

การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมลิพิดในปริมาณสูง  
SCREENING OF HIGH LIPID ACCUMULATING GREEN ALGAE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมลิพิดในปริมาณสูง  
SCREENING OF HIGH LIPID ACCUMULATING GREEN ALGAE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# SCREENING OF HIGH LIPID ACCUMULATING GREEN ALGAE



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมลิพิดในปริมาณสูง
ชื่อนักศึกษา	นายรชานนท์ มั่นกิจ รหัสนักศึกษา 55051373
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พุกษ์

### บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีการสะสมลิพิดในปริมาณสูง โดยใช้สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจำนวน 20 สายพันธุ์ มาใช้ในการศึกษา โดยสาหร่ายทั้ง 20 สายพันธุ์ จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Tris-acetate phosphate (TAP) และถูกสกัดลิพิดทั้งหมด โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากขั้นตอนการสกัดลิพิดขั้นตอนเดียว (Single-step procedure) พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 มีการสะสมลิพิดสูงสุด การขาดแคลนไนโตรเจนนำไปสู่การสะสมลิพิดที่สูงขึ้นในสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 โดยพบว่ามีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงถึง  $25.17 \pm 0.81$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน นอกจากนี้การเพิ่มเกลือโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีการสะสมลิพิดสูงขึ้น โดย *C. reinhardtii* CC-125 สะสมลิพิดสูงถึง  $33.09 \pm 2.72$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไว้ในอาหาร TAP ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และเมื่อทำการศึกษาผลร่วมกันของการขาดแคลนไนโตรเจนและความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าไม่ส่งเสริมให้ให้สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีการสะสมลิพิดเพิ่มมากขึ้น

**คำสำคัญ :** ลิพิด, สาหร่ายสีเขียว, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125

Title	Screening of high lipid accumulating green algae
Student	Mr. Rachanon Mankit Student ID 55051373
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year	2015
Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

### Abstract

In this study, screening of high lipid accumulating green microalgae was investigated from 20 unicellular green microalgal isolates. All green microalgae were cultivated in Tris-acetate phosphate (TAP) medium and their lipid was extracted by a modified single-step procedure. It was found that among green microalgae isolates, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 showed the highest total lipid content. Nitrogen starvation led to an increase of lipid accumulation by *C. reinhardtii* CC-125. The total lipid content was highest with  $25.17 \pm 0.81$  % by dry weight under nitrogen starvation. In addition, an increase of NaCl concentration resulted in a higher total lipid content. *C. reinhardtii* CC-125 accumulated a total lipid content with  $33.09 \pm 2.72$  % by dry weight when cells grown in TAP medium containing 100 mM NaCl. The total lipid accumulation of *C. reinhardtii* CC-125 was not promoted by nitrogen starvation in cooperation with NaCl stress.

**Keywords :** Lipids, Green algae, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกข์ ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้ตลอดมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการสอบโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกข์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขโครงการพิเศษนี้ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์สารเคมี และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวอมรรัตน์ พ่วงพลับ และนางสาวยุวดี คำแหง รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือให้การทำโครงการพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ นางสุนทร บารมี นางดุขฎิ มั่นกิจ และนางเอื้อใจ วงศ์สิน รวมทั้งครอบครัวบารมีทุกท่านของข้าพเจ้า ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ความรัก ความเข้าใจ และสนับสนุนส่งเสริมด้านการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้าโดยตลอดมา

รชานนท์ มั่นกิจ

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับลิพิด.....	4
2.2 จุลินทรีย์ที่สะสมลิพิดในปริมาณสูง.....	10
2.3 สาหร่ายสีเขียว.....	14
2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ในสาหร่ายสีเขียว.....	17
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่าย.....	19
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>24</b>
3.1 สาหร่ายสีเขียวใช้ในการทดลอง.....	24
3.2 สารเคมี.....	25
3.3 อุปกรณ์.....	26
3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	27
3.5 วิธีการวัดปริมาณไขมัน.....	27
3.6 วิธีการศึกษาผลของการขาดไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิด.....	28

3.7	วิธีการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมลิพิด.....	28
3.8	วิธีการศึกษาผลของการขาดไนโตรเจนและสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ต่อการสะสมลิพิด.....	28
3.9	วิธีการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน.....	29
<b>บทที่ 4</b>	<b>ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....</b>	<b>30</b>
4.1	การคัดเลือกสายสำหรับยีสี่เขี้ยวที่มีศักยภาพสูงในการสะสมลิพิด .....	30
4.2	ผลของการขาดไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิด .....	34
4.3	ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมลิพิด .....	37
4.4	ผลของการขาดไนโตรเจนร่วมกับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการ สะสมลิพิด .....	39
4.5	การศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน.....	41
<b>บทที่ 5</b>	<b>สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>44</b>
	เอกสารอ้างอิง.....	45
	ภาคผนวก.....	50
	ภาคผนวก ก.....	51
	ภาคผนวก ข.....	52
	ภาคผนวก ค.....	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณลิวตินที่สะสมในจุลินทรีย์.....	11
2.2 ปริมาณผลผลิตน้ำมันของสาหร่ายเทียบกับพืชน้ำมันบางชนิดที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล.....	13
2.3 การจำกัดสารอาหารที่มีผลต่อการสะสมลิวตินในสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด .....	20
2.4 การเปลี่ยนแปลงของลิวตินและกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ..	21
4.1 ปริมาณไขมันทั้งหมดในสาหร่ายสีเขียว 20 สายพันธุ์.....	32
4.2 ปริมาณไขมันทั้งหมดใน <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125 ที่สภาวะต่างๆ .....	35
4.3 ปริมาณไขมันทั้งหมดใน <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ระดับความเข้มข้นต่างๆ .....	38
4.4 ปริมาณไขมันทั้งหมดใน <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	40
4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> CC-125 .....	42
4.6 แสดงปริมาณกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) ของสาหร่าย <i>C. reinhardtii</i> CC-125 .....	43

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ .....	5
2.2 โครงสร้างของฟอสโฟกลีเซอไรด์ .....	5
2.3 โครงสร้างของไกลโคลิพิด .....	6
2.4 โครงสร้างของสฟิงโกลิพิด .....	6
2.5 โครงสร้างของกรดพาลมิติก .....	8
2.6 โครงสร้างของกรดโอเลอิก .....	8
2.7 โครงสร้างของกรดลิโนเลอิก .....	9
2.8 โครงสร้างของคลอโรพลาสต์ .....	15
2.9 ลักษณะและการทำงานของอายุสปอต .....	16
2.10 ปฏิกริยาการสังเคราะห์มาโลนิล โคเอ จากอะซีทิล โคเอ .....	17
2.11 การสังเคราะห์กรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ใน Eukaryotic algae.....	18
4.1 ปริมาณไขมันทั้งหมดในสาหร่ายสีเขียว 20 สายพันธุ์.....	31
4.2 ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Tris-acetate phosphate (TAP).....	33
4.3 ปริมาณไขมันทั้งหมดของ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการขาดหรือจำกัดแหล่งไนโตรเจน .....	34
4.4 ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP อาหาร TAP limit N และอาหาร TAP – N .....	36
4.5 ปริมาณไขมันทั้งหมดของ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ.....	37
4.6 ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์ และ 100 มิลลิโมลาร์.....	39
4.7 ปริมาณไขมันทั้งหมดของ <i>C. reinhardtii</i> CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ.....	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบัน เชื้อเพลิงและแหล่งพลังงานส่วนใหญ่ได้มาจากทรัพยากรธรรมชาติ ได้แก่ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ และ ปิโตรเลียม ฯลฯ ซึ่งทรัพยากรธรรมชาติเหล่านี้มีปริมาณอยู่อย่างจำกัด มีความผันแปรของราคาสูง และการเผาไหม้ของแหล่งพลังงานทางธรรมชาติเหล่านี้ ยังทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) อย่างไรก็ตาม ปัญหาการเพิ่มขึ้นของประชากรและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ ส่งผลให้มีความต้องการในการใช้แหล่งพลังงานเพิ่มมากขึ้น ทำให้ในปัจจุบันแหล่งพลังงานทางเลือกจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก พลังงานทางเลือกมีหลากหลายรูปแบบ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ นิวเคลียร์ ไฮโดรเจน ลม และ เชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น พลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจคือเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) โดยเฉพาะไบโอดีเซล (Biodiesel) ที่เป็นแหล่งพลังงานชนิดหนึ่งในรูปของเหลว ที่สามารถช่วยแก้ปัญหาภาวะโลกร้อนจากปรากฏการณ์เรือนกระจก และปัญหาหาค่าของปิโตรเลียมที่ผันผวนได้

ไบโอดีเซล คือเชื้อเพลิงเหลวจำพวกอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid mono alkyl ester, FFAE) ที่ได้มาจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Transesterification) ของลิพิดจำพวกไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ในสภาวะที่มีกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในอดีตจะใช้ผลผลิตจากพืชในการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ อ้อย ข้าวโพด และ น้ำมันพืชใช้แล้ว แต่พบว่ามีข้อเสียหลายอย่าง ทั้งในด้านการใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกจำนวนมาก รวมทั้งวัตถุดิบที่มาจากพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน อ้อย และข้าวโพด ซึ่งสามารถใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ เมื่อนำวัตถุดิบเหล่านี้เปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซล ส่งผลให้มีความต้องการใช้พืชเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการแย่งชิงวัตถุดิบระหว่างอุตสาหกรรมน้ำมันเพื่อการบริโภคและอุตสาหกรรมพลังงานทดแทน ส่งผลให้วัตถุดิบจากพืชเหล่านี้มีราคาสูงขึ้นตามไปด้วย จากปัญหาทั้งหลายเหล่านี้ ทำให้หน่วยงานและองค์กรต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนพยายามแสวงหาแหล่งวัตถุดิบอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไบโอดีเซลโดยพบว่าชีวมวลของสาหร่ายกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซล เพราะไม่ส่งผลกระทบต่อแหล่งอาหารของมนุษย์ เป็นแหล่งพลังงานที่มีความปลอดภัย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) พบได้ในแหล่งน้ำทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเภท สาหร่ายมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาในการเจริญที่สั้นกว่าพืชชั้นสูง โดยสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าภายในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง น้ำมัน (Oil) จากสาหร่ายสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยทั่วไป พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กมีน้ำมันประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (Chisti, 2007) แต่พบว่าสาหร่ายบางชนิดสามารถให้น้ำมันได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง โดยปริมาณน้ำมันที่พบจะแปรผันไปตามสารอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Mulbry et al., 2008) สาหร่ายที่ให้ลืพิตได้ในปริมาณสูงพบทั้งในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว และ ไดอะตอม เช่น *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Isochrysis* และ *Tetraselmis* เป็นต้น นอกจากนี้ ไขมันของสาหร่ายยังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ได้แก่ Eicosapentaenoic acid (EPA), Docosaheaxaenoic acid (DHA), Gamma-linolenic acid (GLA) และ Linoleic acid (LA) เป็นต้น (Chisti, 2007) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของอุตสาหกรรมการผลิตอาหารของมนุษย์

ดังนั้น ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสะสมลืพิตในปริมาณสูง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมลืพิตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก รวมทั้งศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเป็นแนวทางในการนำลืพิตจากสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ในด้านพลังงานทดแทนและลดวิกฤติปัญหาการขาดแคลนพลังงานของมนุษย์ในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการสะสมลืพิตในปริมาณสูง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมลืพิตในสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีการสะสมลืพิตในปริมาณสูงจากสาหร่ายสีเขียว 20 สายพันธุ์ที่แยกได้จากธรรมชาติและได้จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักแห้ง โดยในขั้นตอนนี้จะแบ่งวิธีการดำเนินงานออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 20 สายพันธุ์ ในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-acetate phosphate (TAP)

1.2 วิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดจากสาหร่ายโดยใช้วิธีการสกัดขั้นตอนเดียว (Single-step) ซึ่งดัดแปลงจาก Axelsson and Gentili (2014) และคำนวณหาปริมาณลิพิดทั้งหมด (Total lipid content)

2. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิดของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกโดยมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.1 นำสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงไว้ในสถานะที่มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่จำกัด และสถานะที่ขาดไนโตรเจนแล้วนำไปเปรียบเทียบปริมาณลิพิดทั้งหมดเทียบกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสถานะที่มีอาหารสมบูรณ์

2.2 สาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้เพาะเลี้ยงในสถานะที่มีความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์

2.3 ศึกษาผลร่วมกันของการขาดไนโตรเจนและสถานะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์

3. ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก ในสถานะที่มีการสะสมลิพิดทั้งหมดสูงสุด

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่มีการสะสมลิพิดในปริมาณสูง
2. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

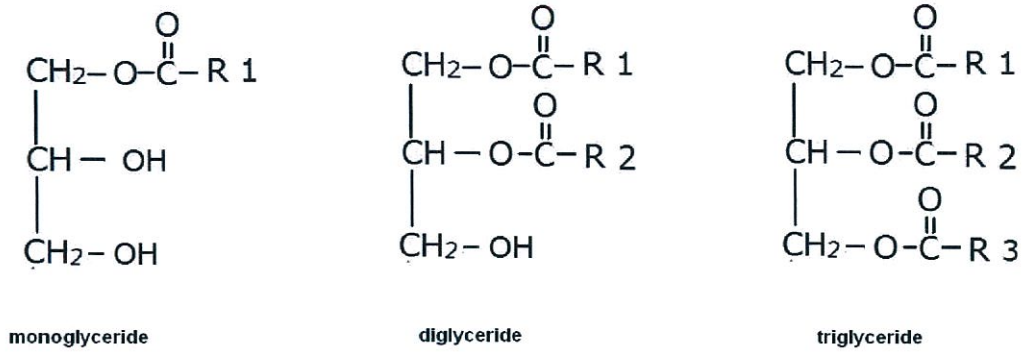
### 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับลิพิด (ดาวัลย์, 2538)

ลิพิด (Lipid) เป็นสารชีวโมเลกุลที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ลิพิดทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานสำรองของร่างกายและเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ในสิ่งมีชีวิต ลิพิดเป็นสารอินทรีย์ที่มีอะตอมของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นหลัก ลิพิดบางชนิดอาจพบอะตอมของธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบด้วย ลิพิดจัดเป็นสารชีวโมเลกุลที่ไม่ละลายในน้ำ (Water-insoluble) แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน อะซีโตน เอทานอล และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น

#### 2.1.1 ประเภทของลิพิด

ชนิดของลิพิด แบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้ 4 ประเภท ดังนี้

1. ลิพิดอย่างง่าย (Simple lipid) คือสารประกอบเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ มอนอกลิเซอไรด์ ไดกลิเซอไรด์ และ ไตรกลิเซอไรด์ (รูปที่ 2.1) ไตรกลิเซอไรด์จัดเป็นลิพิดอย่างง่ายที่พบได้มากที่สุดในธรรมชาติ และไตรกลิเซอไรด์สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซล โดยปกติ ไตรกลิเซอไรด์สภาพปกติอาจอยู่ในสถานะของแข็งหรือของเหลวขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยส่วนใหญ่ ไตรกลิเซอไรด์ที่พบในพืชจะอยู่ในสถานะของเหลว และมีจุดหลอมเหลวต่ำ เนื่องจากไตรกลิเซอไรด์ในพืชมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ เรียกไตรกลิเซอไรด์ในลักษณะนี้ว่า น้ำมัน (Oil) ไตรกลิเซอไรด์ในสัตว์จะมีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นส่วนใหญ่ จึงมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เรียกไตรกลิเซอไรด์ในลักษณะของแข็งนี้ว่า ไขมัน (Fat) เมื่อแอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลใหญ่หรือซับซ้อนกว่ากลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน จะได้ลิพิดที่มีสภาพเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เรียกลิพิดนี้ว่า ไข (Wax)

