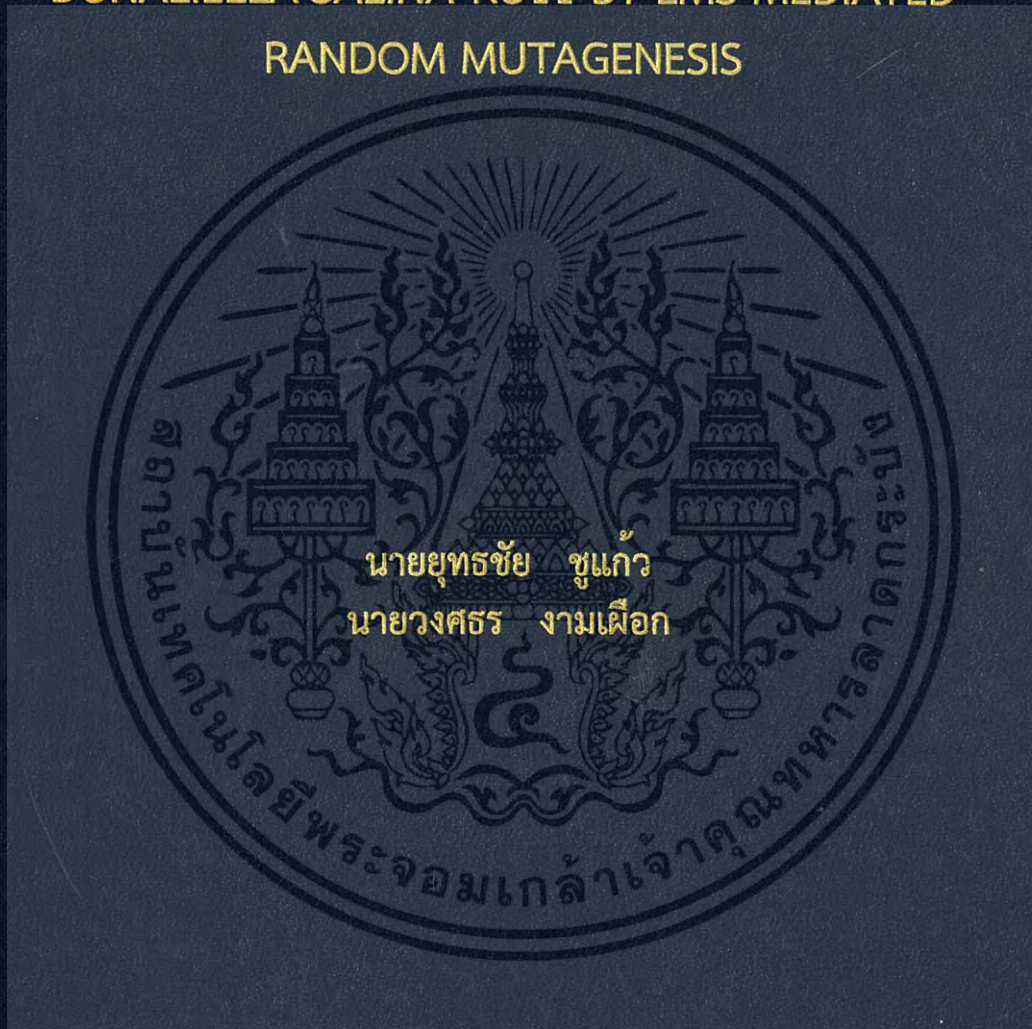


ผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ขนาดเซลล์ และชีวมวลของ  
*DUNALIELLA SALINA* KU11 จากการใช้สารเคมี EMS ทำให้  
เกิดกระบวนการกลายพันธุ์แบบสุ่ม

EFFECT ON GROWTH, CELL SIZE AND BIOMASS OF  
*DUNALIELLA SALINA* KU11 BY EMS-MEDIATED  
RANDOM MUTAGENESIS



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

ผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ขนาดเซลล์ และชีวมวลของ  
*DUNALIELLA SALINA* KU11 จากการใช้สารเคมี EMS ทำให้  
เกิดกระบวนการกลายพันธุ์แบบสุ่ม

EFFECT ON GROWTH, CELL SIZE AND BIOMASS OF  
*DUNALIELLA SALINA* KU11 BY EMS-MEDIATED  
RANDOM MUTAGENESIS



นายยุทธชัย ชูแก้ว

นายวงศธร งามเฟือก

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT ON GROWTH, CELL SIZE AND BIOMASS OF  
DUNALIELLA SALINA KU11 BY EMS-MEDIATED  
RANDOM MUTAGENESIS



MR.YUTACHAI CHOOWKAEW  
MR.VONGSATHORN NGAMPUAK

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF  
SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY PROGRAM)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ ผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ขนาดเซลล์ และชีวมวลของ *Dunaliella salina* KU11 จากการใช้สารเคมี EMS ทำให้เกิด กระบวนการกลายพันธุ์แบบสุ่ม  
Effect On Growth, Cell Size And Biomass Of *Dunaliella salina* KU11 By EMS-Mediated Random Mutagenesis

ชื่อนักศึกษา นายยุทธชัย ชูแก้ว รหัสนักศึกษา 55051369

นายวงศธร งามเฟือก รหัสนักศึกษา 55051384


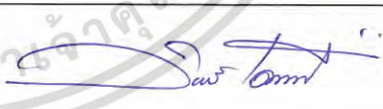
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา (สาขาวิชาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.วีณา ชูโชติ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้อยู่ที่เห็นได้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ขนาดเซลล์ และชีวมวลของ <i>Dunaliella salina</i> KU11 จากการใช้สารเคมี EMS ทำให้เกิดกระบวนการกลายพันธุ์แบบสุ่ม	
ชื่อนักศึกษา	นายยุทธชัย ชูแก้ว	รหัสนักศึกษา 55051369
	นายวงศธร งามเฟือก	รหัสนักศึกษา 55051384
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	
ปีการศึกษา	2558	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์	

### บทคัดย่อ

*Dunaliella salina* เป็นสาหร่ายที่จัดว่ามีประโยชน์เชิงพาณิชย์ เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์และทางการแพทย์ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตนี้สามารถสะสมสารไตรเอทิลกลีเซอรอล (TAG) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญต่อการผลิตไบโอดีเซล จุดประสงค์ในงานวิจัยนี้ต้องการหาสายพันธุ์ *D. salina* ที่เจริญเติบโตและมีการสะสมชีวมวลที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (*D. salina* KU11) ในการทดลองนี้ได้ใช้สารเคมี Ethyl Methane Sulfonate (EMS) เหนี่ยวนำไปให้เกิดเซลล์กลายพันธุ์ หรือมิวแทนท์ หลังจากการบ่มด้วยสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 0.8-1.68% พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.44% EMS มีความเหมาะสมต่อการคัดเลือกหา *D. salina* สายพันธุ์ใหม่ เนื่องจากสาหร่ายแยกเป็นโคลนนี้เพียงจำนวน 300 โคลนนี้ จากการคัดเลือกเบื้องต้น พบว่า มิวแทนท์หมายเลข 17 และ 24 แสดงอัตราการเจริญเติบโตและมีการสะสมจำนวนเซลล์ในระยะ stationary ที่เพิ่มขึ้นถึง 1.8 และ 1.45 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง นอกจากนี้มิวแทนท์หมายเลข 24 มีการสะสมชีวมวลของสาหร่ายมากกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง ในช่วงระยะ log จนถึง early stationary (วันที่ 3-5) ประมาณ 1.37 เท่า จากผลการศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้สรุปได้ว่า มิวแทนท์ 2 สายพันธุ์ ที่มีการปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้อาจมีประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ และเป็นการนำความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่าย

คำสำคัญ : *Dunaliella salina* EMS ขนาดเซลล์ ชีวมวล มิวแทนท์ อัตราการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect On Growth, Cell Size And Biomass Of <i>Dunaliella salina</i> KU11 By EMS-Mediated Random Mutagenesis	
Students	Mr.Yutachai chookaew	Student ID 55051369
	Mr.Vongsathorn Ngampuak	Student ID 55051384
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology Program)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2015	
Advisor	Dr. Wipawee Dejtsakdi	

### ABSTRACT

*Dunaliella salina* is an economically microalgal because it has several benefits for nutraceutical and pharmaceutical product including triacylglycerol (TAG) for biofuel product production. This research aim is to generate a better *Dunaliella salina* strain that is improving growth rate and biomass compared to wild type (*D. salina* KU11). In this study, we induced *Dunaliella* mutant strains by using EMS mutagenesis that *Dunaliella* cells were treated with a varying of 0.8 – 1.68% of EMS concentration. We found that EMS at 1.44% was an optimal concentration to give rise approximately 300 isolated colonies. From the initial screening of those 30 of 300 colonies, we found two mutant strains (# 17 and 24) were improving growth rate and final cell accumulation at stationary phase up to 1.8 and 1.45 fold, respectively, compared to wild type. In additional, mutant # 24 had shown higher biomass accumulation than wild type approximately 1.37 fold while entering log phase through early stationary phase (day 3 to 5). From this preliminary study, we concluded that there were two mutant strains that showed a promising phenotype for growth rate and biomass improvement. This finding in *Dunaliella* could be possibly amendable for upscale production of some valuable products and feasible for biotechnology application platform in Thailand.

**Keywords:** *Dunaliella salina*, EMS, Cell size, Biomass, Mutants, Growth rate

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลผู้มีพระคุณ ดังต่อไปนี้ ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ (อาจารย์ที่ปรึกษา), ผศ.ดร.ดวงกมล เรืองงาม (กรรมการ) และ ผศ. วีน่า ชูโชติ (กรรมการ) รวมทั้งท่านอาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อีกทั้งท่านอาจารย์ดร. นิรันดร์ จันทวงศ์ ซึ่งท่านเป็นอาจารย์ประจำมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และที่แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้แก่ ดร. Ramaraj Sathasivam และ ดร. Zhe Wu ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาอย่างใกล้ชิด รวมทั้งเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา ตลอดจนตรวจแก้สัมมนาฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจ รวมถึงข้อเสนอแนะตลอดในการทำโครงการพิเศษนี้ฉบับนี้

ยุทธชัย ชูแก้ว  
วงศธร งามเผือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 สาหร่ายสกุล <i>Dunaliella</i> .....	4
2.2 การปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> .....	14
2.3 การกลายพันธุ์.....	22
2.4 สารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) .....	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	30
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	30
3.2 สารเคมี .....	30
3.3 สูตรอาหารและสารละลาย .....	30
3.4 สายพันธุ์สาหร่ายและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย .....	32
3.5 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Standard growth curve) .....	32
3.6 การทดสอบโดยสารเคมี EMS (Killing curve) .....	33
3.7 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>D. salina</i> สายพันธุ์มิวแทนท์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง.....	34
3.8 การวัดชีวมวลของสาหร่าย <i>D. salina</i> มิวแทนท์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง.....	35
3.9 การวิเคราะห์เชิงสถิติ.....	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	37
4.1 ผลการวิจัย.....	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การอภิปรายผล .....	47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	50
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	50
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	51
เอกสารอ้างอิง .....	52
ภาคผนวก.	
ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	91
ภาคผนวก ข.....	97



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตารางอาหารสูตร Modified Johnsons Medium (J/L).....	10
3.1 อาหารสูตร Modified Ramaraj Medium.....	31
3.2 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB buffer) 0.1 M.....	32
4.1 ตารางแบบเมตริกซ์แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของแต่ละสายพันธุ์ที่ละคู่.....	43
ก.1 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของ <i>D. salina</i> KU11 ทั้งหมด 3 ซ้ำ.....	58
ก.2 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> KU11 โดยวิธีการนับเซลล์.....	59
ก.3 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 6 ทั้งหมด 3 ซ้ำ.....	60
ก.4 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 6 โดยวิธีการนับเซลล์.....	61
ก.5 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 7 ทั้งหมด 3 ซ้ำ.....	62
ก.6 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 7 โดยวิธีการนับเซลล์.....	63
ก.7 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 17 ทั้งหมด 3 ซ้ำ.....	64
ก.8 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 17 โดยวิธีการนับเซลล์.....	66
ก.9 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 23 ทั้งหมด 3 ซ้ำ.....	66
ก.10 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 23 โดยวิธีการนับเซลล์.....	68
ก.11 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 24 ทั้งหมด 3 ซ้ำ.....	69
ก.12 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 24 โดยวิธีการนับเซลล์.....	70
ก.13 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 28 ทั้งหมด 3 ซ้ำ.....	71
ก.14 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 28 โดยวิธีการนับเซลล์.....	72
ก.15 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของ <i>D. salina</i> KU11 ทั้งหมด 2 ซ้ำ.....	73
ก.16 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> KU11 โดยวิธี OD.....	74
ก.17 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 6 ทั้งหมด 2 ซ้ำ.....	75
ก.18 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 6 โดยวิธี OD.....	77
ก.19 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 7 ทั้งหมด 2 ซ้ำ.....	77
ก.20 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 7 โดยวิธี OD.....	79
ก.21 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 17 ทั้งหมด 2 ซ้ำ.....	80
ก.22 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 17 โดยวิธี OD.....	81
ก.23 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 23 ทั้งหมด 2 ซ้ำ.....	82
ก.24 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 23 โดยวิธี OD.....	83
ก.25 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหว่ายมิวแทนท์ที่ 23 ทั้งหมด 2 ซ้ำ.....	84
ก.26 แสดงค่า ANOVA ของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์ที่ 24 โดยวิธี OD.....	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ก.28 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 28 โดยวิธี OD..... 88



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ประโยชน์ของสาหร่ายสายพันธุ์ <i>D. salina</i> เทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ.....	4
2.2 รูปทางสัณฐานวิทยาของ 1 <i>D. acidophila</i> , 2. <i>D. flagellate</i> , 3. <i>D. lateralis</i> , 4. <i>D. oblique</i> , 5. <i>D. paupera</i> , 6. <i>D. maritima</i> , 7. <i>D. polymorpha</i> , 8. <i>D. primolecta</i> , 9. <i>D. quartolecta</i> , 10. <i>D. tertiolecta</i> , 11. <i>D. parva</i> , 12. <i>D. pseudosalina</i> , 13. <i>D. salina</i> , 14. <i>D. baas-beckingii</i> , 15. <i>D. bioculata</i> , 16. <i>D. carpatica</i> , 17. <i>D. gracilis</i> . 18. <i>D. granulata</i> , 19. <i>D. media</i> , 20. <i>D. minuta</i> , 21. <i>D. minutissima</i> , 22. <i>D. ruineniana</i> , 23. <i>D. terricola</i> , 24. <i>D. viridis</i> , 25. <i>D. asymmetrica</i> , 26. <i>D. jacobae</i> , 27. <i>D. peircei</i> , 28. <i>D. turcomanica</i> . ขนาด 10 ไมโครเมตร.....	5
2.3 ช่วงความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญใน <i>Dunaliella</i> sp.....	7
2.4 แสดงองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบ (% น้ำหนักแห้ง) ของสาหร่ายในช่วงระยะ exponential growth phase.....	11
2.5 โครงสร้างแคโรทีนอยด์ทั้ง 6 ชนิด.....	12
2.6 โครงสร้างกลีเซอรอล.....	13
2.7 แสดงลักษณะของเซลล์สำหรับ <i>D. salina</i> ที่มีการเปลี่ยนรูปร่างและเปลี่ยนสีใน การสะสมสารเบต้าแคโรทีน.....	14
2.8 ชายฝั่งของทะเลสาบอูร์เมียที่มีความเค็มมากและน้ำทะเลที่มีสีแดงเนื่องจากมี เหล็กเป็นองค์ประกอบ.....	15
2.9 รูปของ DNA และองค์ประกอบภายใน.....	23
2.10 การกลายพันธุ์ชนิด Transition และ Transversion.....	24
2.11 การแทรกสารพันธุกรรม (Insertion).....	24
2.12 การลบสารพันธุกรรมออก (Deletion).....	25
2.13 โครงสร้างสารเคมี EMS.....	27
3.1 <i>D. salina</i> ทดสอบกับสารเคมี EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.18, 0.8, 1.44, 1.68% ตามลำดับ ด้วยเทคนิค spread plate.....	33
3.2 แสดงรูปโคโลนีเดี่ยวทั้งหมด 30 โคโลนีด้วยเทคนิค simple streak.....	34
3.3 <i>D. salina</i> มิวแตนท์ 25 สายพันธุ์ เลี้ยงใน 25-well plates.....	34
3.4 <i>D. salina</i> มิวแตนท์ 6 สายพันธุ์ ควบคู่กับสายพันธุ์พื้นเมือง (หมายเลข 6, 24, 28, สายพันธุ์พื้นเมือง, 7, 17, 23 จากซ้ายไปขวา).....	35
4.1 กราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย <i>D. salina</i> KU11 (สายพันธุ์พื้นเมือง).....	37
4.2 แสดงจำนวนโคโลนีของ <i>D. salina</i> ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย EMS : ความเข้มข้นของ EMS ที่ ก 0%, ข 0.8%, ค 1%, ง 1.2%, จ 1.44%, ฉ 1.68%.....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเคมี EMS กับ ปริมาณเซลล์ (cfu/ml) เครื่องหมาย * แสดงถึงอัตราการรอดชีวิตที่ไม่สามารถนับเป็นโคโลนีได้ (TNTC).....	38
4.4 <i>D. salina</i> มิวแตนต์ จำนวน 30 โคโลนีจากทั้งหมด 300 โคโลนี บน อาหารแข็งสูตร Ramaraj medium ด้วยเทคนิค simple streak.....	39
4.5 การคัดเลือก <i>D. salina</i> มิวแตนต์ที่มีสีเขียวเข้มกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง หลังจากวันที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Ramaraj medium ปริมาตร 3 มิลลิลิตร.....	40
4.6 <i>D. salina</i> มิวแตนต์ 6 สายพันธุ์ (6,7,17,23,24,28) เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเปรียบเทียบกับสีเขียวของ (ก) สีเขียวเข้มกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง (6,24,28) (ข) สีเขียวเข้มน้อยกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง (7,17,23) (ค) สายพันธุ์พื้นเมือง.....	40
4.7 แสดงอัตราการเจริญของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่โตเร็ว เมื่อเปรียบ เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์.....	41
4.8 รูปการเพาะเลี้ยง <i>D. salina</i> มิวแตนต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่โตเร็ว (หมายเลข 17, 24) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (ก) ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วันที่ 6.....	41
4.9 แสดงอัตราการเจริญของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่โตช้า เมื่อเปรียบ เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์.....	42
4.10 รูปการเพาะเลี้ยง <i>D. salina</i> มิวแตนต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่โตช้า (หมายเลข 6, 7, 23, 28) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (ก) ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วันที่ 6.....	42
4.11 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์ 4 สายพันธุ์ (6, 7, 23 และ 28) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งวัดค่า OD โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....	44
4.12 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์ 4 สายพันธุ์ (17 และ 24) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งวัดค่า OD โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....	44
4.13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์ ทั้ง 6 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์พื้นเมือง.....	45
4.14 แสดงการวัดขนาดเซลล์ของ <i>D. salina</i> ในแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ ocular micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ก สายพันธุ์พื้นเมือง, ข มิวแตนต์หมายเลข 6, ค มิวแตนต์หมายเลข 7, ง มิวแตนต์หมายเลข 17, จ มิวแตนต์หมายเลข 23, ฉ มิวแตนต์หมายเลข 24, และ ช มิวแตนต์หมายเลข 28 ตามลำดับ.....	45

## สารบัญรูป (ต่อ)

4.15 การสะสมมวลชีวภาพของสายพันธุ์มิวแตนต์หมายเลข 24 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยทำการทดลองทั้งหมด 1 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ครั้ง ในวันที่ 3 และ 4 .....	46
4.16 การสะสมมวลชีวภาพของสายพันธุ์มิวแตนต์หมายเลข 24 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ครั้ง ในวันที่ 5, 6, 7 และ 8.....	46
ก.1 การแจกแจงแบบ F ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05.....	89
ข.1 รูปกราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย <i>D. salina</i> KU11 ซ้ำที่ 1.....	90
ข.2 รูปกราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย <i>D. salina</i> KU11 ซ้ำที่ 2.....	90
ข.3 รูปกราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย <i>D. salina</i> KU11 ซ้ำที่ 3.....	91
ข.4 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ ซ้ำที่ 1.....	92
ข.5 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ ซ้ำที่ 2.....	93
ข.6 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ ซ้ำที่ 3.....	93
ข.7 กราฟแสดงความหนาแน่นของเซลล์ <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยวิธี OD ซ้ำที่ 1.....	94
ข.8 กราฟแสดงความหนาแน่นของเซลล์ <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยวิธี OD ซ้ำที่ 2.....	95
ข.1 แสดงการทดสอบ <i>D. salina</i> กับสารเคมี EMS รอบที่ 1.....	96
ข.2 แสดงการทดสอบ <i>D. salina</i> กับสารเคมี EMS รอบที่ 2.....	96
ข.3 แสดงรูปร่างโคโลนีเดี่ยวทั้งหมด 30 โคโลนี.....	97
ข.4 <i>D. salina</i> มิวแตนต์ 25 สายพันธุ์ เลี้ยงใน 25-well plates.....	97
ข.5 <i>D. salina</i> มิวแตนต์ 10 สายพันธุ์ ควบคุมกับสายพันธุ์พื้นเมือง.....	98
ข.6 <i>D. salina</i> มิวแตนต์ 6 สายพันธุ์ ควบคุมกับสายพันธุ์พื้นเมือง.....	98
ข.7 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 0.....	99
ข.8 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 1.....	99
ข.9 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 2.....	99
ข.10 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 3.....	100

## สารบัญรูป (ต่อ)

ข.11 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 4.....	100
ข.12 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 5.....	100
ข.13 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 6.....	101
ข.14 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 7.....	101
ข.15 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 8.....	101
ข.16 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 9.....	102
ข.17 แสดงการเจริญเติบโตของ <i>D. salina</i> มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 10.....	102
ข.18 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 3 ครั้งที่ 1 (ชาย) และครั้งที่ 2 (ขวา).....	103
ข.19 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 4 ครั้งที่ 1 (ชาย) และครั้งที่ 2 (ขวา).....	103
ข.20 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 5 ครั้งที่ 1 (ชาย) และครั้งที่ 2 (ขวา).....	103
ข.21 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 6 ครั้งที่ 1 (ชาย) และครั้งที่ 2 (ขวา).....	104
ข.22 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 7 ครั้งที่ 1 (ชาย) และครั้งที่ 2 (ขวา).....	104
ข.23 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 8 ครั้งที่ 1 (ชาย) และครั้งที่ 2 (ขวา).....	104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
<i>D. salina</i>	<i>Dunaliella salina</i>
EMS	Ethyl Methane Sulfonate
WT	สายพันธุ์พื้นเมือง
OD	optical density



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

สาหร่าย *Dunaliella salina* เป็นสาหร่ายที่จัดว่ามีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง เนื่องจากเป็นแหล่งสะสมของสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์และทางการแพทย์ เช่น แคลโรทีนอยด์ อีกทั้งยังพบว่า *D. salina* เป็นสาหร่ายที่สะสมไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย ด้วยเหตุนี้นักวิจัยบางกลุ่มเล็งเห็นความสำคัญเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพและมูลค่าของสาหร่ายชนิดนี้ให้เป็นแม่แบบในการประยุกต์ ทั้งในด้านอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหารเสริม อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชภัณฑ์ เป็นต้น และทางด้านพลังงาน เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งเป็นหนึ่งในแหล่งพลังงานทดแทนและพลังงานสะอาดที่สำคัญ

สาหร่ายสายพันธุ์ *D. salina* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว พบได้ทั้งในทะเลและดินที่มีความเค็ม (Borowitzka และคณะ, 1988) ซึ่งสามารถทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 3% ถึงประมาณ 31% (Massyuk, 1973) อีกทั้งมีคุณสมบัติทนต่อช่วงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 5-11 รวมทั้งสามารถทนอุณหภูมิได้  $<0^{\circ}\text{C}$  ถึง  $>38^{\circ}\text{C}$  (Ginzburg และคณะ, 1987) ด้วยคุณสมบัติของ *D. salina* ที่กล่าวมาข้างต้นจึงมีหลายงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาถึงวิธีการปรับปรุงของสาหร่ายสายพันธุ์ *D. salina* เพื่อประโยชน์ทางด้านธุรกิจเกี่ยวกับสุขภาพและพลังงานทดแทน ดังกล่าว (Borowitzka และคณะ, 1988)

จากงานวิจัยเบื้องต้นได้ปรับปรุงเพื่อประสิทธิภาพของสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ *D. salina*, *D. parva* และ *D. tertiolecta* เป็นต้น ในหลากหลายวิธี เช่น บางงานวิจัยได้มีการปรับปรุงโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในสาหร่าย *D. parva* เพื่อเพิ่มผลผลิตทางด้าน เชื้อเพลิงชีวภาพ (biodiesel) โดยการโคลน promoter ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอโนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ TAG และถ่ายเข้าสู่เซลล์สาหร่าย เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนซึ่งมีผลต่อการเพิ่มปริมาณชีวมวล (Alison และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบสารฟีนอลกับ *D. salina* ซึ่งสารฟีนอลสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นสาหร่าย โดยใช้ความเข้มข้นที่ 155.03 มิลลิกรัม/ลิตร และมีผลทำให้อัตราส่วนของคลอโรฟิลล์ เอ/บี ลดลงรวมทั้งผลได้ของชีวมวลลดลงด้วย ซึ่งสารฟีนอลทำให้สะสมสาร malondialdehyde เพิ่มขึ้นรวมถึงเอนไซม์ superoxide dismutase เพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งให้เห็นว่าสารฟีนอลเหนี่ยวนำให้เกิดการ oxidation หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารฟีนอล จากนั้นถ่ายเชื้อสู่อาหารที่ปราศจากฟีนอล พบว่า *D. salina* มีอัตราการเจริญที่เร็วขึ้น คือปริมาณเซลล์เพิ่มเร็วขึ้น 41% ซึ่งจากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า การปรับตัวให้สามารถอยู่รอดได้ของสาหร่ายต่อพิษของสารฟีนอลและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตชีวมวลได้ (Kichul และคณะ, 2016) อีกทั้งมีการศึกษาถึงผลกระทบของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนต่อคุณสมบัติการเจริญของสาหร่าย *D. salina* ภายใต้การเลี้ยงแบบ turbidostat โดยมีระบบการให้แสงที่คงที่ ซึ่งพบว่า สาหร่ายมีอัตราการเจริญที่สูงขึ้นและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูเท่านั้น เมื่อผู้ผู้เห็นใบเขียวระบบอัตโนมัติที่กรีนค่า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการสะสมชีวมวลปริมาณมากขึ้นประมาณ 2 เท่า โดยเกิดจากการเพิ่มขึ้นชั่วคราวของอัตราการแบ่งเซลล์และการฟองตัวของเซลล์ (Packo และคณะ, 2012) นอกจากนี้มีการปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น มีการศึกษาในสาหร่ายทะเลจำพวกไดอะตอม อย่าง *Phaeodactylum tricornutum* โดยใช้รังสียูวีซี (UV-C) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีการสะสมชีวมวลที่มากขึ้น พบว่าสายพันธุ์มิวแทนต์เกิดการสะสมชีวมวลในปริมาณมากกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง (Zhiqian และคณะ, 2015) และยังมีการใช้สารเคมี EMS กับ *D. salina* เพื่อเพิ่มผลผลิตของชีวมวลอีกด้วย ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของสาร EMS ที่ 0.1 M ทำให้สาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนต์มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่าสายพันธุ์พื้นเมือง 3 เท่า (Kawaroe และคณะ, 2015) ซึ่งวิธีการนี้ยังประสบความสำเร็จในสาหร่ายชนิดอื่นอีกด้วย เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* โดยทำให้เกิดสาหร่ายมิวแทนต์ที่มีอัตราการเจริญที่เร็วขึ้น (Lee และคณะ, 2014) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี Ethyl Methane Sulfonate (EMS) เป็นวิธีที่ง่าย และได้ลักษณะการแสดงออกภายนอก (Phenotype) ที่หลากหลายอีกทั้งมีราคาถูกจึงมีการศึกษาที่แพร่หลาย

ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเสนอวิธีการใช้สารเคมี EMS ซึ่งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับพันธุกรรม (genetic mutation) มาทดสอบกับสาหร่าย *D. salina* KU11 ซึ่งเป็นสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในประเทศไทย (Sathasivam และคณะ, 2013) ในงานวิจัยนี้ผู้ทดลองได้นำ *D. salina* KU11 มาทดสอบกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ และคัดเลือกหาสาหร่ายมิวแทนต์ที่เกิดขึ้น มาวัดค่าอัตราการเจริญเติบโตและวัดปริมาณชีวมวล

โดยงานวิจัยนี้นำมาซึ่งประโยชน์ทางด้านการหาสายพันธุ์สาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาด้านวัตถุดิบที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมพลังงานและอาหารเสริมในประเทศไทย รวมทั้งการศึกษาในระดับพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องต่อไปในภายภาคหน้า

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 ทราบถึงความเข้มข้นของสารเคมี EMS ที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์มิวแทนต์

1.2.2 ได้สาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนต์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์พื้นเมือง

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ในโครงการพิเศษนี้จะเริ่มจากการเพิ่มการสะสมจำนวนของสาหร่าย *D. salina* ในอาหารสูตร RAMARAJ MEDIUM (Sathasivam และคณะ, 2013) จากนั้นจะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายในระยะ log phase เพื่อนำมาหาอัตราการรอดชีวิตที่ 30% Killing curve โดยใช้สารเคมี EMS และนำเซลล์สาหร่ายที่เกิดการตัดแปลงพันธุกรรมมาวัดค่าอัตราการเจริญเติบโตโดยเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง และวัดชีวมวลของสาหร่าย รวมถึงหาปริมาณเบต้าแคโรทีนเพื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เมือง

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 เรียนรู้เทคนิคในการเลี้ยงและวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina*
- 1.4.2 สามารถชักนำให้เกิดสาหร่ายมิวแทนท์ โดยใช้สาร EMS ที่คาดว่าสาหร่ายที่ถูกกลายพันธุ์อาจจะมีการเพิ่มอัตราการเจริญ, ชีวมวล และผลผลิตปริมาณเบต้าแคโรทีน เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง
- 1.4.3 สามารถต่อยอดเชิงลึกเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของสาหร่าย *D. salina* สำหรับสายพันธุ์ที่มีการปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโต
- 1.4.4 เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตเบต้าแคโรทีนในระดับอุตสาหกรรมและสารสำคัญเพื่อเป็นวัตถุดิบในการพลังงานทดแทนต่อไปในภายภาคหน้า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สาหร่ายสกุล *Dunaliella*

#### 2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สาหร่ายในสกุล *Dunaliella* สามารถพบได้หลากหลายชนิดอันได้แก่ *D. pauper*, *D. tertiolecta*, *D. parva*, *D. pseudosalina*, *D. salina*, *D. baas-beckingii* เป็นต้น ซึ่งในศตวรรษที่ 18 นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสกุล *Dunaliella* เหมือนกับสกุล *Haematococcus* แต่หลังจากศตวรรษที่ 19 นักวิทยาศาสตร์ได้รายงานว่ามีหลักฐานที่สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความแตกต่างจากสกุล *Haematococcus* จึงเปลี่ยนเป็นชื่อสามัญใหม่เป็น *Dunaliella* (Mansour Shariati และ Mohammad Reza Hadi) ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยใช้สาหร่าย *D. salina* เป็นต้นแบบในการทดลองเพราะเป็นสายพันธุ์ที่ทนทานต่อหลากหลายสภาวะแวดล้อมและมีประโยชน์เชิงพาณิชย์ รวมถึงองค์ความรู้ต่อไปในอนาคตมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ (รูปที่ 2.1)

Species	Proposed application	References
<i>Dunaliella</i> spp.	Source of glycerol-liquid biofuel Removing of heavy metal, treating wastewater	Ben-Amotz and Avron (1980); Ginzburg and Ginzburg (1993); Grizeau and Navarro (1986); Tsukahara and Sawayama (2005) Takimura <i>et al.</i> (1996); Thakur and Kumar (1999); Hirata <i>et al.</i> (2001); Tsuji <i>et al.</i> 2002
<i>D. salina</i>	Food and supplement Source of carotinoids, vitamins and antioxidants Source of PUFA( $\omega_3$ polyunsaturated fatty acids) Biological reactors Single cell protein (SCP), minerals	Kay (1991) Chidambara Murthy <i>et al.</i> (2005); Milko (1963) Abd El-Baky <i>et al.</i> (2004) Geng <i>et al.</i> (2003) Supamattaya <i>et al.</i> (2005)
<i>D. tertiolecta</i>	Enzymes SCP, minerals Ecological indicators	Ben-Amotz and Avron (1990) Fabregas and Herrero (1985) Hall and Golding (1998)
<i>D. primolecta</i>	Source of bioactive compounds	Borowitzka(1995)
<i>D. viridis</i>	Source of antibiotic substances Source of oxygenated carotenoids	Chang <i>et al.</i> (1993) Moulton and Burford (1990)

รูปที่ 2.1 ประโยชน์ของสาหร่ายสายพันธุ์ *D. salina* เทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ

