การผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร

LIPID PRODUCTION FROM GREEN ALGAE UNDER NUTRIENT DEPRIVATION CONDITION

ณัฐริกา เผื่อนบิดา
เดชาธร สิงหรา
สุรีพร สุขช่วย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร

LIPID PRODUCTION FROM GREEN ALGAE UNDER NUTRIENT DEPRIVATION CONDITION

ณัฐริกา เผื่อนบิดา
เดชาธร สิงหรา
สุรีพร สุขช่วย

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LIPID PRODUCTION FROM GREEN ALGAE UNDER NUTRIENT DEPRIVATION CONDITION

NATTARIKA PEAUNBIDA
DACHATRON SINGHARA
SUREEPORN SUKCHUAY

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OFSCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ /ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา	**การผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร** Lipid production from green algae under nutrients deprivation condition
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐริกา เผื่อนบิดา รหัสนักศึกษา 57050600 นายเดชาธร สิงหรา รหัสนักศึกษา 57050602 นางสาวสุรีพร สุขช่วย รหัสนักศึกษา 57050655
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ชมพูนุท ไชยรักษ์ ประธานกรรมการ	
ดร.กลิ่นสุคนธ์ สุวรรณรัตน์ กรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ /ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา	การผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหาร Lipid production from green algae under nutrient deprivation condition
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐริกา เผื่อนบิดา รหัสนักศึกษา 57050600 นายเดชาธร สิงหรา รหัสนักศึกษา 57050602 นางสาวสุรีพร สุขช่วย รหัสนักศึกษา 57050655
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นวัตถุดิบที่กำลังเป็นที่นิยมในภาคอุตสาหกรรมปัจจุบันเพราะสามารถให้ผลผลิตหรือการแปรรูปที่คุ้มกับต้นทุน จากการพัฒนาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กพบว่า มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตไว ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย สามารถผลิตน้ำมันได้มากกว่าพืชน้ำมันทุกชนิดต่อพื้นที่การปลูกในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากชีวมวลโดยการสกัดไขมันจากสาหร่ายที่เรียกว่า“น้ำมันสาหร่าย” และยังมีผลการวิจัยทางแพทย์กล่าวว่าไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กมีธาตุอาหารและสารอาหารที่จำเป็นคือกรดไขมันโอเมก้า 3 สาหร่ายขนาดเล็กที่ผ่านกระบวนการการสกัดสามารถนำไปเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์หรือเป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ในพื้นที่เกษตรอินทรีย์ ลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร จากการนำสาหร่ายขนาดเล็กพันธุ์ KS03 เลี้ยงในธาตุอาหารที่แตกต่างกันคือ อาหารTAP, -Mn ,-S, -Fe,-Cu, -Zn, -Ca, -Mg, -K, -N และ -P เพื่อศึกษาว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตดีและให้ปริมาณไขมันมากในธาตุอาหารชนิดใด โดยสังเกตจากปริมาณไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สาหร่ายใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโต 5 วัน ทำการสกัดไขมันออกจากสาหร่ายด้วยวิธี Soxhlet Extraction ในอุตสาหกรรมการสกัดส่วนมากนิยมวิธีนี้เพราะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัย ตัวทำละลายผสมที่ใช้คือ Chloroform : Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง และทำการระเหยสารละลายในไขมัน นำไปชั่งน้ำหนักหาปริมาณไขมัน เมื่อได้ปริมาณไขมันนำค่าที่ได้ลงในกราฟเพื่อหาชนิดอาหารที่ให้ปริมาณไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่มากที่สุด 3 ลำดับคือสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร -N, -K และ-P หลังจากนั้นเข้าสู่การวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatograph-Mass Spectrometer เพื่อแยกองค์ประกอบของสารผสม เข้าสู่เครื่อง MS โดยไขมันที่จะทำการวิเคราะห์นั้นต้องถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ เพื่อให้เหมาะสมต่อคอลัมน์ที่ใช้การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

คำสำคัญ : สาหร่ายขนาดเล็ก, น้ำมันสาหร่าย, ผลิตภัณฑ์จากไขมันของสาหร่าย, กรดไขมัน, สาหร่ายKS03, สภาวะขาดธาตุอาหาร, การสกัดไขมันด้วยซอกห์เลต, อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเอทานอล, เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี-แมสสเปคโทรมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Lipid production from green algae under nutrient deprivation condition
Students	Miss Nattarika Peaunbida Student ID 57050600 Mr. Dachathon Singhara Student ID 57050602 Miss Sureeporn Sukchuay Student ID 57050655
Degree	Bachelor of Science
Department	Environmental Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

Abstract

Microalgaes are the main raw material in modern times because they can produce or transform product cover the expense. They grown up very fast, use less space for crop and manufacture oil more than all kind of oil crops. Microalgaes have the potential to produce biofuels from biomass by extracting lipid from algae called "Algal Oil". The results of medical research said that lipid from microalgaes contain essential nutrients are omega 3 fatty acids. Microalgaes are extracted can be used as animal feed or as a raw material for the production of organic fertilizers for use in organic farmland. We feed different nutrients in KS03, microalgae gene such as TAP,-Mn, -S, -Fe, -Cu, -Zn,- Ca, -Mg,- K, -N and -P for study which one is the best to feed in KS03 by using time growing up 5 days after that extract lipid from microalgaes by Soxhlet extraction. In the extraction industry, This is the most popular method because it has the most efficient and secure product. The solvent would be able to work were chloroform : ethanol in ratio 1 : 1. The extraction time was 3 hours. And evaporate the solution in the lipid. Measure weight lipid for put the amount of lipid in the graph. Determined which one can gave the highest lipid. From the graph N, K and P are highest lipid.Then analyze by Gas Chromatograph-Mass Spectrometer and GC-MS analysis required in the methyl ester form with VF-5MS column.