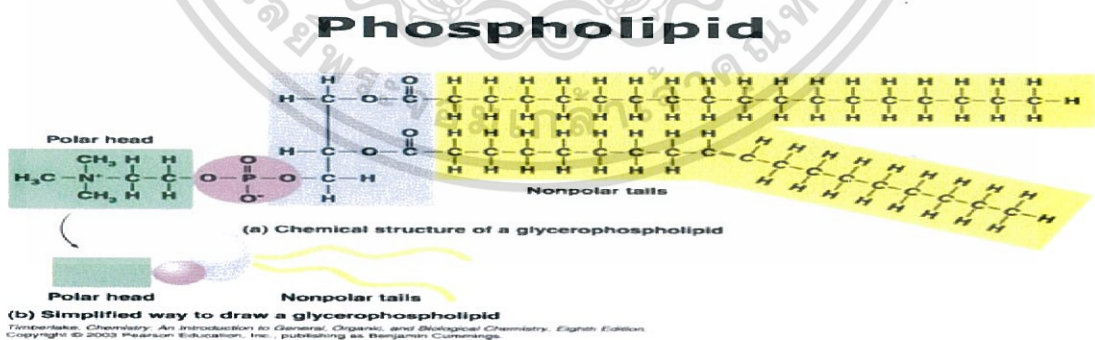


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของมอนอกลิเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และ ไตรกลีเซอไรด์

ที่มา : <http://antranik.org/organic-compound-2-lipids/>

2. ลิพิดประกอบ (Compound lipid) คือ ลิพิดที่ประกอบไปด้วยเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล และนอกจากนี้ยังมีสารประกอบอื่นเข้ามาในโมเลกุลด้วย ลิพิดประกอบแบ่งออกเป็น 4 ประเภทตามกลุ่มของสารประกอบที่เพิ่มขึ้นมา ดังนี้

2.1 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) หรือ ฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Phosphoglyceride) เป็นลิพิดที่ประกอบด้วยไขมันธรรมชาติรวมอยู่กับหมู่ฟอสเฟต (รูปที่ 2.2) ฟอสโฟกลีเซอไรด์พบว่าเป็นลิพิดที่พบมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติ รองจากไตรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิพิดส่วนใหญ่สามารถพบในเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชและสัตว์ เนื้อเยื่อประสาท น้ำเลือด ตัวอย่างของฟอสโฟกลีเซอไรด์ ได้แก่ เซฟาลิน (Cephalin) พลาสมาโลเจน (Plasmalogen) เลซิทีน (Lecithin)

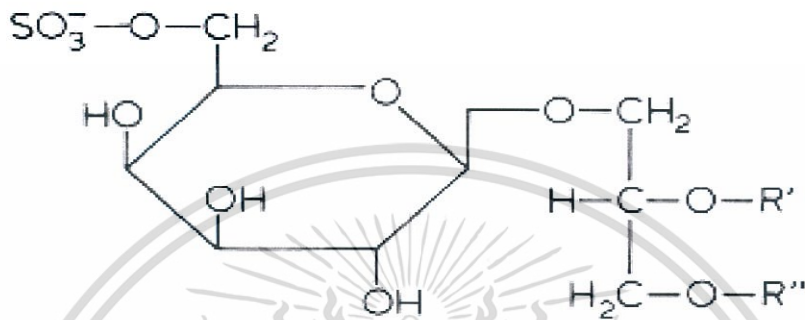


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของฟอสโฟกลีเซอไรด์

ที่มา : <http://www.slideshare.net/hafizayyub/lipids-chemistry>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

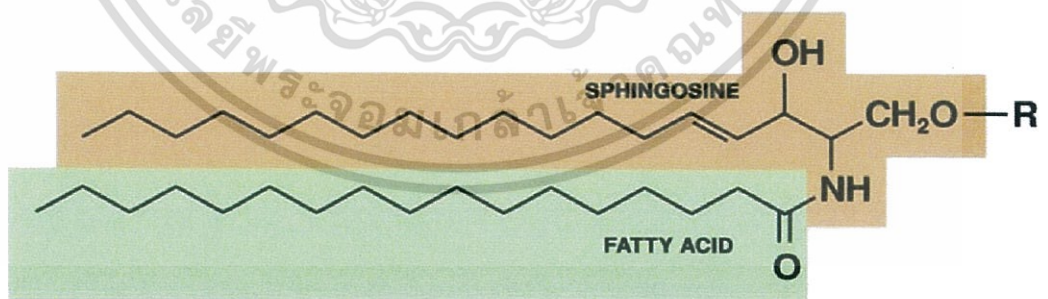
2.2 ไกลโคลิพิด (Glycolipid) หรือกลีเซอรอไกลโคลิพิด (Glyceroglycolipid) เป็นลิพิดที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตรวมอยู่ด้วย ตัวอย่างชนิดที่สำคัญคือ เซเรโบไซด์ (Cerebroside) ซึ่งเป็นลิพิดที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ถ้ามีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ ลิพิดนี้จะเรียกว่า กาแลคโกลิพิด (Galactolipid) ซึ่งลิพิดทั้งสองชนิดสามารถพบได้ที่เยื่อเซลล์สมอง และเซลล์ประสาท โครงสร้างของไกลโคลิพิดแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของไกลโคลิพิด

ที่มา : <http://www.cyberlipid.org/glycolip/glyl0002.htm>

2.3 สฟิงโกลิพิด (Sphingolipid) เป็นลิพิดที่เกิดจากการรวมตัวของสฟิงโกซีนหรืออนุพันธ์ของสฟิงโกซีนและกรดไขมัน (รูปที่ 2.4) สฟิงโกลิพิดเป็นลิพิดที่พบได้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของพืชและสัตว์โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อสมองและประสาท ตัวอย่างของสฟิงโกลิพิด ได้แก่ สฟิงโกไมเอลิน (Sphingomyelin) และ กาแลคโทเซเรโบไซด์ (Galactocerebroside)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสฟิงโกลิพิด

ที่มา : <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphingolipid.png>

2.4 ไลโปโปรตีน (Lipoprotein) เป็นลิพิดที่จับอยู่กับโปรตีนหรือกรดอะมิโนด้วยพันธะ Hydrophobic interaction ระหว่างส่วนที่ไม่มีขั้วของลิพิด ไลโปโปรตีนพบได้ในน้ำเลือดและทำหน้าที่ขนส่งลิพิดในเลือดไปยังเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย เอกสารฉบับนี้เขียนขึ้นเพื่อเป็นคู่มือสำหรับผู้ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อนุพันธ์ของลิพิด (Derived lipid) เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของลิพิดอย่างง่าย และลิพิดประกอบซึ่งยังคงมีคุณสมบัติของความเป็นลิพิดอยู่ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล มอนอกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ รวมไปถึงแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

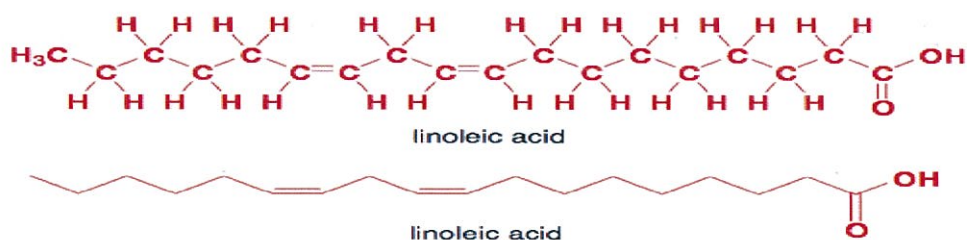
4. ลิพิดเบ็ดเตล็ด (Miscellaneous lipid) เป็นสารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับลิพิดมักพบรวมอยู่กับลิพิดในธรรมชาติและมักจะสลายตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดไขมันและน้ำมัน ได้แก่ สเตอรอยด์ (Steroid) เทอร์พีน (Terpene) และพวกวิตามินที่ละลายในไขมัน คือ วิตามิน A วิตามิน D วิตามิน E และ วิตามิน K เป็นต้น

### 2.1.2 กรดไขมัน (Fatty acid)

กรดไขมันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไขมันและน้ำมันเกือบทุกชนิด กรดไขมันมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดจุดหลอมเหลวและสถานะของลิพิด กรดไขมันเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีปลายด้านหนึ่งของสายโซ่คาร์บอนจะมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (Carboxyl group) 1 หมู่ มีสูตรทั่วไปคือ  $R-COOH$  ซึ่ง R หมายถึง หมู่เอซิล (Acyl group) ซึ่งส่วนใหญ่หมู่เอซิลจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทอะลิฟาติก (Aliphatic hydrocarbon) กรดไขมันมีอยู่มากกว่า 70 ชนิด ทั้งที่เป็นกรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยวและพันธะคู่ โดยส่วนใหญ่ กรดไขมันจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 4 ถึง 30 อะตอม กรดไขมันแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีหมู่เอซิลเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนประเภทอัลเคน (Alkane) โดยภายในสายโซ่ของคาร์บอนและไฮโดรอะตอมจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด เช่น กรดปาล์มิติก (palmitic acid) (รูปที่ 2.5) กรดไขมันอิ่มตัวมีสูตรทั่วไปคือ  $C_nH_{2n+1}COOH$  มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ระหว่าง 14-24 อะตอม กรดไขมันอิ่มตัวที่สามารถพบได้มากที่สุดคือ กรดปาล์มิติก (plamitic acid) ที่มีคาร์บอนอะตอมจำนวน 16 อะตอม ( $C_{16}$ ) และกรดสเตียริก (stearic acid) มีคาร์บอนอะตอมจำนวน 18 อะตอม ( $C_{18}$ )





รูปที่ 2.7 โครงสร้างของกรดลิโนเลอิก

ที่มา : <http://www.chemtube3d.com/ClaydenLinoleic.html>

2.3 ไอโคซานอยด์ (Eicosanoid) จัดเป็นอนุพันธ์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนและมีจำนวนคาร์บอนอะตอม 20 อะตอม เป็นสารต้นตอ (Precursors) ของสารสำคัญหลายชนิด เช่น พรอสตาแกรนดิน (Prostaglandin) พรอสตาซัยคลิน (Prostacyclin) และทรอมบอกเซน (thromboxane) เป็นต้น

กรดไขมันมีสมบัติทางกายภาพ ดังนี้

1. กรดไขมันเมื่ออยู่ในสภาพบริสุทธิ์ จะปราศจากสี กลิ่น และ รส
2. จุดหลอมเหลวของกรดไขมันขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนอะตอมและจำนวนพันธะคู่ จุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนคาร์บอนอะตอมที่มากขึ้น และเมื่อทำการเปรียบเทียบจุดหลอมเหลวของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากันพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากันแต่มีจำนวนพันธะคู่ต่างกันพบว่า กรดไขมันที่มีพันธะคู่มากกว่าจะมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า
3. การละลาย กรดไขมันมีโครงสร้าง 2 ส่วนคือ ส่วนที่ละลายน้ำโดยส่วนนี้จะมีคุณสมบัติของการมีขั้ว (Polar) คือ บริเวณที่หมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl) และส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะมีคุณสมบัติความไม่มีขั้ว (Non-polar) ได้แก่ ส่วนไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายยาว ดังนั้น ยิ่งสายโซ่ยาวขึ้น ความมีขั้วของกรดไขมันจะลดลง ทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง โดยส่วนใหญ่แล้ว ไขมันจะละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำเลย แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์
4. กรดไขมันที่มีพันธะคู่จะมีไอโซเมอร์ (Isomer) ได้แก่ ซิส (Cis-) และทรานส์ (Trans-) ที่มีจุดหลอมเหลวและสมบัติทางกายภาพอื่นๆ ที่แตกต่างกัน เช่น กรดไขมันที่มีคาร์บอนอะตอม 18 ตัว มีพันธะคู่ 1 พันธะ มีสองชนิด คือ กรดโอเลอิก ที่มีการจัดเรียงโมเลกุลเป็นแบบซิส และกรดอีเลดิกที่จัดเรียงโมเลกุลแบบทรานส์ โดยโครงสร้างแบบทรานส์มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันมีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้

1. ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (Hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไขมันหรือน้ำมัน โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้กลีเซอรอล 1 โมเลกุล และ กรดไขมัน 3 โมเลกุล ส่วนการย่อยไขมันด้วยเอนไซม์ไลเปสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเช่นเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของกรดไขมัน
2. ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดพันธะเอสเทอร์ระหว่างสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์และกรดไขมัน
3. ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) เป็นปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจนที่พันธะคู่ของกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยใช้โลหะบางชนิดเช่น พาราเดียม (Pd) แพลททินัม (Pt) นิกเกิล (Ni) หรือทองแดง (Cu) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจนเป็นปฏิกิริยาที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยเทียม
4. ปฏิกิริยาการเติมฮาโลเจน (Halogenation) สารพวกฮาโลเจน เช่น คลอรีน ไอโอดีน และ โบรมีน เป็นต้น ฮาโลเจนเหล่านี้สามารถเติมเข้าไปตรงตำแหน่งพันธะคู่ของกรดไขมัน

## 2.2 จุลินทรีย์ที่สะสมลิพิดในปริมาณสูง (Oleaginous microorganism)

ลิพิดหรือไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมพลังงานทดแทนและกิจการเชิงพาณิชย์อื่นๆ เนื่องจากมีข้อดีคือ จุลินทรีย์สามารถเจริญได้รวดเร็ว ทำให้ได้ผลผลิตลิพิดในปริมาณสูง และใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันหรือพืชพลังงานอื่นๆ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถผลิตและสะสมลิพิดไว้ภายในเซลล์ โดยจุลินทรีย์บางชนิดพบว่าสามารถสะสมลิพิดได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (Miao and Wu, 2006; Chisti, 2007; Meng et al., 2009) ลิพิดที่สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol, TAG) ซึ่งจะมีปริมาณลิพิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณลิกิตที่สะสมในจุลินทรีย์ (มนูเทพ, 2533; Alvarez and Steinbuechel, 2003; Meng et al. 2009)