ที่มา: Tafreshi และคณะ, 2007

*D. salina* เป็นสาหร่ายทะเลเซลล์เดี่ยว ซึ่งมีสีเขียวขนาดเล็กเป็นทรงรีหรือกลม, ทรงไข่ ซึ่งรูปทรงของเซลล์สาหร่ายนี้ไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยงในข้อจำกัดต่างๆ และสายพันธุ์ของสาหร่ายอีกด้วย (Massyuk, 1973) นอกจากนั้นยังพบแฟลเจลลัม 2 เส้น ที่ยาวไม่เท่ากัน และเป็นสาหร่ายที่ไม่มีผนังเซลล์มาห่อหุ้ม เรียกว่า Naked cell ยังพบคลอโรพลาสต์คล้ายกับรูปถ้วย มีไพรีนอยด์อยู่ตรงกลาง (MA & Borowitzka, 1988) ดังรูปที่ 2.2 หมายเลข 13 โดยแบ่งตามอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom: Plantae

Phylum: Chlorophyta

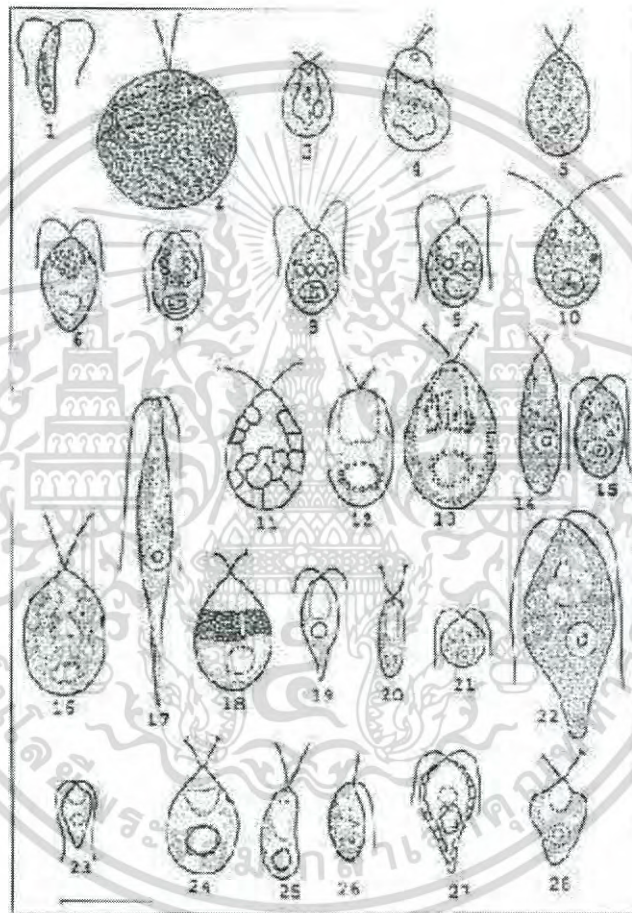
Class: Chlorophyceae

Order: Chlamydomonadales

Family: Dunaliellaceae

Genus: *Dunaliella*

Species: *D. salina*



รูปที่ 2.2 รูปทางสัณฐานวิทยาของ 1 *D. acidophila*, 2. *D. flagellate*, 3. *D. lateralis*, 4. *D. oblique*, 5. *D. paupera*, 6. *D. maritima*, 7. *D. polymorpha*, 8. *D. primolecta*, 9. *D. quartolecta*, 10. *D. tertiolecta*, 11. *D. parva*, 12. *D. pseudosalina*, 13. *D. salina*, 14. *D. baas-beckingii*, 15. *D. bioculata*, 16. *D. carpatica*, 17. *D. gracilis*. 18. *D. granulata*, 19. *D. media*, 20. *D. minuta*, 21. *D. minutissima*, 22. *D. ruineniana*, 23. *D. terricola*, 24. *D. viridis*, 25. *D. asymmetrica*, 26. *D. jacobae*, 27. *D. peircei*, 28. *D. turcomanica*. ขนาด 10 ไมโครเมตร

ที่มา : Avron และ Ben-Amotz, 1992

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของคลอโรพลาสต์ของ *D. salina* และ *D. parva* (หมายเลข 13 และ 11 ตามรูปที่ 2.2) สามารถสะสมสารสำคัญคือ เบต้าแคโรทีน จึงสามารถเห็นเป็นสีส้มแดงในระยะ stationary phase และ death phase ได้มากกว่าสีเขียว เบต้าแคโรทีนเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งจะอยู่ในรูปของหยดไขมัน (plastoglobuli) ทำหน้าที่ป้องกันคลอโรฟิลล์และ DNA ของเซลล์สาหร่าย อันเนื่องมาจากรังสีของแสงอาทิตย์สูงเกินไป เหตุผลดังกล่าวเป็นคุณสมบัติเฉพาะในสาหร่าย *D. salina* (Ben-Amotz, 1980 และ Ben-Amotz และคณะ, 1989) Borowitzka (1988) ยังกล่าวว่า สารเบต้าแคโรทีนในสาหร่ายดังกล่าวทำหน้าที่เป็น carbon sink ในการจัดเก็บคาร์บอนส่วนเกินที่ผลิตในระหว่างปฏิกิริยาการสังเคราะห์ภายใต้เงื่อนไขที่การเจริญเติบโตที่มีอย่างจำกัด ซึ่งสามารถสังเคราะห์คาร์บอนจากบรรยากาศอากาศได้

จากคุณสมบัติพื้นฐานทางสัณฐานวิทยา ยังมีทฤษฎีและองค์ความรู้ที่ศึกษาในสาหร่าย *Dunaliella* sp. เพื่อที่จะเรียนรู้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะสาหร่ายสายพันธุ์ *D. salina* เนื่องจากมีประโยชน์อย่างมากทางเชิงพาณิชย์ เพื่อที่สนับสนุนในการเจริญเติบโตของ *D. salina* รวมทั้งเป็นองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถต่อยอดได้ จึงมีการรายงานปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังหัวข้อ 2.1.1

## 2.1.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1.2.1 ปัจจัยด้านแสง

แสงเป็นแหล่งพลังงานเดียวในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสาหร่าย เพราะสาหร่ายนั้นเป็นสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า obligate photoautotroph (Borowitzka และคณะ, 1989) ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีทั้งการเลี้ยงในสระใหญ่ ซึ่งได้รับพลังงานแสงจากแสงพระอาทิตย์ อีกทั้งมีการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ หรือในขวดรูปชมพู่ที่ใช้ในการทดลอง (flask) จะได้รับพลังงานจากหลอดไฟที่มีแสงสีขาว (white fluorescent lamps) ซึ่งความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* อยู่ในช่วง 5,000-15,000 ลักซ์

### 2.1.2.2 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ

สาหร่ายสายพันธุ์นี้มีความสามารถที่ทนต่ออุณหภูมิจากน้อยกว่า 0 องศาเซลเซียส ถึงประมาณมากกว่า 38 องศาเซลเซียส (Ginzburg 1987 และ MA และ Borowitzka, 1988) จากช่วงอุณหภูมิดังกล่าว ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทางห้องปฏิบัติการมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *D. salina* คือประมาณ 32 องศาเซลเซียส (Tafreshi และคณะ, 2007) ทั้งนี้ในความเย็นจัดที่จุดเยือกแข็งสาหร่ายชนิดนี้สามารถรอดชีวิตได้ (Siegel และคณะ, 1984) แต่หากร้อนเกิน 38 องศาเซลเซียส สาหร่ายดังกล่าวจะไม่สามารถทนทานส่งผลให้สาหร่ายนั้นตายได้ Borowitzka, 1988

### 2.1.2.3 ปัจจัยด้านความเป็นกรด-ด่าง (pH)

pH เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง เพราะค่าความเป็นกรด-ด่างของสารอาหารมีผลกระทบต่อเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึมของสาหร่าย นอกจากนั้นแล้ว ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ในน้ำมีผลต่อปริมาณไฮโดรเนียมไอออน ( $\text{H}^+$ ) ของน้ำ เนื่องจาก  $\text{CO}_2$  ทำปฏิกิริยากับน้ำให้  $\text{H}^+$  ทำให้ pH ของน้ำต่ำ ยกตัวอย่างเช่น ในบ่อที่มีการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าเอกสารมีประโยชน์ควรนำเอกสารนี้ไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนมากหรือในบ่อเลี้ยงปลา ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลง pH ในช่วงที่ 6.5 ซึ่งเป็นช่วงพระอาทิตย์ขึ้น เนื่องจากการสะสม  $\text{CO}_2$  ในน้ำ และ pH จะสูงเป็น 11 ในช่วงเวลาเย็น เพราะ  $\text{CO}_2$  ถูกนำไปสังเคราะห์ด้วยแสงโดยสาหร่ายหรือพืชน้ำ หรือจะกล่าวอีกอย่างคือ pH ที่สูงนี้เพียงเพราะการตรึง  $\text{CO}_2$  ที่อยู่ในรูปก๊าซ ด้วยการดูดซึมไนเตรต ( $\text{NO}_3^-$ ) ดังนั้นจะปลดปล่อยอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล ( $\text{OH}^-$ ) นั้นเอง (Ben-Amotz และ Avron, 1989) สำหรับ *D. salina* มีความทนทนต่อค่า pH ได้กว้างตั้งแต่ 0 ถึง 11 Borowitzka (1988) กล่าวว่าช่วง pH ที่เหมาะสมของ *D. salina* อยู่ประมาณ 9

#### 2.1.2.4 ปัจจัยด้านความเค็ม (Salinity)

*Dunaliella* sp. สามารถเจริญได้ในช่วง NaCl ที่กว้างมาก Aran goyal (1987) กล่าวว่า สาหร่ายวงศ์นี้มีความสามารถในการทนความเข้มข้น NaCl ตั้งแต่ความเค็มน้อยกว่าน้ำทะเลจนถึงจุดอิ่มตัวของ NaCl ในสาหร่าย *D. tertiolecta* สามารถเจริญได้ช่วง 0.4-1.2% ของความเข้มข้น NaCl แต่ในการทดลองของ craigie และ McLachlan (1964) กล่าวถึง *D. tertiolecta* มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นของ NaCl ได้ถึง 15% สำหรับในสาหร่าย *D. salina* จะมีช่วงความเข้มข้นของ NaCl 3%- 31% หรือ 0.3 โมลาร์ ถึงจุดอิ่มตัว (โมลาร์) ซึ่งช่วงความเข้มข้น NaCl ที่เหมาะสมคือ 2 โมลาร์ ด้วยความสามารถนี้ทำให้สาหร่ายชนิดนี้จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ทนต่อความเค็มสูง (Hyper Halotolerant) ดังรูปที่ 2.3

Alga	Source	NaCl concentration (M)		Reference
		Growth range	Optimum*	
<i>D. salina</i>	Salt lake	0.3 - Satu.	2.0	1
<i>D. viridis</i>	Solar salt	1.0 - 4.0	0.9-2.0	2
	pond	0.3 - 4.8	1.0 - 1.5	3
<i>D. sp.</i>	Great salt lake, Utah	0.9 - 3.4	2.5	4
<i>D. sp.</i>	"	0.06 - 2.0	ca. 2.0	5
<i>D. sp.</i>	Solar salt pond	-	1.7 - 2.6	6
<i>D. tertiolecta</i>	Marine	0.06 - >3.6	0.17 - 0.2	3
<i>D. parva</i>	Dead sea	0.3 - 4.0	0.75 - 1.5	7
<i>D. bioculata</i>	Marine	0.025 - 4.0	0.5 - 1.0	8
<i>D. euchlora</i>	Marine	-	0.4	9
<i>D. primolecta</i>	-	0.5 - 1.0	0.5	10

รูปที่ 2.3 ช่วงความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญใน *Dunaliella* sp.

ที่มา : Aran goyal (1987)

### 2.1.2.5 ปัจจัยด้านธาตุอาหาร

#### 2.1.2.5.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย สาหร่ายในแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน คาร์บอนแบ่งออกเป็น 2 ประเภทอันได้แก่ อนินทรีย์คาร์บอน และอินทรีย์คาร์บอน เริ่มที่สารอนินทรีย์คาร์บอนจะอยู่ในรูปก๊าซ  $\text{CO}_2$  ที่ละลายในน้ำ หรืออยู่ในรูปคาร์บอเนต ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) และไบคาร์บอเนต ( $\text{HCO}_3^-$ ) การที่คาร์บอนจะอยู่ในรูปใดขึ้นอยู่กับ pH เช่น ถ้า pH ประมาณ 7-9 จะพบคาร์บอนอยู่ในรูป  $\text{HCO}_3^-$  แต่หาก pH สูงตั้งแต่ 9.5 ขึ้นไป คาร์บอนอยู่ในรูป  $\text{CO}_3^{2-}$  ในทางกลับกัน จะพบคาร์บอนอยู่ในรูป  $\text{CO}_2$  เมื่อ pH คำนข้างเป็นกรด (pH ประมาณ 5) ในสาหร่าย *D. salina* ใช้สารอนินทรีย์คาร์บอนโดยการตรึง  $\text{CO}_2$  ในอากาศ ซึ่งส่งผลทำให้ กระบวนการเจริญเติบโตของ *D. salina* จะทำให้สภาวะอาหารเป็นกรด

#### 2.1.2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ดีคือ สารไนเตรต (Mil'ko, 1962 และ Grant, 1968 และ MA และ Borowitzka, 1988) ถ้าแหล่งไนโตรเจนคือ เกลือแอมโมเนียมอะซิเตท เช่น แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ ในปริมาณความเข้มข้นที่สูง จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้น้อยลง และเลี้ยงควบคู่กับอุณหภูมิที่สูง จะสามารถทำให้ *D. salina* ตายได้ (Mil'ko, 1962) ยกตัวอย่างในงานวิจัยของ MA และ Borowitzka (1988) แสดงให้เห็นถึงการเลี้ยง *D. salina* เมื่อมีแอมโมเนียมไนเตรทในปริมาณมาก จะทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย และการดูดซึมของแอมโมเนีย จะนำไปสู่อาหารมีสภาพเป็นกรดจึงส่งผลให้ *D. salina* ตายลงในที่สุด นอกจากนี้ยังเรียกเป็นหนึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้เป็นบัฟเฟอร์ ในการปรับธาตุอาหารเมื่อปริมาณไนโตรเจนมีไม่เพียงพอ แต่หากเลี้ยงขนาดใหญ่กลางแจ้ง การใช้ยูเรียอาจจะมีปัญหาเพราะแอมโมเนียจะถูกปล่อยออกมา และจะขัดขวางต่อปฏิกิริยาในการดูดซึมของยูเรีย (Massyuk, 1966)

#### 2.1.2.5.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสมีส่วนที่เกี่ยวกับกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ สิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงานและกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก แม้ว่าในธรรมชาติจะพบปริมาณสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัส แต่สาหร่ายจะใช้ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งสารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* โดยอยู่ที่ประมาณ 0.02-0.025 กรัมต่อลิตร (MA และ Borowitzka, 1988) แต่หากมีความเข้มข้นของธาตุนี้สูงเกินกว่าความเหมาะสมของสารดังกล่าว (ประมาณ 0.02-0.025 กรัมต่อลิตร) จะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตในสาหร่ายชนิดนี้ได้

#### 2.1.2.5.4 แหล่งแมกนีเซียมและแคลเซียม

ธาตุนี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* โดยสาหร่ายชนิดนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของธาตุแมกนีเซียมและแคลเซียมนี้ที่กว้าง ซึ่งมีช่วงอัตราส่วน  $\text{Mg}^{2+}$  ต่อ  $\text{Ca}^{2+}$  ตั้งแต่ 0.8-20.0 เท่า ในขณะที่ *D. tertiolecta* มีค่าอัตราส่วน  $\text{Mg}^{2+}$  ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$\text{Ca}_2^+$  เป็น 4 ต่อ 1 เท่า แสดงให้เห็นว่าแต่ละสายพันธุ์สาหร่ายมีความเหมาะสมต่อธาตุสองชนิดนี้ ในช่วงที่แตกต่างกัน (McLachlan, 1960)

#### 2.1.2.5.5 แหล่งโซเดียม

แร่ธาตุนี้จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Dunaliella* sp. อย่างยิ่งซึ่งขาดไม่ได้ ถ้าขาดไปอาจจะทำให้สาหร่ายไม่เจริญเติบโต

#### 2.1.2.5.6 แหล่งคลอไรด์และซัลเฟต

ในการเจริญเติบโตของ *D. salina* มีค่าที่เหมาะสมของธาตุ  $\text{Cl}^-$  ต่อ  $\text{SO}_4^{2-}$  เป็น 3.2 ต่อ 1 เท่า แต่ในขณะที่ค่าในการเหนี่ยวนำให้สะสมสารเบต้าแคโรทีน ธาตุ  $\text{Cl}^-$  ต่อ  $\text{SO}_4^{2-}$  เป็น 8.6 ต่อ 1 เท่า (Massyuk, 1965) ซึ่งประจุลบและประจุบวกของแร่ธาตุในสูตรอาหาร มีผลปฏิกิริยาบางอย่างในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *D. salina* ซึ่งในปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่

#### 2.1.2.5.7 แหล่งเหล็ก

เหล็กในปริมาณความเข้มข้นต่ำอย่างมากมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* ธาตุเหล็กที่เหมาะสมในการเจริญของสาหร่าย *D. salina* และ *D. viridis* อยู่ระหว่าง 1.25 ถึง 3.75 กรัมต่อลิตร (Mil'ko, 1962) และสามารถใส่สารประกอบเหล็กอยู่ในรูปไอออนซิเตรท (iron citrate) หรือ Fe-EDTA (MA และ Borowitzka, 1988) (Sathasivam และคณะ, 2013)

#### 2.1.2.5.8 ธาตุต่างๆ และวิตามิน

แร่ธาตุต่างๆ เช่น Zn, Co, Cu, Mo และ Mn เป็นแร่ธาตุที่ขาดไม่ได้ในการเจริญเติบโตของ *D. salina* แต่ต้องการในปริมาณน้อยมาก

ปัจจัยในการเจริญโดยแร่ธาตุต่างๆแสดงดังตารางอาหารสูตร Modified Johnsons Medium (M.A และ Borowitzka, 1988) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตารางอาหารสูตร Modified Johnsons Medium (J/I)

ปริมาตร 980 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตร :	
NaCl	86.77 กรัม
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.5 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 กรัม
KCl	0.2 กรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 กรัม
KNO <sub>3</sub>	1.0 กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	0.043 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.035 กรัม
Fe-solution	10 มิลลิลิตร
Trace-element solution	10 มิลลิลิตร
<b>สารละลายเหล็ก (Fe solution) เตรียมสำหรับ 1 ลิตร</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	189 มิลลิกรัม
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	244 มิลลิกรัม
<b>สารละลายธาตุ (Trace-element solution) เตรียมสำหรับ 1 ลิตร</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.0 มิลลิกรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	38.0 มิลลิกรัม
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	6.0 มิลลิกรัม
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5.1 มิลลิกรัม
ZnCl <sub>2</sub>	4.1 มิลลิกรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4.1 มิลลิกรัม
ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)	

ที่มา : M.A และ Borowitzka, 1988

การศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตของ *D. salina* ดังที่กล่าวมาในหัวข้อ 2.1.2 ทำให้นักวิทยาศาสตร์ศึกษาความสามารถต่างๆ ของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ รวมทั้งประโยชน์ต่างๆ ทางเชิงพาณิชย์ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของมนุษย์และพลังงานทางเลือก ซึ่งจากการที่คณะผู้ทดลองได้ค้นคว้าข้อมูลดังหัวข้อ 2.1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3 ประโยชน์ของ *D. Salina*

จากปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญ (2.1.2) ล้วนมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายทั้งสิ้น แสดงดังรูป 2.4 แสดงถึงองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลจากสาหร่าย

Class/algal sp.	Protein (%)	CHO (%)	Lipid (%)	Mineral (%)	Total (%)
<b>Chlorophyceae</b>					
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9	8	106
<b>Bacillariophyceae (Diatoms)</b>					
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Paulsen) Takano	33	17	10	29	89
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve	37	21	7	39	104
<i>Phaeodactylum tricomulum</i> (Bohlin)	33	24	10	8	75
<i>Thalassiosira pseudonana</i> -3H (Hustedt) Hasle et	29	17	10	38	94
<b>Prasinophyceae</b>					
<i>Tetraselmis suecica</i> (Kyllin) Butcher	39	8	7	23	77

รูปที่ 2.4 แสดงองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบ (% น้ำหนักแห้ง) ของสาหร่ายในช่วงระยะ exponential growth phase

ที่มา : มณฑานติ ทามตันและสุพล ตันสุวรรณ, สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำชายฝั่ง

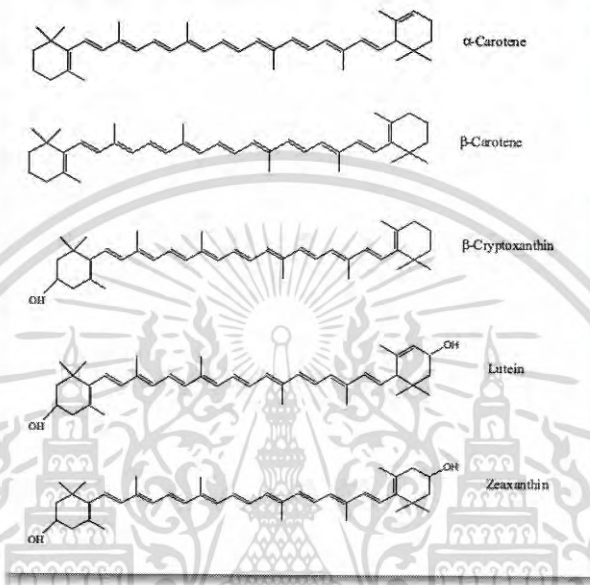
จากรูป 2.4 สารชีวโมเลกุลเป็นสารอาหารหลักที่สะสมในสาหร่าย ซึ่งโปรตีนมีค่าอยู่ในช่วง 25-57% โดยน้ำหนักแห้ง จะเห็นได้ว่า *D. salina* มีการสะสมโปรตีนที่สูงถึง 57% นอกจากนั้นมีการสะสมคาร์โบไฮเดรต, ไขมัน และเกลือแร่ เป็น 32, 9, 8% ตามลำดับ ซึ่งรวมคุณสมบัติทางเคมีอย่างหยาบของสาหร่ายจาก มณฑานติ ทามตันและสุพล ตันสุวรรณ เป็น 106% ซึ่งจากตารางเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงนั่นเอง จะเห็นได้ว่า *D. salina* มีความสามารถสะสมทางด้านสารชีวโมเลกุลได้สูง ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสารสะสมที่มีมูลค่าในเชิงพาณิชย์ดังต่อไปนี้

#### 2.1.3.1 กลุ่มสารแคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น พืชชั้นสูง สาหร่าย สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งแคโรทีนอยด์ในพืชชั้นสูงสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ เช่น ผล ดอก และราก ส่วนแคโรทีนอยด์ที่พบในจุลินทรีย์พบได้ทั้งที่สังเคราะห์ด้วยแสงและไม่สังเคราะห์ด้วยแสง ในปัจจุบันสารแคโรทีนอยด์มีการค้นพบแคโรทีนอยด์กว่า 600 ชนิด และประมาณ 50 ชนิด พบได้ในผักและผลไม้ ที่เรารับประทาน แคโรทีนอยด์ 6 ชนิดที่ กลาย มา เป็น สารต้านอนุมูลอิสระ ดาวเด่นแห่งศตวรรษที่ 21 (<http://www.greenclinic.in.th/>) คือ แอลฟาแคโรทีน ( $\alpha$ -carotene), เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene), เบต้าคริปโตแซนทิน ( $\beta$ -cryptoxanthin), ไลโคพีน (Lycopene), ลูทีน (Lutein), ซีแซนทิน (Zeaxanthin) แสดงโครงสร้างดังรูปที่ 2.5 ในส่วนของสารเบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์โดยเชื่อว่าช่วยป้องกันและรักษามะเร็งบางชนิดได้ ทั้งนี้เพราะเบต้าแคโรทีนมีคุณสมบัติเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระที่ดี และเป็นสารตั้งต้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ผู้ที่อยู่ใต้เห็นแจ้งขอสงวนสิทธิ์ในการนำ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิตามินเอ (<http://umm.edu/health/>) ซึ่งเป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ (<http://thedailyhealth.co.uk/>) นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมทางการแพทย์โดยผสมในอาหารสัตว์น้ำ และ สัตว์ปีก เพื่อให้สัตว์น้ำมีผิวหนัง เนื้อ และเกล็ดที่มีสีส้มสวยงามขึ้น มีผลต่อการปรับปรุงระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ ส่วนในสัตว์ปีกจะทำให้ไข่แดงมีสีส้มสดใสขึ้น เนื้อกึ่งที่มีสีเป็นธรรมชาติมากขึ้น และปลาที่มีสีภายนอกที่สดใส (อรชุน เลี้ยววิวัฒนะผล, 2539 และ Borowitzka, 1988)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างแคโรทีนอยด์ทั้ง 6 ชนิด

ที่มา: ดร.สถาพร คำหอม

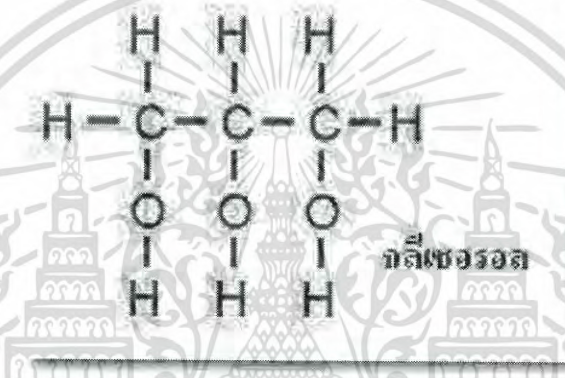
จากคุณสมบัติข้างต้น ซึ่งได้รับความสนใจต่อนักวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มผลผลิตสารดังกล่าว โดยงานวิจัยของ Packo และคณะ (2012) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนต่อคุณสมบัติการเจริญและการผลิตสารเบต้าแคโรทีน ภายในเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* ภายใต้การเลี้ยงแบบ turbidostat โดยมีระบบการให้แสงที่คงที่ ในสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ซึ่งพบว่าชีวมวลมีปริมาณมากขึ้นประมาณ 2 เท่า โดยเกิดจากการเพิ่มขึ้นชั่วคราวของอัตราการแบ่งเซลล์และการพองตัวของเซลล์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงโดยจะเกิดพร้อมกับการเริ่มสะสมเบต้าแคโรทีนภายในเซลล์จนถึงความเข้มข้นสุดท้ายที่ประมาณ 14 มิลลิกรัม LCV<sup>-1</sup> โดยผลผลิตของเบต้าแคโรทีนนี้มีประมาณ 6% ของชีวมวลที่เพิ่มขึ้น ในส่วนงานวิจัยของ Francisca และคณะ (2007) ที่มีการสะสมสารเบต้าแคโรทีนที่เพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจากการการเพิ่มอุณหภูมิจาก 22 องศาเซลเซียส (3.06×10<sup>7</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เป็น 38 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุนี้ เป็นผลที่ทำให้ *D. salina* เกิดการสะสมสารแคโรทีนอยด์เป็น 35.14 พิโคกรัมต่อเซลล์ ซึ่งปริมาณสารแอลฟาแคโรทีนและเบต้าแคโรทีนอยู่ที่ 0.083 ± 0.003 และ 0.598 ± 0.020 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยของ Packo และคณะ (2012) และ Francisca และคณะ (2007) เป็นที่สอดคล้องกันโดยมีเป้าหมายคือเพิ่มผลผลิตสารเบต้าแคโรทีนทางการจำกัตสารไนโตรเจน (Packo และคณะ, 2012) และการเพิ่มอุณหภูมิ Francisca และคณะ, 2007) เป็นต้น

### 2.1.3.2 กลุ่มสารกลีเซอรอล

กลีเซอรอล (glycerol) อาจเรียกว่า กลีเซอริน (glycerine หรือ glycerin) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพอลิออล (polyol) เป็นสารที่เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสหวานเล็กน้อย โมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ จึงทำให้ละลายในน้ำได้ดี มีสมบัติในการดูดจับน้ำได้ดี (hygroscopic) กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบหลักในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งได้จากการรวมตัวของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน (fatty acid) 3 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างกลีเซอรอล

ที่มา : [http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ap-biology1/Chapter2/Part4\\_2.html](http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ap-biology1/Chapter2/Part4_2.html)

กลีเซอรอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มของโพลีไฮดริกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ถือเป็นสารชนิดเดียวกันสำหรับเป็นสารตั้งต้นสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ การผลิตสบู่ การผลิตยา การผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น โดยประโยชน์ของกลีเซอรอลมีดังนี้ (www.siamchemi.com)

จากงานวิจัยของ Edith และคณะ (1991) พบว่าเมื่อได้ชักนำสาร กลีเซอรอลจากสายพันธุ์พื้นเมืองและมิวแทนท์ที่ทำด้วย osmotic shock ด้วยการชักนำให้สาร fructose-1,6-bisphosphate เพิ่มขึ้น และลดการผลิตสาร fructose 6-phosphate ลง ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า pentose-phosphate oxidative pathway มีบทบาทสำคัญมากในการสังเคราะห์สาร glycerol ซึ่งกลไก Hyperosmotic shock นำไปสู่การสะสม phosphorylcholine แบบชั่วคราว และทำให้สะสมสาร inositolbisphosphate ลดลงในสายพันธุ์ *D. salina* โดยในสายพันธุ์มิวแทนท์จะไม่พบสาร phosphorylcholine ซึ่งผลที่ได้นั้นมีผลสอดคล้องกับความแตกต่างของการแสดงออกของเอนไซม์ phospholipases ใน *Dunaliella* sp.