Keywords : Microalgaes, Algae oil, Fatty acid, KS03, Lipid production from green algae, Nutrient deprivation condition, Soxhlet Extraction, Chloroform:Ethanol Gas Chromatography-Mass Spectrometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถดำเนินมาได้สำเร็จลุล่วง เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำติชมที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งกำลังใจที่ดีจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ สำหรับคำแนะนำความรู้ที่เป็นประโยชน์ คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ การตรวจทาน และติชมผลงานในการจัดทำโครงงานพิเศษ รวมทั้งคอยเอาใจใส่และให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ผศ.ดร.ชมพูนุท ไชยรักษ์ และ ดร.กลิ่นสุคนธ์ สุวรรณรัตน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการตรวจทาน รวมไปถึงคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ เพื่อแก้ไขให้โครงงานพิเศษเล่มนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นางสาวปราณี บุญวัฒน์ และนายณัฐพล ไกรธรรม นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ในการทำโครงงานพิเศษ

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยอบรมสั่งสอน คอยแนะนำให้คำปรึกษาให้ความรักความอบอุ่น กำลังใจที่ดี ตลอดจนความอุปการะและให้การสนับสนุนมาโดยตลอด รวมถึงเพื่อนๆทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยให้กำลังใจในทุกๆเรื่อง จนสามารถทำโครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

ณัฐริกา เผื่อนบิดา
เดชาธร สิงหรา
สุรีพร สุขช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญ (ต่อ) ..... จ
สารบัญ (ต่อ) ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
สารบัญรูป (ต่อ) ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขต 1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ความสำคัญของสาหร่าย 4
2.1.1 ความสำคัญต่อระบบนิเวศ 4
2.1.2 เชื้อเพลิงชีวมวลทางเลือก หรือ พลังงานทดแทน 4
2.2 สาหร่ายสีเขียว 5
2.2.1 สาหร่าย KS03 5
2.3 ไบโอดีเซลและผลิตภัณฑ์จากสาหร่าย 7
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก 12
2.4.1 ชนิดของสาหร่าย 12
2.4.2 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง 12
2.4.3 วิธีเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 13
2.5 วิธีวัดการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย 16
2.5.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวัดการเจริญเติบโตเซลล์ 16
2.6 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) 21
2.7 การสกัดสารโดยใช้เครื่องซอกห์เลต (Soxhlet extraction) 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2.8 ข้อดีและข้อเสียของการใช้สาหร่ายในการผลิตไบโอดีเซล 23
2.8.1 ข้อดีของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่าย 23
2.8.2 ข้อเสียของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่าย 23
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24
2.9.1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์จำพวกไบโอดีเซลและโอเมก้าสามของไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก 24
2.9.2 การประเมินประสิทธิภาพของการใช้ตัวทำละลายที่เลือกในการสกัดไขมันจากชีวภาพสาหร่ายโดยวิธีการซอกห์เลต 25
2.9.3 การคัดเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีไขมันสูงแบบมหมวลเพื่อความเป็นไปได้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ 25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 27
3.1 สายพันธุ์สาหร่าย 27
3.1.1 KSO3 27
3.2 สารเคมี 27
3.2.1 สารเคมีที่ใช้ 27
3.2.2 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ 28
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 28
3.4 วิธีการเตรียมสารเคมี 29
3.4.1 สารละลายสต็อคที่ 1 29
3.4.2 สารละลายสต็อคที่ 2 29
3.4.3 สารละลายสต็อคที่ 3 29
3.4.4 สารละลายสต็อคที่ 4 29
3.4.5 สารละลายสต็อคที่ 5 29
3.4.6 สารละลายสต็อคที่ 6 29
3.4.7 สารละลายสต็อคที่ 7 29
3.4.8 สารละลายสต็อคที่ 8 29
3.4.9 สารละลายสต็อคที่ 9 29
3.4.10 สารละลายสต็อคที่10 29
3.4.11 สารละลายสต็อคที่ 11 29
3.4.12 สารละลายสต็อคที่ 12 30
3.4.13 สารละลายสต็อคที่ 13 30
3.4.14 สารละลายสต็อคที่ 14 30
3.5 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 31
3.6 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวKSO3 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