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ปริมาณลิกิต (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
<b>แบคทีเรีย (Bacteria)</b>			
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	Shaking	Gluconate	52.2
<i>Rhodococcus ruber</i>	Shaking	Glucose	35.0
<i>Arthobacter</i> sp.	n.a	n.a	40
<i>ACP netobacter calcoacericus</i>	n.a	n.a	27.28
<i>Streptomyces albus</i>	n.a	Glucose	2.2
<i>Streptomyces coelicolor</i>	n.a	Glucose	3.8
<b>ยีสต์ (Yeast)</b>			
<i>Candida curvata</i> D	Fermenter	Whey	50.0
<i>Cryptococcus paraliptica</i>	Shaking and Fermenter	Glucose	55.0-65.0
<i>Lipomyces lipofer</i> IF00673	Shaking	Glucose	63.5
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Static	Glucose	63.0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	Fermenter	Ethanol	62.0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Shaking	glucose	49.0-71.0

n.a = not available

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ปริมาณลิพิดที่สะสมในจุลินทรีย์ (มนูเทพ, 2533; Alvarez and Steinbuchel, 2003; Meng et al. 2009) (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการเลี้ยง	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ปริมาณลิพิด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
<b>รา (Fungi)</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	Static	Glucose	28.0
<i>Aspergillus terreus</i>	Static	Sucrose	51.0-57.0
<i>Chaetomium globosum</i>	Static	Lactose	54.0
<i>Fusarium</i> sp.	Shaking	Whey	30.0-39.0
<i>Mucor circinelloides</i>	Shaking and Static	Glucose	45.0-65.0
<i>Mortierella vinacea</i>	Shaking	Various carbon sources	25.0-66.0
<b>สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)</b>			
<i>Botryococcus braunii</i>	n.a	n.a	25.0-75.0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	n.a	n.a	27.0
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	n.a	n.a	28.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	n.a	n.a	30.0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	n.a	n.a	72.0
<i>Nitzschia</i> sp.	n.a	n.a	45.0-47.0
<i>Schizochytrium</i> sp.	n.a	n.a	50.0-77.0
<i>Scenedesmus</i> sp. 3	n.a	n.a	25.0

n.a = not available

จากตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดมีลิพิดที่สะสมไว้ในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก (Green microalgae) เช่น *Botryococcus braunii* และ *Chlorella pyrenoidosa* เป็นต้น การใช้สาหร่ายในการผลิตลิพิดหรือไขมันเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการค้ามีข้อดี คือ สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารราคาถูก ควบคุมการเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีศักยภาพในการสังเคราะห์แสงทำให้สามารถเพิ่มจำนวนของชีวมวลได้ในระยะเวลาอันสั้น ทำให้ได้ผลผลิตของลิพิดในปริมาณสูง และยังใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยเมื่อเทียบกับพืชพลังงานอื่นๆ จากข้อดีที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ในปัจจุบันสาหร่ายสีเขียวกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมพลังงานทดแทน สำหรับมีอาหารสะสมเป็นแป้ง ลิพิดและกลีเซอรอล ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนได้ โดยเฉพาะลิพิดซึ่งส่วนใหญ่สะสมอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล ที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซล การนำสาหร่ายมาใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันไบโอดีเซล พบว่าไม่มีส่งผลกระทบต่อราคาของอาหารหรือสินค้าอุปโภคบริโภคอื่นๆ นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายเทียบกับพืชพลังงานชนิดอื่นๆ ต่อพื้นที่การผลิตที่เท่ากันพบว่า สาหร่ายให้ผลผลิตปริมาณน้ำมันที่สูงกว่าพืชหลายชนิด (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณผลผลิตน้ำมันของสาหร่ายเทียบกับพืชน้ำมันบางชนิดที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

ชนิดพืช	ปริมาณน้ำมัน (L oil/ha year)	พื้นที่ที่ต้องการในการ เพาะปลูก ( $M^2$ year/kg biodiesel)	การผลิตไบโอดีเซล (kg biodiesel/ha year)
ข้าวโพด	172	66	152
ถั่วเหลือง	636	18	562
ปาล์มน้ำมัน	5,366	2	4,747
สบู่ดำ	741	15	656
คาโนลา	974	12	862
สาหร่ายขนาดเล็ก (น้ำมัน 30 เปอร์เซ็นต์)	58,700	0.2	51,927
สาหร่ายขนาดเล็ก (น้ำมัน 50 เปอร์เซ็นต์)	97,800	0.1	86,515
สาหร่ายขนาดเล็ก (น้ำมัน 70 เปอร์เซ็นต์)	136,900	0.1	121,104

ที่มา : Mata et al., (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 สาหร่ายสีเขียว (ยูวดี, 2546)

สาหร่ายมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Algae และภาษากรีก เรียกว่า Phykos สาหร่ายพบได้ตั้งแต่เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือเรียกว่า Microscopic algae หรือ Microalgae ไปจนถึงสาหร่ายที่มีขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า Macroscopic algae หรือ Macroalgae สาหร่ายส่วนใหญ่มีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis)

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่พบว่ามียีสสีเขียวเหมือนหญ้า เนื่องจากภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุคลอโรฟิลล์เอ และบี เป็นจำนวนมาก ทำให้บดบังรงควัตถุสีอื่นๆ มีรงควัตถุรวมกันอยู่ในคลอโรพลาสต์ สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างและลักษณะที่หลากหลาย ทำให้สามารถนำคุณลักษณะเหล่านี้มาใช้ในการจัดจำแนกสาหร่ายสีเขียวได้อย่างชัดเจน

สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะทั่วไป ดังนี้

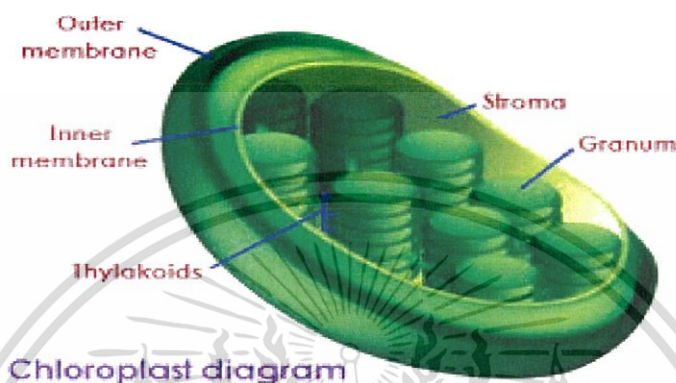
1. รงควัตถุ (Pigment) ที่พบได้ในสาหร่ายสีเขียว ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เอ และ บี แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ประกอบด้วย แอลฟา-แคโรทีน ( $\alpha$ -Carotene) เบตา-แคโรทีน ( $\beta$ -Carotene) และ แกมมา-แคโรทีน ( $\gamma$ -Carotene) แซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) มีหลายชนิดโดยส่วนใหญ่คือ ลูทีน (Lutein) ซีแซนทิน (Zeaxanthin) ไวโอลแซนทิน (Violoxanthin) และ นีโอแซนทิน (Neoxanthin)

2. ผนังเซลล์ (Cell wall) มีโครงสร้างคล้ายกับผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงคือ ประกอบไปด้วย ซิวโมแลกุลจำพวกเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นไมโครไฟบริลประสานกันไปมาครอบคลุมเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว มีความหนาและแข็งแรง นอกจากนี้ อาจพบสารที่มีลักษณะไม่เป็นรูปเป็นร่าง (Amorphous material) อีกหลายๆชนิด ที่ทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์ หรือสารที่ปะปนอื่นๆ เช่น Sporopollenin ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่ง สาหร่ายสีเขียวบางชนิดอาจพบสารประกอบซิลิโคนในผนังเซลล์ และสาหร่ายสีเขียวบางชนิดก็พบว่าไม่มีผนังเซลล์

3. คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) มีลักษณะคล้ายกับพืชชั้นสูงคือ มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ได้แก่ เยื่อหุ้มชั้นนอก และ เยื่อหุ้มชั้นใน เยื่อหุ้มชั้นในจะมีการม้วนตัว ทำให้เกิดเยื่อที่ซับซ้อนอยู่ภายใน โดยจะมีเยื่อที่มีลักษณะเป็นถุงกลมแบนเรียกว่า ไทลาคอยด์ (Thylakoid) เรียงซ้อนกันอยู่เป็นตั้งโดยแต่ละตั้งเรียกว่า กรานัม (Granum) (พหูพจน์เรียกว่า กรานา (Grana)) กรานาจะเรียงกันเป็นชั้นๆ เรียกว่า

ลามัลลา (Lamellae) ระหว่างกรานัมจะมีเยื่อที่เชื่อมต่อกันจะเรียกว่า สโตรมาลามัลลา (Stroma lamellae) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lamellae) ส่วนบริเวณที่ไม่มีเยื่อภายในคลอโรพลาสต์เรียกว่า สโตรมา (Stroma) ซึ่งบริเวณนี้จะมี โปรตีน เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต่างๆ ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ มีดีเอ็นเอและไรโบโซม เยื่อภายใน ไทลาคอยด์ประกอบไปด้วยโปรตีนและไขมัน ซึ่งจะมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงคือคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ โครงสร้างของคลอโรพลาสต์แสดงดังรูปที่ 2.8



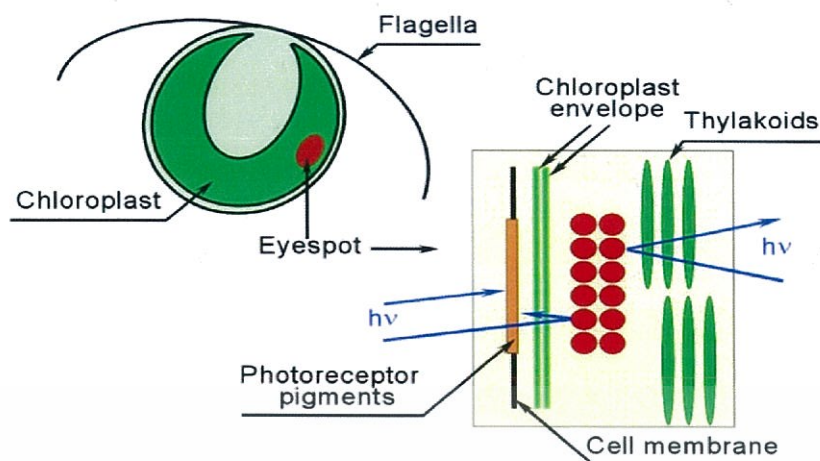
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของคลอโรพลาสต์

ที่มา : <http://biology.tutorvista.com/animal-and-plant-cells/chloroplasts.html>

ภายในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่มักพบองค์ประกอบที่เรียกว่าไพเรินอยด์ (Pyrenoid) ที่เป็นศูนย์กลางของการสร้างแป้ง โดยมีเอนไซม์อะไมโลสซินทีเทส (Amylose synthetase) เปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นแป้ง ลักษณะและจำนวนของไพเรินอยด์ในสาหร่ายแต่ละชนิดที่พบ จะมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ลักษณะนี้มาใช้ในการจัดจำแนกสาหร่ายได้

4. อายสปอต (Eyespot) หรือ สติกมา (Stigma) เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่รับแสงและตอบสนองต่อแสง และนำไปสู่การเคลื่อนไหวของแฟลกเจลลัม อายสปอตจะพบในเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ พบทั้งในเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ อายสปอตมีลักษณะเป็นรูป กลม รียาว อาจอยู่เดี่ยว หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีสีแดงเนื่องจากมีรงควัตถุเป็นพวกลูเทอิน (Lutein) เบตาแคโรทีน และแอสตาแซนทีน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีความไวต่อแสง อายสปอตมีรูปร่างคล้ายถ้วยสีแดง และตำแหน่งของอายสปอตมักอยู่ที่ด้านหน้าของเซลล์ แต่สาหร่ายบางชนิดพบว่ามียายสปอตอยู่ตรงกลางหรือส่วนท้ายของเซลล์ อายสปอตสามารถเกิดขึ้นใหม่ได้เองจากการแบ่งตัวเมื่อเซลล์มีการแบ่งตัว ลักษณะและการทำงานของอายสปอตแสดงดังในรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ลักษณะและการทำงานของอายสปอต

ที่มา : <http://www.pnas.org/content/99/13/8463/F1.expansion.html>

5. แวกิวโอล (Vacuole) สำหรับโดยส่วนใหญ่จะมีแวกิวโอล ที่มีขนาดแตกต่างกัน เช่น ใน *Spirogyra* และ *Valonia* และสำหรับไฟบางชนิดจะมีแวกิวโอลขนาดใหญ่ โดยเฉพาะใน *Spirogyra* จะมีสายไซโตพลาสซึมพาดผ่าน สำหรับสีเขียวใน Family Bryopsidophyceae จะมีเส้นแคลโลส (Callose) และเพคติน (Pectin) พาดผ่าน ส่วนในสีเขียว Order Volvocales จะมีคอนแทรกไทล์แวกิวโอลจำนวน 1 หรือ 2 หรือมากกว่า ทำหน้าที่ขับน้ำและของเสียออกจากเซลล์ คล้ายกับโปรโตซัว เป็นต้น

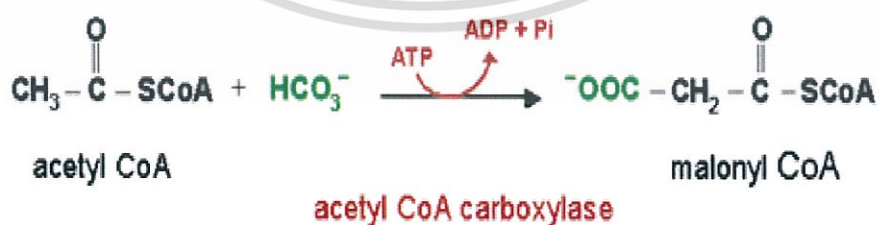
6. นิวเคลียส (Nucleus) สำหรับสีเขียวจัดเป็นยูคาริโอติกแอลจี (Eukaryotic algae) มีนิวเคลียสแยกออกจากไซโตพลาสซึมอย่างแท้จริง มีนิวเคลียสที่มีเยื่อหุ้ม

7. แฟล็กเจลลัม (Flagellum) เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนไหวของเซลล์ และใช้เป็นลักษณะในการจัดจำแนกสาหร่ายได้ แฟล็กเจลลัมสามารถพบได้ในเซลล์ปกติ (Vegetative cell) หรือเซลล์สืบพันธุ์ (Reproductive cell)

8. ออร์แกเนลล์อื่นๆ เช่น ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ไรโบโซม (Ribosome) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum) กอลจิแอปพาราตัส (Golgi apparatus) และอื่นๆ ออร์แกเนลล์ต่างๆ เหล่านี้จะคล้ายกับพืชและทำหน้าที่ทั่วไป

## 2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ในสาหร่ายสีเขียว (Radakovits et al., 2010)

การสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียวเริ่มต้นจากการสังเคราะห์กรดไขมันอิสระภายในคลอโรพลาสต์ และประกอบรวมกันเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ที่บริเวณเอนโดพลาสมิครีติคูลัม การสังเคราะห์กรดไขมันจะใช้สารสำคัญคืออะซีทิล โคเอ (Acetyl CoA) ซึ่งได้มาจากการย่อยสลายแป้งจนได้เป็นน้ำตาล น้ำตาลจะถูกออกซิไดส์ผ่านวิถีไกลโคไลซิสจนได้เป็นไพรูเวท (Pyruvate) แล้วไพรูเวทถูกออกซิไดส์ต่อจนได้เป็น อะซีทิล โคเอ นอกจากนี้อะซีทิล โคเอ มาจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) ได้เป็นสารตัวกลางในวิถีไกลโคไลซิสนั้นคือ 3-ฟอสโฟกลีเซอเรต (3-phosphoglycerate) แล้วถูกออกซิไดส์ต่อจนได้เป็นอะซีทิล โคเอ การสังเคราะห์กรดไขมันเริ่มต้นจากสารตั้งต้นคือ อะซีทิล โคเอ ที่มีจำนวนคาร์บอน 2 อะตอม จำนวน 1 โมเลกุลทำปฏิกิริยากับ มาโลนิล โคเอ (Malonyl CoA) ที่มีจำนวนคาร์บอน 3 อะตอม และมีการปลดปล่อยคาร์บอน 1 อะตอมในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์ของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 4 อะตอม ในรอบที่ 2 จะใช้สารตั้งต้นที่เป็นกรดไขมันคาร์บอน 4 อะตอมทำปฏิกิริยากับ มาโลนิล โคเอ และปลดปล่อยคาร์บอน 1 อะตอมได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคาร์บอน 6 อะตอม เกิดปฏิกิริยาเช่นนี้วนไปเป็นวัฏจักรจนได้กรดไขมันที่ต้องการ (สร้อยญา, 2557) ดังนั้น สารตั้งต้นที่สำคัญอีกตัวหนึ่งที่ต้องใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันคือ มาโลนิล โคเอ ที่สามารถสังเคราะห์มาจากอะซีทิล โคเอ ร่วมกับโมเลกุลของไฮโดรเจนคาร์บอนेटโดยใช้พลังงานจาก ATP 1 โมเลกุล โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Acetyl CoA carboxylase (ACCase) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์มาโลนิล โคเอ จาก อะซีทิล โคเอ แสดงในรูปที่ 2.10

