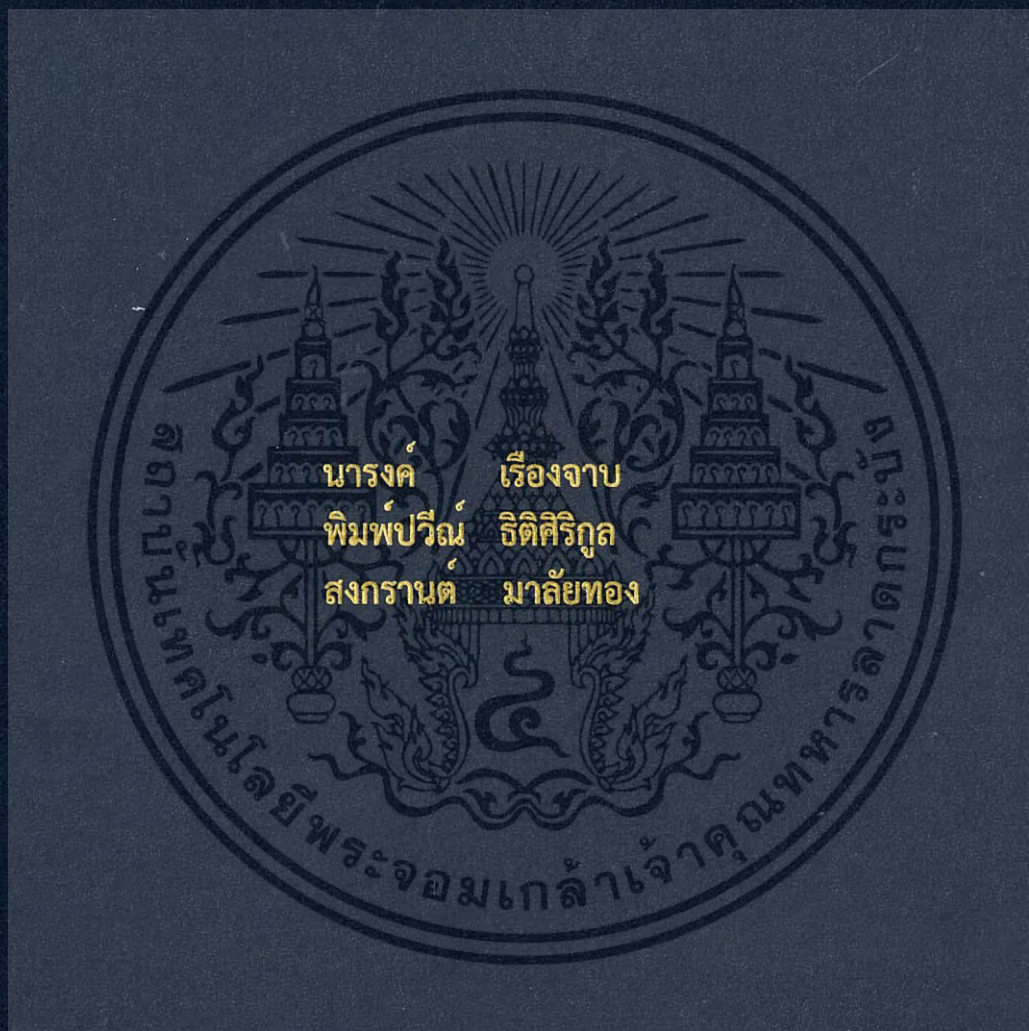


การผลิตคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะ
การขาดธาตุอาหาร

GREEN ALGAL CARBOHYDRATE PRODUCTION IN
NUTRIENTS DEPRIVATION MEDIA



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะ
การขาดธาตุอาหาร

GREEN ALGAL CARBOHYDRATE PRODUCTION IN
NUTRIENTS DEPRIVATION MEDIA



นารงค์ เรืองจาบ
พิมพ์ปวีณ์ ชิตศิริกุล
สงกรานต์ มาลัยทอง

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GREEN ALGAL CARBOHYDRATE PRODUCTION IN NUTRIENTS DEPRIVATION MEDIA



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

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

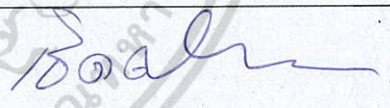
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร
Green Algal Carbohydrate Production in
Nutrients Deprivation Media

ชื่อนักศึกษา นายนารงค์ เรืองจาบ รหัสนักศึกษา 57050612
 นางสาวพิมพ์ปวีณ์ ธิติศิริกุล รหัสนักศึกษา 57050628
 นายสงกรานต์ มาลัยทอง รหัสนักศึกษา 57050647

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา เคมี
ปีการศึกษา 2560
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
(เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. ชมพูนุท ไชยรักษ์ ประธานกรรมการ	
ดร. ธิปปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร		
ชื่อนักศึกษา	นายณรงค์	เรืองจาบ	รหัสนักศึกษา 57050612
	นางสาวพิมพ์วิมล	ธิตศิริกุล	รหัสนักศึกษา 57050628
	นายสงกรานต์	มาลัยทอง	รหัสนักศึกษา 57050647
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)		
ภาควิชา	เคมี		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์		

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็มสามารถสะสมพลังงานในรูปแบบของแป้งได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่ได้จากการแยกได้จากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) โดยเลี้ยงในอาหารสภาวะขาดธาตุอาหาร 11 ชนิด และนำสาหร่ายมาสกัดสีของคลอโรฟิลล์ออกโดยใช้ 65% เอทานอล ตามด้วยการวิเคราะห์ 1) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric Acid พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุกำมะถัน (TAP-S) ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดคิดเป็น 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง 2) ปริมาณแป้งทั้งหมดโดยวิธี Anthrone's reagent พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) ให้ปริมาณแป้งสูงที่สุดคิด 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง 3) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS) พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคิดเป็น 0.700 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง 4) ชนิดของน้ำตาลโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่ามีน้ำตาล Arabinose และน้ำตาลที่ตรวจพบในเวลา 21.807 นาทีเป็นองค์ประกอบของเซลล์จากอาหาร (TAP-Mn) เท่านั้น อย่างไรก็ตามน้ำตาลที่ตรวจพบในเวลา 26.1 และ 29.1 นาทีจะสามารถตรวจพบได้ทุกเซลล์จากทุกอาหาร โดยน้ำตาลสามชนิดนี้ไม่สามารถหาน้ำตาลมาตรฐานมาอ้างอิงได้

คำสำคัญ: สาหร่าย KS03, การขาดธาตุอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Green Algal Carbohydrate Production in Nutrients Deprivation Media		
Students	Mr. Narong	Rueangjap	Student ID 57050612
	Miss Pimpawii	Thitisirigoon	Student ID 57050628
	Mr. Songkran	Malaithong	Student ID 57050647
Degree	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)		
Department	Chemistry		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2017		
Advisor	Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj		

Abstract

Green algae growing in fresh and sea water are known to store energy as starch form, In this research, carbohydrate can be produced in green alga KS03, isolated from fresh water sources in King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL). Cells from 11 nutrient-deprivation media were extracted for chlorophyll using 65% ethanol. Cell debris was further analyzed for 1) total carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid method. The results found that green algae KS03 cultured in sulfur-deprivation (TAP-S) showed the highest carbohydrate content of 0.93 mg/ mg dried weight. 2) Total starch by Anthrone's reagent. The results showed that green algae KS03 cultured in phosphorus-deprivation (TAP-P) showed the highest starch accumulation yielding 0.25 mg/ mg dried weight. 3) Total reducing sugar by Dinitrosalicylic Acid (DNS) method. The results showed that green algae KS03, cultured in manganese-deprivation (TAP-Mn) showed the highest reducing sugar content as 0.700 mg/ mg dried weight. 4) Sugar composition using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. The result showed peak of Arabinose and peak at 21.807 min in cell from TAP-Mn. However, the peaks at 26.1 and 29.1 min were found in all cells from all conditions. These 3 sugar peaks could not be fitted to any sugar standard.

Keywords: KS03, Deprivation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สามารถดำเนินมาได้สำเร็จลุล่วง เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำติชมที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนกำลังใจที่ดีจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ช่วยให้คำแนะนำ คำปรึกษา และความรู้ในเรื่องต่างๆ การตรวจทาน และติชมในการทำโครงการพิเศษ รวมทั้งคอยเอาใจใส่ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชมพูนุท ไชยรักษ์ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบโครงการพิเศษ และได้ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจทาน รวมถึงคำแนะนำคำติชมที่เป็นประโยชน์ เพื่อแก้ไขให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี คุณชัชชัย ลัทธิลักขณา คุณสาคร สอนพงษ์ คุณณัฐพล ไกรธรรม และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาอุปกรณ์ในการดำเนินโครงการพิเศษและอำนวยความสะดวก ในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวธนาภรณ์ มาศวรรณานักศึกษาปริญญาโท สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำที่มีประโยชน์ในการทำโครงการพิเศษ

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยอบรมสั่งสอน คอยแนะนำให้คำปรึกษา และกำลังใจที่ดี ตลอดจนความอุปการะและให้การสนับสนุนมาโดยตลอด รวมถึงเพื่อนๆ ทุกคน และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยให้กำลังใจในทุกๆ เรื่อง จนโครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

นารงค์	เรืองจาบ
พิมพ์วิวัฒน์	ธิดิธิกุล
สงกรานต์	มาลัยทอง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สาหร่าย (Algae).....	3
2.1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่าย.....	3
2.1.2 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes).....	3
2.1.3 การจำแนกหมวดหมู่.....	4
2.1.3.1 Class Chlorophyceae สาหร่ายสีเขียว (green algae).....	4
2.1.3.2 Class Prasinophyceae หรือเรียกว่า “Prasinophytes”	5
2.1.3.3 Class Euglenophyceae ยูกลีโนอิด (euglenoids).....	5
2.1.4 การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์.....	6
2.1.5 ระยะของการเจริญเติบโต.....	7
2.2 คาร์โบไฮเดรตในสาหร่าย	8
2.2.1 การสังเคราะห์ด้วยแสง.....	8
2.2.2 องค์ประกอบในการสังเคราะห์ด้วยแสง	8
2.2.2.1 สารสีในการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic Pigment)	8
2.2.2.2 แสงสว่าง.....	9
2.2.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์.....	9
2.2.3 ปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วยแสง	10
2.2.3.1 ปฏิกิริยาใช้แสง (Light Reaction)	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.3.2 ปฏิกริยาไม่ใช้แสง (Dark Reaction)	11
2.3 คาร์โบไฮเดรต	11
2.3.1 ชนิดและโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรต.....	12
2.3.1.1 โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide).....	12
2.3.1.2 ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide)	12
2.3.1.3 พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide)	13
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย	14
2.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (sugar analysis)	15
2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric	15
2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลางโดยวิธี (Anthrone's test)	16
2.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid	16
2.5.4 เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer	17
2.5.5 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	18
2.5.5.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์.....	18
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	23
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	23
3.1.1 เครื่องมือ.....	23
3.1.2 อุปกรณ์.....	23
3.2 สารเคมี.....	24
3.2.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงสาหร่าย.....	24
3.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์.....	24
3.3 วิธีการเตรียมสารเคมี.....	25
3.3.1 สารละลายอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)	25
3.3.2 สารละลายอาหารขาดธาตุแคลเซียม (TAP-Ca).....	25
3.3.3 สารละลายอาหารขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K).....	25
3.3.4 สารละลายอาหารขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N).....	26
3.3.5 สารละลายอาหารขาดธาตุแมกนีเซียม (TAP-Mg)	26
3.3.6 สารละลายอาหารขาดธาตุกำมะถัน (TAP-S).....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.7 สารละลายอาหารขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P).....	26
3.3.8 สารละลายอาหารขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn).....	26
3.3.9 สารละลายอาหารขาดธาตุทองแดง (TAP-Cu).....	26
3.3.10 สารละลายอาหารขาดธาตุสังกะสี (TAP-Zn)	26
3.3.11 สารละลายอาหารขาดธาตุเหล็ก (TAP-Fe)	26
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย	26
3.4.1 การแยกเชื้อสาหร่าย	26
3.4.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มปริมาณ.....	27
3.4.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ขาดธาตุอาหาร	28
3.4.4 การสกัดคลอโรฟิลล์.....	28
3.4.5 การวิเคราะห์.....	29
3.4.5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric Acid	29
3.4.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งทั้งหมดโดยวิธี Anthrone's test.....	29
3.4.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS).....	29
3.5 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลด้วยวิธี HPLC.....	29
3.5.1 สภาวะการวิเคราะห์.....	30
3.6 สถิติวิจัย.....	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	31
4.1 ผลการศึกษาปริมาณแป้งโดยวิธี Phenol-Sulfuric Acid	34
4.2 ผลการศึกษาปริมาณแป้งโดยวิธี Anthrone's test.....	35
4.3 ผลการศึกษาปริมาณแป้งโดยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS).....	36
4.4 ผลการศึกษาชนิดของน้ำตาลในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	39
5.1 สรุปผลการวิจัย	39
5.2 ข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก.....	43
ภาคผนวก ก.....	44
ภาคผนวก ข.....	47
ภาคผนวก ค.....	50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สารเคมีในการเตรียมอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)	25
3.2 สภาวะในการวิเคราะห์ตัวอย่างของเครื่อง HPLC	30
4.1 ปริมาตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD750)	34
และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย KSO3	
4.2 ตารางเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง Retention Time ที่ 26.1 และ 29.1 นาที	38
ก1.1 สารละลายมาตรฐานวิธี Phenol-sulfuric acid	45
ก1.2 สารละลายมาตรฐานวิธี Anthrone's test	46
ก1.3 สารละลายมาตรฐานวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)	47
ค1.1 ชนิดน้ำตาลมาตรฐาน	50
ค1.2 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP)	51
ค1.3 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Ca)	52
ค1.4 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Cu)	53
ค1.5 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Fe)	54
ค1.6 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-K)	55
ค1.7 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Mn)	56
ค1.8 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Mg)	57
ค1.9 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-N)	58
ค1.10 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-P)	59
ค1.11 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-S)	60
ค1.12 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Zn)	61

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ขั้นตอนการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย	6
2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย	7
2.3 การดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์	9
2.4 ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์	10
2.5 ปฏิกิริยาใช้แสง (Light Reaction).....	10
2.6 วัฏจักรแคลวิน (Calvin Cycle).....	11
2.7 โครงสร้างโมโนแซ็กคาไรด์ (Monosaccharide)	12
2.8 โครงสร้างไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharide)	13
2.9 โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide)	13
2.10 ปฏิกิริยาของวิธี Phenol-Sulfuric.....	16
2.11 ปฏิกิริยาของวิธี Anthrone	16
2.12 ปฏิกิริยาของวิธี DNS.....	17
2.13 หลักการทำงานของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer	18
2.14 ส่วนประกอบของ High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	21
3.1 ลักษณะการลากเส้นบนอาหารวุ้น.....	27
3.2 ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อบนอาหารวุ้น.....	27
4.1 รูปแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย KS03.....	31
วันที่ 1 (รูปซ้าย) และวันที่ 3 (รูปขวา)	
4.2 แผนภูมิแสดงปริมาณแบ่งที่ได้จากวิธี Phenol-Sulfuric Acid.....	35
ของสาหร่าย KS03 ที่เลี้ยงในอาหารสภาวะต่าง ๆ	
4.3 แผนภูมิแสดงปริมาณแบ่งที่ได้จากวิธี Anthrone's test	36
ของสาหร่าย KS03 ที่เลี้ยงในอาหารสภาวะต่าง ๆ	
4.4 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลลิควิดซ์ที่ได้จากวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS).....	37
ของสาหร่าย KS03 ที่เลี้ยงในอาหารสภาวะต่าง ๆ	
ก1.1 กราฟมาตรฐานวิธี Phenol-sulfuric acid.....	44
ก1.2 กราฟมาตรฐานวิธี Anthrone's test.....	45
ก1.3 กราฟมาตรฐานวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)	46
ข1 โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 (SPSS software, New York, USA).....	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข1.1 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan	47
ข1.2 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan	48
ข1.3 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan	48
ข1.4 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan	49
ข1.5 ผลที่ได้จากใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan	49
ค1.1 โครมาโทแกรมของน้ำตามมาตรฐาน.....	50
ค1.2 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP).....	51
ค1.3 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Ca).....	52
ค1.4 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Cu)	53
ค1.5 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Fe).....	54
ค1.6 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-K)	55
ค1.7 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Mn).....	56
ค1.8 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Mg).....	57
ค1.9 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-N).....	58
ค1.10 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-P).....	59
ค1.11 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-S).....	60
ค1.12 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Zn).....	61

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TAP	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate
(TAP-S)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุกำมะถัน
(TAP-N)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุไนโตรเจน
(TAP-P)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส
(TAP-K)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุโพแทสเซียม
(TAP-Cu)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุทองแดง
(TAP-Zn)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุสังกะสี
(TAP-Mg)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุแมกนีเซียม
(TAP-Mn)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุแมงกานีส
(TAP-Fe)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุเหล็ก
(TAP-Ca)	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris-Acetate-Phosphate ที่ขาดธาตุแคลเซียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันผู้บริโภคต้องหันมาตระหนักถึงการรักษาสุขภาพร่างกาย และตระหนักในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพราะปัจจุบันถือว่าเป็นยุคที่อุตสาหกรรมต่าง ๆ กำลังเจริญก้าวหน้าไปมาก และอุตสาหกรรมที่สำคัญนั้นคืออุตสาหกรรมอาหาร เพราะประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำของโลกเลยก็ว่าได้ ทำให้มีผลิตภัณฑ์อาหารเกิดขึ้นให้ผู้บริโภคได้เลือกสรรในการรับประทานอาหารมากมาย ทั้งอาหารหลัก หรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ไม่ว่าจะเป็นเสริมแหล่งพลังงานหลัก หรือวิตามินต่าง ๆ ซึ่งมีทั้งได้มาตรฐานและไม่ได้มาตรฐานแอบแทรกสอดเข้า หากแต่ไว้ในพืช ผัก ผลไม้มีแหล่งพลังงานหลักอย่างคาร์โบไฮเดรต ทำให้ไม่ต้องพึ่งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อาจจะไม่ได้มาตรฐาน

คาร์โบไฮเดรตเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่พบได้ในชีวิตประจำวันทั่วไปได้แก่ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส และไกลโคเจน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักที่ถูกนำไปใช้มากที่สุดในร่างกาย เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยได้ง่ายและร่างกายสามารถนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว คาร์โบไฮเดรตสามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งได้น้ำตาล (Sugar) เพราะพบได้ใน ข้าว หัวเผือก หัวมัน น้ำตาลทราย น้ำตาลปี๊บ น้ำผึ้ง ผัก และผลไม้ ซึ่งมีรสหวาน (ประหยัด, 2543) ทางคณะผู้วิจัยจึงได้แนวทางการศึกษาการผลิตคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวที่สามารถพบได้ง่ายในแหล่งน้ำจืด

สาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำเป็นสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 โดยเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การเพิ่มปริมาณสาหร่าย หลังจากนั้นนำสาหร่ายลงในอาหารในสภาวะการขาดธาตุอาหารเพื่อดูการสะสมของคาร์โบไฮเดรต ทำการสกัดคาร์โบไฮเดรตและวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เกิดขึ้นในสภาวะขาดธาตุอาหารต่าง ๆ โดยเชื่อว่าจะส่งผลต่อการเจริญเติบโต หรือปริมาณคาร์โบไฮเดรต และคาร์โบไฮเดรตชนิดใหม่ ๆ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำภายในสถาบัน
2. ศึกษาสภาวะของการขาดธาตุอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตคาร์โบไฮเดรต

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. สหรัยสี่เขียวที่ใช้คือสายพันธุ์ KS03
2. ปัจจัยที่ศึกษาคือชนิดของการขาดธาตุอาหาร: แคลเซียม โพแทสเซียม ไนโตรเจน แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส แมงกานีส กำมะถัน ทองแดง สังกะสี และเหล็ก
3. ติดตามปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากอาหารแต่ละสูตร
4. ติดตามชนิดของคาร์โบไฮเดรต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำคาร์โบไฮเดรตที่สหรัยผลิตได้มาใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมอาหาร
2. สามารถนำสภาวะที่เหมาะสมไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอุตสาหกรรม
3. ลดต้นทุนการผลิตอาหารเสริมในภาคอุตสาหกรรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย (Algae)