3.7 วิธีการวัดปริมาณของสาหร่ายสีเขียว KS03 ในอาหารสูตรต่างๆ 32
3.8 วิธีการศึกษาปริมาณไขมันที่สาหร่ายสีเขียว KS03 ผลิตได้ในสภาวะขาดธาตุอาหาร 32
3.9 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS 34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 36
4.1 ปริมาณไขมันจากสาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ 36
4.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry 39
4.3 องค์ประกอบของกรดไขมันที่สกัดได้ 42
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 43
5.1 สรุปผลการวิจัย 43
5.2 ข้อเสนอแนะ 43
เอกสารอ้างอิง 46
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย 49
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak Plate 50
ภาคผนวก ค การสกัดไขมันด้วยวิธีการ Soxhlet Extraction 52
ภาคผนวก ง วิธีการใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermoscientific) 54
ภาคผนวก จ ข้อมูลผลการทดลอง 55
ภาคผนวก ฉ ผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันในเซลล์สาหร่าย 58
ภาคผนวก ช สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 เปรียบเทียบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล....8
2.2 ปริมาณน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด.... 10
2.3 แสดงองค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์.... 11
3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ของเครื่อง Gas Chromatography-Mass.... 35
4.1 เทียบน้ำหนักไขมันภายเซลล์เป็นเปอร์เซ็นต์ในสาหร่าย KS03.... 37
4.2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไขมันในเซลล์ของสาหร่ายสองชนิดจากอาหารทั้งสองสูตร....38
4.3. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่พบในไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร....42
ค.1 ปริมาตรของค่า FAME ที่ใช้ในการเลือกตัวทำละลาย....52
จ-1 แสดงปริมาณค่า OD_{750} ที่ตรวจวัดได้....55
จ-2 แสดงปริมาณค่า OD_{750}....56
จ-3 แสดงปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp....56
ฉ-1 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในอาหาร TAP....58
ฉ-2 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในอาหาร TAP-N....60
ฉ-3 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในอาหาร TAP-P....62
ฉ-4 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในอาหาร TAP–K....64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp. 6
2.2 ลักษณะของสาหร่าย KS03 6
2.2 กระบวนการผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอลของ *Chlamydonas* reinhardii 9
2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดท่อแบบให้แสง 14
2.4 การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดในบ่อกวนผสม (raceway pond) 14
2.5 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย 16
2.6 UV-VIS spectrum 17
2.7 องค์ประกอบของเครื่อง UV-VIS spectrophotometer 18
2.8 Single-Beam spectrophotometer 19
2.9 Double beamspectrophotometer 20
2.10 Haemacytometer counting chamber 20
2.11 แสดงขั้นตอนการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายจากสาหร่าย 22
2.12 เครื่องซอกห์เลต 38
4.1. แผนภูมิแท่งแสดงน้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 40
4.2. แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหาร TAP 41
4.3 แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหารTAP-N 41
4.4 แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหาร TAP-K 42
4.5 แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหาร TAP-P 49
ข-1 การขีดอาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อ 50
ข-2 ขั้นตอนการขีดเพลตด้วยเทคนิค Streak Plate 51
ค-1 การสกัดตัวอย่างไขมันจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Soxhlet Extraction 52
ง-1 เครื่อง UV-Vis spectroscopy ที่ใช้ในการวัดDO 54
จ-1 กราฟน้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 57
ฉ-1 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP 59
ฉ-2 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-N 61
ฉ-3 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-P 63
ฉ-4 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-K 65
ช-1 คลอโรฟอร์ม ยี่ห้อ Carloerba เกรดวิเคราะห์ 66
ช-2 กรดแอซิติก (Glacial acetic acid) ยี่ห้อ Duksan เกรดวิเคราะห์ 66
ช-3 เฮกเซน ยี่ห้อ certified เกรดวิเคราะห์ 67
ช-4 เอทานอล ยี่ห้อ L-Pure เกรดอุตสาหกรรม 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

ช-5 เมทานอล ยี่ห้อ Fisher Scientific (UK) เกรดวิเคราะห์ 68
ช-6 ผงวุ้น (Agar) 68
ช-7 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow); MM-tech: Cleanline BS-120 69
ช-8 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave);Hiryama:Hiclave 69
ช-9 เครื่องผสมสาร (Vortex); thermo scientific 69
ช-10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge); Hermle: Z36HK 70
ช-11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermoscientific); UV-VIS Spectroscopy 70
ช-12 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง; Adventure: AR2140 71
ช-13 ชุดอุปกรณ์สกัดไขมัน (Soxhlet apparatus) 71
ช-14 โถดูดความชื้น (Desiccator) 72
ช-15 ถังแก๊ส อาร์กอน 72
ช-16 จานเลี้ยงเชื้อ (Plate) 73
ช-17 ปิเปตแก้วขนาด 1, 5, 10,15 และ 25 มิลลิลิตร 73
ช-18 ไมโครปิเปตขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร 74
ช-19 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) 74
ช-20 ตะเกียงแอลกอฮอล์ 75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันนั้นคำว่าพลังงานทางเลือกเป็นที่พูดถึงและสนใจในคนหมู่มากเพราะในปัจจุบันจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้นมีการนำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้เพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์ แต่การนำเอาทรัพยากรธรรมชาติมาประยุกต์ใช้เกิดปัญหาที่ตามมาเพราะมนุษย์ใช้พลังงานอย่างสิ้นเปลืองและทรัพยากรธรรมชาติก็ผลิตขึ้นไม่ทัน จึงเกิดพลังงานทางเลือก การหาพลังงานทดแทนที่ทั้งสะอาดต้นทุนต่ำมีประสิทธิภาพสูง เป็นเรื่องที่สำคัญและเป็นประโยชน์มาก ในปัจจุบันในประเทศไทยเราได้พลังงานส่วนใหญ่มาใช้จากถ่านหิน และน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งต่างมีปริมาณร่อยหรอ ก่อมลพิษและมีค่าใช้จ่ายสูงจึงมีผู้เริ่มต้นนำ “น้ำมันที่สาหร่ายผลิตได้” เข้ามาศึกษาในการใช้พลังงานทางเลือก