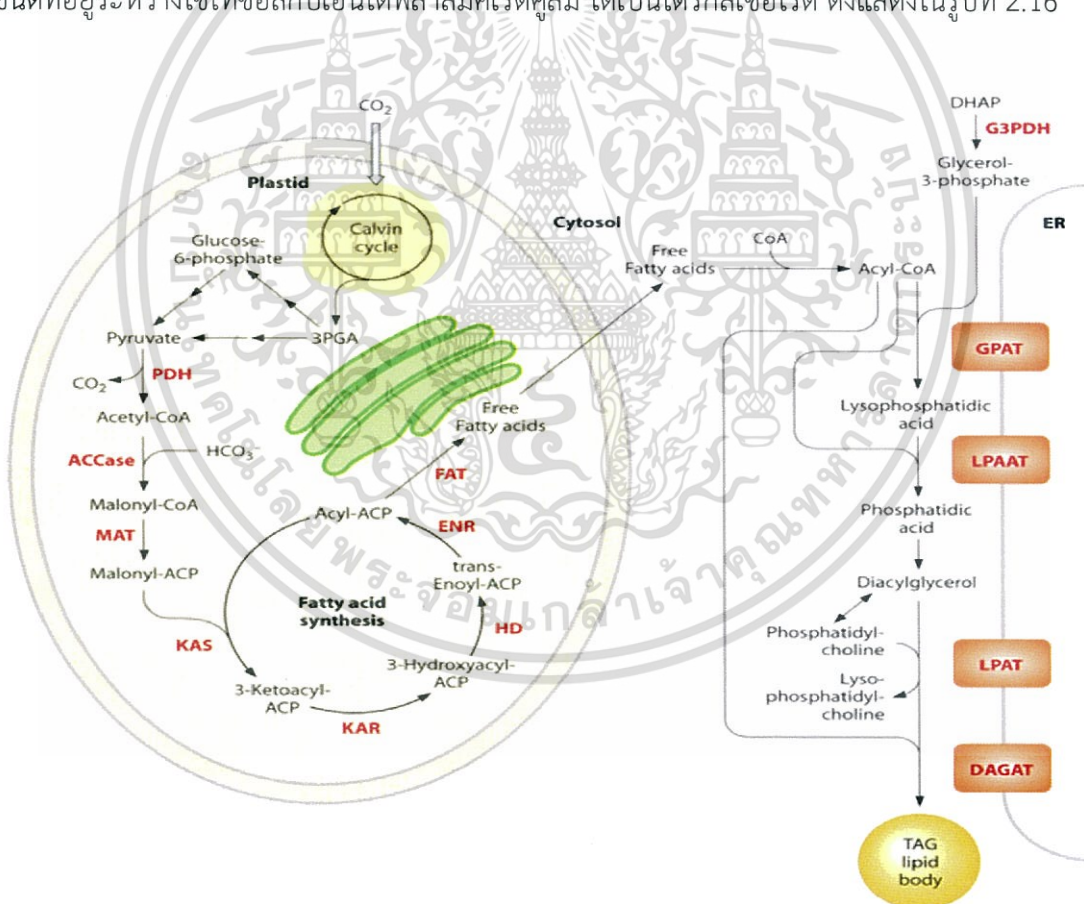


รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์มาโลนิล โคเอ จาก อะซีทิล โคเอ

ที่มา : [http://www.metabolic-database.com/html/amp\\_regulation\\_lipogenesis.html](http://www.metabolic-database.com/html/amp_regulation_lipogenesis.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์กรดไขมัน 1 โมเลกุล เริ่มต้นจากการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอน 4 อะตอม และวนเข้าวัฏจักรของปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันต่ออีกหลายรอบ โดยในแต่ละรอบจะนำ มาโลนิล โคเอ เข้าไปเติม และปลดปล่อยคาร์บอน 1 อะตอม การเติมคาร์บอนให้แก่กรดไขมันทีละ 2 อะตอมจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกันหลายชนิด (Multienzyme complex) คือ Fatty acid synthetase complex ประกอบไปด้วยโปรตีน 7 ชนิด โปรตีน 6 ชนิดจะเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมัน ส่วนโปรตีนอีกชนิดหนึ่งคือ Acyl carrier protein (ACP) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่พาหรือจับกับโมเลกุลของ Fatty acyl เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น Fatty acyl ACP ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตามต้องการแล้วนำ Fatty acyl ACP ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ Fatty acyl ACP thioesterase (FAT) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมัน (สร้อยญา, 2557) และเมื่อนำกรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ไปรวมกับสารตั้งต้น Glycerol-3-phosphate ผ่านระบบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดที่อยู่ระหว่างไซโทซอลกับเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์กรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ใน Eukaryotic algae  
ที่มา : Radakovits et al., (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หมายเหตุ :** ACCase, acetyl-CoA carboxylase; ACP, acyl carrier protein; CoA, coenzyme A; DAGAT, diacylglycerol acyltransferase; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; ENR, enoyl-ACP reductase; FAT, fatty acyl-ACP thioesterase; G3PDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; HD, 3-hydroxyacyl- ACP dehydratase; KAR, 3-ketoacyl-ACP reductase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; LPAAT, lyso-phosphatidic acid acyltransferase; LPAT, lyso-phosphatidylcholine acyltransferase; MAT, malonyl-CoA:ACP transacylase; PDH, pyruvate dehydrogenase complex; TAG, triacylglycerols.

## 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่าย

สาหร่ายที่จะนำมาใช้เพื่อผลิตน้ำมันจะต้องเป็นสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มีปริมาณลิพิดสูง และง่ายต่อการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าปริมาณน้ำมันและกรดไขมันของสาหร่าย แปรผันตามสารอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Khotimchenko and Yakovleva, 2004; Merzlyak et al., 2007; Mulbry et al., 2008; สุนิรัตน์ 2549) การเพาะเลี้ยงที่ทำให้สาหร่ายสะสมลิพิดได้มากขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไว้ในสภาวะเครียด (stress condition) ซึ่งมีสาเหตุที่ทำให้เกิดสภาวะเครียดได้หลายประการ ดังนี้

1. สภาวะเครียดเนื่องมาจากการขาดสารอาหาร (Nutrient starvation) การขาดแคลนสารอาหารหรือสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่มีสารอาหารจำกัดจะทำให้สาหร่ายลดอัตราการแบ่งเซลล์ลง แต่กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเจริญในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ ATP และ NADPH ที่ได้จากระบวนการสังเคราะห์แสงจะถูกนำไปใช้ในการสร้างชีวมวลของสาหร่าย ได้เป็น ADP และ  $\text{NADP}^+$  ในที่สุด ทั้ง ADP และ  $\text{NADP}^+$  จะถูกนำกลับไปใช้เป็น Acceptor molecule ในกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป เมื่อสาหร่ายอยู่สภาวะที่ขาดสารอาหาร แหล่งของตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยเฉพาะ  $\text{NADP}^+$  จะมีปริมาณลดลง แต่หากระบวนการสังเคราะห์แสงไม่สามารถที่จะปิดตัวลงได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้อาณาไปสู่เหตุการณ์ที่เป็นอันตรายที่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่าย ดังนั้น NADPH จะถูกใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันทางชีวภาพมากขึ้นเพื่อเป็นการเสริมหรือเพิ่มตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งในที่นี้คือ  $\text{NADP}^+$  เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เพื่อทำให้เซลล์สาหร่ายสามารถดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ต่อไปได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนสารอาหาร (Thompson, 1996; Hu et

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 2008) เมื่ออัตราการแบ่งเซลล์ของสาหร่ายลดลง แต่มีการสังเคราะห์กรดไขมันเพิ่มมากขึ้น ทำให้เซลล์ไม่มีความจำเป็นที่จะใช้กรดไขมันในการสังเคราะห์ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (Cellular lipid) เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้น เซลล์จะนำกรดไขมันไปสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์แทน ตัวอย่างสารอาหารบางชนิดที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่าย เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ เป็นต้น การขาดสารอาหารเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม กระบวนการสังเคราะห์แสง การดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์สาหร่าย และยังมีผลทำให้สาหร่ายสะสมลิพิดและกรดไขมันเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 2.3)

2. ความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิ (Temperature stress) อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหรือการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่าย มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลิพิดและกรดไขมันภายในเซลล์ (ตารางที่ 2.4)

**ตารางที่ 2.3** ผลของการจำกัดสารอาหารที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด (El-Sheek et al., 1995; Hsieh et al., 2009; Widjaja et al., 2009; Matthew et al., 2009; Converti et al., 2009; Xin L. et al., 2010; Dean et al., 2010)

ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก	สารอาหารที่จำกัด	การเปลี่ยนแปลงของลิพิดหลังจากการจำกัดสารอาหาร
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Nitrogen limitation	Increase in total lipids
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Sulfur limitation	Increase in triglyceride
<i>Chlorella vulgaris</i>	Nitrogen limitation	16.41% Total lipid increase Lipid productivity of 78 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Increase in triglyceride
<i>Chlorella kessleri</i>	Phosphorus limitation	Increase in unsaturated fatty acid
<i>Chlorella</i> sp.	Urea limitation	Total lipid productivity of 0.124 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
<i>Scenedesmus</i> sp.	Nitrogen and phosphorus	Lipid increase 30% and 53%,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 การเปลี่ยนแปลงของลิพิดและกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ (Joh T. et al., 1993; Thomson, 1996; Renaud et al., 2002; Converti et al., 2009)

ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก	อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลงของลิพิด
<i>Chaetoceros</i> sp.	Grown at 25 °C	16.8% Total lipid increase
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Increase from 20 °C to 25 °C	14.92% Lipid production increase
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Lowering temperature	2-fold Unsaturated fatty acid increase
<i>Dunaliella salina</i>	Shift from 30 °C to 12 °C	Increase in unsaturated fatty acid

3. การใช้สภาวะเครียดเกลือ (Salt stress) เพื่อให้เกิดการสะสมลิพิดในสาหร่ายมากขึ้น มีรายงานว่าการใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* เพิ่มการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์ได้สูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ (Takagi et al., 2006)

4. ผลของพีเอชต่อการสะสมลิพิดในสาหร่าย มีรายงานว่า ความเครียดจากพีเอชที่เป็นต่างนำไปสู่การสะสมไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มมากขึ้นในสาหร่าย *Chlorella* CHLOR1 โดยไม่ขึ้นอยู่กับการขาดสารอาหารหรือการจำกัดระดับของไนโตรเจนและคาร์บอน และนำไปสู่การลดลงของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยพบว่า พีเอชที่เป็นด่าง (Alkaline pH) จะยับยั้งการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก สาหร่ายจึงไม่มีความจำเป็นในการใช้กรดไขมันไปสังเคราะห์ลิพิดที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ จึงใช้กรดไขมันไปสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์เพิ่มมากขึ้น (Guckert et al., 1990) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันและลิพิดใน *Chlamydomonas* sp. สายพันธุ์ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ที่แยกมาจากทะเลสาบภูเขาไฟที่มีความเป็นกรด กับ *C. reinhardtii* พบว่า *Chlamydomonas* sp. สายพันธุ์ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว และโพลาร์ลิพิด (Polar lipid) มากกว่า *C. reinhardtii* เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Chlamydomonas* sp. สายพันธุ์ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ ไว้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 1 เทียบกับสภาวะที่มีพีเอชสูงกว่า พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 1 ทำให้ *Chlamydomonas* sp. มีปริมาณของไตรกลีเซอไรด์มากกว่า (Tatsuzawa et al., 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ความเครียดจากโลหะหนัก (Heavy metal stress) การเติมโลหะหนักบางชนิดลงไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสามารถทำให้สาหร่ายบางชนิดสามารถเพิ่มการสะสมลิพิดได้ มีรายงานว่าเมื่อเซลล์ของ *Chlorella vulgaris* ที่เจริญเข้าสู่ระยะ late log phase และมีการเติม  $Fe^{3+}$  เพิ่มลงไปในการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นต่างๆ จะทำให้ปริมาณไขมันทั้งหมดเพิ่มขึ้นถึง 56.6 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (Liu et al., 2008)

6. ผลของความเข้มแสงต่อการสะสมลิพิดในสาหร่าย การเพิ่มความเข้มแสงมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มการสะสมลิพิดในสาหร่ายโดยเฉพาะลิพิดในรูปของไตรกลีเซอไรด์ แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มแสงที่มากเกินไป ทำให้เกิดเหตุการณ์ที่เรียกว่า Photoinhibition ซึ่งอาจทำให้ได้ผลผลิตของลิพิดที่ต่ำลงไปด้วย มีรายงานการทดลองเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 2 ชนิดคือ *Chlorella sp.* และ *Monoraphidium dybowskii* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งสองชนิดในอาหารที่ลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลงครึ่งหนึ่ง ภายใต้ระดับความเข้มแสงต่างๆ พบว่าสาหร่ายทั้งสองชนิดที่ถูกเพาะเลี้ยงในความเข้มแสงระดับสูงให้ปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด (He et al., 2015)

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Converti et al. (2009) ได้ทดลองผลของความเครียดเนื่องมาจากการขาดสารอาหารต่อการสะสมลิพิด ในการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต (Sodium nitrate,  $NaNO_3$ ) ที่ 1.5, 0.75 และ 0.375 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 0.375 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ *C. vulgaris* สะสมลิพิดทั้งหมดสูงสุดคือ  $15.31 \pm 0.51$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตลดลงทำให้สาหร่ายเกิดความเครียด สาหร่ายจึงสะสมปริมาณลิพิดสูงขึ้น

Axelsson and Gentili (2014) ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดไขมันทั้งหมดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กด้วยขั้นตอนเดียว (Single-step procedure) เปรียบเทียบกับวิธีการที่เป็นที่นิยมและได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีมาตรฐานในการสกัดไขมันจากตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็ก คือวิธีการของ Folch et al. (1957) Bligh and Dyer (1959) และวิธีการของ Selstam and Oquist (1985) โดยวิธีการสกัดไขมันขั้นตอนเดียว (Single-step procedure) ถูกพัฒนามาจากวิธีการของ Folch et al. (1957) เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ค่าเฉลี่ยของ เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยว (% Recovery) ของปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด วิธีการสกัดสกัดไขมันในขั้นตอนเดียวมีขั้นตอนดังนี้ ใช้ตัวอย่าง 20-30 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง หรือตัวอย่างสาหร่าย 200-300 มิลลิกรัม น้ำหนักเปียก มาเติมตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม-เมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 8 มิลลิตร หลังจาก