2.1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่าย

สาหร่าย หมายถึง สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ตรงกับภาษาอังกฤษว่า algae และภาษากรีก phykos เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (microscopic algae : microalgae) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์จนถึงขนาดใหญ่ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic algae : macroalgae) ซึ่งดูเหมือนมีราก ลำต้นและใบ รวมเรียกว่า ทัลลัส (thallus) ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ ช่วยในการสังเคราะห์แสง (ยูวตี, 2549)

สาหร่ายจัดเป็นทรัพยากรชีวภาพ (bioresource) ที่มีความสำคัญยิ่งทางเศรษฐกิจ เนื่องจาก สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากได้ ตามความต้องการและมีศักยภาพในการนำมาเป็นวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพื่อผลิตสารที่เป็นประโยชน์หลายชนิด เพราะภายในเซลล์ของสาหร่ายมีสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีคุณค่าในเชิงพาณิชย์สูงอยู่มากมาย อันได้แก่ กรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน เกลือแร่ รังควัตถุหรือสีธรรมชาติ และสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

2.1.2 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes) (ลัดดา, 2544)

ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวไว้ดังนี้คือ คลอโรพลาสต์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b สารสีประกอบได้แก่ carotene (เบต้า-แคโรทีน) ส่วน xanthophyll ได้แก่ lutein, diatoxanthin และ neoxanthin สารสีรวมอยู่ใน คลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน

- สาหร่ายสีเขียวมีหรือไม่มีผนังเซลล์ ถ้าไม่มีก็จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ pellicle, periplast หรือ เป็นแบบ scale
- หนวด (flagella) มีจำนวน 1, 2, 4, 8, 16 เส้น ลักษณะของหนวดมีหลายแบบ เช่น แบบacronematic, pantonematic หรือแบบมีเกล็ดอยู่บนหนวด จุดตั้งต้นของหนวด อยู่ที่ apical cell หรือ subapical cell ความยาวอาจเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้
- อาหารสะสม (starch) ได้แก่ true starch หรือ paramylon (แป้งที่พบในพืชชั้นสูง) อยู่ในไซโทพลาสซึมหรือคลอโรพลาสต์
- รูปร่าง (form) ของเซลล์มีหลายแบบ เช่น กลม รี กระสวย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ โคโลนี บางชนิดเป็นเส้นสาย filament บางกลุ่มมี gullet อยู่ที่ด้านบนสุดของเซลล์ เช่น *Euglenoids*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การจำแนกหมวดหมู่

Christensen (1962) จำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียว ตามรูปร่างลักษณะของเซลล์ ได้ 3 Class ได้แก่ Class Chlorophyceae, Class Prasinophyceae และ Class Euglenophyceae

2.1.3.1 Class Chlorophyceae สาหร่ายสีเขียว (green algae)

1. ลักษณะสำคัญ

สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสงประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b ส่วน carotene ได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน, เบต้า-แคโรทีน และ แกรมมา-แคโรทีน ส่วน xanthophyll ได้แก่ lutein, violaxanthin และ neoxanthin สารสีจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งมีหลายแบบเช่น cup-shape (รูปถ้วย) girdle-shape (รูปเอือกมั่ว) reticulate (เป็นตาข่าย) spiral (ขดเป็นเกลียว) stellate (แฉกรูปดาว) และ band-shape (เป็นแถบ) ผนังเซลล์ ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ชั้นในเป็นพวกเซลล์ลูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพคติน บางชนิดเช่น *Volvox* เป็นโคโลนี ไม่มีเซลล์ลูโลส มีแต่เพคติน *Desmids* สามารถผลิตสารเมือก (mucilaginous substances) มาห่อหุ้มเซลล์ หนวดพบเฉพาะพวกที่เคลื่อนไหวได้มีจำนวน 1, 2, 4, 8 เส้น หรือเป็นวงรอบเซลล์ มีลักษณะคล้ายแส้ (acronematic) ถ้ามีหนวดมากกว่า 2 เส้น ความยาวหนวดจะเท่ากัน ตำแหน่งของหนวดมี 2 ตำแหน่งคือ apical และ subapical cell อาหารสะสม ส่วนใหญ่คือแป้ง amylose และ amylopectin สะสมอยู่ใน pyrenoid ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ ที่เหลือจะสะสมอาหารอยู่ในรูปน้ำมันและกลีเซอรอล

2. รูปร่างลักษณะ

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicell) โคโลนี (colony) และ เส้นสาย (filament) พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีมีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 พวกที่มีหนวดจะมีออร์แกนัลที่มีสีเขียวเรียกว่าตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด

3. วัฏจักรชีวิต

วัฏจักรชีวิตมี 2 แบบคือ แบบแฮพลอนติก (heplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะไซโกตแบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์พบใน Order Volvocales และแบบดิพลอนติก (diplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะสร้างแกมีตพบในบางสกุลของ Order Chlorococcales

4. การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศกล่าวคือแบบอาศัยเพศ โดยการรวมกันของแกมีต ซึ่งมีทั้งแบบ isogamy, anisogamy และ oogamy ส่วนแบบไม่อาศัยเพศ มีทั้งการแบ่งเซลล์, สร้างสปอร์ และสร้าง akinete

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.2 Class Prasinophyceae หรือเรียกว่า “Prasinophytes”

เป็นสาหร่ายที่มีขนาดมีขนาดเล็กมาก 1-50 ไมโครเมตร เดิมรวมอยู่ใน Order Volvales, Class Chlorophyceae แต่มีผู้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จึงพบความแตกต่างจึงแยกออกมาจัดตั้งเป็นคลาสใหม่คือ Class Prasinophyceae ซึ่งมีความแตกต่างคือ เซลล์และขนาดมีเกล็ดหุ้ม แต่มีขนาดเล็กมากและอัดกันแน่น

1. ลักษณะที่สำคัญ

เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมหรือแบนข้าง compressed หรือแบนเล็กน้อยจากบนลงล่าง ผนังเซลล์ส่วนใหญ่เซลล์มีเกล็ดหุ้มซึ่งประกอบด้วย สารอินทรีย์ บางชนิดก็ไม่มี ขนาด มีขนาด 1, 2, 4, 6 และ 8 เส้น บนขนาดมีขนแข็งและหนา นอกจากนี้ขนาดยังมีเกล็ดขนาดเล็กปกคลุม คลอโรพลาสต์มีรูปร่างเป็นแผ่นจำนวน 1-2 แผ่น หรือเป็นเม็ดกลม ๆ จำนวนมาก จุดตา ส่วนใหญ่มีจุดตาและอยู่บน chloroplast มี ejectosome เป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ป้องกันตัวพบในสกุล *Pyramimonas* อาหารสะสมได้แก่แป้ง

2.1.3.3 Class Euglenophyceae ยูกลินอยด์ (euglenoids)

ยูกลินอยด์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ว่ายน้ำเป็นอิสระมีชื่อสามัญคือ euglenoids เซลล์มีสีเขียวสดบางชนิดไม่มีสีจัดเป็นพวก saprophytic และ holozoic form (กินสิ่งเน่าเปื่อยหรือตะกอนเป็นอาหาร) พบทั่วไปในน้ำจืด ทำให้เกิดการบลูมของน้ำได้

1. ลักษณะที่สำคัญ

ชนิดที่มีสี (colored form) พวกที่มีสารสีประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b แคโรทีนได้แก่ เบต้า แคโรทีน ส่วน xanthophylls ได้แก่ lutein, neoxanthin และ astaxanthin ไม่มีผนังเซลล์แต่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasmalemma) ซึ่งมี pellicle ประกอบด้วย แผ่นโปรตีนแบน ๆ จำนวนหลายแผ่นต่อกันเป็นแถว บางชนิดมี lorica หุ้ม พวกที่ว่ายน้ำเป็นอิสระมีขนาด 2 เส้นหรือมากกว่าขนาดเป็นแบบ pantonematic ความยาวไม่เท่ากันและอยู่ที่ apical cell เคลื่อนที่แบบ euglenoid movement อาหารสะสมเป็นพวกแป้ง (paramylon) colored form แป้งจะไม่ทำให้เกิดสีดำเมื่อทดสอบกับหมึกอินเดียน colorless form เป็นเม็ดแป้งลอยอยู่ใน cytoplasm

2. ลักษณะที่สำคัญของ euglenoid

- โครงสร้างของเซลล์ในช่วงชีวิต (life cycle) คือถ้าไม่ได้สร้างซิสต์หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มแล้วจะมีขนาด 2 เส้นสั้นสั้นเรียกว่า nonemergent flagellum ซึ่งยาวไม่เกิน gullet และเส้นยาวเรียกว่า emergent flagellum บางชนิดบริเวณข้างโคนขนาดจะหนาเรียกบริเวณนี้ว่า flagellawelling

- eye spot หรือ stigma มีหน้าที่ในการรับแสงอยู่ด้านบนของ gullet ส่วน contractile vacuole ทำหน้าที่รับของเสียจากเซลล์

- การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งเซลล์ทั้งในระยะที่เคลื่อนที่และในระยะที่เรียกว่า palmella (ระยะที่เซลล์ไม่มีหนวดและอยู่รวมกันเป็นกลุ่มที่มีเมือกหุ้ม)

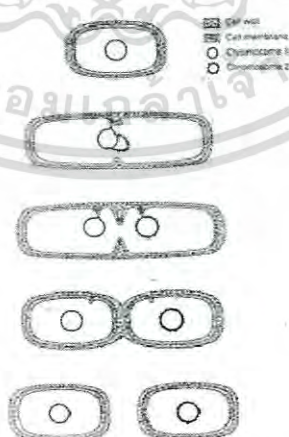
- การดำรงชีวิตของยูกลีนาออยด์มี 2 แบบคือแบบ photoautotrophic คือมีคลอโรพลาสต์สามารถสังเคราะห์แสงได้ มีหนวดจึงเคลื่อนที่ได้ และต้องการวิตามินบี 1 ชนิดตัวอย่างเช่น *Euglena sp.* และ *Phacus sp.* และแบบ heterotrophic ไม่มีคลอโรพลาสต์จึงสังเคราะห์แสงไม่ได้และเจริญเติบโตในที่มืดเช่น *Astasia sp.* และ *Hyalophacus sp.*

2.1.4 การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์

คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) (ธวัชชัย, 2547) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการแบ่งเซลล์และสร้างสปอร์ ได้แก่

1. การแบ่งเซลล์ (cell division) โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์จาก 1 เป็น 2 4 8 และ 16 ถ้าเซลล์ใดมีชีทหุ้ม เมื่อเซลล์ทำการแบ่งเซลล์หลาย ๆ ครั้งจะเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ (colony) มีขนาดใหญ่ขึ้นต่อมาจะหลุดออกจากกันเป็นกลุ่มเซลล์ย่อยโดยวิธีการฉีกขาด (fragmentation) ส่วนพวกที่เป็นเส้นสายการแบ่งเซลล์ทำให้ trichome ยืดยาวออก และจะขาดท่อน เมื่อมีการกระทบกระเทือนแต่ละท่อนจะเจริญเป็น trichome ใหม่ พวกที่มี heterocyst การขาดท่อนจะเกิดตรงรอยต่อของเซลล์ปกติกับ heterocyst

2. การสร้างสปอร์ (sporulation) สปอร์ที่สร้างขึ้นเป็นสปอร์ ที่ไม่มีหนวด (non-motile spore) สำหรับการเคลื่อนไหวแบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกเรียกว่า endospore คือสปอร์ที่เกิดภายในเซลล์โดยการแบ่งโปรโตพลาสซึมออกเป็น 2 ส่วนหรือหลายส่วน แต่ละส่วนเมื่อหลุดออกจากผนังเซลล์จะงอกเป็นต้นใหม่ ชนิดที่สองได้แก่ exospore สปอร์ ที่เกิดขึ้นโดยการแบ่งส่วนของเซลล์ออกมาเป็นสปอร์มีจำนวน 1 หรือหลายสปอร์เรียงต่อกัน

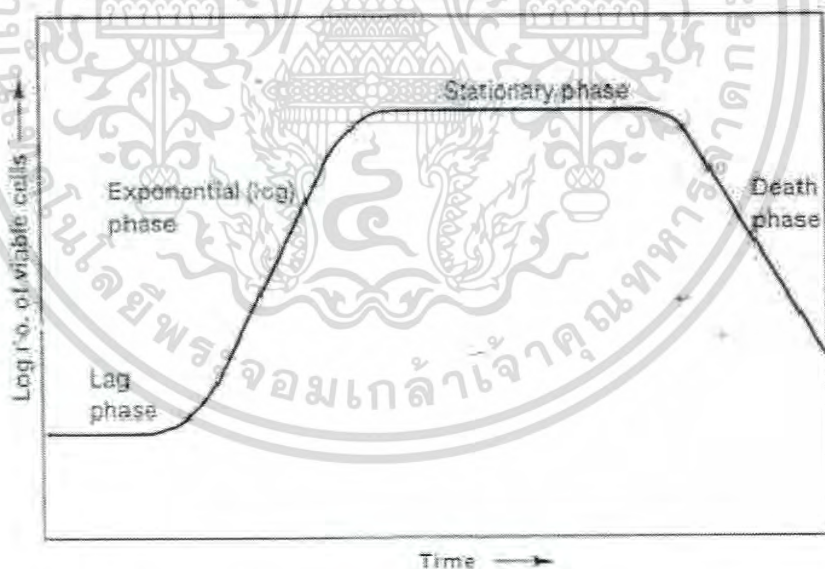


รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการแบ่งเซลล์ของเซลล์สาหร่าย (ธวัชชัย, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโต (growth) และการเจริญพันธุ์ (reproduction) โดยการแบ่งเซลล์การเจริญเติบโตโดยทั่วไป การเพิ่มจำนวนและการเจริญพันธุ์โดยทั่วไปเซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัวเองจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ (binary fission) และเป็นการแบ่งเซลล์ตามขวาง (transverse fission) ก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์จะมีขนาดยาวขึ้น มีการสร้าง DNA RNA โปรตีนชนิดต่าง ๆ และสารประกอบอื่น ๆ ขึ้นภายในเซลล์ ต่อมาจะมีการสร้างผนังกันเซลล์ทางขวางแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน จากนั้นเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จึงแยกออกจากกันเป็น 2 เซลล์การเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่วงที่เพิ่มจำนวนขึ้นเท่าตัวนั้น เรียกว่า generation ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละ generation เรียกว่า generation time ดังรูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการแบ่งเซลล์ของเซลล์สาหร่าย

เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของเซลล์สาหร่าย และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยวิธีทำกราฟแสดงความสัมพันธ์โดยใช้สเกลธรรมดาจึงไม่เหมาะสมเพราะถ้าเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่เร็ว ดังนั้น การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ และเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงมักใช้ค่า logarithmic (log) ของจำนวนเซลล์สาหร่าย ดังนั้น หากมีการทำกราฟเพื่อแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แกน Y ของกราฟจะเป็นค่า log ของจำนวนเซลล์สาหร่าย ส่วนแกน X จะเป็นเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จำนวนของเซลล์สาหร่ายที่สัมพันธ์กับเวลาแสดงเป็น growth curve ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย (ธวัชชัย, 2547)

2.1.5 ระยะของการเจริญเติบโต

เมื่อนำเซลล์สาหร่าย (ธวัชชัย, 2547) จำนวนหนึ่งใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวแล้วจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะพบว่าเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะเป็นไป ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ได้ 4 ระยะ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่ายเริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่จะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่น ๆ ที่สำคัญของเซลล์ตอนระยะท้าย ๆ ของระยะนี้เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยและพร้อมที่จะแบ่งตัวระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์และขบวนการต่าง ๆ ตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจำนวนอีกหรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตแล้วเข้าสู่ระยะ Stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง จึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย

4. Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารอาจหมด มีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก

2.2 คาร์โบไฮเดรตในสาหร่าย

2.2.1 การสังเคราะห์ด้วยแสง

สิ่งมีชีวิตในโลกนี้ ได้พลังงานจากดวงอาทิตย์ ซึ่งพืชจะนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง นับเป็นกระบวนการพื้นฐานทั้งหมดทั้งในทางตรงและทางอ้อม พืชสีเขียวสามารถนำพลังงานแสงจากดวงอาทิตย์ มาสังเคราะห์อาหารจากวัตถุดิบที่ได้จากอากาศ คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำจากในดินมาสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยมีแสงสว่าง คลอโรฟิลล์และเอนไซม์ ได้ผลผลิตคือออกซิเจน (วันเพ็ญ , 2534)

2.2.2 องค์ประกอบในการสังเคราะห์ด้วยแสง

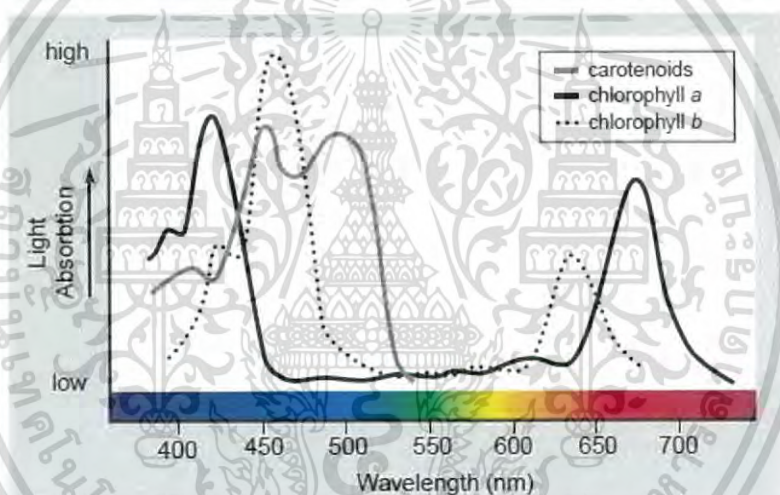
2.2.2.1 สารสีในการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic Pigment)

ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน สารที่สำคัญที่สุดคือคลอโรฟิลล์ ในพืชชั้นสูงมีสองชนิด คือ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์จะทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางของปฏิกิริยา คลอโรฟิลล์จะอยู่ในคลอโรพลาสต์ในพืชชั้นสูงจะมีรูปร่างคล้ายจาน กว้างประมาณ 5 ไมโครเมตร จะมีมากในมีโซฟิลล์ของใบ ในแต่ละเซลล์จะมีประมาณ 50-100 อัน แต่ในเซลล์คุมจะมีน้อย สารที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงจะอยู่ภายในคลอโรพลาสต์ในส่วนกรานา ซึ่งพืชดอกจะมีกรานาประมาณ 10-100 อันในแต่ละคลอโรพลาสต์ ในสาหร่ายสีเขียวมีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่ได้เพียงอันเดียว ส่วนในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้จะไม่มีคลอโรพลาสต์ มีเฉพาะสารสีกระจายอยู่ในเซลล์ (วันเพ็ญ, 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2 แสงสว่าง

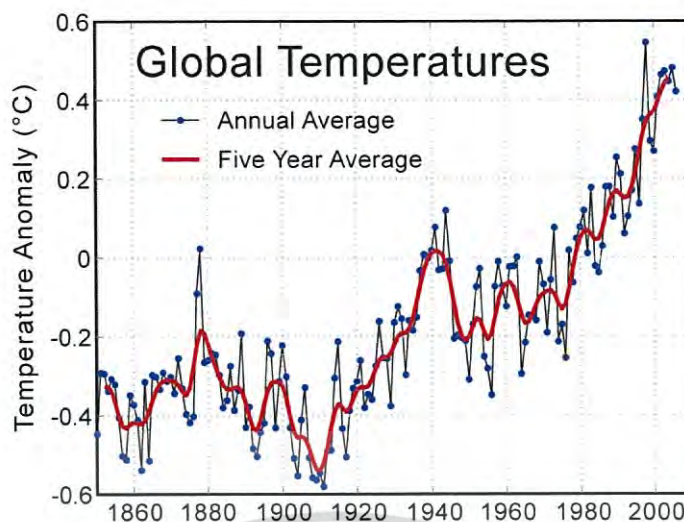
ในกระบวนการแรกของการสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงเป็นสำคัญ โมเลกุลของคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดและสารอื่น ๆ จะดูดแสงได้ในความยาวคลื่นแสงต่างกัน แสงมีอิทธิพลต่อพืช และพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้คือ แสงที่มองเห็นได้ ซึ่งมีความยาวคลื่นคือตั้งแต่ 400-740 นาโนเมตร อิทธิพลที่มีต่อพืชแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสภาพทางสรีรวิทยาของพืชแต่ละชนิด ช่วงเวลาของการได้รับแสง ความเข้มและความยาวคลื่นแสง โดยทั่วไปถ้าความเข้มของแสงลดลงจากสภาพที่เหมาะสมของพืชชนิดหนึ่ง การสังเคราะห์ด้วยแสงก็จะลดน้อยลงด้วย แต่ถ้าพืชได้รับแสงที่มีความเข้มมาก ๆ เป็นเวลานานเกินไปก็จะมีผลทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงชะงักและหยุดลงได้ ทั้งนี้เพราะการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดมาก ออกซิเจนซึ่งเป็นผลพลอยได้ถูกนำไปใช้ในส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้พบว่า แสงที่พืชสามารถนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ คือแสงสีส้ม แดง ม่วง น้ำเงิน โดยเฉพาะแสงสีแดงและน้ำเงิน พืชสามารถนำไปใช้ได้มากที่สุด (ทวี, 2519)



รูปที่ 2.3 การดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และ แคโรทีนอยด์
ที่มา : Raven, Peter H., et.al., 2008, P. 152.