สาหร่ายขนาดเล็ก มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงสูงมากเพราะมีพื้นที่ผิวเยอะเมื่อสังเคราะห์ด้วยแสงออกมาจะมีโปรตีนจำพวกผนังเซลล์ และไขมัน สาหร่ายขนาดเล็กผลิตไขมันได้ในปริมาณ 20-30% ของน้ำหนักเซลล์ (Yusuf Chisti, 2007) สาหร่ายขนาดเล็กใช้เวลาเพียงประมาณ 4 ชั่วโมงในการแบ่งเซลล์ใหม่ออกมา โดยน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล ในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำสาหร่าย KS03 นำมาเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ให้มีจำนวนมากๆเพื่อเป็นตัวตั้งต้น หลังจากได้สาหร่ายตัวตั้งต้นแล้ว จึงนำสาหร่ายที่ได้ไปเลี้ยงในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ และนำไปวิเคราะห์ถึงความแตกต่างของสาหร่ายที่เจริญเติบโตในสภาวะขาดธาตุอาหาร หากทราบชนิดของไขมันและปริมาณเปรียบเทียบแล้ว ก็จะทราบถึงประโยชน์และความเหมาะสมว่าสามารถนำสาหร่ายที่ทำการวิเคราะห์ไปใช้ประโยชน์ทางด้านใดจึงจะคุ้มทุนที่สุด การทราบว่าสาหร่ายชนิดใดสามารถสกัดไขมันได้ในปริมาณมากพอและจำแนกประเภทของไขมันที่สกัดได้ก็จะสามารถนำสาหร่ายแต่ละชนิดไปเพาะเลี้ยงได้อย่างเหมาะสมตรงตามคุณสมบัติ เพื่อเป็นประโยชน์ในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มกำไรให้กับผู้ผลิตทั้งผู้อุปโภคบริโภคเองก็ยังได้สินค้าที่มีคุณภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาปริมาณไขมันที่ได้จากเซลล์สาหร่าย KS03
2. ศึกษาปริมาณไขมันที่ได้จากสภาวะการขาดธาตุอาหารต่างๆ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาการผลิตไขมันเฉพาะในสาหร่าย KS03
2. ศึกษาปริมาณไขมันที่ได้จากเซลล์สาหร่ายอายุ 5 วัน
3. ศึกษาอิทธิพลของธาตุอาหารที่ส่งผลต่อปริมาณไขมันในสาหร่าย
4. ศึกษาองค์ประกอบของไขมันที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อนำผลการวิจัยมาพัฒนาในด้านพลังงานทดแทน
2. เพื่อนำผลการวิจัยมาพัฒนาด้านอุตสาหกรรมสินค้าที่ได้จากไขมันของสาหร่าย KS03
3. เพื่อเป็นประโยชน์ในการหาความคุ้มทุนที่จะลงทุนในการสกัดไขมันจากสาหร่าย KS03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาหร่าย (Algae)