Hui Chen และคณะ (2011) กล่าวว่า ในการเปลี่ยนความเข้มข้นเกลือ (NaCl) ซึ่งมีผลต่อรูปร่างของเซลล์และสารกลีเซอรอลที่สะสมภายในตัวเซลล์ *D. salina* รวมทั้งมีผลต่อการแสดงออกของยีน (NAD<sup>+</sup>) ผลการทดลองกล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเกลือจาก 2 M ถึงประมาณ 4-5 M อย่างรวดเร็ว มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ และมีเม็ดของลิพิดบนผิวในไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายอาหารของ *D. salina* หากเพาะเลี้ยงต่อเนื่องที่ความเข้มข้นเกลือสูงจะมีการสะสมสารกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น ซึ่งในการที่เซลล์ *D. salina* จะลดลงหรือเพิ่มขึ้นของการสะสมสารกลีเซอรอลต่อเซลล์นั้น เพื่อที่จะปรับตัวต่อสภาพ hypoosmotic หรือ hyperosmotic shock ในส่วนของการแสดงออกของยีน G3pdh ในสาหร่าย *D. salina* มีความสัมพันธ์แบบผกผันกันกับความเข้มข้นเกลือ แต่หากเพาะเลี้ยงต่อไปอีก หลังจาก 2 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน G3pdh มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ

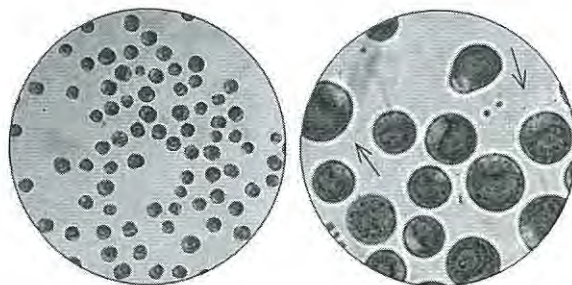
ในงานวิจัยของ Edith และคณะ (1991) และ Hui Chen และคณะ (2011) กล่าวถึงการใช้ความเข้มข้นเกลือที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารกลีเซอรอลใน *D. salina* อันเป็นผลมาจากสภาพ hypoosmotic หรือ hyperosmotic shock โดยการทดลองของ Edith และคณะ (1991) พบถึง phosphofructokinase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตสารกลีเซอรอล และ pentose-phosphate pathway เป็นปฏิกิริยาที่ควบคุมปฏิกิริยา oxidation-reduction ให้อยู่ในระดับที่สมดุลในการสังเคราะห์ glycerol ในขณะที่การทดลองของ Hui Chen และคณะ (2011) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3pdh) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิธีการผลิตกลีเซอรอล ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนสาร dihydroxyacetone phosphate (DHAP) เป็นสาร glycerol-3-phosphate และกลายเป็นสารกลีเซอรอลนั่นเอง

## 2.2 การปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่าย *D. salina*

### 2.2.1 การปรับปรุงโดยสูตรอาหาร

#### 2.2.1.1 การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในสูตรอาหาร (salinity)

ได้มีการทดลองแยกสาหร่าย *D. salina* จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์และทำการเลี้ยงใน สภาวะดึ่งเครียด เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์สาหร่ายมีการสะสมสารเบต้าแคโรทีนในปริมาณที่สูงขึ้น โดยพบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองหรือน้ำตาล ภายใต้การเลี้ยงในสภาวะดึ่งเครียดที่มีความเค็มสูง (200-250 psu) และอุณหภูมิที่สูง (38.5 °C) ประกอบกับมีความเข้มข้นแสงสูง ( $55 \times 10^3$  ลักซ์) และทำการลดความเข้มข้นของอาหารลง 25% (อาหารสูตร AFMED algal media) เพื่อเป็นการจำกัดสารอาหารอีกด้วย ผลปรากฏว่าตัวอย่าง *D. salina* มีการสะสมเบต้าแคโรทีน ปริมาณสูงจนถึง 33.8 - 96.5 พีโคกรัม/เซลล์ ถือว่าประสบความสำเร็จและส่งเสริมการศึกษานี้อย่างมาก อีกทั้งเป็นต้นแบบในการเลี้ยงในระบบเปิดเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต (Tawfiq และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะของเซลล์สาหร่าย *D. salina* ที่มีการเปลี่ยนรูปร่างและเปลี่ยนสีในการ

สะสมสารเบต้าแคโรทีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ที่มา : Tawfiq และคณะ (2010)  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกับในทะเลสาบอูร์เมียในประเทศอิหร่านที่มีความเค็มมากเป็นอันดับต้นๆ ของโลกและเป็นทะเลสาบที่มีพื้นที่กว้างมากเป็นอันดับสองของโลก โดยมีเกลืออยู่มากที่สุดถึง 360 กรัม/ลิตร ซึ่งพบว่ามีการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กทนเค็มอย่าง *D. salina* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสารเบต้าแคโรทีนได้ในปริมาณสูง ได้มีการศึกษาแยกเชื้อสาหร่าย *D. salina* จากน้ำของทะเลสาบดังกล่าว และทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร modified Johnson media ที่มีความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน (1,2 และ 3 M NaCl) จากนั้นทำการศึกษาอัตราการเจริญและการสะสมสารเบต้าแคโรทีนภายในเซลล์ สำหรับการพิจารณาถึงความเข้มข้นสูงสุดของเกลือที่เซลล์สาหร่าย *D. salina* ต้องการในการสะสมสารเบต้าแคโรทีนในปริมาณสูงสุด จะวิเคราะห์จากปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีนภายในเซลล์สาหร่าย โดยวิธีการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยตรงและใช้เครื่องเสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ จากผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน มีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วงระหว่าง  $0.53 - 2.21 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร และมีปริมาณเบต้าแคโรทีนอยู่ในช่วง 0.2 - 11.4 พิโคกรัม/เซลล์ ซึ่งหลังจากจบการทดลองพบว่าอัตราการเจริญสูงสุดของเซลล์สาหร่ายและการสะสมเบต้าแคโรทีนสูงสุด ได้มาจากตัวอย่างที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือที่ 1 และ 3 M NaCl โดยมีปริมาณเซลล์ที่  $1.68 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร และปริมาณเบต้าแคโรทีนที่ 8.94 พิโคกรัม/เซลล์ (Faraz และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.8 ชายฝั่งของทะเลสาบอูร์เมียที่มีความเค็มมากและน้ำทะเลที่มีสีแดงเนื่องจากมีเหล็กเป็นองค์ประกอบ

ที่มา : Faraz และคณะ (2011)

#### 2.2.1.2 การเติมแหล่งคาร์บอนและไอออนของโลหะในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากการเติมเกลือที่ความเข้มข้นสูงๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดและส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญที่เร็วขึ้นหรือมีปริมาณสารสำคัญและชีวมวลที่เพิ่มขึ้นแล้ว ยังมีการเติมสารอื่นๆ ในอาหาร เพื่อเพิ่มผลผลิตเช่นเดียวกัน ดังงานวิจัยของ Mojaat และคณะ (2007) ได้มีการพิจารณาผลกระทบของอัตราการเจริญและการสังเคราะห์สารเบต้าแคโรทีนจากการเติม ไอออน  $Fe^{2+}$  ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ซึ่งได้มีการศึกษาเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าตีพิมพ์เผยแพร่อย่างเป็นทางการไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงผลกระทบที่แตกต่างกันในความเข้มข้นต่างๆ ของไอออน  $Fe^{2+}$  และแหล่งสารคาร์บอนอินทรีย์ (acetate และ malonate) พบว่าปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ด้วยค่าสูงสุด 70 พิโคกรัม/เซลล์ ในอาหารที่เพิ่มสารอะซิเตท (acetate) 67 มิลลิโมลาร์ และ 450 ไมโครโมลาร์ ของสาร  $FeSO_4$  ส่วนในอาหารที่เติมสารมาโลเนท (malonate) 67.5 มิลลิโมลาร์ และ  $FeSO_4$  450 ไมโครโมลาร์ ได้ค่าสูงสุดที่ 33 พิโคกรัม/เซลล์ การเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดของการออกซิเดชัน (oxidation) แสดงให้เห็นว่า ไอออน  $Fe^{2+}$  สามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมสารเบต้าแคโรทีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในขณะที่มีแหล่งคาร์บอนรวมอยู่ด้วย

## 2.2.2 การปรับปรุงสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

### 2.2.2.1 วิธีการในการเพาะเลี้ยง

สำหรับวิธีการในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้มาซึ่งผลผลิตนั้นมีความสำคัญอย่างมาก ดังนั้นจึงต้องเลือกวิธีที่เหมาะสมและง่ายต่อการควบคุมดูแลและที่สำคัญต้องมีต้นทุนที่ต่ำ อีกทั้งต้องง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตอีกด้วย เช่นในการศึกษาถึงกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในสาหร่าย *D. salina* ที่ใช้วิธีการเลี้ยงแบบกะ (batch) ซึ่งพบว่าไม่เหมาะสมต่อการศึกษาที่เฉพาะเจาะจงและการศึกษาถึงผลกระทบโดยตรงของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน เนื่องจากความเข้มข้นที่แต่ละเซลล์จะได้รับนั้นไม่เท่ากันอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงในเมตาบอลิซึมและอัตราการเจริญของเซลล์ โดยการเลี้ยงแบบ turbidostat เหมาะกับการเลี้ยงที่สารละลายมีความขุ่น ซึ่งสามารถรักษาระดับความเข้มข้นตามที่กำหนดและสามารถควบคุมความเจือจางของสารละลายได้อย่างอัตโนมัติ ซึ่งเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อนั่นเอง แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงแบบ turbidostat ไม่สามารถประยุกต์เลี้ยงในเชิงธุรกิจหรือการผลิตในปริมาณสูงได้ จึงมีความเหมาะสมในการเลี้ยงเพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น (Packo และคณะ, 2012) การเลี้ยงสาหร่ายในเชิงพาณิชย์จึงนิยมเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยวิธี batch และ fed-batch มากกว่า ดังในการศึกษาของ Pak และคณะ (1991) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *D. salina* โดยวิธี batch และ fed-batch พบว่าการเลี้ยงภายใต้วิธี fed-batch สามารถผลิตสารไฮโดรคาร์บอนได้ 51.12 มิลลิกรัม/ลิตร และได้น้ำหนักแห้ง 0.313 กรัม/ลิตร ซึ่ง 20% ของสารไฮโดรคาร์บอนและชีวมวลแห้งได้มาจากทั้งกระบวนการเลี้ยงแบบ batch และ fed-batch โดยผลผลิตของสารไฮโดรคาร์บอนมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของสาหร่าย อย่างไรก็ตามพบว่าผลผลิตไฮโดรคาร์บอนและชีวมวลแห้งจากการเลี้ยงแบบ fed-batch มีประสิทธิภาพดีกว่าการเลี้ยงแบบ batch

### 2.2.2.2 การจำกัดสารอาหาร

มีการศึกษาถึงผลกระทบของสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนต่อคุณสมบัติการเจริญและการผลิตสารเบต้าแคโรทีน รวมถึงเมตาบอลิซึมของกรดไขมันภายในเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* ภายใต้การเลี้ยงแบบ turbidostat โดยมีระบบการให้แสงที่คงที่ ในสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ซึ่งพบว่าชีวมวลมีปริมาณมากขึ้นประมาณ 2 เท่า โดยเกิดจากการเพิ่มขึ้นชั่วคราวของอัตราการแบ่งเซลล์และการพองตัวของเซลล์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงโดยจะเกิดพร้อมกับการเริ่มสะสมเบต้าแคโรทีนภายในเซลล์จนถึงความเข้มข้นสุดท้ายที่ประมาณ  $14 \text{ mg LCV}^{-1}$  โดยผลผลิต

ของเบต้าแคโรทีนนี้มีประมาณ 6% ของซีวามวลที่เพิ่มขึ้น ซึ่งให้เห็นว่ามีการสะสมขององค์ประกอบทางชีวเคมีอื่นๆ ด้วย เนื่องจาก *D. salina* มีการสะสมเบต้าแคโรทีนภายในเม็ดลิวพิด จึงทำการพิจารณาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของกลุ่มกรดไขมันภายในเซลล์ทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างทำการทดลองข้างต้น แสดงว่าการสะสมเบต้าแคโรทีนและกรดไขมันทั้งหมดภายในเซลล์ไม่มีความสัมพันธ์กัน (Packo และคณะ, 2012)

### 2.2.2.3 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

การศึกษาของ Fan และคณะ (1994) พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* NIES-144 ซึ่งแสดงให้เห็นจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* NIES-144 ในอาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) ที่ความเข้มข้น 26 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ณ อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20, 25, 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปริมาณแคโรทีนอยด์นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่จำนวนเซลล์สาหร่ายนั้นมีปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 และ 33 องศาเซลเซียส การเติบโตของสาหร่ายจะช้าลง ในขณะที่การสะสมแคโรทีนอยด์นั้นเพิ่มขึ้นระหว่าง 2.5 ถึง 3 เท่า (19 มิลลิกรัม/ลิตร และ 22.6 มิลลิกรัม/ลิตร) ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (8 มิลลิกรัม/ลิตร) และจากการศึกษาของ Fan และคณะ (1994) เมื่อเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* ในสูตรอาหาร BG-11 ที่อุณหภูมิ 20, 22, 25, 28, 31 และ 33 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *H. pluvialis* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Francisca และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษากการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสาหร่าย *Dunaliella salina* และ *Dunaliella viridis* พบว่าอุณหภูมิที่สาหร่าย *D. Salina* เจริญสูงสุดอยู่ที่ 22 °C ( $3.06 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร) และ 26 °C สำหรับ *D. viridis* ( $4.04 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร) โดยปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดใน *D. salina* ที่เพิ่มขึ้นด้วยอุณหภูมิสูงสุดที่ 38 °C คือ 35.14 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งปริมาณสาร แอลฟาแคโรทีนและเบต้าแคโรทีนอยู่ที่  $0.083 \pm 0.003$  และ  $0.598 \pm 0.020$  มิลลิกรัม /100 กรัมของน้ำหนักแห้งตามลำดับ ส่วนในสาหร่าย *D. viridis* ค่าต่างๆมีจำนวนต่ำกว่าในสภาวะการทดลองเดียวกัน ( $0.018 \pm 0.002$  and  $0.136 \pm 0.012$  มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักแห้ง) อัตราการเจริญสูงสุดของ *D. salina* คือ 0.28/วัน (10% NaCl) ในขณะที่ปริมาตรเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 524 เป็น 2066.93 ไมโครลูกบาศก์เมตร โดยเพิ่มเกลือ (NaCl) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 10% เป็น 35% และอัตราการสังเคราะห์แสงสูงสุดเกิดขึ้นพร้อมกับอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 °C สำหรับ *D. viridis* (108 นาโนโมล O<sub>2</sub> ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอ/ชั่วโมง) และ *D. salina* (139 นาโนโมล O<sub>2</sub> ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอ/ชั่วโมง) นั่นคือ กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ตอบสนองต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน และมีความสัมพันธ์กับทางสรีรวิทยาในทั้ง 2 สายพันธุ์

### 2.2.2.4 ความเข้มข้นและสภาพของแสง

ความเข้มข้นของแสงมีผลต่อการสะสมแคโรทีนอยด์และอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Haematococcus* sp. Tjahjono และคณะ (1994) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus* sp. ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 50, 100, 200 และ 400 ไมโครโมล/ตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ข้อมูลใด ๆ ให้แก่บุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมตรต่อวินาที สำหรับจะสะสมแสงตำแหน่งที่มากที่สุดที่ความเข้มแสง 400 ไมโครโมล/ตารางเมตร ต่อวินาที ส่วนสาหร่าย *D. salina* ที่มีการเลี้ยงภายใต้สภาพแสงที่ไม่ต่อเนื่อง (light flash) ทุกๆ 30, 15, 2, 0.1 วินาที และสลับกันระหว่างความสว่างและมืด พบว่า ความไม่ต่อเนื่องของแสงในแต่ละการทดลอง ทำให้เกิดช่วงอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง 0.25 ถึง 0.93 ต่อวัน และยังพบอีกว่า ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงที่เพิ่มขึ้นแปรผันตามความถี่ของ light flash นั้นเพิ่มสูงขึ้น แต่ปริมาณคาร์บอนและคลอโรฟิลล์ในเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Combe และคณะ, 2015) ความเข้มแสงสูงและสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน เป็น 2 ปัจจัยการเหนี่ยวนำที่มีอิทธิพลสูงสุดต่อการสะสมเบต้าแคโรทีน ในสาหร่าย *D. salina* ซึ่งได้มีการศึกษาถึงผลกระทบของความเข้มแสงและบทบาทที่เป็นไปได้ของเมทาบอลิซึมของกรดไขมัน ในผลผลิตแคโรทีนอยด์ ในเซลล์ *D. salina* พบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตแคโรทีนอยด์ปริมาณสูงด้วยความเข้มแสงสูงมีความสัมพันธ์กันกับการสร้างเม็ดไขมันและการลดระดับของกรดไขมันไม่อิ่มตัว สารเบต้าแคโรทีนจะสะสมในสภาวะความเข้มแสงสูง ภายในเซลล์ *D. salina* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการผลิตเฉพาะกรดไขมันชนิด C16:0 และ C18:1 มากกว่าการสะสมกรดไขมันชนิดอื่นทั้งหมด (Packo และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาระดับโมเลกุลและทางชีวเคมีในการประยุกต์ใช้ความเข้มแสงกับสาหร่าย *D. salina* ซึ่งจะศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน phytoene synthase (*psy*) และการสะสม สารสี, คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และ ลิพิด ภายใต้ความเข้มแสงที่ต่างกัน 2 การทดลอง โดยระยะแรกเซลล์จะถูกเลี้ยงที่สภาวะปกติภายใต้ความเข้มแสง  $50 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$  จากนั้นทำการถ่ายเซลล์สู่สภาวะการเลี้ยงที่มีความเข้มแสงที่แตกต่างกันคือ 200 และ 1000 ไมโครโมลโฟตอน/ $\text{m}^2\text{s}$  การแสดงออกของยีน *psy* ที่ความเข้มแสงสูง ( $1000 \text{ ไมโครโมลโฟตอน/m}^2\text{s}$ ) ลดลงและยังคงที่จนถึง 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนดังกล่าวลดลงน้อยลงภายใต้ความเข้มแสงต่ำ ( $200 \text{ ไมโครโมลโฟตอน/m}^2\text{s}$ ) หลังจาก 2 อาทิตย์ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยความเข้มแสงสูงส่งผลให้เกิดการลดลงของปริมาณ คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี และอัตราส่วนของการเพิ่มขึ้นของแคโรทีนอยด์/คลอโรฟิลล์ทั้งหมดและ คลอโรฟิลล์เอ/คลอโรฟิลล์บี ซึ่งปริมาณ คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และ ลิพิด ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลล์สาหร่าย *D. salina* สามารถปรับตัวให้ทนต่อความเข้มแสงสูงได้โดยการแสดงออกของยีน ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์แสงและโครงสร้างของเซลล์รวมถึงองค์ประกอบของชีวเคมีภายในเซลล์ (Leila และคณะ, 2015)

#### 2.2.2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-เบส เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อสาหร่ายขนาดเล็กเซลล์เดียว ค่า pH ของสารอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการเมทาบอลิซึมของสาหร่าย ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำมีผลต่อปริมาณไฮโดรเนียมไอออนของน้ำ เนื่องจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ทำปฏิกิริยากับน้ำให้  $\text{H}^+$  ทำให้ pH หรือ ความเป็นกรด - เบส ของน้ำต่ำ (กรด) เช่น ในบ่อที่มีการเจริญของสาหร่ายจำนวนมากหรือในบ่อเลี้ยงปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ 6.5 ในช่วงเช้าก่อนดวงอาทิตย์ขึ้น เนื่องจากมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ และสูงขึ้นเป็น 11 ในช่วงเวลาเย็น เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์ถูกใช้ไปในการสังเคราะห์แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมเห็นประโยชน์ของเอกสารนี้ กรุณาแจ้งให้เจ้าของเอกสารทราบเพื่อปรับปรุงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสาหร่ายจะตอบสนองต่อความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย เช่น *Chlorella* sp. เติบโตได้ดีในค่า pH ช่วงกว้าง โดยทั่วไปสามารถเติบโตได้ดีในช่วงค่า pH ที่มีค่าเป็นกรดเล็กน้อยจนถึงเป็นกลาง และบางสายพันธุ์ เช่น *Chlorella homosphaera* เติบโตได้ดีที่ pH เท่ากับ 6 นอกจากนี้พบว่า ที่ pH เท่ากับ 9 เหมาะสมต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* (Borowitzka และคณะ, 1988)

### 2.2.3 การดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

งานวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรมสนับสนุนในการปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีผลผลิตในปริมาณมากขึ้นอย่างเช่น งานวิจัยของ Alison Wirshing และคณะ (2012) กล่าวถึง การหาพลังงานใหม่ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ซึ่งพลังงานหรือเชื้อเพลิงนั้นอยู่ในรูปไขมันที่ได้จากพืชและสาหร่าย ทั้งนี้สาหร่ายได้รับความนิยมมากกว่าพืชในการผลิตไขมัน เป็นเพราะสาหร่ายมีช่วงชีวิตที่สั้นกว่าพืชมาก รวมทั้งมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า ซึ่งในจีโนม *Dunaliella* spp. จะสามารถสะสมไขมันต่อน้ำหนักแห้งประมาณ 20-50% จุดประสงค์ในงานวิจัยนี้ เพื่อที่จะพัฒนาเทคนิคหรือวิธีการทางพันธุวิศวกรรมในสาหร่ายสายพันธุ์นี้ เพื่อเพิ่มความสามารถในการสะสมสารในรูปคาร์บอนอะตอม ซึ่งนำไปสู่การสร้างไขมันในการหายใจระดับเซลล์ จากการทดลองพบว่าการสังเคราะห์ยีน polyamines เพิ่มขึ้น มีผลในการเพิ่มการสะสมของสารคาร์บอนอะตอม ในบางการทดลองกล่าวถึงเอ็นไซม์ triacylglycerol (TAG) นำไปสู่การเพิ่มผลผลิตไขมันในสาหร่าย ในการทำพันธุวิศวกรรม โปรโมเตอร์เป็นสิ่งที่จำเป็น ดังนั้นจึงเป็นการทดลองขั้นแรกที่จะโคลนยีนในส่วนโปรโมเตอร์ สำหรับการสร้างไขมันได้ในปริมาณมาก โปรโมเตอร์ที่ใช้ ดังเช่น actin, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO) และ light-harvesting complex II apoprotein (cab4) ส่วนโปรโมเตอร์เหล่านี้จะถูกนำไปรวมกับยีน polyamines และส่งผลต่อการสังเคราะห์สารไขมันได้ในปริมาณมาก

การเจริญของสาหร่ายนอกจากสภาพการเลี้ยง อาหารของสาหร่ายแล้ว ยังรวมถึงสารที่ใช้เหนี่ยวนำในการเจริญของสาหร่าย สารนั้นได้แก่ สารประกอบฟีนอลเช่น vanillin, vanillic acid, gallic acid, coumarin, caffeic acid และacetosyringone ซึ่งจะถูกสกัดมาจากสาหร่าย *D. salina* เพื่อให้มีการส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายให้ดีขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลให้อัตราการเจริญเร็วขึ้น สาหร่าย *D. salina* จะถูกได้รับยีน Vir จาก *Agrobacterium* สายพันธุ์ A348 ในส่วนของสารประกอบฟีนอลพบว่าสาร vanillin มีความเข้มข้นมากที่สุดถึง  $38.12 \pm 0.88$  ไมโครกรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาพบว่า กรดฟีนอลที่กล่าวมาข้างต้นยกเว้น gallic acid มีประสิทธิภาพในการถูกเหนี่ยวนำด้วยยีน Vir ผ่านตัวกลาง *Agrobacterium* สู่สาหร่าย *D. salina* (Pazhukunnel และคณะ, 2015)

จากงานวิจัยของ Roessler และคณะ (2011) การใช้สาหร่ายที่สามารถผลิตไขมันเพื่อทำไบโอดีเซล โดยจะศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการทางกลไกที่เกี่ยวข้องกับชีวเคมีและชีวโมเลกุลในกระบวนการผลิตไขมันในสิ่งมีชีวิตของสาหร่าย รวมทั้งการโอนถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องเข้าสู่สิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (สาหร่าย) เพื่อเพิ่มผลผลิตไขมัน จากการศึกษาพบว่ายีนที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตไขมันคือ ACCase ซึ่งได้รับการคัดแยกและโคลนยีนนั้น และใช้ในการชักนำให้เข้าสู่สาหร่ายอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่ข้อมูลที่ใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หวังว่าเพื่อเพิ่มผลผลิตไขมัน รวมทั้งการใส่ยีน nitrate reductase และ acetolactate synthase เพื่อพัฒนาการจับคู่นิโคโมโซมที่เหมือนกันในกระบวนการถ่ายยีน

## 2.2.4 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutant)

### 2.2.4.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีทางกายภาพ

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีทางกายภาพโดยใช้รังสียูวีเป็นวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ซึ่งมีการใช้ทั้งรังสียูวีเอ (UV-A), ยูวีบี (UV-B) และยูวีซี (UV-C) ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละงานวิจัย ดังเช่นงานวิจัยของ Cao และคณะ (2001) ทำการใช้รังสียูวีเอ (UV-A) ระหว่างช่วงความยาวคลื่น 320 – 400 นาโนเมตร และ 400-700 นาโนเมตร (สภาพเครียด) เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มการสะสมปริมาณเบต้าแคโรทีนในสาหร่าย *Dunaliella bardawil* ซึ่งเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ air-fluidized bed ด้วยอาหารเหลวสูตร S-deprived medium ซึ่งเขาพบว่าผลกระทบที่เกิดขึ้นส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการสะสมเบต้าแคโรทีน โดยปริมาณเบต้าแคโรทีนนั้นจะเพิ่มมากขึ้นเป็นสองเท่า หลังจากได้รับรังสีดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับตัวควบคุม เช่นเดียวกันกับวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้เกิดสารสีในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในปริมาณสูง และศึกษาองค์ประกอบของสารสีภายในเซลล์ของสายพันธุ์มิวแทนท์ ซึ่งการคัดเลือกมิวแทนท์กระทำโดยการใช้สาหร่ายสายพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 14086 โคลนี ไปทดสอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) เป็นเวลา 1 , 2 , 3 และ 5 นาที จากนั้นคัดเลือกโคลนีสาหร่ายมิวแทนท์ โดยพิจารณาจากสารสีภายในเซลล์มิวแทนท์ (124y-1 , 124p-1 , 124y-2 และ 124p-2) เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งพบว่าสายพันธุ์มิวแทนท์มีการลดลงของ คลอโรฟิลล์ เอ และ บี แต่มีการเพิ่มขึ้นของแคโรทีนอยด์ ซึ่งปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ และ บี ลดลงต่ำสุดประมาณ 3-4 เท่า ในขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณสูงสุดที่เพิ่มขึ้นประมาณ 2-4 เท่า ซึ่งมีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรม (Zaydan และคณะ, 2013) อีกทั้งยังมีการปรับปรุงกระบวนการสังเคราะห์แสงภายในเซลล์สาหร่ายทะเลจำพวกไดอะตอม อย่าง *Phaeodactylum tricornutum* โดยใช้รังสียูวีซี (UV-C) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เกิดการเพิ่มขึ้นของการสะสมลิพิดและแคโรทีนอยด์ โดยใช้ Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ในการศึกษาองค์ประกอบของสารสีหลักๆ ใน *P. tricornutum* สายพันธุ์มิวแทนท์เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง พบว่าสายพันธุ์มิวแทนท์เกิดการสะสมสาร fucoxanthin และลิพิดในปริมาณมากกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง (Zhiqian และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีการใช้รังสีอื่นๆ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายเซลล์เดียว เช่น ในการศึกษาของ Tammam และคณะ (2005) ได้ทำการเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ในอาหารสูตร MH medium ภายใต้การควบคุมสภาวะการให้แสงและอุณหภูมิที่คงที่ จากนั้นนำสาหร่าย *D. salina* ฉายด้วยรังสี แกมมา ในความเข้มที่แตกต่างกัน (100 , 180 , 330 และ 430 gray) โดยใช้ โคบอลต์ (cobalt) 60 ปรากฏว่าเกิดสายพันธุ์มิวแทนท์ที่แตกต่างกัน 4 สายพันธุ์ โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในรูปแบบของการแสดงออกของยีน ทำให้เปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นในสายพันธุ์มิวแทนท์มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมืองจากนั้นทำการวิเคราะห์เอนไซม์ peroxidase ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเสริมสร้าง

องค์ประกอบภายในเซลล์หลังจากได้รับความเสียหาย ซึ่งรังสีแกมมาไม่เพียงแต่ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในเซลล์ของสายพันธุ์มิวแตนต์แตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมืองเพียงอย่างเดียว แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังมีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์มิวแตนต์ด้วยกัน

#### 2.2.4.2 การดัดแปลงพันธุกรรมด้วยสารเคมี

นอกจากวิธีข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการนำสารเคมีบางชนิดมาทดสอบกับสาหร่ายสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์และผลิตสารสำคัญในปริมาณที่สูงขึ้น เช่น สารเคมี EMS หรือ Ethyl Methane Sulfonate มีคุณสมบัติเป็น mutagenic agent (สารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ระดับพันธุกรรม) มีรายงานเบื้องต้นในปี 2007 ว่า สาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์มิวแตนต์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร EMS มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้นถึง 30% เมื่อเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์พื้นเมือง ทั้งในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบระบบปิด (ในห้องปฏิบัติการ) และ ระบบเปิด (ในบ่อเปิด) ส่งผลให้อัตราการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์และการสะสมของแคโรทีนอยด์ในเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์ที่เกิดขึ้น (Casal และคณะ, 2007) และยังมีการทดสอบสาร EMS กับสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardtii* โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์มิวแตนต์ที่เกิดขึ้นมีการสะสมผลผลิตของลิพิดมากขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้สามารถสุ่มคัดเลือกสายพันธุ์มิวแตนต์ที่ผลิตลิพิดในปริมาณสูงได้ 3 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Nile red staining ในการตรวจดูปริมาณไขมัน ซึ่งสายพันธุ์มิวแตนต์ที่มีปริมาณลิพิดภายในเซลล์มากกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง โดยพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์มิวแตนต์ที่มีปริมาณสาร fatty acid ester (FAME) มากกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองประมาณ 1.4 เท่า และเมื่อทดลองเลี้ยงทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ในอาหารที่จำกัดสารอาหาร คือ ไนโตรเจน ปรากฏว่าสาหร่ายสายพันธุ์มิวแตนต์มีอัตราการเจริญเร็วกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองและมีการสะสมชีวมวลรวมถึงลิพิดได้ในปริมาณที่สูงกว่า (Lee และคณะ, 2014)

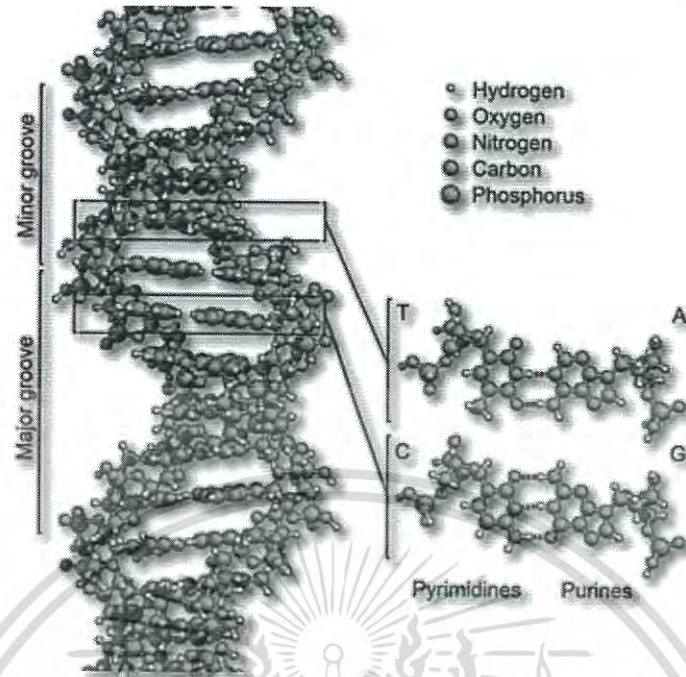
เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mujizat และคณะ (2015) ได้เล็งเห็นความสำคัญของสาหร่ายขนาดเล็ก คือ มีอัตราการเจริญที่เร็วสามารถใช้เป็นผลผลิตทางเชื้อเพลิงชีวภาพได้ ซึ่งมีเพียงสาหร่ายสายพันธุ์หลักๆ ที่สามารถผลิตชีวมวลได้ในปริมาณมากและมีปริมาณกรดไขมันสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ โดย 1 ในวิธีการที่ใช้ในการเพิ่มขึ้นของชีวมวลสาหร่าย คือ วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งในวิธีการก่อมิวแตนต์นี้ จะใช้สารเคมี EMS ทดสอบกับเซลล์สาหร่ายทุกเซลล์ ผลที่ได้คือความหนาแน่นสูงสุดของเซลล์สาหร่ายทั้ง 3 การทดลอง (กลุ่มควบคุม, 0.1 โมลาร์ และ 0.5 โมลาร์) พบว่าการทดลองที่ใช้สาร EMS เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ได้จำนวนเซลล์  $60.7 \pm 11.93 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร ในวันที่ 6 (stationary phase) ซึ่งใน 3 การทดลองที่ได้กล่าวไว้ อัตราการเจริญสูงสุดของสาหร่ายอยู่ที่การทดลองที่ใช้สาร EMS ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ( $\mu = 0.52/\text{วัน}$ ) ในวันที่ 5 (log phase) และในการทดลองที่ความเข้มข้นของสาร EMS 0.5 โมลาร์ มีอัตราส่วนของ RNA/DNA มากที่สุด ( $0.55 \pm 0.46$ ) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราส่วนดังกล่าวน้อยกว่า ( $0.12 \pm 0.04$ ) ในชีวมวลแห้งมีจำนวนเซลล์ในระยะเวลา stationary และ death phase ปริมาณสูงสุดในสาหร่าย *Nannochloropsis* sp. ที่ทดสอบด้วยสาร EMS ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ( $1.08 \pm 0.33$  และ  $1.11 \pm 0.07$  กรัม/ลิตร) ส่วนไขมันที่เกิดขึ้นในทั้ง 2 ระยะเวลาในการทดลองที่ใช้สาร EMS เข้มข้น 0.5 โมลาร์ คือ  $12.17 \pm 0.30\%$  และ  $18.14 \pm 0.35\%$  ตามลำดับ จากนั้นใช้

โครมาโตกราฟีในการทดสอบสารประกอบกรดไขมันอิ่มตัว 22 ชนิด และ สารประกอบกรดไขมันไม่อิ่มตัว 3 ชนิด ซึ่ง methyl palmitate (C16:0) เป็นกรดไขมันอิ่มตัว มีความเข้มข้นสูงสุดในทั้ง 3 การทดลอง และ mono unsaturated fatty acid (MUFA) ที่มีความเข้มข้นสูงได้แก่ methyl palmitoleate พบในการทดลองที่ใช้สาร EMS ทั้ง 2 ความเข้มข้น ซึ่ง poly unsaturated fatty acid (PUFA) ที่ตรวจสอบมีเพียง methyl linoleate (C18:2) ซึ่งมีปริมาณสูงในการทดลองที่ใช้สาร EMS ทดสอบทั้ง 2 การทดลอง

### 2.3 การกลายพันธุ์

ดีเอ็นเอ (DNA) คือ สารพันธุกรรม มีชื่อแบบเต็มว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic Acid) ซึ่งเป็นจำพวกกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ซึ่งดีเอ็นเอมักพบอยู่ในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ โดยพันตัวอยู่บนโครโมโซม (Chromosome) รวมทั้งมักพบดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดได้แก่ คน (Human), สัตว์ (Animal), พืช (Plant), เห็ดและรา (Fungi), แบคทีเรีย (Bacteria), ไวรัส (Virus) รวมทั้งสาหร่าย (Algae) เป็นต้น ดีเอ็นเอทำหน้าที่ในการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆเอาไว้ ซึ่งมีลักษณะที่มีการผสมผสานมาจากสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อน ซึ่งก็คือ รุ่นพ่อและแม่ (Parent) ทั้งยังสามารถถ่ายทอดลักษณะไปยังสิ่งมีชีวิตรุ่นถัดไป ซึ่งก็คือรุ่นลูก หรือ รุ่นหลาน (Offspring) ดีเอ็นเอ (DNA) มีพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) 2 สาย เรียงตัวในแนวที่ตรงกันข้ามกัน พอลินิวคลีโอไทด์สายหนึ่งเรียงตัวในทิศทางจาก 3' ไป 5' ส่วนพอลินิวคลีโอไทด์อีกสายหนึ่งเรียงตัวในทิศทาง 5' ไป 3' โดยที่พอลินิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สายนี้เอาส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose Sugar) ไว้ด้านนอก หันส่วนที่เป็นเบสเข้าหากัน โดยเบสที่อยู่ตรงข้ามกันต้องเป็นเบสที่เข้าคู่กันได้ (Complementary) ดีเอ็นเอจึงมีลักษณะคล้ายบันไดลิงที่บิดตัวทวนขวา หรือบันไดเวียนขวา ขาหรือราวของบันไดแต่ละข้างก็คือการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) นิวคลีโอไทด์เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose Sugar), หมู่ฟอสเฟต (Phosphate Group) (ประกอบด้วยฟอสฟอรัสและออกซิเจน) รวมทั้งไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous Base) เบสในนิวคลีโอไทด์มีอยู่ 4 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเบสพิวรีน (purine) ประกอบด้วย อะดีนีน (Adenine, A) และกวานีน (Guanine, G) อีกกลุ่มคือ ไพริมิดีน (pyrimidine) ซึ่งมีอนุพันธ์สามตัวคือ ไซโทซีน (cytosine, C) ยูราซิล (uracil, U) และไทมีน (thymine, T) ขาหรือราวของบันไดสองข้างหรือนิวคลีโอไทด์ถูกเชื่อมด้วยเบส โดยที่ A จะเชื่อมกับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะคู่ หรือ Double Bonds และ C จะเชื่อมกับ G ด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะสามหรือ Triple Bonds และข้อมูลทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เกิดขึ้นจากการเรียงลำดับของเบสในดีเอ็นเอ (DNA) (<http://www.thaibiotech.info/>)

ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 รูปของ DNA และองค์ประกอบภายใน

ที่มา : <http://www.thaibiotech.info/>

การกลายพันธุ์หรือ การผ่าเหล่าหรือ มิวเทชัน, มิวเตชัน (Mutation) คือ สภาพของสิ่งมีชีวิตที่เกิดมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ทำให้พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เกิดการกลายพันธุ์นั้น เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมที่เคยเป็นหรือ แตกต่างไปจากประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของยีน (Gene) ของสิ่งมีชีวิตนั้น

การกลายพันธุ์นั้นจัดว่าเป็นกลไกหนึ่งของการวิวัฒนาการ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่ดีขึ้นกว่าเดิมหรือ แย่ลงกว่าเดิมก็ได้หรือ อาจจะทั้งไม่ดีขึ้นและไม่แย่ลงเลยก็ได้ ถ้าดีกว่าเดิม อาจทำให้สิ่งมีชีวิตที่มีการกลายพันธุ์นั้นอยู่รอดในธรรมชาติได้ดีกว่าเดิมหรือเกิดวิวัฒนาการที่ดีขึ้นในทางกลับกัน ถ้าแย่กว่าเดิมอาจทำให้สิ่งมีชีวิตที่มีการกลายพันธุ์นั้นเกิดภาวะต่างๆที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการดำรงชีวิตก็ได้หรือเกิดการวิวัฒนาการที่ไม่ดี

หากจะแบ่งการกลายพันธุ์แล้วนั้น สามารถแบ่งเป็น 2 กรณี ได้ดังนี้ (<http://www.rmuti.ac.th>)

### 2.3.1 ชนิดของการกลายพันธุ์ (Point Mutations)

การกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นเองได้จากการผิดพลาดของการทำงานของเซลล์ หรือสามารถเกิดขึ้นได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดสายพันธุ์กลาย โดย mutagen ซึ่งเป็นสารเคมีหรือกระบวนการทางกายภาพ (physical or chemical agent) ที่เพิ่มอัตราการเกิด มิวทาเจนจะเหนี่ยวนำให้เกิดเรียกว่า induced mutations ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองเรียกว่า spontaneous mutations ส่วน point mutation คือ ลำดับเบสบนดีเอ็นเอถูกเปลี่ยนไป 1 เบส (base –pair substitution mutation) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.1 Transition คือปรากฏการณ์การแทนที่ระหว่างหมู่เบสกลุ่มเดียวกัน เช่น กลุ่มเบสพิวรีนกับกลุ่มเบสพิวรีน (A → G) หรือ กลุ่มเบสไพริมิดีนกับกลุ่มเบสไพริมิดีน (T → C) ดังรูปที่ 2.10

2.3.1.2 Transversion คือปรากฏการณ์การแทนที่ระหว่างหมู่เบสต่างกลุ่มกัน เช่น กลุ่มเบสพิวรีนกับกลุ่มเบสไพริมิดีน (A → T) หรือ กลุ่มเบสไพริมิดีนกับกลุ่มเบสพิวรีน (G → C) ดังรูปที่ 2.10

	Sequence of part of a normal gene	Sequence of mutated gene
<b>a) Transition mutation (A–T to G–C in this example)</b>		
DNA	5' TCTCAAAAATTACG 3' 3' AGAGTTTTTAAATGC 5'	5' TCTCAAGAATTACG 3' 3' AGAGTTCCTTAAATGC 5'
<b>b) Transversion mutation (C–G to G–C in this example)</b>		
DNA	5' TCTCAAAAATTACG 3' 3' AGAGTTTTTAAATGC 5'	5' TCTGAAAATTACG 3' 3' AGACTTTTTTAAATGC 5'

รูปที่ 2.10 การกลายพันธุ์ชนิด Transition และ Transversion

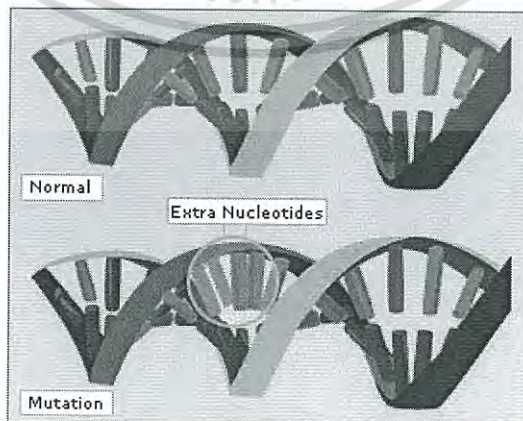
ที่มา : [https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3\\_07-03ab.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_07-03ab.html)

2.3.1.3 Frameshift mutation

การเพิ่ม (addition) หรือ ลบ (deletion) ของ base-pair บนยีน ทำให้การอ่านรหัสของสายโปรตีนนั้นๆ ตั้งแต่ตำแหน่งที่มีการเพิ่มหรือลบของ base-pair เปลี่ยนไปทั้งหมด รวมทั้งทำให้ได้สายโพลีเปปไทด์ยาวขึ้นหรือสั้นลงก็ได้

2.3.1.3.1 การแทรก (Insertion)

คือการเพิ่มลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 2.11



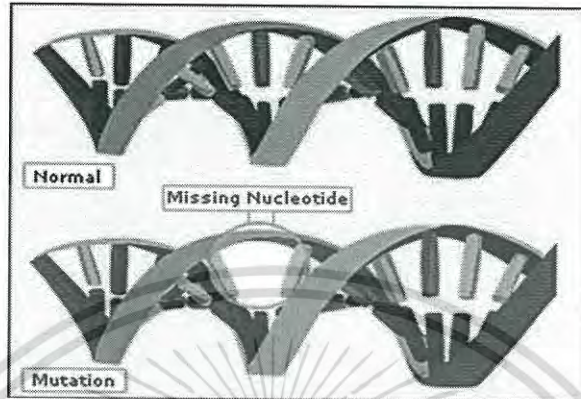
รูปที่ 2.11 การแทรกสารพันธุกรรม (Insertion)

ที่มา : <http://zube.brinkster.net/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.1.3.2 การเอาออก (Deletion)

คือการนำลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ออกจากโมเลกุลดีเอ็นเอ ก่อให้เกิดการหายไปของหมู่เบสที่จับคู่ ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 การลบสารพันธุกรรมออก (Deletion)

ที่มา: <http://zube.brinkster.net/>

นอกจากนี้แล้ว การกลายพันธุ์ยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามผลที่เกิดตามมาภายหลัง นั่นคือ

2.3.1.3.3 forward mutation เป็นการเปลี่ยนแปลงจากลักษณะภายนอกของสายพันธุ์พื้นเมืองไปเป็นสายพันธุ์กลาย

2.3.1.3.4 reverse mutations หรือ back mutations เป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายกลับมาเป็นพันธุ์พื้นเมือง (หรือเกือบเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่สมบูรณ์)

### 2.3.2 การเกิดสายพันธุ์กลายขึ้นเองและโดยการเหนี่ยวนำ

2.3.2.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous mutations) มีคำศัพท์เฉพาะที่บัญญัติดังนี้

2.3.2.1.1 Mutation rate เป็นความน่าจะเป็นในการเกิดการกลายพันธุ์ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเช่น จำนวนสายนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในหนึ่งรุ่น หรือจำนวนสายนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีนๆ หนึ่งใดในหนึ่งรุ่น

2.3.2.1.2 Mutation frequency คือ ตัวเลขความถี่จากการเกิด การกลายพันธุ์แบบหนึ่งต่อเซลล์หนึ่ง หรือสิ่งมีชีวิตหนึ่งต่อประชากรทั้งหมดเช่น ตัวเลขการเกิดการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งต่อ 1 เซลล์ตัวอ่อน 1 ล้านเซลล์

อ้างอิงในแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์คือ  $1 \times 10^{-5}$  ถึง  $1 \times 10^{-7}$  ต่อยีนต่อรุ่น point mutation ทุกชนิดสามารถเกิดขึ้นเองได้ และการเกิดการกลายพันธุ์ ที่เกิดขึ้นเองนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างการจำลองรหัส DNA ในรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2 ของวงจรสิ่งมีชีวิต และเกิดจากการเคลื่อนย้ายรหัสทางพันธุกรรม (transposable genetic elements) จะเห็นได้ว่า ในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ ก็จะมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเองอยู่แล้ว จึงไม่น่าแปลกใจเลยว่าทำไมเราจึงพบเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสดื้อยาอยู่เสมอๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.2.2 การเกิดสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (induced mutation)

โดยทั่วไปการเหนี่ยวนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาบนยีน การกลายพันธุ์ทั่วไปใช้รังสี (radiation) และสารเคมี ซึ่งแต่ละกระบวนการจะมีกลไกที่เฉพาะแตกต่างกันไป โดยทำให้ดีเอ็นเอ (DNA) หรือ ยีน (Gene) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) ของสิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงและเกิดลักษณะแปลกใหม่ที่กลายพันธุ์ไปจากเดิม สารเคมีหรือรังสีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์นี้ เรียกว่า “สิ่งก่อกลายพันธุ์หรือ สารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen)” ซึ่งสารก่อกลายพันธุ์มีดังต่อไปนี้

#### 2.3.2.2.1 รังสี (Radiation) รังสีที่กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์มี 2 ชนิดคือ

##### 2.3.2.2.1.1 Ionizing Radiation เช่น รังสีบีตา, รังสีแกมมา, รังสีเอกซ์

ในการใช้รังสีเอกซ์ (X-rays) เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น รังสีเอกซ์ทะลุทะลวงเนื้อเยื่อให้ไปและชนกับโมเลกุลต่างๆ แล้วทำให้อิเล็กตรอน ( $e^-$ ) หลุดออกจากวงโคจร (orbits) ของโมเลกุลนั้นๆ ทำให้โมเลกุลนั้นๆ เกิดเป็นไอออน (ions) ไอออนนี้สามารถทำให้พันธะโควาเลนต์ (covalent bonds) ต่างๆ ของโมเลกุลในเซลล์แตกได้ ดังเช่นถ้าพันธะโควาเลนต์ของ DNA แตกจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่โครโมโซมของเราได้ และถ้าในเซลล์มีไอออนมากๆ เซลล์ก็จะตายได้

##### 2.3.2.2.1.2 Non-Ionizing Radiation เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสียูวี (Ultraviolet light rays)

มาจากดวงอาทิตย์ที่ไม่ทำให้เกิดไอออน แต่รังสียูวีทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่หมู่เบส purine และ pyrimidine ของสายดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอดูดซับรังสียูวี (คลื่นความถี่ 254-260 นาโนเมตร) จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เกิดเป็นการกลายพันธุ์แบบเฉพาะจุด (point mutations) นอกจากนี้รังสียูวี สามารถชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ไทมินไดเมอร์ (thymine dimers) หรือ ไซโทซีนไดเมอร์ (cytosine dimers)

#### 2.3.2.2.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen) ได้แก่ สารเคมีต่างๆซึ่งมีหลายชนิดเช่น

##### 2.3.2.2.2.1 สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่างๆ ของดีเอ็นเอ (base analogues)

ซึ่งสามารถเข้าแทนที่เบสเหล่านั้นได้ระหว่างที่เกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสและรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปสารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ 5-โบรโมยูราซิล 2-อะมิโนพิวรีน 5-โบรโมยูราซิล มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับไทมิน เมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอจะสามารถเข้าไปแทนที่เบสไทมินได้ และสามารถเกิด tautomeric หรือ ionization ได้ซึ่งเมื่อเกิดแล้วแทนที่จะจับคู่กับเบสอะดีนีน จะไปจับคู่กับเบสกวานีน เมื่อมีการจำลองโมเลกุลต่อไปอีกจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสขึ้นได้

##### 2.3.2.2.2.2 สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของเบส

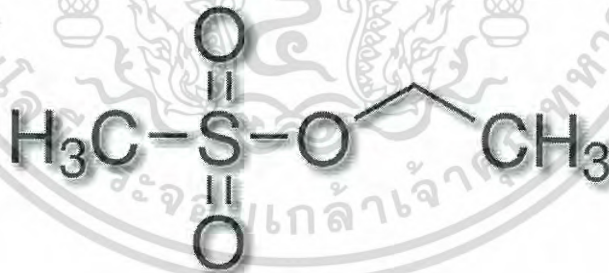
ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสเช่นเดียวกัน ทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ กรดไนตริก ไฮดรอกซิลลามีน ไนโตรเจนมีสตาต เอทิลมีเทนซัลโฟเนต โดยกรดไนตริก จะทำหน้าที่ดึงหมู่อะมิโนออกจากโมเลกุลของเบสอะดีนีน, ไซโทซีน และกวานีนทำให้เบสอะดีนีนเปลี่ยนเป็นไฮโปแซนทีน ซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไซโทซีนได้ เบสไซโทซีนเปลี่ยนเป็นยูราซิลซึ่งสามารถจับคู่กับเบสอะดีนีนได้และเบสกวานีน เปลี่ยนเป็นแซนทีน ซึ่งสามารถจับคู่กับ

เบสไซโทซีนได้ตั้งนั้นเมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบทรานซิชัน

2.3.2.2.3 สารเคมีที่ทำให้เกิดการเพิ่มและการขาดของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ สีย้อมเช่น อะคริดีน ออเรนจ์, โพรฟลาวีน โดยโมเลกุลของอะคริดีน ออเรนจ์ หรือโพรฟลาวีนสามารถเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือทำให้โมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ที่ถูกแทรกโดย อะคริดีน ออเรนจ์ หรือโพรฟลาวีนหลุดออกมา เมื่อมีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์ และการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งยีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้อาจจะกลายเป็นยีนเด่นหรือยีนด้อยก็ได้ หรืออาจทำให้เกิดการตายขึ้นได้ (lethal gene)

#### 2.4 สารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS)

เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติก่อกลายพันธุ์ในพืชและจุลินทรีย์ มีสูตรโมเลกุล คือ  $\text{CH}_3\text{SO}_4\text{OCl}_2\text{H}_5$  (รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างของสารเคมี EMS) มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี ละลายน้ำได้ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ มีคุณสมบัติก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า ทรานซิชัน (Transition) คือเบสของไรโบนิวคลีโอติกแอซิด (RNA) และดีออกซีไรโบนิวคลีโอติกแอซิด (DNA) จับคูผิด เช่น เบสกวานีนจับกับเบสไทมีน แทนที่จะจับกับเบสไซโตซีนตามปกติ (นพพร, 2543) EMS มีหมู่เอทิล (Ethyl group) คือ  $\text{C}_2\text{H}_5$  ซึ่งจะถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน (Alkylation) สามารถเขาทำปฏิกิริยาแอลคิลเลชันกับหมู่เบสพิวรีนและหมู่เบสไพริมิดีนรวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ สารอีเอ็มเอสทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดังนี้ (เปรมจิต รongสวัสดิ์ มหาวิทยาลัยทักษิณ, 2549)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างสารเคมี EMS

ที่มา : <https://www.mpbio.com>

#### 2.4.1 ทำให้เกิดการเขาแทนที่คู่เบส (Single base substitution)

การที่หมู่เอทิลเข้ามาอยู่ในโมเลกุลของเบสกวานีน ทำให้คุณสมบัติในการเกิดไอออนเซชันแตกต่างไปจากเบสกวานีนตามปกติเกิดการจับคู่ที่ผิดไปจากเดิม นำไปสู่การกลายพันธุ์ชนิดทรานซิชันได้ (เบสกวานีนทำปฏิกิริยากับเบสไซโตซีน กลายเป็น เบสอะดีนีนทำปฏิกิริยากับเบสไทมีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.4.2 การหลุดหายไปของเบสพิวรีนจากสายดีเอ็นเอ (Depyrenation)

การที่มีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่ตำแหน่งต่างๆ ในเบสพิวรีน มีการตัดขาดของพันธะเคมี (Bond) ที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบสทำให้เบสหลุดออกไปจากดีเอ็นเอโมเลกุล ทำให้เกิดช่องว่าง (Gap) ขึ้นเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ คือเบสเอคซิซันรีแพร์ (Base excision repair) ทำหน้าที่ซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดกับเซลล์บ่อยครั้งที่การซ่อมแซมเกิดความผิดพลาดได้เบสที่แตกต่างไปจากเดิม ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดทรานซิชัน หรือ ทรานสเวอร์ชันได้

#### 2.4.3 การตัดขาดของเส้นเดี่ยวและเส้นคู่ของดีเอ็นเอ (Single strand or double strand break)

เมื่อมีดีพีวรีนขึ้นหรือการหลุดหายไปของเบสพิวรีน ทำให้น้ำตาลโมคกตัวเกิดไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) มีการตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลทำให้เส้นเดี่ยวของดีเอ็นเอหรือ เส้นคู่ของดีเอ็นเอขาดจากกันได้นำไปสู่การหลุดหายไปของสวอนของดีเอ็นเอ และเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด (สิรินุช, 2540)

จากงานวิจัยของ Mujizat และคณะ (2015) ได้ทดสอบสารเคมี EMS กับสาหร่าย *D. salina* ที่ 2 ความเข้มข้น คือ 0.1 M และ 0.5 M เพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลในสายพันธุ์มีวแทนท์พบว่าที่ความเข้มข้นของสาร EMS 0.1 M ได้เซลล์สาหร่ายขนาด 10.09 ไมโครเมตร และที่ความเข้มข้นของสาร EMS 0.5 M ได้เซลล์สาหร่ายขนาด 3.89 ไมโครเมตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมหรือสายพันธุ์พื้นเมืองมีขนาดเซลล์ 4.08 ไมโครเมตร ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นของสาร EMS 0.1 M ได้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พื้นเมืองประมาณ 3 เท่า ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างมีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน โดยสาหร่ายที่บ่มด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลทำให้อัตราการเจริญช้าลง

Mendoza และคณะ, 2008 ได้ทดลองในสาหร่าย *D. salina* ที่คัดแยกได้ในหมู่เกาะคะเนรี ราชอาณาจักรสเปน เพื่อดูการช่วงชีวิตของสาหร่าย และผลผลิตของสาหร่ายชนิดนี้ โดยจะสังเกตขนาดของเซลล์สาหร่าย ความหลากหลายของเซลล์ที่เป็นลักษณะทางกายภาพ รวมทั้งทางสรีรวิทยาที่เป็นสารสะสมเช่น สารสี รวมทั้งอัตราการเจริญของสาหร่าย ซึ่งพบว่าลักษณะทางกายภาพที่พบมีการเปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์พื้นเมือง รวมทั้งไขมันซึ่งเป็นสารสะสมของสาหร่ายมีการสะสมที่เพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง โดยตรวจสอบด้วยวิธี cytometric ด้วยสาร Nile red

Kawaroe และคณะ, 2015 จากการทดลองด้วยสารเคมี EMS ใน *D. salina* ที่ความเข้มข้น NaCl 0.1 และ 0.5 M พบว่าที่ความเข้มข้น NaCl 0.1 M มีการเพิ่มขึ้นของขนาดของเซลล์ 3 เท่าเป็น 10.09 ไมโครเมตร เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (4.08 ไมโครเมตร) นอกจากนั้นยังมีเปอร์เซ็นต์ในการสะสมไขมันที่เพิ่มสูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองอีกด้วย โดยอัตราการเจริญของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์พื้นเมืองแตกต่างกัน รวมทั้งการสร้างสารแอนติออกซิแดนท์ด้วย

จากการตรวจเอกสารผู้ทำการวิจัยพบว่า การเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นวิธีที่รวดเร็วและง่ายต่อการนำมาซึ่ง *D. salina* สายพันธุ์ใหม่ อีกทั้งยังได้ฟิโนไทป์ที่หลากหลายซึ่งส่งผลต่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด ที่สามารถปรับปรุงการเจริญเติบโต ชีวมวล รวมถึงการสะสมของสารต่างๆที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงเลือกใช้สารเคมี EMS มาทดลองกับ *D. salina*

(สายพันธุ์ที่พบในดินเค็มในประเทศไทย) ในเบื้องต้น ผู้ทำวิจัยคาดหวังว่าจะได้สายพันธุ์ใหม่ที่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยและหวังว่าจะสามารถนำสายพันธุ์ที่ถูกปรับปรุงมาทำการวิจัยต่อยอดต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการ

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

##### 3.1.1 อุปกรณ์เครื่องไฟฟ้า

- 3.1.1.1 หลอดไฟ (Philips TMS110)
- 3.1.1.2 เครื่องเขย่า (KS 501 digital)
- 3.1.1.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (2800A UV/VIS, UNICO)
- 3.1.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (spectrafuge 16M, Edison, NJ)
- 3.1.1.5 ตู้ปลอดเชื้อ (NANA-112485)
- 3.1.1.6 เครื่องเขย่าสาร (Vortex-Genie<sup>®</sup> 2, Scientific Industries)
- 3.1.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- 3.1.1.8 หม้ออบไอน้ำความดันสูง (Autoclave ยี่ห้อ TOMY)
- 3.1.1.9 เครื่องกวนสาร (IKAMAG C-MAG HS7, IKA)
- 3.1.1.10 เครื่องชั่งสาร (Sartorius, BSA224S-CW)
- 3.1.1.11 แวคคัม เคื่องดูดสูญญากาศ (IM-235D)

##### 3.1.2 อุปกรณ์แก้วและภาชนะ

- 3.1.2.1 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250, 500 มิลลิลิตร
- 3.1.2.2 ขวดดูแรนขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.2.3 ขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.2.4 กระบอกตวง 100 มิลลิลิตร

##### 3.1.3 เครื่องนับและเครื่องสังเกต

- 3.1.3.1 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 3.1.3.2 สไลด์วัดขนาดเซลล์ (Ocular micrometer)

##### 3.1.4 อื่นๆ

- 3.1.4.1 เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาด 0.2-2, 200-1000 มิลลิลิตร
- 3.1.4.2 ลูกยางดูดสารละลาย
- 3.1.4.3 กระดาษกรองขนาด 47 นาโนเมตร (whatman<sup>™</sup>, CAT No. 1820-047)

#### 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 สารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS)
- 3.2.2 90% (v/v) อะซิโตน (acetone)
- 3.2.3 10% (w/v) โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate anhydrous)

#### 3.3 สูตรอาหารและสารละลาย

- 3.3.1 อาหารสูตร Modified Ramaraj Medium (Sathasivam และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 อาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

A. Micronutrient

ชื่อสารเคมี	สูตรโมเลกุล	มิลลิโมล	กรัม ต่อ ลิตร
กรดบอริก	$H_3BO_3$	150	9.27507
แมงกานีสคลอไรด์	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10	1.97900
ซิงค์ คลอไรด์	$ZnCl_2$	0.8	0.10902
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.3	0.05114
โซเดียมโมลิบเดต	$Na_2MoO_4$	2	0.48000
โซเดียมเมทาวานาเดต	$NaVO_3$	2	0.24386
โคบอล (II) คลอไรด์	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2	0.047586

B. Concentrated Mix

ชื่อสารเคมี	สูตรโมเลกุล	มิลลิโมล / โมล	กรัม ต่อ ลิตร
โพแทสเซียมคลอไรด์	KCl	30 มิลลิโมล	2.0000
โพแทสเซียมไนเตรท	$KNO_3$	1 โมล	5.0600
แมงกานีสซัลเฟตไฮเดรท	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 โมล	12.3230
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	60 มิลลิโมล	0.4410
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต	$KH_2PO_4$	20 มิลลิโมล	0.1400
ไอรอน (III) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรท	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.4 มิลลิโมล	0.0054

\*  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  ละลายใน 0.5 โมล EDTA 400 ไมโครลิตร (pH 7.5)

C. Modified Ramaraj Medium

ชื่อสารเคมี	มิลลิลิตร ต่อ ลิตร
Micronutrient (A)	1 มิลลิลิตร
Concentrated Mix (B)	100 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์	ตามความต้องการ
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.5 โมล	50 มิลลิลิตร

\* หลังจากออโตเครปปล่อยให้อาหารเย็นตัวลงแล้วผสมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ( $NaHCO_3$ )

3.3.2 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB buffer) 0.1 M (pH 7)  
เตรียมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 3.1 กรัม พร้อมด้วยโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ปราศจากน้ำ ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhydrous)) 10.9 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร และนำมาผสมกัน ซึ่ง pH ที่ได้ประมาณ 7.4 และเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ PB 0.1 M ปริมาตร 1 ลิตร (ปริมาตรทั้งหมด) ในระดับความเข้มข้นที่ต้องการเพื่อให้ได้ pH 7 ตามที่ต้องการ แสดงดังตารางนี้ โดย  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (monobasic; m.w. = 138) และ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (dibasic; m.w. = 142) (Smit และคณะ, 2006)

ตารางที่ 3.2 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB buffer) 0.1 M

pH	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1 M (ml)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 M (ml)
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8
6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4

### 3.4 สายพันธุ์สาหร่ายและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ผู้วิจัยนำเอาสาหร่าย *D. salina* KU11 ซึ่งคัดแยกจากแหล่งดินเค็ม จังหวัด นครราชสีมา ประเทศไทย โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.นิรันดร์ จันทวงศ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตร RAMARAJ MEDIUM 1.5M NaCl (Sathasivam และคณะ, 2013) ที่ความเข้มข้น 2044 ลักซ์ ใช้ความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยง 150 rpm ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

### 3.5 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Standard growth curve)

การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 การทดลองนี้ทำเพื่อหาช่วงที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบด้วย EMS เริ่มจากการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเป็นประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการนับเซลล์ ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกว่าเซลล์สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะ stationary phase (มีอัตราการเจริญเติบโตที่คงที่) นับเซลล์โดยใช้ Hemacytometer การทดลองนี้ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าทางสถิติ และรายงานผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6 การทดสอบโดยสารเคมี EMS (Killing curve)

การทดสอบสาหร่าย *D. salina* ที่ความเข้มข้นของ EMS ตั้งแต่ 0–1.68 % ในการหาอัตราการรอดชีวิตที่เหมาะสม (Mendoza และคณะ, 2008) การทดลองนี้ทำเพื่อหาอัตราการอยู่รอดของสาหร่าย *D. salina* โดยคิดจากจำนวนโคโลนีที่เจริญเติบโตขึ้นในแต่ละความเข้มข้นของ EMS วิธีการทดลองคือ นำเซลล์ในระยะการแบ่งตัวทวีคูณ (Exponential phase) ของการเจริญเติบโตของสาหร่ายปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอด microcentrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการปรับสมดุลเซลล์โดยใช้สารละลาย PB Buffer ประมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วนำมาบ่มกับสารเคมี EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.12%, 0.8%, 1.44%, 1.68% โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0% เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นนำไปบ่มโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มีดรัมด้วยฟอยล์ เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 10% (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อทำลายประสิทธิภาพของสาร EMS แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเติมสารละลาย PB Buffer 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเติมอาหารเหลวสูตร Ramaraj Medium (Sathasivam และคณะ, 2013) 1 มิลลิลิตร จากนั้นหุ้มด้วยฟอยล์แล้วนำไปบ่มโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำสาหร่ายที่ถูกทดสอบด้วยสาร EMS ในแต่ละความเข้มข้นดังกล่าวนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งโดยใช้เทคนิค spread plate (รูปที่ 3.1) สังเกตการเกิดโคโลนีว่าขึ้นมากน้อยแตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของสาร EMS อย่างไร และคัดเลือกสาหร่ายที่เกิดโคโลนีเดียว ณ ความเข้มข้นของสาร EMS ที่เหมาะสมโดยการทำการ killing curve เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 3.1 *D. salina* ทดสอบกับสารเคมี EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.18, 0.8, 1.44, 1.68% ตามลำดับ ด้วยเทคนิค spread plate

### 3.7 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์มิวแตนท์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง

การทดลองนี้เพื่อคัดเลือกหามิวแตนท์ที่มีการปรับปรุงการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง มีวิธีการ ดังนี้

3.7.1 นำสาหร่าย *D. salina* มิวแตนท์จำนวน 30 โคโลนีเดี่ยวจาก 300 โคโลนี จาก EMS ความเข้มข้น 1.44% ไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งด้วยเทคนิค simple streak ดังรูปที่ 3.2 โดยใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 2 อาทิตย์ จากนั้นย้ายสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวใน well plates เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต



รูปที่ 3.2 แสดงรูปโคโลนีเดี่ยวทั้งหมด 30 โคโลนีด้วยเทคนิค simple streak

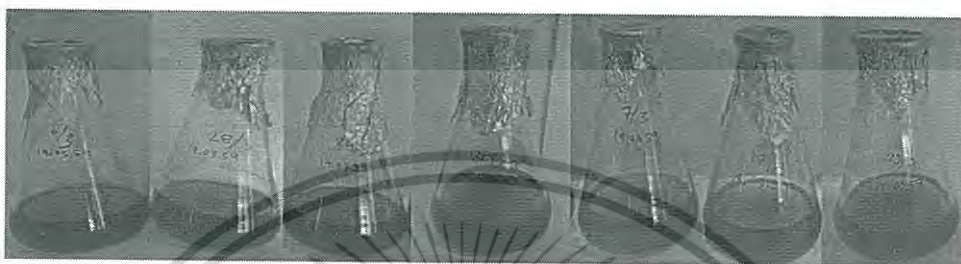
3.7.2 เมื่อได้หัวเชื้อจากข้อ 3.7.1 คัดเลือกมาจำนวน 25 ตัวอย่าง จึงนำมาถ่ายลงในอาหารเหลวใหม่ 3 มิลลิลิตร ด้วยเซลล์เริ่มต้นที่  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วสังเกตสีประมาณ 3-5 วัน เพื่อเลือกตัวอย่างที่คาดว่าจะโตเร็วและโตช้า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (รูปที่ 3.3)



รูป 3.3 *D. salina* มิวแตนท์ 25 สายพันธุ์ เลี้ยงใน 25-well plates

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 จากข้อ 3.7.2 คัดเลือก *D. salina* มิวแตนต์จำนวน 6 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นตัวอย่างที่ คาดว่าจะโตเร็ว 3 ตัวอย่าง และโตช้าอีก 3 ตัวอย่าง มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ (รูปที่ 3.4) และวัดอัตราการ เจริญเติบโตในขวดรูปชมพู่ โดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่เท่ากัน คือ ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร Ramaraj Medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการวัด อัตราการเจริญเติบโตทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยวิธีการนับเซลล์ทั้งหมด 3 ซ้ำ เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 3.4 *D. salina* มิวแตนต์ 6 สายพันธุ์ ควบคู่กับสายพันธุ์พื้นเมือง (หมายเลข 6, 24, 28, สายพันธุ์พื้นเมือง, 7, 17, 23 จากซ้ายไปขวา)

3.7.4 การตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์สำหรับ (optical density) โดยใช้ค่าการ ดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *D. salina* มิวแตนต์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร การทดลองทำขึ้นทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้เซลล์เริ่มต้นประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร Ramaraj Medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นทำการดูอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 มิลลิลิตร มาทำการ ตรวจวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทุกๆ 24 ชั่วโมง

3.7.5 วัดขนาดของเซลล์สำหรับ *D. salina* มิวแตนต์ จากการสุ่มเซลล์ในแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 20 เซลล์ ในช่วง lag phase, log phase และ stationary phase โดยใช้ ocular micrometer หาค่าเฉลี่ยจาก 20 เซลล์และนำมาเปรียบเทียบหาความแตกต่าง เพื่อดูว่าการ เจริญเติบโตที่แตกต่างกัน มีผลมาจากขนาดของเซลล์หรือไม่

3.8 การวัดชีวมวลของสาหร่าย *D. salina* มิวแตนต์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง

จาก 3.7 อยากทราบว่า จะมีการสะสมชีวมวลเพิ่มขึ้นหรือไม่ เมื่อเปรียบเทียบชีวมวลระหว่าง สายพันธุ์มิวแตนต์หมายเลข 24 และสายพันธุ์พื้นเมือง เริ่มต้นโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายใน อาหารเหลวสูตร Ramaraj medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ที่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่เซลล์เริ่มต้นประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 กลุ่มการทดลอง (การทดลองละ 2 ซ้ำ) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3080 ลักซ์ จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายจำนวน 10 มิลลิลิตร โดยการกรองผ่านกระดาษ กรองของบริษัท whatman<sup>TM</sup> ขนาด 47 นาโนเมตร ผ่านเครื่องดูดสุญญากาศ ที่อายุเซลล์ช่วงวันที่ 3-4 (ระยะ log) และวันที่ 5-8 (ระยะ stationary) และนำกระดาษกรองมาชั่งน้ำหนักก่อนและหลัง เพื่อหาค่าความแตกต่างของน้ำหนักแห้งในสายพันธุ์มิวแตนต์และสายพันธุ์พื้นเมือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.9 การวิเคราะห์เชิงสถิติ

3.9.1 เมื่อเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *D. salina* KU11 เพื่อหาช่วงอัตราการเจริญเติบโตทั้ง 3 ครั้ง โดยวิธีการนับเซลล์ นำค่าสังเกตทุกค่ามาคำนวณโดยใช้วิธีทางสถิติ (RCBD) ว่าทั้ง 3 ครั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