2.2.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์

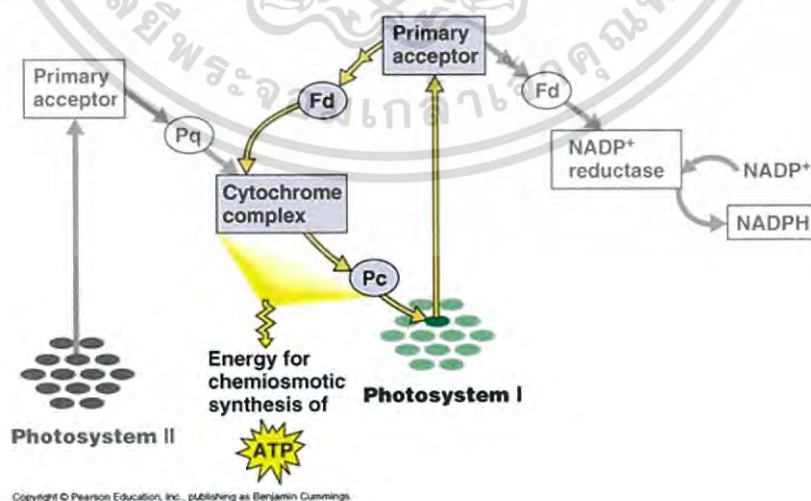
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ตามปกแล้วคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศมีอยู่ประมาณ 0.03-0.04 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าในมหาสมุทรซึ่งมีการแพร่ของคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศลงสู่ทะเล และมีคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดจากการหายใจและการย่อยสลายซากของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในทะเลจึงมีปริมาณมากเพียงพอกับความต้องการของพืชและสาหร่ายที่อยู่ในน้ำ จากการศึกษาพบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่พืชได้รับในบริเวณที่มีความเข้มของแสงที่แตกต่างกันทำให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชไม่เท่ากัน (ปิ่นศักดิ์ และ ปิยาณี, 2545)



รูปที่ 2.4 ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศของโลก (ปีนศักราช และ ปีพ.ศ., 2545)

2.2.3 ปฏิกริยาสังเคราะห์ด้วยแสง

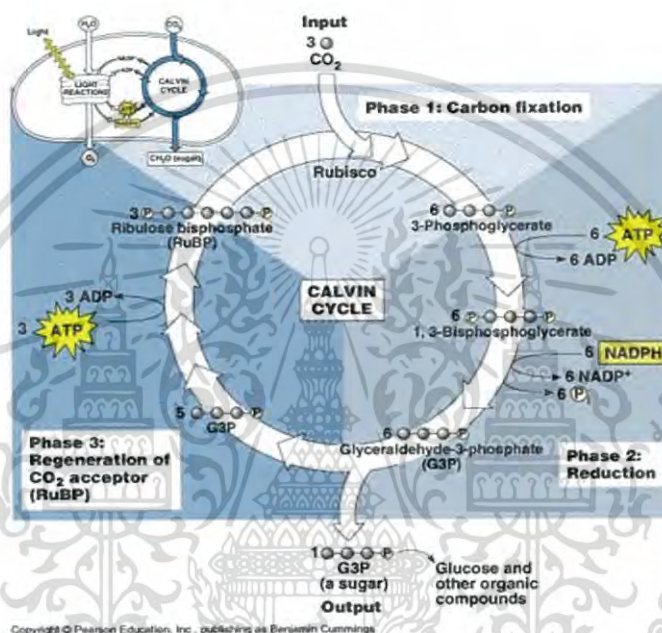
2.2.3.1 ปฏิกริยาใช้แสง (Light Reaction) เป็นปฏิกริยาที่เกิดขึ้นได้ต้องมีพลังงานแสง น้ำ ตัวรับอิเล็กตรอน และคลอโรฟิลล์ เมื่อคลอโรฟิลล์ถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสง ทำให้อิเล็กตรอนของคลอโรฟิลล์มีพลังงานสูงกว่าเดิม จึงเปลี่ยนจาก สภาวะปกติไปสู่สภาวะตื่นตัว แล้วหลุดจากวงโคจรของคลอโรฟิลล์ที่ถูกกระตุ้น เข้าสู่ระบบขนส่งอิเล็กตรอน มีการถ่ายทอดไปเรื่อย ๆ ในขณะที่มีการถ่ายทอดนี้ พลังงานอิเล็กตรอนจะลดลง และมีการสร้าง ATP พลังงานอีกส่วนหนึ่งจะนำไปสร้าง NADPH₂ ในปฏิกริยาใช้แสงนี้ แสงยังทำให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน และออกซิเจน การแตกตัวของน้ำจะทำให้อิเล็กตรอนออกมาในสภาพมีเป็นจริงตามธรรมชาติ ในการเกิดออกซิเจน 1 โมเลกุล จะต้องใช้น้ำอย่างน้อย 4 โมเลกุล



รูปที่ 2.5 ปฏิกริยาใช้แสง (Light Reaction) (ยวดี, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 ปฏิกิริยาไม่ใช้แสง (Dark Reaction) เป็นปฏิกิริยาที่พืชไม่ต้องใช้แสง แต่ต้องใช้ CO_2 , NADP², ATP และ RuDP เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นต่อเนื่องจากปฏิกิริยาใช้แสง จะนำมาใช้ในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นคาร์โบไฮเดรต โดยใช้พลังงานจาก ATP ซึ่งได้จากปฏิกิริยาใช้แสงเช่นกัน การสร้างคาร์โบไฮเดรตจากคาร์บอนไดออกไซด์วิธีนี้เรียกว่า การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วยปฏิกิริยาเคมี ที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งหลายปฏิกิริยา ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดขึ้นติดต่อกันเป็นวัฏจักร ค้นพบโดย เมลวิน แคลวิน ในปี ค.ศ. 1961 เขาได้รับรางวัลโนเบลด้วย จึงเรียกปฏิกิริยานี้ว่า วัฏจักรแคลวิน โดยมีขั้นตอนในวัฏจักร ดังนี้



รูปที่ 2.6 วัฏจักรแคลวิน (Calvin cycle) (ยวดี, 2556)

2.3 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เป็นสารชีวโมเลกุลที่สำคัญที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด คำว่าคาร์โบไฮเดรตมีรากศัพท์มาจากคำว่า คาร์บอน (carbon) และคำว่า ไฮเดรต (hydrate) อิมตัวไปด้วยน้ำ ซึ่งรวมกันก็หมายถึงคาร์บอนที่อิมตัวไปด้วยน้ำ เนื่องจากสูตรเคมีอย่างง่ายก็คือ $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ซึ่ง $n \geq 3$ โดยคาร์โบไฮเดรตจัดเป็นสารประกอบแอลดีไฮด์ (aldehyde) หรือคีโตน (ketone) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, $-\text{OH}$) เกาะอยู่เป็นจำนวนมาก จึงเรียกว่า สารประกอบโพลีไฮดรอกซีแอลดีไฮด์ (polyhydroxyaldehyde) หรือ โพลีไฮดรอกซีคีโตน (polyhydroxyketone) ซึ่งการที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลนั้น ทำให้เกิดการวางตัวกัน และยังสามารถทำปฏิกิริยาหรือสร้างพันธะกับสารอื่น ๆ ได้ ดังนั้น คาร์โบไฮเดรตจึงมีความหลากหลายทั้งในด้านของโครงสร้างทางเคมี และบทบาททางชีวภาพอีกด้วย หน่วยที่เล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรตก็คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมโนแซ็กคาไรด์

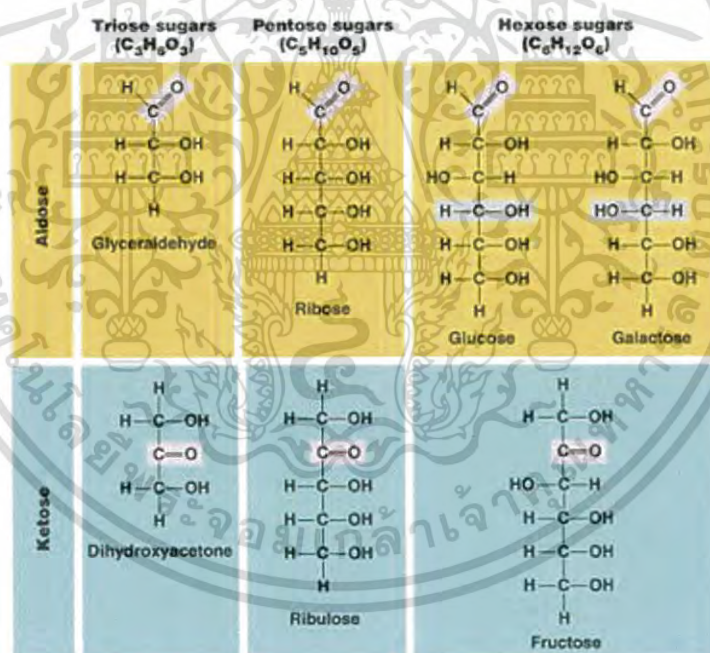
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ชนิดและโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรต

2.3.1.1 โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

- เป็นน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก ประกอบด้วยคาร์บอน 3 ถึง 8 อะตอม
- เป็นโครงสร้างพื้นฐานของ ไดแซ็กคาไรด์
- สูตรทั่วไปเป็น $(CH_2O)_n$ หรือ $C_nH_{2n}O_n$ โดยที่ n มีค่าตั้งแต่ 3 อะตอม ถึง 8 อะตอม
- มีหมู่ฟังก์ชันเป็น $-C-H$ (หมู่คาร์บอกซาลดีไฮด์) และหมู่ $-OH$ (ไฮดรอกซิล)
- เป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรต ตัวอย่างได้แก่ กลูโคส
- เป็นแหล่งพลังงานหลักของสิ่งมีชีวิต เช่น ฟรุคโตส กาแลกโตส และแมนโนส

สามารถจำแนกตามหมู่ฟังก์ชัน ได้เป็น 2 ประเภท คือ แอลโดสและคีโตส ซึ่งมอนอแซ็กคาไรด์แอลโดสเกิดจากการที่ภายในโมเลกุลมีหมู่ฟังก์ชันของคาร์บอกซาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ ส่วน คีโตส เกิดจากภายในโมเลกุลมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบ

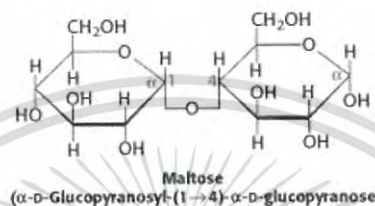
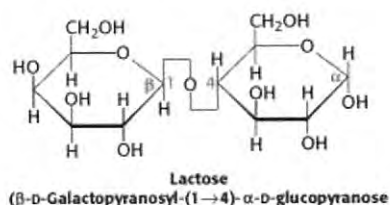
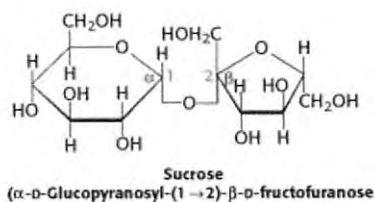


รูปที่ 2.7 โครงสร้างโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) (Lee, 1983)

2.3.1.1 ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่

- เกิดจากโมโนแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุลมารวมกัน (โดยสูญเสีย น้ำ 1 โมเลกุล) มีชื่อเรียกตามชนิดของโมโนแซ็กคาไรด์
- ไดแซ็กคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ เช่น ซูโครส หรือน้ำตาลทราย ($C_{12}H_{22}O_{11}$) เป็นแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของกลูโคส และฟรุคโตส

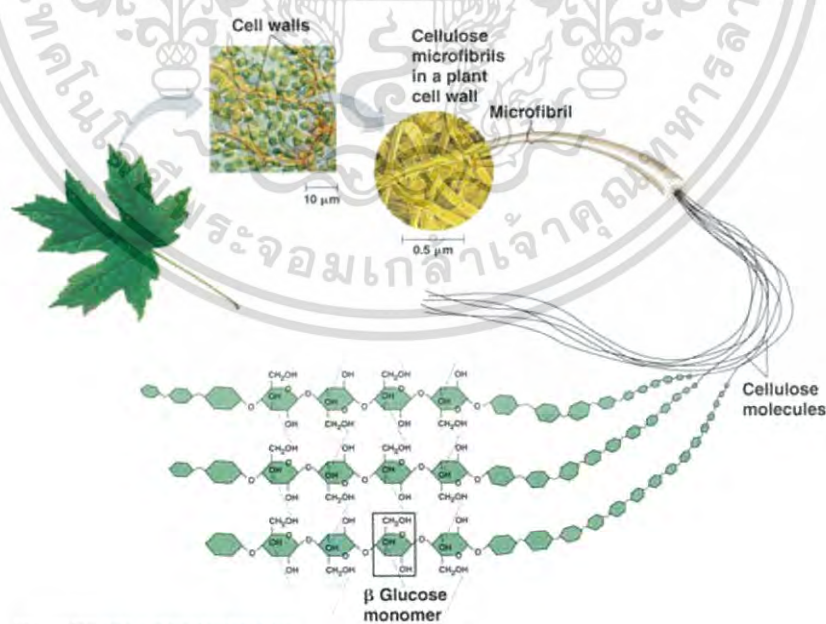
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 โครงสร้างไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) (Lee,1983)

2.3.1.3 พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) หรือ น้ำตาลโมเลกุลใหญ่

- ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากกว่า 10 โมเลกุลขึ้นไป (100 – 1,000 โมเลกุล) เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond)
- มีสมบัติเป็นของแข็งสีขาว แหะเปไม่มีละลายน้ำ ไม่มีรสหวาน ไม่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาเคมี



รูปที่ 2.9 โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) (Lee,1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตหรือ การเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงระดับใหญ่ขึ้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายชนิดต่าง ๆ เช่น สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella Vulgaris* มีอัตราการเติบโต (growth rate) 25 gm-2d-1 (Collet et al. 2011 : 209) เป็นต้น โดยปัจจัยที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ แสง ธาตุอาหาร คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ ออกซิเจนค่า ความเป็นกรดต่าง และการกวน (Junying, Junfeng and Baoning, 2013) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. แสง (light) ความยาวคลื่น และความถี่ของแสง มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยความสามารถในการดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดของสาหร่าย (680 nm หรือ 700 nm) จะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่ายแต่ละชนิด เช่น *Chlorella* จะมีความสามารถดูดซับแสงสีแดงและสีเหลืองตามลำดับ

โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจะใช้แสงสว่างจากธรรมชาติ เนื่องจากสเปกตรัมของแสงธรรมชาติมีประโยชน์ต่อสาหร่ายมากกว่าแสงประดิษฐ์ (เช่น แสงจาก หลอดฟลูออเรสเซนต์) อย่างไรก็ตามแสงจากธรรมชาติควบคุมได้ยากอาจแรงเกินไปในวันที่แดดจ้า หรือน้อยเกินไปในวันที่มีฝนตก ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยจะใช้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ควบคุมไปกับแสงจากธรรมชาติ เพื่อเร่งปริมาณผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก

2. ธาตุอาหาร (nutrients) ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้มีอัตราการเติบโตที่เหมาะสม ต้องใช้อาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นในปริมาณเพียงพอ โดยทั่วไปธาตุอาหารหลักของสาหร่าย ได้แก่ คาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) และฟอสฟอรัส (P) ซัลเฟอร์ (S) โพแทสเซียม (K) ซิลิคอน (Si สำหรับไดอะตอม) นอกจากนั้น เป็นเกลือแร่อื่น ๆ เช่น โคบอลต์ (Co) โมลิบดีนัม (Mo) แมงกานีส (Mn) และวิตามินชนิดต่าง ๆ เช่น บี12 เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปแหล่งของคาร์บอนมาจากอากาศ นอกจากสาหร่ายบางชนิด เช่น *Spirulina* ที่สามารถใช้ไบคาร์บอเนตที่ค่าความเป็นกรดต่างสูง ๆ ได้ และการใช้แหล่งสารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กลูโคส หรือ อะซิเตต (acetate) จะสามารถเร่งผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายได้ดี แต่เป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงให้สูงขึ้น ส่วนไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม ได้จากอาหารที่ใช้ใน การเพาะเลี้ยง

3. คาร์บอนไดออกไซด์เป็นปัจจัยที่จำกัด (limiting factor) สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กและของพืช อื่น ๆ โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วงความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 1-5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) นอกจากนี้การเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก นอกจากใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเร่งปริมาณผลผลิตแล้วยังเป็นการช่วยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างด้วย จากการที่สาหร่ายขนาดเล็กใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการ

สังเคราะห์แสง เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตชีวมวล ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ นอกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของสาหร่ายแต่ละชนิดแล้ว จึงจำเป็นต้องมีแหล่งที่มาของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแหล่งของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อาจมาจากระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศระบบผลิตก๊าซชีวภาพหรือก๊าซสังเคราะห์ที่มีจำหน่าย

4. อุณหภูมิ สาหร่ายขนาดเล็ก แต่ละสายพันธุ์จะสามารถทนอุณหภูมิได้ในช่วงที่แตกต่างกัน โดยสาหร่ายน้ำจืด เช่น *Chlorella* และ *Scenedesmus* มีความสามารถในการปรับตัวได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 5-35°C แต่ช่วง อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25-30 °C

5. ออกซิเจน (oxygen) ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย โดยจะละลายสะสมอยู่ในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้น ๆ ซึ่งจะนำไปสู่การมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่สูงเกินไปที่อาจทำอันตรายและส่งผลต่อการอยู่รอดของสาหร่ายขนาดเล็กได้

6. ความเป็นกรดต่าง การควบคุมค่าความเป็นกรดต่างให้อยู่ช่วงที่เหมาะสม 9.5 - 10.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะอยู่ในช่วง 4 - 6 อีกทั้งยังควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิต หรือสาหร่ายชนิดอื่นที่เป็นพิษ

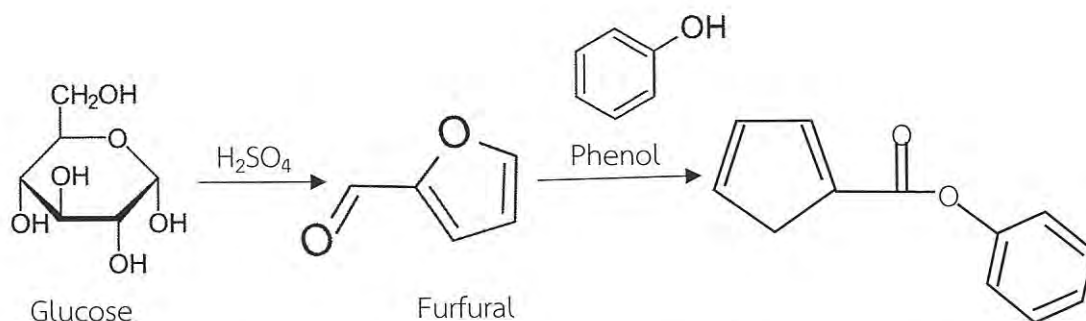
7. การกวนมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตดีเป็นการเพิ่มการกระจายตัวของสาหร่ายให้ได้รับแสงอย่างสม่ำเสมอ ช่วยลดอัตราการตกตะกอนของสาหร่าย สารอาหารกระจายตัวอย่างทั่วถึง ทำให้เซลล์สาหร่ายดูดซึมสารอาหารต่าง ๆ ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ป้องกันไม่ให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิที่ผิวหน้า และระดับลึกลงไป เครื่องมือที่สามารถติดตั้งเพื่อทำการกวนอาจเป็นใบพัด หรือ thermo-zipphon การกวนโดยให้น้ำเคลื่อนที่ควรอยู่ที่ความเร็วประมาณ 21 - 25 เซนติเมตรต่อวินาที ซึ่งเป็นอัตราที่ไม่รบกวนสาหร่าย

