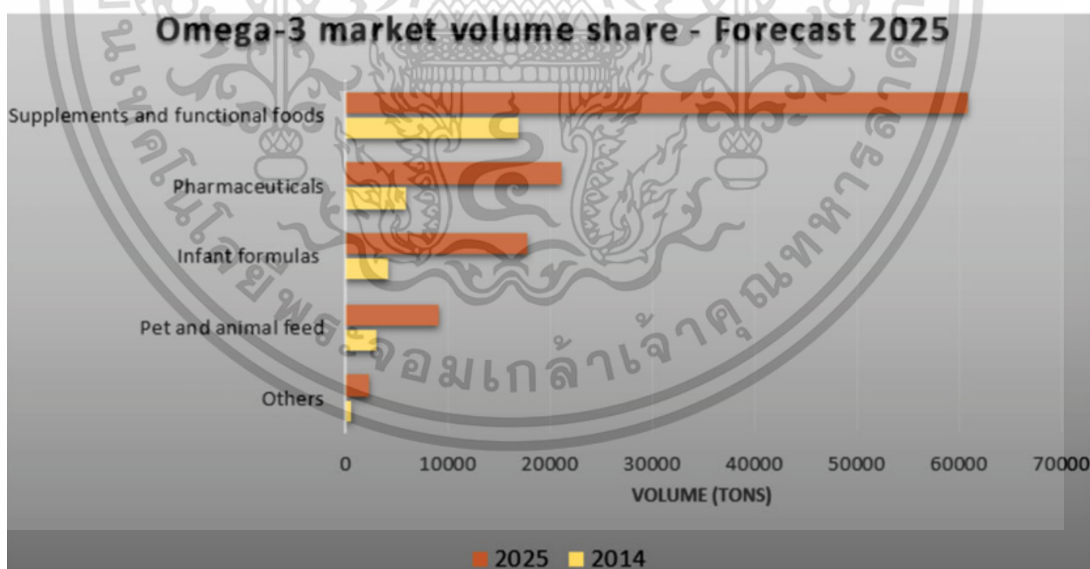
1. ทราบเทคนิคและสถานะที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกที่เหมาะสมต่อการศึกษาน้ำมันโอเมก้า-3
2. ได้สายพันธุ์สาหร่ายในหน่วยวิจัยที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3
3. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายจากการปรับสภาพการทดลองเพื่อนำไปต่อยอดในการศึกษาการผลิตน้ำมันจากสาหร่าย
4. องค์ความรู้ใหม่และฐานข้อมูล สำหรับการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยในเรื่องของการศึกษาเพื่อสกัดน้ำมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการสำหรับร่างกายจากแหล่งอาหารชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการสำรวจอุตสาหกรรมโอเมก้า-3 ทั่วโลกในปี 2020 มีมูลค่าอยู่ที่ 5.58 พันล้านเหรียญสหรัฐ และคาดการณ์ว่าจะขยายตัวในอัตราการเติบโตในปี 2020 ถึง 2028 อยู่ที่ 8.6 เปอร์เซ็นต์ต่อปี (Size *et al.*, 2020) เนื่องจากวิถีชีวิตมนุษย์ในปัจจุบันมีวิถีชีวิตที่เร่งรีบมากขึ้น รวมถึงการระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ได้ทำให้จุดสนใจของผู้บริโภคเปลี่ยนไป หันมาสนใจรักษาสุขภาพมากขึ้นเพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงของร่างกายเพื่อรับมือกับโรคต่างๆ ตามคำแนะนำสมาคมโรคหัวใจแห่งอเมริกาให้บริโภคปลาเพื่อรักษาระดับไขมันโอเมก้า-3 ที่เหมาะสม ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเป็นที่ต้องการมากขึ้น จากรูปที่ 2.1 แสดงให้เห็นว่าอุตสาหกรรมส่วนผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโอเมก้า-3 ครอบคลุมตลาดมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ (Finco *et al.*, 2017) โดยมีการบริโภค 16,900 ตันในปี 2014 ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโอเมก้า-3 ในตลาดส่วนใหญ่มีแหล่งการผลิตมาจากปลาทะเล จากรายงานล่าสุดในปี 2020 ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโอเมก้า-3 จากน้ำมันปลายังคงเป็นผู้นำทางการตลาดที่มีส่วนแบ่งมากกว่า 63.1 เปอร์เซ็นต์ของรายได้ทั่วโลก ข้อมูลทางสถิติคาดว่า การบริโภคน้ำมันโอเมก้า-3 กำลังขยายตัวมากขึ้น แต่ยังคงขาดดุลการผลิตเนื่องจากแหล่งที่มาหลักนั้นมาจากปลาในทะเล



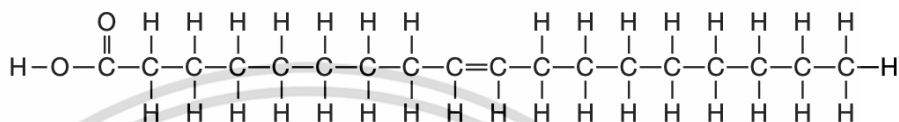
รูปที่ 2.1 ส่วนแบ่งการตลาดของน้ำมันโอเมก้า-3 ในอุตสาหกรรมต่างๆ (Finco *et al.*, 2017)

การผลิตน้ำมันปลาในโลกรู้จักกำลังการผลิตอยู่ที่หนึ่งล้านเมตริกตันต่อปี โดย 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปลาที่ผลิตจะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารปลาแซลมอน ทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการที่เพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันได้มีการออกกฎหมายเกี่ยวกับการประมงในสัตว์ทะเลเพื่อคุ้มครองความหลากหลายทางชีวภาพในทะเลส่งผลต่อการผลิตในอุตสาหกรรม และความกังวลของผู้บริโภคต่อเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- 2.1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid หรือ Monoenic-fatty acid, MUFA) เป็นกลุ่มกรดไขมันที่มีหมู่แอลคิลเป็นสารประกอบอัลคีน (Alkene) สายโซ่คาร์บอนอะตอมจะเชื่อมกันด้วยพันธะคู่ 1 พันธะ ที่เหลือจะเชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยว เช่น กรดโอเลอิก (C18:1) มีคาร์บอนอะตอม 18 อะตอม มีพันธะคู่ 1 พันธะ ดังรูปที่ 2.3

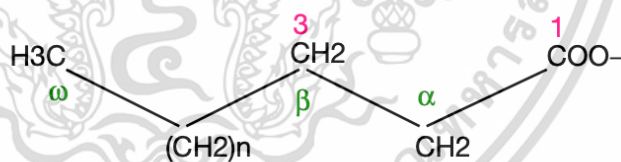
Typical MUFA:



Oleic Acid- Monounsaturated fatty Acid

รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างกรดไขมันโอเลอิก (Petrović *et al.*, 2015)

- 2.1.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid หรือ Polyenoic fatty acid, PUFA) เป็นกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะคู่ มากกว่า 1 พันธะ ซึ่งกรดไขมันกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญต่อร่างกายมนุษย์ โดยมีชื่อเรียกตามตำแหน่งพันธะคู่ ปลายสายโซ่ด้านหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) เป็นต้นสายโซ่ เรียกว่า อัลฟา ( $\alpha$ -) ปลายด้านหมู่เมทิล (-CH<sub>3</sub>) เป็นหางโซ่ เรียกว่า โอเมก้า ( $\omega$ -) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงตำแหน่งโครงสร้างของกรดไขมันทั่วไป (Petrović *et al.*, 2015)

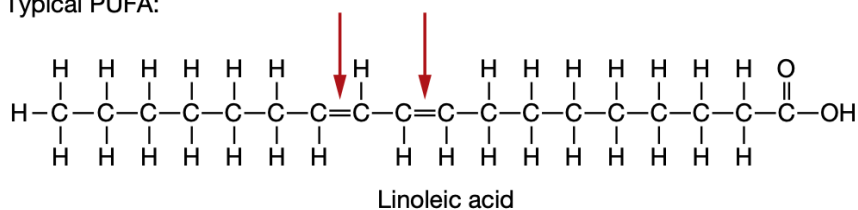
โดยทั่วไปจะตั้งชื่อกรดไขมันจากพันธะคู่แรกโดยนับจากทางด้านปลายสายโซ่ด้านหมู่เมทิล แต่ระบบการอ่านชื่อสากล IUPAC นับตำแหน่งพันธะคู่จากด้านต้นสายโซ่ด้านหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ในกลุ่มนี้สามารถจำแนกย่อยได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามตำแหน่งพันธะคู่ ดังนี้

- 2.1.3.1 กลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-6 (Omega-6 fatty acid,  $\omega$ -6 fatty acid หรือ n-6 fatty acid) เป็นกลุ่มกรดไขมันที่มีตำแหน่งพันธะคู่ที่ตำแหน่งโอเมก้า-6 นับจากคาร์บอนอะตอมของกรดไขมันด้านปลายหมู่เมทิล เช่น กรดไขมันลิโนเลอิก (LA, C18:2 n-6) มีคาร์บอนอะตอม 18 อะตอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

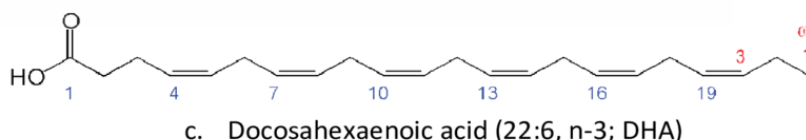
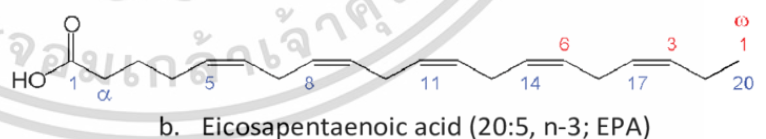
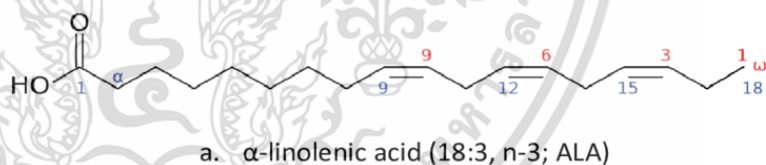
และพันธะคู่ 2 พันธะ ดังรูปที่ 2.5 กรดอะราคิโดนิก (ARA, C20:4) มีคาร์บอนอะตอม 20 อะตอมและพันธะคู่ 4 พันธะ เป็นต้น

Typical PUFA:



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างกรดไขมันไลโนเลอิก (Petrović *et al.*, 2015)

2.1.3.2 กลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Omega-3 fatty acid  $\omega$ -3 fatty acid หรือ n-3 fatty acid) เป็นกลุ่มกรดไขมันมีตำแหน่งพันธะคู่ที่ตำแหน่งโอเมก้า-3 นับจากคาร์บอนอะตอมของกรดไขมันด้านปลายหมู่เมทิล ( $\text{CH}_3$ -) เช่น กรดแอลฟาไลโนเลอิก (ALA, C18:3) มีคาร์บอนอะตอม 18 อะตอมและพันธะคู่ 3 พันธะ กรดสเตียริกโดนิก (SDA, C18:4) มีคาร์บอนอะตอม 18 อะตอมและพันธะคู่ 4 พันธะ กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA, C20:5) มีคาร์บอนอะตอม 20 อะตอมและพันธะคู่ 5 พันธะ และ กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA, C22:6) มีคาร์บอนอะตอม 22 อะตอมและพันธะคู่ 6 พันธะ ดังรูปที่ 2.6 เป็นต้น



รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Khan *et al.*, 2015).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2. ผลของกรดไขมันต่อสุขภาพของมนุษย์

การจัดกลุ่มผลกระทบต่อสุขภาพของกรดไขมันจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ SFA MUFA และ PUFA แม้ว่ากรดไขมันในกลุ่มเดียวกัน มีโครงสร้างทางเคมีจะคล้ายคลึงกัน แต่อาจมีคุณสมบัติทางชีวภาพและส่งผลต่อร่างกายแตกต่างกัน

กลุ่มของ SFAs ในอาหารส่วนใหญ่มาจากไขมันสัตว์ เช่น นม น้ำมันมะพร้าว มักพบ กรดลอริก (C6:0) กรดไมริสติก (C14:0) กรดปาล์มิติก (C16:0) เป็นต้น ส่วนมาก กรดไขมันกลุ่ม SFA ที่มีสายโซ่ยาวมักก่อให้เกิดลิ้มเลือดอุดตัน มะเร็ง และเกี่ยวข้องกับการเพิ่มคอเลสเตอรอลในร่างกายทำให้เกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดหัวใจได้ สำหรับ SFA ที่มีสายโซ่สั้น เช่น กรดบิวทีริก (C4:0) กรดคาปริลิก (C8:0) และกรดคาปริก (C10:0) มีรายงานว่าส่งผลดีต่อสุขภาพ เช่น ป้องกันมะเร็ง มีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

กลุ่มของ MUFAs มักพบในน้ำมันจากพืช เช่น น้ำมันมะกอก พบกรดไขมันหลัก 2 กรดไขมัน คือ กรดปาล์มิโทเลอิก (C16:1, n-7) พบว่ามีกระบวนการโปรไลโปเจนิค (pro-lipogenic) ในเนื้อเยื่อไขมัน คาดว่ามีประโยชน์ในการปกป้องเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ จากการสะสมไขมันและความเป็นพิษของไขมัน และกรดโอเลอิก (C18:1, n-9) มีการศึกษามากมายชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ในระดับเซลล์ โดยกรดไขมันชนิดนี้เป็นหนึ่งในกรดไขมันบนพอสฟอลิพิด ซึ่งเพิ่มความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ การส่งสัญญาณและควบคุมการทำงานของเอนไซม์บางชนิด มีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของคอเลสเตอรอลในร่างกาย สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและลดการเสื่อมของระบบประสาทได้

กลุ่มของ PUFAs ประกอบไปด้วยกรดไขมันโอเมก้า-6 ส่งผลทางลบต่อสุขภาพโดยมีฤทธิ์กระตุ้นการอักเสบ การเพิ่มการจับตัวของเกล็ดเลือด มักก่อความเสี่ยงของการอักเสบในร่างกาย รวมถึงการก่อโรคหลอดเลือดตีบ โรคอ้วน และส่งผลต่อการทำลายเซลล์ประสาทผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สำหรับน้ำมันโอเมก้า-3 ประกอบไปด้วยกรดไขมัน 3 ชนิดหลัก ได้แก่ ALA พบมากในน้ำมันเมล็ดแฟลกซ์ (flaxseed oil) น้ำมันวอลนัต (walnut oil) และ น้ำมันคาโนลา (canola oil) เป็นต้น EPA และ DHA พบมากใน ปลาทะเล เช่น แซลมอน ซาคิน ปลาแมคเคอเรล และอื่นๆ ดังตารางที่ 2.1 ในปัจจุบันมีการศึกษากรดไขมันโอเมก้า-3 โดยเฉพาะ EPA และ DHA ในทางคลินิกอย่างแพร่หลายว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ ป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ มีการศึกษาฤทธิ์ของกรดไขมัน DHA ว่ามีผลต่อการพัฒนาสมองและส่งเสริมการทำงานของเซลล์ประสาท เนื่องจากมีพันธะคู่เป็นจำนวนมากซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ประสาทมีความยืดหยุ่นมากขึ้น ส่งผลให้การสื่อสารระหว่างเซลล์รวดเร็วทำให้การรับรู้ ความจำ และการเรียนรู้ดีขึ้น จึงนิยมนำ DHA มาใส่ในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับเด็กและหญิงตั้งครรภ์ ในปัจจุบันมีการศึกษาผลของการขาดกรดไขมันโอเมก้า-3 อาจเป็นสาเหตุของความผิดปกติทางอารมณ์ และการเสริมกรดไขมันนี้อาจเป็นจุดเริ่มต้นในการรักษาโรคซึมเศร้าได้ (Watson, 2014) (Belwal *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ปริมาณกรดไขมันโอเมก้า-3 ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ

สิ่งมีชีวิต (Source)	กรดไขมัน			หน่วย	อ้างอิง
	ALA	EPA	DHA		
แมคเคอเรล (Atlantic)	0.159	0.898	1.401	กรัมของกรดไขมันต่อ 100 กรัมของตัวอย่าง	(Shahidi <i>et al.</i> , 2018)
ทูน่า (bluefin)	NA	0.283	0.89		
Herring (Pacific)	0.057	0.969	0.689		
Sardines (Canned)	0.235	0.532	0.864		
Salmon (Atlantic, farmed)	0.167	0.862	1.104		
กุ้ง (Shrimp)		15.26	11.37	เปอร์เซ็นต์กรดไขมัน	(Puri <i>et al.</i> , 2015)
ปู (Red crab)		12.13	11.93		
Flaxseed (linseed)	22.81	NA	NA	กรัมของกรดไขมันต่อ 100 กรัมของตัวอย่าง	(Shahidi <i>et al.</i> , 2018)
Chia seed	17.83	NA	NA		
Walnut	10.4	NA	NA		
Soybean	6.79	NA	NA		
Mustard	5.89	NA	NA		
<i>Mortierella alliacea</i>	33-41	1.3-13	NA	เปอร์เซ็นต์กรดไขมัน	(Naveena <i>et al.</i> , 2018)
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	NA	NA	33.5	เปอร์เซ็นต์กรดไขมัน	(Puri <i>et al.</i> , 2015)
<i>Dunaliella salina</i>	NA	21.4	NA		
<i>Chlorella minutissima</i>	NA	39.9	NA		
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	NA	23.4	NA		
<i>Chlorella vulgaris</i>	1.57	NA	NA		
<i>Phaeodactylum tricomutum</i>	NA	8.8	0.5		
<i>Colwellia sp.</i>	NA	NA	0.7- 0.8		

หมายเหตุ NA คือ ไม่แสดงข้อมูลในแหล่งอ้างอิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3. สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) อยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา เป็นสิ่งมีชีวิตแบบยูคาริโอต กลุ่มที่มีความหลากหลายมากกว่า 7,000 ชนิด มักพบในแหล่งน้ำทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เซลล์ของสาหร่ายมีหลายรูปแบบทั้งแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular) แบบโคโลนี (colonial) และแบบหลายเซลล์ (multicellular) ภายในคลอโรพลาสต์ประกอบด้วย รงควัตถุคลอโรฟิลล์เอ และบี เป็นจำนวนมาก ทำให้สาหร่ายมีสีเขียว เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างและลักษณะที่หลากหลาย ทำให้สามารถนำคุณลักษณะเหล่านี้มาใช้จัดจำแนกสาหร่ายสีเขียวได้ โดยลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวมีดังนี้ ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 สาหร่าย *Chlorella* sp.

(ที่มา <http://www.aquasymbio.fr/en/chlorella-sp>)

- 2.3.1 รงควัตถุ (pigment) มักพบคลอโรฟิลล์เอ และบี เป็นหลัก นอกจากนี้ ยังพบ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ประกอบด้วย แอลฟา แคโรทีน (alpha- carotene) เบต้า แคโรทีน (beta- carotene) แกมมา แคโรทีน (gamma- carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) แต่ในสาหร่ายกลุ่มอื่นมีรงควัตถุแตกต่างกัน เช่น สาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) (ยูวดี 2546)
- 2.3.2 ผนังเซลล์ (cell wall) โครงสร้างผนังเซลล์คล้ายกับพืชชั้นสูง ซึ่งประกอบไปด้วย เส้นใยเซลลูโลสมาประกอบในลักษณะไมโครไฟบริล ทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายค่อนข้างหนาและมีความแข็งแรง บางชนิดอาจพบสารประกอบประเภทอื่นร่วมด้วย เช่น ซิลิคอน และสาหร่ายสีเขียวบางสายพันธุ์ก็พบว่าไม่มีผนังเซลล์ (ยูวดี 2546)
- 2.3.3 คลอโรพลาสต์ (chloroplast) เป็นออร์แกเนลล์ภายในไซโทพลาสซึม ซึ่งประกอบไปด้วยเยื่อหุ้มสองชั้น ภายในคลอโรพลาสต์ประกอบด้วยของเหลว เรียกว่า สโตรมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(stroma) เยื่อหุ้มชั้นในมีลักษณะพับไปมา โครงสร้างภายในเป็นถุงล้อมรอบเยื่อหุ้ม เรียกว่า ไทลาคอยด์ (thylakoids) เรียงซ้อนกันเป็นตึ๊งเรียกว่า กรานา (Grana) การเรียงตัวของไทลาคอยด์ในสาหร่ายสีเขียวจะแตกต่างจากพืชชั้นสูง คือ มีการเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ รังควัตถุจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง ภายในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว มักพบ ไพรินอยด์ เป็นองค์ประกอบในการสร้างแป้งซึ่งมีลักษณะและจำนวนต่างกัน ดังนั้นสามารถใช้ความแตกต่างของไพรินอยด์ในการจำแนกสาหร่ายได้ ดังรูปที่ 2.8 (ยูวตี 2546)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างคลอโรพลาสต์

(ที่มา <https://www.britannica.com/science/chloroplast>)

- 2.3.4 อายสปอต (eyespot) หรือ สติกมา (stigma) เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่รับแสง และตอบสนองต่อแสง มีลักษณะเป็นรูป กลม รียาว อาจอยู่เป็นกลุ่มหรือเดี่ยว มีรงควัตถุประเภท ลูทีน (lutein) เบตาแคโรทีน และแอสตาแซนทีน (ยูวตี 2546)
- 2.3.5 แฟลเจลลัม (Flagellum) เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ มักจะพบแฟลเจลลัมจำนวนสองถึงสามเส้น สามารถพบได้ในเซลล์ปกติ (vegetative cell) หรือเซลล์สืบพันธุ์ (Reproductive cell) (ยูวตี 2546)
- 2.3.6 ออร์แกเนลอื่นๆ เช่น แวกิวโอ นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย จะทำหน้าที่คล้ายกับพืชทั่วไป (ยูวตี 2546)

## 2.4. การสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว

การสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียวมีความคล้ายคลึงกับพืชชั้นสูง ดังนั้นกระบวนการสังเคราะห์เริ่มต้นจากการผลิตกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ภายในคลอโรพลาสต์ เรียกว่า กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty acid synthase) หลังจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการต่อสายยาวและเติมพันธะคู่ (Desaturation and elongation process) และประกอบกันอยู่ในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งมีการใช้เอนไซม์หลายชนิดด้วยกัน นอกจากนี้ในสาหร่ายบางสายพันธุ์ยังสามารถ

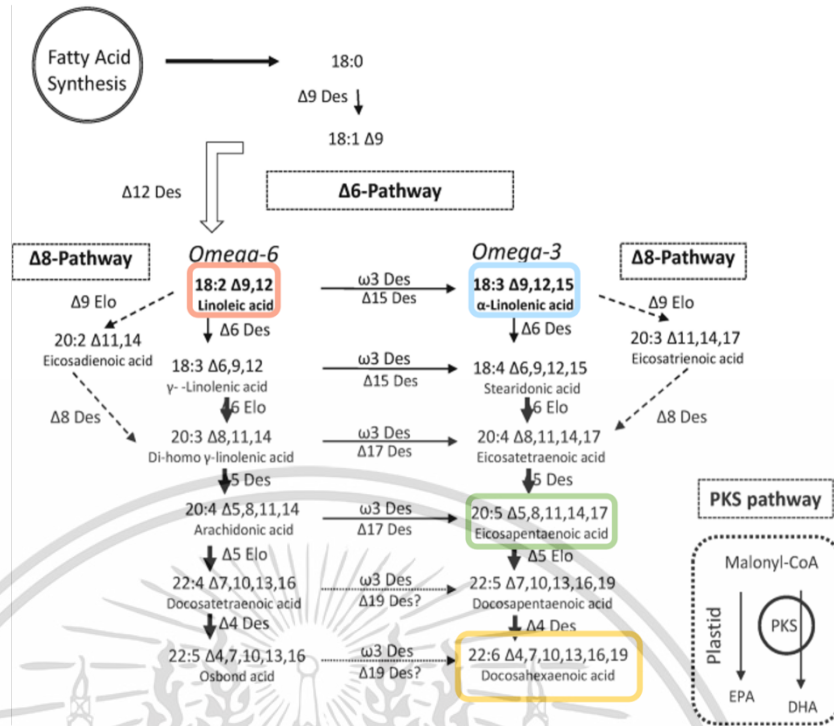
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในสื่อใดๆ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์กรดไขมันผ่านทางกระบวนการผลิตสารพอลิคีไทด์ (Polyketide synthase pathway, PKS) ซึ่งพบในแบคทีเรีย, Thraustochytrids หรือ Dinophytes เป็นต้น ในการสังเคราะห์ทั้งสองกระบวนการเริ่มต้นด้วย อะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมันโดยในวิถีจะสร้างมาจากสองทาง ทางแรกคือ มาจากการย่อยสลายแบ่งให้เป็นน้ำตาลผ่านวิถีไกลโคไลซิสจนได้เป็น ไพรูเวท (Pyruvate) จากนั้นจะถูกออกซิไดส์ต่อเป็นอะซิติล โคเอ (Acetyl-CoA) ทางที่สองได้มาจากกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) ได้เป็น กลีเซอรอลดีไฮด์-3 ฟอสเฟต (glyceraldehyde-3-phosphate) แล้วถูกออกซิไดส์ต่อจนได้เป็นอะซิติล โคเอ ผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway)

#### 2.4.1 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Fatty acid synthase, FAS pathway)

เริ่มต้นจากอะซิติล โคเอ ซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 2 อะตอม 1 โมเลกุลเข้าทำปฏิกิริยากับ มาโลนิล โคเอ (Malonyl CoA) มีคาร์บอน 3 อะตอม โดยใช้เอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase, (Accase) ปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล ได้เป็นกรดไขมันตัวแรกที่มีคาร์บอน 4 อะตอม จากนั้น กรดไขมันคาร์บอน 4 อะตอม จะทำปฏิกิริยากับมาโลนิล โคเอ แล้วปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันคาร์บอน 6 อะตอม ปฏิกิริยานี้จะเกิดวนไปจนได้กรดปาล์มมิติก (C16:0-ACP) และใช้เอนไซม์ elongase (Elo) จนได้กรดสเตียริก (C18:0-ACP) จากนั้นเป็นขั้นตอนการสังเคราะห์กรดไขมันต่างๆ เรียกว่า กระบวนการต่อสายยาวและเติมพันธะคู่ (Desaturation and elongation process) (หลังจากได้กรดสเตียริกแล้วเซลล์จะใช้เอนไซม์  $\Delta 9$  desaturates ( $\Delta 9$ -Des) เข้าเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่งโอเมก้า-9 ได้เป็นกรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1) จากนั้นสำหรับใช้เอนไซม์  $\Delta 12$  desaturates ( $\Delta 12$ -Des) มาเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่งโอเมก้า-6 เป็นกรดลิโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดโอเมก้า-6 ตัวแรกของวิถี จากนั้นเส้นทางการสังเคราะห์จะแบ่งได้สองทาง ขึ้นอยู่กับการทำงานเอนไซม์ ทางแรกคือเส้นทางการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-6 เส้นทางที่สองการเปลี่ยนมาสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3 โดยใช้เอนไซม์  $\Delta 15$  desaturates ( $\Delta 15$ -Des) เข้ามาเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่งโอเมก้า-3 หรือ ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 15 หากนับจากหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ได้เป็นกรดไขมันโอเมก้า-3 ตัวแรก คือ กรดแอลฟา-ไลโนเลอิก (C18:3) ต่อมาใช้เอนไซม์  $\Delta 6$ -Des ได้เป็นกรดสเตียริลโนอิก (C18:4) แล้วใช้เอนไซม์ Elongase เพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอน 2 อะตอม กลายเป็นกรดโอโคซาเตตระอีโนอิก (C20:4) จากนั้น  $\Delta 5$ -Des ทำปฏิกิริยาได้เป็นกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก(C20:5) เอนไซม์ Elo มาเพิ่มคาร์บอนอีก 2 อะตอม เป็นกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (C22:5) จากนั้นเอนไซม์  $\Delta 4$ -Des ทำปฏิกิริยาต่อได้เป็นกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (C22:6) หากสำหรับมีเอนไซม์  $\Delta 15$ -Des และ  $\Delta 17$ -Des ก็สามารถเปลี่ยนเส้นทางการ สังเคราะห์จากโอเมก้า-6 มาเป็น โอเมก้า-3 ได้ จากการศึกษาได้มีการคาดว่าในสิ่งมีชีวิตอาจจะมีเอนไซม์  $\Delta 19$ -Des ในการเปลี่ยนเส้นทางการสังเคราะห์ได้ ดังรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 แสดงวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว (Hallmann et al., 2019)