3.9.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* มีวแดนที่ทั้ง 6 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยวิธีการนับเซลล์ นำค่าสังเกตทุกค่ามาคำนวณโดยใช้วิธีทางสถิติ (RCBD) ว่าทั้ง 3 ซ้ำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ และคำนวณว่าทั้ง 6 สายพันธุ์แตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมืองหรือไม่ โดยใช้วิธีทางสถิติ DMRT

3.9.3 การตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย (optical density) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์มีวแดนที่ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ ด้วย OD นำค่าสังเกตทุกค่ามาคำนวณโดยใช้วิธีทางสถิติ (RCBD) ว่าทั้ง 2 ซ้ำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ และคำนวณว่าทั้ง 6 สายพันธุ์แตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมืองหรือไม่ โดยใช้วิธีทางสถิติ DMRT



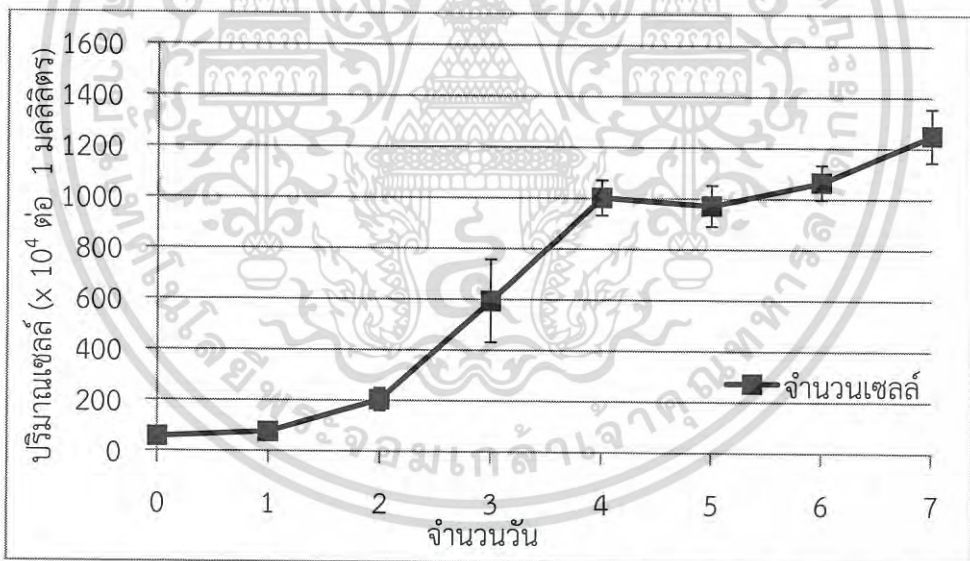
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการวิจัย

##### 4.1.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

การทดลองนี้ทำเพื่อทราบช่วงเวลาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* และนำช่วง log phase ของสาหร่ายไปทดสอบด้วยสารเคมี EMS จากผลการวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งสิ้น 8 วัน โดยมีเซลล์เริ่มต้นที่ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.1) พบว่า สาหร่าย *D. salina* มีการเจริญช่วง lag phase ในวันที่ 0 ถึง วันที่ 2 ซึ่งมีการแบ่งเซลล์ประมาณ  $50-200 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 2 จึงเข้าสู่การเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) จนถึงวันที่ 5 ซึ่งมีจำนวนเซลล์สะสมเพิ่มขึ้นอยู่ที่ประมาณ  $400-700 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 5 เป็นต้นไป อัตราการเจริญเติบโตของ *D. salina* จึงเข้าสู่อัตราที่คงที่บ่งบอกถึงระยะ stationary จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าช่วงวันที่ 3-5 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมเพื่อนำไปสู่การทดลองต่อไป



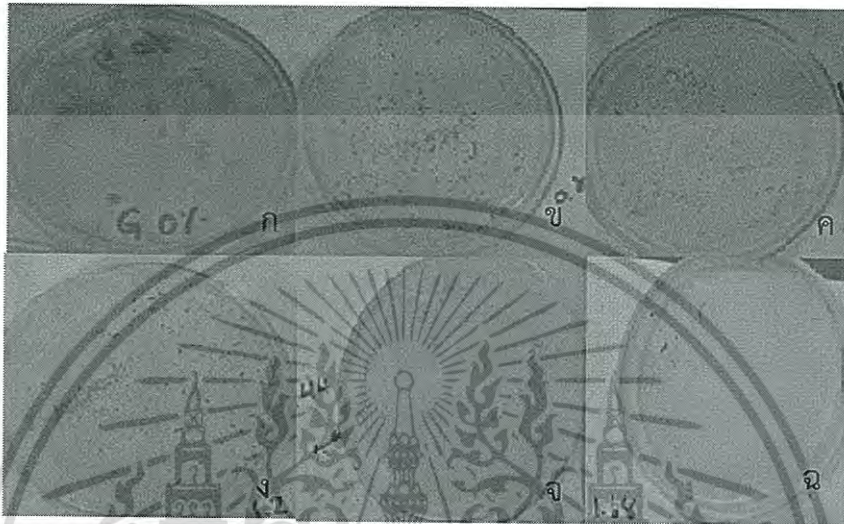
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 (สายพันธุ์พื้นเมือง)

4.1.2 การวัดอัตราการรอดชีวิตของ *D. salina* และสร้าง killing curve หลังจากทดสอบด้วย EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

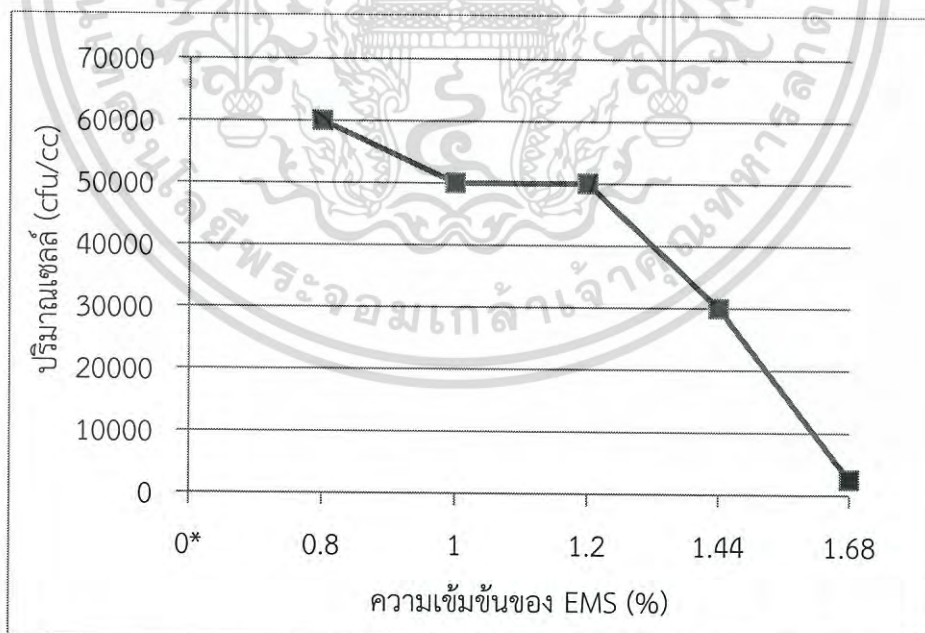
การทดลองนี้ทำเพื่อหาสายพันธุ์มิวแทนท์ ที่คาดว่าจะมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นของ *D. salina* มิวแทนท์ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง จากการทดสอบเซลล์ *D. salina* ที่ความเข้มข้นของ EMS 0.8, 1, 1.2, 1.44 และ 1.68 % พบว่า อัตราการอยู่รอดของ *D. salina* เซลล์ ลดลงคิดเป็นร้อยละ 50, 30 และ 10 ที่ความเข้มข้น 1.2, 1.44, และ 1.68%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นใบยืมเรียบร้อยแล้ว กรุณา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0% ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม และผู้วิจัยได้เลือกเซลล์ *D. salina* ที่รอดชีวิตจำนวน 300 โคโลนี ที่ความเข้มข้น 1.44% มาทำการทดลองต่อไป เนื่องจากมีจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตอย่างเหมาะสม (300 โคโลนี) ไม่มาก หรือน้อยจนเกินไป อีกทั้งโคโลนีที่เกิดขึ้นแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวที่ชัดเจน ดังรูปที่ 4.2 และแสดงเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 แสดงจำนวนโคโลนีของ *D. salina* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย EMS : ความเข้มข้นของ EMS ที่ ก 0%, ข 0.8%, ค 1%, ง 1.2%, จ 1.44%, ฉ 1.68%



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเคมี EMS กับปริมาณเซลล์ (cfu/ml) เครื่องหมาย \* แสดงถึงอัตราการรอดชีวิตที่ไม่สามารถนับเป็นโคโลนีได้ (TNTC)

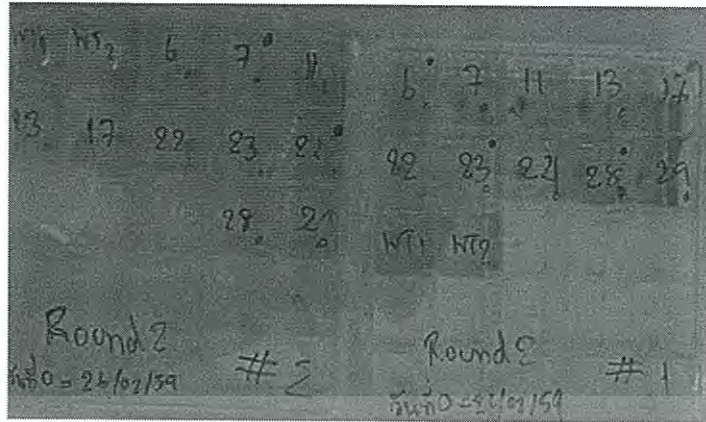
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.3 การคัดเลือกสาหร่าย *D. salina* มิวแทนท์โดยพิจารณาจากความเขียว

การทดลองนี้เพื่อคัดเลือก *D. salina* มิวแทนท์ จากการทดลองก่อนหน้านี้ (4.1.2) ในการทดลองนี้ผู้ทำวิจัยได้ทำการสุ่มตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวของ *D. salina* มิวแทนท์ จำนวน 30 โคโลนี จากทั้งหมด 300 โคโลนี (รูปที่ 4.4) ที่ความเข้มข้น 1.44% EMS จากนั้นคัดเลือกเหลือ 25 โคโลนีที่มีการเจริญเติบโตที่ดึบนอาหารแข็ง และคัดเลือกเหลือ 10 มิวแทนท์ที่มีสีเขียวเข้มที่สุด 10 อันดับแรก ซึ่งคาดว่าจะมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง และนำมาวัดค่าอัตราการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.5) ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยเซลล์เริ่มต้นเท่ากันประมาณ  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อสังเกตความเขียว(คลอโรฟิลล์) ว่า *D. salina* มิวแทนท์ใดมีความเขียวแตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมือง พบว่า *D. salina* มิวแทนท์ จำนวน 6 สายพันธุ์ มีความเขียวของสาหร่ายที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดย *D. salina* มิวแทนท์ที่โตเร็วกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองคือหมายเลข 6, 24, 28 ส่วน *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 7, 17, 23 มีอัตราการเจริญต่ำกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง หลังจากนั้นนำ 6 สายพันธุ์ที่แตกต่าง ไปวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวันต่อไป (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.4 *D. salina* มิวแทนท์ จำนวน 30 โคโลนีจากทั้งหมด 300 โคโลนี บนอาหารแข็งสูตร Ramaraj medium ด้วยเทคนิค simple streak



รูปที่ 4.5 การคัดเลือก *D. salina* มิวแตนต์ที่มีสีเขียวเข้มกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง หลังจากวันที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Ramaraj medium ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

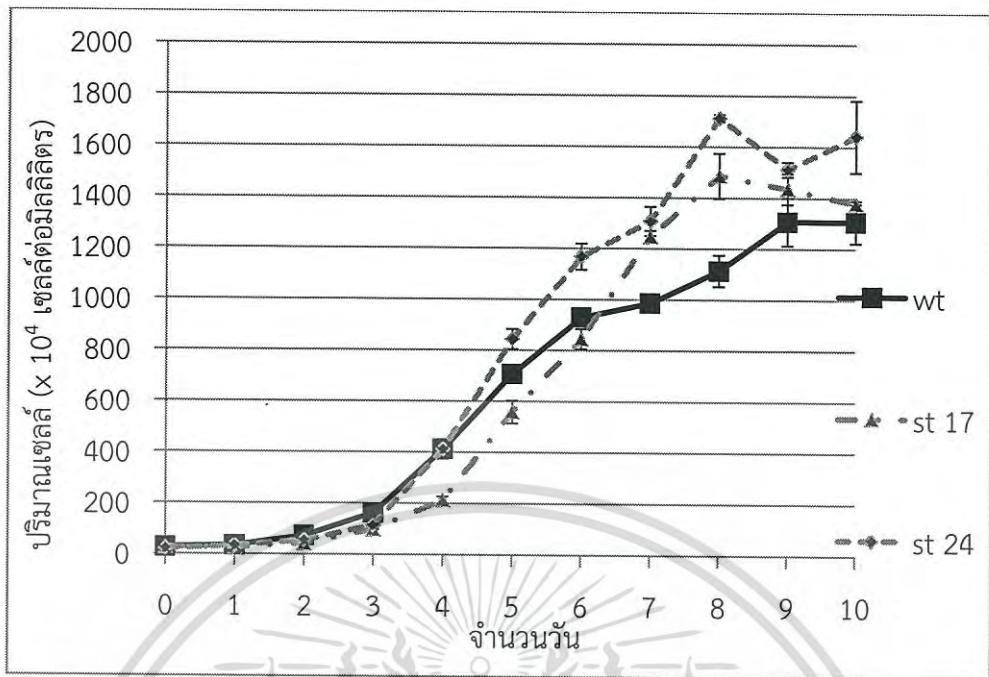


รูปที่ 4.6 *D. salina* มิวแตนต์ 6 สายพันธุ์ (6,7,17,23,24,28) เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเปรียบเทียบสีเขียวของ (ก) สีเขียวเข้มกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง (6,24,28) (ข) สีเขียวเข้มน้อยกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง (7,17,23) (ค) สายพันธุ์พื้นเมือง

#### 4.1.4 การวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแตนต์ 6 สายพันธุ์

*D. salina* มิวแตนต์สายพันธุ์ที่ 6, 7, 17, 23, 24 และ 28 ถูกนำมาวัดหาค่าการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีการปรับปรุงการเจริญเติบโตไปในทิศทางที่ดีขึ้น โดยการใช้เซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 จากกราฟดังกล่าว พบว่า *D. salina* มิวแตนต์หมายเลข 17 และ 24 แสดงอัตราการเจริญเติบโตและการสะสมของเซลล์ในระยะ stationary เพิ่มขึ้นประมาณ 1.8 และ 1.45 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ในขณะที่สายพันธุ์มิวแตนต์ที่ 6 และ 23 แสดงอัตราการเจริญเติบโต และการสะสมของเซลล์ในระยะ stationary ที่ลดลงประมาณ 1.4 และ 1.35 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ดังรูป 4.9 และ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

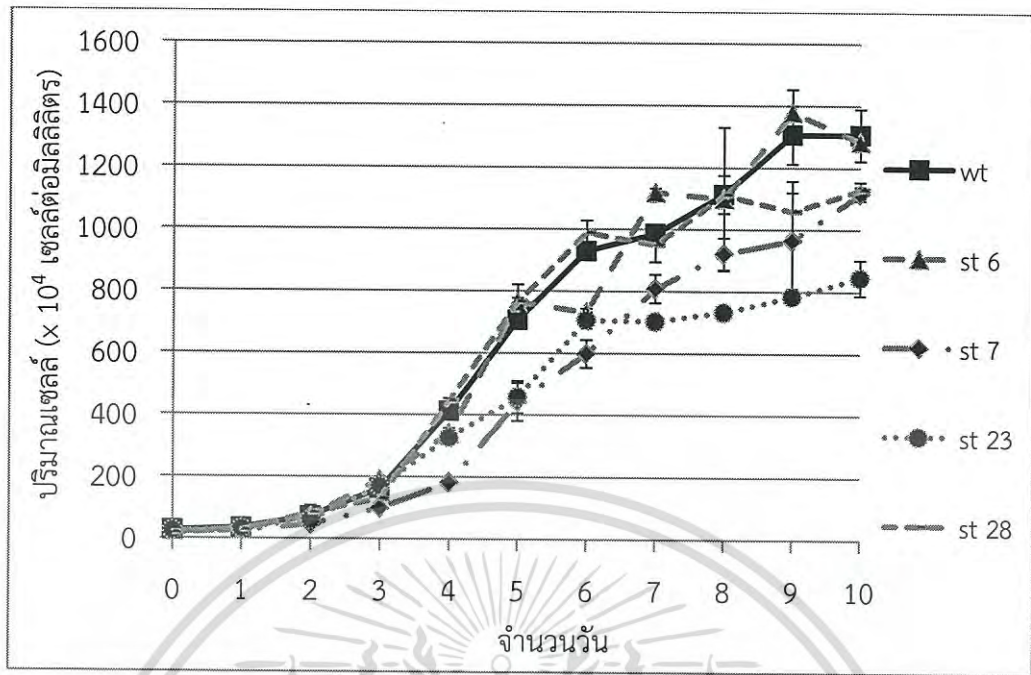


รูปที่ 4.7 แสดงอัตราการเจริญของ *D. salina* มิวแตนท์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่โตเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์

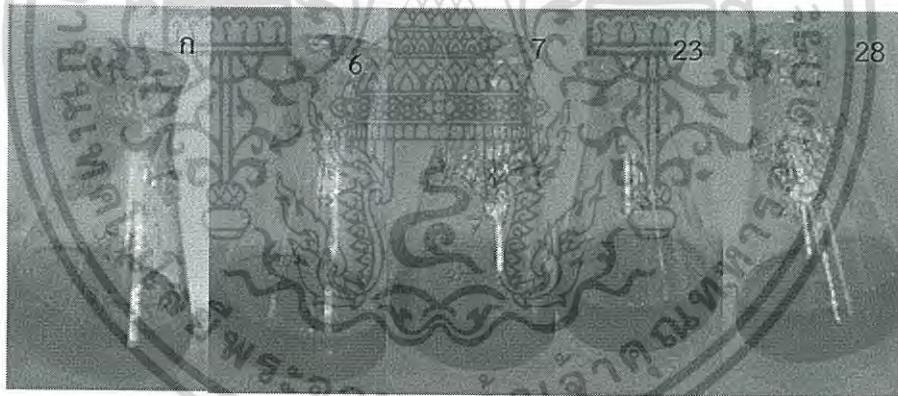


รูปที่ 4.8 รูปการเพาะเลี้ยง *D. salina* มิวแตนท์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่โตเร็ว (หมายเลข 17, 24) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (ก) ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วันที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงอัตราการเจริญของ *D. salina* มิวแตนท์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่โตช้า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์



รูปที่ 4.10 รูปการเพาะเลี้ยง *D. salina* มิวแตนท์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่โตช้า (หมายเลข 6, 7, 23, 28) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (ก) ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วันที่ 6

ซึ่งจากการคำนวณโดยใช้วิธีทางสถิติ DMRT พบว่า *D. salina* มิวแตนท์หมายเลข 17 และ 24 มีค่าผลต่างค่าเฉลี่ยมากกว่าค่า  $LSR_{\alpha}$  ที่ได้จากการคำนวณ ดังตารางที่ 4.1 นั่นคือมิวแตนท์หมายเลข 17 และ 24 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

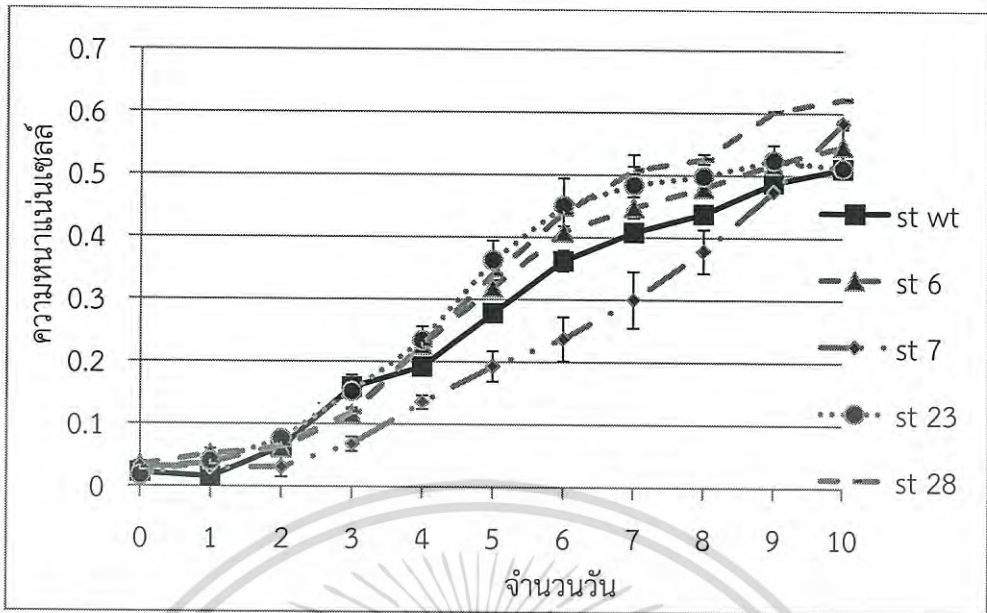
ตารางที่ 4.1 ตารางแบบเมตริกซ์แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของแต่ละสายพันธุ์ทีละคู่

เปรียบเทียบ ทรีทเมนต์คู่ ที่	ค่า p	$SSR_{0.05;}$ (p,6)	$\sqrt{\frac{MS_E}{n}}$	ผลต่าง ค่าเฉลี่ย	$LSR_\alpha = SSR_\alpha;$ (p, v) $\sqrt{\frac{MS_E}{n}}$
$\bar{Y}_{wt} - \bar{Y}_7$	3	2.98	37.6	89	112.1
$\bar{Y}_{wt} - \bar{Y}_{23}$	2	2.83	37.6	64	106.4
$\bar{Y}_{28} - \bar{Y}_{wt}$	2	2.83	37.6	8	106.4
$\bar{Y}_6 - \bar{Y}_{wt}$	3	2.98	37.6	76	112.1
$\bar{Y}_{wt} - \bar{Y}_{17}$	4	3.08	37.6	197	115.8
$\bar{Y}_{wt} - \bar{Y}_{24}$	5	3.14	37.6	238	118.1

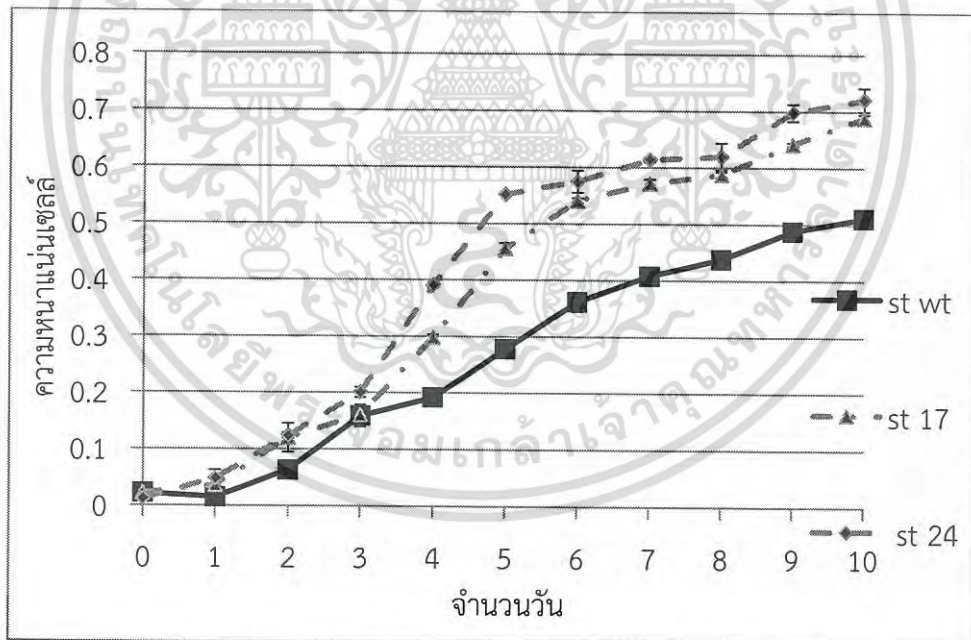
4.1.5 การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์ (OD) ของ *D. salina* มิวแตนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมืองโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

การทดลองนี้ทำเพื่อตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์สำหรับ *D. salina* โดยวัดค่าดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ในเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพื่อเป็นการยืนยันผลของการนับเซลล์ดังการทดลองที่ 4.1.4 การทดลองนี้เริ่มเพาะเลี้ยงที่เซลล์เริ่มต้นประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (ภาคผนวก ข3.) ในแต่ละวันจะดูดสารละลายเซลล์ประมาณ 3 มิลลิลิตร จากรูป 4.11 และ รูป 4.12 พบว่า มิวแตนท์หมายเลข 17 และ 24 มีช่วงระยะ log ประมาณวันที่ 3-5 โดยมีความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 0.18-0.5 หลังจากวันที่ 5 ความหนาแน่นเซลล์นั้นเริ่มคงที่แสดงถึงเซลล์สำหรับเข้าสู่ระยะ stationary ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความสอดคล้องกับวิธีการนับเซลล์ (4.1.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



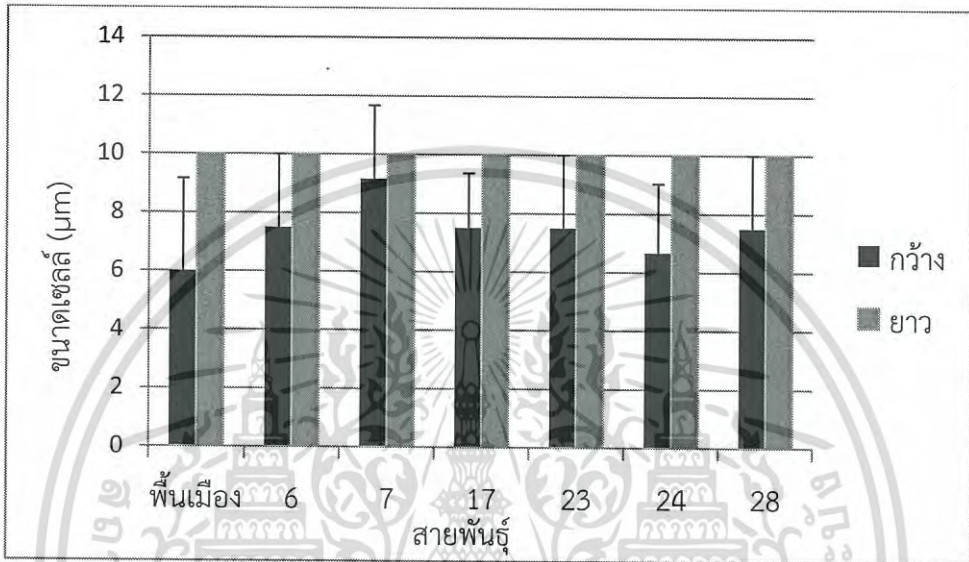
รูปที่ 4.11 แสดงความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์ 4 สายพันธุ์ (6, 7, 23 และ 28) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งวัดค่า OD โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



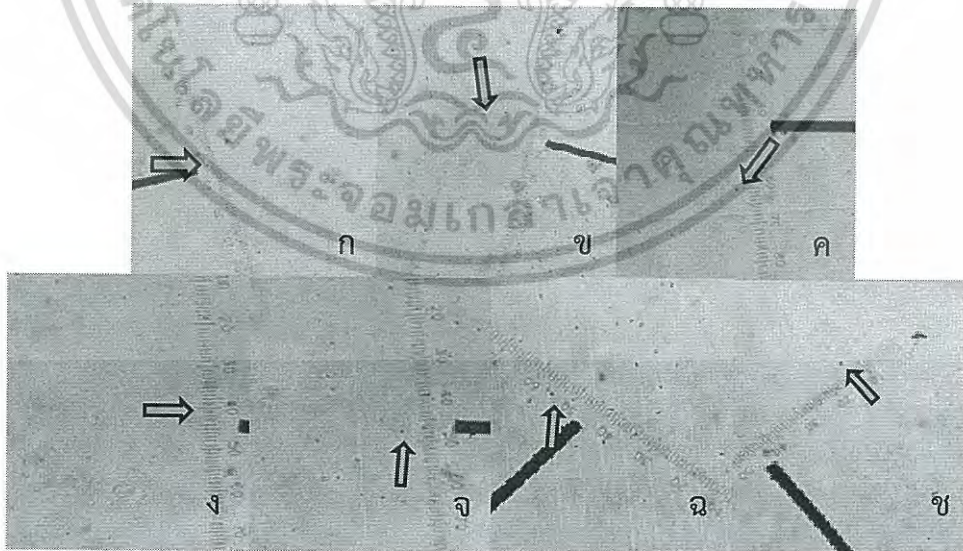
รูปที่ 4.12 แสดงความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์ 4 สายพันธุ์ (17 และ 24) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งวัดค่า OD โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เนื่องจากผลการวัดอัตราการเจริญเติบโตของผู้วิจัย *D. salina* มิวแตนต์มีทั้งที่ช้าและเร็วแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง จึงได้ทำการวัดขนาดของเซลล์ของ *D. salina* มิวแตนต์ รวมทั้งสายพันธุ์พื้นเมือง เพื่อดูว่าอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันนั้น ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัมพันธ์กับขนาดของเซลล์หรือไม่ หลังจากวัดขนาดของเซลล์ในแต่ละมิวแทนต์ โดยการสุ่มเซลล์จำนวน 20 เซลล์ แต่ละสายพันธุ์ของ *D. salina* (มิวแทนต์หมายเลข 6, 7, 17, 23, 24, 28 และสายพันธุ์พื้นเมือง) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้นภายในมิวแทนต์แต่ละสายพันธุ์เกิดจากการแบ่งเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป และไม่ได้เกี่ยวข้องกับขนาดของเซลล์ ดังรูปที่ 4.13 และ 4.14



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของ *D. salina* มิวแทนต์ ทั้ง 6 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์พื้นเมือง

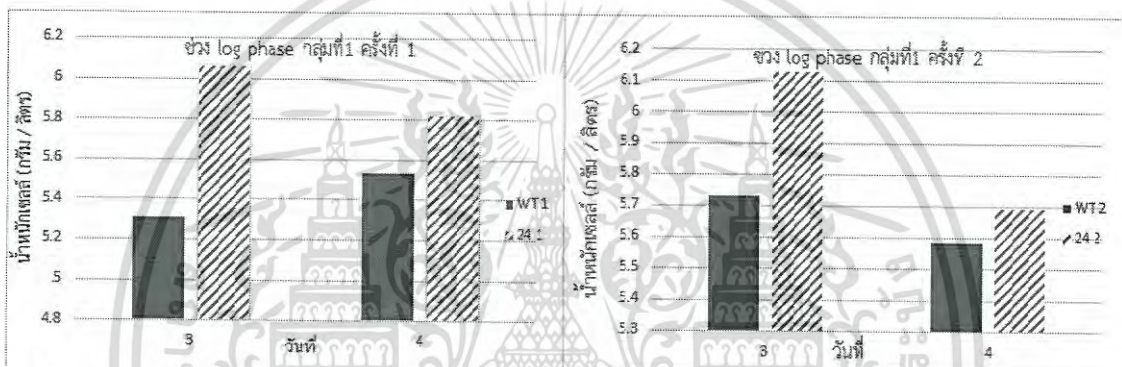


รูปที่ 4.14 แสดงการวัดขนาดเซลล์ของ *D. salina* ในแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ ocular micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40 เท่า ก สายพันธุ์พื้นเมือง, ข มิวแทนต์หมายเลข 6, ค มิวแทนต์หมายเลข 7, ง มิวแทนต์หมายเลข 17, จ มิวแทนต์

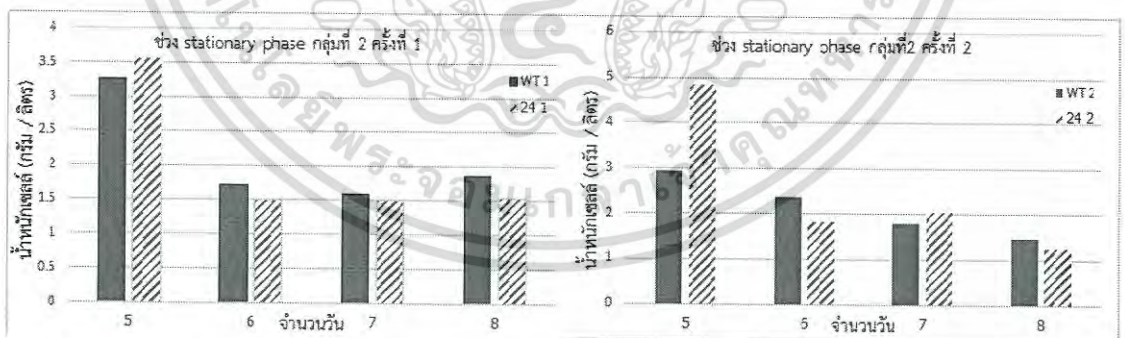
หมายเลข 23, ฉ มิวแทนต์หมายเลข 24, และ ช มิวแทนต์หมายเลข 28 ตามลำดับ ย่อมนำไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.6 การตรวจวัดชีวมวลของ *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 24