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (sugar analysis)

2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมกลูโคส เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วในการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลอื่นในธรรมชาติที่อาจอยู่ในรูปของ mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide โดยน้ำตาลเหล่านี้ จะทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟิวริก เข้มข้นที่อุณหภูมิสูงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นส่วนประกอบที่มีสี และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 480-490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligosaccharide และ polysaccharide พันธะอีเทอร์ระหว่างโมเลกุลถูกตัดออกจากกันด้วยกรด พร้อมทั้งเกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอลกลายเป็นสารประกอบไตรเอริลมีเทนที่มีสีส้ม (triaryl methane dyes) จากข้อมูลข้างต้นปฏิกิริยาของวิธีนี้จะได้ดังรูปที่ 2.10

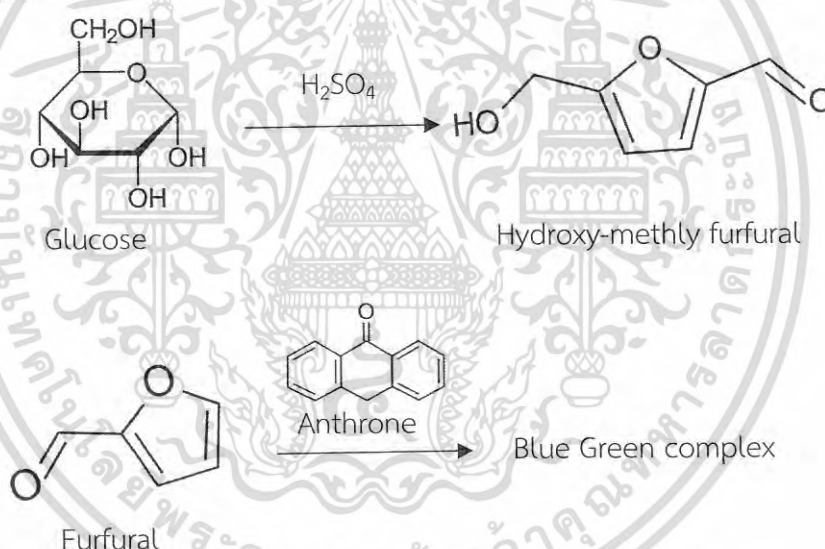
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาของวิธี Phenol-sulfuric (ดัดแปลงจาก มนตรี, 2530 และ Fryhle, 2003)

2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลางโดยวิธี (Anthrone's test)

คาร์โบไฮเดรตจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเพื่อสร้าง furfurals และ hydroxy-methyl furfural เหล่านี้ furfural จะถูกควบแน่นด้วยสารละลาย Anthrone เพื่อสร้างสีเขียวเข้มและสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ ช่วงความยาวคลื่น 620-630 นาโนเมตร จากข้อมูลข้างต้นปฏิกิริยาของวิธีนี้จะได้ดังรูปที่ 2.11



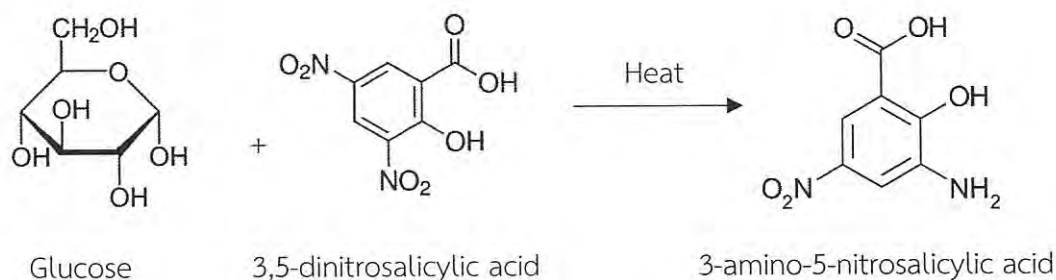
รูปที่ 2.11 ปฏิกิริยาของวิธี Anthrone (มนตรี, 2530 และ Fryhle, 2003)

2.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส โดยการต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายต่างที่มีกรดไดไนโตรลีสาลิก (3,5-dinitrosalicylic acid) อยู่ด้วยปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้สารละลายมีสีเข้มขึ้น และสามารถดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร ซึ่งเชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเกิด จากกระบวนการรีดักชันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ 3,5-dinitrosalicylic acid ไปเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ซึ่งปฏิกิริยานี้จะดำเนินไปจนกว่าสารตั้งต้นคือ น้ำตาลรีดิวซ์จะหมด

จากข้อมูลข้างต้นปฏิกิริยาของวิธีนี้จะได้ดังรูปที่ 2.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 ปฏิกิริยาของวิธี DNS (Plummer, 1967)

2.5.4 เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

1. ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

1.1 Light source แหล่งกำเนิดรังสีเป็นส่วนที่ให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการออกมาอย่างต่อเนื่องและคงที่ รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ หลอดกำเนิดรังสีมีหลายชนิดตามความยาวคลื่นรังสีที่ปล่อยออกมา เช่น ช่วง UV จะใช้หลอด H2 and D2 lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 nm และช่วง Visible ใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 nm เป็นต้น

1.2 Monochromator เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแสงแคบ ๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์ปริซึมหรือ เกรตติง

1.3 Cell sample เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง บางครั้งอาจเรียกว่า Cuvettes ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วจะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะแก้วจะดูดกลืนรังสีในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ต ซึ่งใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

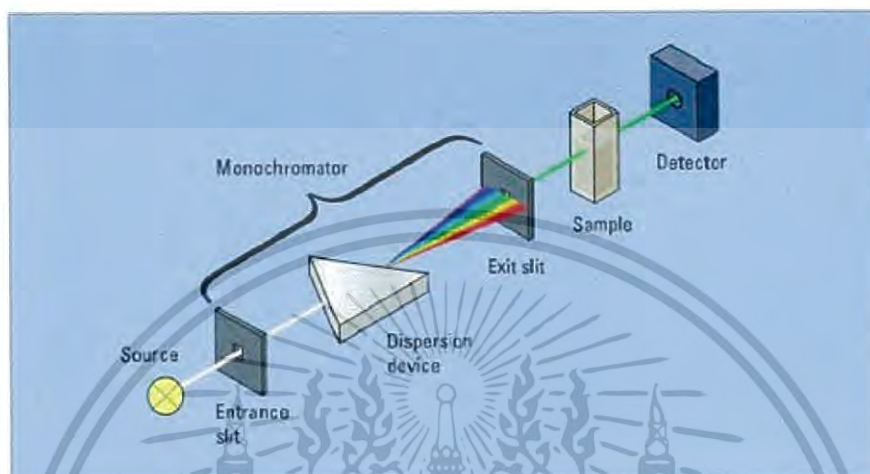
1.4 Detector ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้า เครื่องวัดรังสีมีหลายชนิดที่นิยม ได้แก่ Photomultiplier tube และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด Silicon diode detector

2. หลักการของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมจะทำให้อิเล็กทรอนิกส์ภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีความยาวคลื่นค่าต่าง ๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้



รูปที่ 2.13 หลักการทำงานของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

2.5.5 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (Substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตรา การเคลื่อนที่ของสารประกอบใน Stationary Phase ของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป เมื่อ ต่อเข้ากับ Detector จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (Analyses or Solutes) ได้อย่างต่อเนื่องสามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low Volatile Substation) หรือน้ำหนัก โมเลกุลสูง (High Molecular Weight Compounds)

2.5.5.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คู่อิออนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสถียรได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ต้องละลายได้ 100% (กรองด้วย) การแยกสารจะ ประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยก นั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป

การแยกสารที่เป็นของผสมด้วยวิธีโครมาโทกราฟี จะอาศัยอัตราการเคลื่อนที่ของสาร(หรือ ความสามารถในการกระจายตัวของสาร) ระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสนิ่ง(stationary phase) และเฟส เคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่พาของผสมให้เคลื่อนไปบนเฟสนิ่ง การแยกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกของผสมอาศัย การดูดซับหรือการกระจายตัวของแต่ละองค์ประกอบในเฟสหนึ่งได้แตกต่างกัน เฟสหนึ่งอาจเลือกใช้ได้ทั้ง ของเหลวและของแข็ง และเฟสเคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้

หลักการพื้นฐานของเทคนิค ลิควิดโครมาโทกราฟี คือ การแยกสารละลายผสมออกจากกัน ภายใน คอลัมน์ที่มีลักษณะปิดซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กที่มีรูพรุนเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับและทำให้หลุดออกจากการดูดซับบนอนุภาคที่บรรจุอยู่ใน คอลัมน์ผลที่ตามมาคือสารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลงและอัตราเร็วเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับ สัมพรรคภาพของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์

เทคนิค Liquid chromatography ที่ใช้ในการแยกสารนั้น สามารถจำแนกได้อย่างกว้าง ๆ ตาม กลไกของการแยกสารโดยอาศัยเฟสเป็นตัวกำหนด

1. Adsorption Chromatography
2. Liquid- Liquid Chromatography
3. Ion Exchange Chromatography
4. Size Exclusion Chromatography

1. Adsorption Chromatography หรือ Liquid-Solid Chromatography (LSC) หลักการแยกสารนั้นอาศัยการเกิดอันตรกิริยา ที่ต่างกันระหว่างสารกับตำแหน่งซึ่ง active บนผิวของตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ตัวดูดซับเป็นของแข็งมีขั้ว เช่น ซิลิกา อะลูมินา สามารถเกิดอันตรกิริยา กับสารประกอบที่มีฟังก์ชันนัลกรุปที่มีขั้ว (polar functional group) ส่วนของ non-polar ที่อยู่ใน โมเลกุลนั้นจะมีอิทธิพลต่อการแยกสารน้อยมาก องค์ประกอบที่สามารถยึดติดกับเฟสหนึ่งที่ตำแหน่งว่างไว้ (active site) ได้น้อยกว่า แต่ละลายได้ดีในเฟสเคลื่อนที่ที่จะสามารถถูกแยกออกมา ก่อนองค์ประกอบที่ยึด ติดกับเฟสหนึ่งได้ดี ดังนั้นองค์ประกอบที่มีขั้วสูงจะยึดติดกับเฟสหนึ่งได้ดีกว่า องค์ประกอบที่มีขั้วน้อยกว่า ซึ่ง มีผลต่อ retention time ของแต่ละองค์ประกอบ จึงมีความเหมาะสมมากสำหรับกาแยกสารประกอบที่มี ขั้ว เช่น การแยกสารประกอบพวก alcohol ออกจาก aromatic hydrocarbon

2. Partition Chromatography หรือ Liquid-Liquid Chromatography(LLC) มีเฟสหนึ่งเป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนอนุภาคของแข็ง และไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลว มีหลักการแยกโดยอาศัยการกระจายตัวหรือการละลายได้ขององค์ประกอบในของผสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่ และเฟสหนึ่ง องค์ประกอบที่กระจายตัวได้ดีในเฟสหนึ่งจะถูกยับยั้งได้ดีในเฟสหนึ่งได้ดีกว่า ถ้าเฟสหนึ่งมีขั้วสูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เราเรียกว่า normal phase chromatography องค์ประกอบที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยจะ กระจายตัวได้ดีในเฟสเคลื่อนที่มากกว่า ดังนั้นจึงถูกพาออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าตัวที่มีขั้วสูง แต่ถ้าเฟสหนึ่ง มีขั้วสูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ เรียกว่า reverse phase chromatography เฟสเคลื่อนที่ได้แก่ น้ำ เมทานอล เป็นต้น

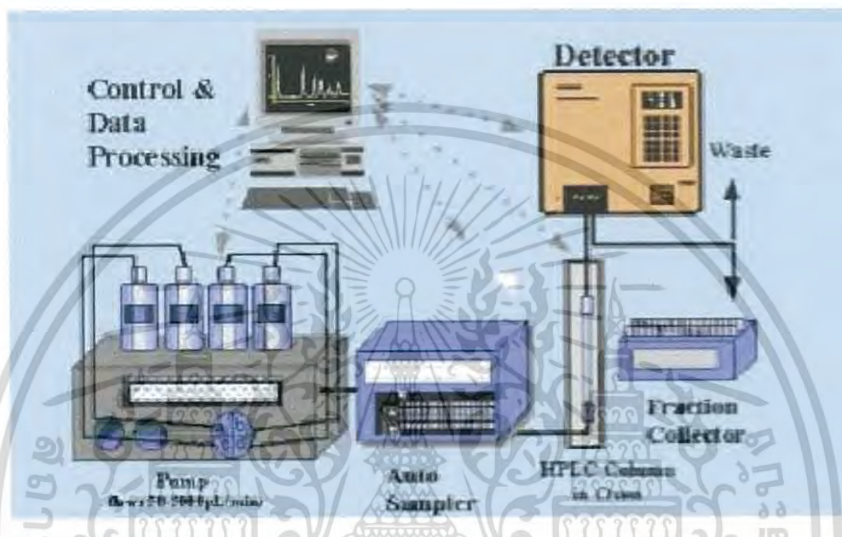
3. Ion exchange chromatography โครมาโทกราฟีชนิดนี้ใช้แยกไอออน โดยอาศัยหลักการกระจายตัวของไอออนระหว่างเฟสเคลื่อนที่ และเฟสหนึ่งที่แลกเปลี่ยนไอออนได้ต่างกัน ขึ้นอยู่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับสัมพรรคภาพของไอออนในสารละลายกับไอออนที่มี ประจุตรงกันข้ามซึ่งอยู่ที่ผิวของเฟสที่อยู่กับที่ โดยทั่วไปจะใช้ของแข็งที่มีรูพรุนเป็นเรซินที่ทำจากสไตรีนได ไวนิลเบนซีน ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์แบบ โครงข่าย ที่มีหมู่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้เกาะอยู่บนเรซิน ไอออนบวกจะถูกแยกด้วยเรซินที่ใช้ แลกเปลี่ยนไอออนบวก และไอออนลบก็ถูกแยกด้วยเรซินที่แลกเปลี่ยน ไอออนลบ เฟสเคลื่อนที่ปกติ แล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย counter ion ที่มีประจุตรง ข้ามกับ group ที่อยู่บนผิว ของอนุภาคที่บรรจุอยู่คือ ไอออนในเฟสเคลื่อนที่จะมีประจุเหมือนกับไอออนที่ ต้องการแยก ซึ่งทำให้ ประจุทั้งหมดอยู่ในสภาวะสมดุล การแข่งขันกันระหว่างไอออนในสารละลายกับ counter ion เพื่อ เข้าครอบครองตำแหน่งที่มีประจุบนผิวของเรซินจะมีผลทำให้เกิดการยืดเกาะขึ้น ionexchange chromatography ไอออนที่มีขนาดและประจุที่ต่างกันจะถูกแยกออกจากคอลัมน์ในเวลา ที่ ต่างกัน

4. Size Exclusion Chromatography แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ Gel Permeation Chromatography (GPC) และ Gel Filtration Chromatography (GFC) เฟสอยู่กับที่ควรมีความ เหนียวทางเคมี กลไกการแยกสารโดย size exclusion chromatography นั้นจะเกี่ยวข้องกับการที่ สารจะถูกเลือกให้แพร่ผ่านรูพรุนของ packings ที่มีลักษณะ เป็น network 3 มิติ และpackings นี้ อาจเป็น gel หรือของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งเป็นสารประกอบ อนินทรีย์ การที่สารจะถูกยืดเหนี่ยวให้อยู่ใน คอลัมน์นานหรือไม่นานขึ้นอยู่กัขนาดของโมเลกุล เมื่อเทียบกับขนาด ของรูของอนุภาคที่ถูกบรรจุอยู่ ในคอลัมน์ โมเลกุลเล็กสามารถที่จะแพร่ผ่านเข้าไปในรูที่เล็ก โมเลกุลใหญ่ที่ มีขนาดกึ่งกลางไม่ใหญ่ มากนักจะแพร่ผ่านได้เฉพาะบางส่วนของรูที่อยู่ในอนุภาคเท่านั้น และจะถูกกีดกัน จากรูที่เล็กมาก ๆ สำหรับโมเลกุลใหญ่มากจะถูกกีดกันออกไป และไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูได้ ดังนั้น โมเลกุลที่มีขนาด ใหญ่ จะเดินทางเร็วมาก และจะออกมาคอลัมน์เป็นพวกแรก ดังนั้น size exclusion chromatography จะมีประโยชน์มากสำหรับแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น polymer และ biopolymer ออกจากโมเลกุลเล็ก ๆ

สำหรับ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีความแตกต่างจาก Liquid Chromatography (LC) เนื่องจากว่าเทคนิค (LC) นั้นอนุภาคที่ใช้ในนั้นจะมีรูพรุนขนาดใหญ่ โดยทั่วไปแล้ว ค่า $dp = 100-250 \mu m$ ซึ่งบรรจุในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5 เซนติเมตร ความดันที่ต้องการ ทำให้ตัวทำละลายไหลผ่านระหว่างอนุภาคน้อยมาก โดยปกติภาชนะที่ใส่ตัวทำ ละลายที่ต่อเข้ากับคอลัมน์ จะทำหน้าที่เป็นแหล่งที่ทำให้ความดันคงที่ โดยภาชนะที่ใส่ตัวทำละลาย อยู่เหนือผิวของอนุภาคที่บรรจุใน คอลัมน์เล็กน้อย ความดันจะลดลงอยู่ในช่วง 0.1-1 บรรยากาศ อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่จะช้ามาก ซึ่ง อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะช้ามาก อาจมีค่า 0.1 มิลลิลิตรต่อนาทีหรือน้อยกว่านี้ ทำให้ต้องมีการใช้ บั้มในการช่วยทำให้ความดันนั้นเพิ่มมากขึ้นถือ เป็นจุดเริ่มต้นของ (HPLC) เนื่องจากจะใช้ high pressure pump ที่ให้ pressure drop ประมาณ 300 บรรยากาศ ทำให้อัตราการไหลสูงประมาณ 0.5-5 มิลลิลิตร ต่อนาที ทำให้การแยกของผสม ด้วยเทคนิคนี้กระทำได้รวดเร็ว และยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์จะทำได้โดยการลดขนาด ของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ ซึ่งในระยะแรก ๆ ของการพัฒนาคอลัมน์โครมาโทกราฟี วัสดุที่ใช้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรจุในคอลัมน์มีขนาดของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดของอนุภาคในช่วง 3075 μm การบรรจุลงในคอลัมน์ที่แคบ ผลทำให้เกิด back pressure สูงมากกว่า classical LC column การใช้ high pressure pump จึงจำเป็นมาก การลดอนุภาคให้ต่ำกว่า 30 ไมโครเมตร ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ในการแยกสารเพิ่มมากขึ้นด้วย ประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นเป็น 10 -100 เท่า เมื่อเทียบกับ classical LC และเวลาที่ใช้ในการแยกจะสั้นลง นอกจากนี้เทคนิค HPLC ยังเป็นเทคนิคที่เกื้อกูลเทคนิค GC คือสารที่ไม่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้ หรือสารที่เกิดการสลายตัวเมื่อได้รับความร้อนที่ไม่สามารถ วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค GC ก็สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้



รูปที่ 2.14 ส่วนประกอบของ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Guinard และคณะ (2005) ทดลองหาชนิดของคาร์โบไฮเดรตในในตัวอย่าง ใบพลีอบปรา (Populus euphratica) โดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล 80% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,000×g อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่สกัดได้ไประเหยแบบลด ความดัน และเจือจางด้วยน้ำ 1 mL กรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 μm แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค high-performance anion-exchange chromatography ร่วมกับ electrospray mass spectroscopy พบ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กาแลกโตส

Saby และคณะ (2003) วิเคราะห์สารชีวโมเลกุลในตัวอย่างยางมะม่วง (Sap mango) โดยปั่นเหวี่ยงที่ 3,000×g จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วย 70% แอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงที่ 2,000×g จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและน้ำตาลอิสระด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟิวริก (Phenol-sulfuric acid) โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ในเอทานอล 80% เป็นสารมาตรฐาน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส พบปริมาณโปรตีน 2.03.5 mg/ml น้ำตาลอิสระ 0.45 mg glucose equivalent/mg กรดฟีนอลิกทั้งหมด 0.049-0.127 mg/ml และการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส 147-214 U/mg protein และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 401-561 U/mg protein