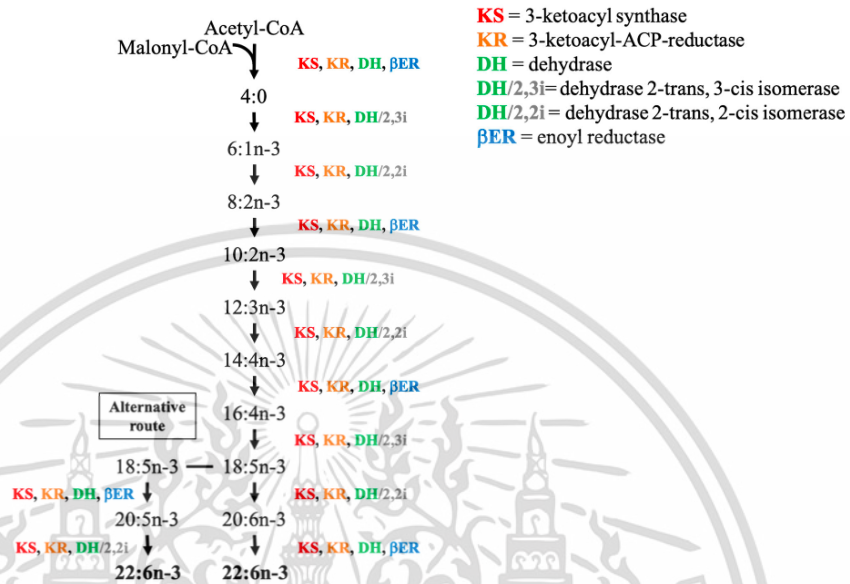
#### 2.4.2 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันโดยพอลิคีไทด์ (Polyketide synthase pathway, PKS)

กระบวนการสังเคราะห์เริ่มต้นด้วยอะซิติล โคเอ มาทำปฏิกิริยากับมาโลนิล โคเอ ได้กรดไขมันตัวแรกคือ กรดไขมันที่มีคาร์บอน 4 อะตอม เป็นตัวแรก โดยเอนไซม์ ketoacyl-synthase (KS) และ ketoacyl-reductase (KR) ทำหน้าที่ในการเติมคาร์บอนทีละ 2 อะตอม ในการสังเคราะห์กรดไขมันในกระบวนการนี้ เมื่อทำการสังเคราะห์กรดไขมันเพิ่มทีละ 2 อะตอมแล้วเอนไซม์ dehydrogenase (DH) (หรือ dehydrogenase ซึ่งสัมพันธ์กับ isomerases) และ enoyl-reductase ( $\beta$ ER) จะเข้าเติมพันธะคู่ที่ปลายด้านหมู่เอซิลของกรดไขมัน ดังนั้นกรดไขมันตัวถัดมาคือ กรดไขมันที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ที่มีพันธะคู่ที่ 1 พันธะ จากนั้นเอนไซม์ ketoacyl-synthase (KS) และ ketoacyl-reductase (KR) จะเข้าทำปฏิกิริยาเติมคาร์บอนทีละ 2 อะตอม ตามด้วยการเติมพันธะคู่ โดยเอนไซม์ dehydrogenase (DH) และ enoyl-reductase ( $\beta$ ER) ไปเรื่อยๆ จนได้ กรดโดโคซาเฮกซาโนอิก (DHA, C22:6) เป็นกรดไขมันตัวสุดท้าย เนื่องจากในวิถีมีการใช้เอนไซม์ทั้งหมดเพียง 4 ชนิดที่มีการทำงานร่วมกับไอโซเมอเรส 2 ชนิด (2.2i และ 2.3i) วิธีนี้เป็น การเติมคาร์บอน และเพิ่มพันธะคู่ลงปลายที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (FAS pathway) ที่ต้องใช้ ATP ในกระบวนการเติมพันธะคู่ (The desaturation step) จึงทำให้วิธีนี้ใช้ ATP น้อยกว่า (รูปที่ 2.10) ส่วนใหญ่แล้วในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (FAS pathway) มักจะสังเคราะห์จนได้กรดไขมัน C16:0, C18:0 ซึ่งเป็นกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไขมันหลักที่พบในสาหร่ายสีเขียว หลังจากนั้นน่าจะเข้าสู่การสังเคราะห์โดยพอลิคีไทด์เพื่อสร้างกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (C20:5) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (C22:6) ต่อไป (Remize *et al.*, 2021)



รูปที่ 2.10 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโดยพอลิคีไทด์ที่คาดว่าเกิดขึ้นในสาหร่ายสีเขียว (Polyketide synthase pathway, PKS) (Remize *et al.*, 2021)

## 2.5. ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมน้ำมันและกรดไขมันในสาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวเมื่อเทียบกับพืชและปลา มีการรายงานว่าปริมาณน้ำมันและกรดไขมันในสาหร่าย แปรผันตามสารอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยง ส่วนใหญ่เมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเครียด (stress condition) (Chen *et al.*, 2017) อย่างไรก็ตามจากรายงานพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีความเครียดสูงๆ มักจะมีกรดไขมันเชิงซ้อนไม่อิ่มตัวลดลง แต่พบการสะสมกรดไขมันอิ่มตัวมากขึ้นในเซลล์ (lipid droplet) ดังนั้นสภาวะความเครียดที่แตกต่างกันทำให้สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ตอบสนองแตกต่างกันด้วย จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 มักใช้สภาวะที่คล้ายคลึงกับสภาวะในการเพิ่มการผลิตน้ำมัน มาใช้เพื่อดูการตอบสนองในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 โดยสภาวะความเครียดที่ถูกใช้ในการศึกษาก่อนหน้ามีดังต่อไปนี้

2.5.1 สภาวะความเครียดจากการขาดสารอาหาร (Nutrient starvation) การขาดสารอาหารในสภาวะเพาะเลี้ยงจะทำให้เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวลดลง แต่จะทำการเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันมากขึ้น เพื่อสะสมพลังงานในการหล่อเลี้ยงเซลล์ต่อไป ในสภาวะที่มีสารอาหารสมบูรณ์เมื่อสาหร่ายสังเคราะห์แสงได้ ATP และ NADPH จะถูกนำไปใช้เพื่อสร้างชีวมวล ได้เป็น ADP และ NADP<sup>+</sup> หลังจากนั้นจะถูกนำกลับไปใช้ใน

กระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป ในสภาวะที่ขาดสารอาหารทำให้สาหร่ายขาดแหล่งตัวรับอิเล็กตรอนไป ทำให้ NADP<sup>+</sup> มีปริมาณลดลง แต่สาหร่ายไม่สามารถที่จะหยุดการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์แสงได้เนื่องจากเป็นแหล่งผลิตพลังงานหลักของสาหร่าย ดังนั้นสาหร่ายจึงใช้ NADPH ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันแทนเพื่อเพิ่ม NADP<sup>+</sup> ให้มากขึ้นเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ให้สาหร่ายสามารถดำเนินกิจกรรมภายในเซลล์ต่อไป (Hu *et al.*, 2008) เมื่อเซลล์มีอัตราการแบ่งตัวลดลง ทำให้สาหร่ายไม่มีความจำเป็นในการใช้กรดไขมันในการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ ในสภาวะนี้เซลล์เลือกที่จะนำกรดไขมันไปสังเคราะห์ให้อยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอไรด์และเก็บสะสมไว้ในเซลล์แทน และกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีแนวโน้มที่จะถูกผลิตขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress oxygen) ในการสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบขาดสารหรือจำกัดอาหารเป็นวิธีที่ถือว่ามีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณน้ำมันในเซลล์ อย่างไรก็ตามการแบ่งตัวของสาหร่ายมักจะลดลงมาก (Song *et al.*, 2020)

2.5.2 สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิ (Temperature stress) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตปริมาณกรดไขมันและชนิดของกรดไขมันก็มีการเปลี่ยนแปลงด้วยการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิต่ำลงจะมีการทำงานของเอนไซม์ desaturase เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสะสมน้ำมันมากขึ้น เพื่อเพิ่มจุดเยือกแข็งและทำหน้าที่ป้องกันความเย็น (An *et al.*, 2013) แต่สภาวะการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิสูง พบว่ามีการผลิตน้ำมันที่มีสมบัติเป็นกลางมากขึ้น (Chen *et al.*, 2017)

2.5.3 สภาวะความเครียดจากความเข้มแสง (Light intensity stress) เป็นปัจจัยความเครียดทางชีวภาพที่สำคัญปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย อิทธิพลของแสงมีความสำคัญโดยตรงกับกระบวนการสังเคราะห์แสง ในกรณีที่มีความเข้มแสงสูงจะเกิด Photoinhibition ได้ซึ่งทำให้การสร้างน้ำมันลดลง มีการรายงานความยาวคลื่นและเวลาส่งผลชนิดของกรดไขมันที่ผลิตขึ้นพบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 37.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีให้รอบการรับแสงเป็น 8 ต่อ 16 ชั่วโมง ทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 15.9 และ 27.4 เปอร์เซ็นต์ (Song *et al.*, 2020)

2.5.4 สภาวะความเครียดจากเกลือ (Salt stress) บทบาทของเกลือคือส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายและช่วยในการดูดซึมอาหาร โดยความเครียดจากเกลือส่งผลต่อสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึมต่างๆในเซลล์ การสังเคราะห์กรดไขมันเป็นหนึ่งในนั้น มีรายงานว่าความเครียดจากความเค็มสูงเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้สาหร่ายสะสมกรดไขมันมากขึ้น จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ภายใต้สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5-30 ppt พบว่าสาหร่ายมีการ

สะสมกรดไขมันเพิ่มมากขึ้นโดยมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 63.5 เปอร์เซ็นต์ (Teh *et al.*, 2021) มีการรายงานว่าการเพิ่มความเค็มในสาหร่ายทำให้องค์ประกอบของกรดไขมันเปลี่ยนแปลงโดยมีระบุที่สามารถเพิ่มองค์ประกอบของกรดไขมันพอลิติกและกรดโอ-เลอิกได้ (Elloumi *et al.*, 2020)

2.5.5 สภาวะความเครียดจากการเติมโลหะหนัก (Heavy metal stress) การเติมโลหะบางชนิดลงไปในการเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มการสะสมกรดไขมันในสาหร่ายได้ โลหะบางชนิดนั้นเป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (trace element) เพื่อให้เซลล์สาหร่ายรักษาเมแทบอลิซึมและสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ เช่น เหล็กและทองแดง เป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่ใช้ขนส่งอิเล็กตรอน แมกนีเซียม เป็นองค์ประกอบหลักของคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายสีเขียว ซึ่งมีผลโดยส่งต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง มีรายงานว่า การเพิ่มแมกนีเซียมไอออนสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Acetyl-CoA carboxylase (ACCCase) ได้ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์กรดไขมัน (Lu *et al.*, 2021) จะเห็นได้ว่าหากเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมให้เหมาะสมอาจเป็นหนทางที่สามารถเพิ่มทั้งชีวมวลและการสะสมน้ำมันในเซลล์ได้ โลหะอีกชนิดที่เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาการเพิ่มปริมาณน้ำมัน คือ แคลเซียม มีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อม และเพิ่มการสังเคราะห์น้ำมันที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง (neutral lipid) ตามระดับสัญญาณของแคลเซียมไอออน นอกจากนี้โลหะอื่นๆ เช่น แคดเมียม ตะกั่ว โครเมียมเป็นโลหะที่เป็นพิษต่อเซลล์อาจทำให้กลไกการสังเคราะห์แสงเสียหาย ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากการศึกษาเมื่อเติมลงไปในความเข้มข้นที่เหมาะสม สามารถเพิ่มการสะสมน้ำมันในสาหร่ายบางสายพันธุ์ได้ (Song *et al.*, 2022)

2.5.6 สภาวะความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงพีเอช (pH stress) การเปลี่ยนแปลงพีเอชอาจส่งผลต่อการสะสมน้ำมันในเซลล์สาหร่าย โดยมีรายงานว่า การเพาะเลี้ยง *Chlorella CHLOR1* ภายใต้สภาวะพีเอชสูงทำให้เกิดการสะสมน้ำมันที่มีสมบัติเป็นกลางมากขึ้นและลดสัดส่วนของฟอสโฟลิพิดในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ลง นอกจากนี้ในการผลิตกรดอิกโซเพนตะอีนอิกของสาหร่าย *Porphyridium purpureum* มีค่าใกล้เคียงกันในช่วงพีเอช 5.0 – 7.6 แต่การผลิตลดลงเมื่อเพิ่มพีเอชสูงกว่า 7.6 (Robertson *et al.*, 2013)

## 2.6 การสกัดน้ำมันในสาหร่ายสีเขียว

ปัจจุบันได้มีการศึกษาสภาวะต่างๆ ในการสกัดน้ำมันจากเซลล์สาหร่าย เนื่องจากโครงสร้างของสาหร่ายมีผนังเซลล์ที่ค่อนข้างแข็งแรง และน้ำมันสามารถถูกออกซิไดส์ได้เมื่อสกัดออกมา ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเป็นต้องสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้มากที่สุดและทำให้คุณภาพของน้ำมันเสียหายน้อยที่สุด จากรายงานมีการศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันโดยทั่วไปมี 4 วิธีดังนี้

2.6.1 การใช้แรงเชิงกล (Pressing and homogenization) การใช้แรงกดเพื่อทำให้ผนังเซลล์แตกออกโดยใช้เม็ดบีดขนาดเล็ก (bead milling) มากวนหรือปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง ทำให้ผนังเซลล์ถูกกระทบจนเสียหายซึ่งจะต้องพิจารณาการระยะเวลาสัมผัสกันระหว่างเซลล์และเม็ดบีด ขนาด รูปร่าง องค์ประกอบของเม็ดบีดและความแข็งแรงของผนังเซลล์ วิธีนี้มักใช้กับควบคู่กับการสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด จากการรายงานพบว่าวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 100-200 กรัมต่อลิตร ข้อดีของวิธีนี้คือง่ายและประหยัด (Mercer *et al.*, 2011).

2.6.2 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent extraction) วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้มาก การสกัดโดยใช้หลักการละลายของสารที่แตกต่างกันสองชนิด โดยพิจารณาจากความเป็นขั้ว (Polarity) ของสารที่ถูกสกัดกับตัวทำละลายที่นำมาใช้ ซึ่งสารที่ต้องการสกัดจะละลายมากับตัวทำละลายเมื่อค่าความเป็นขั้วใกล้เคียงกัน (like-dissolves-like) สารที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม เมทานอล เฮกเซน และเอทานอล สำหรับการสกัดน้ำมัน วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ วิธีการสกัดของ Bligh and Dyer (1959) ซึ่งจะใช้คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 และวิธีของ Folch *et al.* (1957) ใช้คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1

2.6.3 การสกัดแบบของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical fluid extraction) คือ การใช้ของไหลยิ่งยวดมาสกัดสารออก โดยการเพิ่มอุณหภูมิและความดันของสารให้สูงกว่าจุดวิกฤต ได้แก่ ความดันวิกฤต และอุณหภูมิวิกฤต ในสถานะนี้สารจะมีคุณสมบัติทั้งของเหลวและก๊าซ หมายถึงสามารถแพร่ผ่านของแข็งได้เหมือนก๊าซและมีความสามารถในการละลายเหมือนของเหลว โดยสารที่นิยมนำมาใช้คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (SC-CO<sub>2</sub>) (ณัฐยา 2556)

2.6.4 การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic-assisted) เป็นการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงมาทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวในการสกัดสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้ดีขึ้น หลักการของคลื่นอัลตราโซนิกคือการใช้คลื่นเสียงที่ประกอบไปด้วยการอัดและขยาย เมื่อเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟองขนาดเล็กขึ้น เมื่อฟองได้รับแรงจากช่วงอัดทำให้เกิดคลื่นกระแทกไปชนกับผนังเซลล์จนทำให้ผนังเซลล์มีขนาดเล็กลง (สุเมธ 2557)

## 2.7. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารทางเลือกเพื่อดูแลสุขภาพเป็นที่ต้องการมากขึ้น น้ำมันโอเมก้า-3 เป็นผลิตภัณฑ์ตัวหนึ่งที่มีความต้องการสูงในตลาด ไม่ว่าจะเป็น การเสริมลงไปในนมผงสำหรับเด็ก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิตามิน อาหารสัตว์ และใช้เป็นยาในการช่วยรักษาและป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด และมีผลวิจัยทางคลินิกมากมาย เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อร่างกายมนุษย์ เช่น การลดระดับคอเรสเตอรอลในร่างกาย ลดการอักเสบภายในร่างกาย ผลต่อเซลล์ประสาทให้ส่งสัญญาณได้ดีขึ้น จากรายงานพบว่าภาวะโลกร้อนและการทำการประมงมากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพในทะเลลดลง ปลาบางสายพันธุ์ลดลงเป็นอย่างมาก และการออกกฎหมายเกี่ยวกับการทำการประมงในทะเลทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารทางเลือก เช่น น้ำมันโอเมก้า-3 มีกำลังการผลิตที่ลดลง อีกทั้งกำลังการผลิตมักมาจากปลาทะเลเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งผู้บริโภคอาจมีความกังวลเรื่องการสะสมสารเคมีตามห่วงโซ่อาหาร กลุ่มผู้บริโภคมังสวิรัต (vegan) และผู้ที่มีอาการแพ้อาหารทะเล กลุ่มนี้อาจจะขาดการบริโภคได้ องค์การ The Dietary Guidelines for Americans ในปี 2015-2020 ได้แนะนำให้ทานโอเมก้า-3 ในปริมาณ 400-500 มิลลิกรัมต่อวัน การขาดกรดไขมันจำเป็นเหล่านี้แสดงถึงความเสี่ยงที่เพิ่มในการเกิดโรคต่างๆ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคทางจิตเวช และสุขภาพจิต (Lange. 2020) จากการค้นหาแหล่งอาหารทางเลือกพบว่าการผลิตในสาหร่ายเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากมีการเจริญรวดเร็ว ใช้พื้นที่น้อยกว่าการปลูกพืช ใช้พลังงานแสงและคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญเติบโต และนำมาผลิตโครงสร้างคาร์บอนเพื่อสร้างกรดไขมันชนิดต่างๆในเซลล์ อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตและการตอบสนองต่อความเครียดในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาเพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อไป โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้

Chen *et al.*, (2009) ทำการศึกษาการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้วิธีการย้อมสีด้วยไนล์เรดและทำการวิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมทรี จากการรายงานพบว่าวิธีนี้ได้ผลในสาหร่ายบางชนิด การศึกษานี้ทำการศึกษาตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ น้ำมันที่มีคุณสมบัติเป็นกลางจะถูกวิเคราะห์โดย 96 well-plate โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่น (excitation/emission) 530 และ 575 นาโนเมตร ที่สภาวะที่เหมาะสมให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์  $R^2$  เท่ากับ 0.998 ใช้สารมาตรฐานน้ำมันไตรโออีน (triolein) เมื่อนำมาวิเคราะห์กับสาหร่ายสีเขียวหลากหลายสายพันธุ์ มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สารมาตรฐานน้ำมันไตรโออีนที่ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 8.5, 3.9 เปอร์เซ็นต์ และ 8.6, 4.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การตรวจวัดมีขีดจำกัดการวิเคราะห์ต่ำสุดเท่ากับ 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดการวิเคราะห์สูงสุดอยู่ที่ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์เบื้องต้นโดยใช้สีย้อมเป็นวิธีที่รวดเร็วในการคัดแยกสาหร่ายที่มีความสามารถในการสะสมน้ำมันสูงในเวลาอันสั้น โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและพลังงานทดแทนได้

Chen *et al.*, (2011) ทำการศึกษาสภาวะการย้อมสีไนล์เรดในสาหร่าย 13 สายพันธุ์ ซึ่งนำเทคนิคการรบกวนผิวเยื่อหุ้มเซลล์โดนคลื่นไมโครเวฟมาบำบัดรวม (Microwave-assisted) โดยสภาวะการย้อมแบบสองขั้นตอนถูกนำมาใช้ ขั้นตอนที่ 1 เป็นการปรับสภาพและการย้อมสี พบว่าการรบกวนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ที่ได้รับคลื่นไมโครเวฟเป็นเวลา 50 และ 60 วินาที เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ จากนั้นทำการสอบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ได้แก่ การใช้สารมาตรฐาน น้ำมันไตรโอสีน การสกัดน้ำมันและการชั่งน้ำหนัก พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน เทคนิคการตรวจวัดการ ย้อมสีไนล์เรดร่วมกับคลื่นไมโครเวฟเป็นการศึกษาการรบกวนผิวเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้สีย้อมสามารถซึม ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น เพื่อการคัดกรองสาหร่ายที่สามารถสะสมน้ำมันได้อย่างรวดเร็วมากขึ้น

Lee *et. al.*, (2010) การเปรียบเทียบวิธีการรบกวนผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ใช้วิธีการออโตเคลป (autoclaving) การใช้คลื่นเสียงอัลตราโซนิก (sonication) การใช้เม็ดบีด (bead-beating) คลื่นไมโครเวฟ (microwave oven) และสารละลายเกลือเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium-chloride solution) ในสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ดังนี้ *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus sp.* ทำการสกัดน้ำมันโดยใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหนักน้ำมันในสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลวิธีการรบกวนผนังเซลล์โดยใช้วิธีการออโตเคลป เม็ดบีด คลื่นไมโครเวฟ คลื่นเสียงอัลตราโซนิก และสารละลายเกลือเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 5.4 - 11.9, 7.9 - 8.1, 10.0 - 28.6, 6.1 - 8.8 และ 6.8 - 10.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สาหร่าย *Botryococcus sp.* แสดงปริมาณกรดโอเลอิกสูงสุด 5.7 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการรบกวนผิวเซลล์ด้วยคลื่นไมโครเวฟ จากการศึกษาวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายที่สุดและมีประสิทธิภาพในการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก

Archer *et. al.*, (2019) เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีหลากหลายและสามารถสะสมสารเมแทบอลิต์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำให้มีแนวโน้มในการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นอาหารสัตว์ โภชนาการ ปุ๋ยชีวภาพ เชื้อเพลิงชีวภาพ ทำการศึกษาคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำในไอร์แลนด์จำนวน 80 สายพันธุ์ มาประเมินองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี ทำการจัดกลุ่มตามสายพันธุ์เพื่อตรวจวัดกรดไขมันเบื้องต้น จากนั้นเลือก 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมกรดไขมันกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก(DHA) ได้แก่ คลาสไดอะตอม *Stauroneis sp.* (LACW24), คลาส Ochrophyte cf. *Phaeothamnion sp.* (LACW34) and คลาส Haptophyte *Diacronema sp.* (GMC30) จากการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยการผลิตกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) ของ GMC30, LACW24 และ LACW34 มีค่า 3.9, 11.9 และ 1.3 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยการผลิตกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ GMC30 และ LACW24 มีค่า 3.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Ferreira *et. al.*, (2021) ศึกษาพารามิเตอร์ในการเจริญเติบโต การผลิตโปรตีนคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยเฉพาะองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella sp.*, *C. vulgaris*, *Desmodesmus sp.*, *D. brasiliensis*, *Botryococcus braunii* และ *B. terribilis* จากการศึกษาวิเคราะห์การเจริญเติบโตสูงสุด คือ *C. vulgaris* ได้ชีวมวล เท่ากับ 42.6 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และมีปริมาณน้ำมันสูงสุดเป็นอันดับสาม เท่ากับ 21.9

เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบกรดไขมันมีสัดส่วน มีกรดแอลฟา-ไลโนเลอิก เท่ากับ 23.0 เปอร์เซ็นต์ และมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแกมมาไลโนเลอิก เท่ากับ 5.6 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมันทั้งสองชนิดเป็นที่สนใจในอุตสาหกรรมอาหารและยา สามารถเป็นทางเลือกของผู้ทานอาหารมังสวิรัตได้ สายพันธุ์ที่มีการสะสมน้ำมันสูงสุดคือ *B. braunii* มีการสะสมกรดโอเลอิกเป็นหลัก แต่มีอัตราการเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับ *B. terribilis* แสดงการสะสมน้ำมันทั้งภายในและภายนอกเซลล์ มีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 30.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วยกรดสเตียริกเป็นส่วนใหญ่

Shim *et al.*, (2020) ศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella sorokiniana* ที่อุณหภูมิปกติโดยใช้การกระตุ้นการปรับตัวแบบ homeoviscous โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ซึ่งมีบทบาทในการลดคุณสมบัติการไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (cellular membrane fluidity) และเพิ่มของแข็งแรง (rigidity) ของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ โดยทั่วไปการผลิตกรดไขมันชนิดโอเมก้า-3 สามารถเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดต่างๆ ความเครียดจากความเค็มเป็นกลไกที่มีซับซ้อนเกี่ยวกับความดันออสโมติก ผลกระทบต่อไอออนจำเพาะและการขาดสารอาหาร มีอิทธิพลต่อกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยเฉพาะแคลเซียมที่ 10 ไมโครโมลาร์ จนถึง 10 มิลลิโมลาร์ สามารถจับประจุลบบนคาร์บอกซิลิกของเพกทิน ซึ่งทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์ในพืชและในสาหร่ายขนาดเล็กแข็งแรงขึ้น ผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะเพิ่มแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตกรดไขมันชนิดโอเมก้า-3 ได้ดีที่สุด ผลการเลี้ยงในสภาวะเพิ่มแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์แบบขั้นตอนเดียว (1-stage strategy) แสดงค่าความไหลลื่นของเยื่อหุ้มเซลล์ค่อนข้างสูง ซึ่งมาจากการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกับการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (2-stage strategy) หลังจากนั้นได้ทำการศึกษากการเลี้ยงแบบ Repeated-batch พบว่าการผลิตกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) มีค่าเท่ากับ 4.338 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน

Hu *et al.*, (2019) ทำการศึกษาผลกระทบของความเครียดจากสารอาหาร 2 ชนิด คือ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการผลิตกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) และกรดไขมันรวมทั้งหมดในสาหร่ายทะเล *Tisochrysis lutea* และสาหร่ายน้ำจืด *Monodus subterraneus* ศึกษาสภาวะดังต่อไปนี้ (1) แหล่งไนโตรเจนเพียงพอและมีฟอสฟอรัสจำกัด (2) แหล่งไนโตรเจนเพียงพอ และขาดฟอสฟอรัส (3) ขาดแหล่งไนโตรเจน และมีฟอสฟอรัสเพียงพอ (4) ขาดแหล่งไนโตรเจน และมีฟอสฟอรัสจำกัด (5) ขาดแหล่งไนโตรเจน และขาดฟอสฟอรัส จากการทดลองพบว่าสภาวะที่มีความเครียดจากการขาดไนโตรเจน มีค่าการผลิตกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สภาวะที่มีความเครียดจากการขาดฟอสฟอรัส มีค่าการผลิตกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) เท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ และ 51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส กับ สภาวะที่มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจำกัด โดยภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุไนโตรเจนพบว่า ปริมาณกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ *T. lutea* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA)

ใน *M. subterraneus* มีการลดลงเล็กน้อย ข้อมูลชี้ให้เห็นว่าการตอบสนองต่อสภาวะการขาดธาตุอาหารแตกต่างในสาหร่ายจากแหล่งน้ำทั้งสองแหล่ง

Gorain et. al., (2013) ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างของแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลผลิตมวลชีวภาพและการสะสมน้ำมันของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus obliquus* โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบคราวเดียว (batch culture) ภายใต้สภาวะขาดแมกนีเซียมพบว่าปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ภายใต้สภาวะขาดแคลเซียมของสาหร่าย *C. vulgaris* และ *S. obliquus* มีปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้น 37 เปอร์เซ็นต์ และ 11.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะเพิ่มแมกนีเซียมพบว่าการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพและน้ำมันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์แสดงการสะสมน้ำมันประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ได้มวลชีวภาพน้อย ในสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สาหร่ายสีเขียวในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวในการทดลองมี 8 สายพันธุ์ ดังนี้

1. *Tetraspora* sp. CU2551 คัดแยกโดย เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์และคณะ (2554)
2. *Chlorella* sp. KLs59 คัดแยกโดย วัชรภรณ์ เสมาชัยและคณะ (2559)
3. *Chlorella* sp. KLsc61 คัดแยกโดย ญัฐวิภา เหล่าเกื้อและคณะ (2561)
4. สาหร่ายสีเขียวรหัส G1 คัดแยกโดย ญัฐวิภา เหล่าเกื้อและคณะ (2561)
5. A1 คัดแยกโดย ญัฐวิภา เหล่าเกื้อและคณะ (2561)
6. สาหร่ายสีเขียวรหัส BNG2 คัดแยกโดย รัชณิกร กลิ่นสาลีและคณะ (2565)
7. Shell คัดแยกโดย รัชณิกร กลิ่นสาลีและคณะ (2565)
8. LT คัดแยกโดย รัชณิกร กลิ่นสาลีและคณะ (2565)

#### 3.2 สารเคมี

##### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-acetate phosphate (TAP)

1. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีนมีเทน ( $C_4H_{11}NO_3$ ) (CARLO ERBA, India)
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $NH_4Cl$ ) (LOBALO Chemie, India)
3. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) (Ajax Finechem Pty, Australia)
5. ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) (LOBALO Chemie, India)
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) (LOBALO Chemie, India)
7. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ ( $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
9. กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) (LOBALO Chemie, India)
10. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
11. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
12. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (CARLO ERBA, India)
13. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
14. แอมโมเนียมโมลิบเดต ( $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
15. กรดอะซิติก ( $CH_3COOH$ ) (CARLO ERBA, India)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (LOBALO Chemie, India)
17. แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (LOBALO Chemie, India)
18. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (CARLO ERBA, India)
19. อะการ์ (Agar Bacto)

### 3.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์สเปกโตรฟลูออโรเมทรี

1. ไนล์เรด (Nile red) เข้มข้น เกรด Analytical reagent grade (AR)
2. DMSO (dimethyl sulfoxide) เข้มข้น 99.8% เกรด Analytical reagent grade (AR)
3. อะซิโตน (Acetone) เข้มข้น 99.8% เกรด Analytical reagent grade (AR)
4. เอทานอล (Ethanol) เข้มข้น 99.8% เกรด Analytical reagent grade (AR)

### 3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โดยน้ำหนักและแก๊สโครมาโตกราฟี

1. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เข้มข้น 99.8% เกรด Analytical reagent grade (AR)
2. เมทานอล (Methanol) เข้มข้น 99.8% เกรด Analytical reagent grade (AR)
3. เฮกเซน (Hexane) เข้มข้น 99.8% เกรด Analytical reagent grade (AR)
4. โซเดียมเมทอกไซด์ (Sodium methoxide) เข้มข้น 99.8% เกรด Analytical reagent grade (AR)

### 3.2.4 น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)

## 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)
- 3.3.2 ไมโครปิเปตต์ (Pipet-lite xls, Rainin Mettler Toledo, Switzerland)
- 3.3.3 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.3.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- 3.3.5 คิวเวตต์แบบควออร์ท (quart cuvette)
- 3.3.6 หลอดเซนติพีพิจ ขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร
- 3.3.7 หลอดไมโครเซนตริพีพิจขนาด 1.5 มิลลิลิตรและ 2 มิลลิลิตร (Eppendorf tube)
- 3.3.8 หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)
- 3.3.9 ขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร (Glass vials) และ insert glass ขนาด 150 ไมโครลิตร
- 3.3.10 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 3.3.11 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
- 3.3.12 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.3.13 หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)

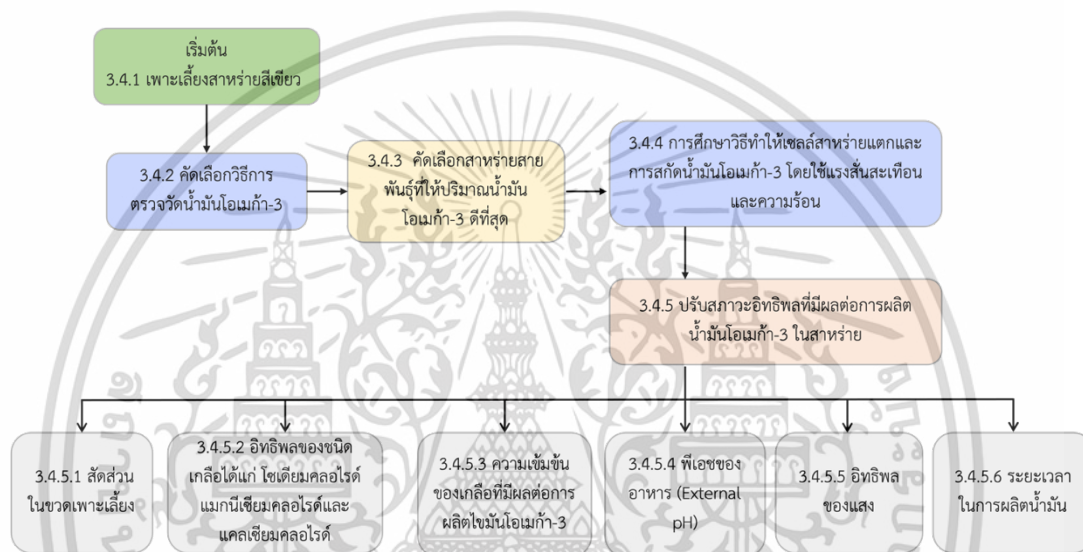
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.14 ขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร (Glass vials) และ insert glass ขนาด 150 ไมโครลิตร
- 3.3.15 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 3.3.16 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
- 3.3.17 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.3.18 ตู้ลามินาร์ (Laminar flow)
- 3.3.19 ตู้อบลมร้อน (Hot-air oven)
- 3.3.20 เครื่องเขย่าสาร (vortex-mixture Genie2, Electro Scientific industries)
- 3.3.21 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3.3.22 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter)
- 3.3.23 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-vis spectrophotometer)
- 3.3.24 เครื่องสเปกโตรฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Fluorescence-Spectrophotometer)
- 3.3.25 เครื่องอัลตราโซนิกแบบโพรบ (sonicate probe)
- 3.3.26 อ่างน้ำอัลตราโซนิก (sonicate water bath)
- 3.3.27 ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen, N<sub>2</sub>)
- 3.3.28 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟแบบแมสสเปกตีเทคเตอร์ (Gas chromatograph-mass spectrometer detector, GC-MS)
- 3.3.29 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี เฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (Gas chromatograph-flame ionization detector, GC-FID) (GC-203 Shimadzu, Japan)
- 3.3.30 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
- 3.3.31 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro-centrifuge) (Thermo Fisher, Germany)
- 3.3.32 เตาอบ (Oven)
- 3.3.33 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (MettlerToledo, Thailand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 วิธีการทดลอง

จากรูปที่ 3.1 เป็นภาพรวมของงานในการคัดแยกและการแสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียวในหน่วยวิจัยที่สามารถผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 โดยผู้วิจัยจะเริ่มจากการสืบค้นวิธีที่เหมาะสมแก่การติดตามปริมาณน้ำมันโอเมก้า-3 แล้วศึกษาวิธีการทำให้เซลล์แตกของเซลล์สาหร่ายเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสกัดน้ำมันดีซีขึ้น จากนั้นจะใช้วิธีที่ได้คัดเลือกสาหร่ายในหน่วยวิจัยว่าสายพันธุ์ใดให้โอเมก้า-3 ดีที่สุด และจะปรับสภาวะในการผลิตให้ได้โอเมก้า-3 สูงที่สุด โดยรายละเอียดแต่ละขั้นตอนมีดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.1 แสดงภาพรวมของงานในการคัดแยกและการแสดงลักษณะของสาหร่ายสีเขียวในหน่วยวิจัยที่สามารถผลิตน้ำมันโอเมก้า-3

#### 3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายด้วยอาหารเหลวสูตร TAP (Tris-Acetate-Phosphate) (Gorman *et al.*, 1965) โดยการนำโคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก มาลงอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ประมาณ 1-2 โคโลนี บ่มในสภาวะที่มีความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.4.2 วิธีการตรวจวัดน้ำมันและกรดไขมัน

หลังจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแล้ว จะนำเซลล์มาวัดค่าความขุ่น (Optical density at 750 nm) ก่อนที่นำไปตรวจวัดด้วยเทคนิคทั้ง 3 เทคนิค ได้แก่ เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนส์สเปกโตร-เอกสาร์นี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมทรี (Spectrofluorometry), เทคนิคการชั่งน้ำหนัก (Gravimetry) และเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer, MS) และแบบเปลวไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (flame ionization, FID)

### 3.4.2.1 เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

ทำการเตรียมเซลล์ *Chlorella* sp. KLsc61 ให้มีค่าความขุ่นเริ่มต้น (Optical density at 750 nm) เท่ากับ 0.2 แล้วทำการตรวจวัดการเรืองแสงของน้ำมันด้วยการย้อมสีไนล์เรด (Alemán-Nava *et al.*, 2016) เตรียมตัวอย่างในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรจำนวน 3 หลอดทดลอง ประกอบไปด้วย

- (1) DMSO เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
- (2) เซลล์สาหร่ายที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $3 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
- (3) น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

จากนั้นแบ่งเป็นสองหลอดทดลองละ 5 มิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมและตัวอย่างซึ่งในตัวอย่างจะมีการเติมสารไนล์เรดเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เตรียมอีกหนึ่งหลอดเพื่อเปรียบเทียบสัญญาณของสาร DMSO ต่อการเรืองแสงของไนล์เรด โดยมีปริมาตรเท่ากัน หลังจากนั้นนำไปเขย่าและบ่มมืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Fluorescence spectrophotometer) โดยมีสภาวะดังนี้ เริ่มต้นความยาวคลื่นสแกนตั้งแต่ 200 นาโนเมตร จนถึง 800 นาโนเมตร ช่วงข้อมูล เท่ากับ 2.0 นาโนเมตร มี excitation slit และ emission slit เท่ากับ 3.0 และ 1.0 นาโนเมตร และมี scan rate เท่ากับ 30,000 นาโนเมตรต่อนาที ตามลำดับ

### 3.4.2.2 เทคนิคการชั่งน้ำหนัก (Gravimetry)

นำหัวเชื้อสาหร่ายมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเจือจางลงในอาหารสูตร TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยคำนวณให้ความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 6 นาที แล้วนำมาเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์แตกด้วย sonicating probe เป็นเวลา 10 นาที (Pulse on 1.0 /1.0 min) แล้วนำของเหลวทั้งหมดมาเติมสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 0.5:0.5:1 แล้วเทของผสมลงกรวยแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารแยกชั้นแล้วไซ้ชั้นคลอโรฟอร์มลงในบีกเกอร์ที่ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นไว้แล้ว นำไปเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก (Lee *et al.*, 2019)

### 3.4.2.3 เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas-chromatography)

เตรียมตัวอย่างเหมือนเทคนิคการชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นตัวอย่างจะถูกนำไปทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) โดยเติมสารละลายเฮกเซน 1 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที เติมโซเดียมเมททอกไซด์ความเข้มข้น 25% v/v ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นบีบอัดส่วนใสให้หลุดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่อง spin-down เป็นเวลา 5 นาที ทำการบีบอัดส่วนใสใส่ vial ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์กรดไขมันโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer, MS) และแบบเฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (Gas-chromatography flame Ionization Detector, FID) ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS)

พารามิเตอร์	สภาวะในการตรวจวิเคราะห์
คอลัมน์ (GC column)	HP-5 50 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร i.d. x 0.25 ไมโครเมตร
โหมดการฉีดสาร (Injection mode)	Split
อัตราส่วน (Split ratio)	10:01
โปรแกรมในการตรวจวิเคราะห์ (temperature program)	อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส ค้างไว้เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนมีอุณหภูมิเท่ากับ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิในอัตราเท่าเดิมจนมีอุณหภูมิเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 นาที ตามลำดับ
ดีเทคเตอร์	MS
ช่วงการสแกน	30-500 amu.
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์	230 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิในการวิเคราะห์มวล (m/z)	150 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทดลองของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (GC-FID) (คิดค้นโดย Asst. Prof. Dr. Sukrit Sirikwanpong)

พารามิเตอร์	สภาวะในการตรวจวิเคราะห์
คอลัมน์ (GC column)	DB-23 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร. i.d. x 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิในการฉีดสาร	270 องศาเซลเซียส
โหมดการฉีดสาร (Injection mode)	Split
อัตราส่วน (Split ratio)	10:01
โปรแกรมในการตรวจวิเคราะห์ (temperature program)	เริ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.50 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิไปถึง 150 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มที่ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 2.3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิเท่ากับ 174 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิขึ้นไปถึง 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ดีเทคเตอร์	FID
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์	270 องศาเซลเซียส
แก๊ส (Make up gas)	ไนโตรเจน

### 3.4.2 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมโอเมก้า-3

การคัดเลือกใช้สาหร่ายทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ดังนี้ *Tetraspora sp. CU2551*, *Chlorella sp. KL59*, *Chlorella sp. KLsc61,G1*, Shell, BNG2, A1 และ LT โดยเตรียมสาหร่ายตามหัวข้อ 3.4.1 ทำการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์และวัดความขุ่นของเซลล์ จากนั้นนำไปสกัดน้ำมันโดยการทำให้เซลล์แตก แล้วทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) โดยทำการเติมสารละลายเฮกเซนลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้เครื่อง vortex mixture 1 นาที แล้วทำการเติมโซเดียมเมททอกไซด์ความเข้มข้น 25% v/v ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่า 2 นาที จากนั้นนำปิเปตต์ส่วนใสใส่ tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่อง spin-down เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสใส่ขวด vial ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นสำหรับการตรวจวัดกรดไขมันโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.3 การศึกษาวิธีการทำให้เซลล์แตกและการสกัดน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว

เมื่อทำการคัดเลือกสาหร่ายที่เขียวที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 แล้ว จะถูกนำมาศึกษาหาวิธีการทำให้เซลล์แตกเพื่อให้สามารถสกัดน้ำมันออกมาได้อย่างเหมาะสม ทำการศึกษาวิธีต่างๆ โดยดัดแปลงจาก Shim *et al.*, (2020) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 วิธีดังตาราง

ตารางที่ 3.3 แสดงวิธีการทำให้เซลล์แตกสำหรับการสกัดน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว โดยดัดแปลงจาก Shim *et al.*, (2020)

สถานะที่	ขั้นตอนการสกัด	เวลา (นาที)	
1	การป้อนร้อน (water bath) 50 °C	30	
2	การป้อนร้อน (water bath) 50 °C	10	} ทำ 3 cycles
	vortex	1	
	เวลาทั้งหมด	30	
3	การป้อนร้อน (water bath) 50 °C	10	} ทำ 6 cycle
	vortex	1	
	เวลาทั้งหมด	60	

### 3.4.4 การศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว

เตรียมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (ตามหัวข้อ 3.4.1) หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงตามสถานะต่างๆดังต่อไปนี้ แล้วทำการสกัดน้ำมัน (ตามผลข้อ 3.4.3) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันโอเมก้า-3 (ตามผลข้อ 3.4.2 )

#### 3.4.4.1 ศึกษาอิทธิพลของเปอร์เซ็นต์ปริมาณอาหารในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3

เตรียมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (ตามหัวข้อ 3.4.1) หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร โดยอาหารมีปริมาณแตกต่างกันดังนี้ 100, 150, 200,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

250 และ 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 เขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการวัดความขุ่นเซลล์เมื่อครบ 7 วัน โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร ก่อนทำการการสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์น้ำมันโอเมก้า-3

#### 3.4.4.2 ศึกษาอิทธิพลของชนิดเกลือคลอไรด์ต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3

เตรียมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (ตามหัวข้อ 3.4.1) หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความขุ่นเซลล์ก่อนจะเติมเกลือคลอไรด์ลงไปในการอาหารเหลว ซึ่งในการอาหารเหลวตามปริมาณจากผลการทดลองข้อ 3.4.4.1 จะทำการเติมโดยทำการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพิจารณากราฟการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะเข้าสู่ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) (Laokua *et.al.*, 2021) แล้วทำการการสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์น้ำมันโอเมก้า-3

#### 3.4.4.3 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3

เตรียมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (ตามหัวข้อ 3.4.1) หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความขุ่นเซลล์ก่อนจะเติมเกลือลงไปในการอาหารเหลว (ตามผลการทดลองข้อ 3.4.4.2) ซึ่งจะทำการเติมเกลือลงไปในการอาหารที่มีปริมาณตามผลการทดลองข้อ 3.4.4.1 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 10, 20, 30 40, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วทำการการสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์น้ำมันโอเมก้า-3

#### 3.4.4.4 ศึกษาอิทธิพลของพีเอชในการอาหารต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3

เตรียมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (ตามหัวข้อ 3.4.1) หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นเซลล์แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ก่อนถ่ายเซลล์ลงอาหารที่สูตร TAP ที่มีการปรับค่าพีเอชต่างๆดังนี้ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 จากนั้นเติมเกลือลงไปในการอาหารเหลว (ตามผลการทดลองข้อ 3.4.4.3) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วทำการการสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์น้ำมันโอเมก้า-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 3.4.4.5 ศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3

เตรียมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (ตามหัวข้อ 3.4.1) หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร วัดค่าความขุ่นเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเกลือลงไปในอาหารเหลว (ตามผลการทดลองข้อ 3.4.4.3) แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่มีแสงและสภาวะที่ไม่มีแสง (ห่อหุ้มด้วยฟอยล์อลูมิเนียม) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วทำการสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์น้ำมันโอเมก้า-3

#### 3.4.4.6 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3

เตรียมการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว (ตามหัวข้อ 3.4.1) หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการปรับค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 โดยใช้เครื่องยูวี-วิซิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ ที่ความความคลื่น 750 นาโนเมตร วัดค่าความขุ่นเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเกลือลงไปในอาหารเหลว (ตามผลการทดลองข้อ 3.4.4.3) แล้วนำไปบ่มตามผลการทดลองข้อ 3.4.4.4 โดยทำการเก็บเซลล์ตามวันเลขคี่ ได้แก่วันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 วัน หลังจากนั้นทำการสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์น้ำมันโอเมก้า-3

#### 3.4.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลความแปรปรวนวิธีทางสถิติของการผลิตกรดไขมันจากสาหร่ายสีเขียว ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Turkey โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Minitab Statistics version 16

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและการอภิปรายผล

ผลการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกและศึกษาลักษณะของสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ได้ทำการคัดเลือกเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดน้ำมันและคัดเลือกสภาวะที่ทำให้เซลล์แตกโดยใช้แรงสั่นสะเทือนและความร้อน ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3 จากสาหร่ายสีเขียว 8 สายพันธุ์ที่มีในหน่วยวิจัย และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก โดยทำการศึกษาทั้งหมด 6 สภาวะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์อาหารในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพาะเลี้ยง, อิทธิพลของเกลือคลอไรด์ 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์, อิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือคลอไรด์ที่เลือก, ศึกษาอิทธิพลของพีเอช, อิทธิพลของแสง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

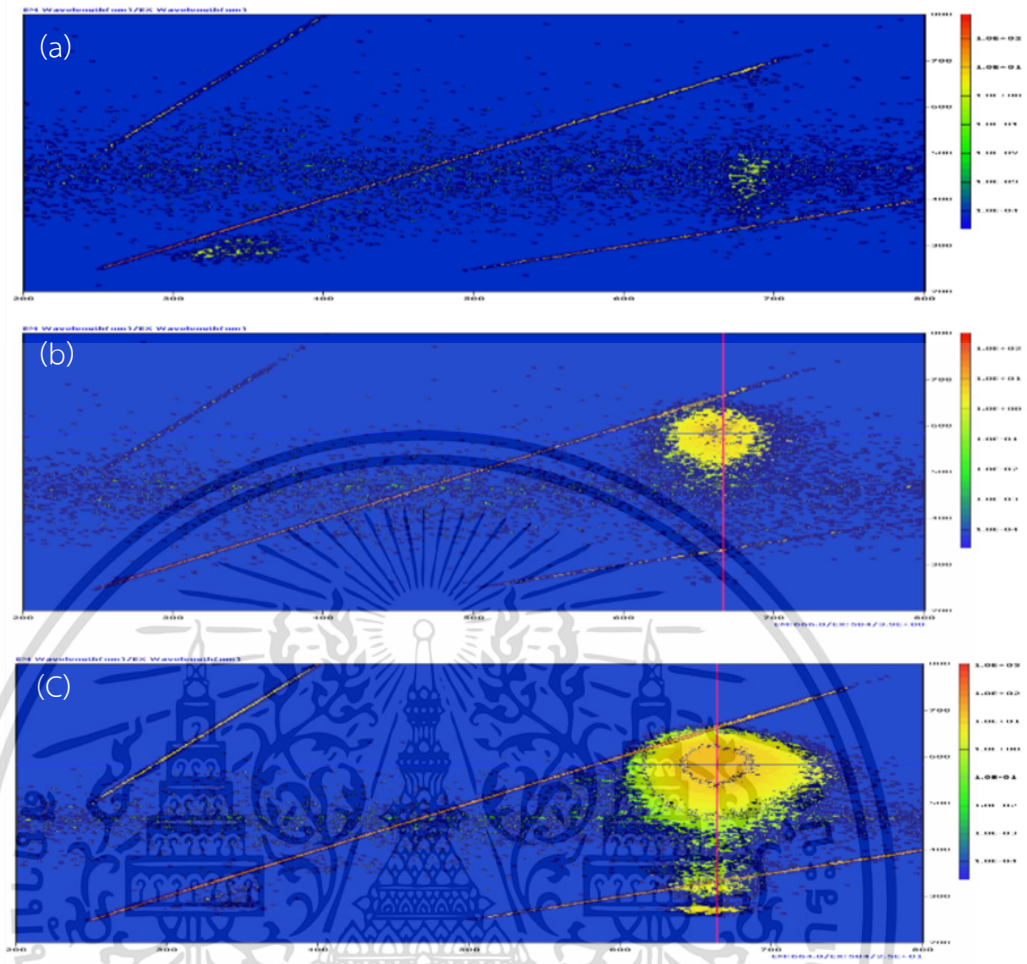
#### 4.1 ผลการศึกษาการคัดเลือกเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจวัดน้ำมันและกรดไขมันในสาหร่าย

จากการศึกษาในงานวิจัยก่อนหน้า พบว่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 สูงสุดใน 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงในสภาวะความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ stationary phase (Laokua *et. al.*, 2021) จากนั้นจะนำมาตรวจวัดน้ำมัน 3 เทคนิค ได้แก่ เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปี เทคนิคการชั่งน้ำหนัก และเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

