อิทธิพลของความเข้มแสงและการเติมอาหาร ระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ที่เลี้ยงในระบบ Fed-batch culture

Effect of light intensity and adding nutrient during growth of unicellular algae cultured in Fed-batch system

นาตารี มานหมัด

วิสสุตา พิศวง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF LIGHT INTENSITY AND ADDING NUTRIENT DURING GROWTH OF UNICELLULAR ALGAE CULTURED IN FED-BATCH SYSTEM

NATAREE MANMHUD
VISSUTA PISSAWONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	อิทธิพลของความเข้มแสงและการเติมอาหารระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวที่เลี้ยงในระบบ Fed-batch culture Effect of light intensity and adding nutrient during growth of unicellular algae cultured in fed-batch system
ชื่อนักศึกษา	นางสาว นาตารี มานหมัด รหัสนักศึกษา 62050610 นางสาว วิสสุตา พิศวง รหัสนักศึกษา 62050650
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ อิทธิพลของความเข้มแสงและการเติมอาหารระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวที่เลี้ยงในระบบ Fed-batch culture
ชื่อนักศึกษา นางสาว นาตารี มานหมัด รหัสนักศึกษา 62050610
นางสาว วิสสุตา พิศวง รหัสนักศึกษา 62050650
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 20 ลิตร ที่มีการเติมผงอาหาร MS ระหว่างการเพาะเลี้ยงปริมาณต่างกัน 3 แบบ (ไม่มีการเติมอาหาร, 0.59 กรัมต่อ 20 ลิตร และ 1.18 กรัมต่อ 20 ลิตร) ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าสาหร่ายในถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมผงอาหาร MS 0.59 กรัม มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุด คือ 9.6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ พบว่ามีปริมาณสารแคโรทีนอยด์มากที่สุด คือ 3,726.13 ไมโครกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงแตกต่างกัน 5 ระดับ (1,900 ลักซ์, 2,200 ลักซ์, 5,560 ลักซ์, 7,000 ลักซ์ และ13,000 ลักซ์) พบว่าสาหร่ายในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้มากที่สุด คือ 1.05×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารแคโรทีนอยด์มากที่สุดคือ 1,309.85 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อมีการเพิ่มความเข้มแสงเป็น 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายตาย เพราะฉะนั้นสภาวะความเข้มของแสงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวจึงอยู่ที่ 1,900 ลักซ์ นำผลที่ได้จากการศึกษาการเติมผงอาหาร MS ในระหว่างการเพาะเลี้ยง และผลของความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว มาทำการศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง 0.074 กรัมต่อ 2.5 ลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากถึง 1.96×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารแคโรทีนอยด์ 1,280.76 ไมโครกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียวที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน เปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน โดยนำสารสกัดจากเซลล์สาหร่ายมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีสารที่น่าสนใจอยู่ 6 ตัว ได้แก่ Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl), 2-Hexadecene, 3,7,11,15tetramethyl, Palmitic acid, Oleic acid, Hexadecanamide และ 9-Octadecenamide,(Z) ซึ่งPalmitic acid และ Oleic acid เป็นสารที่พบมากที่สุดเหมือนกัน

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ เครื่อง GC-MS แคโรทีนอยด์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สาหร่ายเซลล์เดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of light intensity and adding nutrient during growth of Unicellular algae cultured in fed-batch system
Students	Miss Nataree Manmud Student ID 62050610
	Miss Vissuta Pissawong Student ID 62050650
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Asst Prof. Dr. Pana Lohasupthawee

Abstract

This study investigated the growth and carotenoid content of unicellular algae in a 20-L cultivation tank using a 1/150 MS medium supplemented different amounts of MS medium during the cultivation process (0, 0.59g/20L and 1.18g/20L). The results showed that the cultivation tank with 1/150 MS adding 0.59g/20L at 11th of cultivation date exhibited the highest growth (9.6 x 10^{6} cells/ml) and it was found that the highest amount of carotenoids was 3,726.13 µg/L. Growth and carotenoid content of unicellular algae in a 2.5-L cultivation tank under different light intensities (1,900 lux, 2,200 lux, 5,560 lux, 7,000 lux and 13,000 lux) was also investigated. The results showed that the algae cultivated under 1,900 lux exhibited the highest cell growth (1.05 x 10^{7} cells/ml) and the highest carotenoid content at 1,309.85 µg/L. When cultured under light intensities of 7,000 lux and 13,000 lux, the algae died. Therefore, the optimal light intensity for cultivating unicellular algae was found to be 1,900 lux. The study's results provide insights into the effects of MS medium supplementation during cultivation and the impact of different light intensities used in the cultivation of unicellular algae. The study aimed to investigate the growth and carotenoid content of unicellular algae in a 2.5-L cultivation tank with MS medium supplementation during cultivation, under a light intensity of 1,900 lux. The results show a substantial growth in the number of cells, reaching 1.96 x 10^{7} cells/ml and a carotenoid content of 1,280.76 µg/L. Then, the study also analyzed the bioactive compounds of unicellular algae cultivated for 10 days compared to those cultivated for 20 days. The GC-MS analysis of the algae cell extracts revealed the presence of 6 interesting compounds:Benzene,1,3-bis(1,1-dimethylethyl), 2-Hexadecene,3,7,11,15-tetramethyl, Palmitic acid, Oleic acid, Hexadecanamide and 9-Octadecenamide (Z). Among these, Palmitic acid and Oleic acid were the most abundant compounds..

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keyword : Fed-Batch Culture, GC-MS, Carotenoid, Bioactive compounds, Unicellular algae

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาและการสนับสนุนอย่างสูงจาก ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่เสียสละเวลามาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสำหรับโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งให้คำแนะนำและการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่ช่วยให้โครงงานพิเศษนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณนักวิทยาศาสตร์ภาคชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือ ขอขอบพระคุณนายสมศักดิ์ จำปาทิว ที่คอยอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ และขอขอบพระคุณคุณป้าแม่บ้านประจำชั้น 4 ตึกจุฬาภรณ์ 1 และตึกพระจอมเกล้า รวมถึงคุณลุงรปภ. ประจำตึกจุฬาภรณ์ 1 ที่คอยอำนวยความสะดวกและแสดงความห่วงใยในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวที่คอยให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจและผู้ที่ศึกษาในเรื่องนี้ไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้

นาตารี มานหมัด
วิสสุตา พิศวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขตการศึกษา 1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2
2.1 สาหร่าย 2
2.1.1 สาหร่ายขนาดใหญ่ 2
2.1.2 สาหร่ายขนาดเล็ก 2
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย 3
2.2.1 ปัจจัยทางกายภาพ 3
2.2.2 ปัจจัยทางเคมี 4
2.3 ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 5
2.3.1 การเพาะเลี้ยงในระบบเปิด (open-system) 5
2.3.2 การเพาะเลี้ยงในระบบปิด (closed-system bioreactor plants) 5
2.4 การเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ 6
2.4.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) 6
2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Fed-batch culture) 6
2.4.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) 6
2.5 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย 6
2.5.1 Lag phase (ระยะพัก) 6
2.5.2 Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) 6
2.5.4 Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) 7
2.6 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่าย 7
2.6.1 การนับเซลล์ (Cell Counting) 7
2.6.2 การวิเคราะห์การกระจายของแสงหรือความขุ่น (Optical Density Measurement) 7
2.6.3 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll Determination) 7
2.7 สารแคโรทีนอยด์ 8
2.7.1 แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) 9
2.7.2 เบตาแคโรทีน (β-carotene) 9
2.7.3 ลูทีน (lutein) 9
2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 9
2.8.1 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ 10
2.8.2 รงควัตถุต่าง ๆ 10
2.8.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน 11
2.8.4 คาร์โบไฮเดรต 11
2.8.5 กรดอะมิโนและโปรตีน 11
2.8.6 วิตามิน 12
2.9 การใช้ประโยชน์จากสาหร่าย 12
2.9.1 อุตสาหกรรมยา 12
2.9.2 การเกษตร 12
2.9.3 อุตสาหกรรมอาหาร 12
2.9.4 การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ 12
2.9.5 ใช้เพื่อการดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 13
2.9.6 ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย 13
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13
2.10.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัด 13
2.10.2 มวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก สายพันธุ์ PY202 ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก 14
2.10.3 การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.4 การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายกลุ่ม Chlorophyta... 15
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานการวิจัย ... 17
3.1 สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง ... 17
3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ... 17
3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ ... 17
3.2.2 สารเคมี ... 18
3.3 สถานที่ทำการวิจัย ... 19
3.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย ... 19
3.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว ... 19
3.4.2 การศึกษาการเติมอาหาร MS ปริมาณต่างๆ ในระยะ Log phase ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ... 19
3.4.3 การศึกษาความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ... 20
3.4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ ... 22
3.4.5 การวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ ... 22
3.4.6 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียวที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน เปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน ... 23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล ... 25
4.1 การศึกษาการเติมอาหาร MS ปริมาณต่างๆ ในระยะ Log phase ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ... 25
4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ ... 25
4.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid ... 28
4.2 การศึกษาความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ... 37
4.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ ... 37
4.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid ... 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในถังเพาะเลี้ยง ขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 49
4.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ 49
4.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid 52
4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ GC-MS หาสารสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 61
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 64
5.1 สรุปผลการวิจัย 64
5.1.1 การศึกษาการเติมอาหาร MS ปริมาณต่างๆ ในระยะ Log phase ลงในถัง เพาะเลี้ยง ขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว 64
5.1.2 การศึกษาความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร 64
5.1.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 64
5.1.4 การตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธี GC-MS 65
5.2 ข้อเสนอแนะ 65
เอกสารอ้างอิง 66
ภาคผนวก 70
ภาคผนวก ก 71
ภาคผนวก ข 72
ภาคผนวก ค 73
ภาคผนวก ง 74
ภาคผนวก จ 75
ภาคผนวก ฉ 77
ภาคผนวก ช 78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สูตรที่ใช้ในการคำนวณคลอโรฟิลล์ และค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย acetone, ethanol และ diethyl ether 8
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 27
4.2 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 29
4.3 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 31
4.4 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 33
4.5 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 35
4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 39
4.7 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 41
4.8 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 43
4.9 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 45
4.10 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 47
4.11 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 51
4.12 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 53
4.13 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.14 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์..... 57
4.15 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์..... 59
4.16 สารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 10 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 62
4.17 สารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 20 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย 7
2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารแคโรทีนอยด์ที่พบมากในสาหร่าย 9
3.1 ลักษณะเซลล์ของ Monoraphidium contortum 17
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 26
4.2 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 30
4.3 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 32
4.4 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 34
4.5 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture 36
4. 6 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 38
4.7 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 42
4.8 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 44
4.9 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 46
4.10 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน 48
4.11 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 50
4.12 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 54
4.13 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.14 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์..... 58
4.15 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์..... 60
4.16 โครมาโทแกรมของสารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 10 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน..... 62
4.17 โครมาโทแกรมของสารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 20 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน..... 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

แคโรทีนอยด์ (carotenoid) คือกลุ่มของสารสี ซึ่งมีเฉดสีตั้งแต่สีเหลืองไปจนถึงสีแดง พบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายทั้งที่สังเคราะห์แสงและไม่สังเคราะห์แสง เช่น ส่วนต่างๆของพืช สัตว์ สาหร่าย รา และแบคทีเรีย ในปัจจุบันมีการค้นพบแคโรทีนอยด์แล้วมากกว่า 700 ชนิดในธรรมชาติ และเป็นที่ทราบกันอย่างกว้างขวางแล้วว่าสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะในด้านการต้านอนุมูลอิสระที่จะนำไปสู่การชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ร่างกาย และช่วยป้องกันโรคร้ายแรงหลายอย่าง เช่น โรคมะเร็ง อัลไซเมอร์ และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นต้น (ปิยาภัทร, 2560)

ปัจจุบันสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความนิยมนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารแคโรทีนอยด์ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก เนื่องจากสาหร่ายสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน สารประกอบฟีนอลิก รงควัตถุต่าง ๆ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliproteins, PBPs) และสารพวกวิตามินที่ล้วนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ (สุนทรต์ และคณะ, 2564) ปัจจัยที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ แสง ธาตุอาหาร คาร์บอนไดออกไซด์ ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และออกซิเจน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจำเป็นต้องศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตหรือ การเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย (นุชนาถ, 2557) จากแนวคิดและปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายต่อการผลิตสารแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว
2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแคโรทีนอยด์
3) เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1) ศึกษาผลการเติมอาหาร MS ปริมาณต่างๆ ในระยะ Log phase ลงในถังเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch Culture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว
2) ศึกษาผลของความเข้มแสงที่ต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว
3) เก็บเซลล์ของสาหร่ายจากการเพาะเลี้ยงที่สภาวะต่างๆ เพื่อนำไปหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มอัตราเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว
2) ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแคโรทีนอยด์
3) ทราบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวใดบ้างในสาหร่ายเซลล์เดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ รูปร่างลักษณะของสาหร่ายคล้ายกับพืช ในอาณาจักรพืชจัดสาหร่ายเป็นพืชชั้นต่ำพวก thallophytes คือมีระบบการสังเคราะห์แสงโดยใช้คลอโรฟิลล์เอ มีอาหารสะสมในรูปของแป้ง และผนังเซลล์ประกอบเซลลูโลส ลักษณะของสาหร่ายที่แตกต่างจากพืช คือ ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง โครงสร้างระบบสืบพันธุ์ของสาหร่ายไม่ซับซ้อน เซลล์ปกติของสาหร่ายสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สืบพันธุ์ได้ และไม่มีเซลล์เฉพาะที่จะพัฒนาเป็นระยะต่างๆ ของตัวอ่อนดังนั้นเซลล์ทุกเซลล์ของสาหร่ายจึงทำหน้าที่ได้เหมือนกัน

สาหร่ายอาศัยอยู่ทั่วไป สามารถพบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล นอกจากนั้น ยังอาจพบสาหร่ายได้ทุกๆ สิ่งแวดล้อม เช่น สาหร่ายเจริญบนหิมะ ภูเขาน้ำแข็ง พื้นดินแห้งแล้งในทะเลทราย น้ำพุร้อน ผนังบ้านเรือนที่ชื้น อาศัยอยู่รวมกับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น สาหร่ายอาศัยอยู่รวมกับราเรียกว่าไลเคน ไซยาโนแคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด เช่น *Anabaena* หรือ *Nostoc* อาศัยอยู่ในโพรงใบของแหนแดง สาหร่ายมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันมาก รูปร่างของสาหร่ายพบทั้งแบบเซลล์เดียว กลุ่มเซลล์ และฟิลาเมนต์ขนาดเล็กที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น จนถึงสาหร่ายที่มีรูปร่างเป็นทัลลัสขนาดใหญ่ยาวหลายเมตรพบอาศัยอยู่ในทะเล

สาหร่ายสามารถแบ่งตามขนาดออกเป็น 2 กลุ่มคือ สาหร่ายขนาดใหญ่ และสาหร่ายขนาดเล็ก (สุนทรต์ และคณะ, 2564)

2.1.1 สาหร่ายขนาดใหญ่

หรือเรียกอีกอย่างว่าสาหร่ายทะเล เป็นยูคาริโอตมีหลายเซลล์ มีหลากหลายรูปแบบและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถสร้างอาหารเองได้ โดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ในการสร้างอาหาร สาหร่ายขนาดใหญ่มีบทบาท สำคัญในระบบนิเวศชายฝั่ง โดยทำหน้าที่เป็นผู้ผลิตอาหารหลักในทะเล นอกจากนี้ยังผลิตออกซิเจนและเป็นที่พักพิงของสิ่งมีชีวิตในทะเลชายฝั่ง โดยสาหร่ายขนาดใหญ่ที่อาศัยอยู่ในทะเลมีความหลากหลายมากกว่า 10,000 ชนิด ซึ่งการกระจายตัวและลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น พื้นผิว อุณหภูมิ ความเข้มแสง กระแสน้ำแบบไดนามิก ความเค็ม pH สารอาหาร และระดับมลพิษ เป็นต้น ตัวอย่างของสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ เช่นสาหร่าย สีแดง (Red algae) *Actinotrichia fragilis* โดยสาหร่ายชนิดนี้มีแขนงเป็นรูปทรงกระบอกสีส้ม มีเส้นสายสีแดงสั้นๆ ขดเป็นวงรอบๆ อย่างต่อเนื่องตลอดความยาวแขนง แตกแขนงแบบคู่อย่างสม่ำเสมอ ส่วนปลายสุดโค้งมน สาหร่ายชนิดนี้เจริญเติบโตเป็นกลุ่มก้อนรูปทรงคล้ายครึ่งทรงกลมอยู่บนโขดหินในเขตน้ำลงต่ำสุดตามแนวชายฝั่งที่มีคลื่นปานกลางถึงรุนแรง

2.1.2 สาหร่ายขนาดเล็ก

หรือเรียกอีกอย่างว่าแพลงก์ตอนพืช ไม่มีรากหรือใบที่แท้จริง สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ส่วนมากอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่บางชนิดเซลล์อาจต่อกันเป็นสาย กลุ่มหรือโคโลนี ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กเหล่านี้สามารถเป็นได้ทั้งยูคาริโอต เช่น ไดอะตอม สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กและโปรคาริโอต เช่น กลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งส่วน ใหญ่อยู่ร่วมกับสาหร่ายขนาดใหญ่หรือพืชน้ำขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบเครื่องหมายลิขสิทธิ์ของเอกสารนี้ออกจากเอกสารทุกการใช้งานที่มีการนำไปใช้

ใหญ่ โดยสาหร่ายขนาดเล็กจัดอยู่ล่างสุดของห่วงโซ่อาหารทำหน้าที่ เป็นผู้ผลิตสำคัญในระบบนิเวศทางน้ำ จัดเป็นสิ่งมีชีวิตใน กลุ่มโฟโตโทรฟที่สามารถสร้างอาหารเองได้ ซึ่งสาหร่ายเหล่านี้ จะสามารถผลิตออกซิเจนที่จำเป็นสำหรับสัตว์และมนุษย์ได้มากถึงร้อยละ 75 ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แต่สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดก็จัดเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟ ที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้และต้องการอินทรีย์สารจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต สามารถพบสาหร่ายขนาดเล็กได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล สาหร่ายขนาดเล็กสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้ช่วงอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ที่กว้าง หรือในสภาวะที่มีความเค็มสูง ในปัจจุบันมีการค้นพบสาหร่ายขนาดเล็กแล้วกว่า 40,000 ชนิด จำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanophyceae), สาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว (Chlorophyceae), ไดอะตอม (Bacillariophyceae) สาหร่ายสีเขียวแกมเหลือง (Xanthophyceae) สาหร่ายสีทอง (Chrysophyceae) สาหร่ายสีแดง (Rhodophyceae) สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyceae) สาหร่ายไดโนแฟลกเจลเลต (Dinophyceae) และสาหร่ายในกลุ่มพิโคแพลงค์ตอน (Prasinophyceae และ Eustigmatophyceae) เป็นต้น

โครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก มีอาหารสะสมเป็นสารประกอบในรูปแบบต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรตซึ่งจะอยู่ในรูปของโพลีแซคคาร์ไรด์หรือแป้ง ไขมันหรือน้ำมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์ รวมทั้งมีสารสี หรือรงควัตถุ (Pigment) เป็นองค์ประกอบ กระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูงๆ จึง ต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของอาหารได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน คาร์บอน ไนโตรเจน กำมะถันและฟอสฟอรัส กับ จุลธาตุอื่น ๆ (Microalgae biotechnology, 2014) และระบบการเพาะเลี้ยงที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณชีวมวลสาหร่ายที่แตกต่างกัน

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตหรือ การเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงระดับใหญ่ขึ้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย(นุชนาถ, 2557) สาหร่ายแต่ละชนิดมีการเจริญที่แตกต่างกัน แม้แต่สายพันธุ์เดียวกันแต่สภาวะแวดล้อมต่างกัน ก็อาจส่งผลให้การเจริญเติบโตนั้นแตกต่างกันด้วย สามารถแบ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.2.1 ปัจจัยทางกายภาพ

2.2.1.1 แสง (Light)

ความเข้ม ความยาวคลื่น และความถี่ของแสง มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของ สาหร่ายขนาดเล็ก โดยความสามารถในการดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของสาหร่าย (680 nm หรือ 700 nm) จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ ของสาหร่ายแต่ละชนิด เช่น *Chlorella* จะมีความสามารถดูดซับแสงสีแดงและสีเหลือง ตามลำดับ (นุชนาถ, 2557)