สาหร่าย หมายถึง สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ตรงกับภาษาอังกฤษว่า Algae และภาษากรีก Phykos เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Microscopic Algae: Microalgae) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง สามารถเปลี่ยนสารอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ ผลพลอยได้จากกระบวนการนี้ คือการปลดปล่อยออกซิเจนให้แก่สิ่งแวดล้อม ทำหน้าที่เป็นผู้ผลิตในระบบห่วงโซ่อาหาร แต่มีวิวัฒนาการต่ำกว่าพืชมากเนื่องจากไม่มีเอมบริโอ ไม่มีระบบท่อลำเลียง ไม่มี ราก ลำต้น ใบที่แท้จริง มีรูปร่างลักษณะหลายแบบด้วยกัน จากการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์และเปรียบเทียบโครงสร้างนิวคลีโอไทด์สาหร่ายสายพันธุ์ KS03 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กคลอเรลลา **สาหร่ายสายพันธุ์ KS03** เป็นสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะเป็นเซลล์กลมอยู่กันอย่างอิสระที่พบภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเจริญได้ทุกแห่งที่มีความชื้นและสภาพทางกายภาพ เคมี ที่มีความเหมาะสม ซึ่งส่วนมากเจริญได้ดีในน้ำทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม มีน้อยชนิดมากที่พบตามผิวของหินหรือเปลือกไม้ ส่วนสาหร่ายขนาดเล็กที่อยู่ได้ในสภาพที่ค่อนข้างแห้งแล้งจะมีการคงสภาพพักตัวไว้ (Dormant) สาหร่ายมีแหล่งอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ซึ่งจะมีคุณสมบัติทางเคมีหรือกายภาพที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น สาหร่ายที่ชอบอยู่บนบกพบอยู่บนดิน อาทิเช่นสาหร่ายคลอโรคอคคาเลสเป็นสาหร่ายกลุ่มที่อยู่บนบกได้ เป็นพวกสาหร่ายน้ำจืดซึ่งอาศัยในดินที่ชื้นแฉะ สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบทุกหนทุกแห่งที่มีความชื้นเพียงพอต่อการเจริญเติบโต เมื่อมีความชื้นน้อยจะอยู่ในสภาพสปอร์ แต่เมื่อมีความชื้นสูงก็สามารถเจริญเติบโตได้ดี ส่วนในแหล่งน้ำต่างๆจะมีสาหร่ายหลายชนิดเจริญอยู่ได้ซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความอุดมสมบูรณ์ของอินทรีย์สารในแหล่งน้ำนั้น สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่มีการปรับตัวให้มีการดำรงชีวิตที่ดีขึ้นแต่ละสปีชีส์จะมีการวิวัฒนาการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไปตั้งแต่สมัย Paleozoic สมัยเริ่มต้นของยุค Precambrian ซึ่งนับกาลเวลายังไม่ได้ โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดได้ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตแรกที่กำเนิดบนโลกในช่วงระยะเวลาที่พื้นผิวของโลกมีภูเขาไฟระเบิดอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นก็มีวิวัฒนาการไปตามสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน มีผลทำให้สาหร่ายมีความแตกต่างทางชีวภาพสูงมากโดยปัจจัยที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของสาหร่ายมีด้วยกันมากมายตามแต่สภาพแวดล้อมหรือระบบนิเวศที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะสาหร่ายที่เจริญในน้ำไหลและน้ำนิ่งจะมีความแตกต่างกันในด้านรูปร่าง ลักษณะ อย่างชัดเจนสาหร่ายจัดเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กสาหร่ายพวกที่พบลอยตามกระแสน้ำหรือแขวนลอยในน้ำชั้นบนใกล้ผิวน้ำในแหล่งต่างๆเรียกว่า แพลงก์ตอน (Plankton) สาหร่ายเป็น สิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศในน้ำ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพและขนาดทำให้แพลงก์ตอนไม่สามารถรักษาการเคลื่อนที่ในกระแสน้ำได้แพลงก์ตอนพืชเป็นกลุ่มที่มีสารสีในเซลล์ทำให้สามารถดูดซับพลังงานและใช้พลังงานแสงร่วมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและสร้างสารอินทรีย์ แพลงก์ตอนพืชนับว่ามีความสำคัญมากเพราะว่าเป็นอาหารเบื้องต้นในห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำ สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายถึงสาหร่ายกลุ่มที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งมีลักษณะการรวมตัวเป็นโคโลนี หรือทัลลัสที่แตกต่างกันไปซึ่งสาหร่ายขนาดใหญ่ส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายประเภทยึดเกาะกับพื้นท้องน้ำ ลักษณะของพื้นท้องน้ำมีความสำคัญ โดยจะมีผลต่อการกระจายของสาหร่ายขนาดใหญ่ และเนื่องจากสาหร่ายขนาดใหญ่ สามารถเจริญได้ดีบนกรวดและก้อนหิน ดังนั้นพื้นท้องน้ำที่มีลักษณะเป็นกรวดและก้อนหินจะพบ ความหลากหลายของสาหร่ายขนาดใหญ่ค่อนข้างสูง

2.1 ความสำคัญของสาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก แต่ความสำคัญนั้นยิ่งใหญ่โดยเฉพาะ ทางด้านเศรษฐกิจของประเทศต่างๆที่รู้จักนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ซึ่งประโยชน์ของสาหร่ายในแง่ต่างๆ มีดังนี้

2.1.1 ความสำคัญต่อระบบนิเวศ

สาหร่ายดำรงชีวิตแบบออโตโทรฟิค (Autotrophic Organism) เป็นสิ่งมีชีวิตที่ผลิตออกซิเจนให้กับสิ่งแวดล้อมอย่างสำคัญทีเดียวประมาณกว่า 50% ของออกซิเจนในน้ำเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยสาหร่ายนอกจากนี้สาหร่ายยังเป็นผู้ผลิต (Producer) และเป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหารขั้นต้นๆของสิ่งมีชีวิตในน้ำโดยเป็นอาหารของตัวอ่อนแมลง ลูกกุ้ง ลูกปลา หรือแม้แต่ปลาที่โตเต็มที่แล้วจะเห็นได้ว่า ผลผลิต (Productivity) จากทะเล มหาสมุทร แม่น้ำ ลำคลอง และทะเลสาบทั่วไปก็ตามจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่อยู่ในน้ำในแหล่งน้ำนั้นๆถ้าฤดูกาลใดมีแพลงก์ตอนพืชมากก็มักจะมีสิ่งมีชีวิตในน้ำ เช่น กุ้ง หอย ปู ปลา มากตามไปด้วย

2.1.2 เชื้อเพลิงชีวมวลทางเลือก หรือพลังงานทดแทน

แหล่งชีวมวลที่มีแนวโน้มในการผลิตเชื้อเพลิงทางเลือกคือ สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และมีการสะสมไขมันเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของไตรอะซีลกลีเซอรอล (Triacylglycerol: TAG) ที่ถูกเก็บไว้ในออร์แกเนลภายในเซลล์ เช่น ไดอะตอมบางสายพันธุ์ และสาหร่ายสีเขียวซึ่งถือว่าเป็นแหล่งไขมันที่เหมาะสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