Hullar และคณะ (1966) ศึกษาชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ในน้ำยางที่มีการเติมแอมโมเนียลงไปเพื่อรักษาสภาพของน้ำยาง โดยใช้การแยกแบบโครมาโทกราฟีซึ่งใช้เฟสอยู่กับ ที่เป็นผงถ่านมะพร้าว แล้วนำสารที่แยกได้ ไปวิเคราะห์หาชนิดของคาร์โบไฮเดรต พบ 1-O-methyl-L- inositol (quebrachitol), L-inositol, myo- inositol, 1-O- -D-galactopyranosyl-D-myo- inositol (galactosinol), O - galactopyranosyl-(1-6)-O-β-D-galactopyranosyl-(1-1)-D- glyceritol (digalactosylglyceritol) และ raffinose

Lefebvre และคณะ (2002) ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้แก่ กลูโคส มอลโทส และฟรุคโทส ในระหว่างการหมักแป้งด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดหักเหแสง พบกลูโคส มอลโดส ฟรุคโตส และซูโครส ปริมาณ 1.2, 2.5 และ 1.2 g/100 g ตัวอย่าง ตามลำดับ

จารุวรรณ (2554) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย อะซิโตน คลอโรฟอร์ม และเอทานอล (95%) นั้นพบว่า เอทานอล (95%) มีประสิทธิภาพในการสกัด สีออกจากเส้นใยของราได้ดีที่สุด สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นของสีมากที่สุด ส่วนของ เส้นใยที่เหลืออยู่ กลายเป็นสีขาวขิด ในขณะที่คลอโรฟอร์มสามารถสกัดสีออกมาได้บางส่วน สารละลายที่ได้จึงมีสีไม่ เหลืองนัก และมีความเข้มข้นน้อย ส่วนอะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดในการสกัด สารละลายที่ได้มีสีเจือจางมาก และเส้นใยของราก็มีสีใกล้เคียงกับสภาพเดิมมากที่สุด

Templeton และคณะ (2012) โครงสร้าง carbohydrates ส่วนใหญ่จะอยู่ในลักษณะ น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของสาหร่าย การสกัดและการวิเคราะห์ carbohydrate ของสาหร่าย ยัง ขาดขั้นตอนการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพในการแยก monosaccharide โดยใช้เทคนิค chromatographic ทั้งนี้ระบุสถานะที่เหมาะสมของส่วนผสมสังเคราะห์ของทั้ง 13 monomer saccharides ประกอบไปด้วย 8 neutra , 1 , 2 amino sugars , 2 uronic acids และ 1 alditol (myo – inositol เป็นสารมาตรฐาน) การวิเคราะห์ 13 carbohydrate โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) แสดงให้เห็นถึงความละเอียดที่ดีขึ้นและความ ความถูกต้องของการวัดปริมาณด้วย เทคนิค anion exchange chromatography (HPAEC) รวมทั้ง เทคนิค alditol acetate ตามด้วย เทคนิค gas chromatography แสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้ การหาปริมาณ monosaccharide โดยใช้สถานะ chromatography ที่ดีขึ้นหลังจากย่อยสาหร่ายทั้ง 3 แบบ ด้วย sulfuric acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือ

1. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น JSAC-60
2. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ยี่ห้อ Astecair 3000E
3. เครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination orbital shaker)
4. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด รุ่น ML204 ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) ยี่ห้อ ThermoScientific รุ่น Heraeus-Megafuge 8R
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo- Scientific รุ่น Genesys 10S UV-VIS
7. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
8. ไมโครเวฟ (Microwave)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)

3.1.2 อุปกรณ์

1. เข็มเย็บเยื่อปลายกลม (Loop)
2. เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ
3. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)
4. ช้อนตักสารพลาสติก (Plastic Spatula)
5. ช้อนตักสารสแตนเลส (Stainless Spatula)
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
7. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
8. ปิเปตทิป (Pipette Tips)
9. ไมโครปิเปต (Micropipettes)
10. หลอดเซนติฟิวพลาสติก (Centrifuge Tube)
11. หลอดทดลอง (Test Tube)
12. หลอดไมโครเซนติฟิว (Micro Centrifuge Tube)
13. คิวเวตพลาสติก (cuvette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงสาหร่าย

1. Tris (base)
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
3. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
5. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
7. อีดีทีเอไดโซเดียมซอลท์ ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
8. ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
9. กรดบอริก (H_3BO_3) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
10. แมงกานีสคลอไรด์ ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
11. เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
12. โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
13. คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
14. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ยี่ห้อ loba chemie เกรตวิเคราะห
15. กรดแอซิกหรือกรดน้ำส้ม (Glacial acetic acid) ยี่ห้อ Duksan เกรตวิเคราะห
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
17. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)
18. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
19. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)
20. แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2)
21. ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)
22. เฟอรัสคลอไรด์ (FeCl_2)
23. คอปเปอร์คลอไรด์ (CuCl_2)

3.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
2. ฟีนอล
3. แอนโธรน
4. แอลฟาอะไมเลส
5. กรดเปอร์คลอริก (HClO_4)
6. กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิซิลิก (DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการเตรียมสารเคมี

3.3.1 สารละลายอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

1. ชั่งสารเคมีตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีในการเตรียมอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

กลุ่ม	ชื่อสารเคมี	ปริมาณ (กรัม)	ปรับปริมาณเป็น (มิลลิลิตร)
1	Tris	24.20	100
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.75	250
	NH ₄ Cl	1.00	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.50	
3	K ₂ HPO ₄	2.88	10
	KH ₂ PO ₄	1.44	
4	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.5000	10
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2200	
	H ₃ BO ₃	0.1140	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0500	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0500	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0160	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0160	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.0077	
5	CH ₃ COOH (conc.)	-	1

2. ปิเปตสารละลายในกลุ่มที่ 1. มา 10 มิลลิลิตร, กลุ่มที่ 2. มา 25 มิลลิลิตร, กลุ่มที่ 3. มา 1 มิลลิลิตร, กลุ่มที่ 4. มา 1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 5 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
3. เทสารละลายลงในขวดเก็บสารละลาย จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

3.3.2 สารละลายอาหารขาดธาตุแคลเซียม (TAP-Ca)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยเปลี่ยน CaCl₂·2H₂O เป็น NaCl 0.2 กรัม

3.3.3 สารละลายอาหารขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยเปลี่ยน K₂HPO₄ และ KH₂PO₄ เป็น Na₂HPO₄ และ NaH₂PO₄ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 สารละลายอาหารขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยเปลี่ยน NH_4Cl เป็น NaCl

3.3.5 สารละลายอาหารขาดธาตุแมกนีเซียม (TAP-Mg)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยเปลี่ยน $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็น NaSO_4

3.3.6 สารละลายอาหารขาดธาตุกำมะถัน (TAP-S)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยเปลี่ยน เปลี่ยน $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็น MgCl_2 , ZnCl_2 , FeCl_2 ตามลำดับ

3.3.7 สารละลายอาหารขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยไม่ใส่ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4

3.3.8 สารละลายอาหารขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยไม่ใส่ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

3.3.9 สารละลายอาหารขาดธาตุทองแดง (TAP-Cu)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยไม่ใส่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3.3.10 สารละลายอาหารขาดธาตุสังกะสี (TAP-Zn)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยไม่ใส่ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.3.11 สารละลายอาหารขาดธาตุเหล็ก (TAP-Fe)

1. เตรียมสารเคมีตามข้อ 3.3.1 โดยไม่ใส่ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

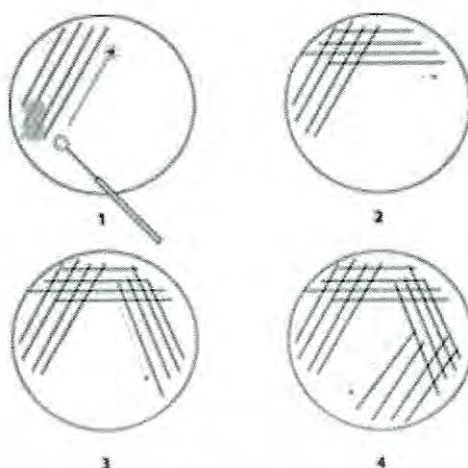
3.4.1 การแยกเชื้อสาหร่าย

1. หยดน้ำตัวอย่างที่มีสาหร่ายที่ต้องการแยกในงานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้น 1 – 2 หยด บริเวณใกล้ขอบจานเพาะเชื้อ

2. นำปลายห่วงเขี่ยเชื้อลงแปลวไฟ แล้วแตะที่หยดน้ำลากเส้นขนานออกไปสัก 3 – 4 เส้น โดยลากเส้นบนอาหารวุ้นเป็นรูปห้าเหลี่ยม เมื่อลากห่วงเขี่ยเชื้อมาสุดแต่ละมุมของรูปห้าเหลี่ยมนี้ ต้องเผาห่วงเขี่ยเชื้อซ้ำทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อและให้ใช้เซลล์ที่ปลายสุดของการลากครั้งสุดท้ายเป็นเชื้อสำหรับการลากเส้นต่อไป

3. ปิดฝาจานเพาะเชื้อ พลิกเอาก้นจานเพาะเชื้ออยู่ข้างบน รินน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป ในจานเล็กน้อย เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารวุ้นแห้ง จากนั้นนำไปวางที่มีแสงสว่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม ประมาณ 1 – 2 อาทิตย์ วิธีนี้จำนวนเซลล์สาหร่ายที่อยู่บนเส้นที่ลากจะลดน้อยลงทุกที ฉะนั้นเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายประมาณ 1 – 2 อาทิตย์ มีกลุ่มเซลล์สาหร่าย (colony) ขึ้นมา โดยจะมีช่องว่างห่างกันมาก ในบริเวณเส้นที่ลากท้าย ๆ จนสามารถเก็บเซลล์เพียงเซลล์เดียว จากจานเพาะเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

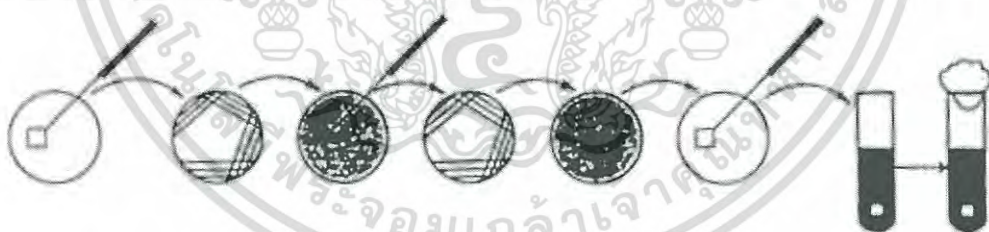


รูปที่ 3.1 ลักษณะการลากเส้นบนอาหารวุ้น (ลัดดา, 2543)

4. เชื้อเซลล์สาหร่ายเดี่ยว ๆ มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ห้วงเชื้อเชื้อเผาไฟแล้ว เชื้อ เซลล์สาหร่ายบางส่วนของโคโลนี ไปทำ wet mount

5. ถ้าเซลล์สาหร่ายที่เชื้อมาตรวจเป็นชนิดเดียวกัน (บริสุทธิ์) ให้ถ่ายเชื้อสาหร่าย (subculture) ลงในอาหารวุ้นชุดใหม่ โดยให้ทำ ข้อ 2 อีกครั้งในอาหารวุ้นจานใหม่ การถ่ายเชื้อสาหร่ายในครั้งที่ 2 นี้ จะช่วยให้ได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ขึ้น จนอยู่ในสภาพ axenic culture แต่ถ้าเชื่อไม่บริสุทธิ์ให้ทำข้อ 2 - 4 ซ้ำ อีกครั้ง หรือจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

6. ให้ถ่ายเชื้อสาหร่ายที่บริสุทธิ์ลงในหลอดแก้วที่มีอาหารวุ้นเอียง (slant) และหลอดแก้วที่มีอาหารเหลว (broth) สำหรับเก็บไว้เป็น stock culture ต่อไป



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อบนอาหารวุ้น (ลัดดา, 2543)

3.4.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มปริมาณ

1. นำหัวเชื้อสาหร่าย KS03 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยวิธี Streak plate technique โดยทำในตู้ถ่ายเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 1500 ลักซ์เป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อให้ ได้โคโลนีเดี่ยว

2. นำสาหร่ายโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนีจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุม อุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายมาปั่นเก็บเซลล์โดยเทสาหร่ายใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่ใสทิ้งจะได้สาหร่ายหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter culture)

3. เติมน้ำกลั่นที่ทำการปราศจากเชื้อแล้ว 40 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาให้สาหร่ายกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่ใสทิ้ง ทำขั้นตอนที่ 3 ซ้ำอีก 2 เพื่อทำการล้างอาหารออกจากสาหร่าย

4. นำสาหร่ายที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 ไปทำการวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร โดยปิเปตสาหร่ายมา 10 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ใส่ในคิวเวต แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า ความขุ่นของสาหร่าย (OD_{750}) เพื่อเก็บไว้ใช้งาน

3.4.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ขาดธาตุอาหาร

1. คำนวณปริมาตรของสาหร่ายที่จะใช้เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุอาหารให้มีค่าความขุ่นเริ่มต้น 0.1 ($OD_{750} = 0.1$)

2. ปิเปตสาหร่ายที่ทำการล้างอาหาร TAP ออกแล้วตามปริมาตรที่คำนวณได้จากข้อ 1 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารที่ขาดธาตุอาหาร 10 ชนิด ชนิดละ 3 ขวด มีปริมาตรอยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส และความเข้มแสงที่ 1500 ลักซ์เป็นเวลา 3 วัน

3. จากนั้นนำสาหร่ายมาปั่นเก็บเซลล์โดยเทสาหร่ายใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่ใสทิ้ง

4. เติมน้ำกลั่นที่ทำการปราศจากเชื้อแล้ว 40 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาให้สาหร่ายกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่ใสทิ้ง ทำขั้นตอนที่ 3 ซ้ำอีก 2 เพื่อทำการล้างอาหารออกจากสาหร่าย

3.4.4 การสกัดคลอโรฟิลล์

1. นำสาหร่ายใส่ลงหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร

2. เติเมทานอล 65% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

4. รอให้เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง

5. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 อีก 3 รอบ

3.4.5 การวิเคราะห์

3.4.5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric Acid

นำสารละลายสาหร่ายที่สกัดสีแล้ว 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1.9 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายแป้งเป็นกราฟมาตรฐาน

3.4.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งทั้งหมดโดยวิธี Anthrone's test

นำสารละลายสาหร่ายที่สกัดสีแล้ว 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง บันทึกลงเซลล์ดูดส่วนใสทิ้ง เติมเปอร์คลอริกความเข้มข้น 30 % 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 10 นาที ดูดสารละลายสาหร่ายมา 100 ไมโครลิตรปรับปริมาตรด้วยเปอร์คลอริกความเข้มข้น 30 % 400 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน และเติมสารละลายแอนโทรนความเข้มข้น 0.2 % 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายแป้งเป็นกราฟมาตรฐาน

3.4.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

นำสารละลายสาหร่ายที่สกัดสีแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองชนิดพิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร ใส่ glass bead นำไปต้ม 5 นาที จากนั้นนำไป vortex 1 นาที เพื่อแตกเซลล์ นำไปปั่นตกเซลล์แล้วนำส่วนใสมาใช้ 70 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเข้มข้น 0.05% แอลฟาอะไมเลส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 780 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เพื่อให้แอลฟาอะไมเลส ย่อยสลายแป้งไปเป็น glucose จากนั้นเติม 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1 มิลลิลิตร ต้ม 5 นาที เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายแป้งเป็นกราฟมาตรฐาน

3.5 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลด้วยวิธี HPLC

นำเซลล์สาหร่ายมาเติมเปอร์คลอริกความเข้มข้น 30 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ให้ได้ pH 4-5 และนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ต่อมานำส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร ส่งไปวิเคราะห์ชนิดน้ำตาล ด้วยวิธี HPLC ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5.1 สภาวะการวิเคราะห์

ตารางที่ 3.2 สภาวะในการวิเคราะห์ตัวอย่างของเครื่อง HPLC

Column	BD-800 Ca++ (24267), 300 x 7.8 mm
Detection	RI Detector
Temperature of (Column Oven)	80 °C
Temperature of (Detector)	40 °C
Eluent	DI H ₂ O
Flow rate	0.4 mL/min
Sample Size	20 µl

3.6 สถิติวิจัย

นำผลการทดลองวัดค่าการเจริญเติบโต และการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย สายพันธุ์ KSO3 ไปทดสอบค่าทางสถิติ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี one way ANOVA และใช้ค่าการเปรียบเทียบสถิติ Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 (SPSS software, New York, USA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างชุดข้อมูล ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และใช้ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

โครงการพิเศษนี้ทำการศึกษาการผลิตคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ด้วยวิธีทางเคมี พร้อมกับศึกษาชนิดของน้ำตาลที่ได้ โดยนำสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 ที่ได้จากสหรณน้ำภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารสูตร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำสาหร่ายที่ได้มาปั่นตกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และนำมาล้างน้ำกลั่น 3 รอบ เพื่อล้างอาหารออกจากสาหร่าย หลังจากนั้นนำสาหร่ายลงในอาหารในสภาวะการขาดธาตุอาหาร 10 ชนิด ได้แก่ ขาดธาตุกำมะถัน (TAP-S) ขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) ขาดธาตุทองแดง (TAP-Cu) ขาดธาตุสังกะสี (TAP-Zn) ขาดธาตุแมกนีเซียม (TAP-Mg) ขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn) ขาดธาตุเหล็ก (TAP-Fe) ขาดธาตุแคลเซียม (TAP-Ca) เป็นต้น และมีอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) เป็นชุดควบคุมในสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดจะได้ผลตามรูปที่ 4.1 นำสาหร่ายมาวัดปริมาตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) เพื่อใช้ในการคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ค่าตามตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 รูปแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย KS03 วันที่ 1 (รูปซ้าย) และวันที่ 3 (รูปขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 (ต่อ) รูปแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย KS03 วันที่ 1 (รูปซ้าย) และวันที่ 3 (รูปขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 (ต่อ) รูปแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย KS03 วันที่ 1 (รูปซ้าย) และวันที่ 3 (รูปขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

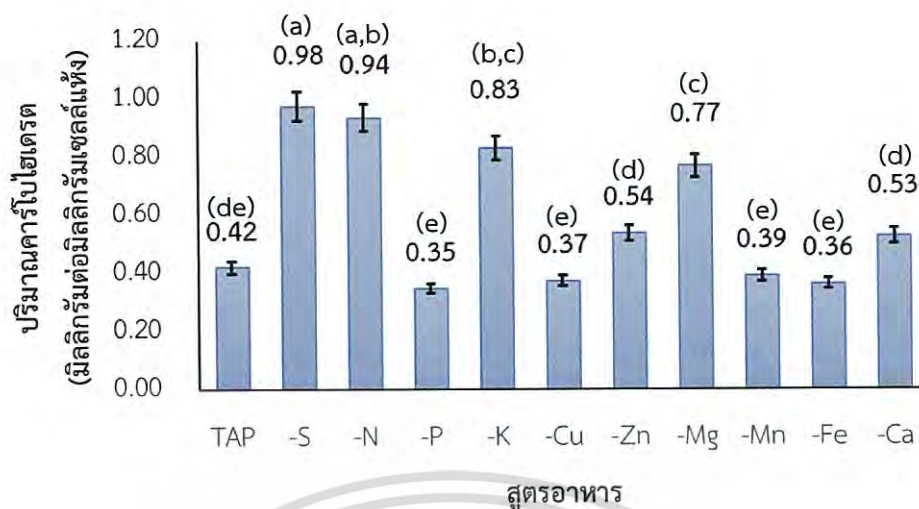
ตารางที่ 4.1 ปริมาตรค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย KS03

สูตรอาหาร	สาหร่าย KS03		
	ปริมาตรสาหร่าย (มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้งของ สาหร่าย (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)
TAP	44	1.147	22.08
(TAP-S)	45	0.720	14.13
(TAP-N)	47	0.687	13.98
(TAP-P)	46	1.160	23.17
(TAP-K)	46	0.436	8.72
(TAP-Cu)	43	1.133	20.99
(TAP-Zn)	49	1.200	25.73
(TAP-Mg)	43	0.635	11.76
(TAP-Mn)	42	1.139	20.68
(TAP-Fe)	42	1.060	19.25
(TAP-Ca)	47	1.167	23.74