2.2.1.2 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการเพิ่มหรือการลดการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ของสาหร่าย และการกระจายตัวของสาหร่าย อุณหภูมิจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มของแสง ถ้าปริมาณความเข้มของแสงมากจะมีผลทำให้อุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแหล่งน้ำเกิดจากการที่แสงผ่านไปในแหล่งน้ำ ต่อมาก็เปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานความร้อนทำให้แหล่งน้ำมีอุณหภูมิที่แตกต่างกันตามระดับความลึก (เปี่ยมศักดิ์, 2539) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงสาหร่ายจะอยู่ระหว่าง 20-24°C สาหร่ายส่วนใหญ่จะทนต่ออุณหภูมิ
ในช่วง 16-27°C ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 16°C สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตช้า และจะตายที่อุณหภูมิ 35°C ขึ้นไป (Lavens and Sorgeloos, 1996)

2.2.1.3 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 6.5-8.5 (นฤนาท และคณะ, 2558)

2.2.2 ปัจจัยทางเคมี

2.2.2.1 ไนโตรเจน

แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตร์ท และ ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สาหร่ายสามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโต หากปริมาณไนโตรเจนมีจำกัดจะทำให้สาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และคลอโรฟิลล์ได้ ซึ่งสารเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ และปริมาณไนโตรเจนภายในเซลล์สาหร่ายและมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย แม้ว่าปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่อย่างจำกัดจะมีผลให้สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโต แต่สาหร่ายยังคงสังเคราะห์แสงอยู่ตลอดเวลา สาหร่ายได้รับพลังงานจากคาร์บอนร่วมกับการสังเคราะห์แสง และเปลี่ยนจากการสังเคราะห์โปรตีนไปเป็นการสร้างไขมัน และคาร์โบไฮเดรตแทน (Li et al., 2008)

2.2.2.2 คาร์บอน

คาร์บอนที่พืชนำไปใช้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อนินทรีย์คาร์บอน สาหร่ายใช้คาร์บอนประเภทอนินทรีย์ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งละลายได้ในน้ำหรือในรูปของเกลือคาร์บอเนต และไบคาร์บอเนต การที่คาร์บอนจะอยู่ในรูปใดนั้นขึ้นอยู่กับระดับของพีเอช เช่น อยู่ในรูปของเกลือไบคาร์บอเนตเมื่อพีเอชมีค่าระหว่าง 7-9 อยู่ในรูปของเกลือคาร์บอเนตเมื่อพีเอชมีค่าสูงกว่า 9.5 ขึ้นไป คาร์บอนจะอยู่ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อน้ำมีสภาพเป็นกรดหรือพีเอชมีค่าประมาณ 5 สาหร่ายจะใช้คาร์บอนประเภทอินทรีย์ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งช่วยการเจริญเติบโต เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ (ซูโครส, กลูโคส, กาแลคโตส ฯลฯ) ความต้องการชนิดรวมทั้งปริมาณของสารประกอบคาร์บอนจะแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย โดยทั่วไปสาหร่ายต้องการอินทรีย์คาร์บอนในสภาพไร้อากาศ (Anaerobic condition) หรือในสถานที่ที่ไม่มีแสงสว่าง (ลัดดา, 2543)

2.2.2.3 ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่สาหร่ายทุกชนิดจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโต และมีความสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การสังเคราะห์ nucleic acids และการถ่ายเทพลังงานภายในเซลล์ ฟอสฟอรัสมีปริมาณจำกัดในแหล่งน้ำธรรมชาติ ฟอสฟอรัส ในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของ orthophosphate และรวมอยู่ในสารอินทรีย์อื่นๆ สาหร่ายสามารถใช้ ประโยชน์จากฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปที่แตกต่างกัน เช่น ฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอสเฟต และ ฟอสฟอรัสที่เป็นสารประกอบ ซึ่งฟอสฟอรัสจะถูก hydrolyzed โดย extracellular phosphatases นอกจากนี้สาหร่ายยังสามารถใช้ฟอสฟอรัสในรูปของอนินทรีย์ฟอสเฟต คือ $H_2PO_4^-$ หรือ HPO_4^{2-} ความเข้มข้นที่ดีที่สุดของฟอสฟอรัสในอาหารเมื่อพิจารณาจากการที่สาหร่ายสามารถทนได้และ เจริญเติบโตได้ คือที่ 50 µg/L-20 mg/L (Becker, 1994)

2.3 ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สาหร่ายต้องการน้ำ แสงแดด และคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตเหมือนพืชชนิดอื่นๆ สาหร่ายสามารถโตได้ดีในพื้นที่ที่มีอากาศร้อนและมีแสงแดดมาก ดังนั้นประเทศไทยจึงเหมาะต่อการเลี้ยงสาหร่าย การเลี้ยงสาหร่ายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ การเพาะเลี้ยงในระบบเปิด และระบบปิด (สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง, 2557)

2.3.1 การเพาะเลี้ยงในระบบเปิด (open-system)

เป็นวิธีการเลี้ยงสาหร่ายแบบธรรมชาติ เช่น เลี้ยงในบ่อน้ำ คลอง และชายทะเล เป็นต้น แต่การเลี้ยงสาหร่ายโดยวิธีนี้ยากต่อการดูแล ทั้งในเรื่องการปนเปื้อนของบ่อน้ำ เช่น แบคทีเรีย ที่มีผลกระทบต่อการเติบโตของสาหร่าย และการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.3.2 การเพาะเลี้ยงในระบบปิด (closed-system bioreactor plants)

เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการวิจัยและพัฒนามาก เพราะการเพาะเลี้ยงวิธีนี้สามารถควบคุม อุณหภูมิ และสิ่งปนเปื้อนได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถพัฒนาและออกแบบให้อยู่ในช่วงที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงระบบปิดสามารถตั้งใกล้กับโรงงานที่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย

นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสามารถแบ่งสภาวะการเพาะเลี้ยงออกเป็น 3 สภาวะ ได้แก่

2.3.2.1 แบบออโตโทรฟิค (Autotrophic cultivation)

เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ใช้แสงและ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากธรรมชาติเป็นหลัก ในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์สารชีวมวลต่างๆ หรือ คือการใช้อนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน

2.3.2.2 แบบเฮทเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic cultivation)

เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดย ใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น กลูโคส ซูโครส หรือกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ซึ่งจะเพาะเลี้ยงในที่ที่ไม่มีแสง หรือในที่มืดตลอดเวลา

2.3.2.3 แบบมิกโซโทรฟิค (Mixotrophic cultivation)

เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้ สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนและแสงเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยแสงที่ใช้อาจเป็นแสงจาก ธรรมชาติหรือจากหลอดไฟ ภายในระยะที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์

2.4.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)

เป็นรูปแบบการดำเนินการที่ง่ายที่สุด และมักใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์และผลิตภัณฑ์เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป การเพาะเลี้ยงแบบ batch เป็นระบบปิด ซึ่งสารอาหารทั้งหมดที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสร้างผลิตภัณฑ์ถูกนำใส่เข้าไปในถังเพาะเลี้ยงครั้งเดียวตั้งแต่เริ่มกระบวนการ (วรสิทธิ์, 2552)

2.4.2 การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (Fed-batch culture)

หลักการสำคัญคล้ายกับการเพาะเลี้ยงแบบ batch แต่ที่แตกต่างคือในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch จะมีการเติมสับสเทรดหรือสารอาหารลงไป อาจมีการนำน้ำหมักออกแล้วเติมเข้าไปใหม่ในปริมาตรที่เท่ากับที่เอาออกมา หรืออาจไม่มีการเอาน้ำหมักออกจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจะมีการเติมสารอาหารใหม่เข้าไปตลอดเวลา ทำให้ปริมาตรของน้ำหมักในถังเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (วรสิทธิ์, 2552)

2.4.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

เป็นวิธีการยืดระยะเอกโพเนนเชียลของการเพาะเลี้ยงแบบ batch ให้นานขึ้น โดยที่สภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ทั้งความเข้มข้นของสารอาหารและจำนวนเซลล์หรือความเข้มข้นของเซลล์ ซึ่งเรียกสภาวะนี้ว่า steady state สารอาหารใหม่จะถูกเติมเข้าไปในถังเพาะเลี้ยงพร้อมกันกับน้ำหมักในถังเพาะเลี้ยง และถูกถ่ายออกจากถังเพาะเลี้ยง ด้วยอัตราเดียวกัน ทำให้มั่นใจได้ว่าปัจจัยต่างๆ คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก (วรสิทธิ์, 2552)

2.5 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เมื่อนำเซลล์สาหร่าย (ธวัชชัย, 2547) จำนวนหนึ่งใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวแล้วจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะพบว่าเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายแบ่งได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ (แสดงในรูปที่2.1)

2.5.1 Lag phase (ระยะพัก)

เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่าย เริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ จะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม ที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อมีการสร้างโปรตีนและส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยและพร้อมที่จะแบ่งตัวระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5.2 Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ)

เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และขบวนการต่างๆตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกัน

2.5.3 Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์)

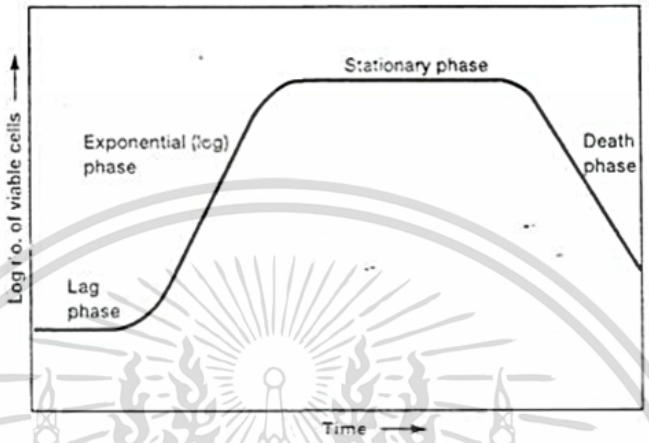
เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตระยะ Stationary นี้เพราะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง จึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย

2.5.4 Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย)

เป็นระยะสุดท้าย เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารอาจหมด มีสารพิษสะสมเป็นจำนานมาก



รูปที่ 2.1 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย (ธวัชชัย, 2547)

2.6 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ (ลัดดา, 2543)

2.6.1 การนับเซลล์ (Cell Counting)

เป็นการวิเคราะห์โดยตรง โดยการนับเซลล์สาหร่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ haemacytometer ซึ่งสามารถนับได้ทั้งเซลล์สาหร่ายที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต และสามารถศึกษารูปร่าง ของเซลล์สาหร่าย แต่ต้องเสียเวลาในการทำการเจือจางก่อนหากเซลล์สาหร่ายมีปริมาณมากเกินไป

2.6.2 การวิเคราะห์การกระจายของแสงหรือความขุ่น (Optical Density Measurement)

เป็นการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายด้วยค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง spectrophotometer พบว่า สาหร่ายสีเขียวมีความยาวคลื่นในช่วง 500-600 nm ซึ่งเป็นวิธี วิเคราะห์ที่สะดวกรวดเร็ว แต่ไม่สามารถบอกถึงการมีชีวิตหรือการไม่มีชีวิตของเซลล์ได้

2.6.3 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll Determination)

สาหร่ายประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์เอและบี การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ทำได้โดยการสกัดคลอโรฟิลล์จากสาหร่าย โดยการใช้อะซิโตน, เอทานอล หรือ ไดเอทิลอีเทอร์ เป็นตัวสกัด บางครั้งอาจมีการใช้ความร้อนมาช่วยในการสกัดให้ได้ผลดีขึ้น และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer สารที่ใช้ในการสกัดคลอโรฟิลล์จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน สูตรที่ใช้ในการคำนวณคลอโรฟิลล์ และค่าการดูดกลืนแสงของ ใช้อะซิโตน, เอทานอล และ ไดเอทิลอีเทอร์ แสดงดังในตารางที่ 2.1 (Becker, 1994) รายงาน ว่า การวิเคราะห์ค่าคลอโรฟิลล์เป็นวิธีที่ดีกว่าการ วิเคราะห์การเจริญเติบโตของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายด้วยน้ำหนักแห้ง เนื่องจากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของ สาหร่ายด้วยน้ำหนักแห้งอาจจะมีน้ำหนักแห้งของ bacteria และ zooplankton รวมอยู่ด้วย

ตารางที่ 2.1 สูตรที่ใช้ในการคำนวณคลอโรฟิลล์ และค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย acetone, ethanol และ diethyl ether

ตัวทำละลาย	คลอโรฟิลล์	สูตรคำนวณ (mg/L)
Acetone	Chlorophyll a	(12.7×A663) - (2.69×A645)
	Chlorophyll b	(22.9×A645) - (4.64×A663)
	Chlorophyll a+b	(8.02×A663) + (20.2×A645)
	Chlorophyll a	(16.5×A665) - (8.3×A650)
90% ethanol	Chlorophyll b	(33.8×A650) - (2.69×A665)
	Chlorophyll a+b	(4.0×A665) + (25.5×A650)
	Chlorophyll a	(9.92×A660) - (0.77×A642.5)
Dieathyl ether	Chlorophyll b	(17.6×A642.5) - (2.18×A660)
	Chlorophyll a+b	(7.12×A660) + (16.8×A642.5)

หมายเหตุ: A คือค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นที่กำหนด
ที่มา: Becker (1994)

2.7 สารแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้มหรือแดง พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น พืชชั้นสูง สาหร่าย สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งแคโรทีนอยด์ในพืชนั้นสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ เช่น ผล ดอก และราก แคโรทีนอยด์มีหลายชนิด แต่ที่รู้จักกันดีคือ เบตาแคโรทีน พบมากในผักที่มีสีส้ม เช่น แครอท มะเขือเทศ ฟักทอง หัวผักกาดแดง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในตับ เครื่องในสัตว์ กุ้ง และผักใบเขียว เช่น บรอคลี่ พริก ผักตำลึง ผักบุ้ง และในผักใบเขียวทั้งหมด (อุษาพร, 2558)

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุชนิดที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) คือไม่ชอบน้ำ โครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอน 40 โมเลกุล แคโรทีนอยด์ทำหน้าที่ดูดซับพลังงานจากแสงอาทิตย์เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและช่วยในการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงป้องกันอันตรายจากแสง (Photoprotective agents) (Markou and Nerantzis, 2013) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

- กลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ได้แก่ เบตาแคโรทีน (beta-carotene) และไลโคพีน (lycopene) เป็นต้น

- กลุ่มแซนโทฟิล (xanthophyll) มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่าแคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น (ประยูร และคณะ, 2557)

แคโรทีนอยด์ที่พบมากในสาหร่ายขนาดเล็กคือ แอสตาแซนธิน เบตาแคโรทีน และลูทีน โดยสาหร่ายสายพันธุ์ที่ได้มีการวิจัยและพบว่ามีแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้สะสมอยู่ในปริมาณมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ได้แก่ *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* และ *Chlorella vulgaris* (Rammuni et al., 2019)

2.7.1 แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) (ประยูร และคณะ, 2557)

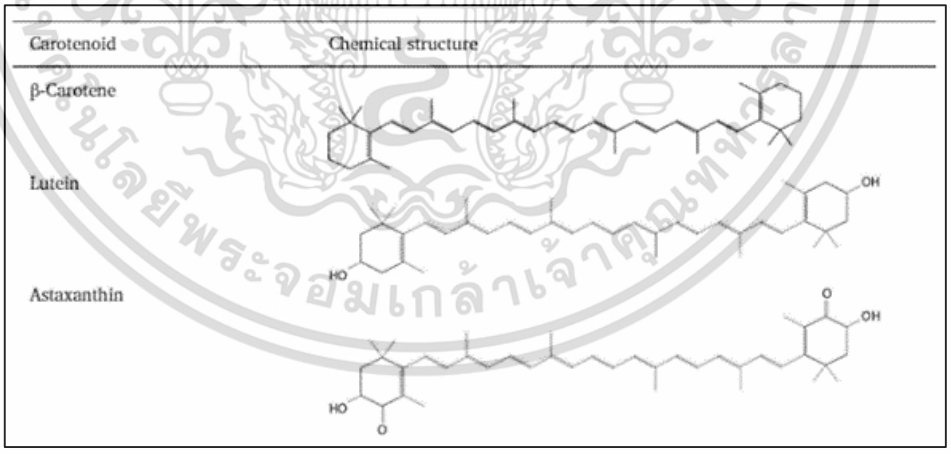
เป็นสารสีแดงในกลุ่มแซนโทรฟิลล์ ตระกูลแคโรทีนอยด์ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น เนื้อ ไข่ ปลาแซลมอน ปู เปลือกกุ้ง ไข่ปลาคาเวียร์ และสาหร่ายขนาดเล็ก เช่น สาหร่าย *Haematococcus* sp. มีโครงสร้างทางเคมีรูปแบบจำเพาะเหมือนกับสารแคโรทีนอยด์ โดยสามารถปรับตัวอยู่ในชั้นผนังเซลล์ได้ทั้งชั้นน้ำและชั้นไขมัน ร่างกายไม่สามารถสร้างสารแอสตาแซนธินได้ แต่จะได้รับสารชนิดนี้จากอาหารที่รับประทานเข้าไป (แสดงดังรูป 2.2)

2.7.2 เบตาแคโรทีน (β-carotene)

เบตาแคโรทีน หรือสารตั้งต้นของวิตามินเอ (โปรวิตาในเอ) พบมากในพืชที่มีสีเหลือง และสีส้ม เช่น หัวแครอท หัวผักกาดแดง มะเขือเทศ เป็นต้น นอกนั้นจะพบในผักสีเขียว เช่น ผักคะน้า ผักกาดเขียว เป็นต้น และปัจจุบันมีการพบว่าในสาหร่ายเกลียวทองมีเบตาคาโรทีนมากยิ่งกว่าพืชผักที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมด มีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL, สามารถลดอัตราการเกิด โรคมะเร็ง รักษาสุขภาพและ เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง (แสดงดังรูป 2.2)

2.7.3 ลูทีน (lutein)

เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ช่วยกรองรังสียูวีจากแสงแดด พบได้ในจุดรับภาพที่จอประสาทตาและเลนส์ตา นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติช่วยต้านอนุมูลอิสระ ชะลอการเกิดโรคต้อกระจกและโรคจอตาเสื่อมลูทีนและซีแซนทีน พบมากในไข่แดงและผักใบเขียว เช่น ผักคะน้า ปวยเล้ง บรอคโคลี (แสดงดังรูป 2.2) (ธนภัทร, 2564)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารแคโรทีนอยด์ที่พบมากในสาหร่าย (Rammuni et al., 2019)

2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สาหร่ายขนาดเล็กสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ได้หลากหลาย เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน สารประกอบฟีนอลิก รงควัตถุต่างๆ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliproteins, PBPs) และสารพวกวิตามินที่ล้วนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ รวมถึงใช้เป็นส่วนผสมในยา เครื่องสำอางและส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เป็นต้น (สุนทรต์ และคณะ, 2564)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.1 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มโมเลกุลขนาดเล็กที่ลักษณะ โครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก ที่ประกอบด้วยหมู่ ฟังก์ชั่นคือ หมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งตัว โดยหมู่ไฮดรอกซิลมีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไก metal chelating รวมทั้งความสามารถในการให้อิเล็กตรอน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวกลางที่มีเสถียรภาพทางเคมีมากกว่าอนุมูลเริ่มต้น ยิ่งไปกว่านั้นการ ทำงานร่วมกันของวงแหวนเบนซีนที่ไม่ชอบน้ำและหมู่ไฮดรอกซิลทำให้สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Reactive oxidative species (ROS) ได้ (Barkia et al., 2019)

สาหร่ายจะมีความคล้ายคลึงกันกับพืชทั้งทางด้านชีววิทยา และนิเวศวิทยา ซึ่งกระบวนการการตอบสนองต่อสารเคมีหรือสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปก็มีความคล้ายคลึงกันกับในพืช รวมไปถึงความสามารถในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมโดยสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เช่นเดียวกับในพืช แต่โครงสร้างและชนิดนั้น อาจแตกต่างกันไป (Freile-Pelegrin and Robledo, 2014) เช่น แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) และ ฟลาโวน (Flavones) ที่พบมากในพืชบกนั้น แทบไม่พบในเซลล์สาหร่าย(Stengel and Connan, 2015) ส่วนโฟลโรแทนนิน (Phlorotannins) พบเป็นองค์ประกอบของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลมากถึง 25% ของน้ำหนักแห้ง Bromophenols เป็น สารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในสาหร่ายแทบทุกชนิด (Choi et al., 2012) เช่นเดียวกับสารในกลุ่ม Phenolic terpenoids สารประกอบฟีนอลิกอีกกลุ่มที่พบมากในสาหร่ายคือ กรดอะมิโน ในกลุ่มคล้ายไมโคสปอรินสารในกลุ่มนี้ละลายได้ดี ในน้ำและพบในปริมาณที่สูงในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและ *Rhodophyta* รวมถึงในสาหร่ายขนาดเล็ก *Prasiola* spp. (Sinha et al., 2007)