นั้น ใช้มือเขย่าด้วยความรุนแรง 2-3 วินาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.73 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 350 x g เป็นเวลา 2 นาที แล้ว Recovery ส่วนที่อยู่ด้านล่างไปวิเคราะห์ปริมาณลิพิดทั้งหมดต่อไป วิธีการสกัดลิพิดขั้นตอนเดียวเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่สามารถสกัดลิพิดจากตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน และเป็นวิธีการที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination,  $R^2$ ) เท่ากับ 0.985 เมื่อเทียบกับวิธีการของ Folch et al. (1957) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ 1 ตัวอย่างจะต้องสกัดซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง

Siaut et al. (2011) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร Standard TAP medium จนถึงระยะ Mid-log phase แล้วจึงเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ แล้วเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งและลิพิดต่อไป จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทำให้สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 มีปริมาณแป้งและไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์สูงสุด และนอกจากนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยง *C. reinhardtii* cw15 ในอาหาร TAP เป็นเวลา 2 วันก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร TAP-N เป็นเวลา 7 วัน โดยในทุกๆ วัน จะมีการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อไปวิเคราะห์ปริมาณแป้ง ปริมาณลิพิดในรูปของไตรกลีเซอไรด์ และปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* cw15 ที่ถูกเพาะเลี้ยงไว้ในอาหาร TAP-N เป็นระยะเวลา 7 วัน จะมีการสะสมลิพิดในรูปของไตรกลีเซอไรด์สูงถึง 40 ไมโครกรัมต่อล้านเซลล์

Takagi et al. (2006) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella teriolecta* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.5 และ 1 โมลาร์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงที่สาหร่ายเจริญอยู่ในระยะ Mid-log phase หรือเมื่อสิ้นสุดระยะ Log phase พบว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ จะทำให้ได้ปริมาณไขมัน 67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ซึ่งให้ไขมัน 60 เปอร์เซ็นต์

Widjaja et al. (2009) ทำการทดลองโดยเลี้ยงสาหร่าย *C. vulgaris* โดยเปรียบเทียบปริมาณไขมันทั้งหมดระหว่างการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารปกติและสูตรอาหารขาดไนโตรเจน พบว่าปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน เนื่องจากในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน ทำให้ *C. vulgaris* เกิดความเครียด เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ จึงส่งผลทำให้เกิดการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มี 20 สายพันธุ์ โดยได้มาจากการคัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืดและน้ำในนาข้าวของประเทศไทย นอกจากนี้ ยังได้มาจากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวของ *Chlamydomonas* ประเทศสหรัฐอเมริกา (*Chlamydomonas* Resource Center) สาหร่ายสีเขียวทั้ง 20 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

1. *Chlorella* sp. 2SinS4 คัดแยกมาจากน่านาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
2. *Coelastella* sp. CH คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
3. *Scenedesmus* sp. L คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
4. *Chlorella* sp. NakS4 คัดแยกมาจากน่านาข้าว จังหวัดนครสวรรค์
5. *Tetraspora* sp. TT คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด จังหวัดปทุมธานี
6. *Chlorella* sp. ChiW1 คัดแยกมาจากน่านาข้าว จังหวัดชัยนาท
7. *Chlorella* sp. ChiS4 คัดแยกมาจากน่านาข้าว จังหวัดชัยนาท
8. *Chlorella* sp. CirGreen คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
9. Unidentified B35.1 คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด จังหวัดมหาสารคาม
10. *Micractinium* sp. A25.1 คัดแยกมาจากน่านาข้าว จังหวัดชัยนาท
11. Unidentified 2C-2 คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืดภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
12. *Micractinium* sp. 1SinS1.1 คัดแยกมาจากแหล่งน่านาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
13. *Chlorella* sp. 2TKS 2.1 คัดแยกมาจากแหล่งน่านาข้าว อำเภอดาคลี จังหวัดนครสวรรค์
14. *Chlorella* sp. 2TKS 2.2 คัดแยกมาจากแหล่งน่านาข้าว อำเภอดาคลี จังหวัดนครสวรรค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. *Chlorella* sp. 8260 คัดแยกมาจากแหล่งน้ำจืด กรุงเทพมหานคร
16. *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ได้มาจาก *Chlamydomonas* Resource Center
17. *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 ได้มาจาก *Chlamydomonas* Resource Center
18. *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 ได้มาจาก *Chlamydomonas* Resource Center
19. *Chlamydomonas reinhardtii* CC-3806 ได้มาจาก *Chlamydomonas* Resource Center
20. *Chlamydomonas reinhardtii* CC-4147 ได้มาจาก *Chlamydomonas* Resource Center

### 3.2 สารเคมี

#### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก)

#### 3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.2.1 แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
- 3.2.2.2 แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ )
- 3.2.2.3 แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4$ )
- 3.2.2.4 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.2.2.5 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.2.2.6 กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )
- 3.2.2.7 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.2.2.8 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.2.2.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.2.2.10 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.2.2.11 โพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 3.2.2.12 ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- 3.2.2.13 กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.14 ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน ( $C_4H_{11}NO_3$ )

3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณลิพิด

3.2.3.1 คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_3$ )

3.2.3.2 เมทานอล ( $CH_3OH$ )

3.2.3.3 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

### 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation, Japan)
- 3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.3.6 ตู้ดูดควันสารเคมี (Protector laboratory hood)
- 3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)
- 3.3.8 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Heidolph, Germany)
- 3.3.9 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.3.10 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.11 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.3.12 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.3.13 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
- 3.3.14 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon 80i Eclipses, USA)
- 3.3.15 ลูปเปียเชื้อ (loop)
- 3.3.16 ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.3.17 อุปกรณ์สำหรับวางหลอดทดลอง (Rack)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น (Starter) เริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวบนจานอาหารแข็ง (TAP agar) จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวของเซลล์สาหร่ายบนจานอาหารแข็ง 1 โคโลนีไปเพาะเลี้ยงต่อในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำหัวเชื้อตั้งต้นที่เก็บเกี่ยวได้มาเพาะเลี้ยงต่อในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP 100 มิลลิลิตร และปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของเซลล์ให้มีค่าประมาณ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที

### 3.5 วิธีการวัดปริมาณไขมันทั้งหมด

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อที่ 3.4 จนเซลล์ของสาหร่ายเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) คือประมาณชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ของสาหร่ายโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ครบ นำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์สาหร่ายไปชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งให้ได้น้ำหนัก 20-30 มิลลิกรัมเพื่อใช้สำหรับการสกัดไขมัน วิธีการที่ใช้ในการสกัดไขมันจากตัวอย่างสาหร่ายดัดแปลงมาจากวิธีการสกัดไขมันขั้นตอนเดียว (Single-step procedure) ของ Axelsson and Gentili (2014) วิธีการสกัดไขมันทำได้โดยชั่งตัวอย่างสาหร่าย 20-30 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งให้อยู่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้น เติมตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เขย่าหลอดอย่างรุนแรง และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.73 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไป แล้วนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1768 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำชั้นของคลอโรฟอร์มที่อยู่ด้านล่างของหลอดไปใส่ยังหลอดใหม่ และดูดสารเคมีที่ใช้สกัดไขมันในรอบแรกออกให้หมด แล้วทำการเติมสารสำหรับการสกัดรอบใหม่ลงไปเหมือนดังที่กล่าวมาข้างต้น ทำการสกัดไขมัน 5 รอบต่อ 1 ตัวอย่าง เมื่อสกัดไขมันเสร็จ จะได้สารสกัดหยาบของไขมันที่มีตัวทำละลายคลอโรฟอร์มอยู่เป็นจำนวนมาก นำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดไขมันที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ให้เหลือปริมาตรให้น้อยที่สุดคือประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้น ถ่ายสารสกัดไขมันที่ได้ไปใส่ในหลอดเซนต์ปิฟส์ขนาดเล็กที่มีปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำหลอดหลอดเซนต์ปิฟส์ขนาดเล็กไปทำให้แห้งด้วยการพ่นก๊าซไนโตรเจน และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำหลอดไปทิ้งให้เย็นใน Desiccator ก่อนที่จะนำไปชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณไขมันทั้งหมด (ภาคผนวก ข)

### 3.6 วิธีการศึกษาผลของการขาดไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิด

นำสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ที่มีระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0, 0.7 และ 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เปรียบเทียบปริมาณไขมันโดยวัดปริมาณไขมันทั้งหมดตามวิธีการในหัวข้อ 3.5

### 3.7 วิธีการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมลิพิด

นำสาหร่ายที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในช่วงเวลาที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ดังนี้ 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกสองวันบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่ได้จากสภาวะต่างๆ ไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดตามวิธีการในหัวข้อที่ 3.5

### 3.8 วิธีการศึกษาผลของการขาดไนโตรเจนและสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมลิพิด

ใช้สาหร่ายที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในช่วงเวลาที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง โดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ดังนี้ 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกสองวันบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่ได้จากสภาวะต่างๆ ไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดตามวิธีการในหัวข้อที่ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.9 วิธีการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

ส่งตัวอย่างสารห่วยที่ถูกคัดเลือกที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ไปวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันไปที่ ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ Gas chromatograph-Flame ionization detector (GC-FID) สภาวะของ GC-FID และผลการวิเคราะห์ทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ค



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

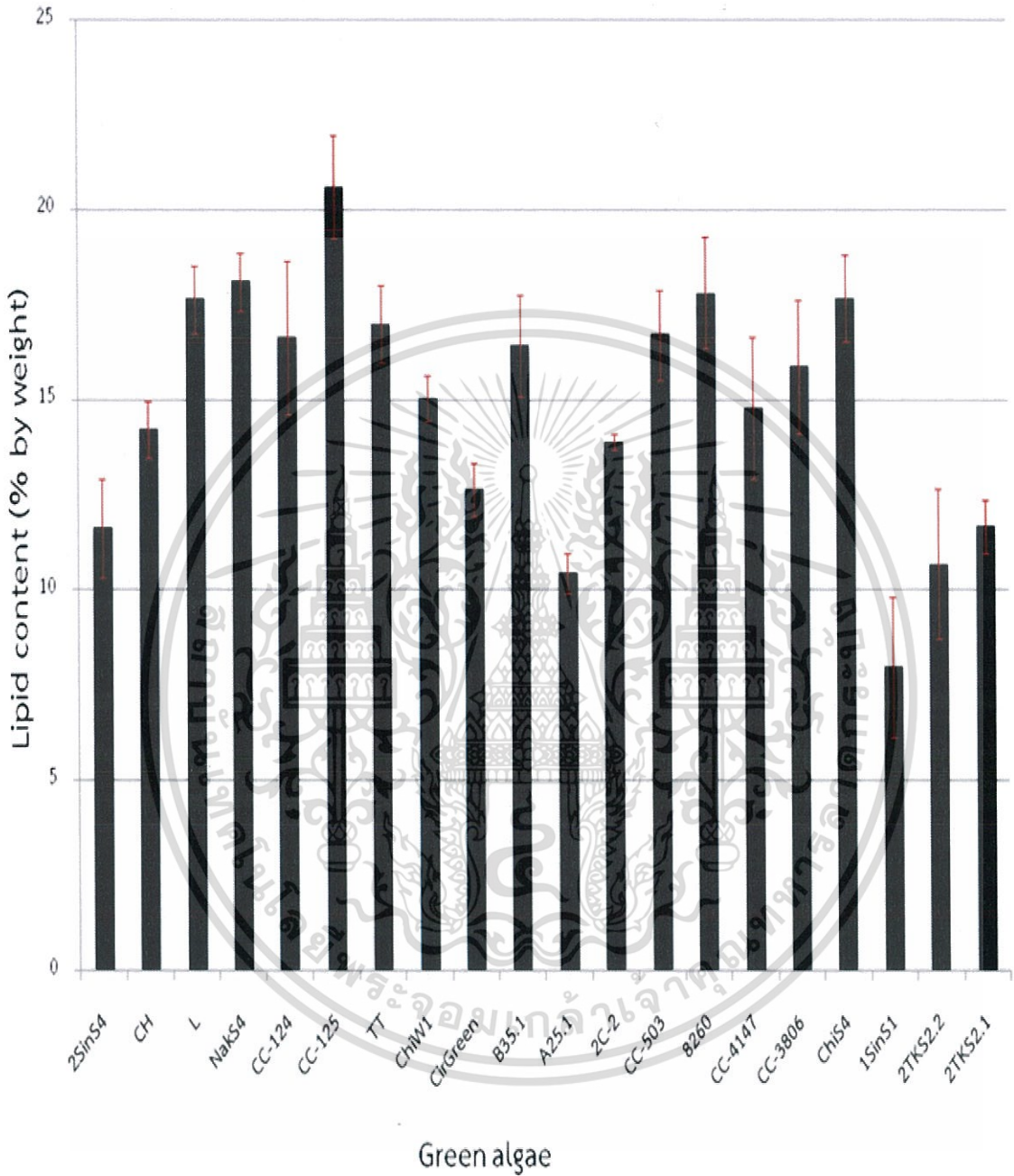
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

โครงการพิเศษนี้ใช้สาหร่ายสีเขียว 20 สายพันธุ์มาวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด จากนั้นคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด 1 สายพันธุ์เพื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิดในสาหร่าย โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเครียดเนื่องมาจากการขาดไนโตรเจน และความเครียดเนื่องมาจากเกลือ สามารถอธิบายผลได้ดังนี้

#### 4.1 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพสูงในการสะสมลิพิด

จากการนำสาหร่าย 20 สายพันธุ์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tris-acetate phosphate (TAP) จนครบ 96 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์ไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดโดยใช้วิธีการสกัดไขมันที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Axelsson and Gentili (2014) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด (รูปที่ 4.1) โดยสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงถึง  $20.60 \pm 1.36$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ พบว่ามีสาหร่ายสีเขียว 10 สายพันธุ์ ที่มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง คือ *Scenedesmus* sp. L, *Chlorella* sp. NakS4, *C. reinhardtii* CC-124, *Tetraspora* sp. TT, *Chlorella* sp. ChiW1, Unidentified B35.1, *C. reinhardtii* CC-503, *Chlorella* sp. 8260, *C. reinhardtii* CC-3806 และ *Chlorella* sp. ChiS4 (ตารางที่ 4.1) สาหร่าย 20 สายพันธุ์ที่ใช้การศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ยกเว้นสาหร่าย *Micractinium* sp. 1SinS1.1 เป็นสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์เดียวที่มีปริมาณไขมันทั้งหมดต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณไขมันทั้งหมดเท่ากับ  $7.97 \pm 1.86$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ปริมาณไขมันทั้งหมดในสาหร่ายสีเขียว 20 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณไขมันทั้งหมดในสาหร่ายสีเขียว 20 สายพันธุ์