##### 4.1.1 ผลการศึกษาเทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปีในการตรวจวัดน้ำมัน

จากการนำสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 มาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง แล้วนำมาศึกษาโดยใช้เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปีในการตรวจวัดน้ำมัน สีย้อมไนล์เรด (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) เป็นสีย้อมที่ถูกนำมาใช้บ่อยที่สุดในเซลล์สาหร่ายในตรวจวัดน้ำมัน มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำและเมตาโครเมติก โดยจะเรืองแสงออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นแสงสำหรับการกระตุ้นพลังงาน (excitation wavelength,  $\lambda_{ex}$ ) และความยาวคลื่นแสงสำหรับการคายพลังงาน (emission wavelength,  $\lambda_{em}$ ) ในช่วง 450 ถึง 500 และ มากกว่า 528 นาโนเมตร (Rumin *et. al.*, 2015) จากการทดลองพบความแตกต่างของการเรืองแสงของทั้ง 3 สภาวะ จากรูป 4.1 (a) แสดงภาพการสแกนสเปกตรัมของสารละลายเซลล์ในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถเห็นค่าสัญญาณการเรืองแสงเป็นแถบสี โดยแถบสีเขียวบ่งบอกว่ามีค่าสัญญาณการเรืองแสงอยู่ในช่วง  $10^{-2}$  ถึง 10 a.u. เนื่องจากในสาหร่ายสีเขียวมีปริมาณคลอโรฟิลล์ประมาณ 1-4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Rumin *et. al.*, 2015) เมื่อคลอโรฟิลล์ดูดกลืนพลังงานแสงจะเกิดการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นพื้นหลังของระบบที่จะศึกษา ในสภาวะที่ 2 แสดงภาพการสแกนสเปกตรัมของสารละลายไนล์เรดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์แบบไม่มีเซลล์ (รูปที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 (b)) แสดงให้เห็นว่าแถบสีมีสีเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองซึ่งหมายถึงมีค่าสัญญาณการเรืองแสงอยู่ในช่วง  $10^2 - 10^4$  a.u. เนื่องจากไนล์เรดเป็นสารที่ประกอบไปด้วยองค์ประกอบที่เป็นขี้ เช่น หมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิก (-COOH) บนวงแหวนอะโรมาติก และผลการทำปฏิกิริยาของตัวทำละลาย ทำให้เกิดค่าการเรืองแสงขึ้นถือเป็นพื้นหลังอีกแบบ โดยมีรายงานการศึกษาพบการเรืองแสงของไนล์เรดในตัวทำละลายเอทานอลและคลอโรฟอร์มที่ 632 และ 600 นาโนเมตร (Mutanda *et al.*, 2011), (Eley *et al.*, 2007) ส่วนผลจากทดลองในสถานะที่ 3 เป็นการเติมเซลล์ลงสถานะที่ 2 พบว่า มีการเรืองแสงที่มีช่วงกว้างมากขึ้นและมีการแสดงค่าสัญญาณที่มากขึ้นโดยวงในแสดงแถบสีสัมผัสมาเป็นสีเหลืองและสีเขียว ตามลำดับ ซึ่งค่าสัญญาณแถบสีสัมผัสมีค่าสัญญาณการเรืองแสงอยู่ในช่วง  $10^4$  a.u. ขึ้น (รูปที่ 4.1 (c) ) มีการศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวัดน้ำมันโดยใช้เทคนิคนี้ พบว่าผลของสารละลายแต่ละชนิดมีผลต่อค่าการเรืองแสงของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ โดยในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่าให้ค่าสัญญาณสูงสุดเมื่อใช้สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสัญญาณเท่ากับ 420 a.u. (Chen *et al.*, 2009) ในการทดลองนี้สามารถเห็นได้ว่าเมื่อทำการตรวจวัดน้ำมันในวิธีนี้สามารถตรวจวัดได้ เหมาะสำหรับการคัดกรองความสามารถในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายสีเขียวเบื้องต้นได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้ปริมาณเซลล์ไม่มาก แต่มีข้อจำกัดในส่วนของกระบวนการระบุความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด และผลของสารเคมีที่ใช้ควบคุมกับสีของไนล์เรด ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายที่นำมาตรวจวัด โดยในสาหร่ายสีเขียวมักจะใช้ความยาวคลื่นแสงสำหรับการกระตุ้นพลังงาน (excitation wavelength,  $\lambda_{ex}$ ) และความยาวคลื่นแสงสำหรับการคายพลังงาน (emission wavelength,  $\lambda_{em}$ ) ในช่วง 470 จนถึง 670 โดยในรายงานการศึกษาในสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* ใช้ความยาวคลื่นแสงสำหรับการกระตุ้นพลังงาน 480 นาโนเมตร และ ความยาวคลื่นแสงสำหรับการคายพลังงาน 570 ถึง 590 นาโนเมตร (Alemán-Nava *et al.*, 2016) เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปีเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการวัดน้ำมันโดยรวมของสาหร่ายสีเขียว แต่ไม่สามารถตรวจวัดน้ำมันโอเมก้า-3 ได้ จึงเหมาะสำหรับการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวเบื้องต้นที่สามารถผลิตน้ำมันได้ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงไม่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียวต่อไป



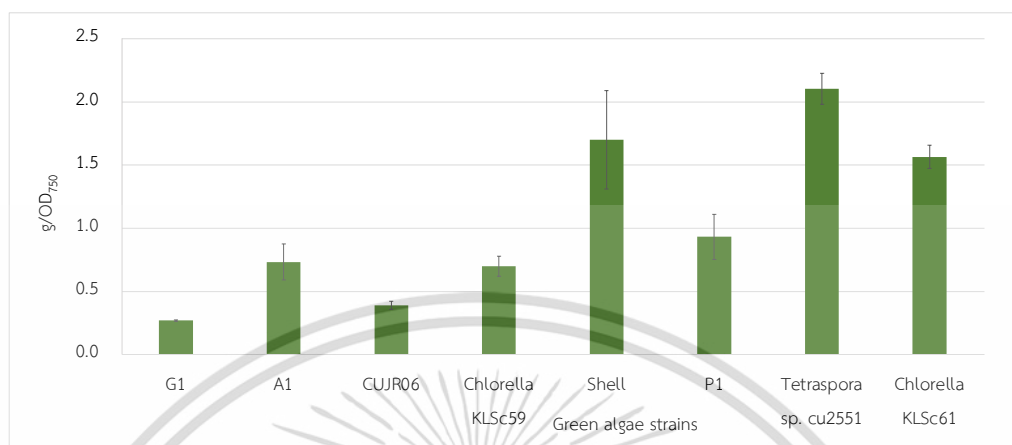
รูปที่ 4.1 แสดงภาพการสแกนสเปกตรัมการเรืองแสงใน 3 สภาวะ (a) สภาวะที่ 1 ภาพการสแกนสเปกตรัมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์, (b) สภาวะที่ 2 ภาพการสแกนสเปกตรัมของสารละลายไนล์เรดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ และ (c) สภาวะที่ 3 ภาพการสแกนสเปกตรัมของการเรืองแสงน้ำมันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 ในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์

#### 4.1.2 ผลการศึกษาเทคนิคการชั่งน้ำหนักในการตรวจวัดน้ำมัน

จากการศึกษาสาหร่ายทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะ 7 วัน มาทำการสกัดน้ำมัน (Lee *et al.*, 2019) แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน ผลการทดลองเป็นไปดังรูป 4.2 พบว่าสาหร่ายสีเขียวที่มีน้ำหนักสูงสุด 3 อันดับ ได้แก่ *Tetraspora* sp. CU2551, สาหร่ายสีเขียวรหัส shell และ *Chlorella* sp. KLSc61 มีค่าเท่ากับ  $2.10 \pm 0.12$ ,  $1.70 \pm 0.39$  และ  $1.56 \pm 0.09$  กรัมต่อความชุ่มเซลล์ ในการสกัดน้ำมันเป็นการสกัดแบบเซลล์เปียก (wet cell) และมีคลอโรฟิลล์ปนออกมาในระหว่างการสกัดน้ำมันด้วย ดังนั้นน้ำหนักที่วิเคราะห์เป็นน้ำหนักน้ำมันและคลอโรฟิลล์ โดยทั่วไปสาหร่ายสีเขียวจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์อยู่ที่ 1-4 % ขึ้นกับแต่ละสายพันธุ์ เมื่อ

ทำการคำนวณโดยคิดว่าสาหร่ายทุกชนิดมีคลอโรฟิลล์เท่ากับ 4% (Rumin *et. al*, 2015) ดังนั้น  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ของ *Tetraspora* sp. CU2551, สาหร่ายสีเขียวรหัส shell และ *Chlorella* sp. KLSc61 มีค่าเท่ากับ 2.02, 1.63 และ 1.50 กรัมต่อความขุ่นเซลล์



รูปที่ 4.2 แสดงน้ำหนักของน้ำมันและคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้ของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ในหน่วยวิจัย

#### 4.1.3 ผลการศึกษาเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีในการตรวจวัดน้ำมัน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 8 สายพันธุ์ เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำมาสกัดน้ำมันเพื่อวิเคราะห์ พบว่าเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (ดังตารางที่ 4.1) มีสาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวรหัส G4, Shell, A1 และ LT สามารถผลิตกรดแอลฟา-ลิโนเลนิก (ALA, C18:3) เท่ากับ 31.05 6.84 และ 30.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ LT สามารถผลิตกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (DHA, C22:6) เท่ากับ 1.48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจากชนิดของกรดไขมันที่ตรวจวัดได้จากเทคนิคนี้ พบว่ามีกรดไขมันบางชนิดที่ควรพบในทุกสิ่งมีชีวิตแต่กลับไม่สามารถตรวจวัดได้ในสาหร่ายบางสายพันธุ์ เช่น กรดสเตียริก (C18:0) (Remize *et. al.*, 2021) จากการศึกษาคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากชนิดของคอลัมน์ไม่มีความจำเพาะกับการตรวจวัดกรดไขมัน จากรายงานของ Niemi และคณะ (2019) พบความแตกต่างในการตรวจวัดกรดไขมันบางชนิดไม่เท่ากันโดยเฉพาะ C16:1 และ C18:0 เมื่อตรวจวัดโดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออนเซชันดีเทคเตอร์ โดยใช้คอลัมน์ FAMEWAX ซึ่งมี stationary phase คือ โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) สามารถตรวจวัดได้มากกว่า GC-MS โดยใช้ ZB-FAME เป็นคอลัมน์ในการตรวจวัดถึง 1.7 เท่า จากผลการวิเคราะห์ในการศึกษานี้พบว่าเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออนเซชันดีเทคเตอร์ (ดังตาราง 4.1) สามารถตรวจวัดกรดไขมันได้มากกว่าผลจากเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ ซึ่งสาหร่ายสีเขียวทั้ง 8 สายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 (ดังตาราง 4.2) ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวรหัส A1, *Chlorella* sp. KLSc61, *Chlorella* sp. KLSc59, สาหร่ายสีเขียวรหัส Shell, BNG2, *Tetraspora* sp. CU2551, สาหร่ายสีเขียวรหัส G1 และ LT โดยกลุ่มที่สามารถผลิตกรดไขมันชนิด

EPA และ DHA ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวรหัส Shell, *Tetraspora* sp. CU2551, สาหร่ายสีเขียวรหัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นใจเว็บไซต์นี้เป็นการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

G1, LT, สาหร่ายสีเขียวรหัส BNG2, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61 ตามลำดับ จากผลการตรวจวัดพบกรดสเตียริก (C18:0) ในสาหร่ายทุกสายพันธุ์ ซึ่งคอลัมน์ที่ใช้ในการตรวจวัดคือ DB-23 เป็นคอลัมน์ที่คาดว่าจะมีความจำเพาะต่อการตรวจวัดกรดไขมันมากกว่าคอลัมน์ HP-5 ในเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปคโตรมิเตอร์ นอกจากนี้การตรวจวัดโดยใช้แมสสเปคโตรมิเตอร์ทำวิเคราะห์สารจากการไอออนในเซชันไอออนออกมาในรูป  $m/z$  แล้วทำการเทียบกับฐานข้อมูลในเครื่องว่าโมเลกุลที่ถูกแตกออกมาคือสารอะไร ดังนั้นค่าพลังงานที่ใช้ในการตรวจวัดจะต้องมีความเหมาะสมด้วย เมื่อเทียบกับแบบเฟลมไอออนในเซชันดีเทคเตอร์ที่ระบุสารจากการเทียบเวลา (retention time, RT) ของสารมาตรฐานในการระบุ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการศึกษาวិธีการตรวจวัดน้ำมันในสาหร่ายสีเขียวพบว่า เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปีและเทคนิคการชั่งน้ำหนักเป็นวิธีที่สามารถระบุปริมาณน้ำมันได้เหมาะสำหรับการคัดเลือกสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันเบื้องต้นได้ แต่ไม่สามารถที่จะระบุชนิดของกรดไขมันได้ โดยที่ข้อจำกัดของเทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปีจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด เช่น ตัวทำละลาย เนื่องจากความเป็นขี้ของตัวทำละลายมีผลต่อการเรืองแสงของไนล์เรดและมีผลต่อการซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว ในการศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่าย จำเป็นต้องระบุชนิดกรดไขมันเพื่อนำมาคัดเลือกสาหร่ายต่อไป ดังนั้นควรใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์ โดยจากการการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวัดกรดไขมันโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีทั้งสองแบบ พบว่าแบบเฟลมไอออนในเซชันดีเทคเตอร์มีความเหมาะสมในการตรวจวัดมากกว่าเนื่องจากความจำเพาะของชนิดคอลัมน์ที่ใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์กรดไขมันที่ตรวจวัดได้ในสาหร่ายสีเขียว 8 สายพันธุ์ โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปคโตรมิเตอร์

No.	Fatty acid	Percent of peak area								
		G4	Shell	BNG 2	CUJR0 6	<i>Chlorella</i> sp. KLSc59	A1	<i>Chlorella</i> sp. KLSc61	Tetrasp ora sp. CU2551	LT
1	C14:0	-	-	-	-	-	-	-	-	1.40
2	C16:0	32.76	54.10	60.11	76.29	56.95	22.13	55.38	61.13	51.56
3	C16:1	-	-	-	-	11.20				1.63
4	C16:1	-	-	-	-	-		7.59	4.34	1.63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

No.	Fatty acid	Percent of peak area								
		G4	Shell	BNG 2	CUJR0 -6	<i>Chlorella</i> sp. KLSc59	A1	<i>Chlorella</i> sp. KLSc61	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	LT
5	C16:2	12.43	-	-	-	-	-	-	-	1.40
6	C16:3	-	-	-	-	-	5.41	-	-	-
7	C18:0	7.70	-	9.91	-	-	-	-	11.60	14.76
8	C18:1	-	-	-	-	-	-	-	15.08	-
9	C18:1	-	-	-	13.85	-	-	-	-	-
10	C18:1	-	22.91	18.55	12.92	-	0.77	20.90	-	17.08
11	C18:1	-	-	-	-	-	30.22	-	-	-
12	C18:2 cis,n-6	22.99	16.15	11.44	9.41	31.85	11.25	16.13	7.84	9.05
13	C18:3, n-3	31.05	6.84	-	-	-	30.22	-	-	-
14	C22:6, n-3 (DHA)	-	-	-	-	-	-	-	-	1.48

(ND = Not detected)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์กรดไขมันที่ตรวจวัดได้ในสาหร่ายสีเขียว 8 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแบบเฟลมไอออนเซชันดีเทคเตอร์

No.	Fatty acid	Percent of peak area							
		G1	Shell	BNG2	<i>Chlorella</i> sp. KLSc59	A1	<i>Chlorella</i> sp. KLSc61	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	LT
1	C10:0	0.99	0.32	1.81	2.72	0.95	1.45	1.33	1.83
2	C11:0	2.69	4.49	ND	4.21	ND	1.62	2.38	1.71
3	C12:0	1.23	0.54	0.99	1.50	0.47	0.91	0.64	ND
4	C13:0	ND	0.42	ND	5.14	ND	2.56	0.73	ND
5	C14:0	ND	ND	2.07	ND	0.32	0.50	0.27	ND
6	C14:1	ND	6.76	ND	ND	ND	ND	4.66	1.19
7	C15:0	ND	ND	ND	3.75	ND	2.38	1.45	ND
8	C15:1	11.76	10.09	ND	ND	ND	ND	13.04	18.3 7
9	C16:0	13.10	1.72	17.36	13.78	12.11	15.00	3.11	3.07
10	C16:1	ND	7.44	2.60	0.99	2.44	1.57	5.09	ND
11	C17:0	6.73	1.22	1.56	4.16	1.81	5.31	2.01	1.83
12	C17:1	2.04	3.56	3.73	1.25	4.23	2.07	5.37	3.72
13	C18:0	0.91	0.24	2.16	2.45	0.69	1.77	0.36	0.31
15	C18:1 -cis	5.43	9.74	8.89	1.07	11.03	1.98	6.82	8.52
16	C18:2 -cis	41.37	18.72	41.32	13.59	17.28	11.53	32.43	58.0 6
18	C18:3 , n-6	ND	ND	ND	0.44	1.07	ND	ND	ND
19	C18:3 , n-3	0.93	ND	ND	20.32	46.07	38.58	0.41	ND
20	C20:0	4.08	10.69	ND	ND	0.45	ND	6.71	ND

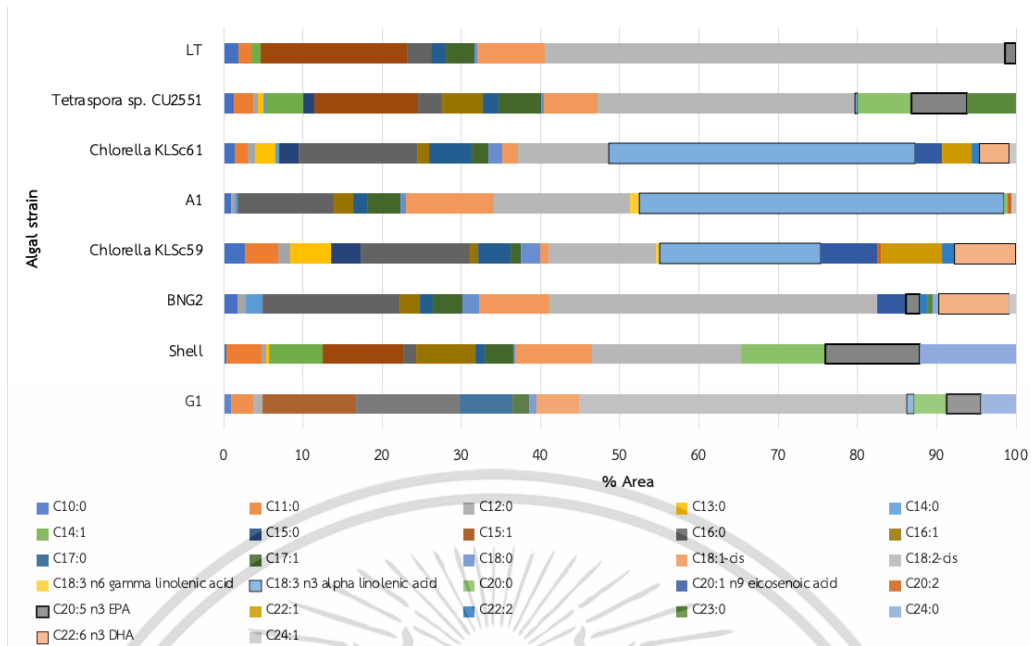
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

No.	Fatty acid	Percent of peak area							
		G1	Shell	BNG2	<i>Chlorella</i> sp. KLS59	A1	<i>Chlorella</i> sp. KLS61	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	LT
21	C20:1, n-9	ND	ND	3.63	7.10	ND	3.43	ND	ND
22	C20:2	ND	ND	ND	0.49	0.45	ND	ND	ND
26	C20:5, n-3 (EPA)	4.30	11.88	1.76	ND	ND	ND	7.00	1.4
28	C22:1	ND	ND	ND	7.66	ND	3.72	ND	ND
29	C22:2	ND	ND	0.92	1.63	ND	1.02	ND	ND
30	C23:0	ND	ND	0.66	ND	ND	ND	6.20	ND
31	C24:0	4.45	12.18	0.77	ND	ND	ND	ND	ND
32	C22:6, n-3 (DHA)	ND	ND	8.91	7.76	ND	3.75	ND	ND
33	C24:1	ND	ND	0.88	ND	0.62	0.86	ND	ND

(ND = Not detected)

#### 4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3

จากผลจากวิเคราะห์กรดไขมันของสาหร่ายทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโต-กราฟฟีแบบเฟลมไอออนเซชันดีเทคเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ได้ดังนี้ สาหร่ายสีเขียวรหัส A1, *Chlorella* sp. KLS61, *Chlorella* sp. KLS59, สาหร่ายสีเขียวรหัส Shell, BNG2, *Tetraspora* sp. CU2551, สาหร่ายสีเขียวรหัส G1 และ LT มีค่าเท่ากับ 46.07, 42.33, 28.08, 11.88, 10.67, 7.41, 5.23 และ 1.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยกลุ่มที่สามารถผลิตอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวรหัส Shell, *Tetraspora* sp. CU2551, สาหร่ายสีเขียวรหัส G1 และ LT สามารถผลิตได้ 11.88, 7.00, 4.30 และ 1.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกลุ่มที่สามารถผลิตกรดไขมันชนิด DHA มี 3 สายพันธุ์ด้วยกัน ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวรหัส BNG2, *Chlorella* sp. KLS59 และ *Chlorella* sp. KLS61 สามารถผลิตได้ 8.91, 7.76 และ 3.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (DHA, C22:6) เป็นกรดไขมันที่มีมูลค่าสูงในตลาด ดังนั้นจึงเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (DHA, C22:6) มาศึกษาต่อในการทดลองถัดไป



รูปที่ 4.3 แสดงผลการคัดเลือกสายสำหรับสีเขียวที่มีความสามารถในการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3 โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออนเซชันดีเทคเตอร์

#### 4.3 ผลการศึกษาการคัดเลือกวิธีที่ทำให้เซลล์แตกโดยใช้แรงสั่นสะเทือนและความร้อน

สำหรับสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำมันโอเมก้า-3 ได้แก่ สายสีเขียวชเวียรท์ส BNG2, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61 ถูกนำมาศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมัน โดยได้ทำการดัดแปลงวิธีการสกัดจาก Shim และคณะ (2020) ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 4.3 จากวิธีการสังเคราะห์น้ำมันเซลล์เริ่มสังเคราะห์กรดไขมันจาก C16:0 มาเรื่อยๆ จนถึง C18:2 ก่อนจะเปลี่ยนเป็นกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 ซึ่งมีพันธะคู่ในโครงสร้าง 2 พันธะ เพื่อศึกษาผลของการสกัดน้ำมันเมื่อใช้ความร้อนร่วมกับแรงสั่นสะเทือน ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์กรดไขมัน C18:2-cis ในวิธีที่ 1 เป็นวิธีที่ให้ความร้อนอย่างเดียวในการสกัดให้ผลการสกัดดีที่สุด ในสายสีเขียวชเวียรท์ส BNG2 และ *Chlorella* sp. KLSc59 สามารถสกัดได้  $46.25 \pm 0.63$  และ  $33.55 \pm 0.64$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในสายสีเขียวชเวียรท์ส *Chlorella* sp. KLSc61 วิธีที่ 3 เป็นวิธีที่สามารถสกัดได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถสกัด C18:2-cis ได้เท่ากับ  $28.92 \pm 1.11$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโครงสร้างของผนังเซลล์ของสายในแต่ละสายพันธุ์อาจมีความต่างกัน ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาผลของแรงสั่นสะเทือนต่อการสกัดน้ำมันในสาย *Chlorella vulgaris* โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาสถานะแรงสั่นสะเทือนตั้งแต่ 20-80 กิโลเฮิรท์ซ เป็นเวลา 5 นาที และทำการตรวจสอบโครงสร้างน้ำมันด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform Infrared (FTIR) Spectroscopy) พบว่าแรงสั่นสะเทือนไม่มีผลต่อโครงสร้างของน้ำมัน (Olubunmi F. A. ,2017) อย่างไรก็ตามในการศึกษาใช้วิธีการสกัดที่ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส

ในทำให้อาจจะมีผลต่อการสกัดน้ำมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนได้ ในการศึกษาผลของแรงสั่นสะเทือนต่อการสกัดน้ำมันเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันทานตะวันและน้ำมันปาล์มของ Halim และคณะ (2018) ซึ่งทำการศึกษาเวลาในการสั่นสะเทือนตั้งแต่ 2 ถึง 120 นาที (sonication) เมื่อตรวจสอบค่าเปอร์ออกไซด์ภายในระยะเวลา 6 วัน พบว่า ค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันทานตะวันและน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการสั่นสะเทือน ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 10.25 และ 5.67 เมกะเปอร์ออกไซด์ต่อกิโลกรัม (Halim and Thoo, 2018) ซึ่งในงานศึกษานี้เห็นได้ว่าการใช้สภาวะที่มีแรงสั่นสะเทือนทำให้น้ำมันที่สกัดได้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดไขมันสำหรับสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 11 ครั้ง เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีการแสดงลักษณะการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 โดยเฉพาะการผลิตน้ำมันในกลุ่ม EPA และ DHA ซึ่งเป็นสารเมทาบอลไลต์ที่มีมูลค่าสูงและเป็นที่ต้องการในตลาด พบว่ากรดไขมันของสายพันธุ์ *Chlorella sp.* KLSc59 มีความแปรปรวนน้อยที่สุด จึงเลือกสายพันธุ์ *Chlorella sp.* KLSc59 มาทำการทดลองต่อไป (ดังตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 ผลเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนจากการสกัดน้ำมันโดยดัดแปลงจาก Shim และคณะ (2020) ของสายพันธุ์สีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์

Fatty acid	BNG2			<i>Chlorella sp.</i> KLSc59			<i>Chlorella sp.</i> KLSc61		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C18:2-cis	46.25 ± 0.63	41.97 ± 5.98	45.63 ± 1.91	33.55 ± 0.64	20.35 ± 3.01	29.06 ± 3.69	20.75 ± 2.36	17.50 ± 6.59	28.92 ± 1.11
C18:3 n3 alpha linolenic acid	22.58 ± 0.82	13.89 ± 3.52	22.41 ± 1.87	17.10 ± 1.28	0.40 ± 0.42	17.20 ± 2.66	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.05	0.18 ± 0.07
C20:5 n3 EPA	ND	0.04 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.34 ± 0.45	0.31 ± 0.14	0.02 ± 0.01	0.08 ± 0.06	0.22 ± 0.20
C22:6 n3 DHA	ND	0.04 ± 0.04	ND	0.06 ± 0.06	ND	2.65 ± 2.51	0.05 ± 0.01	0.03	ND

(ND = Not detected)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการผลการตรวจวัดสัดส่วนกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (DHA) จากการเพาะเลี้ยง 11 ครั้งของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3

Fatty acid	Percent area of BNG2											Avg $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
C20:5 EPA	0.04	0.01	ND	3.04	ND	ND	0.05	0.06	ND	ND	ND	0.29 $\pm$ 0.91
C22:6 DHA	0.08	0.01	ND	15.40	ND	0.03	ND	0.08	ND	ND	ND	1.42 $\pm$ 4.63

Name	Percent area of <i>Chlorella</i> sp. KLSc59											Avg $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
C20:5 EPA	0.02	0.08	ND	24.14	0.09	0.06	0.03	0.06	0.40	0.30	0.16	2.30 $\pm$ 7.24
C22:6 DHA	0.15	0.02	11.13	11.71	0.05	0.03	0.01	0.13	0.12	4.84	2.53	2.79 $\pm$ 4.52

Name	Percent area of <i>Chlorella</i> sp. KLSc61											Avg $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
C20:5 EPA	ND	ND	ND	0.10	0.21	0.02	0.04	0.01	0.03	0.18	0.04	0.06 $\pm$ 0.07
C22:6 DHA	ND	6.02	2.73	0.05	0.04	0.04	0.04	0.08	0.06	ND	ND	0.82 $\pm$ 1.90

(ND = Not detected)

#### 4.4 ผลการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

จากผลจากทดลองก่อนหน้าได้ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ของสาหร่าย 8 สายพันธุ์ พบว่ามี สาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิต ได้แก่ BNG2, *Chlorella* sp. KLSc59 และ *Chlorella* sp. KLSc61 เมื่อทำการเทียบโปรไฟล์กรด-เอกลสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