ส่วนสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์หรือ Nonhydrolyzable tannins ที่พบมากในสาหร่ายได้แก่ Rutin, Caffeic acid, Catechol, Hesperidin, Quercitrin และMorin ส่วนสารที่มีฤทธิ์เป็น Anticarcinogenic flavonoids ที่พบมากในพืชเช่น Kaempherol, Apigenin, Luteolin และ Myricetin นั้นมีรายงานว่าพบในสาหร่ายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Stark et al., 2003)

2.8.2 รงควัตถุต่าง ๆ

รงควัตถุเป็นสารประกอบเคมีที่มีสีทำหน้าที่ดูดซับและสะท้อนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เฉพาะของแสงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Visible light) รวมถึงทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับพลังงานแสงในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก รงควัตถุที่พบมากในสาหร่ายขนาดเล็กแบ่งได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ คือ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน โดยคลอโรฟิลล์พบได้ในพืชชั้นสูงและสาหร่ายที่สามารถเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงทั้งหมด แคโรทีนอยด์จะพบได้ในสาหร่ายทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่แทบทุกชนิด และไฟโคบิลิน พบได้ในไซยาโนแบคทีเรีย และในสาหร่ายสีแดงบางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

ไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กมีสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ ลิพิดที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและเก็บสะสมไว้ ในเซลล์ (Storage lipids) และอีกกลุ่มคือไขมันที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในโครงสร้างของเซลล์ (Structural lipids) (Hamed, 2016) กรดไขมันที่สาหร่ายขนาด เล็กสะสมไว้ในเซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไป เป็นกรดไขมันที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ กรดไขมันที่จำเป็นต่อสุขภาพและพบมากในสาหร่ายขนาดเล็กคือกรดไขมันในกลุ่ม**ω**-3 และ **ω**-6Eicosapentaenoic (EPA), Docosahexaenoic (DHA) และกรด Arachidonic (AA) ซึ่งจากการวิจัย พบว่าสามารถนำกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เหล่านี้ไปใช้ในการรักษาอาการอักเสบเรื้อรังเช่นโรคไขข้อและโรคผิวหนังได้อย่าง มีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอลและป้องกันโรคหัวใจ (Levasseur, 2020)

2.8.4 คาร์โบไฮเดรต

ในสาหร่ายขนาดเล็ก คาร์โบไฮเดรตถูกสังเคราะห์ภายในเซลล์และเป็นผลิตผลหลักที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในสาหร่ายบางสายพันธุ์อาจมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรทสูงถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง น้ำตาลโมเลกุลใหญ่หรือพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในสาหร่ายขนาดเล็กแบ่งออกเป็นสามประเภทหลักๆ ตามบทบาททางสรีรวิทยา คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่เซลล์เก็บสะสมไว้เป็นพลังงานสำรอง (Energy reserve polysaccharides) พอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้าง (Structural polysaccharides) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารของเซลล์ (Cell communication) ส่วนใหญ่พอลิแซ็กคาไรด์ที่เซลล์เก็บสะสมไว้เป็นพลังงานสำรองของสาหร่ายขนาดเล็กที่จะอยู่ในรูปของแป้ง ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน (Complex carbohydrate) ที่ประกอบด้วยอะไมโลส และ อะไมโลเพคติน จำนวนโดยประมาณของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ในสายพอลิเมอร์และตำแหน่งที่เก็บสะสมในเซลล์นั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่าย เช่น ในพวกสาหร่ายสีแดง อาหารสะสมมีชื่อเรียกเฉพาะว่าแป้งฟลอริดีน (Floridean starch) ถูกเก็บอยู่ในไซโทพลาสซึมนอกคลอโรพลาสต์ ส่วนในสาหร่ายสีเขียวแป้งจะถูกเก็บสะสมไว้ในคลอโรพลาสต์ (Levasseur, 2020), (Bernaerts et al., 2019)

2.8.5 กรดอะมิโนและโปรตีน

ในสาหร่ายขนาดเล็กนั้นสามารถพบปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบได้ตั้งแต่ร้อยละ 6 ถึงร้อยละ 70 ขึ้นอยู่กับ ชนิดของสาหร่าย กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดคือ แอสพาร์เตท (Aspartate) และกลูตาเมท (Glutamate) (Levasseur, 2020), (Conde et al., 2013) โปรตีนจากสาหร่ายขนาดเล็กส่วนใหญ่จะนำไปประยุกต์ใช้กับโภชนเภสัช หรือใช้เป็นส่วนผสมในอาหารฟังก์ชั่นและอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชสำอาง และยังเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญในกลุ่มเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร เช่นโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris* และ *Tetraselmis* sp. มีคุณสมบัติในการเปนอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying property) ที่ดี สาหร่าย *Arthrospira platensis* และ *Tetraselmis suecica* มีสมบัติเป็นสารเพิ่มความหนาและก่อให้เกิดเจล(Bernaerts et al., 2019) ส่วนโปรตีนจากสาหร่าย *Arthrospira* sp. มีฤทธิ์ในการต้านริ้วรอยและลดรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า (Levasseur, 2020), (Stolz and Obermayer, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.6 วิตามิน

วิตามินยังมีบทบาทสำคัญในกลไกการต้านอนุมูลอิสระใน ร่างกาย เนื่องจากวิตามินส่วนใหญ่ไม่สามารถสังเคราะห์ ภายในร่างกายของมนุษย์ได้ จึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร และสาหร่ายทะเลขนาดเล็กสามารถสังเคราะห์และสะสมวิตามินได้ แทบทุกชนิดรวมทั้ง โปรวิตามินเอ วิตามินบางชนิดในกลุ่ม วิตามินบี (บี 1, บี2, บี3, บี5, บี6, บี8, บี9 และบี12) วิตามินซี และวิตามินอี (Galasso et al., 2019) โดยความสามารถในการผลิตวิตามิน ในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กนั้นจะขึ้นอยู่กับทั้งสายพันธุ์ของสาหร่ายรวมถึงสภาวะในการเจริญเติบโตหรือเพาะเลี้ยงในปัจจุบัน

2.9 การใช้ประโยชน์จากสาหร่าย

2.9.1 อุตสาหกรรมยา

โดยจากการ ศึกษาของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกม น้ำเงิน *Scytonema* No.11 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้

2.9.2 การเกษตร

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ประสบผลสำเร็จในการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพจากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวหลายสายพันธุ์ เช่น *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Calothrir* sp., *Cylindrospermum* sp. และ *Scytonema* sp. เป็นต้น ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศและผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่างๆ มาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพที่ใช้สำหรับนาข้าว (สุริยา, 2541)

2.9.3 อุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนาการผลิตสารสีธรรมชาติจากสาหร่าย โดยเริ่มศึกษาสารสีฟ้าเรียกว่า ไฟโคไซยานิน จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ไฟโคไซยานินเป็นเม็ดสีที่พบเฉพาะในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ทำหน้าที่ดูดกลืนแสงแล้วถ่ายทอดพลังงานไปยังเม็ดสีคลอโรฟิลล์ เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ไฟโคไซยานินเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเตตราไพโรลล์ ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอซิดหลายชนิด จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ วท. พบสายพันธุ์สาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและสามารถสร้างไฟโคไซยานินได้ในปริมาณสูง 2 สายพันธุ์ คือ *Anabaena siamensis* และ *Nostoc calcicola* (สุริยา, 2541)

2.9.4 การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ

น้ำมันดิบที่สกัดได้จากสาหร่าย สามารถนำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพได้เช่นเดียวกับน้ำมันปาล์ม หรือน้ำมันจากพืชชนิดอื่นๆ โดยหลังจากผ่านกระบวนการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย น้ำมันดิบที่ได้มาเมื่อนำไปผ่านกระบวนการทางเคมี สามารถผลิตได้เป็นน้ำมันไบโอดีเซล น้ำมันดีเซลชีวภาพสังเคราะห์ (BHD) หรือน้ำมันเครื่องบินชีวภาพ (Bio-jet) ได้ ส่วนกากสาหร่ายซึ่งเป็นผลพลอยได้จากขั้นตอนการสกัดน้ำมันก็สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์ต่างๆ อาทิ อาหารสัตว์ ปุ๋ย ยา เป็นต้น (สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง, 2557) โดยจากผลการวิจัย พบว่า มีสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่มี ศักยภาพในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพ ได้แก่ *Scenedesmus* sp. AARLG022, *Monoraphidium* sp. AARLG044 และ *Carteria* sp. AARLG045 (ยุวดี และคณะ. 2553)

2.9.5 ใช้เพื่อการดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Hsueh et al., 2007)

สาหร่ายขนาดเล็กสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งจากการศึกษาพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 1-15 เมื่อ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น (Lam et al.,2012)

2.9.6 ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

จากการวิจัยของ กรองจันทร์ (2536) ทดลองเลี้ยง *Chlorella* ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล พบว่าสามารถลดค่าซีโอดี ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาฯแอมโมเนีย ปริมาณไนเตรท และปริมาณฟอสเฟสลดลง ร้อยละ 60-90 จากการวิจัยของ หยกแก้ว และคณะ (2525) ทดลองเลี้ยง *Chlorella* ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลือง ในเวลา 2 วัน พบว่าสามารถลดค่าบีโอดีได้ร้อยละ 96 และจากการวิจัยของ Boongorsrang et al. (1986) ทดลองเลี้ยง *Spirulina* (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) และ *Uronema*, *Ulothrix* และ *Chlorella* (สาหร่ายสีเขียว) ในน้ำทิ้งจากบ้านเรือน พบว่า สาหร่ายสีเขียวมีศักยภาพในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสดีกว่า *Spirulina*

การใช้สาหร่ายบำบัดน้ำเสียมีข้อจำกัดคือ น้ำเสียจะต้องมีของแข็งปนอยู่น้อย (ไม่เกิน 10 %) และมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ต่ำ จึงเหมาะสำหรับใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมขั้นสุดท้ายก่อนปล่อยทิ้งลงแหล่งน้ำสาธารณะ

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.10.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัด

จากการวิจัยของ ดวงกมล (2560) พบว่า *Scenedesmus armatus* เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีความสำคัญในฐานะผู้ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและไบโอดีเซล งานวิจัยนี้มีเพื่อศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus armatus* อันได้แก่ ศึกษาเรื่องสูตรอาหาร ศึกษาประเภทของหัวพ่นอากาศรูปแบบต่างๆ ศึกษาความเข้มแสง โดยเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการทดลองในระบบขนาด 800 mL และจากนั้นจะทำการขยายขนาดในระบบ 5,000 mL โดยใช้ปริมาตร อาหาร 400 mLและอาหาร 4,000 mL ตามลำดับ จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดสารต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมใน ระบบอาหาร400 mL ความเข้มแสง 3,400 lux อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ศึกษาได้แก่ BG11 N-8 และ BBM พบว่า BG11 สามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ความเข้มข้นเซลล์มากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ และอาหาร ชนิดนี้จะนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป ผลของความเข้มแสง ระหว่าง2,700 และ3,400 lux พบว่า 3,400 lux เหมาะสมกับการเลี้ยงสาหร่าย เปรียบเทียบหัวพ่นอากาศที่แตกต่างกัน 5 แบบ ได้แก่ หัวพ่นอากาศที่พิจารณาได้แก่ ท่อยางซิลิโคนตรง ท่อยางซิลิโคนดัด วงกลมเจาะรูซิลิโคน 3 ทางเจาะรูหัวทรายทรงกลม และหัวทราย ทรงกระบอก โดยนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงแบบเขย่า ผลการ เจริญเติบโตของสาหร่ายพิจารณาจากปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ ปริมาณเซลล์มีชีวิตวัดที่ความยาวคลื่น 560 nm และ น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าหัวทราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรงกลมสามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ปริมาณมาก ที่สุดคือ 6×10^6 cell/mLและ 3.34 $g_{driedweight}$/l นอกจากนี้ได้ศึกษาในระบบขยายขนาด5,000 mL พบว่าหัวพ่นอากาศแบบซิลิโคน 3 ทางเจาะรูให้ความเข้มข้นของเซลล์มากที่สุด คือปริมาณ 8.7×10^6 cell/mLและ 5 g/l ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ และบี เบตาแคโรทีน และ ไลโคปีน เป็น 28.6111.028.24และ 7.08 mg/100 mLตามลำดับ สารสกัดที่ได้สามารถเจือจางสีของสารละลาย DPPH ได้และได้ค่าประสิทธิภาพในต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละ85.33 ใกล้เคียงกับเมื่อเทียบกับวิตามินซีที่ความเข้มข้น 1 g/100 mL ที่มีค่าเป็นร้อยละ 135.33

2.10.2 มวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก สายพันธุ์ PY202 ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก

จากการวิจัยของ ณิมนาราห์ และคณะ (2560) พบว่า แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แคโรทีนอยด์กลุ่มคีโตแคโรทีนอยด์ ดังนั้นจึงมีการนำสารกลุ่มนี้ไปใช้ทั้งในด้านโภชนาการ เภสัชศาสตร์ และอุตสาหกรรมความงาม นับได้ว่าเป็นสารสีที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หากแต่พบได้ในสิ่งมีชีวิตเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก PY202 ซึ่งคัดแยกจากดินโป่งยุบ อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ซึ่งมีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมคีโตแคโรทีนอยด์ มีแคนธาแซนธินเป็นรงควัตถุเด่น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ในสาหร่าย PY202 นี้ มีความคล้ายคลึงกับสาหร่าย *Hylodesmus singaporensis* (95%) การศึกษารูปแบบการเจริญพบว่าสาหร่าย PY202 สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิก และ เฮเทอโรโทรฟิก โดยภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิกซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นช่วยส่งเสริมให้สาหร่าย PY202 มีการผลิตมวลชีวภาพเพิ่มมากขึ้นจากชุดควบคุมถึงประมาณ 4 เท่า ($p<0.05$) อีกทั้งการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายนี้มีการสะสมแคนธาแซนธินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 1,341.31 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมประมาณ 12 เท่า ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจและศักยภาพของวิถีสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่าสูงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิกของสาหร่าย PY202

2.10.3 การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย

จากงานวิจัยของ ปฏิพัทธ์ (2564) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ *Dunaliella* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีความสำคัญสำหรับการผลิตสารรงควัตถุ เบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสารกลุ่มนี้ถูกนำไปใช้ทั้งในอุตสาหกรรมที่หลากหลายเช่น ด้านโภชนาการ เภสัชศาสตร์ เครื่องสำอาง และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นต้น งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อจัดจำแนกและระบุชนิดสาหร่ายด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา (พื้นที่ยีน 18S rDNA และพื้นที่ยีน ITS) รวมถึงศึกษาปัจจัยการเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุองค์ประกอบไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลของสาหร่าย *D. salina* NUAC09 ผลการทดลองพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย เช่น ขนาด สีออแกเนลล์และรูปร่างของเซลล์ มีความใกล้เคียงกับลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงมากกว่าร้อยละ 99 ของพื้นที่ยีน 18S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

rDNA และร้อยละ 95 ของพื้นที่ยีน ITS สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์การวิวัฒนาการของพื้นที่ยีน ITS ที่แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *D. salina* NUAC09 อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *D. salina* (ML = 93 % และ NJ = 85 %) ดังนั้น จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางอณูชีวิทยาจึงจำแนกสาหร่าย NUAC09 เป็น *D. salina* ในการศึกษาปัจจัยการเลี้ยงที่เหมาะสมในสูตรอาหารดัดแปลง Johnson ได้แก่ ไนโตรเจน (0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 กรัมของ KNO3ต่อลิตร) ฟอสฟอรัส (0.000, 0.043, 0.053, 0.070 กรัมของ KH2PO4ต่อลิตร) ความเค็ม (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 โมลาร์ของ NaCl) และไบคาร์บอเนต (0.00, 0.022, 0.043, 0.065, 0.086 กรัมของ NaHCO3ต่อลิตร) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่ายด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดท่อแบบให้แสง (photobioreactor) ระยะเวลาเลี้ยง 14 วัน และตรวจวัดการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล และปริมาณรงควัตถุ ทุก ๆ 2 วัน นอกจากนี้ตรวจวัดองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนในสาหร่ายด้วยเทคนิค HPLC ผลของปัจจัยการเลี้ยงพบว่าเมื่อความเข้มข้น ของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ความเค็ม และไบคาร์บอเนตเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้จำนวนเซลล์ค่าคลอโรฟิลล์ เอ และผลผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ขณะที่แคโรทีนอยด์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) เมื่อปัจจัยธาตุอาหารลดลง อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีความเหมาะสมต่อจำนวนเซลล์ (3.49 - 6.09 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร) การเจริญเติบโตจำเพาะ (0.57 - 0.82 μ ต่อวัน) และปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (6.46 - 18.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระดับไนโตรเจน 2.00 กรัมของ KNO3 ต่อลิตร ฟอสฟอรัส 0.070 กรัมของ KH2PO4ต่อลิตร ความเค็ม 2.5 โมลาร์ของ NaCl และไบคาร์บอเนต 0.043 กรัมของ NaHCO3ต่อลิตร ส่วนองค์ประกอบและปริมาณไอโซเมอร์ของเบต้าแคโรทีนพบไอโซเมอร์ที่เด่นชัดที่สุด คือ *all–trans* และ *9–cis β–carotene* และมีปริมาณ *9–cis* (27 - 329 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งต่อกรัม) และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (71 - 76%inhibition) สูงสุดในชุดการทดลองที่ขาดธาตุอาหาร ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าปัจจัยธาตุอาหารส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโต ปริมาณรงควัตถุ ปริมาณไอโซเมอร์เบต้าแคโรทีน และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของ สาหร่าย *D. salina* NUAC09 โดยสามารถนำไปประยุกต์กับการเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ในระดับเชิงพาณิชย์แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายยังมีความจำเป็นซึ่งจะ ช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตซิสเบต้าแคโรทีนให้สูงขึ้นได้

2.10.4 การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายกลุ่ม Chlorophyta

จากงานวิจัยของ ประยูร และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จาก สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้ตาข่ายแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 20 ไมโครเมตร แล้วนำมาคัดแยกสาหร่ายโดยใช้ไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้ได้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 เป็นสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำในพื้นที่ป่าชายเลน สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ จ. สมุทรสงคราม ซึ่งผลจากการทำ Sequencing พบว่าเป็นสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella* sp.,และ พบว่ามีโคโลนีเป็นสีส้มแดงในระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง จึงเลือกสายพันธุ์นี้มาเพาะเลี้ยงโดยใช้สูตรอาหารมาตรฐาน 3 สูตร คือ BBM BG-11 และ Modified Chu-13 และเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยงโดยใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์และแสงแดดโดยให้อากาศอย่างต่อเนื่อง ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลอง พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์คือการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Modified Chu-13 ที่ใช้แสงแดด โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากับ 9.00 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็น เวลา 15 วัน ได้ผลผลิตชีวมวลเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยวิธีการตกตะกอนแล้วนำชีวมวลมาศึกษาการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเซลล์สาหร่ายโดยใช้ไมโครเวฟร่วมด้วย พบว่าสภาวะในการสกัดที่เหมาะสมคือใช้กำลังไฟฟ้า 50 วัตต์และใช้เวลาสกัด 5 นาที ที่สามารถสกัดแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 2.72 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง เมื่อนำไปศึกษาชนิดของแคโรทีนอยด์พบว่า มีเบต้าแคโรทีนเป็นแคโรทีนอยด์หลักในปริมาณ 1.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 10.62 มิลลิกรัมเทียบเท่า Trolox ต่อ 100 กรัมชีวมวลสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A จากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog (MS) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อส่องดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า จะเห็นเซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงตรง หรือรูปทรงโค้งปลายแคบ จึงคาดว่าเป็น *Monoraphidium contortum* ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์เดียว รูปทรงตรงหรือทรงโค้งมุมที่ด้านปลายแคบลง ระหว่างปลายทั้งสองข้างยาวประมาณ 16-18 ไมครอน กว้าง 1-2 ไมครอน (แสดงในรูปที่ 3.1) สามารถพบได้ที่แหล่งน้ำจืด จะล่องลอยอย่างอิสระในน้ำหรือยึดติดกับผิวดิน (Bellinger and Sigee, 2010)