ลำดับที่	สายพันธุ์ของสาหร่าย	ปริมาณไขมันทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก $\pm$ ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน)
1	<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	11.63 $\pm$ 1.30
2	<i>Coelastella</i> sp. CH	14.20 $\pm$ 0.75
3	<i>Scenedesmus</i> sp. L	17.64 $\pm$ 0.90
4	<i>Chlorella</i> sp. NakS4	18.10 $\pm$ 0.77
5	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	16.62 $\pm$ 2.01
6	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125	20.60 $\pm$ 1.36
7	<i>Tetraspora</i> sp. TT	17.00 $\pm$ 1.03
8	<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	15.04 $\pm$ 0.60
9	<i>Chlorella</i> sp. CirGreen	12.65 $\pm$ 0.70
10	Unidentified B35.1	16.43 $\pm$ 1.33
11	<i>Micractinium</i> sp. A25.1	10.43 $\pm$ 0.55
12	Unidentified 2C-2	13.90 $\pm$ 0.21
13	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-503	16.71 $\pm$ 1.19
14	<i>Chlorella</i> sp. 8260	17.80 $\pm$ 1.46
15	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-4147	14.78 $\pm$ 1.88
16	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-3806	15.88 $\pm$ 1.77
17	<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	17.67 $\pm$ 1.15
18	<i>Micractinium</i> sp. 1SinS1.1	7.97 $\pm$ 1.86
19	<i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.2	10.67 $\pm$ 1.98
20	<i>Chlorella</i> sp. 2TKS2.1	11.66 $\pm$ 0.70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 เป็นสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสะสมลิพิดในปริมาณสูง นอกจากสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 จะสะสมลิพิดในปริมาณสูงแล้ว *C. reinhardtii* สายพันธุ์อื่นๆ ที่นำมาใช้ในการศึกษาก็มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4.1) ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ที่ได้มาจากการคัดแยกในแหล่งน้ำจืดและน้ำจืดจากนาข้าวในประเทศไทย มีปริมาณไขมันทั้งหมด คือประมาณ 7-15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) อาจกล่าวได้ว่าการสะสมลิพิดในสาหร่ายสีเขียวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

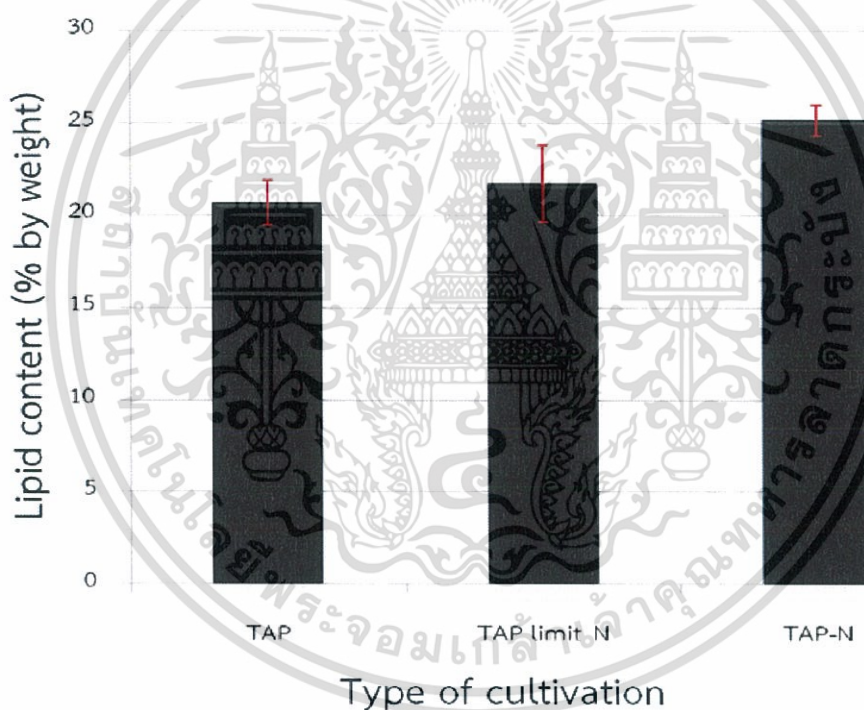
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 พบว่า *C. reinhardtii* CC-125 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 5 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ใช้สำหรับการเคลื่อนที่ (รูปที่ 4.2) มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่คิดเป็นพื้นที่ 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์สาหร่าย มีอายสปอตหรือสติกมาอยู่ที่บริเวณขอบด้านหนึ่งของคลอโรพลาสต์ ที่ทำหน้าที่ในการรับและตอบสนองต่อแสง นำไปสู่การเคลื่อนไหวของแฟลกเจลลา



รูปที่ 4.2 ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. reinhardtii* CC-125 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Tris-acetate phosphate (TAP) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

## 4.2 ผลของการขาดไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิด

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (TAP limit N) ที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.7 มิลลิโมลาร์ และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) ที่ปราศจากแอมโมเนียมคลอไรด์ แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ (TAP) พบว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด (รูปที่ 4.3) โดยสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจนจะมีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงถึง  $25.17 \pm 0.81$  เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)



รูปที่ 4.3 ปริมาณไขมันทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการขาดหรือจำกัดแหล่งไนโตรเจน

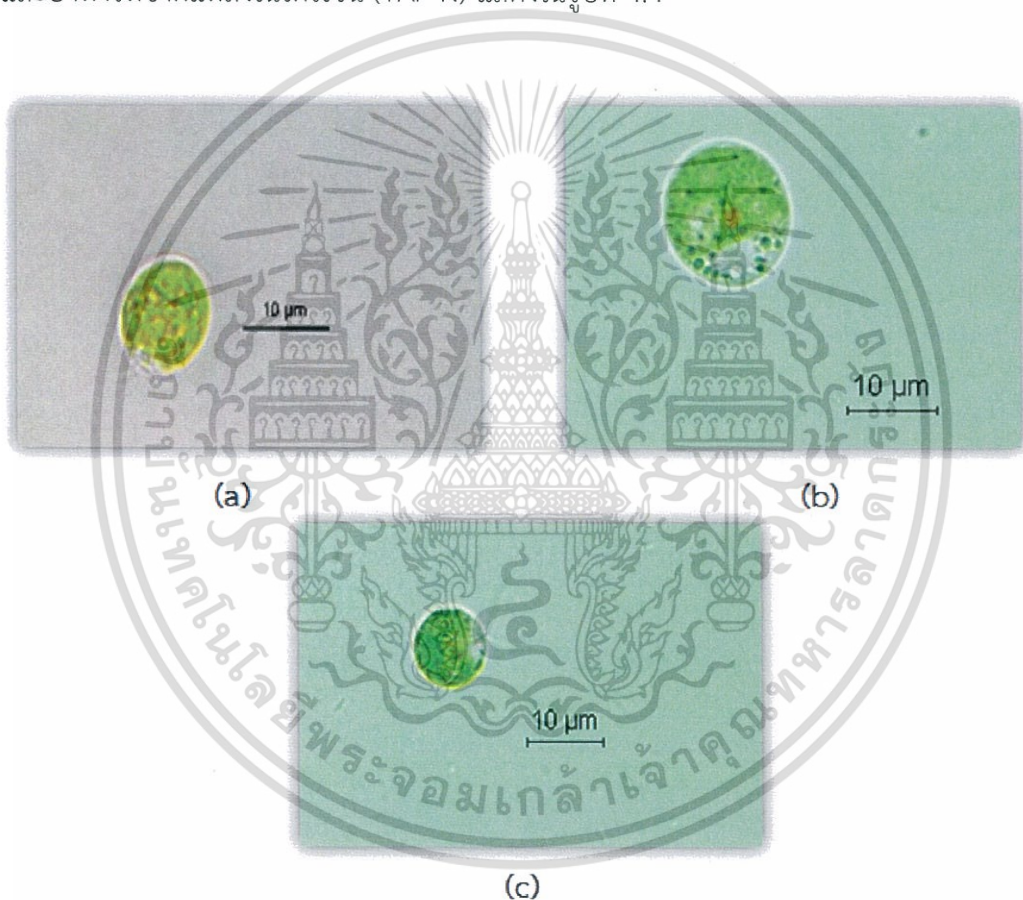
ตารางที่ 4.2 ปริมาณไขมันทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ในสภาวะที่มีการขาดหรือจำกัดไนโตรเจน

สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ปริมาณไขมันทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก±ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน)
มีสารอาหารสมบูรณ์ (TAP)	20.70±1.22
มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด (TAP limit N)	21.74±2.10
ขาดไนโตรเจน (TAP - N)	25.17±0.81

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) ทำให้มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์สาหร่าย และไนโตรเจนยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนและโปรตีนชนิดต่างๆ ที่สำคัญภายในเซลล์ การขาดไนโตรเจนทำให้สาหร่ายเกิดความเครียด และลดอัตราการแบ่งเซลล์ลง เซลล์จึงไม่มีความจำเป็นที่จะใช้กรดไขมันในการสังเคราะห์ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ดังนั้นกรดไขมันที่สังเคราะห์ได้จะถูกเก็บไว้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์แทน ส่งผลให้มีปริมาณไขมันทั้งหมดของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (TAP limit N) และการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนสมบูรณ์ (TAP) (ตารางที่ 4.2) จากการทดลองของ Saut et al. (2011) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *C. reinhardtii* cw15 ในอาหาร TAP เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร TAP-N เป็นเวลา 7 วัน โดยในทุกๆ วันจะมีการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อไปวิเคราะห์ปริมาณเบี่ยงปริมาณลิพิดในรูปของไตรกลีเซอไรด์ และปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* cw15 ที่ถูกเพาะเลี้ยงไว้ในอาหาร TAP-N เป็นระยะเวลา 7 วัน มีการสะสมลิพิดในรูปของไตรกลีเซอไรด์สูงถึง 40 ไมโครกรัมต่อล้านเซลล์ นอกจากนี้ ยังมีการทดลองของ Converti et al. (2009) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 1.5, 0.75 และ 0.375 กรัมต่อลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตที่ 0.375 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ *C. vulgaris* มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงที่สุดคือ 15.31±0.51 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เนื่องจากเมื่อแหล่งไนโตรเจนในที่นี้คือโซเดียมไนเตรต มีปริมาณลดลง สาหร่ายจึงเกิดความเครียด ทำให้มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

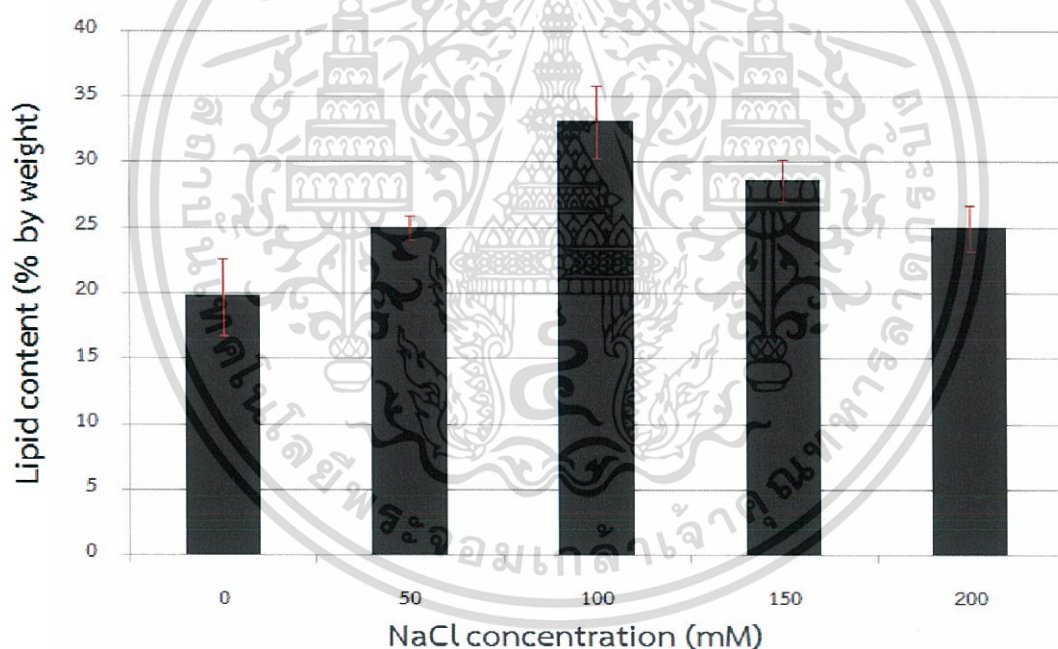
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการขาดหรือจำกัดไนโตรเจนพบว่า ไม่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างของรูปร่าง ลักษณะ และ รงควัตถุ ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ในสภาวะต่างๆ ได้ เนื่องจากปริมาณไขมันทั้งหมดที่สะสมในสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ในสภาวะต่างๆ มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนสมบูรณ์ (TAP) อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (TAP limit N) และอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) แสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP (a) *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP limit N (b) และ *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N (c) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

### 4.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมลิพิด

จากการทดลองนำสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP จนถึงชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้น ทำการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ แล้วเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 2 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายมาวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดพบว่า *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่นๆ (รูปที่ 4.5) โดยมีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงถึง  $33.09 \pm 2.72$  เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ให้สูงกว่า 100 มิลลิโมลาร์ ในการทดลองครั้งนี้ คือ 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณไขมันทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 ปริมาณไขมันทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

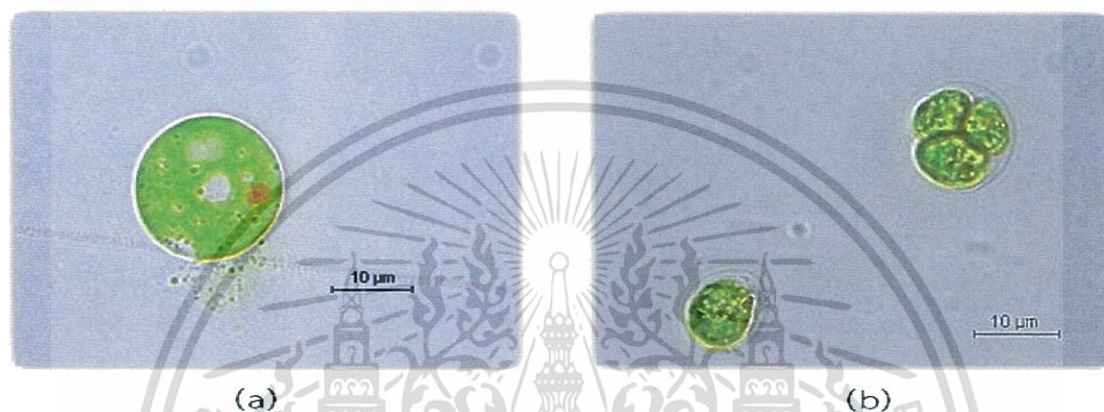
ตารางที่ 4.3 ปริมาณไขมันทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณไขมันทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
0	19.73±2.94
50	24.99±0.89
100	33.09±2.72
150	28.64±1.57
200	24.92±1.76

จากการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 อาจส่งผลให้สาหร่ายเกิดความเครียดเนื่องจากแรงดันออสโมติก (Osmotic stress) เพื่อเป็นการป้องกันน้ำออกจากเซลล์ สาหร่ายจึงมีความจำเป็นต้องสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เพื่อให้เกิดความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของสารภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ด้วยสาเหตุเหล่านี้ อาจส่งผลให้สาหร่ายมีการสังเคราะห์กรดไขมันและลิพิดเพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณไขมันทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น จากการทดลองของ Saut et al (2011) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหารเหลว TAP ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ทำให้สาหร่ายมีปริมาณแป้งและลิพิดในรูปของไตรกลีเซอไรด์สูงสุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่นๆ และจากการทดลองของ Takagi et al. (2006) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella teriolecta* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่ 0.5 และ 1.0 โมลาร์ โดยทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในการเพาะเลี้ยงที่สาหร่ายที่เซลล์เจริญอยู่ในระยะ Mid-log phase หรือสิ้นสุดระยะ Log phase โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ จะทำให้ได้ปริมาณไขมัน 67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ซึ่งให้ไขมัน 60 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 และ 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่อยู่ในสภาวะที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ เซลล์จะมีรูปร่างลักษณะความสมบูรณ์ สามารถมองเห็นองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์บางชนิดได้อย่างชัดเจน แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เซลล์ของสาหร่ายไม่มีความสมบูรณ์ เซลล์มีลักษณะผิดปกติหดตัวลงและมีขนาดเล็กลง