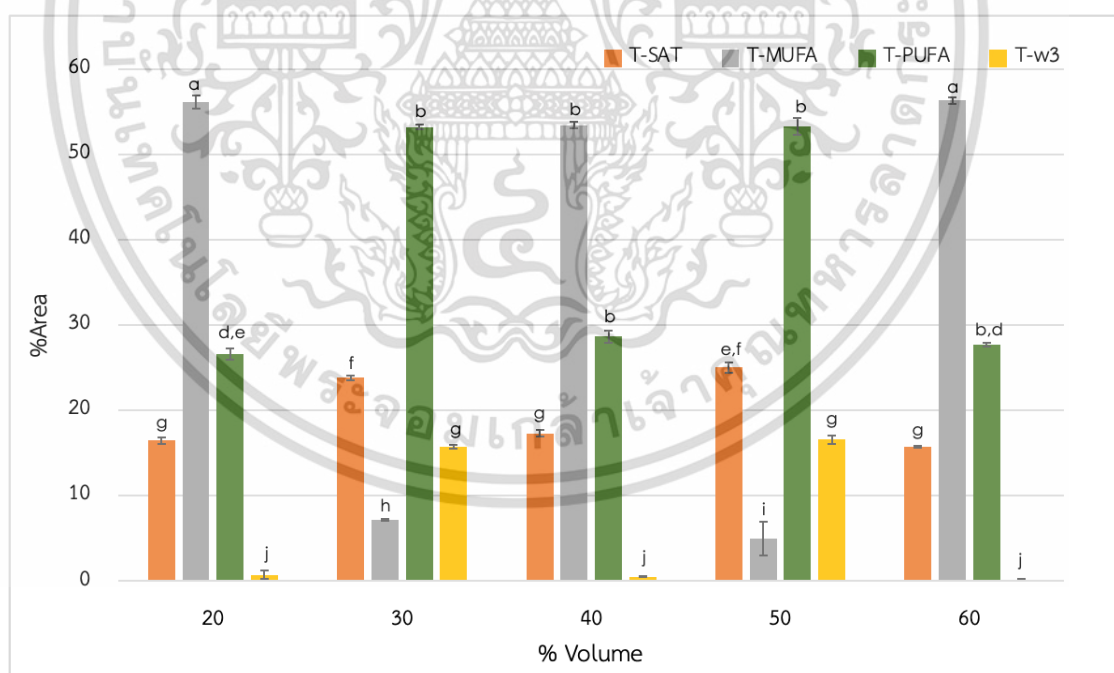
ไขมันของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า *Chlorella* sp. KLSc59 มีโปรไฟล์การแสดงออกของน้ำมันโอเมก้า-3 ในกลุ่มของ DHA มากที่สุด จึงนำมาศึกษาวิธีที่เหมาะสมของการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sirawattananmongkol และคณะ (2020) พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 มีความใกล้เคียงกับ *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella sonokiniana* และจากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวของ Laokua และคณะ (2021) พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 ในสภาวะเข้มแสง 3,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถเจริญเติบโตได้ภายใน 24 ชั่วโมงแรกแล้วจะเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันมีด้วยกันหลายปัจจัย โดยจะเริ่มศึกษาจากเปอร์เซ็นต์อาหารในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพาะเลี้ยง อิทธิพลของชนิดเกลือและความเข้มข้นของเกลือ อิทธิพลของพีเอช อิทธิพลของแสง และระยะเวลา โดยแสดงผลวิเคราะห์เป็นสัดส่วน (Relative percent of peak area) และปริมาณน้ำมัน (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) ดังแสดงการคำนวณในภาคผนวก ค

#### 4.4.1 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์อาหารในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพาะเลี้ยง

หลังจากการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. KLSc59 เป็นระยะเวลา 7 วัน ในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำวิเคราะห์สัดส่วนและปริมาณกรดไขมันประเภทต่างๆ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ ได้แก่ C18:2 cis และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ มีสัดส่วนกลุ่มกรดไขมันอิ่มตัวสูงที่สุด เท่ากับ  $23.83 \pm 0.32$  และ  $25.06 \pm 0.59$  และ ขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สัดส่วนกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะจะเห็นว่าในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารอื่นๆ โดยในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 20 และ 60 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด รองลงมาคือที่ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีสัดส่วนเท่ากับ  $56.14 \pm 0.79$ ,  $56.33 \pm 0.34$  และ  $53.45 \pm 0.39$  เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สัดส่วนกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 ผลการทดลองสอดคล้องกัน ซึ่งกลุ่มที่มีค่ามากที่สุดคือขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นสัดส่วน  $53.25 \pm 0.25$  และ  $53.31 \pm 0.96$  เปอร์เซ็นต์ และ  $15.75 \pm 0.20$  และ  $16.71 \pm 0.48$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สัดส่วนในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาปริมาณกลุ่มกรดไขมันทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าผลมีความสอดคล้องกับสัดส่วนน้ำมันดังที่กล่าวไปก่อนหน้านี้ (ดังรูป 4.5) จากการตรวจสอบโปรไฟล์กรดไขมันของทุกขวดเพาะเลี้ยง จะสังเกตเห็นได้ว่าการผลิตกรดไขมันแต่ละชนิดมีความเป็นสัดส่วนกันตามวิธีการสังเคราะห์ ซึ่งในการทดลองนี้จะแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

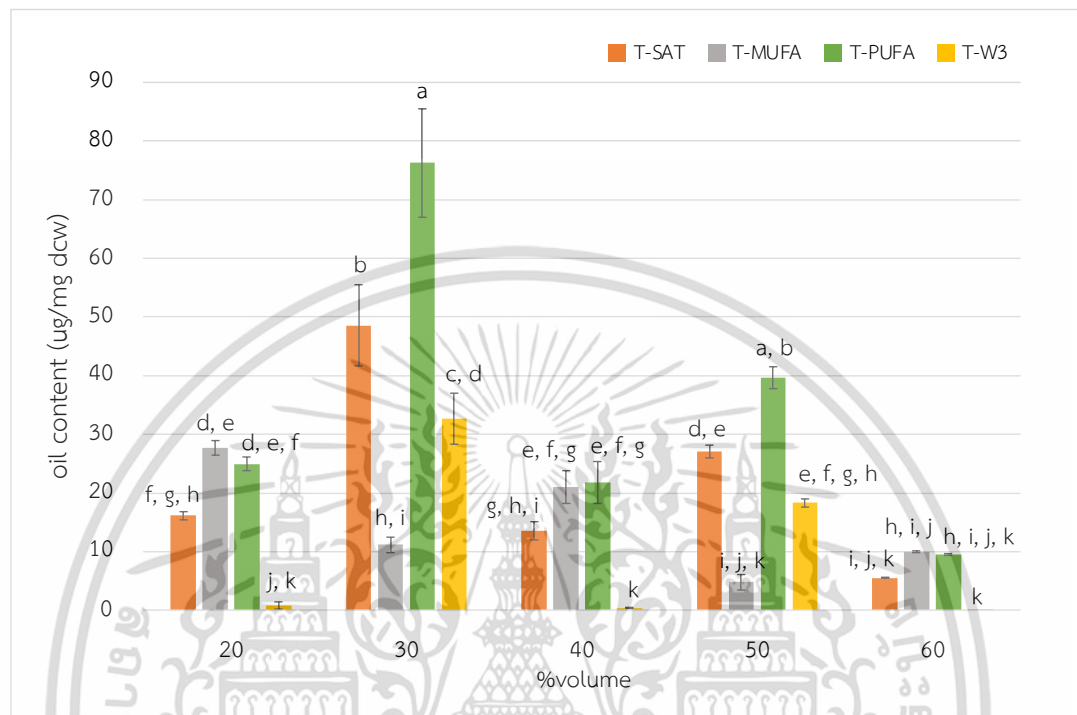
1 กลุ่มที่มีการผลิตกรดไขมันเกือบทุกประเภทสูงยกเว้นการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะซึ่งกรดไขมันหลักคือ C18:2 cis (โอเมก้า-6) ซึ่งตามวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันจะสามารถสังเคราะห์ต่อไปเป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-6 ถ้ามีเอนไซม์  $\Delta 6$  desaturase และ ถ้ามีเอนไซม์  $\Delta 15$  desaturase จะสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ตัวแรกคือ ALA ถือเป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญในวิธีการสังเคราะห์หากอยากให้การสังเคราะห์มาทางกลุ่มโอเมก้า-3 จำเป็นจะต้องมีการผลิตกรดไขมัน C18:2 cis (โอเมก้า-6) เยอะและเซลล์ต้องมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์  $\Delta 15$  desaturase หรือ  $\omega$ - desaturase เพื่อให้ทันการเปลี่ยน C18:2 cis เป็นกรดไขมันโอเมก้า-3 และกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่มีการผลิตกรดไขมัน C18:2 cis (โอเมก้า-6) สูง แต่มีกลุ่มกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 น้อย ซึ่งหมายความว่าในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันทำให้การสังเคราะห์กรดไขมันของ *Chlorella* sp. KLS59 มีความแตกต่างในแง่ของชนิดกรดไขมันและปริมาณโอเมก้า-3 จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณกรดไขมันของขวดเพาะเลี้ยงที่มีปริมาตรอาหาร 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่เมื่อทำการตรวจสอบค่าความขุ่นของเซลล์ก่อนทำการสกัดพบว่าค่าความขุ่นของเซลล์ ( $OD_{750}$ ) มีค่าเท่ากับ 0.79 และ 0.69 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากสัดส่วนอาหารขวดเพาะเลี้ยงที่มีปริมาตรอาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ มีความคุ้มค่ามากกว่าจึงเลือกใช้สัดส่วนอาหารขวดเพาะเลี้ยงที่มีปริมาตรอาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ในการทดลองถัดไป



**รูปที่ 4.4** สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-Ω3) ของ *Chlorella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 เปอร์เซ็นต์ (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

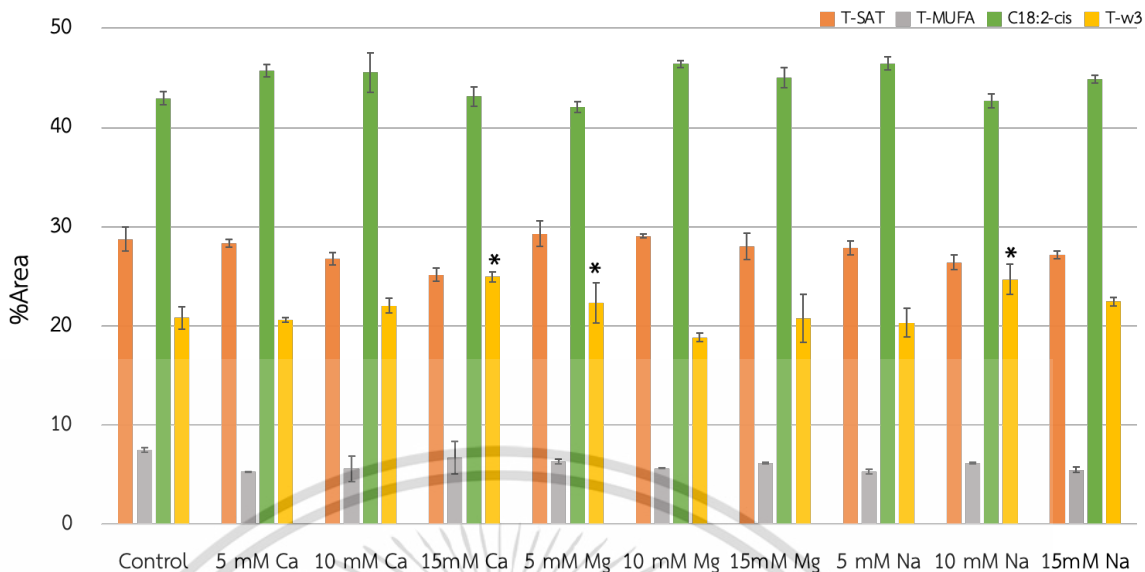


รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella sp.* KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 เปอร์เซ็นต์ (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) รายละเอียดดังภาคผนวก ค )

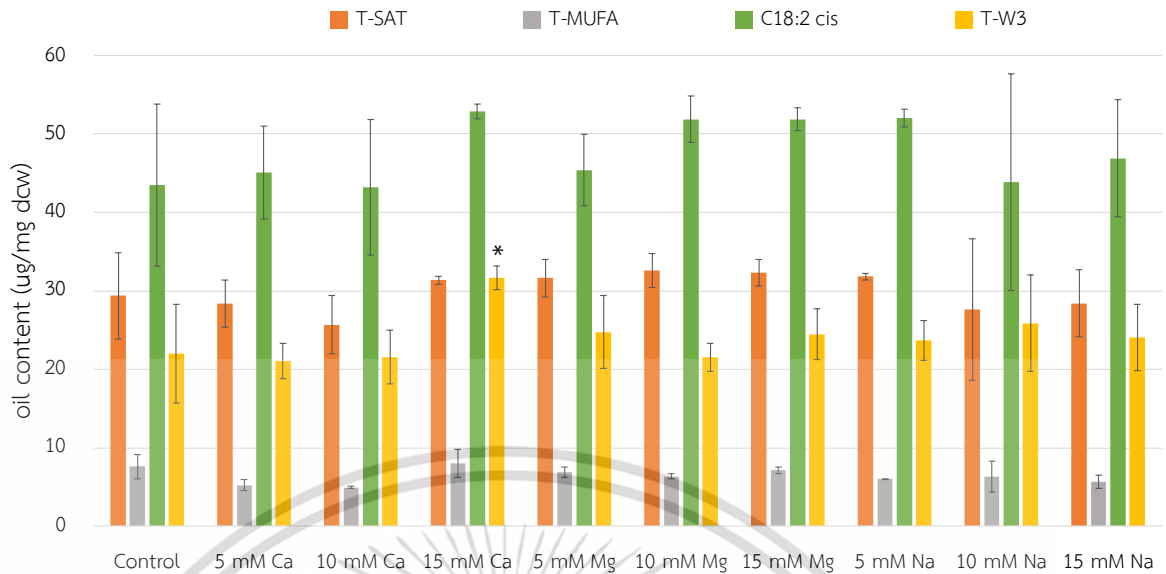
#### 4.4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของเกลือ

จากการทดลองก่อนหน้าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella sp.* KLSc59 ในขวดการเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเลี้ยงในขวดการเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 7 วัน เหมาะสมที่จะนำมาทดลองต่อทำการศึกษาอิทธิพลของเกลือชนิดต่างๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงในปริมาณอาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ได้เพิ่มปริมาณ หลังจากนั้นเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ จากในอาหารเดิมมีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมเท่ากับ 0.45 มิลลิโมลาร์ และ 0.83 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไรต์ มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5.45, 10.45 และ 15.45 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แมกนีเซียมคลอไรด์ มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5.45, 10.45 และ 15.45 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และโซเดียมคลอไรด์ มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ผลการทดลองวิเคราะห์สัดส่วนปริมาณน้ำมันออกเป็น 4 กลุ่ม เช่นเดียวกับผลการทดลอง 4.4.1 ดังรูป 4.6 และ 4.7 ผลการทดลองพบว่าในสถานะที่มีการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ มีสัดส่วนกลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว และกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นในการทดลองนี้จะพิจารณาจากสัดส่วนกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 เป็นหลัก (ดังรูปที่ 4.6) ในกลุ่มควบคุมพบว่ามีสัดส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะและกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 เท่ากับ  $42.96 \pm 0.66$  และ  $20.82 \pm 1.13$  เปอร์เซ็นต์ จากรูป 4.5 จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่มีการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ มีสัดส่วนเท่ากับ  $45.54 \pm 2.00$   $46.41 \pm 0.33$  และ  $46.47 \pm 0.64$  เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สัดส่วนกรดไขมันโอเมก้า-3 มีค่าเท่ากับ  $22.05 \pm 0.77$   $18.85 \pm 0.41$  และ  $20.33 \pm 1.45$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งถือได้ว่ากลุ่มที่มีการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้ปริมาณน้ำมันทั้งสองชนิดสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* ที่ความเข้มข้น 10 mM เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้ค่าปริมาณกรดไลโนเลอิก (C18:2 cis) สูงสุด และ กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 สูงสุด (Shim et al., 2020) ในกลุ่มของการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ เห็นได้ว่าการผลิตกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้น และ ปริมาณกรดไขมัน C18:2 cis (โอเมก้า-6) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติมแมกนีเซียม-คลอไรด์ไรต์ พบว่ามีสัดส่วนกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 สูงสุด ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ตามด้วยความเข้มข้น 15 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้สัดส่วนกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 สูงสุด รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น 15 และ 5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณกลุ่มกรดไขมันทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าผลการวิเคราะห์มีแนวโน้มเหมือนกับสัดส่วนน้ำมันดังที่กล่าวไปก่อนหน้านี้ โดยมีปริมาณน้ำมันโอเมก้า-3 สูงสุดเมื่อเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ที่ 15 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้เมื่อคำนวณสัดส่วนของปริมาณกรดไขมัน C18:2 cis (โอเมก้า-6) รวมกับสัดส่วนกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 ทุกตัวอย่างจะมีค่าสัดส่วนอยู่ที่ 63 ถึง 68 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นหลักฐานที่บ่งชี้ได้ว่าการผลิตกรดไขมัน C18:2 cis (โอเมก้า-6) เมื่อเซลล์สังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3 มาก ปริมาณกรดไขมัน C18:2 cis จะลดลง (ดังรูปที่ 4.6)



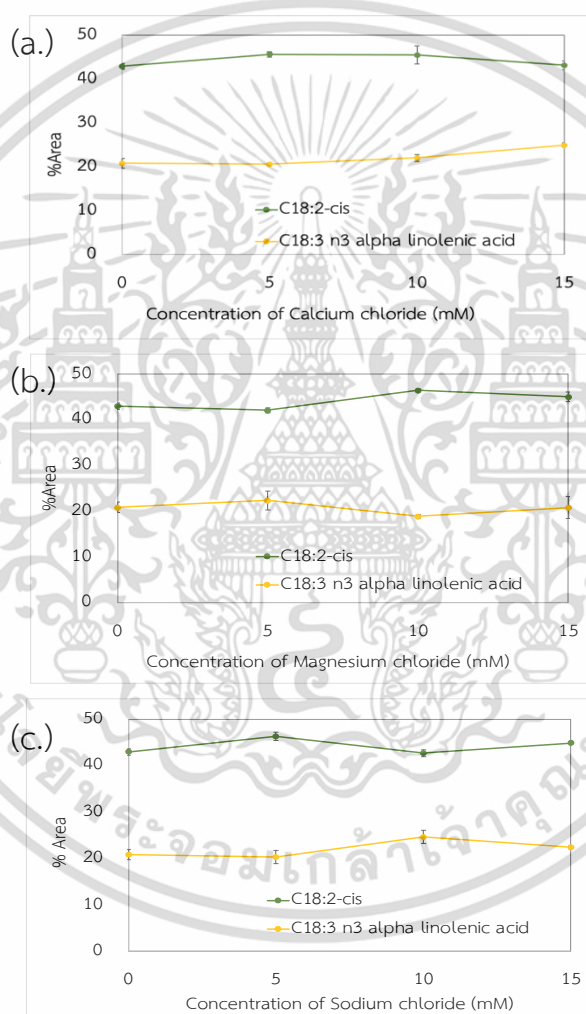
รูปที่ 4.6 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือแต่ละชนิด รายละเอียดดังภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.7 ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella sp.* KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือแต่ละชนิด รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

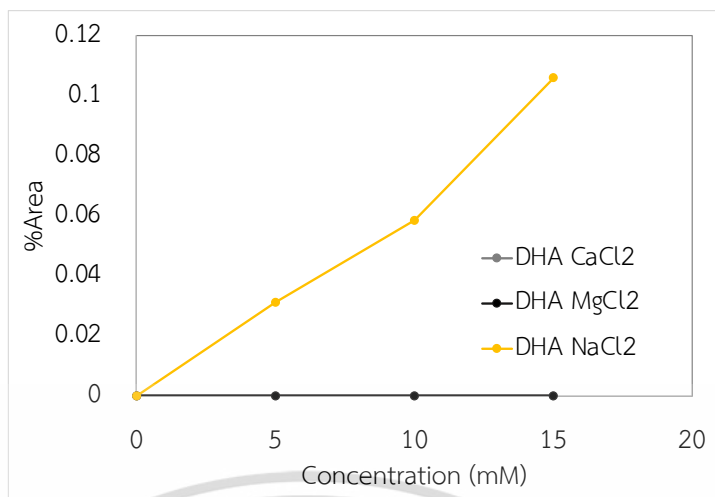
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเกลือแต่ละชนิดมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* KLSc59 เนื่องจากเกลือจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในส่งเสริมการเจริญและการดูดซึมอาหาร ความเครียดจากเกลือที่ส่งผลต่อแรงดันออสโมติกในเซลล์และมีอิทธิพลต่อการสะสมมวลชีวภาพ มีหลายรายงานที่ระบุความเครียดจากเกลือที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำมันโดยรวมของสาหร่าย อย่างไรก็ตามพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันที่แตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ (Lu *et al.*, 2021) ในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 100 มิลลิโมลาร์ เซลล์ไม่สามารถทนได้ แต่ปริมาณกรดปาล์มิติก (C16:0) และกรดไลโนเลนิก (C18:3, n3) สูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเกลือ (Hounslow *et al.*, 2016) เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือสูงๆจะกระตุ้นให้เซลล์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เซลล์เพิ่มการผลิตไขมันขึ้นมากขึ้นโดยพบว่ามักจะผลิตกรดไขมันที่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวเนื่องจากต้องการให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งแรงเพื่อรักษาสมดุลไอออนภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก (Lu *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ค่ากรดกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (DHA, C22:6) พบว่าโซเดียมคลอไรด์เป็นเกลือชนิดเดียวที่ทำให้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 สร้างกรดโคโคซะเฮกซะอีโนอิก ในขณะที่เกลือชนิดอื่นไม่พบการผลิตเลย จากรูป 4.9 และ 4.10 พบว่าในเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบปริมาณกรดโคโคซะเฮกซะอีโนอิก  $18.75 \pm 32.48$  นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อวิเคราะห์ผลเป็นสัดส่วนกรดไขมันไม่พบการผลิตกรดโคโคซะเฮกซะอีโนอิก ในเกลือโซเดียมคลอไรด์จะเห็นได้ว่าทั้งสัดส่วนและปริมาณการผลิตกรดโคโคซะเฮกซะอีโนอิกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ในเกลือโซเดียมคลอไรด์สอดคล้องกับสัดส่วนที่เกิดขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกเกลือแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์มาทำการทดลองต่อไป

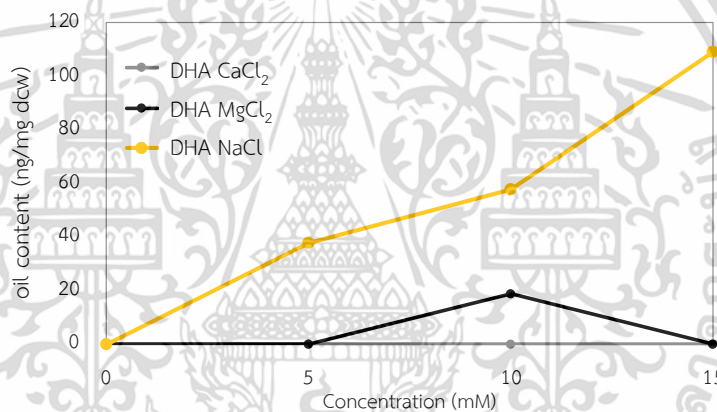


**รูปที่ 4.8** แสดงสัดส่วนปริมาณน้ำมันกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (C18:2 cis,n-6) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือ (a) แคลเซียมคลอไรด์ (b) แมกนีเซียมคลอไรด์ และ (c) โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 สัดส่วนน้ำมัน DHA ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียม และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.10 ปริมาณน้ำมัน DHA ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียม และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์

#### 4.4.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือที่เลือก

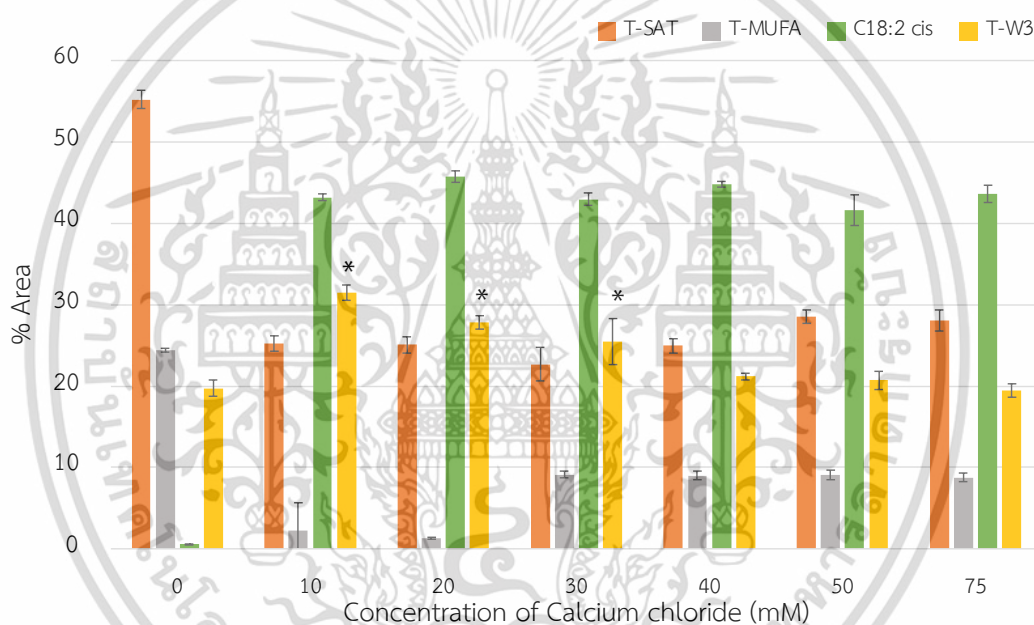
จากผลการทดลองข้อ 4.4.2 จึงเลือกเกลือแคลเซียม และโซเดียมคลอไรด์ มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป ทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. KLSc59 เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่ความเข้มข้นเกลือแคลเซียม และโซเดียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองได้ดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 พบว่าเมื่อเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 มีการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะลดลง แต่มีการผลิตกรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2 cis) และ ผลิตภัณฑ์ไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากรูปจะเห็นว่าแนวโน้มการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ลดลงเมื่อเพิ่มเกลือแคลเซียมคลอไรด์ โดยสถานะที่เติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นสถานะที่ให้สัดส่วนน้ำมันโอเมก้า-3 สูงสุด แบ่งเป็นการผลิตกรดแอลฟา-ไลโนเลอิก (ALA), กรดอีโคซะเพนตะ-อีโนอิก (EPA) และกรดโด-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