จากนั้นนำสาหร่ายมาสกัดสีคลอโรฟิลล์ด้วย 65% เอทานอลจำนวน 3 รอบ เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตรเพื่อแบ่งไปทำการทดลองวิธีต่าง ๆ 4 วิธี ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ดังนี้

4.1 ผลการศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric Acid

จากการนำสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารในสภาวะขาดธาตุอาหาร 10 ชนิด มาสกัดคลอโรฟิลล์แล้วดูดสาหร่าย 100 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลอง เติมน้ำ 1.9 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย 5% ฟีนอล 1 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้แทนในสมการเส้นตรง $y=0.001x$ ที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก1.) และนำไปหารด้วยปริมาณเซลล์ จะได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดดังแสดงใน รูปที่ 4.2



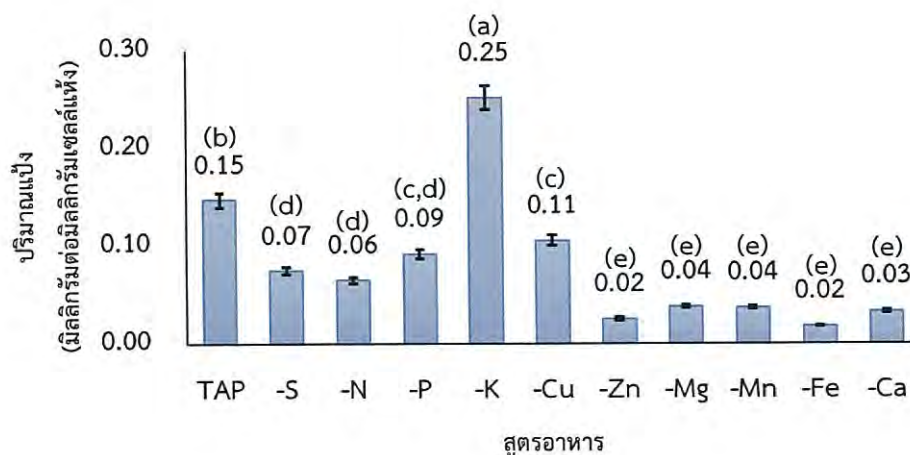
รูปที่ 4.2 แผนภูมิแสดงปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ได้จากวิธี Phenol-Sulfuric Acid

ของสาหร่าย KS03 ที่เลี้ยงในอาหารสภาวะต่าง ๆ

จากรูปที่ 4.2 สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุกำมะถันให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดสูงที่สุดคือ 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 2.3 เท่าของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ได้จากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุไนโตรเจน (TAP-N) โพแทสเซียม (TAP-K) แมกนีเซียม (TAP-Mg) สังกะสี (TAP-Zn) และแคลเซียม (TAP-Ca) ตามลำดับ โดยที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-P) ทองแดง (TAP-Cu) แมงกานีส (TAP-Mn) และเหล็ก (TAP-Fe) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดน้อยกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

4.2 ผลการศึกษาปริมาณแป้งทั้งหมดโดยวิธี Anthrone's test

จากการนำสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารในสภาวะขาดธาตุอาหาร 10 ชนิด มาสกัดคลอโรฟิลล์แล้วดูดสาหร่าย 1 มิลลิลิตร ปั่นตกเซลล์ดูดส่วนใสทิ้ง เติม 30% เพอร์คลอริก 1.5 มิลลิลิตร เขย่า 10 นาที ดูดสาหร่ายมา 100 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลอง ปรับด้วย 30% เพอร์คลอริก จนได้ 500 ไมโครลิตร เติม 0.2% แอนโธรน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร นำค่าที่ได้แทนในสมการเส้นตรง $y=0.0086x$ ที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข2.) นำไปหารด้วยปริมาณเซลล์จะได้ปริมาณแป้งทั้งหมดดังแสดงใน รูปที่ 4.3

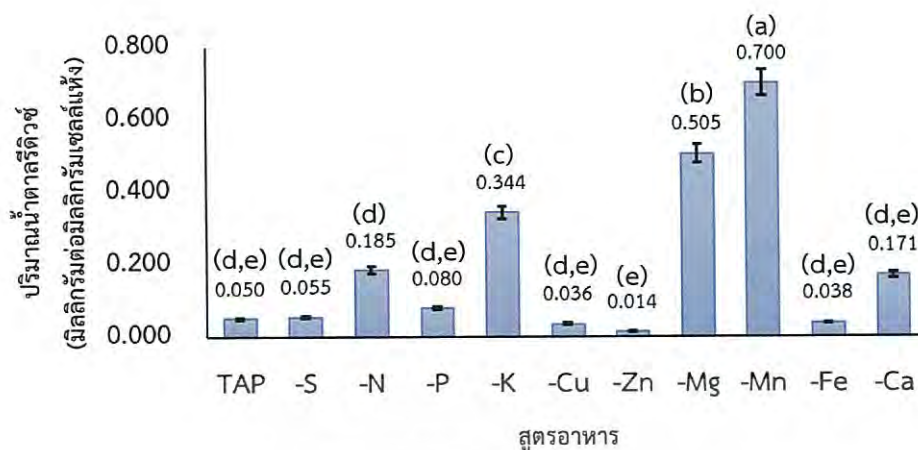


รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดงปริมาณแป้งที่ได้จากวิธี Anthrone's test ของสาหร่าย KS03 ที่เลี้ยงในอาหารสภาวะต่าง ๆ

จากรูปที่ 4.3 สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) ให้ปริมาณแป้งทั้งหมดสูงที่สุดคือ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 1.7 เท่าปริมาณแป้งทั้งหมดที่ได้จากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุทองแดง (TAP-Cu) ฟอสฟอรัส (TAP-P) กำมะถัน (TAP-S) ไนโตรเจน (TAP-N) แมกนีเซียม (TAP-Mg) แคลเซียม (TAP-Ca) แมงกานีส (TAP-Mn) สังกะสี (TAP-Zn) และเหล็ก (TAP-Fe) มีปริมาณแป้งทั้งหมดน้อยกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

4.3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS)

นำเซลล์สาหร่ายมา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ใส่ glass bead นำไปต้ม 5 นาที จากนั้น vortex 1 นาที เพื่อแตกเซลล์ นำไปปั่นตกเซลล์แล้วนำส่วนใสมาใช้ 70 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม 50 ไมโครลิตร ของ 1M อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.0 เติม 100 ไมโครลิตร ของ 0.05 % แอลฟาอะไมเลส เติมน้ำกลั่น 780 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เพื่อให้แอลฟาอะไมเลสย่อยสลายแป้งไปเป็น glucose จากนั้นเติม 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1 มิลลิลิตร ต้ม 5 นาที เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้แทนในสมการเส้นตรง $y=0.2048x$ ที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข3.) และนำไปหารด้วยปริมาณเซลล์จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังแสดงใน รูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แผนภูมิแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS) ของสาหร่าย KS03 ที่เลี้ยงในอาหารสภาวะต่าง ๆ

จากรูปที่ 4.4 สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 0.700 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 14 เท่าของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุแมกนีเซียม (TAP-Mg) โพแทสเซียม (TAP-K) ไนโตรเจน (TAP-N) แคลเซียม (TAP-Ca) ฟอสฟอรัส (TAP-P) กำมะถัน (TAP-S) โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารขาดธาตุเหล็ก (TAP-Fe) ทองแดง (TAP-Cu) และสังกะสี (TAP-Zn) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

4.4 ผลการศึกษาชนิดของน้ำตาลในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการนำสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารในสภาวะขาดธาตุอาหาร 10 ชนิด มาสกัดคลอโรฟิลล์แล้วดูดสาหร่าย 10 มิลลิลิตร บั่นตกเซลล์ ดูดส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ 30% เปอร์คลอริก 1.5 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าระหว่าง 5-6 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำไปกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ทำการวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลด้วยเทคนิคการวิเคราะห์โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ผลการทดลองพบว่าเจอน้ำตาลที่เวลา 21.807 นาที ของ (TAP-Mn) (ภาคผนวก ค1.7)ระบุได้ว่าเป็นน้ำตาล Arabinose (ภาคผนวกค1.1) แต่ที่เวลา 26.1 และ 29.1 นาที (ภาคผนวก ค1.)จะสามารถตรวจพบได้ทุกเซลล์จากทุกอาหาร กับพบว่าไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นน้ำตาลชนิดใดจึงได้เพียงนำพื้นที่ใต้กราฟมาเปรียบเทียบกันดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ตารางเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง Retention Time ที่เวลา 26.1 และ 29.1 นาที

อาหาร	พื้นที่ใต้กราฟ	
	น้ำตาลเวลาที่ 26.1 นาที	น้ำตาลเวลาที่ 29.1
TAP	196633	217
TAP-S	737909	7408
TAP-N	244059	382
TAP-P	147498	549
TAP-k	91909	334
TAP-Cu	219603	300
TAP-Zn	5374865	-
TAP-Mg	87909	2080
TAP-Mn	303745	111
TAP-Fe	201019	-
TAP-Ca	129848	2334

จากการนำพื้นที่ใต้กราฟของทุกเซลล์จากทุกอาหารมาเปรียบเทียบกับน้ำตาลที่ 26.1 นาที พบว่า (TAP-Zn) มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด เท่ากับ 5374865 รองลงมาคือ (TAP-S) มีพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ 737909 และ (TAP-Mg) มีพื้นที่ใต้กราฟน้อยที่สุด เท่ากับ 87909 ส่วนการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลที่ 29.1 นาที พบว่า (TAP-S) มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด เท่ากับ 7408 รองลงมาคือ (TAP-Ca) มีพื้นที่ใต้กราฟ เท่ากับ 2334 และ (TAP-Mn) มีพื้นที่ใต้กราฟน้อยที่สุด เท่ากับ 111

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จากการทดลองการผลิตคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 11 ชนิด ได้แก่ TAP, TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-Cu, TAP-Zn, TAP-Mg, TAP-Mn, TAP-Fe และ TAP-Ca และนำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปสกัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ด้วย 65 % เอทานอล และนำไปวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Acid พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุกำมะถัน (TAP-S) ให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเยอะที่สุดเท่ากับ 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง

2. จากการทดลองการผลิตคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 11 ชนิด ได้แก่ TAP, TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-Cu, TAP-Zn, TAP-Mg, TAP-Mn, TAP-Fe และ TAP-Ca และนำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปสกัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ด้วย 65 % เอทานอล และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งด้วยวิธี Anthrone's test พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุฟอสฟอรัส (TAP-K) ให้ปริมาณแป้งเยอะที่สุดเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง

3. จากการทดลองการผลิตคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 11 ชนิด ได้แก่ TAP, TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-Cu, TAP-Zn, TAP-Mg, TAP-Mn, TAP-Fe และ TAP-Ca และนำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปสกัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ด้วย 65 % เอทานอล และนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS) พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 ที่เลี้ยงในอาหารที่ขาดธาตุแมงกานีส (TAP-Mn) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เยอะที่สุด 0.700 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง

4. จากการจากการทดลองการผลิตคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ KS03 โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 11 ชนิด ได้แก่ TAP, TAP-S, TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-Cu, TAP-Zn, TAP-Mg, TAP-Mn, TAP-Fe และ TAP-Ca และนำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปสกัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ด้วย 65 % เอทานอล และนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิคการวิเคราะห์โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้ตรวจพบว่าเจอน้ำตาลในเวลา 21.807 นาที ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จากอาหาร (TAP-Mn) สามารถระบุได้ว่าเป็นน้ำตาลชนิด Arabinose และจากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟในเวลา 26.1 และ 29.1 นาที พบว่า (TAP-Zn) และ (TAP-S) มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและคุณค่าทางโภชนาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 เพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรตที่เป็นประโยชน์ในการใช้เป็นอาหารเสริม พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 สำหรับการทดลองนี้คือ อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) สูตรปรับปรุงที่ไม่เติมกำมะถัน หรือ (TAP-S) ซึ่งเป็นธาตุอาหารรองที่สาหร่ายต้องการในปริมาณน้อยจึงไม่ส่งผลต่อการสร้างคาร์โบไฮเดรต ทำให้ได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการวิเคราะห์มากกว่า ชุดการทดลองอื่น ๆ เท่ากับ 0.98 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมเซลล์แห้ง มีปริมาณแป้งเท่ากับ 0.07 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเท่ากับ 0.014 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมเซลล์แห้ง ส่วนในการวิเคราะห์ปริมาณแป้งพบว่าสูตรอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) สูตรปรับปรุงที่ไม่เติมอาหาร TAP-K ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักและจำเป็นต่อการสร้างแป้ง ส่งผลให้สาหร่ายสร้างแป้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และเก็บสะสมปริมาณแป้งมากที่สุดเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมเซลล์แห้งซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 0.83 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเท่ากับ 0.0086 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมเซลล์แห้ง สาหร่ายสายพันธุ์ KS03 ที่เลี้ยงในอาหาร TAP-S และ TAP-K มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการผลิตอาหารเสริมคาร์โบไฮเดรตเพราะให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและปริมาณแป้งมาก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากปัญหาที่พบในการวิจัยคือการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอันเนื่องมาจากการฉีกขาดของถุงที่ใส่อุปกรณ์หลังจากนำไปฆ่าเชื้อแล้ว และอาหารในการเลี้ยงเพิ่มจำนวนสาหร่ายที่เก็บไว้นานจึงทำให้เกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ง่าย ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรมีการตรวจเช็คอุปกรณ์ว่ามีพร้อมใช้งานอยู่เสมอ ส่วนอาหารเลี้ยงเพิ่มจำนวนสาหร่ายควรปิดฝาอย่างมิดชิดและควรเก็บไว้ไม่นานจนเกินไป

2. จากการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNS) ที่ผลการวิเคราะห์ได้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่น้อย เนื่องมาจากปริมาณตัวอย่างของสาหร่ายที่น้อย ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างของสาหร่าย หรือเปลี่ยนไปใช้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยวิธีของ Lane และ Eynon เพื่อความแม่นยำของผลการวิเคราะห์

3. จากการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิคการวิเคราะห์โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ไม่สามารถตรวจพบชนิดของน้ำตาลได้ทุกเซลล์จากทุกอาหาร และพืชที่ปรากฏไม่สามารถหาน้ำตาลมาตรฐานมาอ้างอิงได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างของเซลล์จากทุกอาหารในการวิเคราะห์ และเพิ่มชนิดน้ำตาลมาตรฐานที่มาจากพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่1 การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงสาหร่าย.

[Online].Available: <http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/TUJl3IXThu25949.pdf>

ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่2 เทคนิคการคัดแยกเชื้อสาหร่ายและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์. [Online]. Available:<http://www.fishtech.mju.ac.th/fishnew1/OSS/files/B0XCL6LThu25957.pdf>

ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่3 การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่าย. [Online].Available: <http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/TmBcVklThu30003.pdf>

ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก. [Online].Available:<http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/LkJ6JYXThu30027.pdf>

นุชนาถ แซ่มซอย. 2557. “สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์.” วารสารมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ วิชาการ. 17(34): หน้า 169-183

ประหยัด โกมารทัต. 2543. ชีวเคมี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

ภาสกร สกุลศิลปกร. 2549. สาหร่ายสีเขียว. [Online]. Available: <http://knowledge.eduzones.com/knowledge-2-5-28773.html>

ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วัชรภรณ์ เสมาชัย, วิภารัตน์ ชูทอง และ อติสรณ์ รักษาศิริ. 2559. การคัดแยกสาหร่ายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2549. วิทยาสาหร่าย (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์

สุภาพร แสงศรีจันทร์. 2557. UV-Visible Spectroscopy (UV-Vis).[Online]. Available: http://www.science.mju.ac.th/chemistry/download/s_sangsrichan/05UV-Visible%20Spectroscopy-UV-Vis-292557.pdf

สุมาลี ดุลยอนุกิจ. 2535. แร่ธาตุอาหารของสาหร่าย [Online]. Available <https://web.ku.ac.th/nk40/nk/data/11/fact4.htm>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ammar A. Albalasmeh, Asmeret Asefaw Berthe And Teamrat A. Ghezzehei. 2013. “ A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry” *Carbohydrate Polymer* 97 (2013) : 253-261.
- Fernandes, B. Dragone, G. Abreu, P. Ana Geada, P. Teixeira J. and Vicente A. 2011. “ Starch determination in *Chlorella vulgaris* a comparison between acid and enzymatic methods” *J ApplyPhycol* (2012) : 24 : 1203-1208.
- Scott, N. and B. Greenberg 1995. **Measurement of Photosynthetic Activity in Plant Cell Fractions.**Page 71-80, in *Tested studies for laboratory teaching*, Volume 16 (C.A.Goldman, Editor). *Proceedings of the 16th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, 273 pages.
- S.S. Nielsen, “*Food Analysis Laboratory Manual.*” *food Science Texts Series*, (2010) , 47-53.
- Zhe Qu, Zhao Li, Xiuming Zhang and Xiao-Hua Zhang. 2012. “ *Salinicoccus qingdaonensis* sp. nov., isolated from coastal seawater during a bloom of green algae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 62, 545-549



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ก1. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ก1.1 การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด โดยวิธี Phenol-sulfuric acid

วัตถุประสงค์ เพื่อหาคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอล 5%: ชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)
3. สารละลายแป้ง: ชั่งแป้ง 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

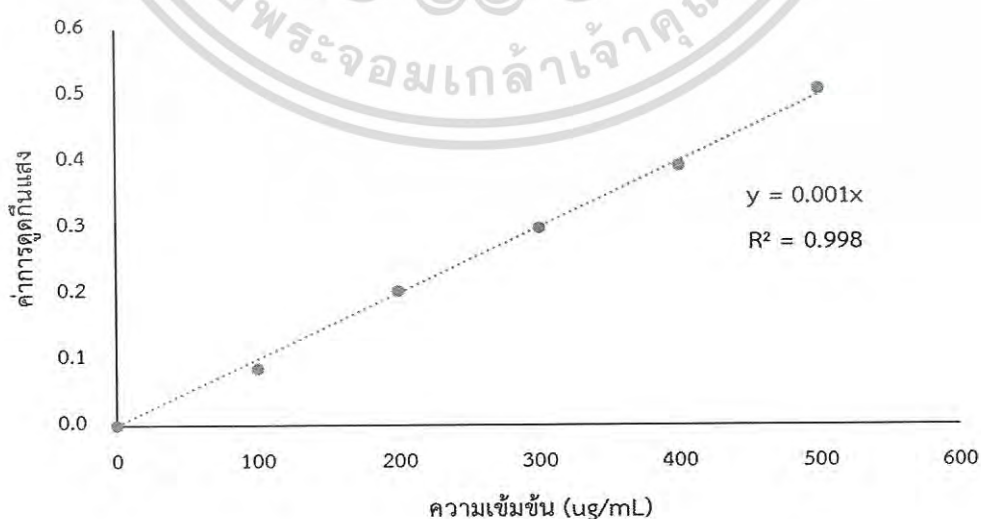
1. ดูดสารละลายตามตาราง

ตารางที่ ก1.1 สารละลายมาตรฐานวิธี Phenol-sulfuric acid

หลอด	1	2	3	4	5	6
น้ำแป้ง (μl)	0	200	400	600	800	1000
น้ำกลั่น (ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1
Phenol-sulfuric acid (ml)	1	1	1	1	1	1
sulfuric acid (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

2. นำไปต้ม 10 นาที

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายแป้งเป็นกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก1.1 กราฟมาตรฐานวิธี Phenol-sulfuric acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก1.2 การวิเคราะห์หาแบ่งทั้งหมด โดยวิธี Anthrone's test

วัตถุประสงค์ เพื่อหาแบ่งทั้งหมด

สารเคมี

1. แอนโทรน 0.2%: ชั่งแอนโทรน 0.2 กรัม ปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนละลาย
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)
3. สารละลายแบ่ง: ชั่งแบ่ง 20 มิลลิกรัม ละลายใน 30% เปอร์คลอริก 100 มิลลิกรัม เขย่าจนใส