รูปที่ 3.1 ลักษณะเซลล์ของ *Monoraphidium contortum*

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถังเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบให้อากาศขนาด 20 ลิตร จำนวน 1 ถัง
2. ถังเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบให้อากาศ 2.5 ลิตร จำนวน 3 ถัง
3. สายยางออกซิเจน (Oxygen hose)
4. หัวทรายละเอียด (Fine sand)
5. ชั้นวางสาหร่าย
6. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์
7. หลอดไฟ LED 12 วัตต์ และ 25 วัตต์
8. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
9. ชุดนับจำนวนเซลล์ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
10. กระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
11. ชุดกรองสุญญากาศ (Filtration Assembly)
12. เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum Pump)
13. เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
16. ชุดสกัดซอกห์เลต (Soxhlet extractor)
17. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
18. เครื่อง Rotary Evaporator
19. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
20. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorption spectrophotometer)
21. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge)
22. กระบอกตวง (Graduated Cylinder)
23. ขวดลดความดัน (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
24. ถ้วยพลาสติก (Plastic cup)
25. บีกเกอร์ (Beaker)
26. เหยือกตวงขนาด 3 ลิตร
27. หลอดหยดสาร (Dropper)
28. กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)
29. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10-100 µl , 20-200 µl และ 2-10 ml
30. ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula Stainless)
31. คิวเวทท์ (Cuvette)
32. ขวดแก้ว (Glass bottle)
33. โกร่งบดยา
34. หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge)
35. กรวยกรอง (Funel)
36. หลอดทดลอง (Test Tube)
37. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
38. ปากคีบ (Forcep)
39. ขวดเก็บสารฝาเกลียว
40. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
41. แม่พิมพ์ซิลิโคน

3.2.2 สารเคมี

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog (MS) Basal Medium with Vitamins (M519)
2. อะซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์ (100% C_3H_6O)
3. อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ (80% C_3H_6O)
4. น้ำกลั่น
5. กรดไฮโดรคลอริก (HCL)
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
7. เฮกเซน (C_3H_{14})

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ชั้น 4 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว

ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog (MS) Basal Medium with Vitamins (M519) ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัม/ลิตร เตรียมความเข้มข้นของอาหาร MS คือ 1/150 โดยชั่งอาหาร 0.0295 กรัม/ลิตร ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของกิตติวัฒน์ และพีรดนย์, (2563) ทำการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์ จึงนำอาหารสูตร 1/150 MS มาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว

3.4.1.1 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร

ใช้อาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เตรียมโดยชั่งอาหาร MS 0.074 กรัม เติมในน้ำปริมาตร 2.5 ลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับค่า pH ให้อยู่ในระดับ 6.00 – 7.00 โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ข)

3.4.1.2 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/150 MS ปริมาตร 20 ลิตร

ใช้อาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 20 ลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เตรียมโดยชั่งอาหาร MS 0.59 กรัม เติมในน้ำปริมาตร 20 ลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับค่า pH ให้อยู่ในระดับ 6.00 – 7.00 โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ก)

3.4.2 การศึกษาการเติมอาหาร MS ปริมาณต่างๆ ในระยะ Log phase ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว

ศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหาร MS ปริมาตร 20 ลิตร ที่มีการเติมผงอาหาร MS ระหว่างการเพาะเลี้ยงปริมาณต่างกัน ได้แก่ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่ไม่มีการเติมอาหารระหว่างเพาะเลี้ยง (ชุดควบคุม), ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่เติมอาหาร MS 0.59 กรัมระหว่างการเพาะเลี้ยง และถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่เติมอาหาร MS 1.18 กรัมระหว่างการเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก)

3.4.2.1 ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม)

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.2 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 20 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ที่ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.2 ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร MS 0.59 กรัม

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.2 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 20 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ที่ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน จนถึงวันที่ 11 ของการทดลอง เติมอาหาร MS 0.59 กรัม ลงในถังเพาะเลี้ยง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อไปจนครบระยะเวลา 20 วัน

3.4.2.3 ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร MS 1.18 กรัม

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.2 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 20 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ที่ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน จนถึงวันที่ 11 ของการทดลอง เติมอาหาร MS 0.59 กรัม ลงในถังเพาะเลี้ยง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อไปจนครบระยะเวลา 20 วัน

3.4.3 การศึกษาความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร

ศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ทำการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มของแสงแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 1,900 ลักซ์, 2,200 ลักซ์, 5,560 ลักซ์, 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ภาคผนวก ข)

3.4.3.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.1 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 2.5 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ที่ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 20 วัน

3.4.3.2 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.1 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 2.5 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 5-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวและหลอดไฟ LED ที่ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 20 วัน

3.4.3.3 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.1 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 2.5 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวและหลอดไฟ LED ที่ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 20 วัน

3.4.3.4 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.1 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 2.5 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวและหลอดไฟ LED ที่ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 20 วัน

3.4.3.5 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.1 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 2.5 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวและหลอดไฟ LED ที่ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

ศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว 1/150 MS ที่มีการเติมผงอาหาร MS 0.074 กรัม ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร แบบ Fed-batch Culture ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (ภาคผนวก ค)

3.4.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังขนาด 2.5 ลิตร ที่เติมอาหาร MS 0.074 กรัม ระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

เตรียมอาหารดังหัวข้อ 3.4.1.1 ใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 2.5 ลิตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียว Isolate A มาใส่ในถังเพาะเลี้ยงปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำถังเพาะเลี้ยงวางบนชั้นเลี้ยงสาหร่าย ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ที่ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน จนถึงวันที่ 11 ของการทดลอง เติมผงอาหาร MS 0.074 กรัม ลงในถังเพาะเลี้ยง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อไป จนครบระยะเวลา 20 วัน

3.4.5 การวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์

เก็บตัวอย่างสาหร่ายใส่บีกเกอร์ประมาณ 10 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว

3.4.5.1 การนับจำนวนเซลล์

นำตัวอย่างสาหร่ายมาทำการนับจำนวนเซลล์ทุกๆ วัน โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) คำนวณเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิเมตร (ภาคผนวก ง) บันทึกผลการทดลองและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับเวลาที่เพาะเลี้ยง

3.4.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid

นำตัวอย่างสาหร่าย 2 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่มีอะซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีการเขย่าโดยใช้ความร้อนช่วยในการสกัด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปกรองสุญญากาศเพื่อแยกส่วนเซลล์สาหร่ายออก แล้วนำส่วนใสมาปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร โดยใช้อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{470}, A_{645} และ A_{663} โดยใช้สารละลายอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบลงค์ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid โดยใช้สูตรการคำนวณของ (Kundu et al., 2016) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{Chlorophyll a (mg/L)} = \frac{[12.7\,(A_{663}) - 2.69\,(A_{645})]}{(1000 \times V_2)} \times V_1$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/L)} = \frac{[22.9\,(A_{645}) - 4.68\,(A_{663})]}{(1000 \times V_2)} \times V_1$$

$$\text{Total Chlorophyll (mg/L)} = \frac{[20.2\,(A_{645}) + 8.02\,(A_{663})]}{(1000 \times V_2)} \times V_1$$

Carotenoid (mg/L)

$$= \frac{[1000(A_{470}) - 3.27\{(\text{Chlorophyll a}) - (\text{Chlorophyll b})\}]}{(229 \times V_2)} \times V_1$$

โดยกำหนดให้

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ที่กำหนด

V_1 = ปริมาตรสุดท้ายที่สกัดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์

V_2 = ปริมาตรของสาหร่ายที่นำมาสกัด

3.4.6 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียวที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน เปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน

3.4.6.1 กลุ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 10 วัน

ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ฉ) เพื่อให้ได้เซลล์สาหร่ายแห้ง จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา แล้วนำไปใส่ในกระดาษกรอง (ที่ทราบน้ำหนัก) แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ1.127 กรัม จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายแห้งที่อยู่ในกระดาษกรองไปสกัดด้วยชุดซอกห์เลต (ภาคผนวก ช) โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเฮกเซน ใส่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรในขวดก้นกลม มีการให้ความร้อน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไปควบแน่นลงมาที่ Thimble ซึ่งบรรจุเซลล์สาหร่ายไว้ เมื่อสารสกัดที่ได้สูงถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงมาในขวดก้นกลม วนเวียนเช่นนี้จนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ สังเกตจากสีของตัวทำละลายใน Thimble ที่ใสขึ้น ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดใส่ขวดแก้วดูแรน แล้วนำสารสกัดไปทำการระเหย เพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้นขึ้น ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator เสร็จแล้วใช้หลอดหยดสารดูดสารสกัดใส่ขวดแก้ว (ที่ทราบน้ำหนัก) นำสารสกัดไปอบข้ามคืนในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสารสกัด เท่ากับ 0.3229 กรัม

3.4.6.2 กลุ่มเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 20 วัน

ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ฉ) เพื่อให้ได้เซลล์สาหร่ายแห้ง จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา แล้วนำไปใส่ในกระดาษกรอง (ที่ทราบน้ำหนัก) นำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 1.9433 กรัม จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายแห้งที่อยู่ในกระดาษกรองไปสกัดด้วยชุดซอกห์เลต (ภาคผนวก ช) โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเฮกเซน ใส่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรในขวดก้นกลม มีการให้ความร้อน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบแน่นลงมาที่ Thimble ซึ่งบรรจุเซลล์สาหร่ายไว้ เมื่อสารสกัดที่ได้สูงถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงมาในขวดก้นกลม วนเวียนเช่นนี้จนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ สังเกตจากสีของตัวทำละลายใน Thimble ที่ใสขึ้น ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 7 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดใส่ขวดแก้วดูแรน แล้วนำสารสกัดไปทำการระเหย เพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้นขึ้น ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator เสร็จแล้วใช้หลอดหยดสารดูดสารสกัดใส่ขวดแก้ว (ที่ทราบน้ำหนัก) นำสารสกัดไปอบข้ามคืนในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสารสกัด เท่ากับ 0.5143 กรัม

3.4.6.3 การตรวจวิเคราะห์ GC-MS

นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องซอกห์เลตมาละลายในตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้สารสกัด 0.1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตรจากนั้นนำส่งตรวจ GC-MS โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ ทำการฉีดตัวอย่างเข้าช่องฉีดสารของเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี ครั้งละ 1.0 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้คือ HP-5 ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร โดยมีฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพา ด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความดัน 14.08 psi สำหรับสภาวะของตู้ให้ความร้อน (oven) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นของตู้เป็น 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มอุณหภูมิสูงถึง 220 องศาเซลเซียส ในอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิอินเจคเตอร์ 220 องศาเซลเซียส ใช้แมสสเปคโตรโฟโตมิเตอร์เป็นดีเท็คเตอร์ ทำด้วยพลังงานอิเล็คตรอน 70 eV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

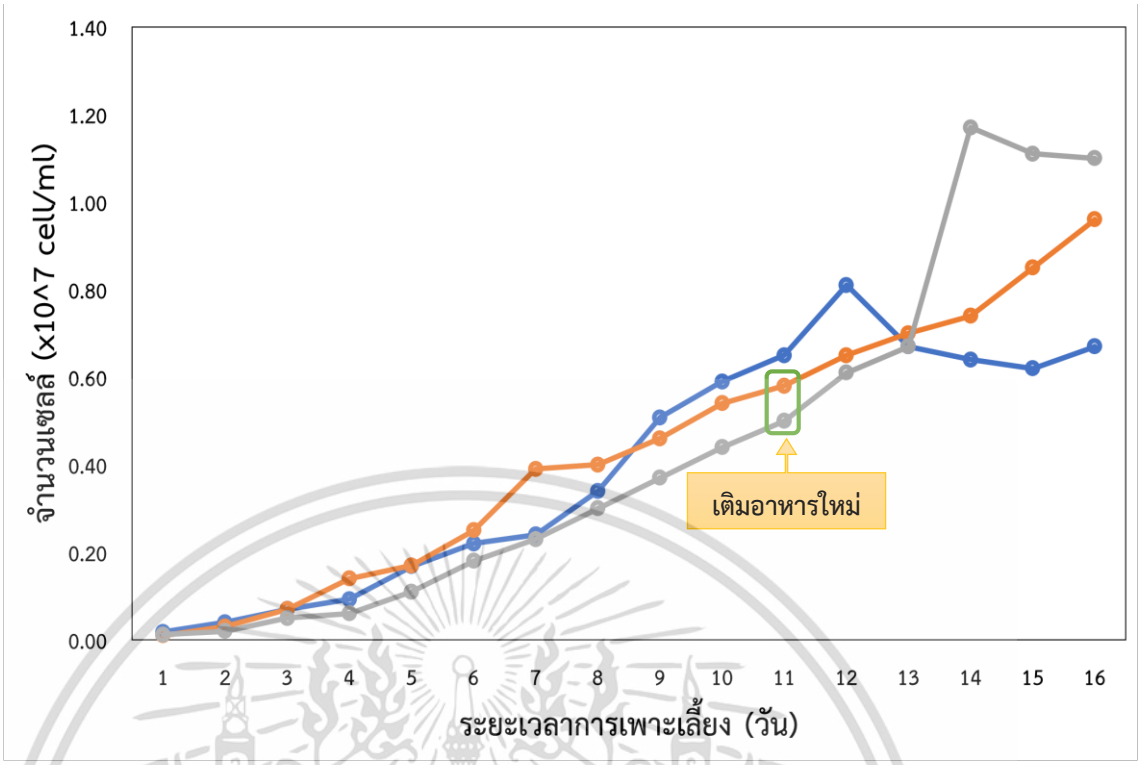
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาการเติมอาหาร MS ปริมาณต่างๆ ในระยะ Log phase ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว

4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์

การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) พบว่าในวันที่ 16 ของการทดลอง ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร MS 1.18 กรัม มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุด เท่ากับ 1.1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม) มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับ 6.7×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม)
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม

รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

จำนวนเซลล์			
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่ไม่มีการเติมอาหาร (ชุดควบคุม) (Cell/ml)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม (Cell/ml)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม (Cell/ml)
1	1×10^5	1×10^5	1×10^5
2	4×10^5	3×10^5	2×10^5
3	7×10^5	7×10^5	5×10^5
4	9.3×10^5	1.4×10^6	6×10^5
5	1.7×10^6	1.7×10^6	1.1×10^6
6	2.2×10^6	2.5×10^6	1.8×10^6
7	2.4×10^6	3.9×10^6	2.3×10^6
8	3.4×10^6	4×10^6	3×10^6
9	5.1×10^6	4.6×10^6	3.7×10^6
10	5.9×10^6	5.4×10^6	4.4×10^6
11	6.5×10^6	5.8×10^6	5×10^6
12	8.1×10^6	6.5×10^6	6.1×10^6
13	6.7×10^6	7.0×10^6	6.7×10^6
14	6.4×10^6	7.4×10^6	1.17×10^7
15	6.2×10^6	8.5×10^6	1.11×10^7
16	6.7×10^6	9.6×10^6	1.1×10^7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Chlorophyll a พบว่าในวันที่ 16 ของการทดลอง ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม มีปริมาณ Chlorophyll a สูงสุดเท่ากับ 6.62 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม เท่ากับ 4.27 ไมโครกรัม/ลิตร และสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม) เท่ากับ 1.59 ไมโครกรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Chlorophyll b พบว่าในวันที่ 16 ของการทดลอง ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม มีปริมาณ Chlorophyll a สูงสุดเท่ากับ 3.58 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม เท่ากับ 1.67 ไมโครกรัม/ลิตร และสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม) เท่ากับ 0.65 ไมโครกรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total chlorophyll พบว่าในวันที่ 16 ของการทดลอง ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม มีปริมาณ Total chlorophyll สูงสุดเท่ากับ 10.20 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม เท่ากับ 5.94 ไมโครกรัม/ลิตร และสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม) เท่ากับ 2.24 ไมโครกรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4

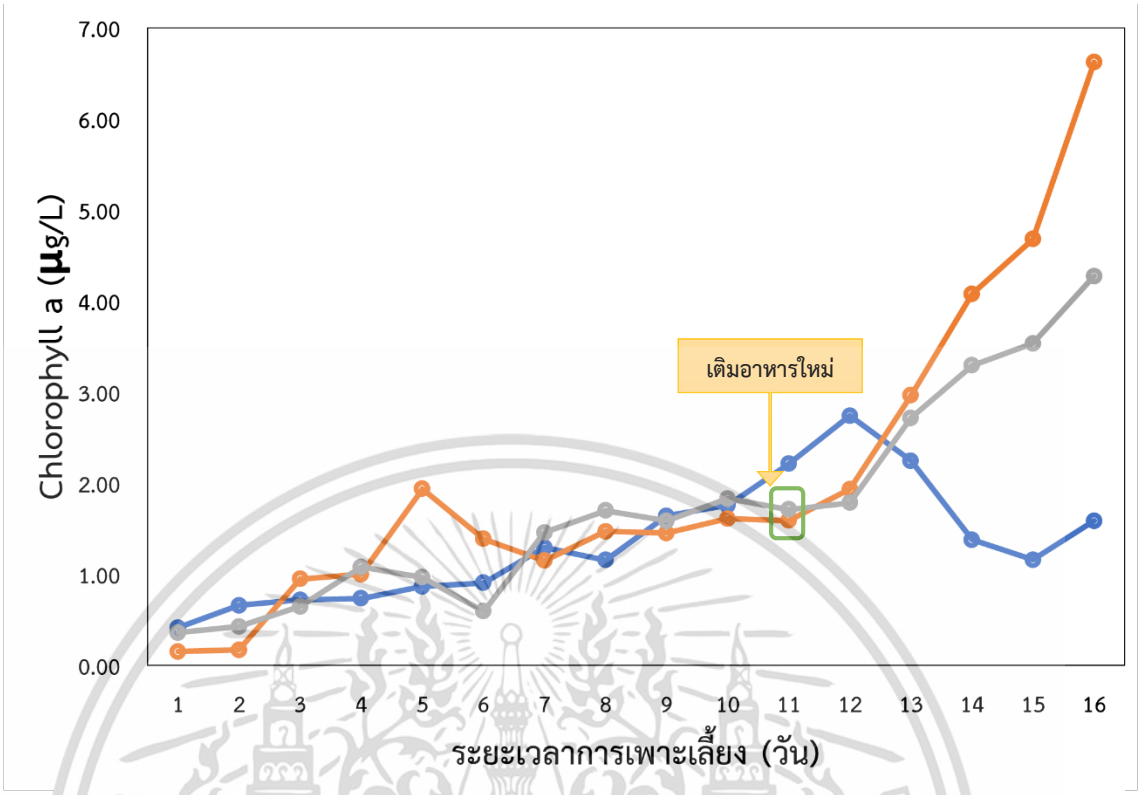
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Carotenoid พบว่าในวันที่ 16 ของการทดลอง ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม มีปริมาณ Carotenoid สูงสุดเท่ากับ 3,726.13 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม เท่ากับ 1,673.76 ไมโครกรัม/ลิตร และสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม) เท่ากับ 713.10 ไมโครกรัม/ลิตรแสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

Chlorophyll a (μg/L)			
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่ไม่มีการเติมอาหาร (ชุดควบคุม)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม
1	0.41	0.15	0.36
2	0.66	0.17	0.43
3	0.72	0.95	0.65
4	0.73	1.00	1.08
5	0.87	1.94	0.97
6	0.91	1.39	0.59
7	1.29	1.15	1.46
8	1.16	1.47	1.70
9	1.64	1.45	1.59
10	1.76	1.61	1.83
11	2.21	1.59	1.71
12	2.74	1.93	1.78
13	2.25	2.96	2.72
14	1.38	4.08	3.29
15	1.16	4.68	3.53
16	1.59	6.62	4.27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม)
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม

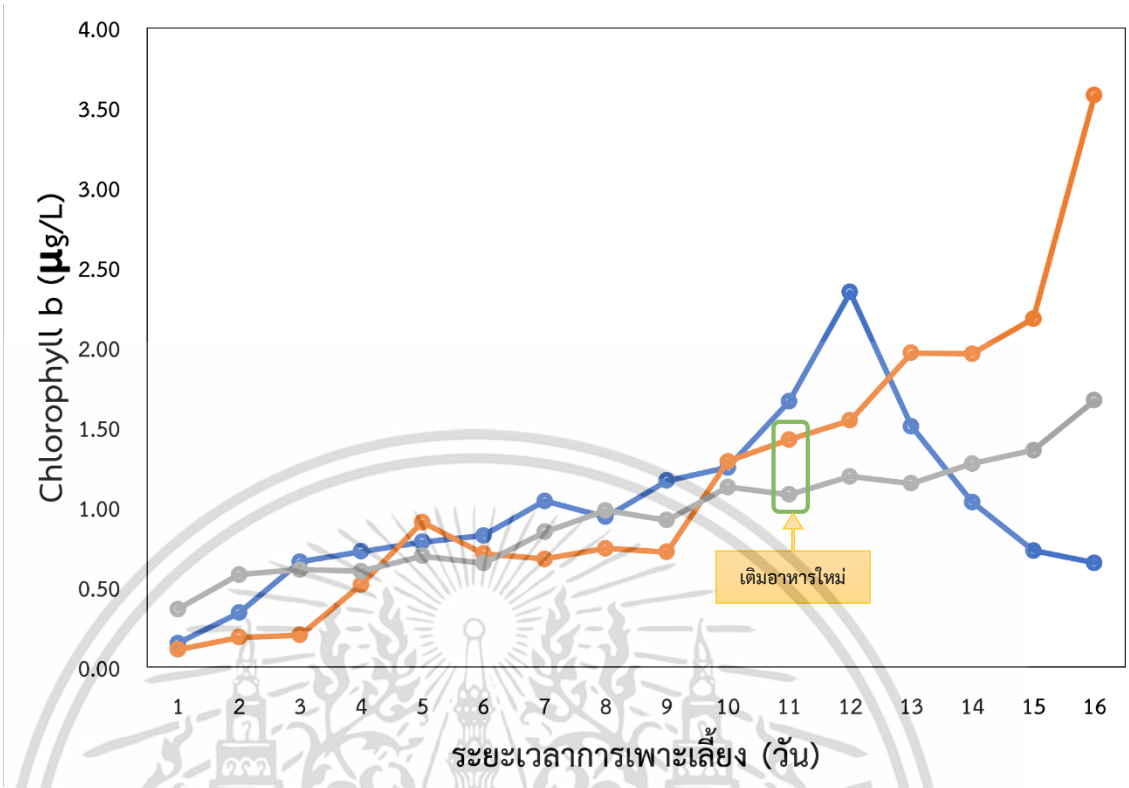
รูปที่ 4.2 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

Chlorophyll b (μg/L)			
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่ไม่มีการเติมอาหาร (ชุดควบคุม)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม
1	0.15	0.11	0.36
2	0.34	0.19	0.58
3	0.66	0.20	0.61
4	0.72	0.52	0.60
5	0.78	0.91	0.70
6	0.82	0.71	0.65
7	1.04	0.68	0.85
8	0.94	0.74	0.98
9	1.17	0.72	0.92
10	1.25	1.29	1.13
11	1.66	1.42	1.08
12	2.35	1.54	1.19
13	1.51	1.97	1.15
14	1.03	1.96	1.27
15	0.73	2.18	1.36
16	0.65	3.58	1.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม)
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม

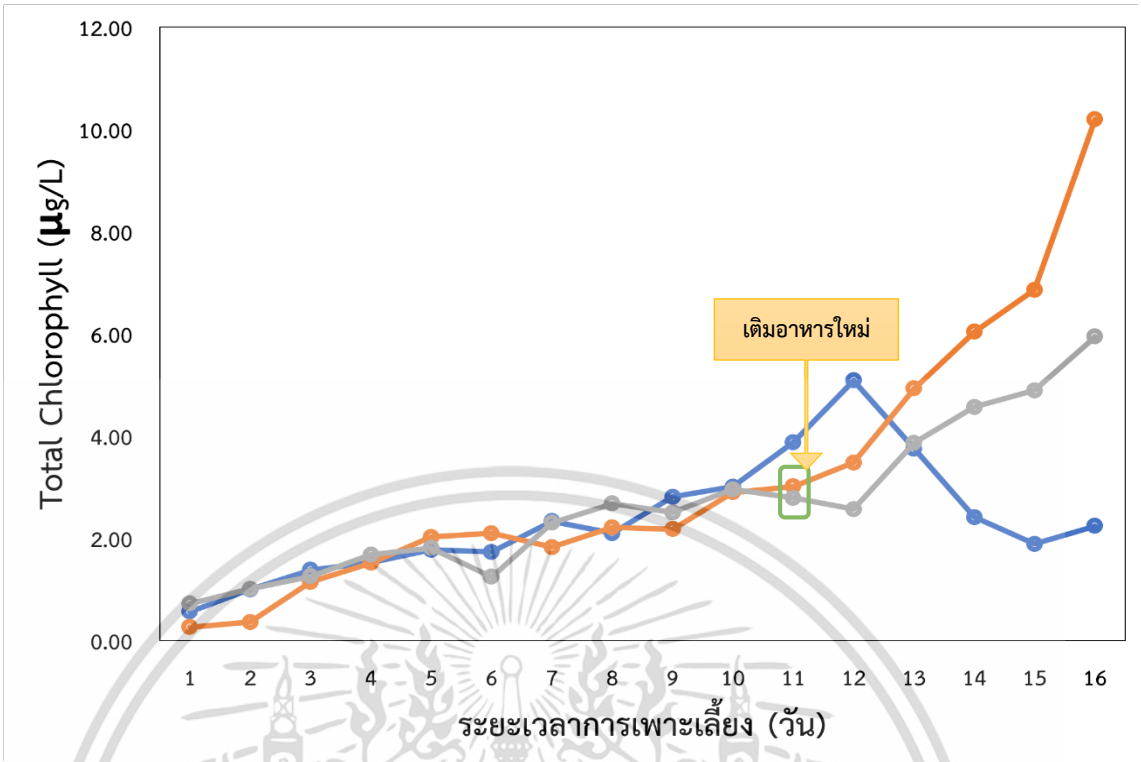
รูปที่ 4.3 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

Total Chlorophyll (µg/L)			
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่ไม่มีการเติมอาหาร (ชุดควบคุม)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม
1	0.56	0.26	0.72
2	1.00	0.36	1.01
3	1.38	1.15	1.26
4	1.53	1.52	1.68
5	1.77	2.02	1.81
6	1.73	2.10	1.24
7	2.33	1.83	2.30
8	2.10	2.21	2.68
9	2.81	2.17	2.51
10	3.01	2.90	2.96
11	3.88	3.01	2.79
12	5.09	3.48	2.57
13	3.75	4.93	3.87
14	2.41	6.04	4.57
15	1.89	6.86	4.89
16	2.24	10.20	5.94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม)
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม

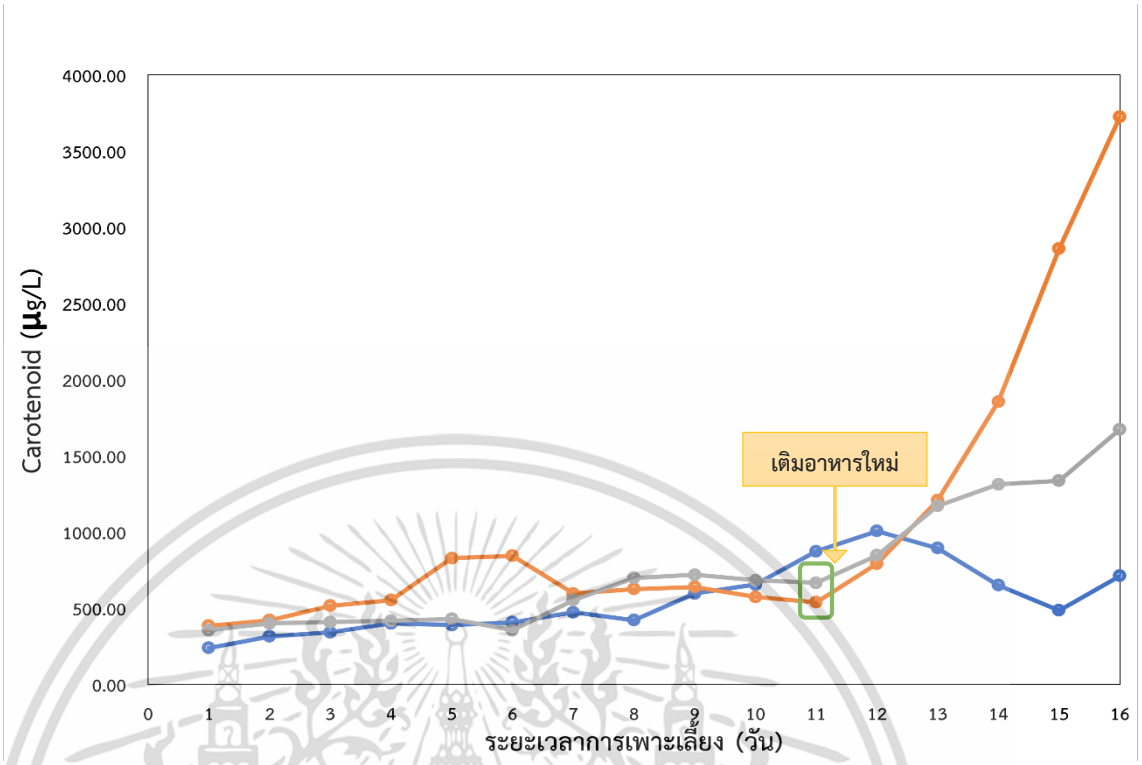
รูปที่ 4.4 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

Carotenoid (μg/L)			
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่ไม่มีการเติมอาหาร (ชุดควบคุม)	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม	ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม
1	240.18	385.65	356.66
2	315.45	422.09	400.32
3	342.01	516.72	409.31
4	400.22	553.06	418.28
5	389.56	829.63	429.72
6	407.56	844.11	356.58
7	473.09	596.70	553.09
8	422.16	625.67	698.66
9	596.76	640.00	720.50
10	654.99	574.90	682.94
11	873.32	539.33	666.37
12	1006.66	793.24	846.70
13	895.14	1208.01	1171.65
14	651.97	1855.74	1312.90
15	486.40	2860.04	1337.23
16	713.10	3726.13	1673.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS (ชุดควบคุม)
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 0.59 กรัม
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมอาหาร 1.18 กรัม

รูปที่ 4.5 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ที่มีการเติมปริมาณอาหาร MS ที่ต่างกัน ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

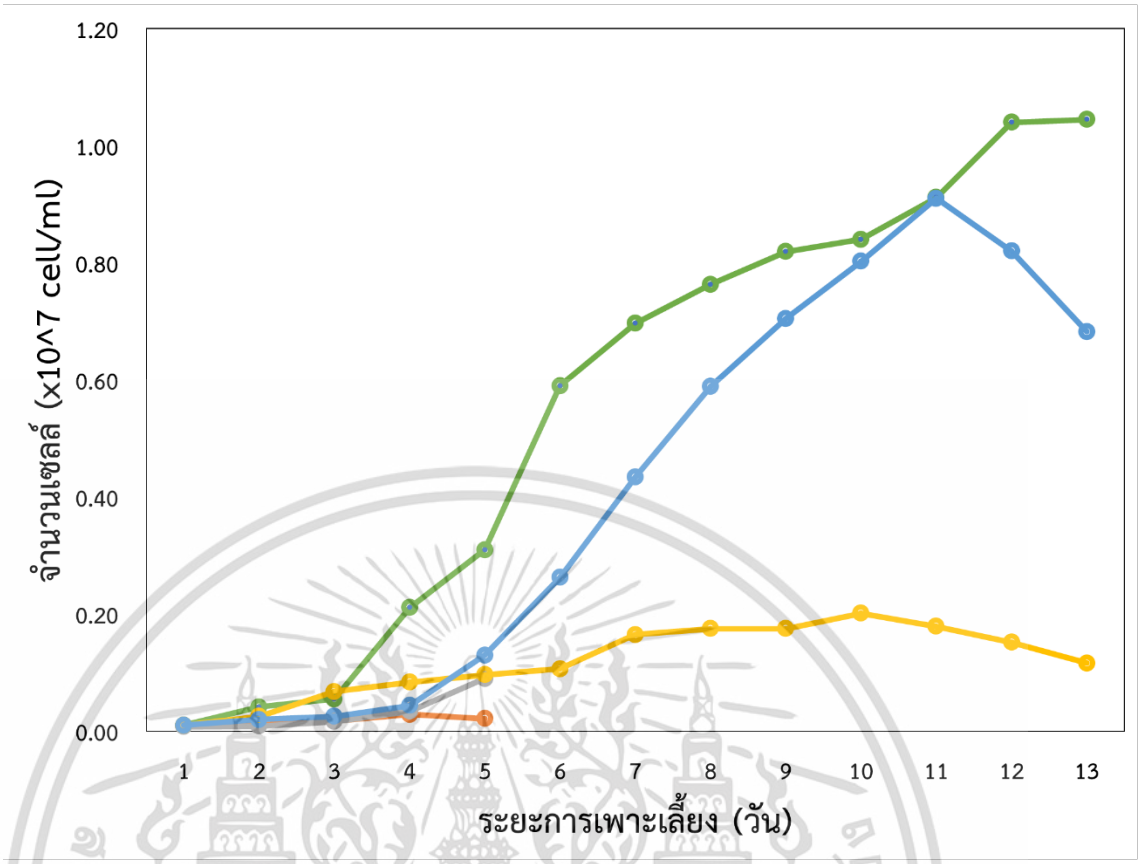
4.2 การศึกษาความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร

จากการศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร ที่มีความเข้มแสงแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 1,900 ลักซ์, 2,200 ลักซ์, 5,560 ลักซ์, 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ ซึ่งวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และวิธีการสกัดหาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid

4.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์

ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) พบว่าในวันที่ 13 ของการทดลอง ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุด เท่ากับ 1.05×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ เท่ากับ 6.8×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลำดับต่อมาคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ เท่ากับ 1.2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ สาหร่ายไม่มีการเจริญเติบโต เนื่องจากความเข้มแสงที่มากเกินไป ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ยับยั้งด้วยแสง การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวลดลง (Park et al.,2011) แสดงดังรูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีเขียว คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์
เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์
เส้นสีเหลือง คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์

รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

จำนวนเซลล์					
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ (Cell/ml)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ (Cell/ml)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์ (Cell/ml)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ (Cell/ml)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์ (Cell/ml)
1	1×10^5	1×10^5	1×10^5	1×10^5	1×10^5
2	4×10^5	2×10^5	3×10^5	1×10^5	1×10^5
3	6×10^5	3×10^5	7×10^5	2×10^5	2×10^5
4	2.1×10^6	4×10^5	8×10^5	3×10^5	3×10^5
5	3.1×10^6	1.3×10^6	1×10^6	9×10^5	2×10^5
6	5.9×10^6	2.6×10^6	1.1×10^6	-	-
7	7×10^6	4.3×10^6	1.7×10^6	-	-
8	7.6×10^6	5.9×10^6	1.8×10^6	-	-
9	8.2×10^6	7.1×10^6	1.8×10^6	-	-
10	8.4×10^6	8.0×10^6	1.8×10^6	-	-
11	9.1×10^6	9.1×10^6	2×10^6	-	-
12	1.04×10^7	8.2×10^6	1.8×10^6	-	-
13	1.05×10^7	6.8×10^6	1.5×10^6	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a พบว่าหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 13 วัน ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีปริมาณ Chlorophyll a สูงสุดเท่ากับ 2.15 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ เท่ากับ 1.58 ไมโครกรัม/ลิตร ลำดับสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์ เท่ากับ 0.15 ไมโครกรัม/ลิตร ในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายมีการตายในวันที่ 5 ของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.7

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll b พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 13 วัน ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีปริมาณ Chlorophyll b สูงสุดเท่ากับ 2.05 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ เท่ากับ 1.42 ไมโครกรัม/ลิตร ลำดับสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์ เท่ากับ 0.24 ไมโครกรัม/ลิตร ในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายมีการตายในวันที่ 5 ของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.8

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Total Chlorophyll พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 13 วัน ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีปริมาณ Total Chlorophyll สูงสุดเท่ากับ 4.20 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ เท่ากับ 2.99 ไมโครกรัม/ลิตร ลำดับสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์ เท่ากับ 0.40 ไมโครกรัม/ลิตร ในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายมีการตายในวันที่ 5 ของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.9

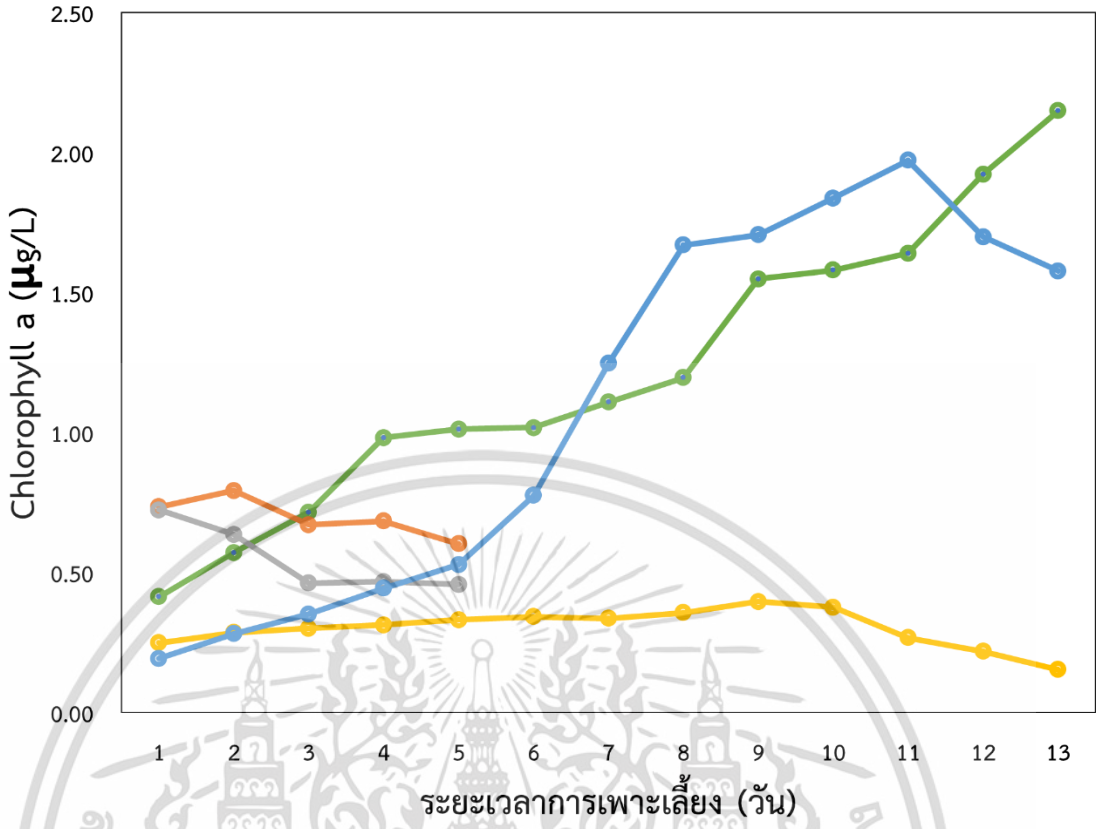
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Carotenoid พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 13 วัน ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีปริมาณ Carotenoid สูงสุดเท่ากับ 1,309.85 ไมโครกรัม/ลิตร รองลงมาคือถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์ เท่ากับ 846.98 ไมโครกรัม/ลิตร ลำดับสุดท้ายคือถังเพาะเลี้ยงชุดที่มีความเข้มแสง 5,560 ลักซ์ เท่ากับ 148.71 ไมโครกรัม/ลิตร ในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายมีการตายในวันที่ 5 ของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

Chlorophyll a (μg/L)					
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์
1	0.41	0.19	0.25	0.72	0.73
2	0.57	0.28	0.29	0.64	0.79
3	0.72	0.35	0.30	0.46	0.67
4	0.98	0.44	0.31	0.47	0.68
5	1.01	0.53	0.33	0.46	0.60
6	1.02	0.78	0.34	-	-
7	1.11	1.25	0.34	-	-
8	1.20	1.67	0.36	-	-
9	1.55	1.71	0.40	-	-
10	1.58	1.84	0.38	-	-
11	1.64	1.97	0.27	-	-
12	1.92	1.70	0.22	-	-
13	2.15	1.58	0.15	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีเขียว คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์
เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์
เส้นสีเหลือง คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์