การทดลองนี้ทำให้ทราบถึงการปรับปรุงชีวมวลของสายพันธุ์ *D. salina* ที่มีการเปลี่ยนแปลงการของเจริญเติบโตที่ทางที่เพิ่มขึ้นหรือไม่ การทดลองทำโดยการเก็บเกี่ยวเซลล์สำหรับในช่วงระยะ log คือวันที่ 3 และ 4 และช่วง early stationary จนถึงระยะ late stationary คือวันที่ 5, 6, 7 และ 8 ดังรูปที่ 4.15 และ 4.16 ผลการทดลองพบว่า มิวแทนท์หมายเลข 24 มีการสะสมชีวมวลสูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองในช่วงวันที่ 3, 4 และ 5 คิดเป็น 1.11, 1.03 และ 1.37 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง หลังจากวันที่ 5 ทั้งมิวแทนท์หมายเลข 24 และสายพันธุ์พื้นเมือง มีปริมาณชีวมวลลดลงอย่างรวดเร็ว แต่จำนวนเซลล์ยังคงที่ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อมาจากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงของการสะสมสารภายใน โดยจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป



รูปที่ 4.15 การสะสมมวลชีวภาพของสายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยทำการทดลองทั้งหมด 1 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ครั้ง ในวันที่ 3 และ 4



รูปที่ 4.16 การสะสมมวลชีวภาพของสายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ครั้ง ในวันที่ 5, 6, 7 และ 8

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ามิวแทนท์หมายเลข 24 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS มีการปรับปรุงทั้งการเจริญเติบโตและชีวมวลที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง

## 4.2 การอภิปรายผล

งานวิจัยของ Sathasivam และคณะ (2013) กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ที่คัดแยกจากดินเค็ม ในประเทศไทย ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ (KU07, KU08, KU11, KU13 และ KU16) ที่ภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3910 ลักซ์ พบว่าสายพันธุ์ KU11 มีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วในอาหารสูตร Ramaraj medium ในความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0 M ตามลำดับ โดยในความเข้มข้นเกลือ 1.5 M มีปริมาณเซลล์ในช่วงเซลล์ log phase ประมาณ  $200-500 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ โดยผลการทดลองแสดงถึงช่วงอายุเซลล์ log phase ประมาณ  $400-700 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และช่วงอายุเซลล์ stationary phase ประมาณ  $1000-1250 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2044 ลักซ์ ในอาหารสูตร Ramaraj medium 1.5 M ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับงานวิจัยของ Arash Rad และคณะ (2011) กล่าวว่า *Dunaliella* sp. ที่คัดแยกมาจากทะเลสาบทะเลสาบอูร์เมีย ประเทศอิหร่าน มีปริมาณเซลล์ทั้งช่วงอายุเซลล์ (log phase และ stationary phase) เป็น  $530-2210 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร modified Johnson's medium (1 M, 2 M, 3 M) ภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3910 ลักซ์ โดยงานวิจัยในการศึกษานี้มีเซลล์รวมอยู่ที่  $400-1250 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นช่วงความหนาแน่นเซลล์ใกล้เคียงกับ ของ Arash Rad และคณะ (2011) เช่นกัน อีกทั้ง Arash Rad และคณะ ได้คัดแยก *Dunaliella* sp. จากท่าเรือ Shahid Kalantari เลี้ยวภายในสภาวะเดียวกันในอาหารสูตร modified Johnson's medium 1.5 M พบช่วงอายุเซลล์ stationary phase ประมาณ  $2010 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาของ Yang และคณะ (2013) ได้ทดสอบสารเคมี EMS ในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ความเข้มข้นของสาร EMS ที่ 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร แล้วทำการคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนท์โดยคัดเลือกจากการวิเคราะห์อัตราการเจริญ ซึ่งวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนท์ที่มีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง ส่งผลให้มีปริมาณชีวมวลที่มากกว่าด้วย เช่นเดียวกับการศึกษานี้ ในครั้งนี้ ที่ใช้ความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน แต่มีบางความเข้มข้นของสาร EMS ที่มากกว่า คือ ที่ 40, 50, 60, 72 และ 84 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ซึ่งอัตราการรอดชีวิตของสาหร่าย *D. salina* ลดลง 50%, 30% และ 10% ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (1.2%), 72 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (1.44%), และ 84 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (1.68%) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของสาร EMS 72 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร เกิดโคโลนีเดียวที่ชัดเจนและอยู่ในช่วง (300โคโลนี) ที่เหมาะสมต่อการทดลอง วัดค่าอัตราการเจริญต่อไป โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vikas และคณะ (2016) ได้ทดสอบสารเคมี EMS กับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechocystis* PCC 6803 ที่ความเข้มข้นของสาร EMS 12.65, 25.88, 38.55, 51.76 และ 64.98 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ซึ่งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์คือ 81.9%, 68.3%, 21.0%, 5.1% และ 0.14% ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกโคโลนีมิวแทนท์จากลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปยังบุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้าง เพื่อนำไปวัดอัตราการเจริญและปริมาณสารต่อไป จะเห็นว่าทั้งงานวิจัยของผู้ทดลองและงานวิจัยอื่นๆ มีความสอดคล้องกัน คือที่ความเข้มข้นของสารเคมี EMS เข้มข้นสูงเซลล์สาหร่ายจะมีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยลง ซึ่งสาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตได้มีความเป็นไปได้สูงว่าเป็นสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนท์ จึงขึ้นอยู่กับผู้ทดลอง ในการเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์และนำสายพันธุ์มิวแทนท์ไปใช้ประโยชน์หรือศึกษาต่อไป

จากงานวิจัยของ Lee และคณะ (2013) ได้ทดสอบสารเคมี EMS กับสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardtii* โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม และคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ดี พบว่าสาหร่ายมิวแทนท์หมายเลข 128 มีการสะสมชีวมวลในปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองและมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง 1.06 เท่า เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 17 และ 24 มีอัตราการเจริญที่แตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญ ในลักษณะที่มีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าประมาณ 1.5 – 1.8 เท่า ในสายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 ซึ่งมีอัตราการเจริญที่เร็วที่สุดในสายพันธุ์มิวแทนท์ด้วยกันและสายพันธุ์พื้นเมือง อย่างไรก็ตามผู้ทำการทดลองพบว่าอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของสายพันธุ์มิวแทนท์ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับขนาดของเซลล์ (รูปที่ 4.13) ซึ่งอีกนัยหนึ่งคือเซลล์มีการแบ่งตัวที่เปลี่ยนแปลงไป ผลนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mujizat และคณะ (2015)<sup>6</sup> ได้ทดสอบสาหร่ายสกุล *Dunaliella* กับสารเคมี EMS พบว่าเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนท์มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พื้นเมือง 3 เท่า แต่อัตราการเจริญช้ากว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง จะเห็นว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS มีความหลากหลายของฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้น ซึ่งฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นแบบสุ่มและเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ที่เปลี่ยนจาก GC เป็น AT และ TA เป็น CG ที่ไม่จำเพาะเจาะจงในยีนใดยีนหนึ่ง อีกทั้งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นไม่ถาวร (Vikas และคณะ, 2016)

จากงานวิจัยของ Mujizat และคณะ (2015)<sup>6</sup> ได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสกุล *Nannochloropsis* โดยใช้สารเคมี EMS พบว่าเซลล์สาหร่ายมีอัตราการเจริญเร็วที่สุดในวันที่ 5 ( $\mu=0.52/\text{วัน}$ ) (log phase) และวันที่ 6 ของการทดลอง (stationary phase) สายพันธุ์มิวแทนท์มีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุด จำนวนเซลล์คือ  $60.7 \pm 11.93 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร และสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนท์มีปริมาณชีวมวลแห้ง  $1.11 \pm 0.07$  กรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองประมาณ 2 เท่า เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ จากผลการทดลองการตรวจวัดปริมาณชีวมวลที่ช่วงระยะและวันที่ที่แตกต่างกันของสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมืองพบว่า สายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 มีการสะสมชีวมวลในช่วงเซลล์อายุ log phase วันที่ 3 และ 4 และในช่วงเซลล์อายุ early-stationary phase วันที่ 5 ของการทดลองที่สูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง โดยเฉพาะวันที่ 5 ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มเข้าสู่ stationary phase สายพันธุ์มิวแทนท์มีการสะสมชีวมวลมากที่สุด ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองประมาณ 1.37 เท่า แต่หลังจากนั้นคือวันที่ 6 , 7 และ 8 ทั้งสายพันธุ์มิวแทนท์และสายพันธุ์พื้นเมืองมีการสะสมชีวมวลที่น้อยลงอย่างชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์

เอกสารวันเป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เพิ่มบัญชีไปยังมหาวิทยาลัย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายเข้าสู่ระยะ death phase ซึ่งสอดคล้องกับชีวมวลของสาหร่ายสกุล *Desmodesmus* สายพันธุ์ S5 และ G3 ซึ่งมีปริมาณชีวมวล คือ 778.10 มิลลิกรัม/ลิตร และ 739.52 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ 45.50% และ 20.67% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง (Yi และคณะ, 2016)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้ทำวิจัยพบว่าสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 มีการเจริญช่วง lag phase ในวันที่ 0 ถึง วันที่ 2 จากนั้นเข้าสู่การเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ซึ่งมีจำนวนเซลล์สะสมเพิ่มขึ้นอยู่ที่ประมาณ  $400-700 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของ *D. salina* จึงเข้าสู่อัตราที่คงที่ในระยะ stationary phase จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าช่วงวันที่ 3-5 ซึ่งเป็นช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

นอกจากนี้การทดสอบเซลล์ *D. salina* กับสาร EMS ที่ความเข้มข้น 0, 0.8, 1, 1.2, 1.44 และ 1.68 % พบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์ *D. salina* ลดลงคิดเป็น 50, 30 และ 10 ที่ความเข้มข้น 1.2, 1.44 และ 1.68 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0% (กลุ่มควบคุม) โดยเซลล์ *D. salina* ที่รอดชีวิตจำนวน 30 - 300 โคโลนี ที่ความเข้มข้น 1.44% เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตอย่างเหมาะสม ( 300 โคโลนี) ซึ่งไม่มากหรือน้อยจนเกินไป อีกทั้งโคโลนีที่เกิดขึ้นแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวที่ชัดเจน

หลังจากการวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของ *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมืองโดยวิธีการนับเซลล์ พบว่า *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์ทั้ง 6 สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญที่แตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมือง แต่มีเพียง *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 17 และ 24 เท่านั้น ที่มีอัตราการเจริญที่แตกต่างจากสายพันธุ์พื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองประมาณ 1.5-1.8 เท่า อย่างไรก็ตาม พบว่า *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 มีอัตราการเจริญที่เร็วที่สุดในสายพันธุ์มิวแทนท์ด้วยกัน ผลที่ได้จากการนับเซลล์มีความสอดคล้องกับค่าความหนาแน่นเซลล์ของ (OD) ของ *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมืองโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งพบว่า อัตราการเจริญของ *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 17 และ 24 มีอัตราการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตของสายพันธุ์มิวแทนท์ที่เกิดขึ้นไม่ได้เป็นผลมาจากขนาดของเซลล์ที่ต่างกัน และ *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 ยังคงมีอัตราการเจริญที่เร็วที่สุด

จากการตรวจวัดชีวมวลของ *D. salina* สายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 เทียบกับสายพันธุ์พื้นเมืองในช่วงระยะ log จนถึง stationary พบว่า สายพันธุ์มิวแทนท์หมายเลข 24 มีการสะสมชีวมวลในช่วงระยะ log และ early-stationary (วันที่ 3-5) ที่สูงกว่าสายพันธุ์พื้นเมือง ดังนั้นในงานวิจัยเบื้องต้นครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถได้รับ *D. salina* สายพันธุ์ใหม่ ที่มีการปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตและชีวมวลที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นความสำเร็จเบื้องต้นในการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้กับสาหร่ายเพื่อนำเอาสาหร่ายที่ได้ไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆต่อไป

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนของการคัดเลือกโคโลนีมิวแทนต์ของสาหร่าย ผู้ทำการทดลองได้คัดเลือกเพียง 30 โคโลนี จากทั้งหมดประมาณ 300 โคโลนีมาทำการทดลองวัดอัตราการเจริญและวัดปริมาณซีมวล ซึ่งเป็นประมาณ 10% ของจำนวนสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนต์ทั้งหมด นั่นคือมิวแทนต์อีก 70% ที่เหลืออาจมีลักษณะทางพีโนไทป์ที่ดีกว่าที่มีอยู่ ดังนั้นควรที่จะเพิ่มจำนวนตัวอย่างของมิวแทนต์ในการทดลองดังกล่าว เพื่อให้ได้มาซึ่งสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนต์ที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด เท่าที่สามารถทำการคัดเลือกได้

หลังจากที่คัดเลือกได้สาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์มิวแทนต์ที่มีคุณสมบัติทางพีโนไทป์ที่ดี คือ มีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองและมีการสะสมซีมวลที่มากกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองแล้ว ดังนั้นน่าจะมีการศึกษาต่อยอดถึงปริมาณสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่าย เช่น ลิพิด เบต้าแคโรทีน เป็นต้น เพื่อทดสอบว่าสาหร่ายสายพันธุ์มิวแทนต์นี้มีบทบาทที่สำคัญในหลากหลายผลผลิต และเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป อีกทั้งควรมีการศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไป เพื่อทราบถึงยีนที่ควบคุมการแสดงออกของการผลิตสารสำคัญและยีนที่ควบคุมการเจริญของสาหร่าย ทำให้สะดวกและรวดเร็วต่อการตัดต่อทางพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงและได้สายพันธุ์สาหร่ายที่มีคุณสมบัติที่ดีเลิศตามที่ต้องการ รวมทั้งเป็นความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ในระดับโมเลกุลของสาหร่ายต่อไปในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ ขวัญไตรรงค์ และ ศิริเพ็ญ ตรีไชยาพร. พ.ศ. 2553. “ประสิทธิภาพการผลิตคาโรทีนอยด์ และคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก่อ (*Cladophora* sp.) เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ (I).” วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 4 ฉบับที่ 1

ดร.สถาพร คำหอม. “แคโรทีนอยด์ (Carotenoid).” Hot news ภาควิชาวิศวกรรมเคมีและวัสดุ มหาวิทยาลัยรังสิต.

มหาวิทยาลัยมหิดล. 2016. กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวแตกต่างกันอย่างไร. [online]. Available : [http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ap-biology1/Chapter2/Part4\\_2.html](http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ap-biology1/Chapter2/Part4_2.html)

สถาบันวิจัยอาหารสัตว์น้ำชายฝั่ง. คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายเซลล์เดียว (Microalgae). เรียบเรียงโดย มณฑกานติ ท้ำมดินและสุพล ต้นสุวรรณ.

A. Hosseini Tafreshi, M. Shariati. 2007. “*Dunaliella* biotechnology: methods and applications.” *Journal of Applied Microbiology*.

A.A Tammam, M.M. Allam, M. Osman. 2005. “Mutagenesis of *Dunaliella salina*.” *International Journal of Agriculture & Biology*. 7(2005) : 477-481.

Agora Health Limited. 2001. *Dunaliella Salina: The Algae With Powerful Anti-Cancer Properties*. [online]. Available : <http://thedailyhealth.co.uk/dunaliella-salina- algae-anti-cancer-properties-00119/>

Alison Wirshing. 2012. “Genetic engineering of *Dunaliella*: Potential for improved biofuel production.” *Genetic Engineering of Dunaliella: Potential for Improved Biofuel Production*.

Arun Goyal. 1987. “Physiological and biochemical studies on *Dunaliella*.” degree of Doctor of Philosophy. The University of Wollongong.

Ami Ben-Amotz. 1995. “New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for  $\beta$ -carotene production.” *Journal of Applied Phycology*. 7(1) : 65-68.

Ana A. Ramos, Jürgen Polle, Duc Tran, John C. Cushman, EonSeon Jin, João C. Varela. 2011 “The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives.” 26(1) : 3-20.

Abdallah Oukarroum, Se bastien Bras, Franc-ois Perreault, RadovanPopovic. 2011. “Inhibitory effects of silver nanoparticles in two greenalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*.” *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 78(2012) : 80-85.

Ben-Amotz & Avron. 1982. “Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerent algae:

Purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae).” *Journal of Phycology* 18 : 529-537.

- Benito Mogedas, Carlos Casal, Eduardo Forján, and Carlos Vilchez. 2009. “ $\beta$ -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawi* (cultivated in laboratory reactors.” *Journal of Bioscience and Bioengineering*.1(47) : 47-51.
- Chitlaru, Uri Pick. 1990. “Regulation of Glycerol Synthesis in Response to Osmotic Changes in *Dunaliella*.” *Department of Biochemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel*. 96 : 50-60.
- Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2006. **Sodium phosphate**. [online]. Available : [http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8303.full?text\\_only=true](http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8303.full?text_only=true)
- Daniel Chaumont. 1993. “Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture.” *Journal of Applied Phycology*. 5 : 593-604.
- Emily Hounslow. 2010. “Optimum salinity conditions for producing lipids from *Dunaliella salina* for biofuels production.” Energy Futures DTC, University of Sheffield.
- Faraz Arash Rad, Nilufer Aksoz, Mohammad Amin Hejazi. 2011. “Effect of salinity on cell growth and  $\beta$ -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran.” *African Journal of Biotechnology*. 10(12) : 2282-2289.
- Francisca Garcia, Yolanda Freile Pelegrin, Daniel Robledo. 2006. “Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico.” *Bioresource Technology*. 98(2007) : 1359-1365.
- Gaël Bougaran<sup>1</sup>, Catherine Rouxel, Nolwenn Dubois, Raymond Kaas, Sophie Grouas. 2012. “Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure.” *Biotechnology and Bioengineering*. 109(11) : 2737-2745.
- Greenclinic. 2016. แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) . [online] . Available : <http://www.greenclinic.in.th/component/content/article/1-phytochemecals/58-vitaminc.html>.
- Héctor Mendoza, Adelina de la Jara, Karen Freijanes, Laura Carmona, Ana Alexandra Ramos, Vanessa de Sousa Duarte, João Carlos Serafim Varela. 2008. “Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains.” *Electronic Journal of Biotechnology*. 11 : 4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hui Chen, Yong-Min Lao, Jian-Guo Jiang. 2011. "Effects of salinities on the gene expression of a (NAD<sup>+</sup>)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*." *Science of the Total Environment*. 409 : 1291–1297.
- John E. Dore and Gerald R. Cysewski. 2000. "Haematococcus algae meal as a source of natural astaxanthin for aquaculture feeds." *Cyanotech Corporation*. 102 : 225-230.
- Karin Larsdotter. 2006. "Wastewater treatment with microalgae." *Environmental Microbiology*. 6(2) : 31-38.
- Keramatollah Nikookar, Lahya Rowhani, Sasan Mohsenzadeh, Bahman Kholdebarin. 2013. "Growth and pigment development of *Dunaliella salina* Teod. In response to ammonium nitrate nutrition." *Molecular Biology Research Communications*. 2(3) : 73-79.
- Kezhen Ying, D. James Gilmour, William B. Zimmerman. 2015. "Periodic CO<sub>2</sub> Dosing Strategy for *Dunaliella salina* Batch Culture." *International Journal of Molecular Sciences*. 16 : 11509-11521.
- Kichul Cho, Chi-Heon Lee, Kyungjun Ko. 2016. "Use of phenol-induced oxidativestress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*." *Algal Research*. 17(2016) : 61-66.
- Krys Bangert. 2013. "Photo-Bioreactor Modelling And Development Of Methods For The Optimisation Of Micro-algal Biodiesel Production." degree of Doctor of Philosophy. The University of Sheffield, UK.
- Mansour Shariati, Mohammad Reza Hadi. 485. *Microalgal Biotechnology and Bioenergy in Dunaliella*. [online]. Available : <http://www.intechopen.com>
- MICHAEL A. BOROWITZKA. 2016. *THE MASS CULTURE OF DUNALIELLA SALINA*. [online] Available:<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB728E/AB728E06.htm>
- Mohammad Reza Fazeli, Hossein Tofighi, Nasrin Samadi, Hossein Jamalifar, Ahmad Fazeli. 2006. "Carotenoids Accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18 & WT) Under Stress Conditions." *African Journal of Biotechnology*. 7(2) : 2344-2441.
- Mojtaba Fathi<sup>1</sup>, Saeed Meshkini, Roya Nadiri. 2013. "The Effect of Extracted Salt from Urmia Lake on the Growth, beta-Carotene and Chlorophyll a Content of Halophilic Alga *Chlorella* sp.." *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13 : 233-240.

M. Le Chevanton<sup>a</sup>, M. Garniera<sup>a</sup>, G. Bougarana<sup>a</sup>, N. Schreiber<sup>a</sup>, E. Lukomskaa<sup>b</sup>,  
 J.-B. Berarda<sup>b</sup>, E. Fouilland<sup>b</sup>, O. Bernard<sup>c</sup>, J.-P. Cadoret<sup>d</sup>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- “Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures.” *Algal Research* 2.3 : 212–222.
- M. Mojaat, J. Pruvost, A. Foucault, J. Legrand. 2007. “Effect of organic carbon sources and Fe<sup>2+</sup> ions on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by *Dunaliella salina*.” *Biochemical Engineering Journal*. 39(2008) : 177-184.
- M. Shariati, S. Yahyaabadi. 2006. “THE EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CADMIUM ON THE GROWTH RATE AND BETA-CAROTENE SYNTHESIS IN UNICELLULAR GREEN ALGAE *DUNALIELLA SALINA*.” *Iranian Journal of Science & Technology*. 30 : A1.
- Mujizat Kawaroe, Tri Prartono, Junkwon Hwangbo. 2015. “Effect of ethyl methane sulfonate (EMS) on cell size, fatty acid content, growth rate and antioxidant activities of microalgae *Dunaliella* sp..” *International Journal of the Bioflux Society*. 8(6) : 221-228.
- Mujizat Kawaroe, Tri Prartono, Junkwon Hwangbo, Adriani Sunuddin, Dina Augustine, Amelia S. Gustina. 2015. “Effect of ethyl methane sulfonate (EMS) on cell size, fatty acid content, growth rate, and antioxidant activities of microalgae *Dunaliella* sp..” *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society*. 8 : 6.
- Mujizat Kawaroe, Agus Oman Sudrajat, Junkwan Hwangbo. 2015. “Chemical Mutagenesis of Microalgae *Nannochloropsis* sp. Using EMS (Ethyl Methanesulfonate).” *British Journal of Applied Science & Technology*. 8(5) : 494-505.
- Neda Akbarzadeh, Mansour Shariati. 2014. “Aluminum remediation from medium by *Dunaliella*.” *Ecological Engineering*. 67(2014) : 76-79.
- Packo P. Lamersa, Marcel Janssen, Ric C.H. De Vos. 2012. “Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga.” *Journal of Biotechnology*. 162(2012) : 21-27.
- Patricia I. Gomez, Mariela A. Gonzalez. 2005. “The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions.” *Biol Res* 38 : 151-162.
- P. G. Roessler, L. M. Brown, T. G. Dunahay, D. A. Heacox, E. E. Jarvis, L. C. Schneider, S. G. Talbot, K. G. Zeiler. 1977. “Genetic Engineering Approaches for Enhanced Production of Biodiesel Fuel from Microalgae.” *National Renewable*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Prakasam Velu, Maria Jenita Peter, Elumalai Sanniyasi. 2015. "Effect of Various Carbon Sources on Biochemical Production in Marine Microalgae *Nannochloropsis salina* (Eustigmatophyceae), *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) and *Tetraselmis suecica* (Chlorodendrophyceae)." *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 4(3): 207-215.
- Preejith Vachali , Prakash Bhosale , Paul S. Bernstein. 2012. "Microbial Carotenoids." *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 898
- Ramaraj Sathasivam, Niran Juntawong. 2013. "Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains." *SHORT COMMUNICATION*. 5 : 67-73.
- R . H. Al-hasan, M. A. Ghannoum, A-K. Sallal, K . H. Abu-Elteen, S. S. Radwan. 1987. "Correlative Changes of Growth, Pigmentation and Lipid Composition of *Dunaliella salina* in Response to Halostress." *Journal of General Microbiology*. 133 : 2607-2616.
- Sam Oeun May. 1978. "The Effect of Various Environmental Factors on the Growth of a Red Pigmented *Dunaliella* Species From the Great Salt Lake." degree of Master of Science. Utah State University.
- Sara Rasoul Amini, Pegah Mousavi, Nima Montazer Najafabady, Mohammad Ali Mobasher. 2013. "Biodiesel Properties of Native Strain of *Dunaliella salina*." *International Journal of Renewable Energy Research*. 4 : 1345-1583.
- Sergio Santos Jesus and Rubens Maciel Filho. 2010. "Modeling Growth of Microalgae *Dunaliella Salina* under Different Nutritional Conditions." *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 6(4) : 279-283.
- Shenbaga Devi, A., P. Santhanam, V. Rekha, S. Ananth, B. Balaji Prasath, R. Nandakumar. 2012. "Culture and biofuel producing efficacy of marinemicroalgae *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis* sp.." *Journal of Algal Biomass Utilization*. 3(4) : 38-44.
- Steven D. Ehrlich. 2015. **Beta-carotene**. [online]. Available : <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/betacarotene>.
- Suong Nguyen, Duc Tran, Sixto Portilla, Trung Vo. 2014. "Medium improvement for higher growth and longer stationary phase of *Dunaliella*." *Journal of Plant Sciences*. 2(1) : 9-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sushanta Kumar Saha, Siobhan Moane, Patrick Murray. 2013. "Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18." *Bioresource Technology*. 147(2013) : 23-28.
- The student-edited microbiology resource. 2016. *Dunaliella salina*. [online]. Available : [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Dunaliella\\_salina](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Dunaliella_salina)
- Tim de Mooij, Marcel Janssen, Oscar Cerezo Chinarro. 2014. "Antenna size reduction as a strategy to increase biomass productivity a great potential not yet realized." *Springer Science&Business Media Dordrecht*. 27(2015) : 1063-1077.
- Trung Vo, Duc Tran. 2014. "Carotene and Antioxidant Capacity of *Dunaliella Salina* Strains." *World Journal of Nutrition and Health*. 2 : 2, 21-23.
- Vikas Kumar Patel, Deepamala Maji, Shiv Shanker Pandey. 2016. "Rapid budding EMS mutants of *Synechocystis* PCC 6803 producing carbohydrate or lipid enriched biomass." *Algal Research*. 16(2016) : 36-45
- Wan-Loy Chu. 2012. "Biotechnological applications of microalgae." *International Medical University*. 6(2012) : S24-S37.
- Yao Nanyu, Li Jianzhi. 1984. "The relationship between the resistance of intertidal marine benthic algae against osmotic shock and their content of soluble carbohydrates." *Eleventh International Seaweed Symposium*. 22 : 485-487.
- Yi Zhang, Meilin He, Shanmei Zou, Cong Fei. 2016. "Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by Ethylmethane sulfonate-induced mutation." *Bioresource Technology*. 207(2016) : 268-275.
- Yong-Min Lao, Lan Xiao, Li-Xin Luo, Jian-Guo Jiang. 2014. "Hypoosmotic Expression of *Dunaliella bardawil* z-Carotene Desaturase Is Attributed to a Hypoosmolarity-Responsive Element Different from Other Key Carotenogenic Genes." *Plant Physiology*. 165 : 359-372.
- Zaydan, B. K., Sadvakasova, A. K., Saleh, M. M., Gaballah, M. M. 2013. "Generation and characterization of pigment mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124." *African Journal of Biotechnology*. 13(8) : 910-915.
- Zhe Wu, Promchup Duangmanee, Pu Zhao, Niran Juntawong, Chunhong Ma. 2016. "The Effects of Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation of Three *Dunaliella salina* Strains Isolated from Saline Soil." *Jundishapur J Microbiol*. 9(1) : e26732.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhiqian Yi, Maonian Xu, Manuela Magnúsdóttir, Yuetuan Zhang. 2015. "Photo-Oxidative Stress-Driven Mutagenesis and Adaptive Evolution on the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* for Enhanced Carotenoid Accumulation." *marine drugs*. 13 : 6138-6151.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวกค่าสถิติ ก.

ก.1 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 8 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ทั้ง 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวัน แสดงดังตาราง ก.1 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.2

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 10 ดังตาราง ก.1

ตารางที่ ก.1 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของ *D. salina* KU11 ทั้งหมด 3 ซ้ำ

วันที่	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	รวม (Y <sub>j</sub> )
0	5.7220	4.3670	4.3410	14.4300
1	7.6330	6.7580	10.0000	24.4410
2	20.4920	27.0750	31.3750	78.9420
3	59.4170	57.3000	92.8500	209.5670
4	100.2000	95.9000	112.1670	308.2670
5	97.2000	116.9330	105.4000	319.5330
6	106.5000	120.0000	104.8000	331.3000
7	125.0330	134.5000	109.1000	368.6330
รวม (Y <sub>i</sub> )	522.2470	562.3330	570.0330	1655.1130 (Y <sub>..</sub> )
ค่าเฉลี่ย	65.2809	70.3541	71.2541	

ข้อมูลมีจำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 3$ , จำนวนวัน (block)  $b = 8$ ,  $N = ab = 24$

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= [(5.7220)^2 + (7.6330)^2 + \dots + (109.1000)^2] - \frac{1655.1130^2}{24}$$

$$= 52106.1026$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 1 [  $(522.2470)^2 + (562.3330)^2 + (570.0330)^2 ] - \frac{1655.1130^2}{24}$  ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= 165.9402$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y^2_{.j} - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{3} [(14.4300)^2 + (24.4410)^2 + (78.9420)^2 + (209.5670)^2 + (308.2670)^2$$

$$+ \dots + (319.5330)^2 + (331.3000)^2 + (368.6330)^2] - \frac{1655.1130^2}{24}$$

$$= 50436.9113$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 52106.1026 - 165.9402 - 50436.9113$$

$$= 1503.2511$$

$$df_T = ab - 1 = 24 - 1 = 23$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$df_{bl} = b - 1 = 8 - 1 = 7$$

ตารางที่ ก.2 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* KU11 โดยวิธีการนับเซลล์

source	df	SS	MS	$F_{cal}$	$F_{0.05}$
Treatment	2	165.9402	82.9701	0.7727	3.7400
Block	7	50436.9113	7205.2730	67.1037	2.7000
Error	14	1503.2317	107.3751		
Total	23	52106.1026			

สมมติฐานทดสอบอทิพของปริมาณเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

$$\text{ตารางได้ค่าวิกฤต } F_{0.05,2,14} = 3.7400$$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{82.9701}{107.3751} = 0.7727$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,2,14}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.2 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มีวแตนท์หมายเลข 6, 7, 17, 23, 24 และ 28

ก.2.1 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มีวแตนท์หมายเลข 6 ทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ทั้ง 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.3 อยากรู้อะไรว่าการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.4

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 100 ดังตาราง ก.3

ตารางที่ ก.3 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสาหร่ายมีวแตนท์ที่ 6 ทั้งหมด 3 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 6			
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	รวม (Y <sub>.j</sub> )
0	0.25	0.27	0.30	0.82
1	0.35	0.33	0.27	0.95
2	0.87	0.71	0.56	2.14
3	1.60	1.90	1.62	5.12
4	3.61	3.40	3.49	10.5
5	8.86	7.64	7.03	20.53
6	9.87	7.32	7.62	24.81
7	11.76	11.19	10.09	33.04
8	12.74	10.99	11.08	34.81
9	13.40	13.79	14.04	41.23
10	11.29	12.84	14.39	40.13
รวม (Y <sub>i.</sub> )	73.21	70.38	70.49	214.08

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 3$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 33$

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= [(0.25)^2 + (0.35)^2 + \dots + (70.49)^2] - \frac{214.08^2}{33}$$

$$= 886.4386$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned}
 SS_{Tr} &= \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_i^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{11} [(73.21)^2 + (70.38)^2 + (70.49)^2] - \frac{214.08^2}{33} \\
 &= 0.467
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SS_{bl} &= \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{3} [(0.82)^2 + (0.95)^2 + \dots + (41.23)^2 + (40.13)^2] - \frac{214.08^2}{33} \\
 &= 875.6524
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SS_E &= SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl} \\
 &= 886.4386 - 0.467 - 875.6524 \\
 &= 10.3192
 \end{aligned}$$

$$df_{Tr} = ab - 1 = 33 - 1 = 32$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.4 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 6 โดยวิธีการนับเซลล์

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	2	0.46	0.23	0.44	3.49
Block	10	875.65	87.56	169.69	2.28
Error	20	10.31	0.51		
Total	32	886.43			

สมมติฐานทดสอบอทิพผลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

$$\text{ตารางได้ค่าวิกฤต } F_{0.05,2,20} = 3.49$$

จากตาราง ANOVA ได้  $F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{0.23}{0.51} = 0.44$  เนื่องจากค่า  $F_{cal}$  น้อยกว่าค่า  $F_{table}$  (3.49) ดังนั้นจึงยอมรับสมมติฐาน  $H_0$  และไม่ปฏิเสธการันยาค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,2,20}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.2.2 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มีวแทนท์หมายเลข 7 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ทั้ง 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.5 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.6

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 100 ดังตาราง ก.5

ตารางที่ ก.5 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสาหร่ายมีวแทนท์ที่ 7 ทั้งหมด 3 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 7			
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	รวม (Y.j)
0	0.26	0.21	0.26	0.73
1	0.29	0.26	0.22	0.77
2	0.90	0.46	0.35	1.71
3	1.73	0.98	0.97	3.68
4	3.65	1.82	2.16	7.63
5	5.70	4.42	4.05	14.17
6	8.99	5.98	6.49	21.46
7	10.58	8.09	8.63	27.30
8	11.73	9.22	8.43	29.38
9	13.89	9.65	9.59	33.13
10	12.16	11.16	10.23	33.55
รวม (Yi.)	69.88	52.25	51.23	173.51