วิธีการ

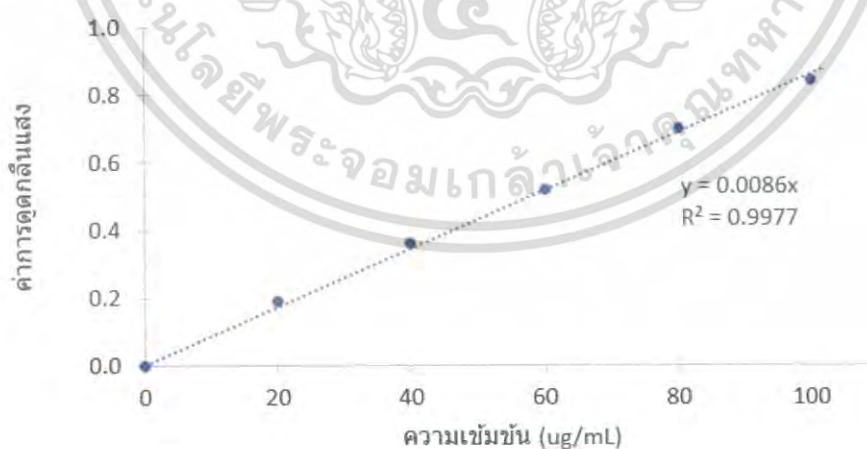
1. ดูดสารละลายตามตาราง

ตารางที่ ก1.2 สารละลายมาตรฐานวิธี Anthrone's test

หลอด	1	2	3	4	5	6
น้ำแบ่ง (μl)	0	50	100	150	200	250
Perchloric Acid (μl)	500	450	400	350	300	0
Anthrone (ml)	2	2	2	2	2	2

2. นำไปต้ม 10 นาที

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายแบ่งเป็นกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก1.2 กราฟมาตรฐานวิธี Anthrone's test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก1.3 การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วัตถุประสงค์ เพื่อหาน้ำตาลรีดิวซ์

สารเคมี

1. แอลฟาอะไมเลส 0.05 % : ชั่งแอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. 1 M อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.0 : นำอะซิติกปริมาตร 5.73 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 4 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS)
4. สารละลายแป้ง : ชั่งแป้ง 300 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 5 นาที

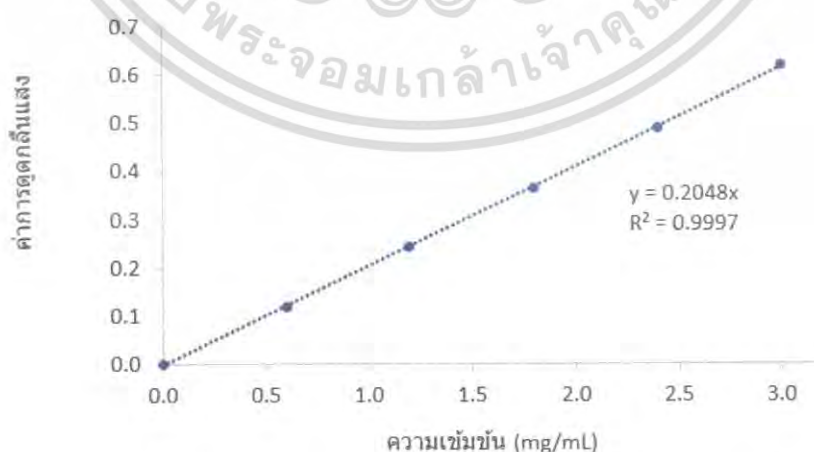
วิธีการ

1. ดูดสารละลายตามตาราง

ตารางที่ ก1.3 สารละลายมาตรฐานวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

หลอด	1	2	3	4	5	6
น้ำแป้ง (μl)	0	100	200	300	400	500
Acetic buffer (μl)	20	20	20	20	20	20
α- amylase (μl)	80	80	80	80	80	80
น้ำกลั่น (μl)	900	800	700	600	500	400

2. เขย่าผสม และ บ่มอุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. เติม DNS 1 มิลลิตร ทุกหลอด ต้ม 5 นาที เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิตร
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



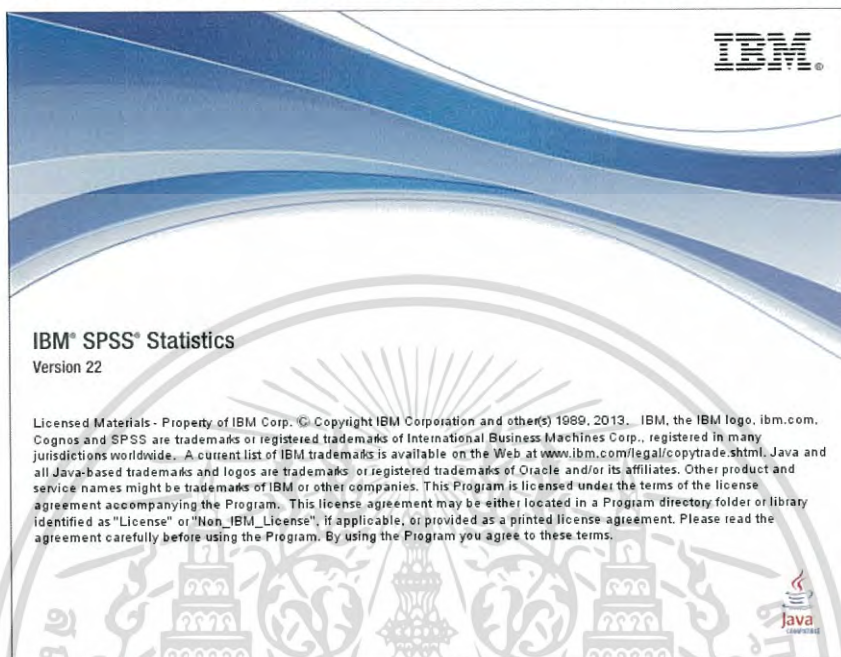
รูปที่ ก1.3 กราฟมาตรฐานวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข1. โปรแกรมคำนวณสถิติ

โปรแกรมที่ใช้ คือ IBM SPSS Statistics version 22 (SPSS software, New York, USA)



รูปที่ ข1 โปรแกรม IBM SPSS Statistics version 22 (SPSS software, New York, USA)

ข1.1 วิธีการใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan

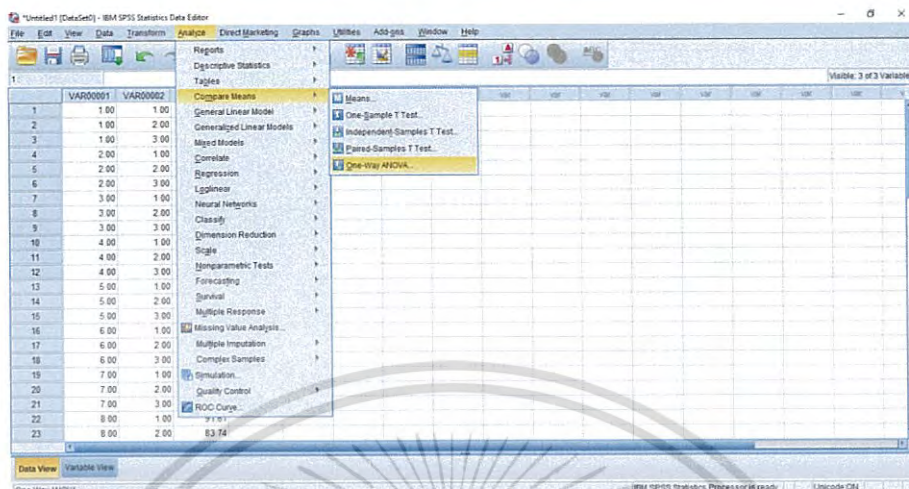
ขั้นตอนที่ 1 : ใส่ข้อมูลในตาราง

	Type	Rep	Starch	
1	1	1	41.07	
2	1	2	47.68	
3	1	3	41.72	
4	2	1	159.85	
5	2	2	287.44	
6	2	3	184.20	
7	3	1	139.68	
8	3	2	120.39	
9	3	3	137.83	
10	4	1	34.61	
11	4	2	32.33	
12	4	3	37.79	
13	5	1	86.68	
14	5	2	90.85	
15	5	3	99.68	
16	6	1	37.42	
17	6	2	39.29	
18	6	3	35.78	
19	7	1	64.61	
20	7	2	62.28	
21	7	3	34.74	
22	8	1	91.61	
23	8	2	83.74	

รูปที่ ข1.1 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan

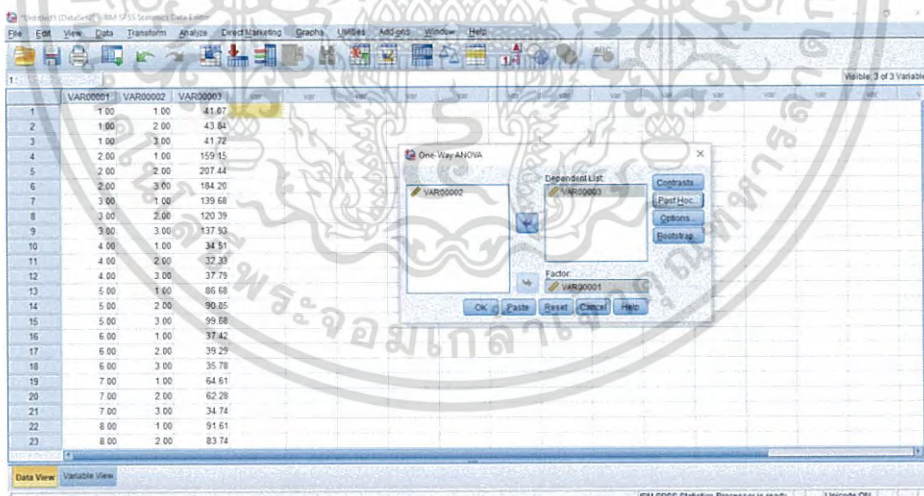
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 : เมื่อใส่ข้อมูลตัวเลขเรียบร้อยแล้ว เลือก Analyze > Compare Means > One-Way ANOVA..



รูปที่ ข1.2 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan

ขั้นตอนที่ 3 : ใส่ช่องเลขคี่ใน Factor และใส่ช่องเลขคู่ใน Dependent List แล้วเลือก Post Hoc..

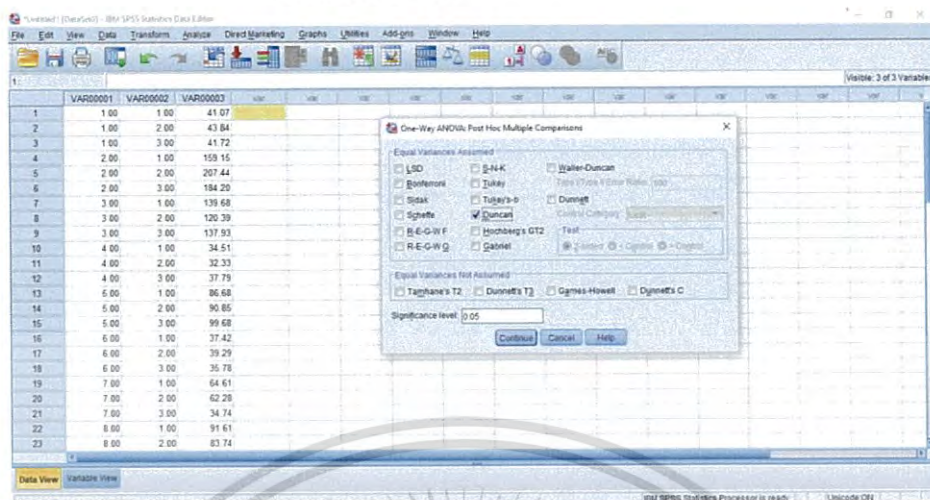


รูปที่ ข1.3 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 4 : เลือก Duncan และ ใส่ Significance level = 0.05 >

Continue > OK



รูปที่ ข1.4 ขั้นตอนการคำนวณใช้โปรแกรมคำนวณ Duncan

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	699.99814	10	69.99981	72.081	.000
Within Groups	2134.697	22	97.032		
Total	7207.711	32			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

VAR00003

Duncan^a

Subset for alpha = 0.05

VAR00001	N	1	2	3	4	5
4.00	3	74.8780				
10.00	3	36.3216	38.3216			
6.00	3	37.4833	37.4833			
9.00	3	39.8655	39.8655			
1.00	3	42.2671	42.2671			
11.00	3	52.7166	52.7166			
7.00	3	53.8751				
8.00	3		87.9595			
5.00	3		92.4040			
3.00	3			132.6655		
2.00	3				183.5540	
Sig.		.051	.065	.586	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

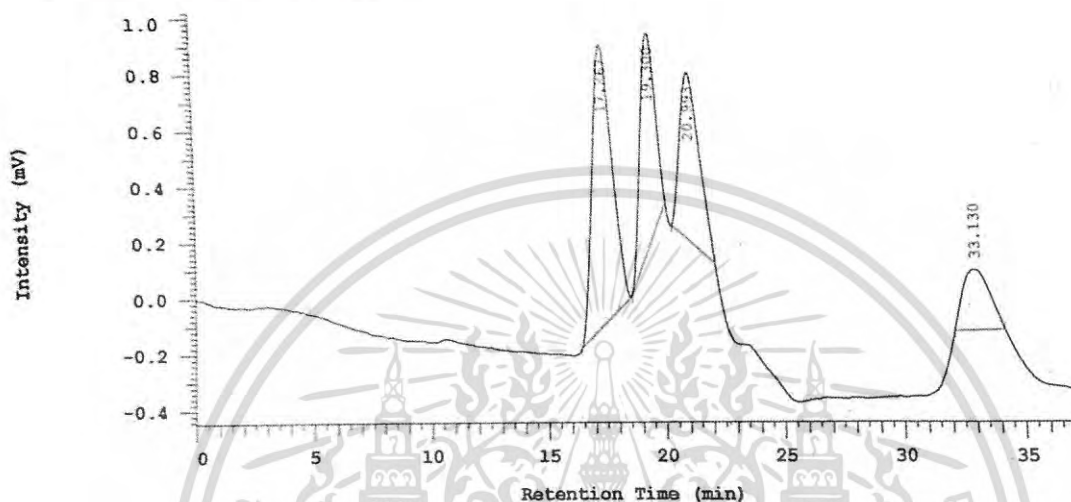
รูปที่ ข1.5 ผลที่ได้จากใช้โปรแกรมคำนวณ Duncan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ค1 ผลการศึกษาหาชนิดของน้ำตาลจากทุกเซลล์ของทุกอาหารด้วยเทคนิค
High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสาหร่าย KSO3

ค1.1 ผลของน้ำตาลมาตรฐาน



รูปที่ ค1.1 โครมาโทแกรมของน้ำตาลมาตรฐาน

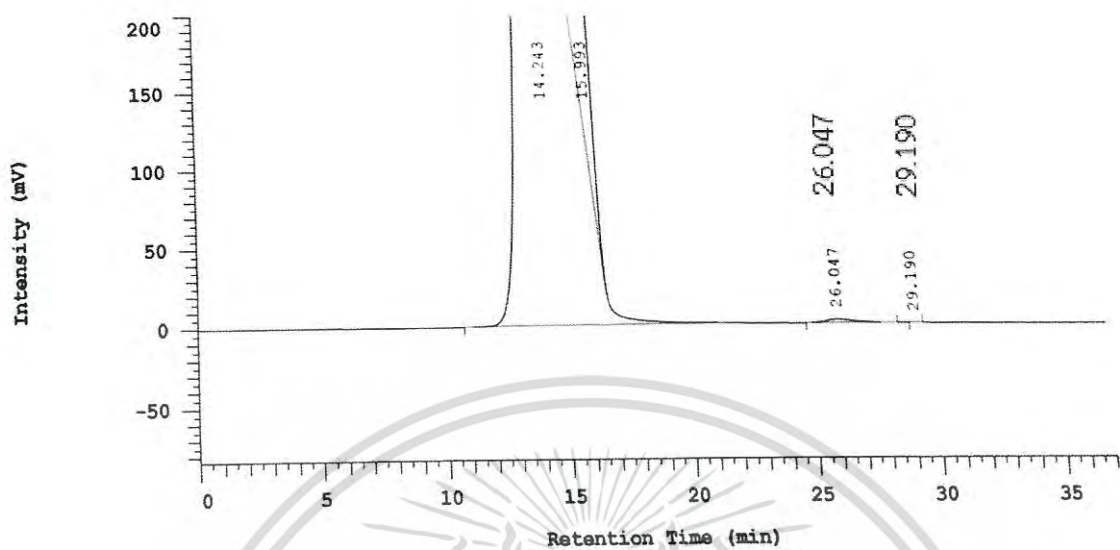
ตารางที่ ค1.1 ชนิดน้ำตาลมาตรฐาน

ลำดับ	ชนิดน้ำตาล	RT (min)	Area
1	Maltose	15.403	410,679
2	Sucrose	15.273	221,360
		17.697	79,323
		21.543	61,996
3	Glucose	17.780	430,321
4	Mannose	19.927	410,859
5	Galactose	19.477	415,411
6	Fructose	21.700	403,922
7	Xylose	19.300	401,062
8	Arabinose	21.823	398,968
9	Lactose	15.727	416,262
10	Ribose	34.100	290,374

ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค1.2 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP)



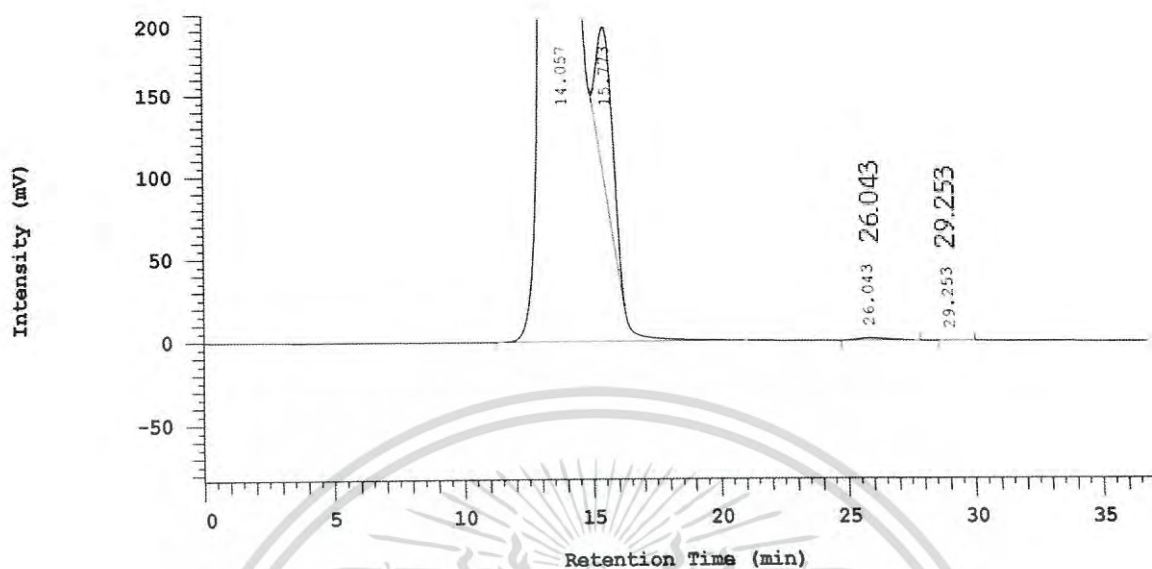
รูปที่ ค1.2 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP)

ตารางที่ ค1.2 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP)

No.	RT	Area
1	14.243	1.341E+08
2	15.993	5688578
3	26.047	196633
4	29.190	217

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค1.3 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Ca)



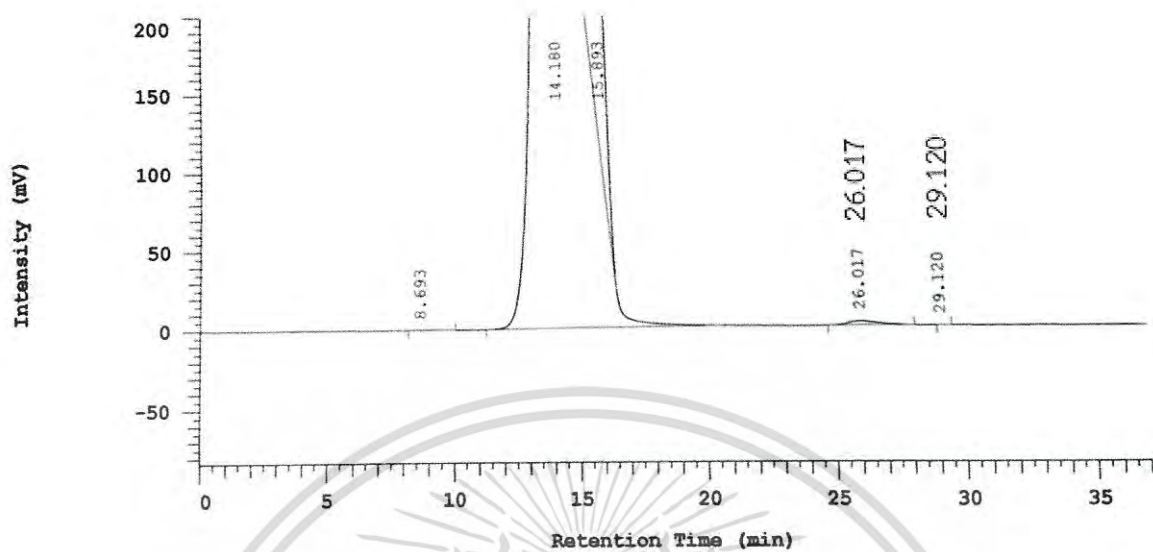
รูปที่ ค1.3 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Ca)