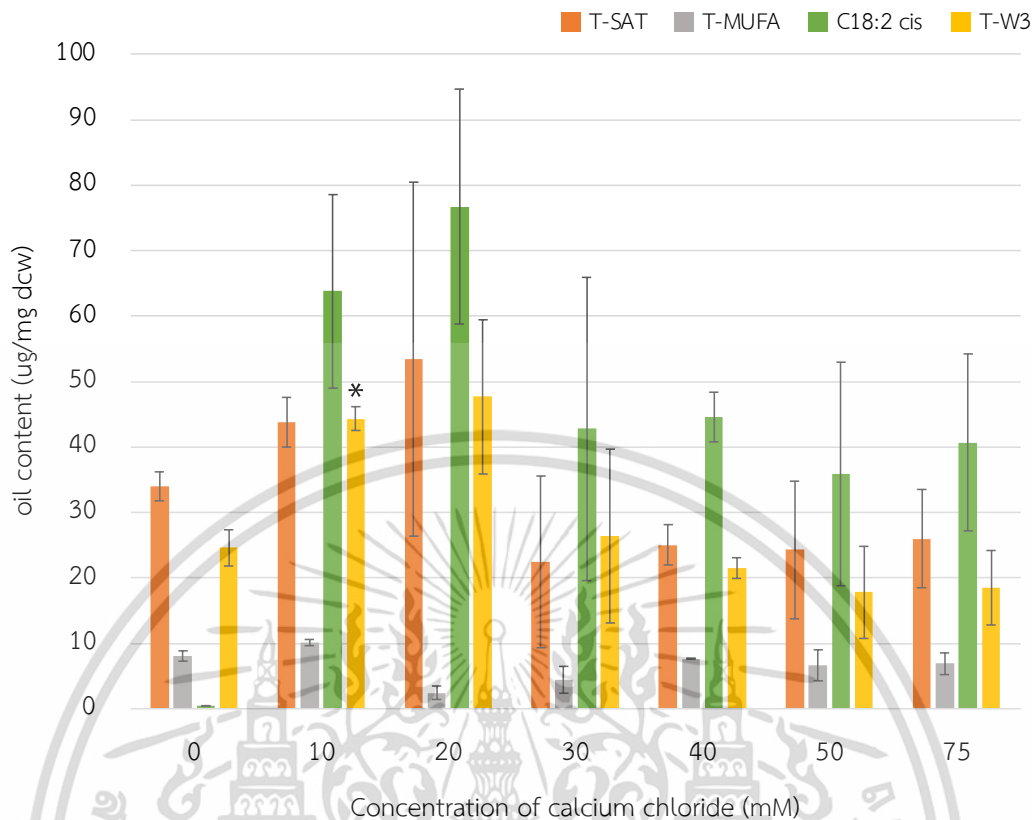
โคชะเฮกชะอีโนอิก (DHA) เท่ากับ  $30.57 \pm 0.92$ ,  $0.14 \pm 0.02$  และ  $0.75 \pm 0.40$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ดังรูป 4.11) จากผลปริมาณน้ำมันโอเมก้า-3 พบว่าเมื่อเติมเกล็ดแคลเซียมคลอไรด์ 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ  $44.19 \pm 1.81$  และ  $47.66 \pm 11.81$  ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ดังรูป 4.12) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Shim และคณะ (2020) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella sorokinana* ในอาหาร TAP ที่ไม่มีคาร์บอนร่วมกับการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ให้การผลิตกรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2 cis) และน้ำมันโอเมก้า-3 ดีที่สุด ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ให้มากกว่า 10 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้การผลิตกรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2 cis) และน้ำมันโอเมก้า-3 ลดลง สำหรับในการศึกษานี้พบว่าการผลิตกรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2 cis) มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกล็ดแคลเซียมคลอไรด์ เนื่องจากแคลเซียมคลอไรด์เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์อย่างที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้ มีรายงานกิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อได้ระดับแคลเซียมไอออนในเซลล์สูงขึ้น นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการไหลของอิเล็กตรอนในระบบสังเคราะห์แสง โดยเมื่อแคลเซียมไอออนเข้าไปจับกับ chloroplast-localized CAS (CaM) แล้วจะกระตุ้นการทำงานของ PGRL1-mediated ในระบบสังเคราะห์แสง 1 (PS I) เพิ่มความต่างศักย์ระหว่างโปรตอนและอิเล็กตรอน ทำให้เกิดการสร้าง Adenosine triphosphate (ATP) มากขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ไขมัน (Chen *et al.*, 2015) จากผลวิเคราะห์พบว่าเมื่อเติมเกล็ดแคลเซียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* KLS59 แสดงสัดส่วนการผลิตกรดไขมันโคชะเฮกชะอีโนอิกและกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกล็ดแคลเซียมคลอไรด์ (ดังรูป 4.13 และ 4.14) เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณพบว่าความเข้มข้นของเกล็ดแคลเซียมคลอไรด์มีความแตกต่างกันในการศึกษานี้จึงอนุมานได้ว่าการเพิ่มแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณน้อยทำให้เซลล์มีความเครียดไม่มาก ทำให้แคลเซียมไอออนภายนอกเข้าไปเมื่อระดับแคลเซียมเพิ่มสูงขึ้นก็เป็นการส่งสัญญาณให้เซลล์ตอบสนองต่อความเครียดด้วยการเพิ่มการสังเคราะห์น้ำมันมากขึ้นแต่เนื่องจากความเครียดไม่มากแต่อาจจะเกิดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ทำให้มีการสังเคราะห์น้ำมันในกลุ่มของโอเมก้า-3 มากขึ้น เพื่อดำเนินการต้านสารอนุมูลอิสระที่อาจจะเกิดขึ้น (Anand *et al.*, 2019) จากผลการทดลองการเติมเกล็ดโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน (รูปที่ 4.15 และ 4.16) ไม่พบกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก อย่างที่ได้คาดไว้จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ โดยผลการทดลองมีแนวโน้มคล้ายกับการเติมเกล็ดแคลเซียมคลอไรด์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกล็ดโซเดียมคลอไรด์มีการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะลดลง แต่มีการผลิตสัดส่วนกรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2 cis) และกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสถานะที่เติมเกล็ดโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้ผลสัดส่วนน้ำมันโอเมก้า-3 สูงสุด ( $37.14 \pm 0.50$  เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นกรดแอลฟาไลโนเลอิกทั้งหมด และการผลิตค่อยๆลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปจนถึง 30 มิลลิโมลาร์ สอดคล้องกับปริมาณน้ำมันโอ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

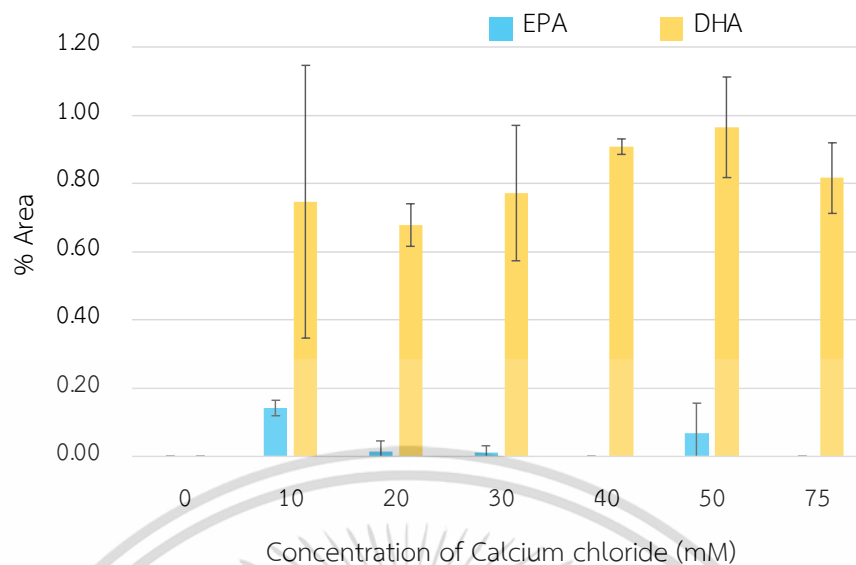
เมก้า-3 สูงสุด ( $43.67 \pm 2.35$  ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ดังรูป 4.16) เนื่องจากโซเดียมมีความเกี่ยวข้องกับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของไอออน ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pump) เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง มีรายงานเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้เซลล์เริ่มที่จะปรับตัวรับความเครียดที่จะเกิดขึ้นโดยการสะสมพลังงานที่ผลิตได้ทั้งหมดในรูปของไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (TAG) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Anand และคณะ (2019) เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus vacuolatus* ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10 ถึง 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ 10 มิลลิโมลาร์ ให้ผลการทดลองดีที่สุด พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ส่งผลให้มวล-ชีวภาพ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ลดลง



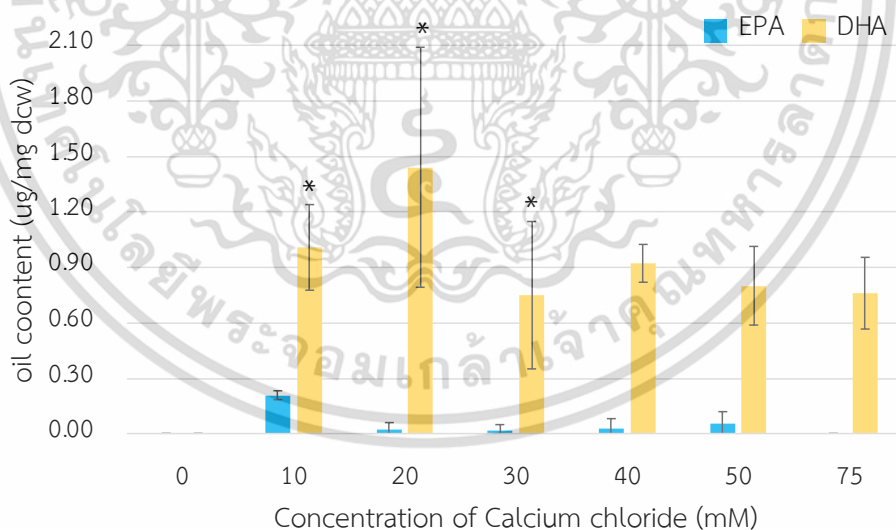
**รูปที่ 4.11** สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือแคลเซียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้น รายละเอียดดังภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.12 ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือแคลเซียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้น รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

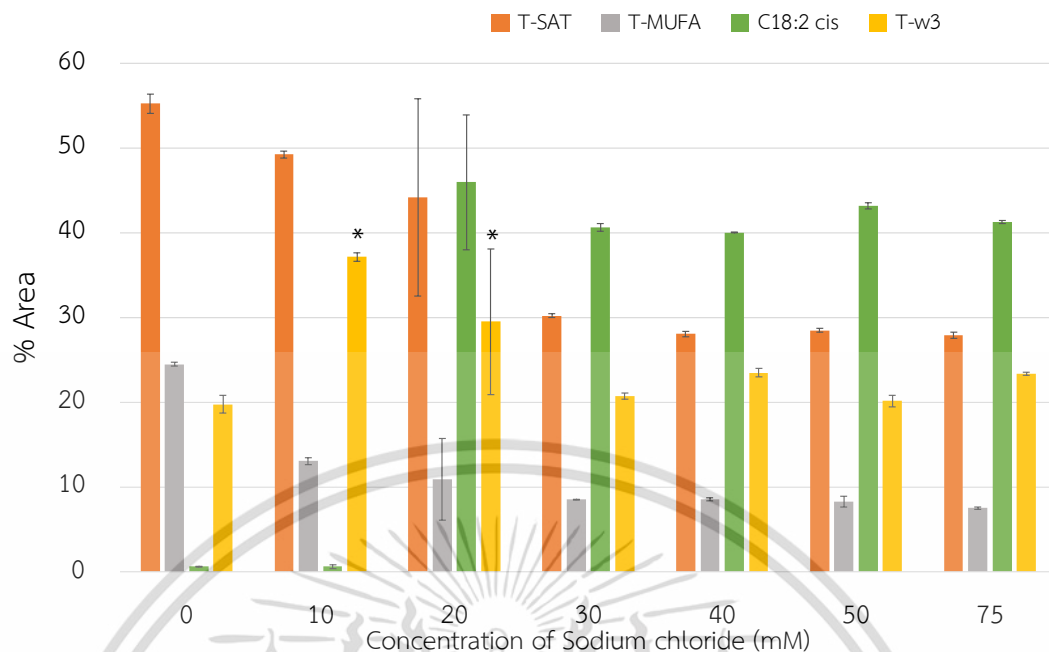


**รูปที่ 4.13** สัดส่วนกรดอีโคซานอยด์ (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (DHA) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือแคลเซียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้น รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

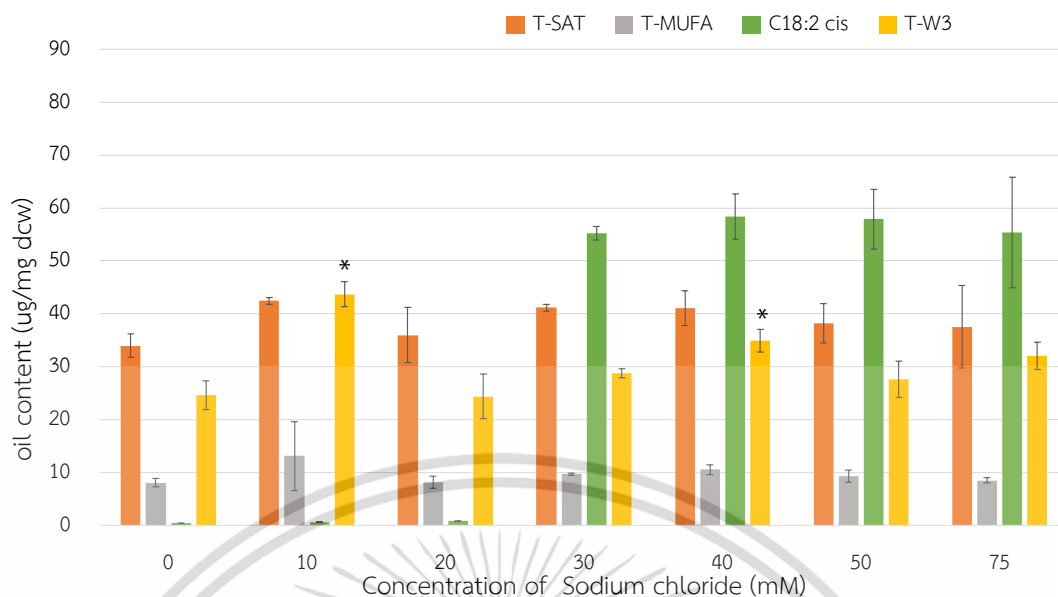


**รูปที่ 4.14** ปริมาณน้ำมันกรดอีโคซานอยด์ (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (DHA) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือแคลเซียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้น รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-w3) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเพิ่มความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือโซเดียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้น รายละเอียดดังภาคผนวก ค)



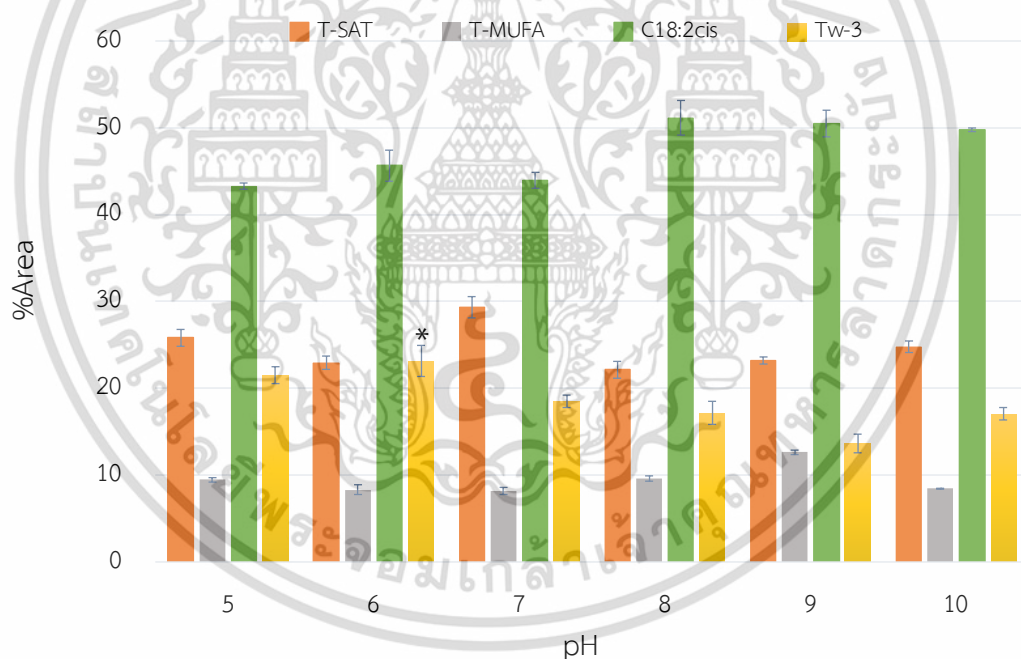
รูปที่ 4.16 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella sp. KLS59* ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกลุ่มน้ำมันในเกลือโซเดียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้น รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

#### 4.4.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของพีเอชและแสง

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella sp. KLS59* ในขบวนการเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการถ่ายลงอาหารใหม่ที่มีพีเอชของอาหารเท่ากับ 5, 6, 7, 8, 9, 10 แล้วเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงต่ออีก 6 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์สัดส่วนและปริมาณกรดไขมัน (ดังรูป 4.15 และ 4.16) พบว่าที่พีเอช 7 กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่มีสัดส่วนการผลิตกรดไขมันอิ่มตัวสูงสุด เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีความเป็นเบสมากขึ้นพบว่า *Chlorella sp. KLS59* สามารถผลิตกรดไขมันไลโนเลอิก (C18:2 cis) ได้ดีมากกว่าสภาวะที่มีความเป็นกรด และสภาวะที่พีเอชเท่ากับ 6 เป็นพีเอชที่สาหร่าย *Chlorella sp. KLS59* สามารถผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 สูงสุด เท่ากับ  $23.14 \pm 1.75$  เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็นแอลฟาไลโนเลอิก กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิกและกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก เท่ากับ  $22.71 \pm 1.84$ ,  $0.23 \pm 0.06$  และ  $0.20 \pm 0.04$  เปอร์เซ็นต์ หากเพิ่มความเป็นกรดมากกว่านี้สาหร่ายแสดงการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ลดลง และเมื่อเพิ่มความเป็นเบสให้มากขึ้นก็จะเห็นแนวโน้มการผลิตที่ลดลง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ

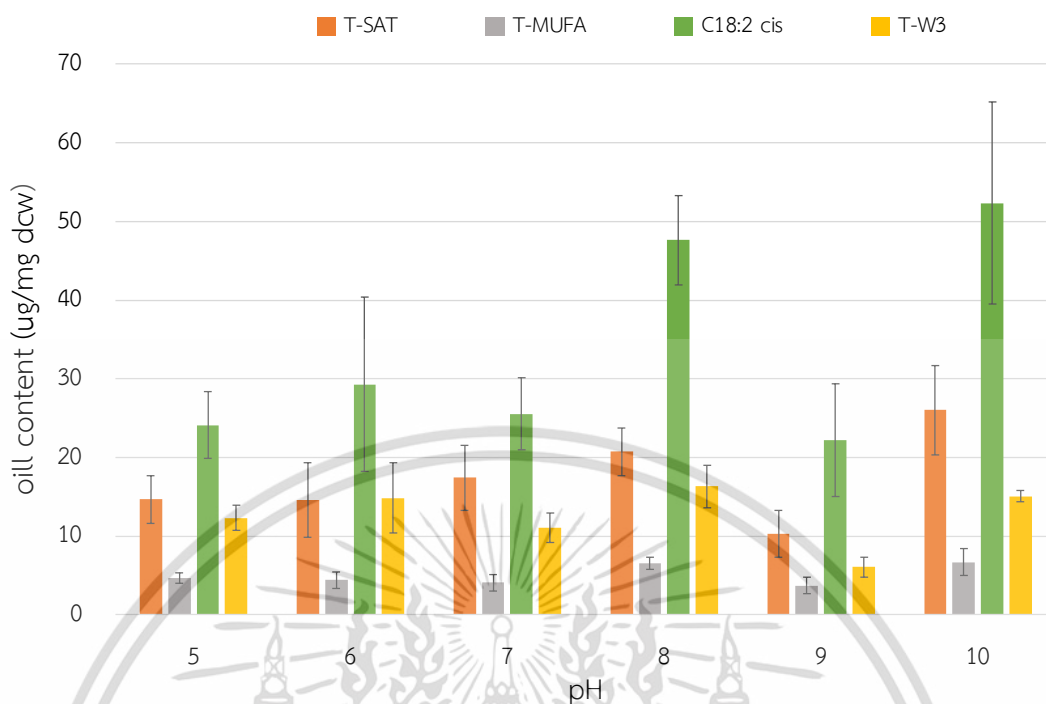
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันโอเมก้า-3 (ดังรูปที่ 4.16) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่พีเอชที่แตกต่างกัน แต่แนวโน้มเช่นเดียวกับสัดส่วนกรดไขมันโอเมก้า-3 มีรายงานเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sorokiana* DOE1412 ที่มีความเป็นกรดเท่ากับ 6.0 ให้การเจริญสูงสุด และเมื่อความเป็นเบสมากขึ้นไปจนถึง 8.5 พบว่ามีการผลิตกรดไขมันแอลฟาไลโนเลอิกเพิ่มขึ้นแต่มีมวลชีวภาพที่ลดลง (Qiu *et al.*, 2017). นอกจากนี้ในการศึกษาของ Sang และคณะ (2012) เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Pinguicoccus pyrenoidosus* 2078 ที่พีเอชตั้งแต่ 5.0 ถึง 9.0 พบว่าที่พีเอช 6.0 มีค่าการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนและกรดโคเซเพนตะอีโนอิกสูงสุด อย่างไรก็ตามพีเอชถือเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของสาหร่าย มีอิทธิพลต่อการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงอาหารจะมีค่าความเป็นเบสเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาผลกระทบของพีเอชต่อเมแทบอลิซึมของสาหร่ายแต่พบว่าพีเอชมีอิทธิพลต่อการผลิต กรดไขมันของสาหร่าย โดยมีความแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ (Chen and Durbin, 1994)



รูปที่ 4.17 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ -3) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่าง (external pH) เป็นระยะเวลา 7 วัน (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างกันของกลุ่มน้ำมันโอเมก้า-3 ที่พีเอช 7 กับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงที่พีเอชอื่นจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

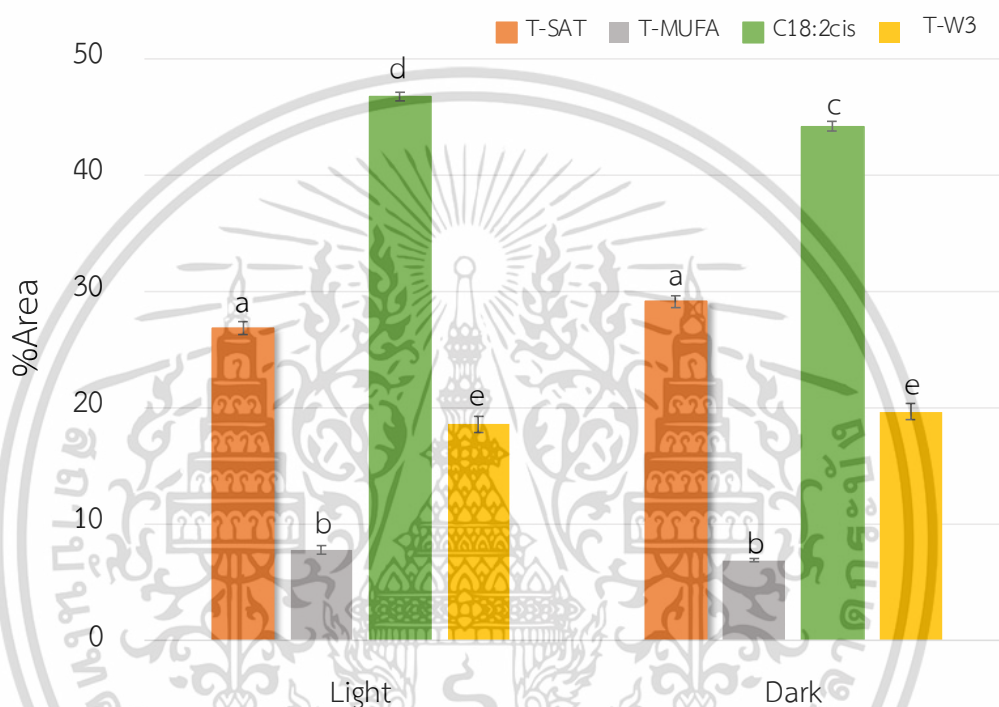
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



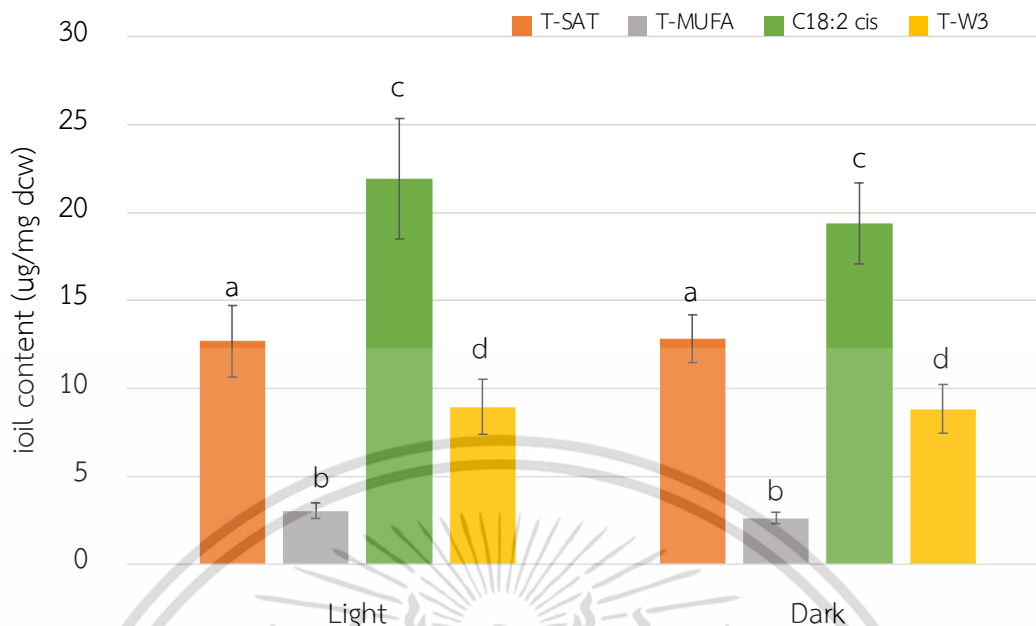
**รูปที่ 4.18** ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่าง (external pH) เป็นระยะเวลา 7 วัน (เครื่องหมาย \* แสดงค่าความแตกต่างกันของกลุ่มน้ำมันโอเมก้า-3 ที่พีเอช 7 กับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงที่พีเอชอื่นจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p < 0.05$ ) รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. KLSc59 ในขวดการเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 30 เปอร์เซนต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงแบบมีแสงและไม่มีแสง ผลการศึกษาอิทธิพลของแสงต่อสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม (ดังรูปที่ 4.17) พบว่าสถานะที่มีแสงมีการผลิตกรดไขมันอิ่มตัวน้อยกว่าสถานะที่ไม่มีแสง แต่มีการผลิตกรดไลโนเลอิกมากกว่าสถานะที่ไม่มีแสง มีค่าเท่ากับ  $26.85 \pm 0.56$  และ  $46.75 \pm 0.35$  เปอร์เซนต์ ตามลำดับ โดยทั้งสองสถานะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 จากรูปที่ 4.18 แสดงผลจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าปริมาณน้ำมันทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงในสถานะที่มีแสงและไม่มีแสง อิทธิพลของแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง จากการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบช่วงเวลาส่งผลต่อองค์ประกอบกรดไขมัน เมื่อเพาะเลี้ยงสำหรับ *Chlorella vulgaris* ที่ความเข้มแสง 100 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้รอบการรับแสง 16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมง สามารถผลิตกรด-เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไขมันอิ่มตัวสูงสุด 33.38 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) ลดลง (Amini *et. al.*, 2012) จากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าแสงและการจำกัดช่วงเวลาการให้แสงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบน้ำมันที่สาหร่ายผลิตขึ้น และมีรายงานก่อนหน้านี้แสดงการผลิตกรดไขมันแตกต่างกันในช่วงเวลามืดและสว่าง (Archer *et. al.*, 2019) ดังนั้นสรุปได้ว่าที่พีเอช 6 และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำในการทดลองถัดไป



รูปที่ 4.19 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงและไม่มีการให้แสง (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) รายละเอียดดังภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.20 ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella sp. KLSc59* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง (อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p < 0.05$ ) รายละเอียดดังภาคผนวก ค)

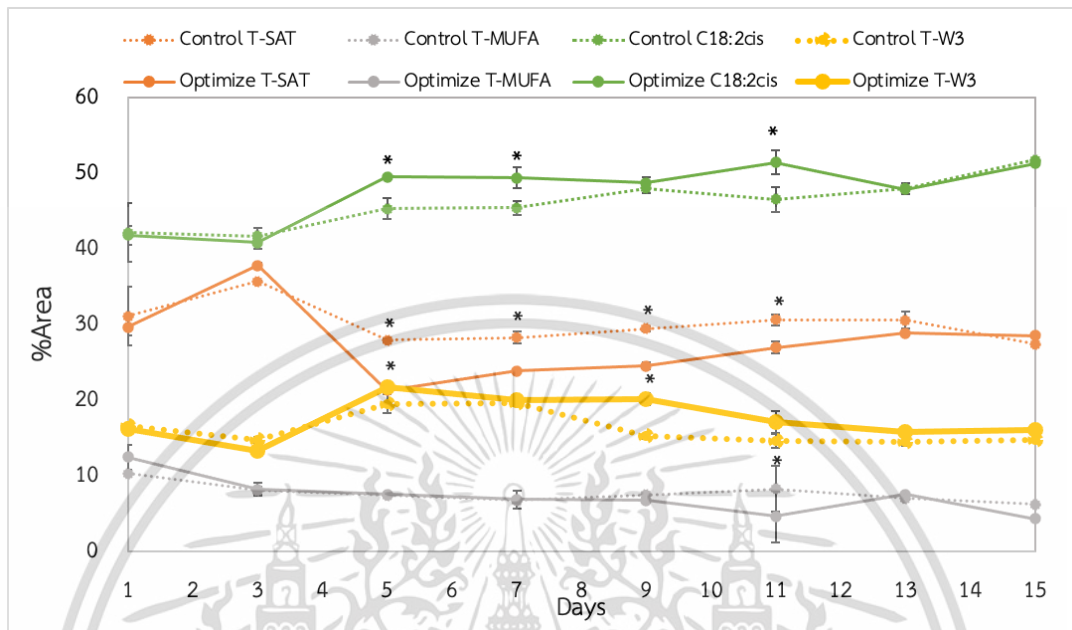
#### 4.4.5 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ทำการปรับสภาวะโดยนำทุกปัจจัยก่อนหน้าที่เหมาะสมมาทดลอง โดยการเพาะเลี้ยง *Chlorella sp. KLSc59* ในขวดการเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหาร 30 เปอร์เซนต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากนั้นทำการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 6.0 เลี้ยงในสภาวะที่มีแสงแล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่ออีก 6 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์สัดส่วนและปริมาณกรดไขมัน (ดังรูป 4.19 และ 4.20) พบว่าระยะเวลาวันที่ 1 ถึง 3 ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์สู่ระยะ stationary phase ช่วงต้น แสดงสัดส่วนน้ำมันทุกกลุ่มใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่หลังจากวันที่ 3 จะเริ่มเห็นความแตกต่างโดยมีสัดส่วนกรดไขมัน สำหรับการผลิตกรดไขมันอิ่มตัวพบว่าหลังจากปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงให้การผลิตมากกว่า แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยสัดส่วนสูงสุดในวันที่ 3 ( $37.76 \pm 1.11$  เปอร์เซนต์ หรือ  $27.07 \pm 5.79$  ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง) หลังจากนั้นค่อยๆลดการผลิตลงทั้งในกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม สัดส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ พบว่าไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับสัดส่วนกรดไขมันไลโนเลอิกพบค่าการผลิตสูงสุดในวันที่ 5 หลังจากนั้นมีความโน้ม

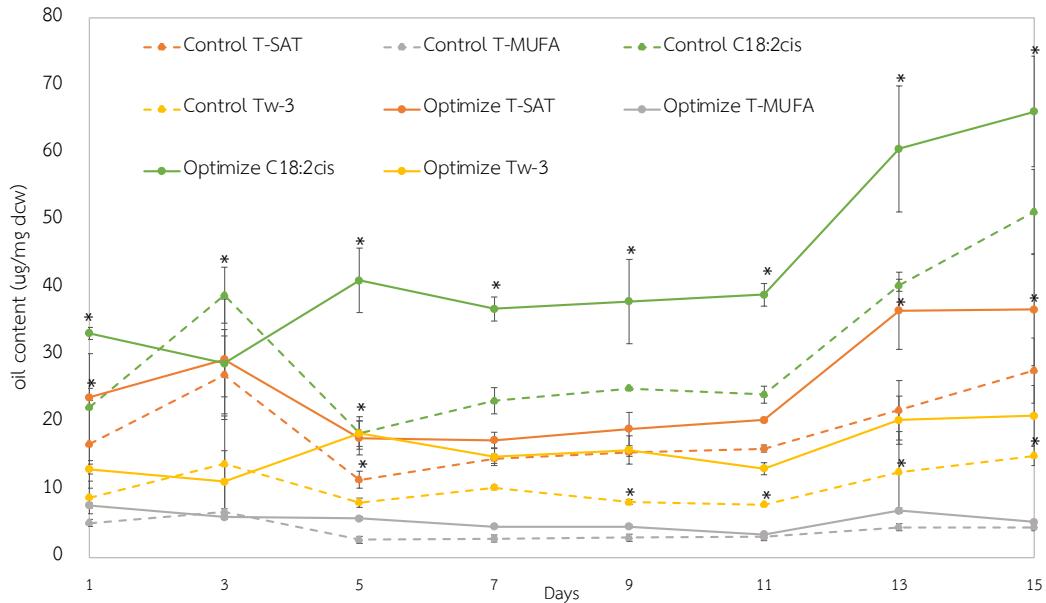
ค่อนข้างคงที่ โดยในกลุ่มที่ปรับสภาวะให้ค่าการผลิตเท่ากับ  $49.53 \pm 0.82$  เปอร์เซนต์ ซึ่งมากกว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีค่าการผลิตสูงสุดในวันที่ 11 มีค่าเท่ากับ  $51.45 \pm 0.70$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในกลุ่มควบคุมการผลิตสูงสุดในวันที่ 15 และการผลิตกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 พบว่าในกลุ่มควบคุมมีการผลิตสูงสุดในวันที่ 7 มีค่าเท่ากับ  $19.63 \pm 1.25$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงเมื่อปรับสภาวะที่จะมีการผลิตมากกว่ากลุ่มควบคุมและมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 โดยมีค่าเท่ากับ  $21.73 \pm 0.63$  เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะค่อยๆลดการผลิตลงทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งผลวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่มมีแนวโน้มเดียวกับสัดส่วนกรดไขมัน ในการศึกษาจะเห็นได้ว่าเมื่อทำการปรับสภาวะแล้วพบการเปลี่ยนแปลงการผลิตกรดไขมันอิ่มตัว กรดไลโนเลอิกและกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 มากขึ้น แต่การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ มีค่าพอกๆกับกลุ่มควบคุมปกติแล้วการผลิตกรดไขมันจะมีการผลิตสูงสุดช่วง log phase ซึ่งเซลล์เริ่มมีการแบ่งจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นเพื่อนำไปใช้ประกอบของฟอสโฟลิพิด หลังจากการนี้การผลิตจะเริ่มลดลง แล้วเปลี่ยนมาเป็นการผลิตกรดไขมันเพื่อสะสมน้ำมันเป็นพลังงานสำรองแทน จากผลวิเคราะห์นั้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase มาเป็นระยะเวลา 3 วัน เซลล์จะมีการผลิตน้ำมันในกลุ่มกรดไขมันอิ่มตัวสูง หลังจากนั้นกรดไขมันอิ่มตัวเหล่านี้จะถูกสังเคราะห์เปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase 5 วัน หลังจากนั้นการผลิตจะค่อนข้างคงที่ จากการศึกษาโดยการรวมทุกปัจจัยพบว่าสำหรับ *Chlorella* sp. KLS59 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์และมีความเป็นกรดเท่ากับ 6.0 สะท้อนให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ได้ถึง  $22.04 \pm 0.34$  เปอร์เซ็นต์ หรือ 21.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (คำนวณดังแสดงในภาคผนวก ข )ซึ่งประกอบไปด้วยกรดแอลฟาไลโนเลอิก (ALA) กรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) เท่ากับ  $12.22 \pm 0.31$ ,  $2.20 \pm 0.21$  และ  $8.83 \pm 1.10$  เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษายังไม่เจอรายงานในปัจจุบันเกี่ยวกับสาหร่ายน้ำจืดที่มีความสามารถในการผลิตกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ซึ่งเป็นกลุ่มน้ำมันที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ และสาหร่ายในกลุ่ม *Chlorella* sp. มีรายงานว่าสามารถนำมารับประทานได้ (Scieszka et al., 2020) แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อตอบโจทย์อาหารทางเลือกมากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองผู้วิจัยคาดว่าเกิดการเปลี่ยนกรดไขมันตามวิธีการสังเคราะห์เมื่อเซลล์สามารถสังเคราะห์กรดไลโนเลอิก (C18:2 cis) มากขึ้น และมีการทำงานของเอนไซม์  $\Delta 15$  desaturase ก็จะทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดแอลฟา-ไลโนเลอิก (ALA) ทั้งนี้ในจากผลการศึกษาการผลิตกรดไขมันในสาหร่าย *Chlorella* sp. KLS59 จะเห็นได้ว่าปกติเซลล์จะพบการผลิตกรดแอลฟา-ไลโนเลอิก (ALA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) แต่จะเจอกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) น้อยมาก ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าเอนไซม์  $\omega$ -3 desaturase ในการเปลี่ยนกรดแอลฟา-ไลโนเลอิก (ALA) ไปเป็น กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) มีแนวโน้มที่จะมีมากในสาหร่ายสายพันธุ์นี้ แต่การทำงานของ เอนไซม์  $\Delta 15$  desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญการเปลี่ยนจากน้ำมันโอเมก้า-6 มาเป็นน้ำมันโอเมก้า-3 ยังมีน้อยเลยทำให้สาหร่าย *Chlorella* sp. KLS59 มีปริมาณกรดไลโนเลอิกสูง อย่างไรก็ตามหากมีการทำงานเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์  $\Delta 15$  desaturase เพิ่มมากขึ้นกรดไลโนเลอิกเหล่านั้นน่าจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำมันโอเมก้า-3 ได้มากขึ้น



รูปที่ 4.21 สัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-W3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงหลังจากทำการปรับสภาวะต่างๆ ในระยะเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 15 วัน (เครื่องหมาย \* หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุม รายละเอียดดังภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.22 ปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-Ω-3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงหลังจากทำการปรับสภาวะต่างๆ ในระยะเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 15 วัน (เครื่องหมาย \* หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุม รายละเอียดดังภาคผนวก ค )

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสัดส่วนการผลิตน้ำมันทั้ง 4 กลุ่มเทียบกับรายงานอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 หลังจากทำการปรับสภาวะมีสัดส่วนการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 มากกว่าสาหร่าย *Chlorella sorokinana*, *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas* sp. และ *Isochrysis galbana* และเป็นสาหร่ายในน้ำจืดเพียงสายพันธุ์เดียวที่พบการผลิตกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ในรายงานมักพบว่าสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม *Chlorella* sp. มักผลิตกรดแอลฟาไลโนเลอิก และกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) เป็นหลัก (Shim et al., 2020) ในส่วนของ *Phaeodactylum tricornutum* และ *Isochrysis galbana* เป็นสาหร่ายน้ำเค็มที่มีการผลิตกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) มากกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 สำหรับการผลิตน้ำมันประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะและการผลิตน้ำมันชนิดกรดไลโนเลอิกสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 สามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเทียบกับรายงานอื่นๆ ในตาราง 4.5 กรดไขมันกลุ่มนี้ถือเป็นสารตั้งต้นของการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ต่อไป และมีงานวิจัยทางคลินิกที่พบว่า มีผลที่ดีต่อสุขภาพ (Belwal et al., 2014) ส่วนการผลิตน้ำมันประเภทกรดไขมันอิ่มตัว พบว่าสาหร่าย

*Chlorella vulgaris* และ *Chlorella sorokinana* ให้สัดส่วนสูงกว่าในงานวิจัยนี้ เมื่อทำการคำนวณอัตราส่วนน้ำมันโอเมก้า-6 ต่อน้ำมันโอเมก้า-3 ที่สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 ผลิตได้พบว่ามีค่า เท่ากับ 3.09 ซึ่งถือว่าอยู่เกณฑ์ที่ดีเนื่องจากมีค่าน้อยกว่า 5 เมื่อเทียบกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่นดังตารางจะเห็นได้ว่า สาหร่ายสายพันธุ์อื่นให้อัตราส่วนที่ต่ำกว่า แต่มีปริมาณน้ำมันโอเมก้า-3 ที่ต่ำกว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้ จากที่ได้กล่าวไปข้างต้นเนื่องจากผู้วิจัยคาดว่าหากทำให้เอนไซม์  $\Delta 15$  desaturase ทำงานได้มากขึ้น แนวโน้มวิธีการสังเคราะห์น้ำมันโอเมก้า-3 ก็จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้มีการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า การรวมปัจจัยทั้งหมดที่ศึกษามีผลต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากในสถานะควบคุม *Chlorella* sp. KLSc59 มีการผลิตน้ำมันน้อยกว่าภายหลังปรับสถานะในเกือบทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะที่มีการผลิตพอๆกัน และภายหลังปรับสถานะการผลิตน้ำมันกลุ่มโอเมก้า-3 มีค่าสูงสุดในวันที่ 5 และหากต้องการน้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสามารถที่จะเพาะเลี้ยงได้ภายใน 3 วันเท่านั้น ดังนั้นสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 ถือว่าเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่มีความเหมาะสมในการพัฒนาในการศึกษาการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ต่อไป

**ตารางที่ 4.5** การเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc59 กับสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ

Algal strain	Yield							Ref.
	Condition	T-FAT <sup>a</sup>	T-MUFA <sup>b</sup>	LA	T-omega 3			
					ALA	EPA	DHA	
<i>Chlorella</i> sp. KLSc59	CaCl <sub>2</sub> 10 mM, pH 6.0 for 5 days	21.27 % of TFA	7.47% of TFA	49.53% of TFA	21.53 % of TFA	0.03 % of TFA	0.18 % of TFA	This study
<i>Chlorella sorokinana</i>	CaCl <sub>2</sub> 10 mM	52.31 % of TFA	20.26 % of TFA	13.87 % of TFA	11.12 % of TFA	2.44 % of TFA	NR	Shim et. al.,2020
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mg starved	53.5 % of TFA	2.6% of TFA	26.4% of TFA	17.6% TFA	NR	NR	Chandra et. al.,2013
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	MgCaCl <sub>2</sub> 50 mM for 15 day	38.26 %TFA	2.8% of TFA	6.1% of TFA	40.9% of TFA	NR	NR	Anand et. al.,2019

Algal strain	Yield							Ref
	Condition	T-FAT <sup>a</sup>	T-MUFA <sup>b</sup>	LA	T-omega 3			
					ALA	EPA	DHA	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Marine & Cold environment	NR	NR	NR	NR	7.33 % of TFA	0.58 % of TFA.	Steinrück et. al., 2017
<i>Botryococcus braunii</i>	Trophic regions with low latitude	NR	NR	11.49% of TFA	8.41% of TFA	NR	NR	Hena et. al., 2015
<i>Chlorella sp.</i>	Trophic regions with low latitude	NR	NR	22.19% of TFA	28.25 % of TFA	NR	NR	Hena et. al., 2015
<i>Chlamydomonas sp.</i>	latitude	NR	NR	19.35% of TFA	14.16 % of TFA	NR	NR	Ge et. al., 2023
<i>Isochrysis galbana</i>	50 mL/L Hydrolysates	21 % of TFA	17% of TFA	4% of TFA	11 % of TFA	7% of TFA	14 of TFA	

Remark: a = C14:0, C16:0, C17:0 and C18:0; b = C16:1, C17:1 and C18:1, (TFA = Total fatty- acid), (NR = Not reported)

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดเลือกเทคนิคที่เหมาะสมในตรวจวัดน้ำมันและกรดไขมันในสาหร่ายสีเขียว พบว่า เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปี และเทคนิคการชั่งน้ำหนัก เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ในการประเมินความสามารถในการผลิตน้ำมันเบื้องต้นได้ และเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แบบแมสสเปกโตรมิเตอร์และแบบเฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งปริมาณและระบุชนิดของกรดไขมันได้ ในการศึกษาพบว่าเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์มีความเหมาะสมมากกว่าที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากคอลัมน์ที่ใช้ในการตรวจวัดมีความจำเพาะมากกว่า จากนั้นทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในหน่วยวิจัย พบว่ามี 3 สายพันธุ์จาก 8 สายพันธุ์ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวรหัส BNG2, *Chlorella* sp. KLs59 และ *Chlorella* sp. KLsc61 หลังจากนั้นทำการศึกษาสภาวะการสกัดน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำมันโอเมก้า-3 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือสภาวะที่ใช้ความร้อน 50 องศาเซลเซียสเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีแรงสั่นสะเทือน (sonication) คาดว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ส่งผลต่อโครงสร้างของน้ำมันน้อยที่สุด เนื่องจากโครงสร้างของน้ำมันโอเมก้า-3 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนซึ่งประกอบไปด้วยพันธะคู่หลายพันธะซึ่งทำปฏิกิริยาได้ง่าย จากการตรวจวัดโปรไฟล์กรดไขมันทั้งหมด 11 ครั้งพบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. KLs59 มีความแปรปรวนในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนและกรดโตนิกและกรดโตนิกเฮกซาอินอิกน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวรหัส BNG2 และ *Chlorella* sp. KLsc61 จึงเลือกสาหร่าย *Chlorella* sp. KLs59 มาทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ซึ่งทำการศึกษาทั้งหมด 5 ปัจจัย ได้แก่

1. อิทธิพลของเปอร์เซ็นต์ปริมาณอาหารในขวดเพาะเลี้ยงสาหร่าย พบว่าที่ ปริมาตร 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตดีสุด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
2. ศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของเกลือ พบว่าเมื่อเติมเกลือแคลเซียม-คลอไรด์ลงอาหารสูตร TAP 10 มิลลิโมลาร์ให้ค่าการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 สูงสุด
3. ศึกษาอิทธิพลของพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่พีเอชเท่ากับ 6.0 ให้ค่าการเจริญ และการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 สูงสุด
4. ศึกษาอิทธิพลของแสง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง แต่พบว่าในสภาวะที่มีแสงมีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่า 5.41 เปอร์เซ็นต์
5. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 พบว่าช่วงวันที่ 5 ถึงวันที่ 9 การผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 สูงสุด เมื่อทำการรวมทุกปัจจัยแล้วพบว่าสาหร่าย

*Chlorella* sp. KLS59 พบว่าทุกปัจจัยที่นำมาศึกษาส่งผลต่อการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ซึ่งสุดท้ายพบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. KLS59 สามารถผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 เท่ากับ  $22.04 \pm 0.34$  เปอร์เซ็นต์ หรือ 18.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งในวันที่ยาวของการเพาะเลี้ยง เมื่อคำนวณอัตราส่วนของน้ำมันโอเมก้า-6 ต่อโอเมก้า-3 พบว่า 3.09 ซึ่งถือว่าเป็นน้ำมันที่มีอัตราส่วนที่ดีในการนำมาประกอบอาหารหรือนำไปรับประทาน

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 และทำการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 เป็นที่น่าพึงพอใจ สามารถเพิ่มการผลิตน้ำมันโอเมก้า-3 ได้ แต่ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตน้ำมันในกลุ่มกรดโอเมก้า-3 กับปริมาณเกลือแคลเซียมที่ฟิเอช 6.0 ได้ ดังนั้นในงานวิจัยต่อจากนี้สามารถศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์  $\Delta 15$  desaturase ในสาหร่ายสีเขียวเมื่ออยู่ในสภาวะเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์และค่าความกรดที่ 6 และควรศึกษา *Chlorella* sp. KLS59 มีการสะสมกรดไขมันกรดโอโคซาเพนตะอีโนอิกและกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิกในรูปแบบใด เพื่อที่จะสามารถนำมาต่อยอดในการปรับสภาวะต่อไปได้

## เอกสารอ้างอิง

- ณัฐชยา พรรณรัตน์ศิลป์. 2556. การใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดในการย้อมสีสิ่งทอและสังเคราะห์สีย้อมเอโซ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปีที่ 21. [Online]. Available : <http://tujournals.tu.ac.th/tstj/detailart.aspx?ArticleID=149>. [2565, ธันวาคม 19].
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546 สาขาวิทยวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่
- สุเมธ บุญเกิด.(ม.ป.ป.).การใช้อัลตราซาวด์ในการช่วยสกัดพืชสมุนไพร. กลุ่มวิจัยอุตสาหกรรมเภสัช และ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ . [ Online]. Available: [www.gpo.or.th/rdi/html/ultrasound](http://www.gpo.or.th/rdi/html/ultrasound). [2557, กรกฎาคม 29].
- Alemán-Nava, G. S., Cuellar-Bermudez, S. P., Cuaresma, M., Bosma, R., Muylaert, K., Ritmann, B. E., & Parra, R. (2016). How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, 128, 74-79.
- Amini Khoeyi, Z., Seyfabadi, J., & Ramezanpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20, 41-49
- Amini Khoeyi, Z., Seyfabadi, J., & Ramezanpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20, 41-49.
- An, M., Mou, S., Zhang, X., Ye, N., Zheng, Z., Cao, S., Xu, D., Fan, X., Wang, Y., & Miao, J. (2013). Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Bioresource Technology*, 134, 151-157.
- Archer, L., Mc Gee, D., Paskuliakova, A., McCoy, G. R., Smyth, T., Gillespie, E., & Touzet, N. (2019). Fatty acid profiling of new Irish microalgal isolates producing the high-value metabolites EPA and DHA. *Algal Research*, 44, 101671.
- Belwal, T., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Dehpour, A. R., & Shirooie, S. (2020). Naturally occurring chemicals against Alzheimer's disease. Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819212-2.00035-9>

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J. S., Bai, F., & Zhao, X. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—a review. *Bioresource Technology*, 244, 1198-1206.
- Chen, C. Y., & Durbin, E. G. (1994). Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Marine Ecology-Progress Series*, 109, 83-83.
- Chen, H., Hu, J., Qiao, Y., Chen, W., Rong, J., Zhang, Y., He, C., & Wang, Q. (2015). Ca<sup>2+</sup>-regulated cyclic electron flow supplies ATP for nitrogen starvation-induced lipid biosynthesis in green alga. *Scientific Reports*, 5(1), 15117.
- Chen, W., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource technology*, 102(1), 135-141.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41-47.
- Elloumi, W., Jebali, A., Maalej, A., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2020). Effect of Mild Salinity Stress on the Growth, Fatty Acid and Carotenoid Compositions, and Biological Activities of the Thermal Freshwater Microalgae *Scenedesmus* sp. *Biomolecules*, 10(11), 1515.
- Elsay, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 639-642.
- Ferreira, G. F., Rios Pinto, L. F., Carvalho, P. O., Coelho, M. B., Eberlin, M. N., Maciel Filho, R., & Fregolente, L. V. (2021). Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella*, and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11, 1675-1689.
- Finco, A. M. d. O., Mamani, L. D. G., Carvalho, J. C. d., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2017). Technological trends and market

- perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(5), 656-671.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Garcia-Pichel, F., & Belnap, J. (2021). Cyanobacteria and algae. *Principles and Applications of Soil Microbiology*, 171-189.
- Ge, F., Song, K., Yang, Z., Li, J., Yan, F., Zhang, M., Huang, B., Fu, G., & Zheng, H. (2023). Enhancing docosahexaenoic acid production of *Isochrysis galbana* from starch-rich food processing byproducts. *Fermentation*, 9(2), 158.
- Gomaa, F., Kosakyan, A., Heger, T. J., Corsaro, D., Mitchell, E. A., & Lara, E. (2014). One alga to rule them all: unrelated mixotrophic testate amoebae (Amoebozoa, Rhizaria and Stramenopiles) share the same symbiont (Trebouxiophyceae). *Protist*, 165(2), 161-176.
- Gorain, P. C., Bagchi, S. K., & Mallick, N. (2013). Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environmental Technology*, 34(13-14), 1887-1894.
- Gorman, D. S., & Levine, R. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(6), 1665-1669.
- Halim, H., & Thoo, Y. (2018). Effect of ultrasound treatment on oxidative stability of sunflower oil and palm oil. *International Food Research Journal*, 25(5).
- Hallmann, A., & Rampelotto, P. H. (2019). *Grand Challenges in Algae Biotechnology* (1 ed.). Springer. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-25233-5>
- Hena, S., Abida, N., & Tabassum, S. (2015). Screening of facultative strains of high lipid producing microalgae for treating surfactant mediated municipal wastewater. *Royal Society of Chemistry*, 5(120), 98805-98813.
- Hounslow, E., Vijay Kapoore, R., Vaidyanathan, S., James Gilmour, D., & C Wright, P. (2016). The search for a lipid trigger: the effect of salt stress on the lipid profile of the model microalgal species *Chlamydomonas reinhardtii* for biofuels production. *Current Biotechnology*, 5(4), 305-313.