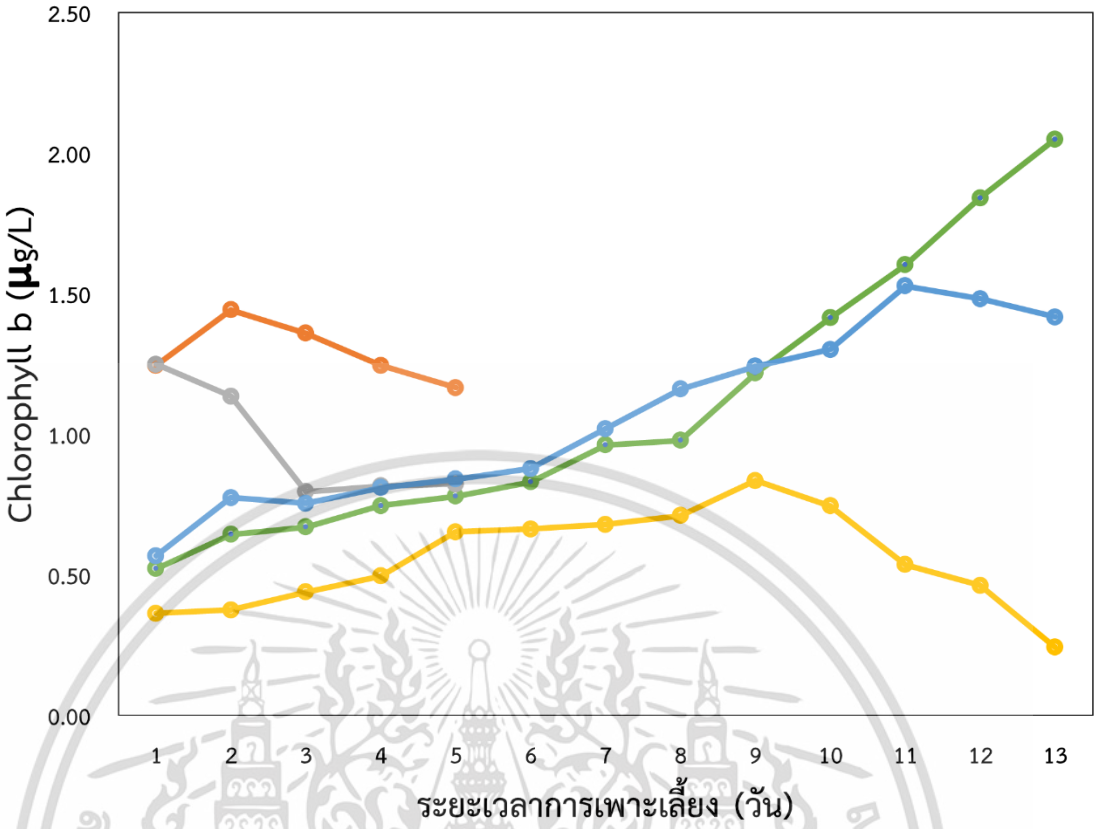
รูปที่ 4.7 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

Chlorophyll b (µg/L)					
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์
1	0.52	0.57	0.36	1.25	1.24
2	0.64	0.77	0.38	1.13	1.44
3	0.67	0.75	0.44	0.80	1.36
4	0.75	0.81	0.50	0.82	1.25
5	0.78	0.84	0.65	0.82	1.17
6	0.83	0.88	0.66	-	-
7	0.96	1.02	0.68	-	-
8	0.98	1.16	0.71	-	-
9	1.22	1.24	0.84	-	-
10	1.41	1.30	0.74	-	-
11	1.60	1.53	0.54	-	-
12	1.84	1.48	0.46	-	-
13	2.05	1.42	0.24	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีเขียว คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์
เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์
เส้นสีเหลือง คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์

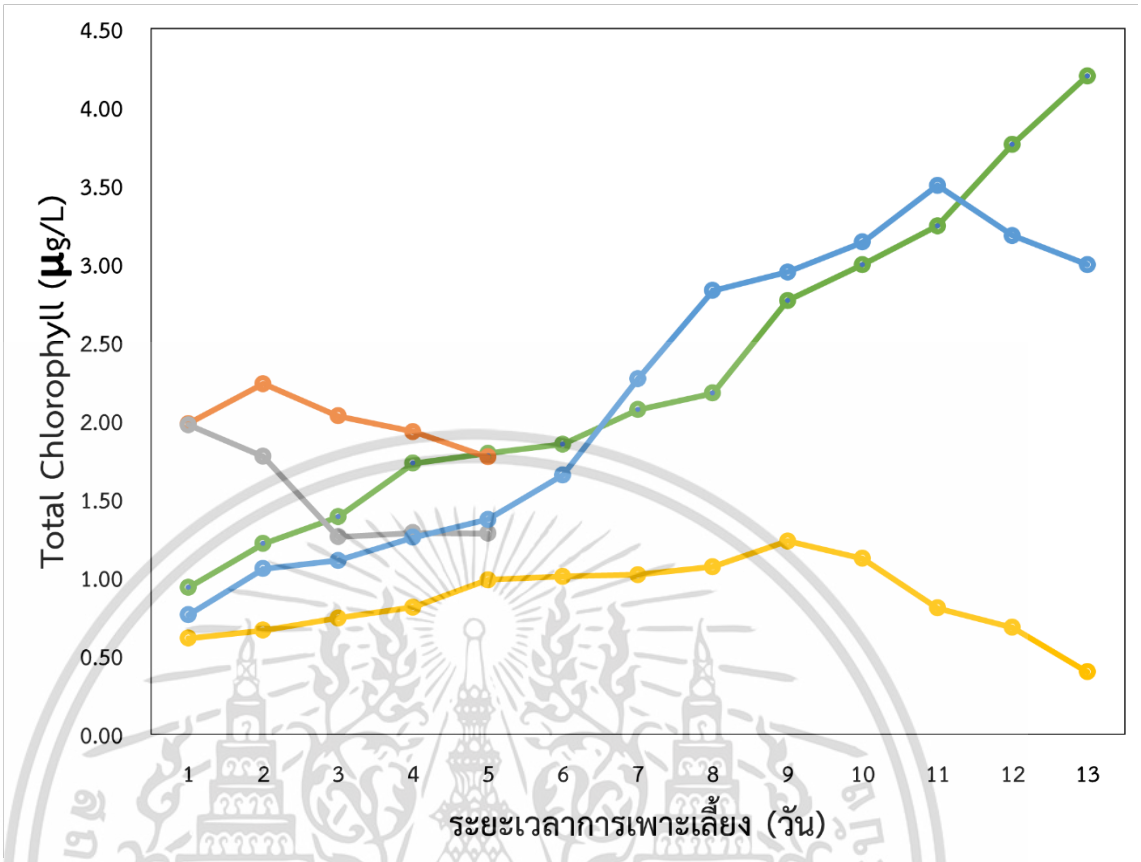
รูปที่ 4.8 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

Total Chlorophyll (µg/L)					
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์
1	0.94	0.76	0.61	1.97	1.98
2	1.21	1.06	0.66	1.77	2.23
3	1.39	1.11	0.74	1.26	2.03
4	1.73	1.25	0.81	1.28	1.93
5	1.79	1.37	0.98	1.28	1.77
6	1.85	1.65	1.01	-	-
7	2.07	2.27	1.02	-	-
8	2.17	2.83	1.07	-	-
9	2.77	2.95	1.23	-	-
10	2.99	3.14	1.12	-	-
11	3.24	3.50	0.80	-	-
12	3.76	3.18	0.68	-	-
13	4.20	2.99	0.40	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีเขียว คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์
เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์
เส้นสีเหลือง คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์

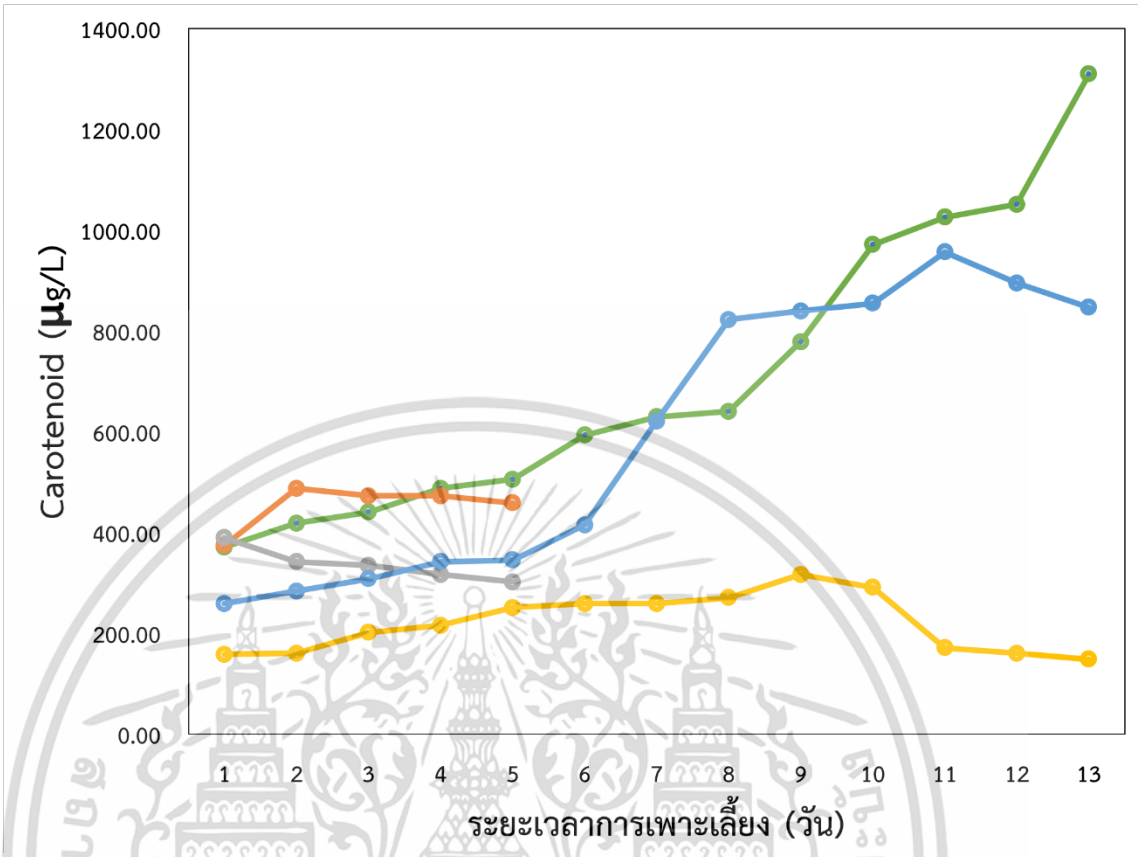
รูปที่ 4.9 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

Carotenoid (μg/L)					
ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์	ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์
1	371.13	258.75	157.87	389.30	374.74
2	418.43	283.80	160.09	341.99	487.54
3	440.27	308.11	201.53	334.74	472.99
4	487.54	341.77	216.06	316.54	473.00
5	505.72	345.26	251.06	301.99	458.45
6	593.06	414.77	259.06	-	-
7	629.45	621.08	258.85	-	-
8	640.39	822.27	270.94	-	-
9	778.62	839.69	316.55	-	-
10	971.43	855.02	291.09	-	-
11	1025.53	956.91	171.01	-	-
12	1051.46	895.05	160.09	-	-
13	1309.85	846.98	148.71	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โดย เส้นสีเขียว คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์
เส้นสีน้ำเงิน คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,200 ลักซ์
เส้นสีเหลือง คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 5,560 ลักซ์
เส้นสีเทา คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์
เส้นสีส้ม คือ ถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์

รูปที่ 4.10 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์ ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

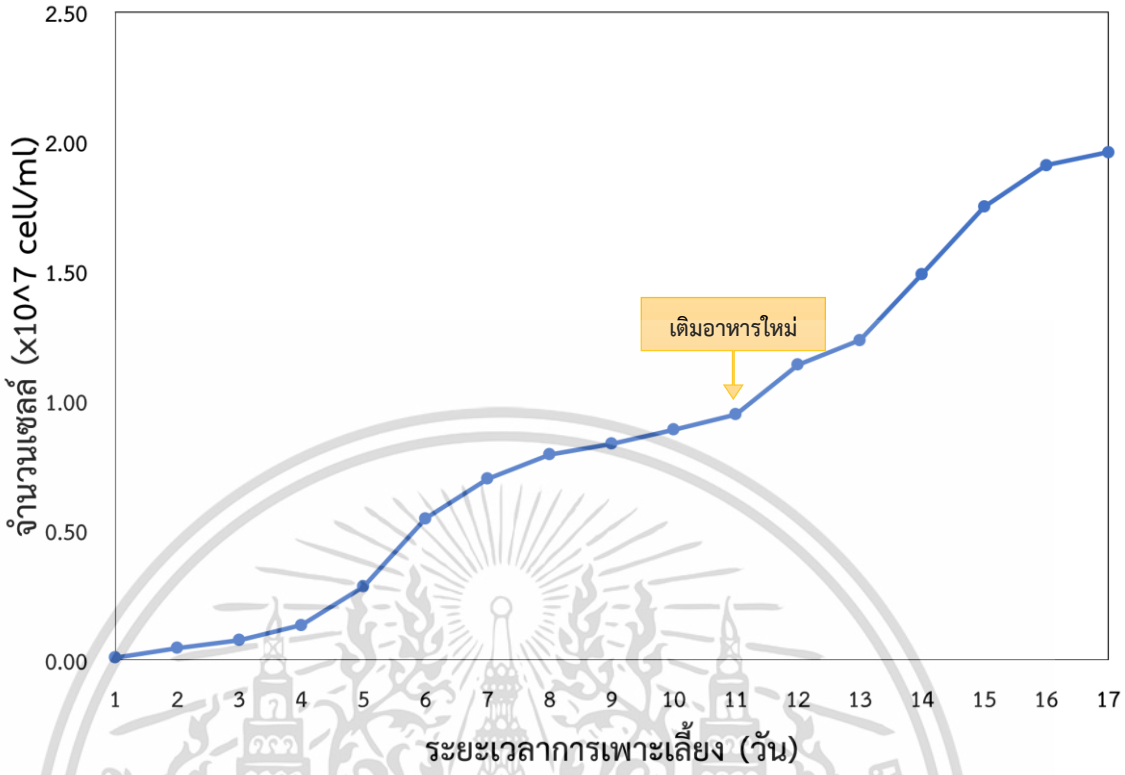
4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

จากการศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหาร MS 0.074 กรัม ในระหว่างการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และวิธีการสกัดหาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid ด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์

4.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์

การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) พบว่าในวันที่ 11 ของการทดลองมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เท่ากับ 9.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในระยะ log phase จึงเติมผงอาหาร MS 0.074 กรัม ภายหลังการเติมอาหาร พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดในวันที่ 17 ซึ่งนับจำนวนเซลล์ได้ 1.96×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยง ขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	จำนวนเซลล์ (Cell/ml)
1	1×10^5
2	5×10^5
3	8×10^5
4	1.4×10^6
5	2.9×10^6
6	5.5×10^6
7	7×10^6
8	7.9×10^6
9	8.4×10^6
10	8.9×10^6
11	9.5×10^6
12	1.14×10^7
13	1.24×10^7
14	1.49×10^7
15	1.75×10^7
16	1.91×10^7
17	1.96×10^7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid

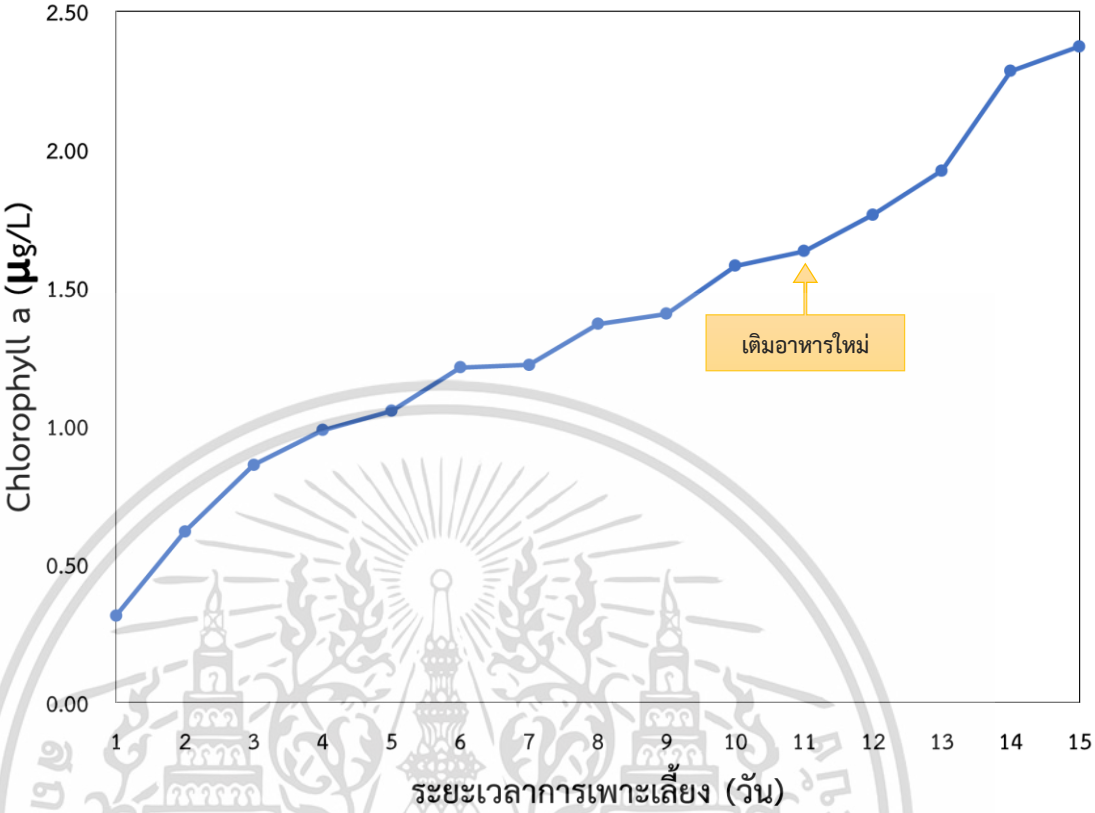
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมผงอาหาร MS 0.074 กรัม ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ ภายหลังการเติมอาหาร พบว่าในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณ Chlorophyll a สูงสุดเท่ากับ 2.37 ไมโครกรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Chlorophyll b มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 2.05 ไมโครกรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Total Chlorophyll พบว่ามีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 4.42 ไมโครกรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.14 และผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Carotenoid มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1,280.76 ไมโครกรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณ Chlorophyll a (µg/L)
1	0.31
2	0.62
3	0.86
4	0.98
5	1.05
6	1.21
7	1.22
8	1.37
9	1.41
10	1.58
11	1.63
12	1.76
13	1.92
14	2.28
15	2.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



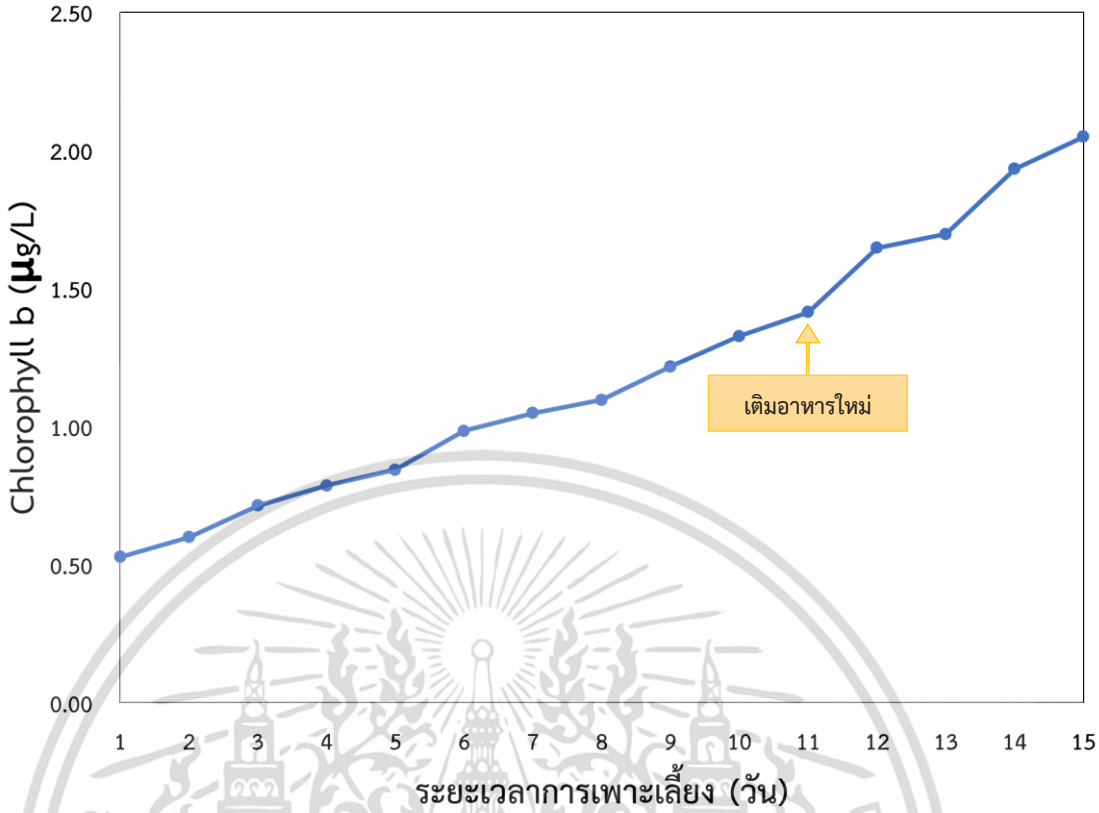
รูปที่ 4.12 ปริมาณ Chlorophyll a ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณ Chlorophyll b (µg/L)
1	0.53
2	0.60
3	0.71
4	0.79
5	0.84
6	0.98
7	1.05
8	1.10
9	1.22
10	1.33
11	1.41
12	1.65
13	1.70
14	1.93
15	2.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