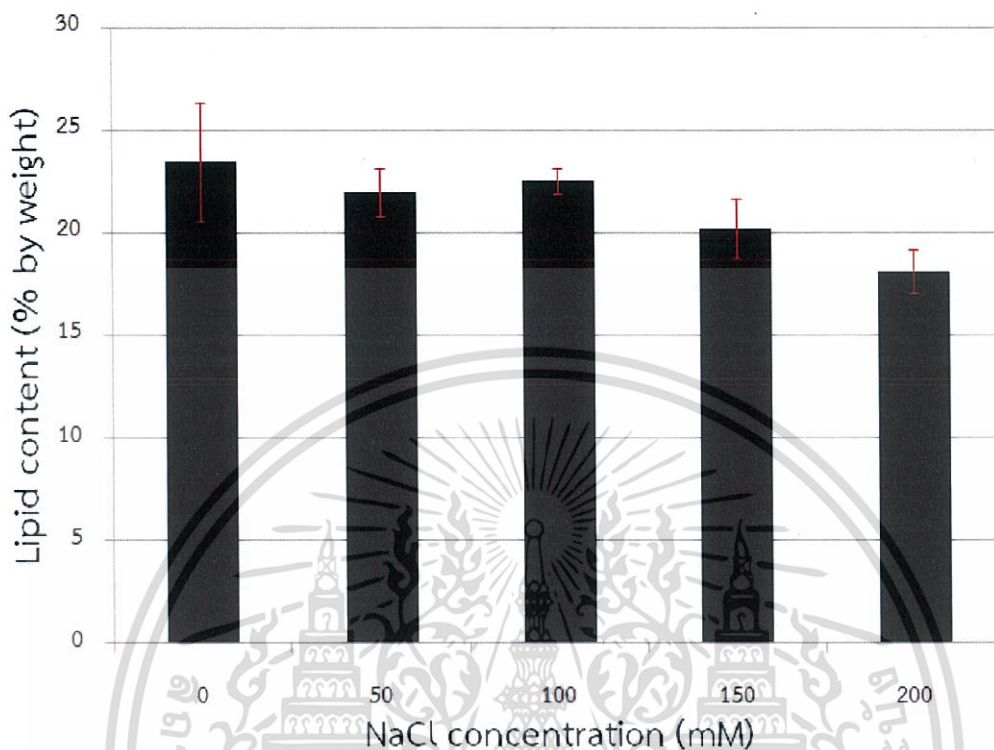
รูปที่ 4.6 ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 มิลลิโมลาร์ (a) *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ (b) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

#### 4.4 ผลของการขาดไนโตรเจนร่วมกับความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมลิพิด

จากการนำสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N จนถึงชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้น ทำการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 2 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณไขมันทั้งหมดของสาหร่าย (รูปที่ 4.7) โดยพบว่าปริมาณไขมันทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น (ตารางที่ 4.4) โดยอาจมีสาเหตุจากเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ขาดสารอาหารและมีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ทำให้สาหร่ายเกิดความเครียดมากเกินไปจนไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ได้เป็นปกติ ระบบเมทาบอลิซึม รวมไปถึงเอนไซม์ชนิดต่างๆ ภายในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสาหร่ายอาจทำงานได้ไม่ดีเมื่อถูกเพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะดังกล่าว ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดไขมัน และลิพิดในสาหร่ายต่ำลง ทำให้ปริมาณไขมันทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณลดลง



รูปที่ 4.7 ปริมาณไขมันทั้งหมดของ *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณไขมันทั้งหมดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณไขมันทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
0	23.41±2.89
50	21.95±1.16
100	22.49±0.63
150	20.18±1.45
200	18.07±1.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 การศึกษาชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

จากการนำสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP, อาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจน (TAP-N) และอาหารเหลว TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (TAP+NaCl) มาวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph-Flame Ionization Detector (GC-FID) พบว่าชนิดของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ เป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 14 ถึง 18 อะตอม (ตารางที่ 4.5) โดยชนิดของกรดไขมันที่พบได้มากที่สุดคือ กรดปาล์มติก (C16:0) กรดปาล์มทีโอเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) (ตารางที่ 4.6) ซึ่งกรดไขมันที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นตัวบ่งชี้ว่าลิพิดจากสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซล (Knothe, 2009) จากการทดลอง Siat et al. (2011) ได้ทำการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันจากลิพิดที่ได้จาก *C. reinhardtii* cw15 โดยพบว่าชนิดของกรดไขมันที่พบได้มากที่สุดคือ กรดปาล์มติก (C16:0) กรดปาล์มทีโอเลอิก (C16:1) กรดปาล์มทีเตตระอีโนอิก (C16:4) กรดโอเลอิก (C18:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) และ กรดลิโนเลนิก (C18:3) และจากการทดลองของ Nguyen et al. (2013) ได้ทำการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่าย *C. reinhardtii* WT และ *C. reinhardtii* 1C11 กรดไขมันที่พบมากที่สุดคือ กรดปาล์มติก (C16:0) กรดปาล์มทีเตตระอีโนอิก (C16:4) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และ กรดลิโนเลอิก (C18:2)

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125

Retention time (min)	Equivalent chain lengths	Detector response			Identity
		TAP	TAP-N	TAP+NaCl	
2.30	14.30	8,572	10,236	14,697	C14:0
2.52	15.06	89,663	6,903	16,655	C15:0
2.66	15.50	18,449	13,837	28,650	C14:0 3OH/C16:1 iso I
2.74	15.74	16,286	9,868	42,771	ND
2.81	15.96	65,477	65,826	74,105	ND
2.83	16.04	185,106	368,918	362,816	C16:0
2.85	16.08	33,951	56,839	58,347	ND
2.87	16.16	22,872	157,879	106,903	C16:1 $\Delta^9$
2.91	16.28	21,657	12,481	27,168	ND
2.93	16.33	307,343	312,949	306,113	C16:1 (3t)
2.97	16.46	22,428	16,929	29,364	ND
2.99	16.52	39,453	32,459	56,361	C16:2 $\Delta^{7,10}$
3.01	16.60	27,625	42,871	73,395	C16:3 $\Delta^{4,7,10}$
3.08	16.80	52,189	41,721	86,442	C16:3 $\Delta^{7,10,13}$
3.38	17.76	54,059	25,632	54,464	C16:4 $\Delta^{4,7,10,13}$
3.44	17.96	153,351	247,818	184,099	C18:0
3.47	18.04	23,385	42,580	35,314	ND
3.49	18.09	151,166	152,309	155,858	ND
3.50	18.13	26,108	37,153	41,689	ND
3.51	18.18	316,243	384,014	438,252	C18:1
3.55	18.28	137,281	265,767	491,625	C18:2 $\Delta^{9,12}$
3.56	18.33	15,987	29,084	38,169	ND
Total detector response		1,788,651	2,334,073	2,723,257	-

ND = Not detected

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากตารางที่ 4.5 จะได้ปริมาณของกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) ของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณกรดไขมัน (%)		
	TAP	TAP-N	TAP+NaCl
C14:0	0.48	0.44	0.54
C15:0	5.01	0.30	0.61
C14:0 3OH/C16:1 iso I	1.03	0.59	1.06
C16:0	10.35	15.81	13.39
C16:1 $\Delta^9$	1.28	6.76	3.94
C16:1 (3t)	17.18	13.41	11.29
C16:2 $\Delta^{7,10}$	2.21	1.39	2.08
C16:3 $\Delta^{4,7,10}$	1.54	1.84	2.71
C16:3 $\Delta^{7,10,13}$	2.92	1.79	3.17
C16:4 $\Delta^{4,7,10,13}$	3.02	1.10	2.00
C18:0	8.57	10.62	6.76
C18:1	17.68	16.45	16.09
C18:2 $\Delta^{9,12}$	7.68	11.39	18.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงการพิเศษนี้ได้ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพสูงในการสะสมลิพิดและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมลิพิดในสาหร่ายที่คัดเลือกได้ โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

1. สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 เป็นสายพันธุ์ที่มีการสะสมลิพิดในปริมาณสูงสุด ในบรรดาสาหร่ายสีเขียวที่ทำการศึกษา
2. การขาดไนโตรเจน มีผลทำให้สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 สะสมลิพิดในปริมาณที่สูงขึ้น โดยสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 มีปริมาณลิพิดสูงขึ้นไปถึง  $25.17 \pm 0.81$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง
3. ความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ทำให้สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125 สะสมลิพิดเพิ่มมากขึ้น โดย *C. reinhardtii* CC-125 มีการสะสมลิพิดสูงสุดเท่ากับ  $33.09 \pm 2.72$  เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง
4. การขาดไนโตรเจนร่วมกับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ไม่มีการส่งเสริมให้มีการสะสมลิพิดของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-125

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการสะสมลิพิดในสาหร่าย เช่น pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นแสง และ โลหะหนัก เป็นต้น
2. ควรศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณไขมันชนิดต่างๆ เช่น Neutral lipid โดยเฉพาะ ไตรกลีเซอไรด์ Polar lipid หรือ วิธีการวัดค่า Lipid yield และ Productivity
3. ควรศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไว้ในอาหารที่มีราคาถูก เช่น กากน้ำตาล น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

ดาวัลย์ ฉิมภู. 2538. โมเลกุลชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเคมี. มหาวิทยาลัยนครสวรรค์.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนานพนธ์. 2559. กรดปาล์มิติก [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2038/palmitic-acid>.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนานพนธ์. 2559. กรดโอเลอิก [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1643/oleic-acid>.

ไพฑูรย์ สุขสถาวรพันธ์. 2537. การสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นที่อยู่ในตัวโดยยีสต์และวิธีทางเคมี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพมหานคร.

มนูเทพ กนกศิลป์. 2533. ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตกรดไขมันของยีสต์ *Rhodotorula gracilis*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะพลังงานและวัสดุ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สหรัยวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สุนีรัตน์ เรื่องสมบูรณ์. 2549. แพลงค์ตอนวิทยา. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สรัญญา พันธุ์พฤกษ์. 2557. เอกสารประกอบคำสอนวิชาชีวเคมี 2. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Alvarez, H.M., Steinbuchel, A. 2003. Triglyacylglycerols in prokaryotic microorganism. *Applied Microbiol. and Biotechnol.* 60, 367-376.

Antoni, D., Zverlov, V.V., and Schwarz, H. 2007. Biofuels from Microbes. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 77:23-35.

Antranik. 2012. Organic compound #2: Lipids. [online]. Available: <http://antranik.org/organic-compound-2-lipids/>.

Axelsson, M. and Gentili, F. 2014. A single-step Method for rapid extraction of total lipids from Green Microalgae. *Journal of PLOS one*, volume 9, issue 2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bellou, S., Baeshen, M.N., Elazzazy, A.M., Aggeli, D., Sayegh, F., Aggelis, G., 2014. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* 32 (8), 1476-1493.
- Brennan, L. and Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14: 557– 577.
- Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X. and Wang, J. 2012. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresource technology* 111: 208 – 214.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol.* 25; 294-306  
Chloroplast. [online]. Available: <http://biology.tutorvista.com/animal-and-plant-cells/chloroplasts.html>.
- Converti, A., A.A. Casazza, E.Y. Ortiz, P. Perego and M.D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* 48: 1146-1151.
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K. 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae *Bioresour. Technol.* 101: 4499 – 4507.
- El-Sheek, M.M., Rady, A.A. 1995. Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic process in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Phytoplankton*, 35 : 139-151.
- Fangrui, M. and Milford A. Hanna. 1999. Biodiesel production – A review of *Bioresour. Technol.* Volume 70, issue 1: 1-2.
- Fats and oils. 2016. Glycolipids based on glycerol. [online]. Available: <http://www.cyberlipid.org/glycolip/glyl0002.htm>.
- Greeves, N. 2015. Introductory structures. Linoleic acid X-ray Structure. [online]. Available: <http://www.chemtube3d.com/ClaydenLinoleic.html>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Guckert, J.B., Cooksey, K.E. 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *J. Phycol.* 26: 72-79.
- Harris, E.H. 1989. **The *Chlamydomonas* sourcebook.** A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press. San Diego. 780pp.
- He, Q., Yang, H., Wu, L. and Hu, C. 2015. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresour. Technol.* 191:218-228.
- Hsieh, C.H., Wu, W.T. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour. Technol.* 100: 3921-3926.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production : Perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.
- Huang, G.H., Chen, F.; Wei, D., Zhang, X., and Chen, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy.* 87:38–46.
- Joh, T., Yoshida, T., Yoshimoto, M., Miyamoto, T., Hatano, S. 1993. Composition and positional distribution of fatty acids in polar lipids from *Chlorella ellipsoidea* differing in chilling susceptibility and frost hardiness. *Physiol. Plant.* 89: 285-290.
- Kalpesh, K., Holger S. and Peer M. S. 2012. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *ISSN 1996-1073* : 1532-1553.
- Khotimchenko, S.V. and Yakovleva, I.M. 2004. Effect of solar irradiance on lipids of the green alga *Ulva fenestrata* Postels et Ruprecht. *Bot Mar.* 47:395–401.
- Knothe, G., 2009. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. SCI* 2 (7), 759–766.
- Liu, Z.Y., G.C. Wang, and B.C. Zhou. 2008. Effect of iron growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology.* 99: 4717-4722.
- Manske, Magnus. 2008. File: Sphingolipid.png. [online]. Available:

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphingolipid.png> นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 :217–232.
- Matthew, T., Zhou, W., Rupprecht, J., Lim, L., Thomas-Hall, S.R., Doebbe, A., Kruse, O., Hankamer, B., Marx, U.C., Smith, S.M., et al. 2009. The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H<sub>2</sub> Production by sulfur depletion. *J. Biol. Chem.* 284: 23415-23425.
- Mazurek, S. 2011. Lipogenesis: The pathway of fatty acid synthesis. [online]. Available: [http://www.metabolic-database.com/html/amp\\_regulation\\_lipogenesis.html](http://www.metabolic-database.com/html/amp_regulation_lipogenesis.html).
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganism. *Renewable Energy*. 34, 1-5.
- Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Gorelova, O.A., Reshetnikova, I.V., Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., and Cohen, Z. 2007. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 43:833–843.
- Miao, X., and Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97, 841-846.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C., Kebede-Westhead, E. 2008. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresour. Technol.* 99:8137–8142.
- Nguyen, H.M., Cuine, S., Beyly-Adriano A., Legeret, B., Billon, E., Auroy, P., Beisson, F., Peltier, G. and Li-Beisson, Y. 2013. The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Has a single omega-3 fatty acid desaturase that Localizes to the Chloroplast and impacts both plastidic and extraplastidic membrane lipids. *Plant Physiol.* 163(2): 914-928.
- Patel, A. 2014. Lipids chemistry and Structure function. [online]. Available: <http://www.slideshare.net/hafizayyub/lipids-chemistry>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำออกไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A. and Posewitz, M.C. 2010. Algae Metabolism [online]. Available: <http://algaeenergy.weebly.com/metabolism.html>.
- Renaud, S.M., Thin, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. 211: 195-214.
- Rochaix, J-D. 1995. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Ann Rev Genet* 29:209-30.
- Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y. and Peltier, G. 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *Journal of Biomed central* 1472-6750.
- Takagi, M., Karseno and Yohida, T. 2006. Effect of Salt Concentration on Intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* Cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 223-226.
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Wada, M. and Yamamoto, Y. 1996. Fatty acid and lipid composition of acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp. *J. Phycol.* 32: 598-601.
- Thomas, G. 2002. A new type of photoreceptor in algae. [online]. Available: <http://www.pnas.org/content/99/13/8463/F1.expansion.html>.
- Thomson, G.A.Jr. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochem. Biophys. Acta.* 1302 (1):17-45.
- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst Chem. Eng.* 40: 13-20.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101: 5494-5500.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP) (Harris, 1989)