- Hu, H., Li, J.-Y., Pan, X.-R., Zhang, F., Ma, L.-L., Wang, H.-J., & Zeng, R. J. (2019). Different DHA or EPA production responses to nutrient stress in the marine microalga *Tisochrysis lutea* and the freshwater microalga *Monodus subterraneus*. *Science of the Total Environment*, 656, 140-149.
- Khan, M., Rahman, M., Zaman, S., Jahangir, T., & Razu, M. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids from algae. *Microalgal Biotechnology*, 43-45.
- Lange, K. W. (2020). Omega-3 fatty acids and mental health. *Global Health Journal*, 4(1), 18-30.
- Laokua, N., Rittiyon, N., Kornrawudaphikasama, Y., Klinsalee, R., Tonawut, Y., Preechaphonkul, N., Raksajit, W., Khetkorn, W., Dejitsakdi, W., & Maneeruttanarungroj, C. (2022). Optimal conditions for maximized H<sub>2</sub> yield from a new green algal strain *Chlorella* sp. KLSc61. *Journal of Applied Phycology*, 34(4), 1909-1919.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource technology*, 101(1), S75-S77.
- Lu, N., Wei, D., Jiang, X.-L., Chen, F., & Yang, S.-T. (2012). Regulation of lipid metabolism in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to NaCl stress: An integrated analysis by cytomic and lipidomic approaches. *Process Biochemistry*, 47(7), 1163-1170.
- Lu, Q., Li, H., Xiao, Y., & Liu, H. (2021). A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms, production technologies, and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Algal Research*, 55, 102281.
- Mercer, P., & Armenta, R. E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(5), 539-547.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., & Bux, F. (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 57-70.
- Naveena, K., & Ramalingappa, I. (2018). Production of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from microbes and their secondary metabolites. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 7(12).

- Niemi, C., Lage, S., & Gentili, F. G. (2019). Comparisons of analysis of fatty acid methyl ester (FAME) of microalgae by chromatographic techniques. *Algal Research*, 39, 101449.
- Nozaki, H. (2003). Flagellated green algae. *Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification*, 225-252.  
[Online]. Available <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573105976081198592>
- Olubunmi, F. A. (2017). Effect of sonication at different ultrasonic frequencies on the quality and quantity of fatty acids of the oil of *Chlorella vulgaris*. *Scientific Research and Essays*, 12(16), 155-162.
- Petrović, S. B., & Arsić, A. (2015). Fatty acids: fatty acids. *Encyclopedia of Food & Health*, 623-631. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00277-4>.
- Puri, M., Thyagarajan, T., Gupta, A., & Barrow, C. J. (2015). Omega-3 fatty acids produced from microalgae. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, 1043-1057.
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192-199.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A., & Posewitz, M. C. (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, 9(4), 486-501.
- Remize, M., Brunel, Y., Silva, J. L., Berthon, J. Y., & Filaire, E. (2021). Microalgae n-3 PUFAs production and use in food and feed industries. *Marine Drugs*, 19(2), 113.
- Robertson, R., Guihéneuf, F., Schmid, M., Stengel, D. B., Fitzgerald, G., Ross, P., & Stanton, C. (2013). Algae-derived polyunsaturated fatty acids: implications for human health. In (pp. 45-99): Nova Sciences Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA.
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., ... & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-16
- Sang, M., Wang, M., Liu, J., Zhang, C., & Li, A. (2012). Effects of temperature, salinity, light intensity, and pH on the eicosapentaenoic acid production of

- Pinguicoccus pyrenoidosus*. Journal of Ocean University of China, 11, 181-186.
- Ścieszka, S., & Klewicka, E. (2020). Influence of the Microalga *Chlorella vulgaris* on the Growth and Metabolic Activity of *Lactobacillus* spp. *Bacteria. Foods*, 9(7), 959.  
[Online]. Available <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/7/959>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 345-381.
- Shim, S. J., Hong, M. E., Chang, W. S., & Sim, S. J. (2020). Repeated-batch production of omega-3 enriched biomass of *Chlorella sorokiniana* via calcium-induced homeoviscous adaptation. *Bioresource Technology*, 303, 122944.
- Sirawattanamongkol, T., Maswanna, T., & Maneeruttanarungroj, C. (2020). A newly isolated green alga *Chlorella* sp. KLSc59: potential for biohydrogen production. *Journal of Applied Phycology*, 32, 2927-2936.
- Size, A. M. (2020). Share & trends tnalysis report by source, by product (Dried Algae Meal, Oil, Softgel), by application (nutraceutical, cosmetics, aquaculture and animal feed), and segment forecasts, 2020–2027. Market Analysis Report; Grand View Research: San Francisco, CA, USA, 76.
- Song, X., Liu, B. F., Kong, F., Ren, N. Q., & Ren, H. Y. (2022). Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: application, mechanisms, and challenges. *Resources, Conservation and Recycling*, 183, 106355.
- Steinrücken, P., Erga, S. R., Mjøs, S. A., Kleivdal, H., & Prestegard, S. K. (2017). Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. *Algal Research*, 26, 392-401.
- Tao, L. (2015). Oxidation of polyunsaturated fatty acids and its impact on food quality and human health. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences* 1(6), 135-142.
- Teh, K. Y., Loh, S. H., Aziz, A., Takahashi, K., Effendy, A. W. M., & Cha, T. S. (2021). Lipid accumulation patterns and role of different fatty acid types towards

mitigating salinity fluctuations in *Chlorella vulgaris*. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.

Watson, R., & Preedy, V. R. (2019). *Omega Fatty Acids in Brain and Neurological Health*. Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410527-0.00019-3>

## ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ ก-1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

ลำดับที่	สารเคมี	น้ำหนัก ในการ เตรียม stock (กรัม)	ปริมาตรที่ ใช้ในการ เตรียม stock (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ ใช้ในอาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
1	ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน (Tris-base)	24.20	100	10
2	แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	3.75	250	25
	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	1.00		
	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0.50		
3	ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.880	10	1
	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.440		
4	เกลือโซเดียม อีดีทีเอ (Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O)	0.500	1	1
	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.220		
	กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.114		
	แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	0.050		
	เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	0.050		
	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	0.0160		
	แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	0.0077		
5	กรดอะซิติก (CH <sub>3</sub> COOH)			1
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น		1 ลิตร		

### วิธีการเตรียมอาหารวุ้น

1. เตรียมสารละลาย 1 -5 ตามตาราง ก-1
2. ปรับปริมาตรของเหลวให้เท่ากับ 1 ลิตร
3. เติมอะการ์ (Agar) 15 กรัม

## ภาคผนวก ข

### การคำนวณปริมาณน้ำมัน

ในการคำนวณปริมาณน้ำมันในงานวิจัยนี้จะทำการเทียบพื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันมาตรฐาน (Supelco 37 component FAMES standard mixture) ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสามารถคำนวณได้ดังนี้

- 3.1.1.1 คำนวณปริมาณน้ำมันแต่ละกลุ่มจากพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของแต่ละกรดไขมัน และพื้นที่ใต้กราฟของกรดไขมันมาตรฐานแต่ละชนิด โดยคำนวณจากสมการ (0.2 มิลลิลิตร คือ ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยง)

$$\text{Total content} = \frac{\text{peak area of each fatty acid} \times \text{concentration of standard}}{\text{peak area of standard}} \times 0.2 \text{ ml}$$

- 3.1.1.2 คำนวณปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่มในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของเซลล์ จากสมการเส้นตรง  $y = 2.2938x$  เทียบค่าความขุ่นของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLS59 กับมิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง โดยที่ค่า  $y$  คือ ค่าความขุ่นของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLS59 ที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร และ  $x$  คือ น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว (Sirawattanamongkol *et. al.*, 2020)

- 3.1.1.3 เมื่อคำนวณได้ค่าปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดแล้ว ทำการรวมกรดไขมันแต่ละกลุ่ม โดยจัดเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- 3.1 กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) ได้แก่ C14:0, C16:0, C17:0, C18:0
- 3.2 กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) ได้แก่ C16:1, C17:1, C18:1 cis
- 3.3 กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) ได้แก่ C18:2 cis
- 3.4 กลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ได้แก่ C18:3 (ALA), C20:5 (EPA), C22:6 (DHA)

## ภาคผนวก ค

### ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p\text{-value} < 0.05$ ) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นอักษรเดียวกันคือ ชุดข้อมูลที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p\text{-value} < 0.05$ )

#### Tukey Pairwise Comparisons: Fatty acid\*%Aeration

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence				
Fatty acid* %Aeration	N	Mean	Grouping	
T-MUFA 60	3	56.3318	A	
T-MUFA 20	3	56.1379	A	
T-MUFA 40	3	53.4486	B	
T-PUFA 50	3	53.3056	B	
T-PUFA 30	3	53.2536	B	
T-PUFA 40	3	28.6915	C	
T-PUFA 60	3	27.7114	C D	
T-PUFA 20	3	26.6160	D E	
T-SAT 50	3	25.0588	E F	
T-SAT 30	3	23.8285	F	
T-SAT 40	3	17.3405		G
T-w3PUFA 50	3	16.6099		G
T-SAT 20	3	16.4834		G
T-SAT 60	3	15.7472		G
T-w3PUFA 30	3	15.7468		G
T-MUFA 30	3	7.1711		H
T-MUFA 50	3	5.0256		I
T-w3PUFA 20	3	0.7626		J
T-w3PUFA 40	3	0.5195		J
T-w3PUFA 60	3	0.2096		J

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-1 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-~~W~~3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.4)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*	%volume	N	Mean	Grouping
T-PUFA 30	30	3	76.2612	A
T-SAT 30	30	3	48.5826	B
T-PUFA 50	50	3	39.6464	B C
T-w3 30	30	3	32.6925	C D
T-MUFA 20	20	3	27.6881	D E
T-SAT 50	50	3	27.0941	D E
T-PUFA 20	20	3	24.9570	D E F
T-PUFA 40	40	3	21.8300	E F G
T-MUFA 40	40	3	20.9791	E F G
T-w3 50	50	3	18.2980	E F G H
T-SAT 20	20	3	16.1306	F G H
T-SAT 40	40	3	13.5516	G H I
T-MUFA 30	30	3	11.2063	H I
T-MUFA 60	60	3	9.9997	H I J
T-PUFA 60	60	3	9.5164	H I J K
T-SAT 60	60	3	5.5208	I J K
T-MUFA 50	50	3	4.8339	I J K
T-w3 20	20	3	0.7804	J K
T-w3 40	40	3	0.4201	K
T-w3 60	60	3	0.0757	K

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-2 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของ การศึกษาปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีเปอร์เซ็นต์อาหารแตกต่างกันตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5)

## Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*salinity	N	Mean	Grouping
C18:2 cis 5.3	3	46.4666	A
C18:2 cis 10.1	3	46.4056	A
C18:2 cis 10.2	3	45.7412	A B
C18:2 cis 5.2	3	45.5405	A B
C18:2 cis 15.1	3	45.0174	A B C
C18:2 cis 15.3	3	44.8491	A B C
C18:2 cis 15.2	3	43.1532	B C
C18:2 cis 0.0	3	42.9581	B C
C18:2 cis 10.3	3	42.6890	B C
C18:2 cis 5.1	3	42.0472	C
TSAT 5.1	3	29.3007	D
TSAT 10.1	3	29.0734	D
TSAT 0.0	3	28.7365	D
TSAT 5.2	3	28.3331	D E
TSAT 15.1	3	28.0144	D E F
TSAT 5.3	3	27.8669	D E F G
TSAT 15.3	3	27.1616	D E F G
TSAT 10.2	3	26.7985	D E F G
TSAT 10.3	3	26.4158	D E F G
TSAT 15.2	3	25.1699	E F G H
W-3 15.2	3	24.9520	F G H
W-3 10.3	3	24.7030	G H
W-3 15.3	3	22.4786	H I
W-3 5.1	3	22.3163	H I
W-3 10.2	3	22.0543	H I
W-3 0.0	3	20.8171	I J
W-3 15.1	3	20.7827	I J
W-3 5.2	3	20.6275	I J
W-3 5.3	3	20.3276	I J
W-3 10.1	3	18.8520	J
TMUFA 0.0	3	7.4883	K
TMUFA 15.2	3	6.7249	K
TMUFA 5.1	3	6.3359	K
TMUFA 10.3	3	6.1922	K
TMUFA 15.1	3	6.1854	K
TMUFA 10.1	3	5.6689	K
TMUFA 10.2	3	5.6068	K
TMUFA 15.3	3	5.5107	K
TMUFA 5.3	3	5.3389	K
TMUFA 5.2	3	5.2982	K

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-3 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของ การศึกษาสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, T-PUFA) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ ทำการเพาะเลี้ยงโดยเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.6)



**Comparisons for %Aera**  
**Tukey Pairwise Comparisons: Fatty acid\*Concentration**  
**Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence**

Fatty acid*Concentration	N	Mean	Grouping							
TSAT 0	3	49.6932	A							
C18:2-cis 20	3	45.7626	A	B						
C18:2-cis 40	3	44.8094		B	C					
C18:2-cis 75	3	43.6059		B	C					
C18:2-cis 10	3	43.1879		B	C					
C18:2-cis 30	3	42.9735		B	C					
C18:2-cis 50	3	41.6115			C					
w-3 0	3	35.2561				D				
TSAT 50	3	28.5457					E			
TSAT 75	3	28.0850					E			
w-3 20	3	27.8291					E			
w-3 10	3	25.5595					E	F		
w-3 30	3	25.4361					E	F		
TSAT 10	3	25.2609					E	F		
TSAT 20	3	25.0929					E	F	G	
TSAT 40	3	24.9865					E	F	G	
TSAT 30	3	22.6866						F	G	H
w-3 40	3	21.1913						G	H	
w-3 50	3	20.7463							H	
w-3 75	3	19.5133							H	
TMUFA 0	3	14.4451								I
TMUFA 30	3	9.1451								J
TMUFA 50	3	9.0965								J
TMUFA 40	3	9.0127								J
TMUFA 75	3	8.7958								J
TMUFA 10	3	2.3216								K
TMUFA 20	3	1.3154								K
C18:2-cis 0	3	0.6056								K

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-5 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของ การศึกษาสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-Ω3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.11)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*Conc	N	Mean	Grouping
C18:2-cis 20	3	76.7118	A
C18:2-cis 10	3	63.8393	A B
TSAT 20	3	53.3739	A B C
w-3 20	3	47.6616	A B C D
C18:2-cis 40	3	44.5925	A B C D
w-3 10	3	44.2944	A B C D
TSAT 10	3	43.7716	A B C D
C18:2-cis 30	3	42.7785	B C D E
C18:2-cis 75	3	40.6774	B C D E F
C18:2-cis 50	3	35.8256	B C D E F G
TSAT 0	3	33.9576	B C D E F G
w-3 30	3	26.4413	C D E F G H
TSAT 75	3	25.9801	C D E F G H
TSAT 40	3	24.9808	C D E F G H
w-3 0	3	24.5938	C D E F G H
TSAT 50	3	24.2900	C D E F G H
TSAT 30	3	22.4703	C D E F G H
w-3 40	3	21.5005	C D E F G H
w-3 75	3	18.4975	D E F G H
w-3 50	3	17.7914	D E F G H
TMUFA 10	3	10.0776	E F G H
TMUFA 0	3	8.0219	F G H
TMUFA 40	3	7.6231	F G H
TMUFA 75	3	6.8992	G H
TMUFA 50	3	6.6243	G H
TMUFA 30	3	4.4454	G H
TMUFA 20	3	2.3943	G H
C18:2-cis 0	3	0.4060	H

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-6 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของ การศึกษาปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T-Ω3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.12)

#### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*Concentration	N	Mean	Grouping
DHA 50	3	0.964724	A
DHA 40	3	0.908797	A
DHA 75	3	0.816099	A
DHA 30	3	0.770908	A
DHA 10	3	0.745676	A
DHA 20	3	0.678011	A
EPA 10	3	0.142963	B
EPA 50	3	0.068541	B
EPA 20	3	0.016723	B
EPA 30	3	0.011399	B
EPA 75	3	0.000000	B
EPA 40	3	0.000000	B
DHA 0	3	-0.000000	B
EPA 0	3	-0.000000	B

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-7 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาสัดส่วนกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.13)

#### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*Conc	N	Mean	Grouping
DHA 20	3	1.44164	A
DHA 10	3	1.00872	A B
DHA 40	3	0.92318	A B
DHA 50	3	0.79937	A B C
DHA 75	3	0.76121	A B C
DHA 30	3	0.75230	B C
EPA 10	3	0.20808	C D
EPA 50	3	0.05771	D
EPA 40	3	0.03039	D
EPA 20	3	0.02284	D
EPA 30	3	0.01759	D
EPA 75	3	-0.00000	D
DHA 0	3	-0.00000	D
EPA 0	3	-0.00000	D

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-8 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาสัดส่วนกรดอีโคซะเพนตะอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือแคลเซียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.14)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentration*Fatty acid	N	Mean	Grouping																
0 TSAT	3	49.6932	A																
10 TSAT	3	49.2273	A																
20 TSAT	3	44.1236	A	B															
50 C18:2-cis	3	43.1522	A	B															
75 C18:2-cis	3	41.2531	A	B															
30 C18:2-cis	3	40.6107	A	B															
40 C18:2-cis	3	39.9951	A	B	C														
10 w-3	3	37.1394	A	B	C	D													
0 w-3	3	35.2561	A	B	C	D	E												
30 TSAT	3	30.1711		B	C	D	E	F											
20 w-3	3	29.4887		B	C	D	E	F	G										
50 TSAT	3	28.4535		B	C	D	E	F	G										
40 TSAT	3	28.0349		B	C	D	E	F	G										
75 TSAT	3	27.8790		B	C	D	E	F	G										
40 w-3	3	23.4477			C	D	E	F	G	H									
75 w-3	3	23.3593			C	D	E	F	G	H									
30 w-3	3	20.7121				D	E	F	G	H									
50 w-3	3	20.1240					E	F	G	H									
0 TMUFA	3	14.4451						F	G	H	I								
20 C18:2-cis	3	14.4075						F	G	H	I								
10 TMUFA	3	13.0383							G	H	I								
20 TMUFA	3	10.9083								H	I								
40 TMUFA	3	8.5223									H	I							
30 TMUFA	3	8.5060										H	I						
50 TMUFA	3	8.2703											H	I					
75 TMUFA	3	7.5086												H	I				
0 C18:2-cis	3	0.6056																	I
10 C18:2-cis	3	0.5951																	I

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-9 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของ การศึกษาสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.15)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*Conc	N	Mean	Grouping					
C18:2-cis 40	3	58.3893	A					
C18:2-cis 50	3	57.8594	A					
C18:2-cis 75	3	55.4069	A					
C18:2-cis 30	3	55.2329	A					
TSAT 10	3	42.4383	B					
TSAT 30	3	41.1257	B	C				
TSAT 40	3	41.0227	B	C				
TSAT 50	3	38.2281	B	C				
TSAT 75	3	37.5169	B	C	D			
TSAT 20	3	35.9242	B	C	D	E		
w-3 40	3	34.8954	B	C	D	E		
w-3 10	3	34.0337	B	C	D	E		
TSAT 0	3	33.9576	B	C	D	E		
w-3 75	3	32.0024		C	D	E	F	
w-3 30	3	28.7386			D	E	F	
w-3 50	3	27.5680				E	F	
w-3 0	3	24.5938					F	
w-3 20	3	24.3584					F	
TMUFA 10	3	13.0808					G	
TMUFA 40	3	10.5280					G	
TMUFA 30	3	9.6617					G	H
TMUFA 50	3	9.3165					G	H
TMUFA 75	3	8.4385					G	H
TMUFA 20	3	8.1620					G	H
TMUFA 0	3	8.0219					G	H
C18:2-cis 20	3	0.7923						H
C18:2-cis 10	3	0.6205						H
C18:2-cis 0	3	0.4060						H

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-10 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของ การศึกษาปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเติมความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10, 20, 30, 40, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.16)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*pH	N	Mean	Grouping
LA 8	3	51.1188	A
LA 9	3	50.5162	A
LA 10	3	49.7520	A
LA 6	3	45.6500	B
LA 7	3	43.9863	B
LA 5	3	43.2793	B
TSAT 7	3	29.3505	C
TSAT 5	3	25.8082	D
TSAT 10	3	24.7686	D E
TSAT 9	3	23.2352	D E F
Tw-3 6	3	23.1355	D E F
TSAT 6	3	22.9169	D E F
TSAT 8	3	22.1389	E F
Tw-3 5	3	21.4718	F G
Tw-3 7	3	18.5095	G H
Tw-3 8	3	17.1405	H
Tw-3 10	3	17.0520	H
Tw-3 9	3	13.6386	I
TMUFA 9	3	12.6099	I J
TMUFA 8	3	9.6017	J K
TMUFA 5	3	9.4407	K
TMUFA 10	3	8.4275	K
TMUFA 6	3	8.2976	K
TMUFA 7	3	8.1538	K

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-11 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ -3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่าง (external pH) เป็นระยะเวลา 7 วัน (รูปที่ 4.17)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*pH	N	Mean	Grouping					
C18:2 cis 10	3	52.3570	A					
C18:2 cis 8	3	47.6434	A					
C18:2 cis 6	3	29.2839		B				
T-SAT 10	3	26.0155		B	C			
C18:2 cis 7	3	25.5553		B	C			
C18:2 cis 5	3	24.1247		B	C	D		
C18:2 cis 9	3	22.1781		B	C	D		
T-SAT 8	3	20.7347		B	C	D	E	
T-SAT 7	3	17.4482		B	C	D	E	F
T-w-3 8	3	16.3577		B	C	D	E	F
T-w-3 10	3	15.0860		B	C	D	E	F
T-w-3 6	3	14.8731		B	C	D	E	F
T-SAT 5	3	14.6622		B	C	D	E	F
T-SAT 6	3	14.5899		B	C	D	E	F
T-w-3 5	3	12.3067			C	D	E	F
T-w-3 7	3	11.1070			C	D	E	F
T-SAT 9	3	10.2854				D	E	F
T-MUFA 10	3	6.6748					E	F
T-MUFA 8	3	6.5615					E	F
T-w-3 9	3	6.0641					E	F
T-MUFA 5	3	4.6920						F
T-MUFA 6	3	4.4336						F
T-MUFA 7	3	4.1110						F
T-MUFA 9	3	3.7385						F

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-12 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ -3) ของ *Chlorella* sp. KLS59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่าง (external pH) เป็นระยะเวลา 7 วัน (รูปที่ 4.18)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*condition	N	Mean	Grouping
LA 1	3	46.7536	A
LA 2	3	44.2228	B
TSAT 2	3	29.1533	C
TSAT 1	3	26.8451	D
Tw-3 2	3	19.7010	E
Tw-3 1	3	18.6029	E
TMUFA 1	3	7.7984	F
TMUFA 2	3	6.9229	F

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-13 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาสัดส่วนน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง (รูปที่ 4.19)

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Fatty acid*condition	N	Mean	Grouping
C18:2 cis 1	3	21.9350	A
C18:2 cis 2	3	19.3819	A
T-SAT 2	3	12.8570	B
T-SAT 1	3	12.6931	B
T-w-3 1	3	8.9611	B
T-w-3 2	3	8.8345	B
T-MUFA 1	3	3.0564	C
T-MUFA 2	3	2.6415	C

Means that do not share a letter are significantly different.

รูป ค-14 ผลจากการทดสอบสมมติฐาน โดยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ one way anova ของการศึกษาปริมาณน้ำมันทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid, T-SAT) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หนึ่งพันธะ (Total monounsaturated fatty acid, T-MUFA) กลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ (Total polyunsaturated fatty acid, C18:2 cis) และกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า-3 (Total omega-3 fatty acid, T- $\omega$ 3) ของ *Chlorella* sp. KLSc59 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง (รูปที่ 4.20)



7.30 LA	3	41.6 864					E	F	G											
6.30 LA	3	40.8 492						F	G											
6.30 TSAT	3	37.7 642							G	H										
7.30 TSAT	3	35.6 911								H										
7.10 TSAT	3	31.0 877									I									
7.11 TSAT	3	30.6 118									I	J								
7.13 TSAT	3	30.5 463									I	J								
6.10 TSAT	3	29.6 460									I	J								
7.90 TSAT	3	29.4 126									I	J								
6.13 TSAT	3	28.8 540									I	J								
6.15 TSAT	3	28.4 762									I	J	K							
7.70 TSAT	3	28.2 583									I	J	K							
7.50 TSAT	3	27.9 028									I	J	K							
7.15 TSAT	3	27.3 795									I	J	K	L						
6.11 TSAT	3	26.9 070										J	K	L						
6.90 TSAT	3	24.4 980											K	L	M					
6.70 TSAT	3	23.7 893												L	M	N				
6.50 Tw- 3	3	21.7 311													M	N	O			
6.50 TSAT	3	21.2 717													M	N	O			
6.90 Tw- 3	3	20.0 768														N	O	P		
6.70 Tw- 3	3	19.9 844														N	O	P	Q	





C18:2 cis 6.11	3	38.9 715		B	C	D															
C18:2 cis 6.90	3	37.9 622			C	D	E														
C18:2 cis 6.70	3	36.8 503			C	D	E	F													
T-SAT 6.15	3	36.7 705			C	D	E	F													
T-SAT 6.13	3	36.6 043			C	D	E	F	G												
C18:2 cis 6.10	3	33.2 418			C	D	E	F	G	H											
C18:2 cis 7.13	3	29.8 695			C	D	E	F	G	H	I										
T-SAT 6.30	3	29.3 562			C	D	E	F	G	H	I	J									
C18:2 cis 6.30	3	28.7 978			C	D	E	F	G	H	I	J	K								
T-SAT 7.15	3	27.7 157				D	E	F	G	H	I	J	K	L							
C18:2 cis 7.30	3	27.5 151				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M						
T-SAT 7.30	3	27.0 706				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M						
C18:2 cis 7.90	3	25.0 393					E	F	G	H	I	J	K	L	M	N					
C18:2 cis 7.11	3	24.1 764						F	G	H	I	J	K	L	M	N	O				
T-SAT 6.10	3	23.7 519							G	H	I	J	K	L	M	N	O	P			
C18:2 cis 7.70	3	23.2 001								H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q		
C18:2 cis 7.10	3	22.2 827								H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q		
T-SAT 7.13	3	21.8 669								H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q		
T-w-3 6.15	3	20.9 844								H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	
T-SAT 6.11	3	20.4 019								H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
T-w-3 6.13	3	20.3 728								H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S





## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณัฐนันท์ ปรีชาพลกุล
วัน เดือน ปีเกิด	24 กรกฎาคม 2542
ที่อยู่ปัจจุบัน	838/128 เดอะทรอป ถนนหลวงแพ่ง แขวงทับยาว เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10520
ประวัติการศึกษา	2563 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม เกรดเฉลี่ย 3.73 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2565) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 4.00 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนเรียนดี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม ทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย (RATA) ประจำปีการศึกษา 2564
ผลงานทางวิชาการ	1. Preechaphonkul N., Sirikwanpong S., Maneeruttanarungroja C. 2023. "Detection Evaluation of Omega-3 fatty Acid in Green Alga <i>Chlorella</i> sp. KLSc." In Proceeding of the 61 <sup>st</sup> Kasetsart University Annual Conference.