Yusuf Chisti (2007, 2008) ได้เสนอแนวคิดเกี่ยวกับการนำไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กมาผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซลแทนน้ำมันที่สกัดจากพืช เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากพืชชั้นสูงทั่วไปคือมีโครงสร้างเซลล์และความต้องการปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมรวมทั้งสารอาหารต่างๆ ที่ไม่ซับซ้อนจึงทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและผลิตไขมันได้ในปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับไขมันหรือน้ำมันที่ได้จากพืชจำพวกข้าวโพด ถั่วเหลือง ปาล์ม และมะพร้าวตลอดจนการใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงที่น้อยกว่าพืช ซึ่งหัวใจสำคัญของการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กในทางอุตสาหกรรมคือ การเพิ่มผลผลิตชีวมวลและการเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมด (Lipid Content)

นักวิจัยหลายท่านพยายามที่จะนำวัตถุดิบเชื้อเพลิงชีวภาพจากการวิจัยในห้องปฏิบัติการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์โดยจุดเริ่มต้นที่สำคัญคือ การคัดแยกหาสายพันธุ์สาหร่ายที่มีส่วนประกอบไขมันทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งลิพิดที่เป็นกลางหรือไขมัน ที่มีความสามารถในการสะสมอย่างรวดเร็วและมีปริมาณมากภายใต้สภาวะต่างๆในการเพาะเลี้ยง (Chen *et al*., 2007) สาหร่ายสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวน และสามารถทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำเสียหรือน้ำกร่อยเพื่อผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพและสามารถทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลได้ (Brennan และ Owende, 2010: Costa และ Morais, 2011)

การผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายนี้มีต้นทุนการผลิตที่สูง เนื่องจากอุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนั้นมีราคาค่อนข้างสูงมาก ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้โดยการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายให้มากขึ้น (Yusuf Chisti, 2008) โดยจะต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อหาหนทางในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลผลิตของพลังงานเชื้อเพลิงให้มากที่สุด

ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กชนิด KS03 ที่สามารถผลิตไขมันในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ แล้ววิเคราะห์ถึงความแตกต่างในสภาวะขาดธาตุอาหารว่าสภาวะขาดธาตุอาหารชนิดที่สาหร่ายจะผลิตไขมันออกมาได้ปริมาณมากพอและทำการแยกประเภทไขมันที่สกัดได้

2.2 สาหร่ายสีเขียว

สามารถนำมาเป็นแหล่งวัตถุดิบทั้งไบโอดีเซลหรือแม้กระทั่งผลิตภัณฑ์มากมายในอุตสาหกรรม ค่าเฉลี่ยของไขมันที่สะสมในสาหร่ายแตกต่างกันไปตั้งแต่ร้อยละ 1 ถึง ร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้งหรือบางสายพันธุ์มีมากถึงร้อยละ90 ของน้ำหนักแห้งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์นั้นๆ (Yusuf Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008; Spolaore *et al.*, 2006)

ซึ่งสาหร่ายที่ได้นำมาศึกษา คือสาหร่ายสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่พบภายในสถาบันเทคโนโลยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเมื่อได้นำมาส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope) ทำให้พบว่ามีลักษณะของเซลล์สาหร่ายเป็นทรงกลมเดี่ยวอยู่แยกจากกันโดยอิสระจากการวิเคราะห์ Bootstrap NI Phylogenetic Tree โดยใช้ยีน18S Rdna พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ KS03 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella sonrokiniana* KU948991 มากที่สุด

2.2.1 สาหร่าย KS03

อนุกรมวิธาน

Division Chlorophyta

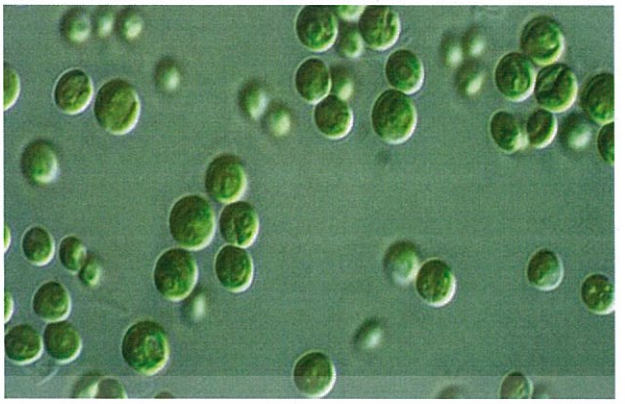
Class Chlorophyceae

Order Chlorococales

Family Oocystaceae

Genus Chlorella

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp.
ที่มา : Salvador, 2013

ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย *Chlorella* sp.

เซลล์ของ *Chlorella* sp. มีขนาดเล็กประมาณ 2-12 ไมโครเมตร รูปร่างทรงกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์มักอยู่ด้านข้างหรือเป็นรูปถ้วย อาจมีหรือไม่มีไพรีนอยด์ผนังเซลล์ค่อนข้างบาง ผนังเซลล์จะประกอบไปด้วยสารพวก Sporopollenin มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้าง 2 ถึง 8 ออโตสปอร์ (Autospore) ต่อเซลล์ ซึ่งจะปล่อยออกทางผนังของเซลล์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศยังไม่มีรายงานการค้นพบที่แน่ชัด (ลัดดา, 2544)

จากลักษณะของเซลล์สารหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีรูปร่างทรงกลม รวมถึงลักษณะพื้นฐานอื่นๆของเซลล์สาหร่าย มีความคล้ายคลึงกันกับลักษณะเซลล์สาหร่าย KS03 และเมื่อนำเซลล์สาหร่าย KS03 มาทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่าย KS03 มีความใกล้เคียงกันกับสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* จึงมีความเป็นไปได้ที่สาหร่าย KS03 จะถูกจัดอยู่ในวงศ์ของ *Chlorella* sp.