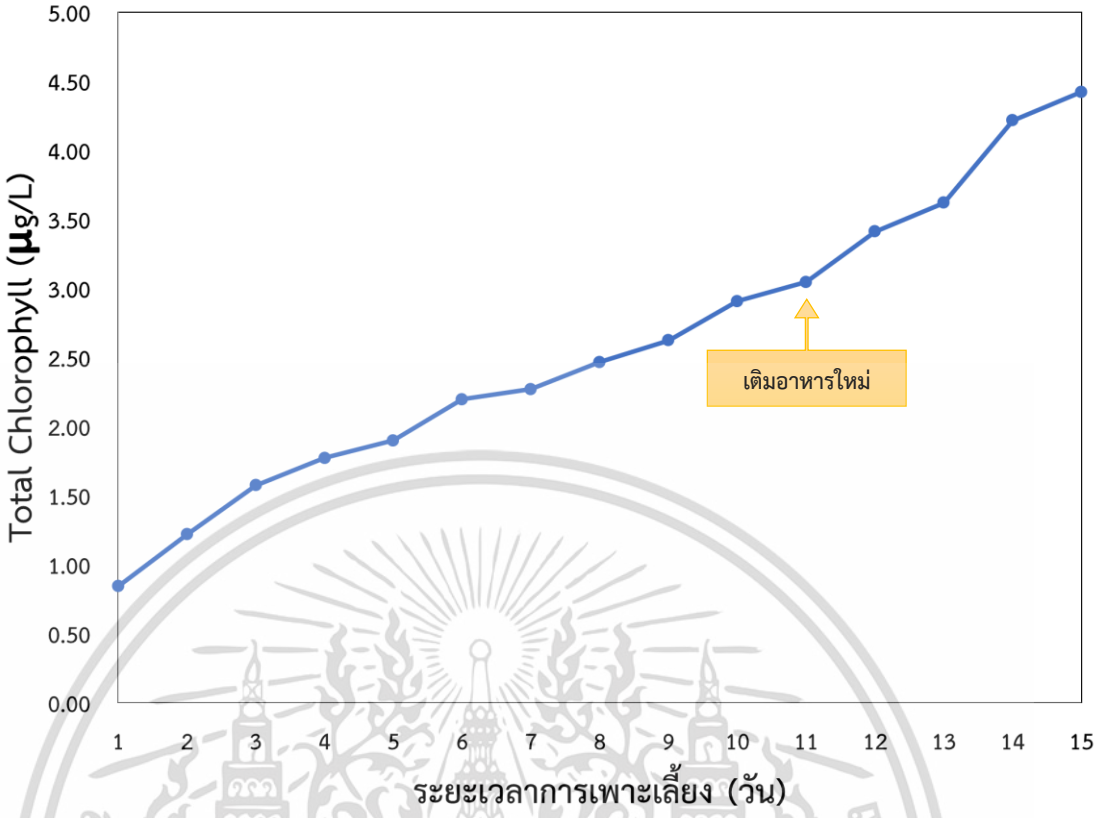
รูปที่ 4.13 ปริมาณ Chlorophyll b ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณ Total Chlorophyll (µg/L)
1	0.84
2	1.22
3	1.57
4	1.77
5	1.90
6	2.20
7	2.27
8	2.46
9	2.62
10	2.91
11	3.05
12	3.41
13	3.62
14	4.22
15	4.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



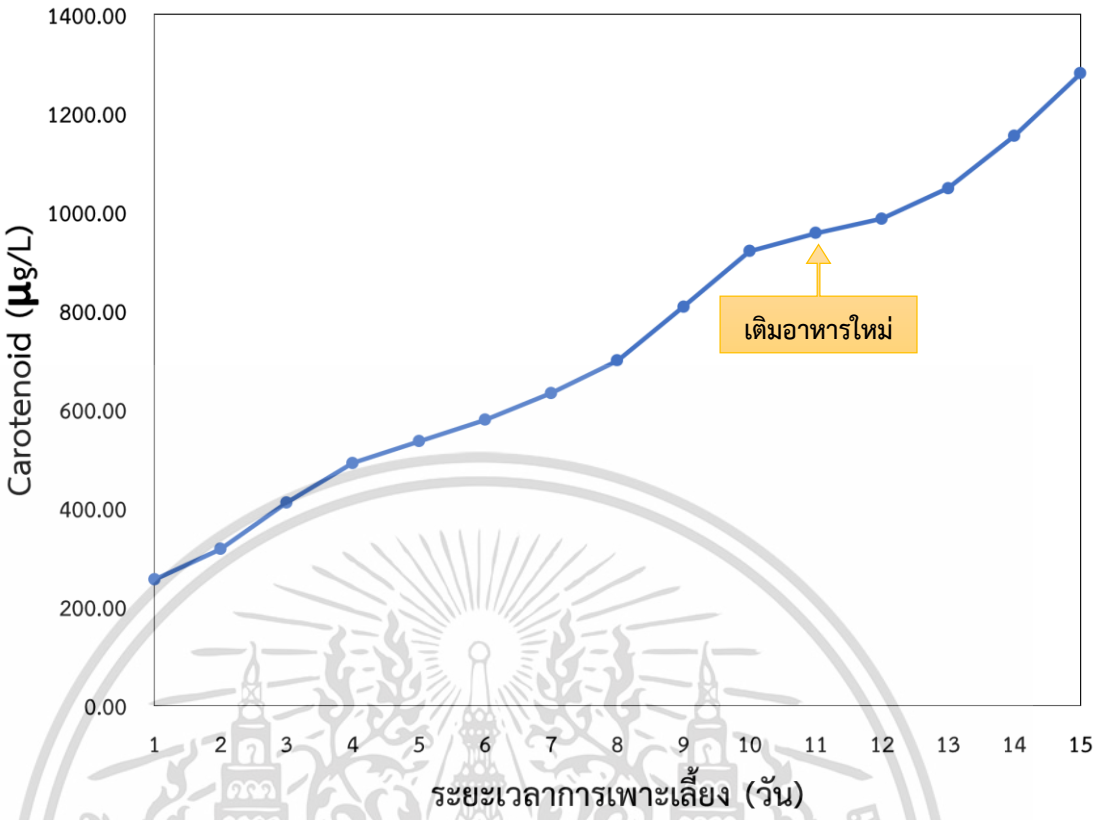
รูปที่ 4.14 ปริมาณ Total Chlorophyll ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณ Carotenoid (µg/L)
1	254.68
2	316.53
3	411.14
4	491.18
5	534.85
6	578.51
7	633.09
8	698.58
9	807.72
10	920.55
11	956.87
12	986.02
13	1047.92
14	1153.40
15	1280.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ปริมาณ Carotenoid ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายเซลล์เดียว ในอาหารสูตร 1/150 MS ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

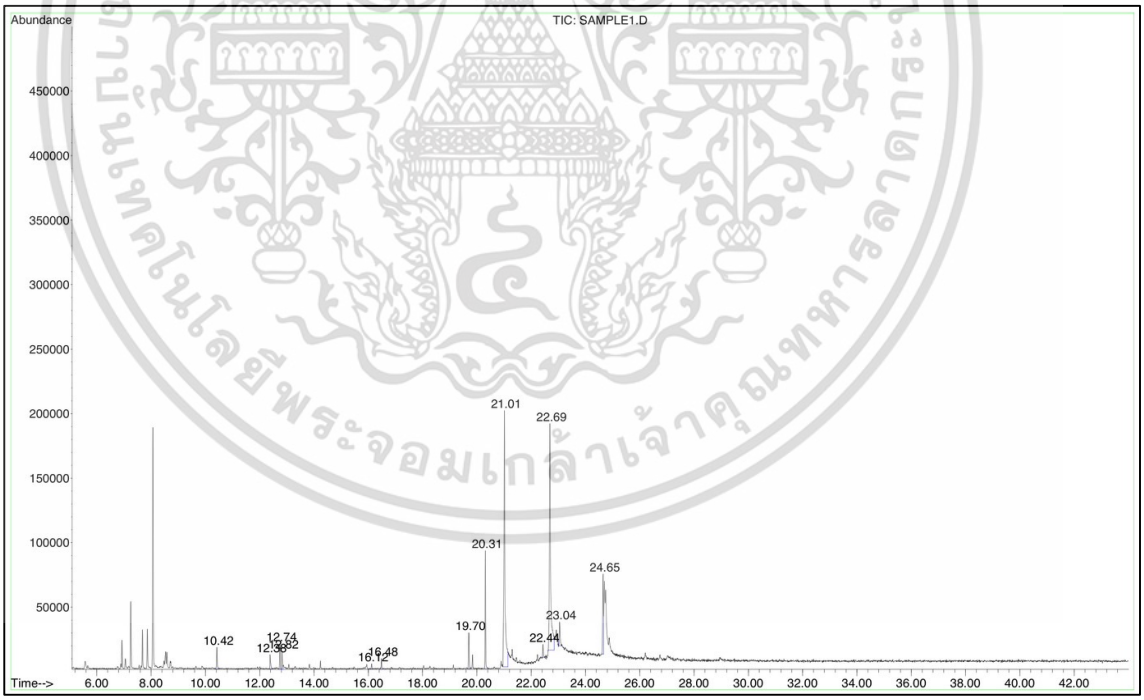
4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ GC-MS หาสารสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการนำตัวอย่างเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน ซึ่งตัวอย่างกลุ่มนี้ระยะในการเจริญจะอยู่ในช่วง log phase และสาหร่ายที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน ระยะการเจริญอาจอยู่ในช่วง stationary phase หรือใกล้ระยะ death phase โดยจะนำทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างนี้ไปสกัดด้วยซอกห์เลต โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 3 ชั่วโมง และตัวอย่างเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 7 ชั่วโมง เนื่องจากตัวอย่างเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่า จึงใช้เวลาในการสกัดนานกว่า จากนั้นนำส่วนที่เป็นสารสกัดของทั้ง 2 ตัวอย่างไปทำการระเหย เพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary Evaporator และนำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้สารสกัด 0.1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปส่งตรวจ GC-MS เพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยผลของสารประกอบที่พบในตัวอย่างสาหร่ายที่มีระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน มีสารที่พบทั้งหมด 13 ตัว และตัวอย่างสาหร่ายที่มีระยะเวลาการเลี้ยง 20 วัน มีสารที่พบทั้งหมด 17 ตัว โดยทั้ง 2 ตัวอย่างนี้มีสารที่พบเหมือนกันอยู่ 6 ตัว ได้แก่ Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl), 2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl, Palmitic acid, Oleic acid, Hexadecanamide และ 9-Octadecenamide, (Z) ซึ่ง Palmitic acid และ Oleic acid เป็นสารที่พบมากที่สุดเหมือนกัน โดยตัวอย่างสาหร่ายที่มีระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน มี Peak area ของ Palmitic acid เท่ากับ 34.985 % และ Peak area ของ Oleic acid เท่ากับ 33.539 % (แสดงดังตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.16) ตัวอย่างสาหร่ายที่มีระยะเวลาการเลี้ยง 20 วัน มี Peak area ของ Palmitic acid เท่ากับ 31.565 % และ Peak area ของ Oleic acid เท่ากับ 37.420 % (แสดงดังตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.17) โดย Palmitic acid เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (Saturated Fatty Acid) มีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลเท่ากับ 16 มีชื่อทางเคมีว่า hexadecanoic acid กรดปาล์มมิติก พบได้ในน้ำมันพืช โดยพบมากในน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันจากเนื้อปาล์ม นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สบู่ ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิว และเป็นสารลดแรงตึงผิวในสูตรผลิตภัณฑ์ชำระล้างทำความสะอาด Oleic acid เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีชื่อทางเคมีว่า octadecenoic acid มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ 1 อัน ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 จัดเป็น monounsaturated fatty acid สามารถใช้เป็นสารทำความสะอาดในการผลิตสบู่และสารซักฟอก เป็นสารทำให้ผิวนวลหรือนุ่มขึ้นในครีม โลชั่น ลิปสติก และผลิตภัณฑ์ต่างๆที่เกี่ยวกับผิว นอกจากนี้กรดโอเลอิกยังสามารถใช้เพื่อป้องกันโรคหัวใจและลดคอเลสเตอรอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 สารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 10 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

Retention Time (min)	Peak area (%)	สารประกอบจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเฮกเซน
10.423	1.830	n-Nonylaldehyde
12.381	1.401	2-ethyl-3-methyl maleimide
12.743	1.836	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)
12.820	1.496	2-Decenal, (E)
16.122	0.365	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)
16.484	0.851	Dihydroactinidiolide
19.703	2.850	2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl
20.310	8.423	1-Heptadecene
21.014	34.985	Palmitic acid
22.436	1.056	Phytol isomer
22.688	33.539	Oleic acid
23.044	2.449	Hexadecanamide
24.646	8.918	9-Octadecenamide, (Z)

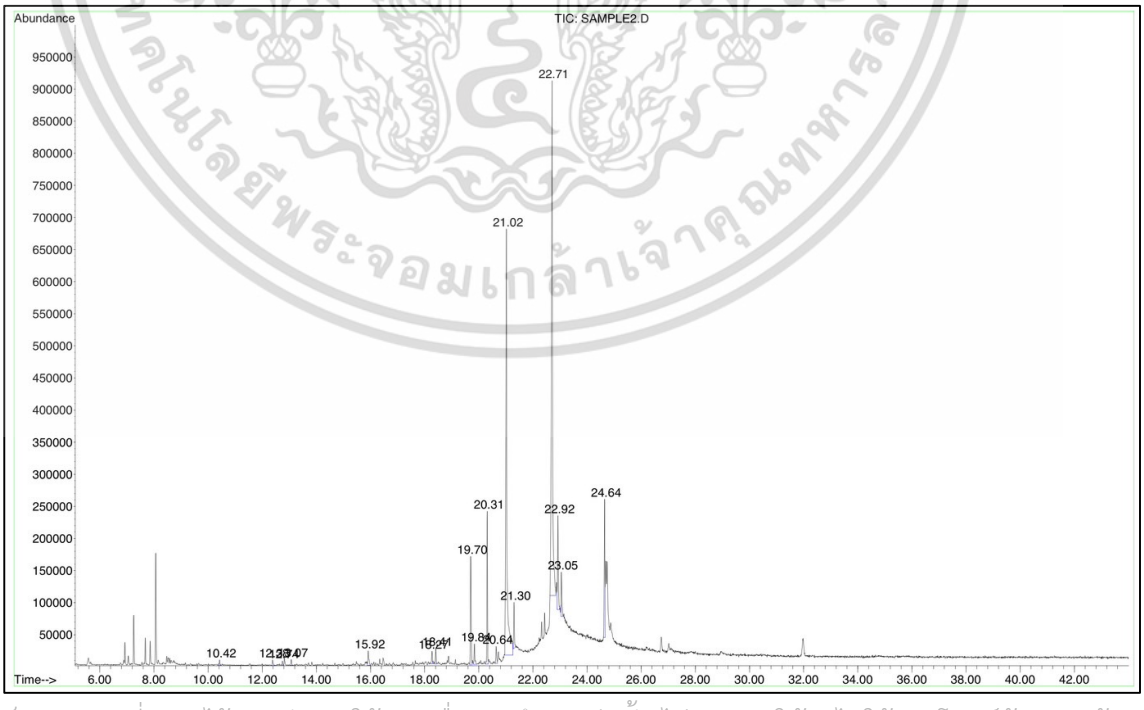


รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมของสารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 10 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 สารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 20 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

Retention Time (min)	Peak area (%)	สารประกอบจากสาหร่ายที่สกัดด้วยเฮกเซน
10.423	0.235	Lauraldehyde
12.381	0.301	alpha-(Aminomethylene)glutaconic anhydride
12.743	0.154	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)
13.073	0.217	Eicosane
15.916	0.800	Docosane
18.268	0.590	n-Tridecane
18.410	0.677	Pentadecane
19.696	4.661	2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl
19.838	0.998	2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl
20.310	5.774	1-Nonadecene
20.640	0.881	Palmitic acid, methyl ester
21.021	31.565	Palmitic acid
21.299	1.936	Ethyl palmitate
22.708	37.420	Oleic acid
22.921	4.357	Ethyl Oleate
23.050	2.092	Hexadecanamide
24.640	7.342	9-Octadecenamide, (Z)



รูปที่ 4.17 โครมาโทแกรมของสารประกอบที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง 20 วัน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การศึกษาการเติมอาหาร MS ปริมาณต่างๆ ในระยะ Log phase ลงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร แบบ Fed-batch Culture เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว

จากการศึกษาพบว่า ในถังเพาะเลี้ยง 1/150 MS ที่มีการเติมผงอาหาร MS 0.59 กรัม มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้มากที่สุด คือ 9.6 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการสกัดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid มากที่สุด คือ 6.62, 3.58, 10.20 และ 3,726.13 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

5.1.2 การศึกษาความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต และปริมาณแคโรทีนอยด์ ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร

จากการศึกษาความเข้มแสงที่ต่างกันดังนี้ 1,900 ลักซ์, 2,200 ลักซ์, 5,560 ลักซ์, 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ พบว่า สาหร่ายในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้มากที่สุด คือ 1.05 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มแสงเป็น 7,000 ลักซ์ และ 13,000 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายไม่มีการเจริญเติบโต (ตาย) และเมื่อทำการสกัดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สาหร่ายในถังเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ มีปริมาณ Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll และ Carotenoid มากที่สุด คือ 2.15, 2.05, 4.20 และ 1,309.85 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสาหร่ายเซลล์เดียวสามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้ความเข้มแสงที่ประมาณ 1,900 – 2,200 ลักซ์ แต่จะเจริญเติบโตและมีปริมาณสารแคโรทีนอยด์มากที่สุดที่สภาวะภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

5.1.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสาหร่ายเซลล์เดียว ในถังเพาะเลี้ยงขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์

จากการศึกษาพบว่า ภายหลังการเติมอาหาร มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากถึง 1.96 x 107 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการสกัดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีปริมาณ Chlorophyll a สูงสุดคือ 2.37 ไมโครกรัม/ลิตร มีปริมาณ Chlorophyll b สูงสุดคือ 2.05 ไมโครกรัม/ลิตร มีปริมาณ Total Chlorophyll สูงสุดคือ 4.42 ไมโครกรัม/ลิตร และมีปริมาณ Carotenoid สูงสุด 1,280.76 ไมโครกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาทั้งหมด พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวคือ การเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ และหากมีการเติมอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยง จะยิ่งส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตและมีปริมาณสารแคโรทีนอยด์มากขึ้น ถ้าหากเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ยับยั้งด้วยแสง (Photoinhibition) การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะลดลงและอาจตายได้ (Park et al., 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 การตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียวด้วยวิธี GC-MS

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าทั้งตัวอย่างเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงเป็น ระยะเวลา 10 วัน และตัวอย่างเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน มีสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพที่พบเหมือนกันอยู่ 6 ตัว ได้แก่ Benzene, 1,3-bis (1,1-dimethylethyl), 2-Hexadecene, 3 ,7 ,1 1 ,1 5 - tetramethyl, Palmitic acid, Oleic acid, Hexadecanamide และ 9 - Octadecenamide, (Z) ซึ่ง Palmitic acid และ Oleic acid เป็นสารที่พบมากที่สุดเหมือนกัน โดยทั้ง 2 ตัวนี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิว และเป็นสารลดแรงตึงผิวในสูตรผลิตภัณฑ์ชำระล้างทำความสะอาด ทำให้ผิวนวลหรือนุ่มขึ้นในครีม รวมถึงผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เกี่ยวกับผิว และสามารถนำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทดลองเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบที่ต่างกัน เช่น เลี้ยงในระบบปิดแบบออโตโทรฟิค หรือเฮทเทอโรโทรฟิค เป็นต้น เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่ต่างกัน เช่น การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) และแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบหาระบบที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Isolate A

2. ทดลองเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เพียงอย่างเดียว 24 ชั่วโมง โดยไม่มีแสงจากธรรมชาติ

3. หัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นที่จะใส่ในถังเพาะเลี้ยง ควรอยู่ในระยะ log phase หรือ Stationary phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. 2536. การเลี้ยง *Chlorella sp. T. ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 128 หน้า

กิตติวัฒน์ จำนงโชค และ พีรดนย์ อ่าวลึกเหนือ. 2563. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวเพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์. วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณิมนาราห์ อยู่คงแก้ว ,ปรียานุช เจริญสุข, ปิลดา เชิดชูเกียรติศักดิ์ และ ธัญนันท์ วรรณธง บรอคเคิล เฮอร์สท์. 2560. มวลชีวภาพและการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ PY202 ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 4: 591.

ดวงกมล เรือนงาม. 2560. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัด. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. 1: 59.