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร/ลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร/ลิตร
Trace mineral solution	5	มิลลิลิตร/ลิตร
Tris-Base	2.42	กรัม/ลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)	1	มิลลิลิตร/ลิตร

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แอมโมเนียมคลอไรด์( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคนปรับ pH 6.5 ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	2.2	กรัม
กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.073	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายจะมีสีเหลืองเขียว เปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้น เติมสารตามด้านล่างตามลำดับ

20 มิลลิลิตร 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (1M stock: 6.8 กรัม/50 มิลลิลิตร)

30 มิลลิลิตร 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (1M stock: 8.7 กรัม/50 มิลลิลิตร)

(ปรับพีเอช7.2)สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

การคำนวณปริมาณไขมันทั้งหมด ( % by dry weight )

1. นำสารสกัดไขมันที่เหลืออยู่จากการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำสารสกัดไขมันที่อยู่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ไปทำแห้งด้วยการพ่นก๊าซไนโตรเจน และอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่ผ่านการทำแห้ง ไปทิ้งให้เย็นใน Desiccator ก่อนที่จะนำไปชั่งน้ำหนัก
4. เมื่อชั่งน้ำหนัก Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ให้นำน้ำหนักที่ได้หักลบกับน้ำหนักของ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จะได้น้ำหนักของไขมัน (W1)
5. คำนวณหาปริมาณไขมันทั้งหมด (% by dry weight) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณไขมันทั้งหมด (\% by dry weight)} = \frac{W1}{W2} \times 100$$

W1 คือ น้ำหนักไขมัน

W2 คือ น้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### สภาวะของ Gas-Chromatograph และผลการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

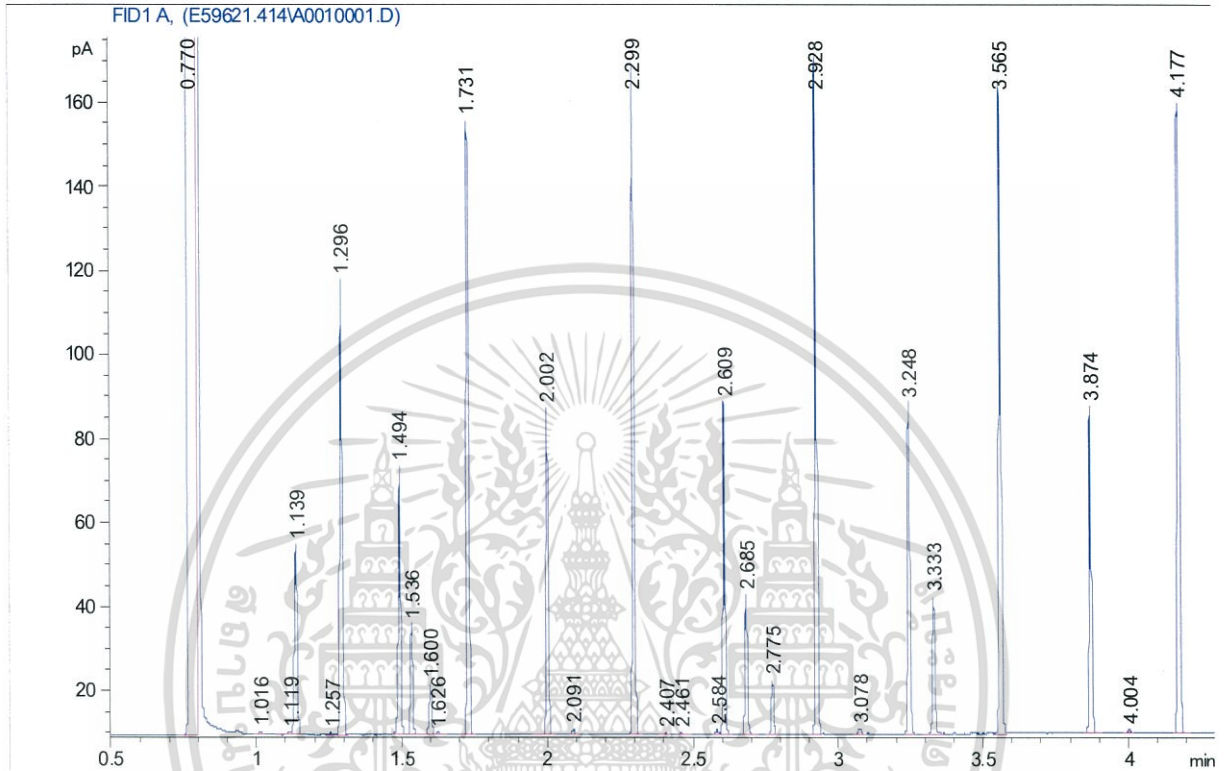
ตารางแสดงสภาวะของ Gas-Chromatograph

Gas Chromatograph	Agilent 6850 series II Networked GC System (Agilent Technologies, USA)
Column	HP-ULTRA2 25 m. x 0.22 mm. i.d. x0.33 $\mu$ m(film) Capillary column
Temperature program	Injector temperature : 250 °C Oven temperature : 170 °C (initial temperature) then increased from 170 °C to 288 °C at 28 °C /min , 288 °C to 310 °C at 60 °C /min , holding at 310 °C for 1.25 min Detector temperature : 300 °C
Injection mode	Mode : Split Sample volume : 2 $\mu$ l Split ratio : 40 : 1
Carrier Gas	Hydrogen 99.999 % purity (Labgaz (Thailand) Co.,Ltd.) Flow rate 30 ml/min
Calibration standard	1300-AA (Microbial ID, Inc., USA) Standard Fatty acid methyl-ester in hexane 0.001-0.008% (w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค (ต่อ)

### ผลการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

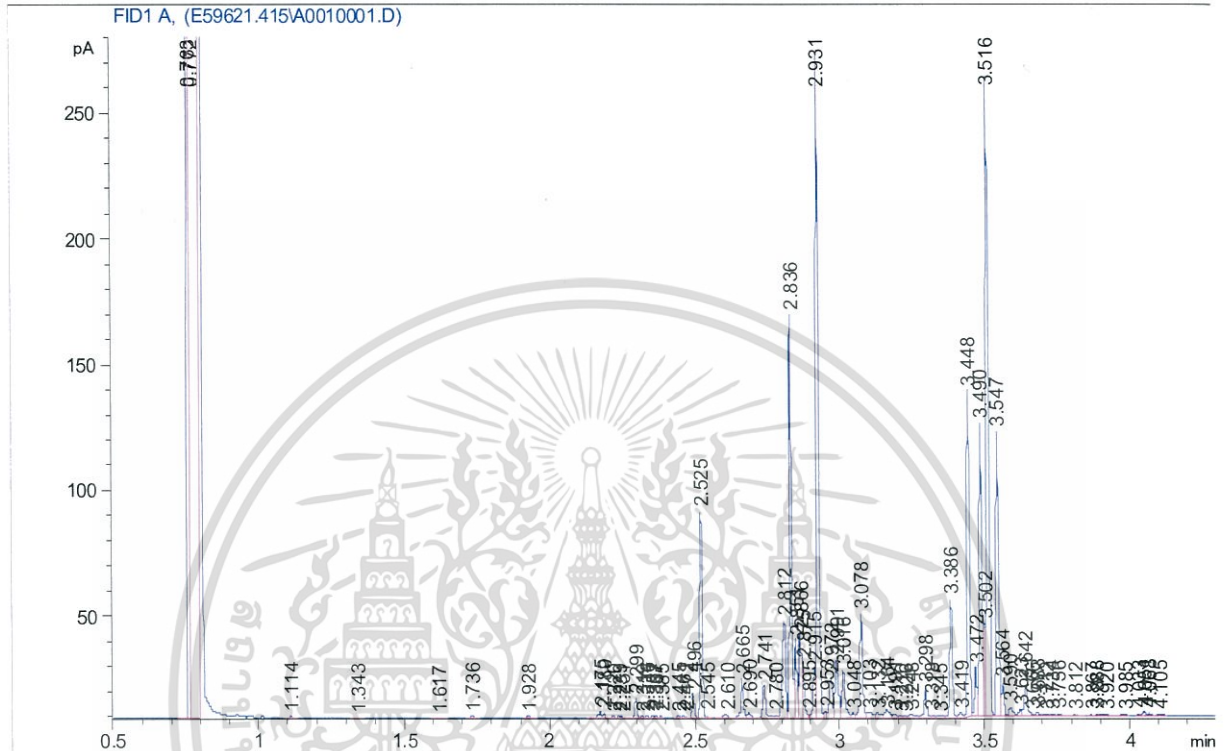


รูปภาพแสดงโครมาโทแกรม (Chromatogram) ของกรดไขมันมาตรฐาน (C9-C20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

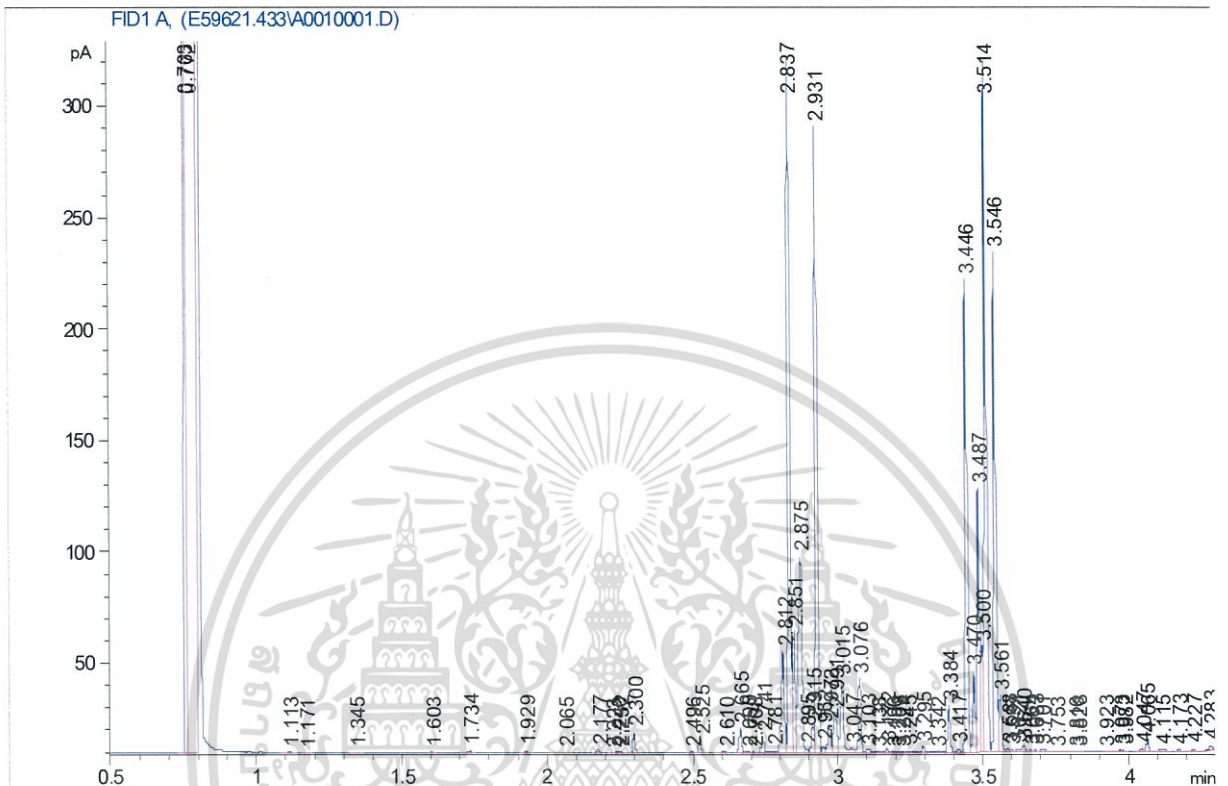
## ภาคผนวก ค (ต่อ)

### ผลการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน



## ภาคผนวก ค (ต่อ)

### ผลการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

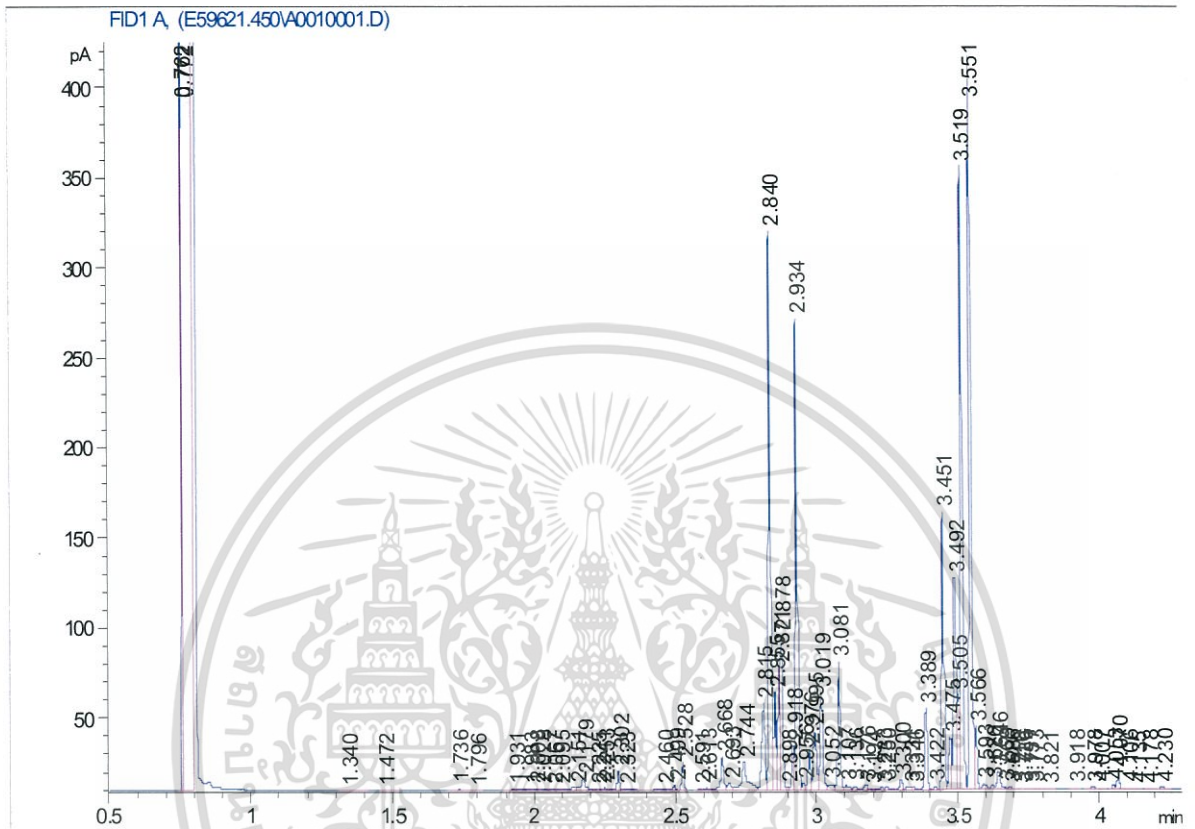


รูปภาพแสดงโครมาโทแกรม (Chromatogram) ของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค (ต่อ)

### ผลการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน



รูปภาพแสดงโครมาโทแกรม (Chromatogram) ของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ (TAP+NaCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้