รูปที่ 2.2 ลักษณะของสาหร่าย KS03
ที่มา : วัชราภรณ์และคณะ, 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ไบโอดีเซลและผลิตภัณฑ์จากสาหร่าย

การนำพืชอาหาร เช่น มะพร้าว ถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานไบโอดีเซล ก่อให้เกิดการแข่งขันด้านราคาและส่งผลกระทบต่อความมั่งคงทางอาหาร (Food Security) ของประเทศ เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาการแข่งขันด้านราคาและการแย่งชิงปัจจัยการผลิต เช่น พื้นที่การเพาะปลูก น้ำ ปุ๋ย จากการนำพืชอาหารมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล จึงมีการแสวงหาแหล่งวัตถุดิบอื่นทดแทนพืชอาหารซึ่งพบว่าแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพน่าสนใจคือ ชีวมวล (Biomass) ที่เกิดจากการสังเคราะห์แสงซึ่งเป็นทรัพยากรที่ไม่หมดสิ้น (Renewable Resource) ซึ่งแหล่งของชีวมวลที่อยู่ในความสนใจในการนำมาพัฒนาเพื่อการผลิตพลังงานในหลายประเทศทั่วโลก ณ ขณะนี้ คือ ชีวมวลจากสาหร่าย (Algal Biomass) ด้วยเหตุผลนี้การผลิตพลังงานจากสาหร่ายจึงเป็นอีกความพยายามหนึ่งของนักวิจัยทั่วโลก (อาภารัตน์และคณะ, 2556 ; Mata *et al*., 2010)

โดยทั่วไปสาหร่ายแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae) และสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) สาเหตุที่สาหร่ายขนาดเล็กได้รับความสนใจในการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล เนื่องจากมีการผลิตน้ำมันได้มากกว่าสาหร่ายขนาดใหญ่ (Yusuf Chisti, 2007) โดยทั่วไปมักจะพบสาหร่ายขนาดเล็กตามแหล่งน้ำธรรมชาติ และคุณลักษณะเด่นที่ทำให้สาหร่ายขนาดเล็กแตกต่างจากสาหร่ายขนาดใหญ่หรือพืชน้ำอื่นๆ คือ ความรวดเร็วในการสะสมพลังงานภายในเซลล์ในรูปแบบของสารอินทรีย์ โดยเปลี่ยนพลังงานจากแสงอาทิตย์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงนอกจากนี้การเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กก็ไม่ยุ่งยากเมื่อเทียบกับการปลูกพืชที่ให้น้ำมันหรือไขมันชนิดอื่นๆ เพราะสาหร่ายสามารถเติบโตได้ และสามารถให้สารอาหารในรูปของแก๊สของเสีย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน ทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีความพิเศษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาก (ผกาวดีและพนิดา, 2551)

Yusuf Chisti (2007, 2008) รายงานว่าสาหร่ายที่มีเซลล์ขนาดเล็กเป็นทางเลือกที่ดีที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากประสิทธิภาพในการเปลี่ยนพลังงานแสงมาเป็นพลังงานเคมีโดยการสังเคราะห์แสง ผลผลิตน้ำมันที่ได้ (ลิตรต่อเฮกตาร์) และความต้องการพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงที่น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งหัวใจสำคัญของการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กทางอุตสาหกรรม คือการเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมด (Lipid Content)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 2.1 เปรียบเทียบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

แหล่งของน้ำมัน	ผลผลิตของน้ำมัน (ลิตรต่อเฮกตาร์)	พื้นที่ที่ต้องการ (ล้านเฮกตาร์)[1]	ร้อยละของพื้นที่การเพาะปลูกในสหรัฐอเมริกา
ข้าวโพด	172	1540	846
ถั่วเหลือง	446	594	326
คาโนลา (canola)	1190	223	122
สบู่ดำ	1892	140	77
มะพร้าว	2689	99	54
ปาล์มน้ำมัน	5950	45	24
สาหร่ายขนาดเล็ก[2]	136900	2	1.1
สาหร่ายขนาดใหญ่[3]	58700	4.5	2.5

ที่มา : Yusuf, 2007

[1]เพื่อใช้ในระบบขนส่งร้อยละ 50 ของเชื้อเพลิงที่ต้องการใช้ทั้งหมดในสหรัฐอเมริกา

[2]น้ำมันสาหร่ายร้อยละ 70 ของน้ำหนักเซลล์ (การผลิตในเครื่องปฏิชีวภาพแบบแสง)

[3]น้ำมันสาหร่ายร้อยละ 30 ของน้ำหนักเซลล์ (การผลิตในเครื่องปฏิชีวภาพแบบแสง)