ตารางที่ ค1.3 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Ca)

No.	RT	Area
1	14.057	88197160
2	15.773	4142716
3	26.043	129848
4	29.253	2334

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค1.4 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO₃ ในอาหาร (TAP-Cu)

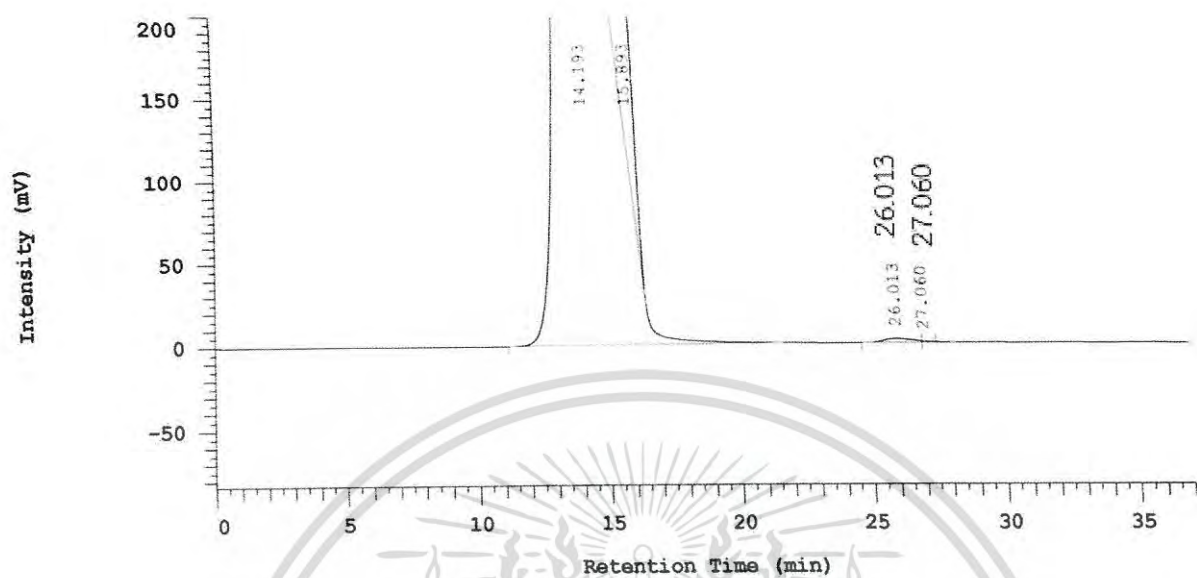


รูปที่ ค1.4 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Cu)

ตารางที่ ค1.4 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO₃ ในอาหาร (TAP-Cu)

No.	RT	Area
1	8.693	1071
2	14.180	1.197E+08
3	15.893	5162638
4	26.017	219603
5	29.120	300

ค1.5 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สำหรับ KSO₃ ในอาหาร (TAP -Fe)



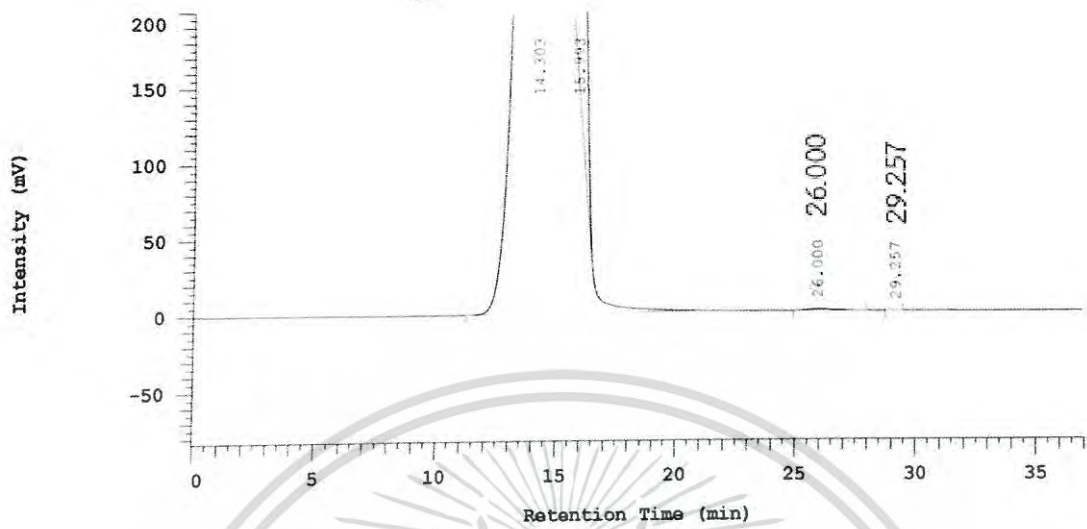
รูปที่ ค1.5 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Fe)

ตารางที่ ค1.5 Retention Time และ Area ของเซลล์สำหรับ KSO₃ ในอาหาร (TAP-Fe)

No.	RT	Area
1	14.193	1.244E+08
2	15.893	5257597
3	26.013	201019
4	27.060	1554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค1.6 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-K)



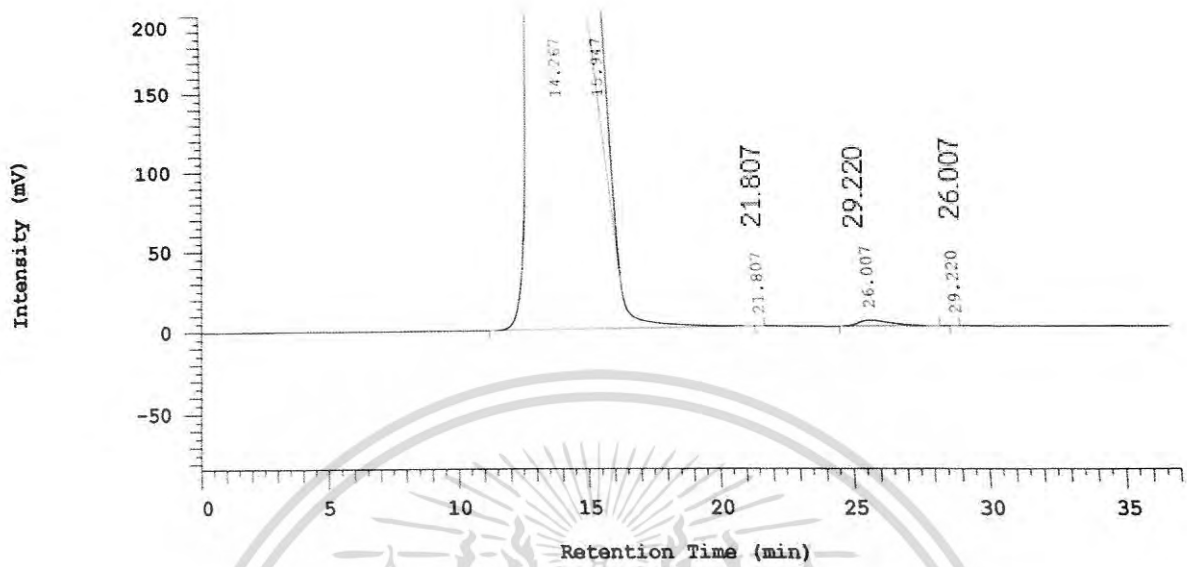
รูปที่ ค1.6 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-K)

ตารางที่ ค1.6 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-K)

No.	RT	Area
1	14.303	1.550E+08
2	15.993	6071654
3	26.000	91909
4	29.257	334

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค1.7 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO₃ ในอาหาร (TAP-Mn)

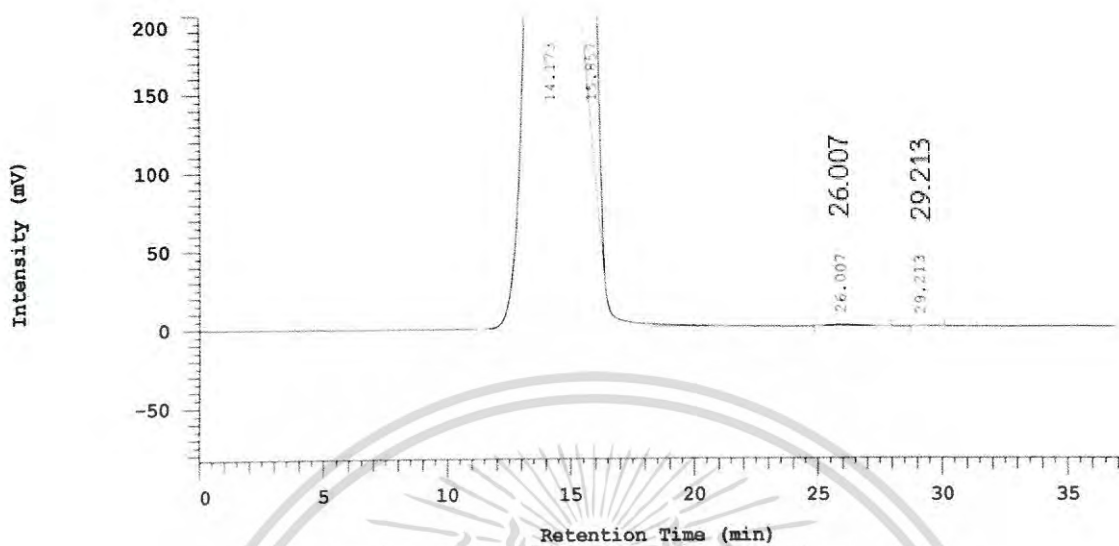


รูปที่ ค1.7 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Mn)

ตารางที่ ค1.7 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO₃ ในอาหาร (TAP-Mn)

No.	RT	Area
1	14.267	1.464E+08
2	15.947	5808978
3	21.807	213
4	26.007	303745
5	29.220	111

ค1.8 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Mg)



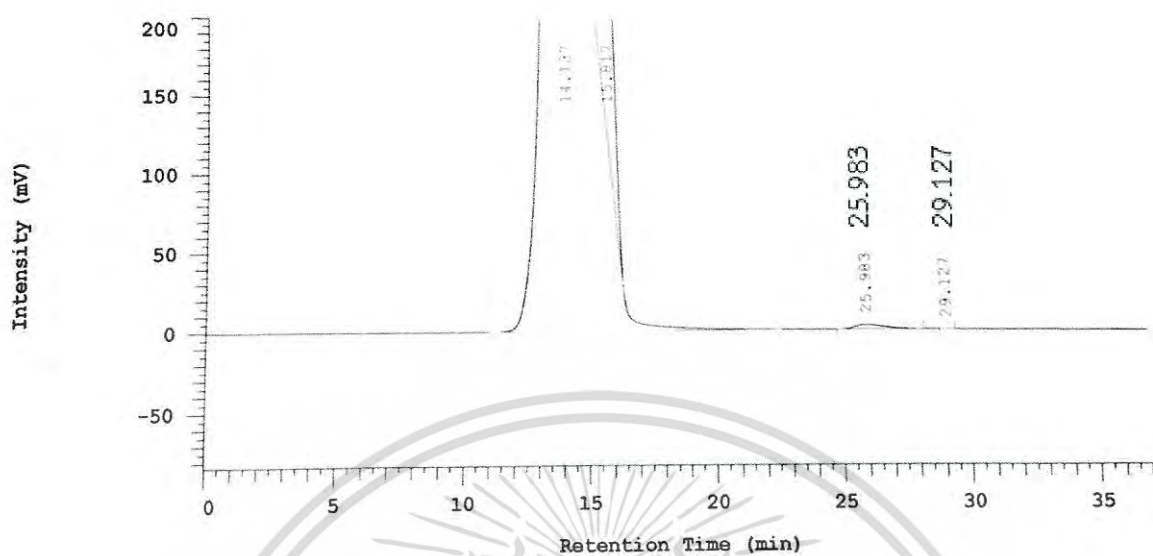
รูปที่ ค1.8 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP -Mg)

ตารางที่ ค1.8 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Mg)

No.	RT	Area
1	14.173	1.262E+08
2	15.857	5312856
3	26.007	87909
4	29.213	2080

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค1.9 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-N)



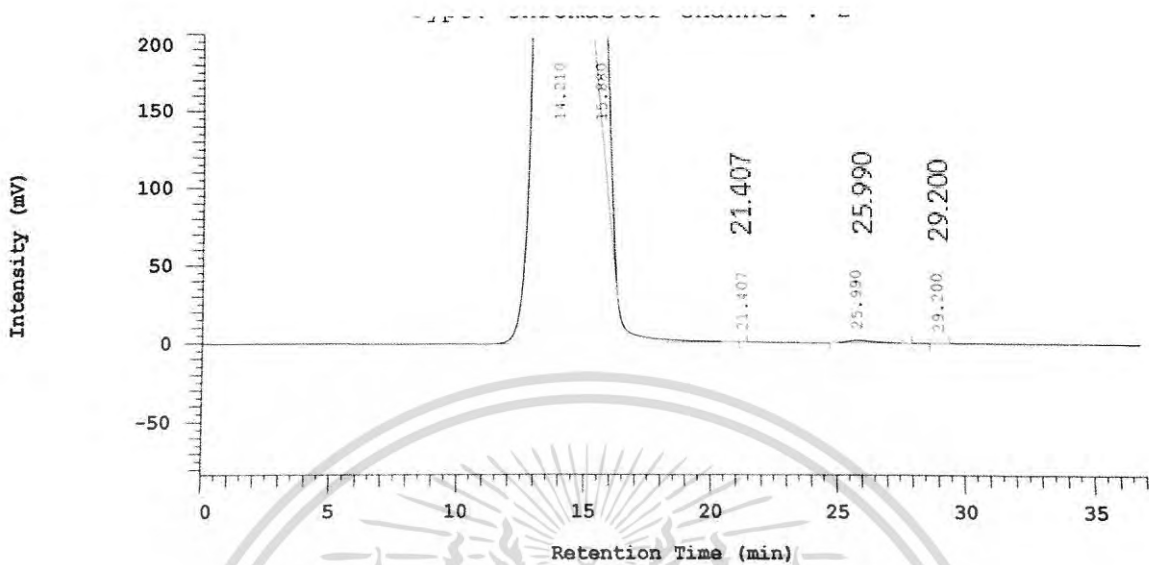
รูปที่ ค1.9 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-N)

ตารางที่ ค1.9 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-N)

No.	RT	Area
1	14.137	1.194E+08
2	15.817	5215103
3	25.983	244059
4	29.127	382

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค1.10 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สำหรับ KSO3 ในอาหาร (TAP-P)

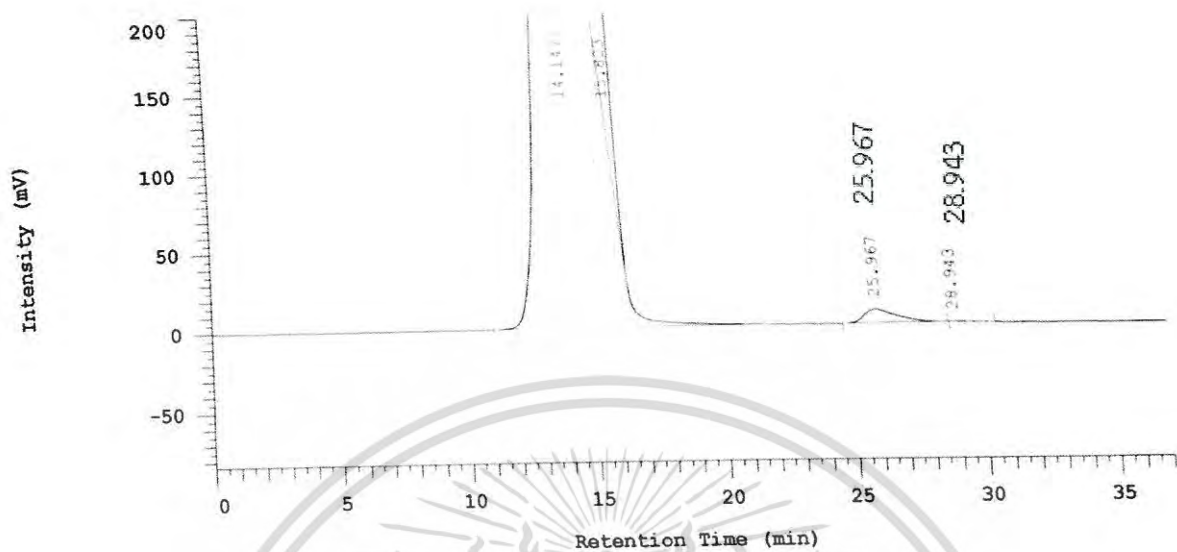


รูปที่ ค1.10 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-P)

ตารางที่ ค1.10 Retention Time และ Area ของเซลล์สำหรับ KSO3 ในอาหาร (TAP-P)

No.	RT	Area
1	14.210	1.396E+08
2	15.880	5666392
3	21.407	178
4	25.990	147498
5	29.200	549

ค1.11 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สำหรับ KSO3 ในอาหาร (TAP-S)

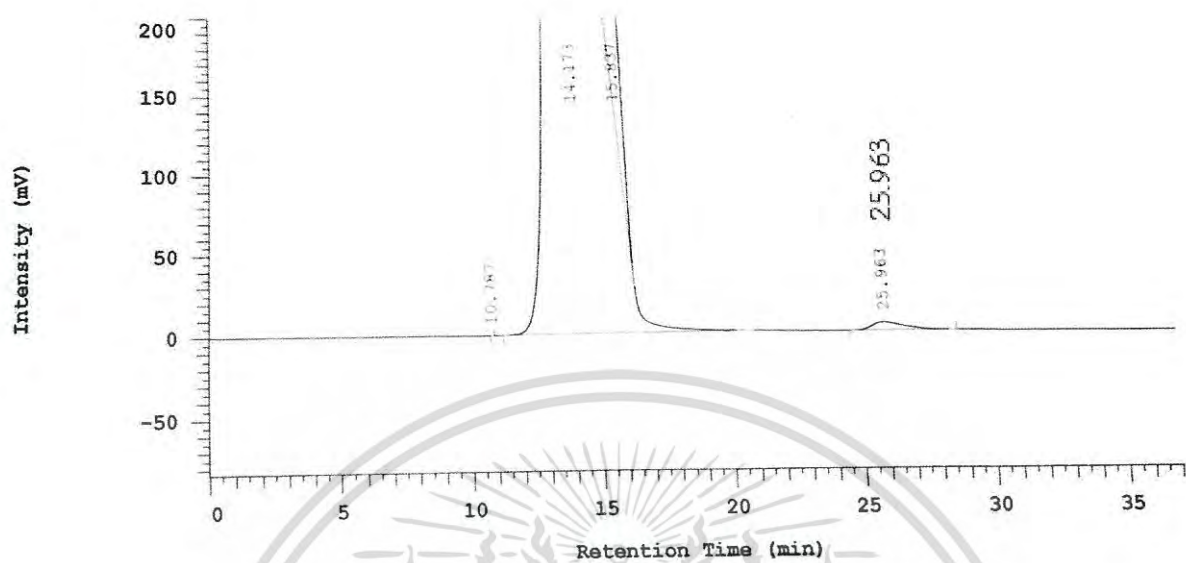


รูปที่ ค1.11 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-S)

ตารางที่ ค1.11 Retention Time และ Area ของเซลล์สำหรับ KSO3 ในอาหาร (TAP-S)

No.	RT	Area
1	14.147	1.306E+08
2	15.823	5169960
3	25.967	737909
4	28.943	7408

ค1.12 ผลของการศึกษาหาชนิดน้ำตาลของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Zn)



รูปที่ ค1.12 โครมาโทแกรมของอาหาร (TAP-Zn)

ตารางที่ ค1.12 Retention Time และ Area ของเซลล์สาหร่าย KSO3 ในอาหาร (TAP-Zn)

No.	RT	Area
1	10.787	52
2	14.173	1.372E+08
3	15.837	5374865
4	25.963	426208