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 3$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 33$

$$\begin{aligned}
 SS_T &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{ab} \\
 &= [(0.26)^2 + (0.29)^2 + \dots + (10.23)^2] - \frac{173.51^2}{33} \\
 &= 643.1675
 \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned}
 SS_{Tr} &= \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_i^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{11} [(69.88)^2 + (52.25)^2 + (51.23)^2] - \frac{173.51^2}{33} \\
 &= 19.8128
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SS_{bl} &= \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_j^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{3} [(0.73)^2 + (0.77)^2 + \dots + (33.13)^2 + (33.55)^2] - \frac{173.51^2}{33} \\
 &= 248.0399
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SS_E &= SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl} \\
 &= 643.1675 - 19.8128 - 248.0399 \\
 &= 375.3148
 \end{aligned}$$

$$df_T = ab - 1 = 33 - 1 = 32$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.6 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 7 โดยวิธีการนับเซลล์

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	2	19.81	9.91	0.56	3.49
Block	10	248.04	24.80	1.32	2.28
Error	20	375.31	18.76		
Total	32	643.16			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

$$\text{เปิดตารางได้ค่าวิกฤต } F_{0.05,2,20} = 3.49$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์ใช้ในงานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 จากตาราง ANOVA ได้  $F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{9.91}{18.76} = 0.56$   
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงแก้ไข และอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,2,20}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.2.3 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 17 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ทั้ง 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.7 อยากราบว่าการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.8

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 100 ดังตาราง ก.7

ตารางที่ ก.7 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสาหร่ายมิวแทนท์ที่ 17 ทั้งหมด 3 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 17			
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	รวม ( $Y_{.j}$ )
0	0.31	0.27	0.24	0.82
1	0.43	0.26	0.30	0.99
2	0.84	0.42	0.42	1.68
3	2.33	0.97	1.36	4.66
4	4.69	2.13	3.55	10.37
5	8.26	5.58	8.80	22.64
6	11.11	8.45	11.60	31.16
7	12.59	12.48	12.89	37.96
8	14.54	14.86	12.08	41.48
9	15.18	14.35	13.55	43.08
10	13.40	13.78	13.82	41.00
รวม ( $Y_{i.}$ )	83.68	73.55	78.61	235.84

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 3$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 33$

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= [(0.31)^2 + (0.43)^2 + \dots + (13.82)^2] - \frac{235.84^2}{33}$$

$$= 1108.6775$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= \frac{1}{11} [(83.68)^2 + (73.55)^2 + (78.61)^2] - \frac{235.84^2}{33}$$

$$= 4.66441$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y^2_{.j} - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{3} [(0.82)^2 + (0.99)^2 + \dots + (43.08)^2 + (41.00)^2] - \frac{235.84^2}{33}$$

$$= 1086.4238$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 1108.6775 - 4.66441 - 1086.4238$$

$$= 17.5893$$

$$df_{Tr} = ab - 1 = 33 - 1 = 32$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.8 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 17 โดยวิธีการนับเซลล์

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	2	4.66	2.33	2.65	3.49
Block	10	1086.42	108.64	123.59	2.28
Error	20	17.59	0.88		
Total	32	1108.67			

สมมติฐานทดสอบอทธิพลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,2,20} = 3.49$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{2.33}{0.88} = 2.65$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,2,20}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.2.4 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มีวัตถุหมายเลข 23 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ทั้ง 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.9 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.10

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 100 ดังตาราง ก.9

ตารางที่ ก.9 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสาหร่ายมีวัตถุที่ 23 ทั้งหมด 3 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 23			
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	รวม (Y <sub>j</sub> )
0	0.26	0.20	0.23	0.69
1	0.43	0.32	0.34	1.09
2	0.83	0.49	0.56	1.88
3	1.82	1.69	2.12	5.63
4	3.79	3.27	3.06	10.12
5	6.05	4.58	4.95	15.58
6	7.97	7.06	7.09	22.12
7	9.10	7.03	7.75	23.88
8	10.79	7.33	9.40	27.52
9	10.48	7.84	10.19	28.51
10	9.74	8.45	9.31	27.5
รวม (Y <sub>i</sub> )	61.26	48.65	55	164.52

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 3$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 33$

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{ab}$$

$$= [(0.26)^2 + (0.43)^2 + \dots + (9.31)^2] - \frac{164.52^2}{33}$$

$$= 866.77$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned}
 SS_{Tr} &= \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_i^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{11} [(61.26)^2 + (48.65)^2 + (55)^2] - \frac{164.52^2}{33} \\
 &= 7.57
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SS_{bl} &= \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_j^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{3} [(0.69)^2 + (1.09)^2 + \dots + (28.51)^2 + (27.5)^2] - \frac{164.52^2}{33} \\
 &= 274.17
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SS_E &= SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl} \\
 &= 866.77 - 7.57 - 274.17 \\
 &= 585.032
 \end{aligned}$$

$$df_T = ab - 1 = 33 - 1 = 32$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.10 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 23 โดยวิธีการนับเซลล์

source	df	SS	MS	F <sub>cat</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	2	7.57	3.79	0.13	3.49
Block	10	274.17	27.42	0.94	2.28
Error	20	585.03	29.25		
Total	32	866.77			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,2,20} = 3.49$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{\text{cal}} = \frac{MS_{\text{Tr}}}{MS_E} = \frac{3.787}{29.25} = 0.13$$

เพราะฉะนั้น  $F_{\text{cal}} < F_{0.05,2,20}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.2.5 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 24 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ทั้ง 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.11 อยากทราบว่า การทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.12

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 100 ดังตาราง ก.11

ตารางที่ ก.11 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสาหร่ายมิวแทนท์ที่ 24 ทั้งหมด 3 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 24			
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	รวม (Y <sub>j</sub> )
0	0.20	0.20	0.23	0.63
1	0.30	0.33	0.20	0.83
2	0.93	0.54	0.33	1.8
3	2.13	1.14	1.13	4.4
4	5.12	4.13	3.87	13.12
5	10.54	8.44	8.77	27.75
6	13.93	11.68	10.95	36.56
7	12.33	13.08	13.08	38.49
8	14.83	17.11	15.03	46.97
9	13.73	15.11	12.83	41.67
10	12.46	16.41	13.74	42.61
รวม (Y <sub>i</sub> )	86.50	88.17	80.16	254.83

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 3$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 33$

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= [(0.20)^2 + (0.30)^2 + \dots + (13.74)^2] - \frac{254.83^2}{33}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น 33 เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= 1236.323$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y^2_{.i} - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{11} [(86.50)^2 + (88.17)^2 + (80.16)^2] - \frac{254.83^2}{33}$$

$$= 3.2468$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y^2_{.j} - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{3} [(0.63)^2 + (0.83)^2 + \dots + (41.67)^2 + (42.61)^2] - \frac{254.83^2}{33}$$

$$= 1212.8979$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 1236.32 - 3.2468 - 1212.89$$

$$= 20.18$$

$$df_T = ab - 1 = 33 - 1 = 32$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.12 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 24 โดยวิธีการนับเซลล์

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	2	3.25	1.62	1.61	3.49
Block	10	1212.89	121.29	120.22	2.28
Error	20	20.18	1.01		
Total	32	1236.32			

สมมติฐานทดสอบอทธิพลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$H_a = \mu_i \neq \mu_j$  อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ  $i \neq j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,2,20} = 3.49$

จากตาราง ANOVA ได้  $F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{1.62}{1.01} = 1.61$

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,2,20}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.2.6 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 28 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ทั้ง 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.13 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.14

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 100 ดังตาราง ก.13

ตารางที่ ก.13 แสดงการเปรียบเทียบการนับเซลล์ของสาหร่ายมิวแทนท์ที่ 28 ทั้งหมด 3 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 28			
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร			
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	รวม (Y <sub>.j</sub> )
0	0.33	0.17	0.24	0.74
1	0.28	0.27	0.28	0.83
2	0.49	0.83	0.82	2.14
3	1.08	1.29	1.51	3.88
4	2.61	4.45	4.19	11.25
5	4.59	7.65	6.47	18.71
6	7.34	9.89	10.33	27.56
7	10.30	9.50	9.08	28.88
8	12.16	11.11	10.18	33.45
9	11.02	10.59	10.23	31.84
10	12.72	11.29	10.84	34.85
รวม (Y <sub>i.</sub> )	62.92	67.04	64.17	194.13

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 3$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 33$

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= [(0.33)^2 + (0.28)^2 + \dots + (10.84)^2] - \frac{194.13^2}{33}$$

$$= 687.87$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_i^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{11} [(62.92)^2 + (67.04)^2 + (64.17)^2] - \frac{194.13^2}{33}$$

$$= 0.811$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_j^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{3} [(0.74)^2 + (0.83)^2 + \dots + (31.84)^2 + (34.85)^2] - \frac{194.13^2}{33}$$

$$= 670.758$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 687.87 - 0.811 - 670.758$$

$$= 16.29$$

$$df_T = ab - 1 = 33 - 1 = 32$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.14 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 28 โดยวิธีการนับเซลล์

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	2	0.811	0.40	0.49	3.49
Block	10	670.76	6.07	82.31	2.28
Error	20	16.29	0.81		
Total	32	687.87			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานทดสอบอสมมติของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,2,20} = 3.49$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{\text{cal}} = \frac{MS_{\text{Tr}}}{MS_E} = \frac{0.40}{0.81} = 0.49$$

เพราะฉะนั้น  $F_{\text{cal}} < F_{0.05,2,20}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.3 การวัดความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* สายพันธุ์พื้นเมืองและมิวแทนต์ 6, 7, 17, 23, 24 และ 28

ก.3.1 การวัดความหนาแน่นเซลล์ *D. salina* KU11 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ (Biological duplicate) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.15 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.16

วิธีทำ นำค่าสังเกตทุกค่าแสดงดังตาราง ดังตาราง ก.15

ตารางที่ ก.15 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของ *D. salina* KU11 ทั้งหมด 2 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์ป่า		
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม (Y <sub>j</sub> )
0	0.031	0.022	0.053
1	0.024	0.015	0.059
2	0.058	0.063	0.121
3	0.120	0.159	0.279
4	0.189	0.192	0.381
5	0.271	0.278	0.549
6	0.328	0.362	0.690
7	0.400	0.408	0.808
8	0.464	0.438	0.902
9	0.501	0.488	0.989

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10	0.521	0.511	1.032
รวม (Y <sub>i.</sub> )	2.907	2.936	5.843

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment) a = 2, จำนวนวัน (block) b = 11, N = ab = 22

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= [(0.031)^2 + (0.024)^2 + \dots + (0.511)^2] - \frac{5.843^2}{22}$$

$$= 0.71466$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{11} [(2.907)^2 + (2.936)^2] - \frac{5.843^2}{22}$$

$$= 3.413 \times 10^{-5}$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{2} [(0.053)^2 + (0.059)^2 + \dots + (0.989)^2 + (1.032)^2] - \frac{5.843^2}{22}$$

$$= -0.041$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 0.71466 - 0.000034 - (-0.041)$$

$$= 0.756$$

$$df_T = ab - 1 = 22 - 1 = 21$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.16 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* KU11 โดยวิธี OD

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	1	0.000034	0.000034	0.00045	4.96
Block	10	-0.041	-0.0041	-0.054	2.91
Error	10	0.756	0.0756		
Total	21	0.71466			

สมมติฐานทดสอบอทิพผลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

$$\text{เปิดตารางได้ค่าวิกฤต } F_{0.05,1,10} = 4.96$$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{0.000034}{0.0756} = 0.00045$$

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,1,10}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.3.2 การวัดความหนาแน่นเซลล์ *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 6 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ (Biological duplicate) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.17 อยากทราบว่า การทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.18

วิธีทำ นำค่าสังเกตทุกค่าแสดงดังตาราง ดังตาราง ก.17

ตารางที่ ก.17 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายห่วยมิวแทนท์ที่ 6 ทั้งหมด 2 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 6		
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม (Y <sub>j</sub> )
0	0.045	0.034	0.079
1	0.068	0.052	0.120
2	0.067	0.064	0.131
3	0.136	0.116	0.252
4	0.201	0.227	0.428

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5	0.305	0.319	0.624
6	0.388	0.408	0.796
7	0.414	0.448	0.862
8	0.482	0.480	0.962
9	0.580	0.518	1.098
10	0.603	0.547	1.150
รวม (Y <sub>i.</sub> )	3.289	3.213	6.502

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment) a = 2, จำนวนวัน (block) b = 11, N = ab = 22

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= [(0.045)^2 + (0.068)^2 + \dots + (0.547)^2] - \frac{6.502^2}{22}$$

$$= 0.86879$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{11} [(3.289)^2 + (3.213)^2] - \frac{6.502^2}{22}$$

$$= 0.000263$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{2} [(0.079)^2 + (0.120)^2 + \dots + (1.098)^2 + (1.150)^2] - \frac{6.502^2}{22}$$

$$= 0.8304$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 0.86879 - 0.000263 - 0.8304$$

$$= 0.038$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.18 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 6 โดยวิธี OD

source	df	SS	MS	$F_{cal}$	$F_{0.05}$
Treatment	1	0.000263	0.038	0.0689	4.96
Block	10	0.8304	0.08304	21.77	2.91
Error	10	0.038	0.0038		
Total	21	0.86879			

สมมติฐานทดสอบอทิพของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,1,10} = 4.96$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{0.038}{0.0038} = 0.0689$$

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,1,10}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.3.3 การวัดความหนาแน่นเซลล์ *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 7 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ 25-50x10<sup>4</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ (Biological duplicate) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.19 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.20

วิธีทำ นำค่าสังเกตทุกค่าแสดงดังตาราง ดังตาราง ก.19

ตารางที่ ก.19 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหรัยมิวแทนท์ที่ 7 ทั้งหมด 2 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 7		
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม (Y.j)
0	0.025	0.033	0.058
1	0.035	0.029	0.064

2	0.064	0.031	0.095
3	0.091	0.068	0.159
4	0.157	0.135	0.292
5	0.242	0.193	0.435
6	0.308	0.237	0.545
7	0.390	0.300	0.690
8	0.448	0.378	0.826
9	0.478	0.474	0.952
10	0.512	0.584	1.096
รวม (Yi.)	2.750	2.462	5.212

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 2$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 22$

$$\begin{aligned}
 SS_T &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= [(0.025)^2 + (0.035)^2 + \dots + (0.584)^2] - \frac{5.212^2}{22} \\
 &= 0.719 \\
 SS_{Tr} &= \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{11} [(2.750)^2 + (2.462)^2] - \frac{5.212^2}{22} \\
 &= 0.0037 \\
 SS_{bl} &= \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{2} [(0.058)^2 + (0.064)^2 + \dots + (0.952)^2 + (1.096)^2] - \frac{5.212^2}{22} \\
 &= 0.7048 \\
 SS_E &= SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}
 \end{aligned}$$

$$= 0.719 - 0.0037 - 0.7048$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= 0.0101$$

$$df_T = ab - 1 = 22 - 1 = 21$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.20\_แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 7 โดยวิธี OD

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	1	0.0037	0.0037	3.71	4.96
Block	10	0.7048	0.07048	73.55	2.91
Error	10	0.0101	0.00101		
Total	21	0.719			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,1,10} = 4.96$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{0.0037}{0.00101} = 3.71$$

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,1,10}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.3.4 การวัดความหนาแน่นเซลล์ *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 17 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ 25-50x10<sup>4</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ (Biological duplicate) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.21 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.22

วิธีทำ นำค่าสังเกตทุกค่าแสดงดังตาราง ดังตาราง ก.21

ตารางที่ ก.21 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายพันธุ์กลายที่ 17 ทั้งหมด 2 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 17		
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม (Y.j)
0	0.013	0.022	0.035
1	0.032	0.036	0.068
2	0.069	0.120	0.189
3	0.145	0.161	0.306
4	0.287	0.298	0.585
5	0.436	0.456	0.892
6	0.531	0.541	1.072
7	0.558	0.572	1.130
8	0.598	0.588	1.186
9	0.648	0.642	1.290
10	0.701	0.689	1.390
รวม (Yi.)	4.018	4.125	8.143

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 2$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 22$

$$\begin{aligned}
 SS_T &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= [(0.013)^2 + (0.032)^2 + \dots + (0.689)^2] - \frac{8.143^2}{22} \\
 &= 1.364
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SS_{Tr} &= \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab} \\
 &= \frac{1}{11} [(4.018)^2 + (4.125)^2] - \frac{8.143^2}{22} \\
 &= 0.000434
 \end{aligned}$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 1 [(0.035)<sup>2</sup> + (0.068)<sup>2</sup> + ... + (1.290)<sup>2</sup> + (1.390)<sup>2</sup>] - 8.143<sup>2</sup> / 22 ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= 1.3369$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 1.364 - 0.000434 - 1.3369$$

$$= 0.02669$$

$$df_T = ab - 1 = 22 - 1 = 21$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.22 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 17 โดยวิธี OD

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	1	0.000434	0.000434	0.1625	4.96
Block	10	1.3369	0.13369	50.078	2.91
Error	10	0.02669	0.002669		
Total	21	1.364			

สมมติฐานทดสอบอทิพของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,1,10} = 4.96$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{0.000434}{0.002669} = 0.1625$$

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,1,10}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.3.5 การวัดความหนาแน่นเซลล์ *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 23 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ (Biological duplicate) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.23 อยากทราบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีทำ นำค่าสังเกตทุกค่าแสดงดังตาราง ดังตาราง ก.23

ตารางที่ ก.23 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสาหร่ายมีวแดนท์ที่ 23 ทั้งหมด 2 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สาหร่ายพันธุ์กลายที่ 23		
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม (Y.j)
0	0.017	0.017	0.034
1	0.056	0.040	0.096
2	0.089	0.076	0.165
3	0.131	0.152	0.283
4	0.189	0.234	0.423
5	0.300	0.363	0.663
6	0.361	0.450	0.811
7	0.386	0.484	0.985
8	0.487	0.498	0.985
9	0.510	0.524	1.034
10	0.502	0.512	1.014
รวม (Yi.)	3.028	3.350	6.378

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 2$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 22$

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= [(0.017)^2 + (0.056)^2 + \dots + (0.512)^2] - \frac{6.378^2}{22}$$

$$= 0.7725$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{11} [(3.028)^2 + (3.350)^2] - \frac{6.378^2}{22}$$

$$= 0.0047$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= \frac{1}{2} [(0.034)^2 + (0.096)^2 + \dots + (1.034)^2 + (1.014)^2] - \frac{6.378^2}{22}$$

$$= 0.24615$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 0.7725 - 0.0047 - 0.24615$$

$$= 0.522$$

$$df_T = ab - 1 = 22 - 1 = 21$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.24 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มีวแทนที่ที่ 23 โดยวิธี OD

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	1	0.0047	0.0047	0.09	4.96
Block	10	0.24615	0.024615	0.47	2.91
Error	10	0.522	0.0522		
Total	21	0.7725			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของปริมาณเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,1,10} = 4.96$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{0.0047}{0.05226} = 0.09$$

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,1,10}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก.3.6 การวัดความหนาแน่นเซลล์ *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 24 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ (Biological duplicate) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.25 อยากราบว่าการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.26

วิธีทำ นำค่าสังเกตทุกค่าแสดงดังตาราง ดังตาราง ก.25

ตารางที่ ก.25 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหรัยมิวแทนท์ที่ 23 ทั้งหมด 2 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 24		
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม (Y <sub>j</sub> )
0	0.024	0.012	0.036
1	0.077	0.048	0.125
2	0.114	0.124	0.238
3	0.219	0.201	0.420
4	0.400	0.391	0.791
5	0.553	0.552	1.105
6	0.614	0.575	1.189
7	0.622	0.614	1.236
8	0.668	0.620	1.288
9	0.728	0.698	1.426
10	0.763	0.721	1.484
8	0.668	0.620	1.288
9	0.728	0.698	1.426
10	0.763	0.721	1.484
รวม (Y <sub>i</sub> )	4.782	4.556	9.388

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment) a = 2, จำนวนวัน (block) b = 11, N = ab = 22

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{ab}$$

$$= [(0.024)^2 + (0.077)^2 + \dots + (0.721)^2] - \frac{9.388^2}{22}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= 1.4643$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y^2_{.i} - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{11} [(4.782)^2 + (4.556)^2] - \frac{9.388^2}{22}$$

$$= -0.04$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y^2_{.j} - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{2} [(0.036)^2 + (0.125)^2 + \dots + (1.426)^2 + (1.484)^2] - \frac{9.388^2}{22}$$

$$= 1.46$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 1.4643 - (-0.04) - 1.46$$

$$= 0.0437$$

$$df_T = ab - 1 = 22 - 1 = 21$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.26 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มีวแตนท์ที่ 24 โดยวิธี OD

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	1	-0.04	-0.04	-9.15	4.96
Block	10	1.46	0.146	33.41	2.91
Error	10	0.0437	0.00437		
Total	21	1.4643			

สมมติฐานทดสอบอทิพของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$H_a = \mu_i \neq \mu_j$  อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ  $i \neq j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต  $F_{0.05,1,10} = 4.96$

จากตาราง ANOVA ได้  $F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{-0.04}{0.00437} = -9.15$

เพราะฉะนั้น  $F_{cal} < F_{0.05,1,10}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ก3.7 การวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* มิวแทนท์หมายเลข 28 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 10 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดคลอโรฟิลล์รวมที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทั้งหมด 2 ซ้ำ (Biological duplicate) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองของแต่ละวันแสดงดังตาราง ก.27 อยากราบว่าการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ดังตาราง ANOVA ที่ ก.28

วิธีทำ นำค่าสังเกตทุกค่าแสดงดังตาราง ดังตาราง ก.27

ตารางที่ ก.27 แสดงการเปรียบเทียบการวัดความหนาแน่นเซลล์ของสายหรัยมิวแทนท์ที่ 28 ทั้งหมด 2 ซ้ำ

วันที่	<i>Dunaliella salina</i> สายพันธุ์กลายที่ 28		
	ปริมาณเซลล์ ต่อ 1 มิลลิลิตร		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม ( $Y_{.j}$ )
0	0.014	0.029	0.043
1	0.040	0.038	0.078
2	0.064	0.066	0.130
3	0.111	0.119	0.230
4	0.224	0.227	0.451
5	0.388	0.340	0.728
6	0.443	0.438	0.881
7	0.496	0.508	1.004
8	0.542	0.526	1.068
9	0.600	0.602	1.202
10	0.619	0.622	1.241
รวม ( $Y_{i.}$ )	3.541	3.515	7.056

ข้อมูลมี จำนวนการทดลอง (Treatment)  $a = 2$ , จำนวนวัน (block)  $b = 11$ ,  $N = ab = 22$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= [(0.014)^2 + (0.040)^2 + \dots + (0.622)^2] - \frac{7.056^2}{22}$$

$$= 3.17$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_i^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{11} [(3.541)^2 + (3.515)^2] - \frac{7.056^2}{22}$$

$$= 0.000031$$

$$SS_{bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_j^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$= \frac{1}{2} [(0.043)^2 + (0.078)^2 + \dots + (1.202)^2 + (1.241)^2] - \frac{7.056^2}{22}$$

$$= 1.093$$

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{bl}$$

$$= 3.17 - 0.000031 - 1.093$$

$$= 2.08$$

$$df_T = ab - 1 = 22 - 1 = 21$$

$$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$$

$$df_{bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$$

ตารางที่ ก.28 แสดงค่า ANOVA ของ *D. salina* มิวแทนท์ที่ 28 โดยวิธี OD

source	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Treatment	1	0.000031	0.000031	0.00015	4.96
Block	10	1.093	0.1093	0.5	2.91
Error	10	2.08	0.208		
Total	21	3.17			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานทดสอบอทิพผลของปริมาณเซลล์สำหรับในแต่ละการทดลอง

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a = \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ เมื่อ } i \neq j$$

$$\text{เปิดตารางได้ค่าวิกฤต } F_{0.05,1,10} = 4.96$$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ } F_{\text{cal}} = \frac{MS_{\text{Tr}}}{MS_E} = \frac{0.000031}{0.208} = 0.00015$$

เพราะฉะนั้น  $F_{\text{cal}} < F_{0.05,1,10}$  ดังนั้นไม่สามารถปฏิเสธ  $H_0$  แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางการแจกแจง F ระดับนัยสำคัญ .05

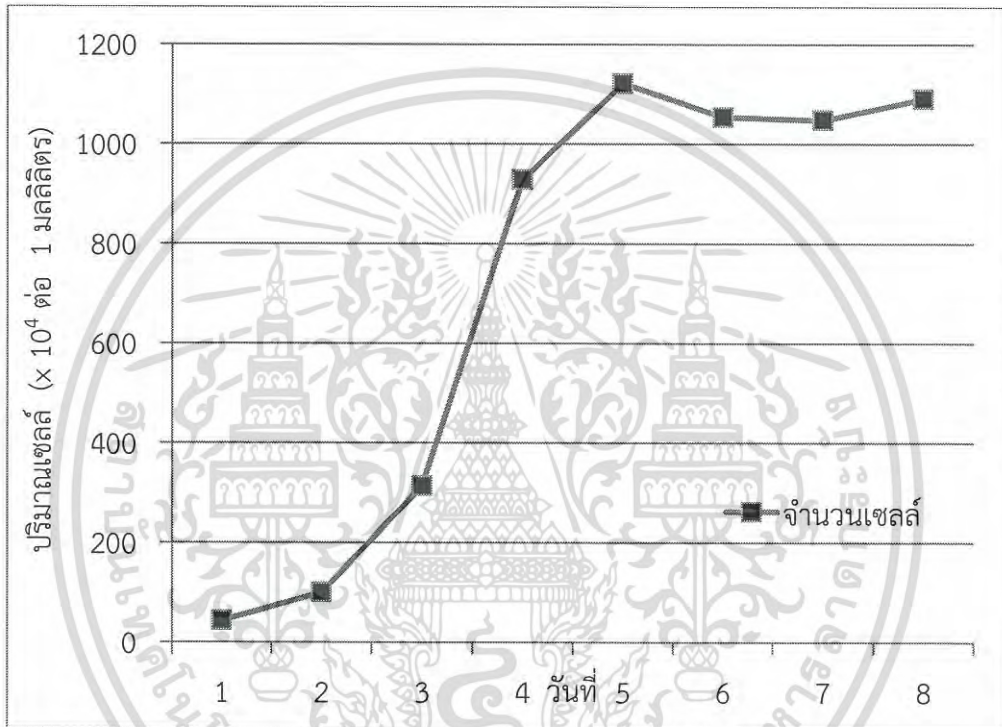
df2	df1																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	27	30	40	50	75	100	200	500	10000
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	242.98	243.91	244.69	245.38	245.95	246.46	246.92	247.32	247.69	248.01	248.58	249.05	249.63	250.10	251.14	251.77	252.62	253.04	253.68	254.06	254.30
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.42	19.42	19.43	19.43	19.44	19.44	19.44	19.45	19.45	19.45	19.46	19.46	19.47	19.48	19.48	19.49	19.49	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.73	8.71	8.70	8.69	8.68	8.67	8.67	8.66	8.65	8.64	8.63	8.62	8.59	8.58	8.58	8.55	8.54	8.53	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.89	5.87	5.85	5.84	5.83	5.82	5.81	5.80	5.79	5.77	5.76	5.75	5.72	5.70	5.68	5.66	5.65	5.64	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.66	4.64	4.62	4.60	4.59	4.58	4.57	4.56	4.54	4.53	4.51	4.50	4.46	4.44	4.42	4.41	4.39	4.37	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.98	3.96	3.94	3.92	3.91	3.90	3.88	3.87	3.86	3.84	3.82	3.81	3.77	3.75	3.73	3.71	3.69	3.68	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.55	3.53	3.51	3.49	3.48	3.47	3.46	3.44	3.43	3.41	3.39	3.38	3.34	3.32	3.29	3.27	3.25	3.24	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.26	3.24	3.22	3.20	3.19	3.17	3.16	3.15	3.13	3.12	3.10	3.08	3.04	3.02	2.99	2.97	2.95	2.94	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.05	3.03	3.01	2.99	2.97	2.96	2.95	2.94	2.92	2.90	2.88	2.86	2.83	2.80	2.77	2.76	2.73	2.72	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.89	2.86	2.85	2.83	2.81	2.80	2.79	2.77	2.75	2.74	2.72	2.70	2.66	2.64	2.60	2.58	2.56	2.54	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.72	2.70	2.69	2.67	2.66	2.65	2.63	2.61	2.59	2.57	2.53	2.51	2.47	2.46	2.43	2.42	2.41
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.66	2.64	2.62	2.60	2.58	2.57	2.56	2.54	2.52	2.51	2.48	2.47	2.43	2.40	2.37	2.35	2.32	2.31	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.58	2.56	2.53	2.51	2.50	2.48	2.47	2.46	2.44	2.42	2.40	2.38	2.34	2.31	2.28	2.26	2.23	2.22	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.51	2.48	2.46	2.44	2.43	2.41	2.40	2.39	2.37	2.35	2.33	2.31	2.27	2.24	2.21	2.19	2.16	2.14	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.60	2.54	2.51	2.48	2.45	2.42	2.40	2.38	2.37	2.35	2.34	2.33	2.31	2.29	2.27	2.25	2.20	2.18	2.14	2.12	2.10	2.08	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.40	2.37	2.35	2.33	2.32	2.30	2.29	2.28	2.25	2.24	2.21	2.19	2.15	2.12	2.09	2.07	2.04	2.02	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.98	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.35	2.33	2.31	2.29	2.27	2.26	2.24	2.23	2.21	2.19	2.17	2.15	2.10	2.08	2.04	2.02	1.99	1.97	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.31	2.29	2.27	2.25	2.23	2.22	2.20	2.19	2.17	2.15	2.13	2.11	2.06	2.04	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.28	2.26	2.23	2.21	2.20	2.18	2.17	2.16	2.13	2.11	2.09	2.07	2.03	1.99	1.97	1.93	1.91	1.88	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.25	2.22	2.20	2.18	2.16	2.14	2.12	2.11	2.10	2.08	2.06	2.04	1.99	1.97	1.93	1.91	1.88	1.86	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.22	2.20	2.18	2.16	2.14	2.12	2.11	2.10	2.07	2.05	2.03	2.01	1.96	1.94	1.90	1.88	1.84	1.83	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.20	2.17	2.15	2.13	2.11	2.10	2.08	2.07	2.05	2.03	2.00	1.96	1.94	1.91	1.87	1.85	1.82	1.80	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.18	2.15	2.13	2.11	2.09	2.08	2.06	2.05	2.02	2.01	1.98	1.96	1.91	1.88	1.84	1.82	1.79	1.77	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.15	2.13	2.11	2.09	2.07	2.05	2.04	2.02	2.00	1.98	1.96	1.94	1.89	1.86	1.82	1.80	1.77	1.75	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.14	2.11	2.09	2.07	2.05	2.04	2.02	2.01	1.98	1.96	1.94	1.92	1.87	1.84	1.80	1.78	1.75	1.73	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.12	2.09	2.07	2.05	2.03	2.02	2.00	1.99	1.97	1.95	1.92	1.90	1.85	1.82	1.78	1.76	1.73	1.71	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.10	2.08	2.06	2.04	2.02	2.00	1.99	1.97	1.95	1.93	1.90	1.88	1.84	1.81	1.76	1.74	1.71	1.69	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.09	2.06	2.04	2.02	2.00	1.99	1.97	1.96	1.93	1.91	1.89	1.87	1.82	1.79	1.75	1.73	1.69	1.67	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.08	2.05	2.03	2.01	1.99	1.98	1.96	1.94	1.92	1.90	1.88	1.85	1.81	1.77	1.73	1.70	1.67	1.65	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.06	2.04	2.01	1.99	1.98	1.96	1.95	1.93	1.91	1.89	1.86	1.84	1.79	1.76	1.72	1.70	1.66	1.64	1.62
31	4.16	3.30	2.91	2.68	2.52	2.41	2.32	2.25	2.20	2.15	2.11	2.08	2.05	2.03	2.00	1.98	1.98	1.95	1.93	1.92	1.90	1.88	1.85	1.83	1.78	1.75	1.70	1.68	1.65	1.62	1.61
32	4.15	3.29	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14	2.10	2.07	2.04	2.01	1.99	1.97	1.95	1.94	1.92	1.91	1.88	1.86	1.84	1.82	1.77	1.74	1.69	1.67	1.63	1.61	1.60
33	4.14	3.28	2.89	2.66	2.50	2.39	2.30	2.23	2.18	2.13	2.09	2.06	2.03	2.00	1.98	1.96	1.94	1.93	1.91	1.90	1.87	1.85	1.83	1.81	1.76	1.72	1.68	1.65	1.62	1.60	1.58
34	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12	2.08	2.05	2.02	1.99	1.97	1.95	1.93	1.92	1.90	1.89	1.86	1.84	1.82	1.80	1.75	1.71	1.67	1.65	1.61	1.59	1.57