ธนภัทร เชาว์วิศิษฐ์เสรี. 2564. สารอาหารสำคัญช่วยป้องกันและบำรุงดวงตา. [Online]. https://sriphat.med.cmu.ac.th/th/knowledge-790

ธวัชชัย เอกสันติ และคณะ (2547). *จุลชีววิทยาในทางสาธารณสุข*. คณะพลศึกษาวิชาสุขศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

นฤนาท เสวิวัฒน์, ดิสรณ์ ประนัดโส, นิพัทธ์ เล็กบุญญาสิน, สาวิทย์ นาคมิตร และ ธัญลักษณ์ ราษฎรีภักดี. 2558. การเลี้ยงสาหร่ายน้ำมันด้วยก๊าซชีวภาพและธาตุอาหารจากระบบถังหมักก๊าซชีวภาพแบบไร้อากาศ. 32. ในการประชุมวิชาการวิศวกรรมฟาร์มและเทคโนโลยีการควบคุมอัตโนมัติ ระดับชาติครั้งที่ 2. ขอนแก่น

นุชนาถ แชมชอย. 2557. สาหรายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใชประโยชน. วารสาร มฉก.วิชาการ. 34: 176

ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า. 2564. การศึกษาสภาวะการเลี้ยงต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนและสัดส่วนไอโซเมอร์ของสาหร่าย *Dunaliella salina* NUAC09 สายพันธุ์ไทย. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประยูร เอ็นมาก, วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร และ ศุภมาศ กลิ่นขจร. 2557. การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่าย กลุ่ม Chlorophyta. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร.

ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2560. แคโรทีนอยด์: ความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสาร อาหาร. 2: 29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2539. แหล่งน้ำกับปัญหามลพิษ. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ยุวดี พีรพรพิศาล, ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง และคณะ. 2553. การพัฒนาการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่าย ขนาดเล็ก ระยะ ที่ 1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรสิทธิ์ โทจำปา. 2552. *การพัฒนาโปรแกรมจำลองกระบวนการหมัก*. คณะเกษตรศาสตร์

สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง. 2557. ความรู้เกี่ยวกับ น้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่าย. [Online]. เข้าถึงได้จาก https://www.doeb.go.th/knowledge/data/algal_biofuel_mar57.pdf.

สุนทรต์ ชูลักษณ์, ปูริดา สุพิทิพย์, และ วิชุดา จันทร์ข้างแรม. 2564. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย ขนาดเล็ก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 3: 98-107.

สุริยา สาสนรักกิจ. “การผลิตสารสีธรรมชาติจากสาหร่ายเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร,” จดหมายข่าว วท. 1, 11 (พ.ย. 2541): 5

หยกแก้ว ยามาลี, วิเชียร ยามนิตชัย, สมบูรณ์ ผู้พัฒน์, กัญญา สุจริตวงศานนท์, ไปรมา ภัทรกุลพงษ์ และไพลิน ผู้พัฒน์. 2525. การกำจัดน้ำทิ้งจากนมถั่วเหลืองโดยใช้สาหร่ายสีเขียว (Chlorella sp.). สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. หน้า 1-32

อุษาพร ภูคัสมาส 2558. แคโรทีนอยด์สารสีในอาหาร. วารสารอาหาร. 2: 47.

Barkia, I., Saari, N. and Manning, S. 2019. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. Marine Drugs. 17: 304.

Becker, E.W. 1994 Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.

Bellinger, E. G. and Sigee, D. C. 2010. Freshwater Algae. Oxford. Wiley-Blackwel.

Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M.E. and Van Loey, A.M. 2019. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. Biotechnology Advances. 37(8): 107419.

Boongorsrang, A., Thomgtong, T., Yamali, Y. and Sitachitta, C. 1986. *Nitrogen and Phosphorus removal efficiencies of different algae for waste water*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

treatment purpose. Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol. 5. NRCT, NUS, NSTA-JSPS Joint Seminar on Biotechnology, November 20-22, 1986, Osaka, Japan. P. 268-273

Choi, H., Pereira, A. and Gerwick, W. 2012. The chemistry of marine algae and cyanobacteria. In: Fattorusso, E., Gerwick, W. and TaglialatelaScafati, O. (eds.) Handbook of Marine Natural Products. Dordrecht: Springer.

Conde, E., Balboa, E., Parada, M. and Falqué, E. 2013. Algal proteins, peptides and amino acids. In: Domínguez, H. (ed.) Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. Cambridge: Woodhead Publishing.

Freile-Pelegrin, Y. and Robledo, D. 2014. Bioactive phenolic compounds from algae. In: Hernbndez-Ledesma, B. and Herrero, M. (eds.) Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources. Illinois: John Wiley & Sons, Ltd.

Galasso, C., Gentile, A., Orefice, I., Ianora, A., Bruno, A., Noonan, D.M., Sansone, C., Albini, A. and Brunet, C. 2019. Microalgal derivatives as potential nutraceutical and food supplements for human health: A focus on cancer prevention and Interception. Nutrients. 11(6): 1226.

Hamed, I. 2016. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 15(6): 1104-1123

Hsueh, H.T ., Chu. H. and Yu, S. T. 2007 “A batch study on the bio-fixation of carbondioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae” Chemosphere. 66 P 878–886.

Kundu P., K. Anitha and N. Ramani. 2016. “Feeding Impact of The Vegetable Mite, Tetranychus neocaledonicus André (Acari: Tetranychidae) on Mentha Rotundifolia L.” Internation Journal of Recent Scientific Research. 7(4), 10406-10409.

Lam, M. K., Lee, K. T. and Mohamed, A. R. 2012 “Current status and challenges on microalgae-based carbon capture” International Journal of Greenhouse Gas Control. 10 P 456–469.

Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Gent. FAO.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Levasseur, W., Perre, P. and Pozzobon, V. 2020. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. Biotechnology Advances. 41: 107545.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., and Lan, C. Q. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 629–636.

Markou, G. and Nerantzis, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. Biotechnology Advances. 31(8): 1532-1542.

Microalgae biotechnology. 2014. Microalgae and its metabolites. [Online]. https://w3.ual.es/~jfernand/MBio70411204/Lesson1/Indice.html.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., and Shilton, A.N. 2011. Wastewater treatment high rate algae ponds for biofuel production. Bioresource Technology, 102, 35-42.

Rammuni, M.N., Ariyadasa, Thilini U., Nimarshana, P.H.V. and Nimarshana, P.H.V. 2019. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β-carotene from *D. salina*. Food Chemistry. 277: 128-134.

Sinha, R.P., Singh, S.P. and Häder, D.P. 2007. Database on mycosporines and mycosporinelike amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 89(1): 29-35.

Stark, Y. , Hsieh, Y. and Suzuki, T. 2003. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. Journal of the Tokyo University of Fisheries. 89: 1-6.

Stengel, D. and Connan, S. 2015. Marine algae: A source of biomass for biotechnological applications. Methods in Molecular Biology. 2015(1308): 1-37.

Stolz, P. and Obermayer, B. 2005. Manufacturing microalgae for skin care. Cosmetics and Toiletries. 120: 99-106.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 20 ลิตร ที่มีการเติมผงอาหาร MS ระหว่างการเพาะเลี้ยง

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยพลาสติก (Plastic cup)
2. ถังเพาะเลี้ยงขนาด 20 ลิตร
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
4. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
5. ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula Stainless)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH Meter)
7. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว
8. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
9. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope)
10. เครื่องวัดแสงสว่าง (Lux meter)

1.2 สารเคมี

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog (MS) Basal Medium with Vitamins (M519)

2. ขั้นตอนและวิธีการ

1. เตรียมน้ำใส่ถังเพาะเลี้ยง 3 ถัง ถังละ 20 ลิตร
2. เตรียมอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายใช้ความเข้มข้นของอาหาร MS คือ 1/150 MS เตรียมโดยชั่งอาหาร 0.0295 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/150 MS ปริมาตร 20 ลิตร ทำโดยชั่งอาหาร MS 0.59 กรัม ใส่ในทุกๆถัง และใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน
3. ปรับค่า pH ให้อยู่ในระดับ 6.00 – 7.00 โดยใช้ pH meter
4. ใส่หัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
5. นับจำนวนเซลล์เริ่มต้น โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)
6. ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ที่มีความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ ทุกๆถัง วัดค่าความเข้มแสงโดยใช้ Lux Meter
7. ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม
8. ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับเซลล์ (ภาคผนวก ง) และสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ (ภาคผนวก จ) ทุกๆวัน
9. ในวันที่ 11 ของการทดลอง เติมผงอาหาร MS 0.59 กรัมลงในถังที่ 2 และเติมผงอาหาร MS 1.18 กรัมลงในถังที่ 3
10. ทำการวัดการเจริญเติบโตดังข้อ 8 ต่อไปจนครบระยะเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร ที่ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่ต่างกัน

1. อุปกรณ์

1.1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยพลาสติก (Plastic cup)
2. เหยือกพลาสติกขนาด 3 ลิตร
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
4. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
5. ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula Stainless)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH Meter)
7. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว
8. หลอดไฟ LED แสงสีขาว 12 วัตต์ และ 25 วัตต์
9. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
10. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope)
11. เครื่องวัดแสงสว่าง (Lux meter)

1.2. สารเคมี

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog (MS) Basal Medium with Vitamins (M519)

2. ขั้นตอนและวิธีการ

1. เตรียมน้ำใส่ถังเพาะเลี้ยง 5 ถัง ถังละ 2.5 ลิตร
2. เตรียมอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายใช้ความเข้มข้นของอาหาร MS คือ 1/150 MS เตรียมโดยชั่งอาหาร 0.0295 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร ทำโดยชั่งอาหาร MS 0.074 กรัม ใส่ในทุกๆถัง จากนั้นใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน
3. ปรับค่า pH ให้อยู่ในระดับ 6.00 – 7.00 โดยใช้ pH meter
4. ใส่หัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นปริมาตร 5 – 10 มิลลิลิตร
5. ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน โดยถังที่ 1 ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ภายใต้ความเข้มแสง 1,900 ลักซ์ ถังที่ 2 ให้แสงสว่างภายใต้ความเข้มแสง2200 ลักซ์ ถังที่ 3 ให้แสงสว่างภายใต้ความเข้มแสง 5560 ลักซ์ ถังที่ 4 ให้แสงสว่างภายใต้ความเข้มแสง 7000 ลักซ์ และถังที่ 4 ให้แสงสว่างภายใต้ความเข้มแสง 13,000 ลักซ์
6. นับจำนวนเซลล์เริ่มต้น โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)
7. ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโตและปริมาณแคโรทีนอยด์ทุกๆวัน เป็นระยะเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร ที่มีการเติมผงอาหาร MS ระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความเข้มแสง 1900 ลักซ์

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยพลาสติก (Plastic cup)
2. เหยือกพลาสติกขนาด 3 ลิตร
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
4. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
5. ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula Stainless)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH Meter)
7. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว
8. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
9. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope)
10. เครื่องวัดแสงสว่าง (Lux meter)

1.2 สารเคมี

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog (MS) Basal Medium with Vitamins (M519)

2. ขั้นตอนและวิธีการ

1. เตรียมน้ำใส่ถังเพาะเลี้ยง 2 ถัง ถังละ 2.5 ลิตร
2. เตรียมอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 4.43 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายใช้ความเข้มข้นของอาหาร MS คือ 1/150 MS เตรียมโดยชั่งอาหาร 0.0295 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/150 MS ปริมาตร 2.5 ลิตร ทำโดยชั่งอาหาร MS 0.074 กรัม ใส่ในทุกๆถัง ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน
3. ปรับค่า pH ให้อยู่ในระดับ 6.00 – 7.00 โดยใช้ pH meter
4. ใส่หัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นปริมาตร 5 – 10 มิลลิลิตร
5. ให้แสงสว่าง 24 ชั่วโมงต่อวัน ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาว ที่มีความเข้มแสง 1,900 ลักซ์
6. นับจำนวนเซลล์เริ่มต้น โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)
7. ให้อากาศด้วยเครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อกับหัวทรายกลม
8. ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโต (ภาคผนวก ง) และสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ (ภาคผนวก จ) ทุกๆวัน
9. เติมผงอาหาร MS 0.59 กรัม ในวันที่ 11 ของการทดลอง
10. ทำการวัดการเจริญเติบโตดังข้อ 8 ต่อไปจนครบระยะเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ชุดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope)
2. ชุดนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
3. กระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
4. ไมโครปิเปต ขนาด 20 – 200 ไมโครลิตร
5. บีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร
6. กระดาษทิชชู่

2. ขั้นตอนและวิธีการ

1. เปิดก๊อกเพื่อนำน้ำสาหร่ายใส่บีกเกอร์แล้วเทกลับเข้าไปในถัง เพื่อให้น้ำค้างตรงหัวก๊อกออก แล้วใช้แท่งแก้วคนน้ำสาหร่ายเพื่อให้สาหร่ายกระจายทั่วถัง จากนั้นเก็บตัวอย่างสาหร่ายใส่บีกเกอร์ปริมาณเล็กน้อย
2. ทำความสะอาดชุดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ด้วยน้ำสะอาด เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่
3. ปิเปตน้ำสาหร่ายจากบีกเกอร์ หยดลงบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ
4. เตรียมกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยปรับคอนเดนเซอร์ (Condenser) ในระดับต่ำๆ เพื่อไม่ให้เกิดการรวมแสงไปที่วัตถุมากเกินไปจนสาหร่ายมีสีจาง ปรับเลนส์ใกล้วัตถุที่กำลังขยาย 4 เท่า
5. นำตัวอย่างสาหร่ายที่เตรียมไว้วางบนแท่นสไลด์ (Stage) วางให้ตรงที่หนีบสไลด์
6. ทำการส่องหาเซลล์สาหร่ายโดยปรับสไลด์ให้ต่ำสุดด้วยปุ่มปรับภาพหยาบ และเลื่อนขึ้นไปเรื่อยๆ จนมองเห็นวัตถุ จากนั้นหมุนเปลี่ยนเป็นกำลังขยาย 10 เท่า จะเริ่มเห็นเซลล์สาหร่าย ปรับภาพให้ชัดขึ้นด้วยปุ่มปรับภาพละเอียด และเปลี่ยนกำลังขยายเป็น 40 เท่า เพื่อนับจำนวนเซลล์
7. นับเซลล์ที่อยู่ตรง 25 ช่องตรงกลาง โดยเลือกนับ 5 ช่อง เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยเป็นจำนวนเซลล์ต่อช่อง และจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากความยาวและความกว้างของช่องใหญ่มีค่าเท่ากับ 1 มิลลิเมตร แบ่งเป็น 5 ช่อง จะได้ความยาวและกว้างของช่องเล็กเท่ากับ $\frac{1}{5} = 0.2$ มิลลิเมตร และมีความลึกเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร จาก 10 มิลลิเมตร เท่ากับ 1 เซนติเมตร ดังนั้นปริมาตรต่อหนึ่งช่องจะเท่ากับ 0.02 x 0.02 x 0.01 เท่ากับ 4×10^{-6} ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรมีค่า เท่ากับ 1 มิลลิลิตร จึงสามารถเทียบจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรได้
8. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับเวลาที่เพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การสกัดหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ โดยใช้อะซิโตนเป็นตัวสกัด ด้วยเทคนิคการเขย่าโดยใช้ความร้อนช่วย

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
2. บีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. กรวยกรอง (Funel)
4. หลอดทดลอง (Test tube)
5. ชุดกรองสุญญากาศ (Filtration Assembly)
6. เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorption spectrophotometer)
8. กระบอกตวง (Graduated Cylinder)
9. ขวดลดความดัน (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
10. ไมโครปิเปต ขนาด 10 – 1000 ไมโครลิตร และ ขนาด 2 – 10 มิลลิลิตร
11. คิวเวทท์ (Cuvette)
12. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube Rack)

2. ขั้นตอนและวิธีการ

1. ปิเปตอะซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และตัวอย่างสาหร่าย 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เตรียมน้ำใส่บีกเกอร์ปริมาตร 60 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอุ่นในไมโครเวฟ 2 นาที
3. นำหลอดทดลองทั้งหมดใส่บีกเกอร์ ทำการสกัดด้วยวิธีการเขย่า ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ในช่วง 50 – 55 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเป็นเวลา 30 นาที
4. เมื่อครบเวลานำไปกรองสุญญากาศเพื่อแยกส่วนเซลล์สาหร่ายออก
5. นำส่วนใสที่ได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร โดยใช้อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 645 และ 663 นาโนเมตร โดยใช้อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์เป็นแบลงค์
7. นำค่าที่ได้ไปคำนวณโดยใช้สูตรคำนวณของ Kundu et al., 2016 ดังนี้

$$\text{Chlorophyll a (mg/L)} = \frac{[12.7\ (A_{663}) - 2.69\ (A_{645})]}{(1000 \times V_2)} \times V_1$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/L)} = \frac{[22.9\ (A_{645}) - 4.68\ (A_{663})]}{(1000 \times V_2)} \times V_1$$

$$\text{Total Chlorophyll (mg/L)} = \frac{[20.2\ (A_{645}) + 8.02\ (A_{663})]}{(1000 \times V_2)} \times V_1$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Carotenoid (mg/L)

$$= \frac{[1000(A_{470}) - 3.27\{(\text{Chlorophyll a}) - (\text{Chlorophyll b})\}]}{(229 \times V_2)} \times V_1$$

โดยกำหนดให้

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่กำหนด

V_1 = ปริมาตรสุดท้ายที่สกัดด้วยอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์

V_2 = ปริมาตรของสาหร่ายที่นำมาสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

วิธีการเก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัดด้วยซอกห์เลต

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องเซนติฟิวก์ (Centifuge)
2. หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
4. แม่พิมพ์ซิลิโคน
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)

2. ขั้นตอนและวิธีการ

1. นำเซลล์สาหร่ายมาเซนติฟิวก์ให้ได้แค่ส่วนเซลล์
2. นำส่วนเซลล์ใส่แม่พิมพ์ซิลิโคน
3. นำไปอบแห้งข้ามคืนในตู้อบลมร้อนที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
4. นำเซลล์ออกจากแม่พิมพ์ซิลิโคนใส่ขวดแก้ว (ที่ทราบน้ำหนัก)
5. นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง
6. บันทึกน้ำหนักเซลล์แห้งและระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง
7. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเตรียมใช้ในการสกัดด้วยวิธีซอกห์เลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

การสกัดด้วยวิธีซอกห์เลต

1. **อุปกรณ์**
   1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์
      1. ชุดสกัดซอกห์เลต (Soxhlet extractor)
      2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
      3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
      4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
      5. เครื่องมินิเซนติฟิวก์ (Centifuge)
      6. หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube)
      7. เครื่อง Rotary Evaporator
2. **ขั้นตอนและวิธีการ**
      1. นำเซลล์สาหร่ายแห้งที่รวบรวมไว้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน และ 20 วัน
      2. นำเซลล์สาหร่ายแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา จากนั้นนำไปใส่ในกระดาษกรอง (ที่ทราบน้ำหนัก)
      3. นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
      4. นำเซลล์ไปสกัดด้วยวิธีซอกห์เลต โดยใช้ตัวทำละลายคือเฮกเซน โดยใส่เฮกเซนปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลม
      5. สังเกตสีของตัวทำละลายใน Thimble ที่ใสขึ้นจึงถือว่าการสกัดเสร็จสมบูรณ์ จากนั้นนำสารสกัดกรองใส่ขวดดูแรน
      6. นำสารสกัดไปทำการ Evaporation ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator
      7. ใช้หลอดหยดสารดูดสารสกัดใส่ขวดแก้ว (ที่ทราบน้ำหนัก)
      8. นำสารสกัดไปอบข้ามคืนในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำมาชั่งหาน้ำหนักสารสกัด
      9. นำสารสกัดที่ได้มาละลายในตัวทำละลาย โดยใช้สารสกัด 01 กรัม ต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร
      10. นำสารสกัดไปเซนติฟิวก์ จากนั้นส่งตรวจ GC-MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 24 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว นาตารี มานหมัด รหัสประจำตัว 62050610
นางสาว วิสสุตา พิศวง รหัสประจำตัว 62050650
นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษเรื่อง

ชื่อภาษาไทย	อิทธิพลของความเข้มแสงและการเติมอาหารระหว่างการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียวที่เลี้ยงในระบบ Fed-batch culture
ชื่อภาษาอังกฤษ	Effect of light intensity and adding nutrient during growth of Unicellular algae cultured in fed-batch system
ปีการศึกษา	2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 5.63 %

ลงชื่อ.....นาตารี มานหมัด.....
(นางสาว นาตารี มานหมัด)
นักศึกษา

ลงชื่อ.....วิสสุตา พิศวง.....
(นางสาว วิสสุตา พิศวง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....
(ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้