รูปที่ ก.1 การแจกแจงแบบ F ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

## ภาคผนวกกราฟ ข.

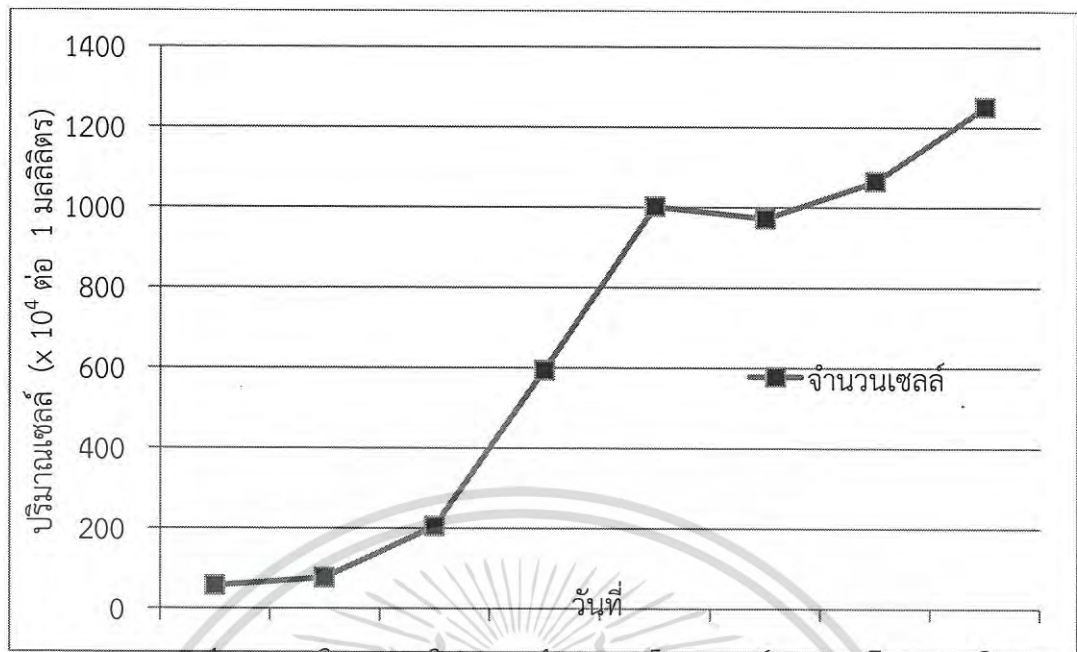
ข.1 กราฟแสดงอัตราการการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 (สายพันธุ์พื้นเมือง)

ข.1.1 กราฟการวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 8 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ซ้ำที่ 1 จากทั้งหมด 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ดังรูป ข.1 โดยค่า  $R^2$  ของกราฟแบบลอการิทึมเป็น 0.7965



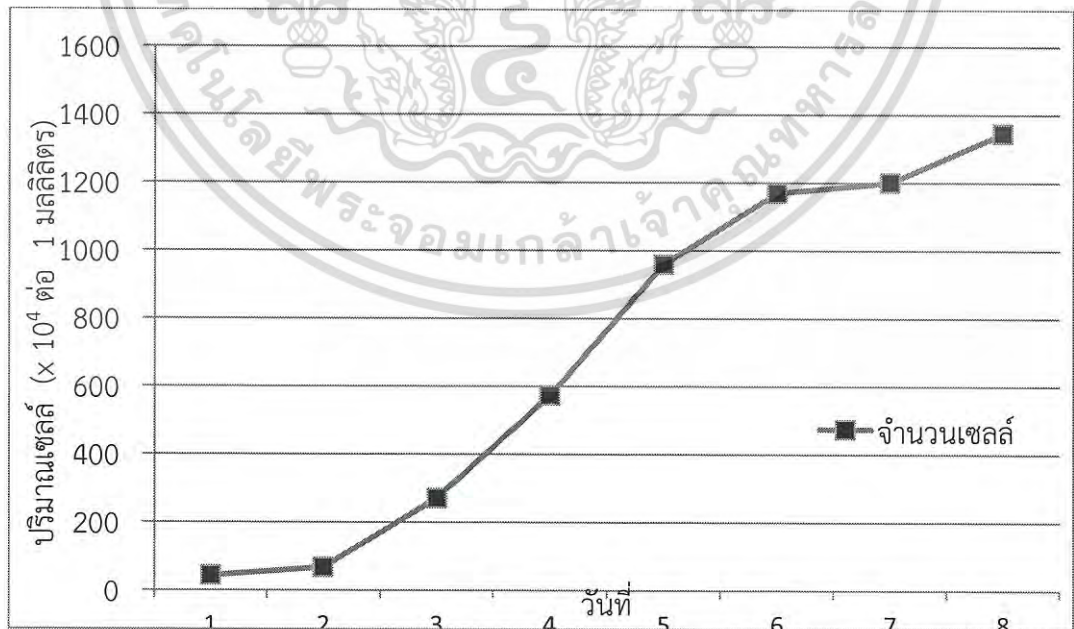
รูปที่ ข.1 รูปกราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ซ้ำที่ 1

ข.1.2 กราฟการวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 8 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ซ้ำที่ 2 จากทั้งหมด 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ดังรูป ข.2 โดยค่า  $R^2$  ของกราฟแบบลอการิทึมเป็น 0.9998



รูปที่ ข.2 รูปกราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ครั้งที่ 2

ข.1.3 กราฟการวัดอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 8 วัน โดยเริ่มต้นวัดที่จำนวนเซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ซ้ำที่ 3 จากทั้งหมด 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer ดังรูป ข.3 โดยค่า  $R^2$  ของกราฟแบบลอการิทึมเป็น 0.9951

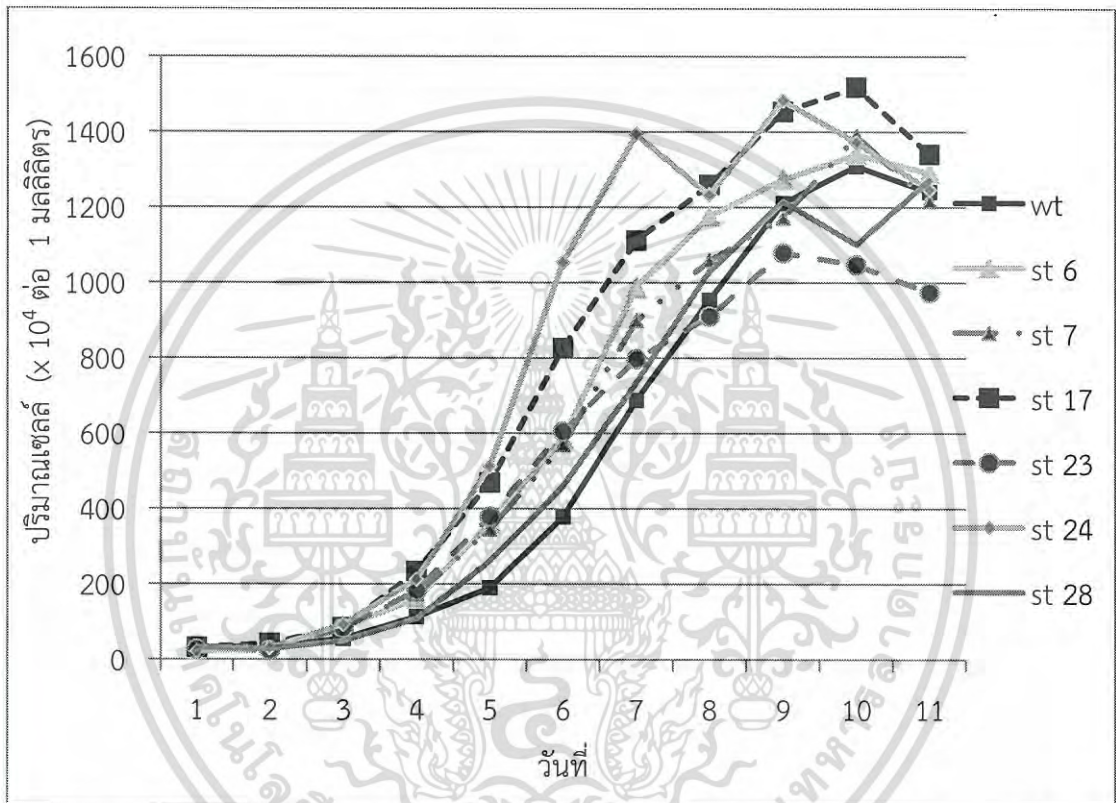


รูปที่ ข.3 รูปกราฟแสดงอัตราการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ครั้งที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

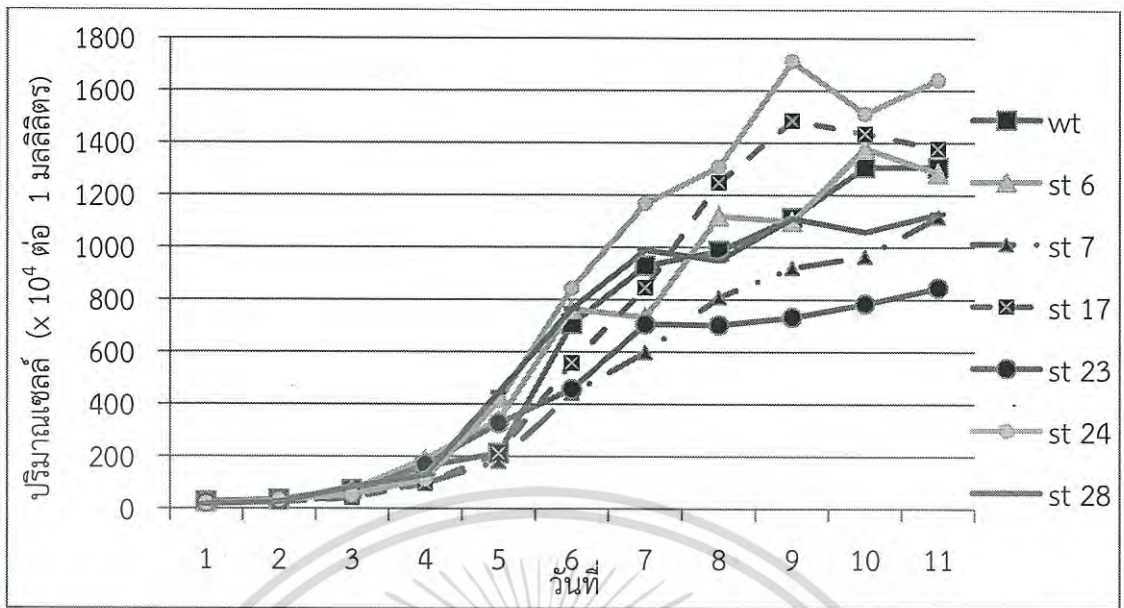
ข.2 การวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์

ข.2.1 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง นับเซลล์สำหรับซ้ำที่ 1 ดังรูปที่ ข.4 จากทั้งหมด 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer เริ่มที่เซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน



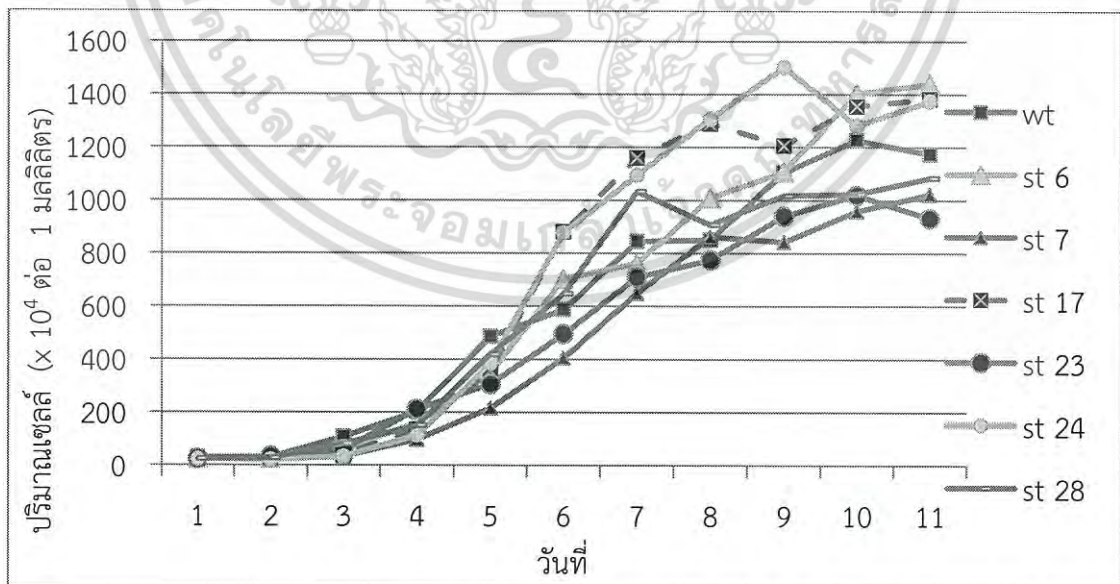
รูปที่ ข.4 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ ซ้ำที่ 1

ข.2.2 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง นับเซลล์สำหรับซ้ำที่ 2 ดังรูปที่ ข.5 จากทั้งหมด 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer เริ่มที่เซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ ข.5 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต *D. salina* มีวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ ซ้ำที่ 2

ข.2.3 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต *D. salina* มีวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง นับเซลล์สำหรับซ้ำที่ 3 ดังรูปที่ ข.6 จากทั้งหมด 3 ซ้ำ (Biological triplicate) โดยใช้ Hemacytometer เริ่มที่เซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน

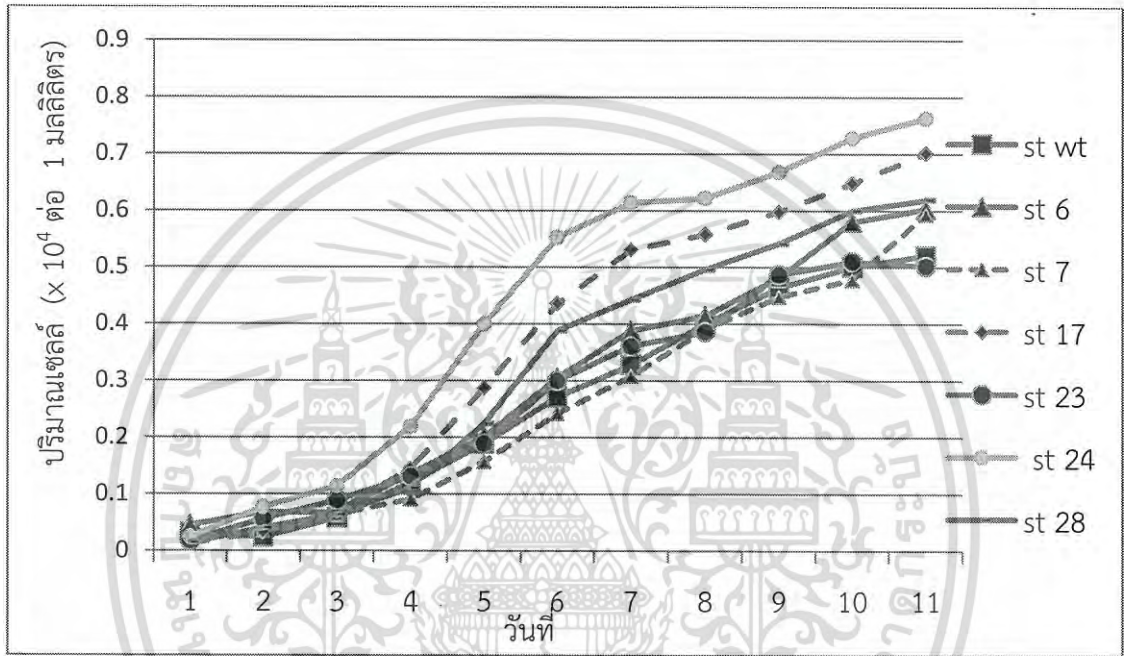


รูปที่ ข.6 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต *D. salina* มีวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ ซ้ำที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

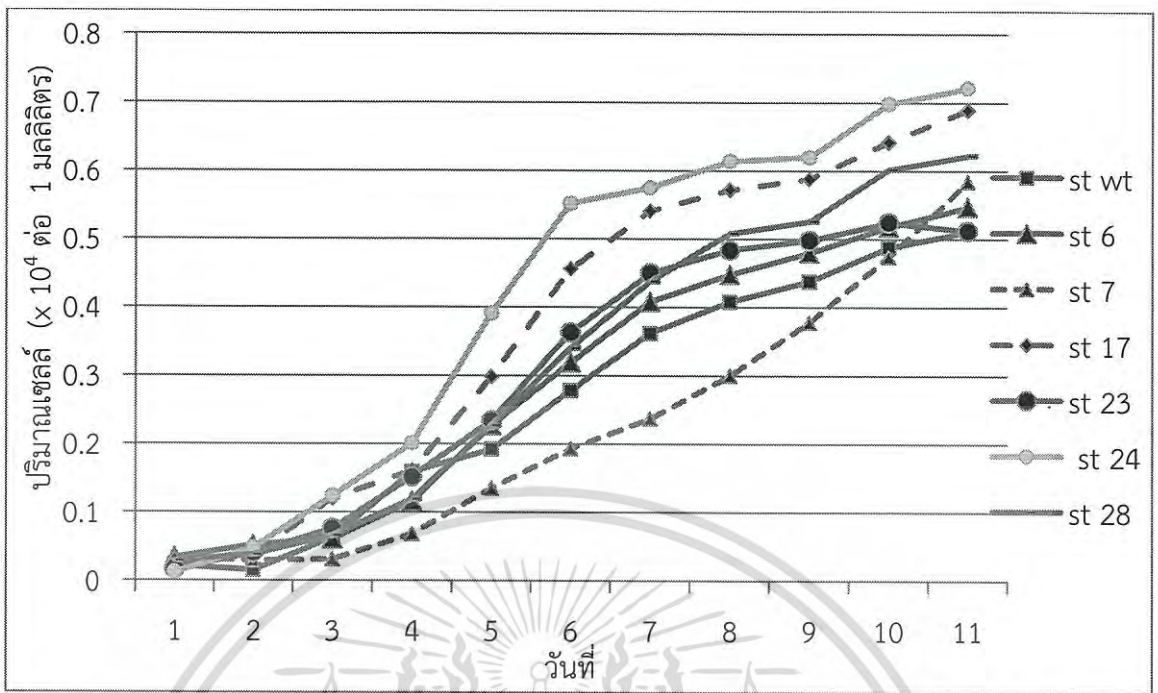
ข.3 การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสง (OD)

ข.3.1 กราฟแสดงการตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยวิธี OD ซ้ำที่ 1 จากทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยเริ่มที่เซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ดังรูปที่ ข.7



รูปที่ ข.7 กราฟแสดงความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยวิธี OD ซ้ำที่ 1

ข.3.2 กราฟแสดงการตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยวิธี OD ซ้ำที่ 2 จากทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยเริ่มที่เซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ดังรูปที่ ข.8

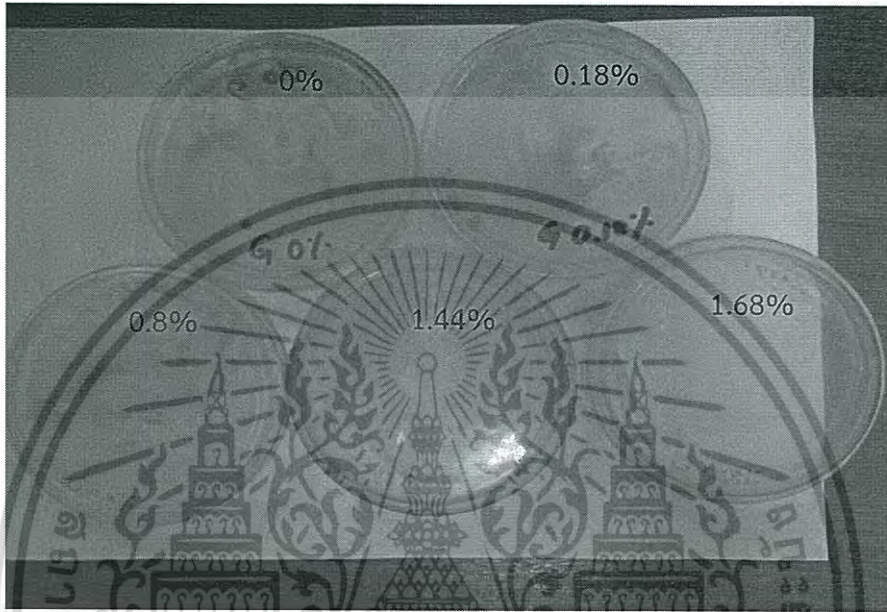


รูปที่ ข.8 กราฟแสดงความหนาแน่นของเซลล์ *D. salina* มิวแตนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยวิธี OD ซ้ำที่ 2

## ภาคผนวก รูป ข.

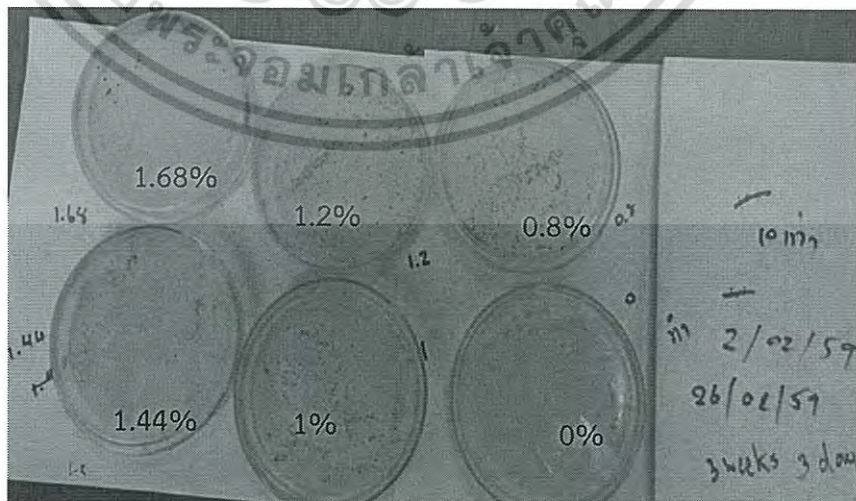
ข.1 การคัดเลือก *D. salina* มิแตนท์

ข.1.1 *D. salina* ทดสอบกับสารเคมี EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.18, 0.8, 1.44, 1.68% ตามลำดับ โดยวิธี spread plate รอบที่ 1 ดังรูป ข.1



รูปที่ ข.1 แสดงการทดสอบ *D. salina* กับสารเคมี EMS รอบที่ 1

ข.1.2 *D. salina* ทดสอบกับสารเคมี EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.8, 1, 1.2, 1.44, 1.68% ตามลำดับ โดยวิธี spread plate รอบที่ 2 ดังรูป ข.2



รูปที่ ข.2 แสดงการทดสอบ *D. salina* กับสารเคมี EMS รอบที่ 2

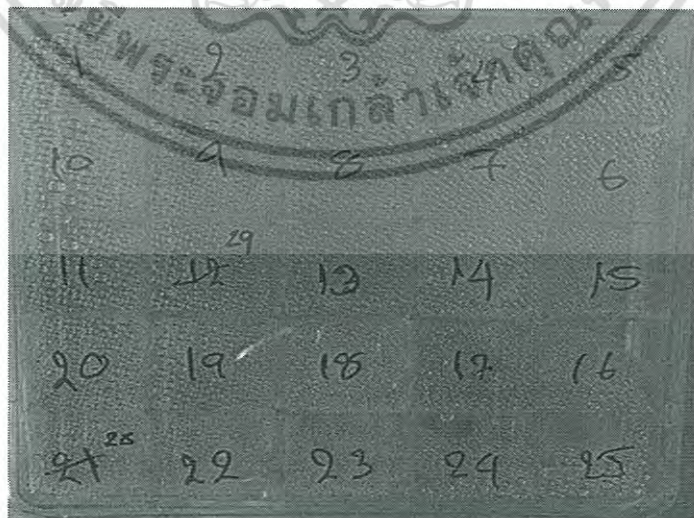
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1.3 รูป *D. salina* มิวแทนท์โคโลนีเดี่ยวที่ได้จากความเข้มข้น EMS 1.44% ทั้งหมด 30 โคโลนี บนอาหารแข็งสูตร Ramaraj medium โดยวิธี simple streak (Sathasivam และคณะ, 2013) ดังรูป ข.3



รูปที่ ข.3 แสดงรูปรูปโคโลนีเดี่ยวทั้งหมด 30 โคโลนี

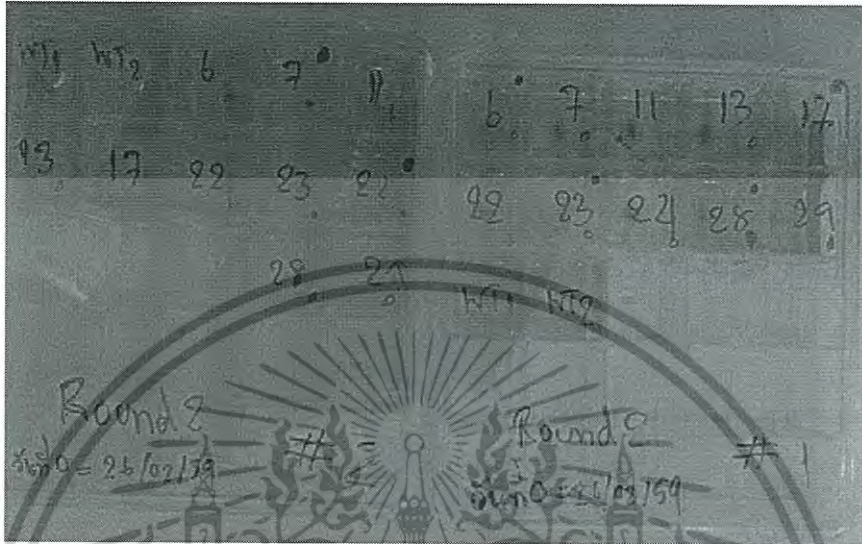
ข.1.4 คัดเลือกโคโลนี *D. salina* มิวแทนท์ 25 จากทั้งหมด 30 โคโลนี เลี้ยงใน 25-well plates ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ดังรูป ข.4



รูปที่ ข.4 *D. salina* มิวแทนท์ 25 สายพันธุ์ เลี้ยงใน 25-well plates

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1.5 คัดเลือกสายพันธุ์ *D. salina* มีวแทนท์ 10 จากทั้งหมด 30 โคโลนี เลี้ยงใน 25-well plates ควบคู่กับสายพันธุ์พื้นเมือง ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ดังรูป ข.5



รูปที่ ข.5 *D. salina* มีวแทนท์ 10 สายพันธุ์ ควบคู่กับสายพันธุ์พื้นเมือง

ข.1.6 รูปการเพิ่มปริมาณ *D. salina* มีวแทนท์ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium (Sathasivam และคณะ, 2013) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังรูปที่ ข.6



รูปที่ ข.6 *D. salina* มีวแทนท์ 6 สายพันธุ์ ควบคู่กับสายพันธุ์พื้นเมือง

ข.2 การวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของ *D. salina* มีวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมืองโดยวิธีการนับเซลล์ เริ่มที่เซลล์ประมาณ  $25-50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร Ramaraj medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.1 วันที่ 0 ดังรูปที่ ข.7



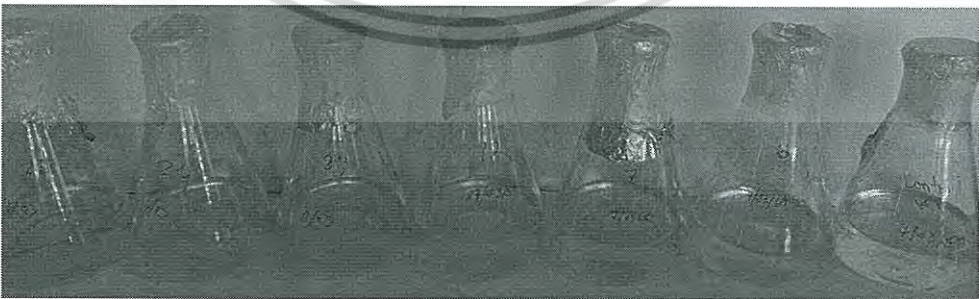
รูปที่ ข.7 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 0

ข.2.2 วันที่ 1 ดังรูปที่ ข.8



รูปที่ ข.8 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 1

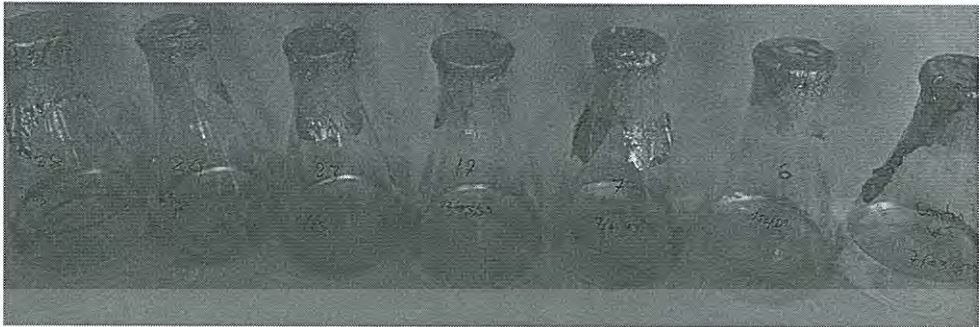
ข.2.3 วันที่ 2 ดังรูปที่ ข.9



รูปที่ ข.9 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.4 วันที่ 3 ดังรูปที่ ข.10



รูปที่ ข.10 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแตนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 3

ข.2.5 วันที่ 4 ดังรูปที่ ข.11



รูปที่ ข.11 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแตนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 4

ข.2.6 วันที่ 5 ดังรูปที่ ข.12



รูปที่ ข.12 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแตนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.7 วันที่ 6 ดังรูปที่ ข.13



รูปที่ ข.13 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มีวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 6

ข.2.8 วันที่ 7 ดังรูปที่ ข.14



รูปที่ ข.14 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มีวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 7

ข.2.9 วันที่ 8 ดังรูปที่ ข.15



รูปที่ ข.15 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มีวแทนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.10 วันที่ 9 ดังรูปที่ ข.16



รูปที่ ข.16 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแทนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 9

ข.2.11 วันที่ 10 ดังรูปที่ ข.17

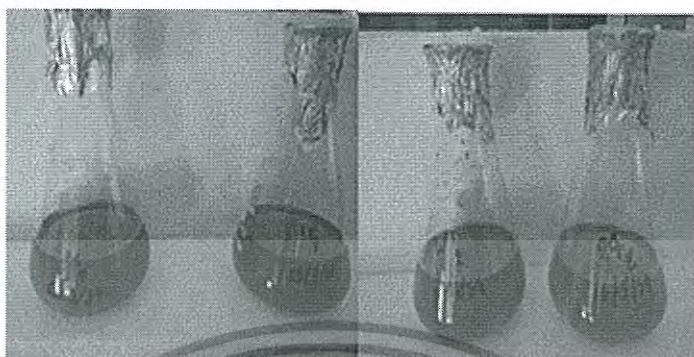


รูปที่ ข.17 แสดงการเจริญเติบโตของ *D. salina* มิวแทนต์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการนับเซลล์ วันที่ 10

ข.3 การตรวจวัดชีวมวลของ *D. salina* มิวแทนต์หมายเลข 24 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พื้นเมือง การทดลองเก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วงที่เหมาะสม แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเก็บเกี่ยวเซลล์สำหรับในระยะ log วันที่ 3 และ 4 และอีกกลุ่มเก็บเกี่ยวในระยะ stationary วันที่ 5, 6, 7 และ 8 โดยทำการทดลองกลุ่มละ 2 ครั้งดังนี้

### ข.3.1 กลุ่มที่ 1

#### ข.3.1.1 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 3 ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แสงดังรูป ข.18



รูปที่ ข.18 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 3 ครั้งที่ 1 (ซ้าย) และครั้งที่ 2 (ขวา)

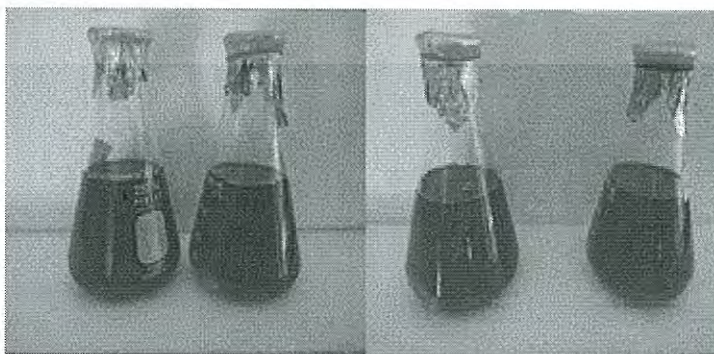
#### ข.3.1.2 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 4 ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แสงดังรูป ข.19



รูปที่ ข.19 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 4 ครั้งที่ 1 (ซ้าย) และครั้งที่ 2 (ขวา)

### ข.3.2 กลุ่มที่ 2

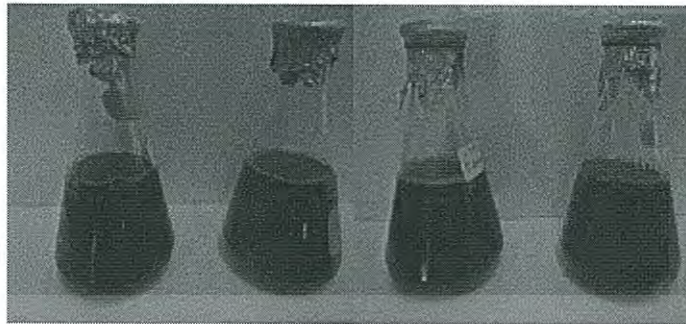
#### ข.3.2.1 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 5 ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แสงดังรูป ข.20



รูปที่ ข.20 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 5 ครั้งที่ 1 (ซ้าย) และครั้งที่ 2 (ขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3.2.2 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 6 ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แสงดังรูป ข.21



รูปที่ ข.21 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 6 ครั้งที่ 1 (ซ้าย) และครั้งที่ 2 (ขวา)

ข.3.2.3 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 7 ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แสงดังรูป ข.22



รูปที่ ข.22 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 7 ครั้งที่ 1 (ซ้าย) และครั้งที่ 2 (ขวา)

ข.3.2.4 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 8 ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แสงดังรูป ข.23



รูปที่ ข.23 เก็บเกี่ยวชีวมวลวันที่ 8 ครั้งที่ 1 (ซ้าย) และครั้งที่ 2 (ขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้