เมื่อเปรียบเทียบสาหร่ายกับพืชน้ำมันประเภทอื่นๆพบว่าสาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตน้ำมันได้มากกว่าถึงร้อยละ 60 ต่อน้ำหนักอีกทั้งยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่อัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและสามารถใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญเติบโตได้ จึงควรค่าแก่การพัฒนาสาหร่ายเพื่อเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้กากสาหร่ายที่เหลือจากการสกัดน้ำมันยังสามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ย และวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์อื่นๆและช่วงลดการเกิดมลพิษทางอากาศด้วยแนวคิดในการออกแบบถังเพาะเลี้ยงให้ติดตั้งอยู่กับโรงไฟฟ้า เพื่อดักจับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนเกินอีกด้วยช่วยในการพัฒนาพลังงานจากสาหร่าย คือการหาสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและคำนึงถึงรูปแบบของการเพาะเลี้ยงที่คุ้มทุนและมีประสิทธิภาพ (อุรัจฉวี, 2555)

สาหร่ายน้ำมัน

สาหร่ายน้ำมันกลายเป็นวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจจากทั่วโลกในการนำมาค้นคว้าวิจัยเพื่อสร้างสรรค์พลังงานใหม่ในอนาคต สำหรับประเทศไทยมีสาหร่ายน้ำมันหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติของแต่ละพื้นที่แต่ละภูมิภาคของประเทศในการศึกษานี้สายพันธุ์สาหร่ายส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสาหร่ายสีเขียว

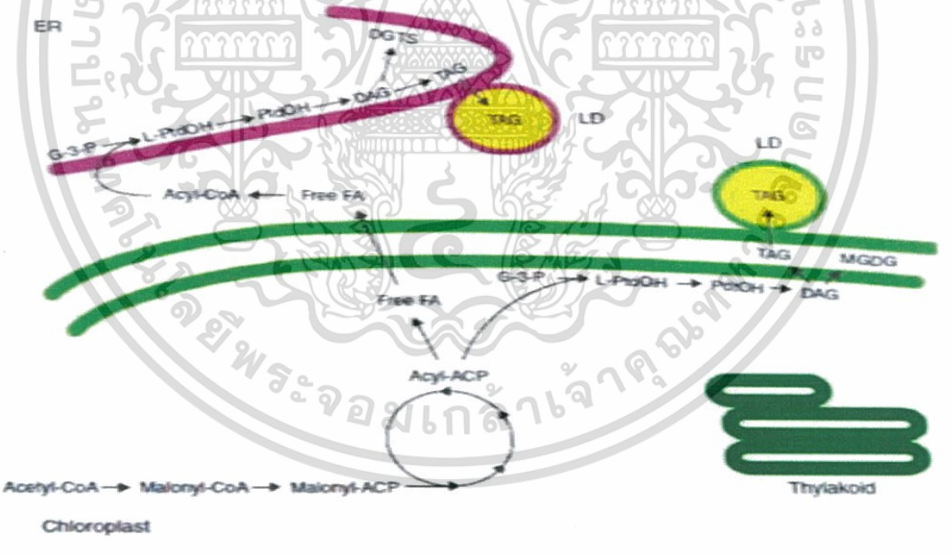
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*Chlorococcum* sp. ,*Chlorella* sp. *Monoraphidium* sp. ,*Scenedesmus* sp. และ *Selenastrum* sp.) และมีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่เป็นกลุ่มยูกลีนอยด์ (*Euglena* sp.) (Yusuf Christi, 2007; Xiaodong *et al*., 2009; McLarnon-Riches *et al*., 1998)

การผลิตน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก

โดยทั่วไปสาหร่ายแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalgae) และสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) สาหร่ายที่สาหร่ายขนาดเล็กได้รับความสนใจในการนำมาผลิตไบโอดีเซล เนื่องมาจากภายในเซลล์สาหร่ายบางสายพันธุ์ มีการสะสมน้ำมันไว้สูงเกือบร้อยละ 80 ของน้ำหนักแห้งโดยใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงและน้ำน้อย มีความสามารถในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมีการสังเคราะห์และสะสมไขมันที่มีสภาพเป็นกลาง (Neutral lipid) จำนวนมากส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไตรกลีเซอรอล (triacylglycerol lipid bodies) (Yusuf Chisti, 2007; Brennan และ Owende, 2010; Day *et al*., 1999; Hu *et al*., 2008)

Liu และ Benning (2012) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardii* ซึ่งการสังเคราะห์กรดไขมันจะเกิดขึ้นบริเวณคลอโรพลาสต์และเอนโดพลาสมิคเรติคูลัม โดยเริ่มจากเอซิล-โคเอจะจับกับ L-PtdOH แล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลตามลำดับ ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.3 กระบวนการผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอลของ *Chlamydonas reinhardii*
ที่มา: Liu และ Benning, 2012

สาหร่ายจะมีการผลิตน้ำมันออกมาเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น มีประมาณสารอาหารหรือธาตุอาหารที่มีจำกัดเซลล์สาหร่ายจะหยุดการแบ่งตัวและมีการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นน้ำมัน ส่งผลให้องค์ประกอบของน้ำมันในเซลล์สาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นเพื่อสะสมไว้เป็นแหล่งพลังงานการสังเคราะห์ไขมันจะเริ่มต้นจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซน์เอซิลไฮโตรเลส(Acyl Hydrolase) ซึ่งเป็นเอนไซน์ไดเอซิลกลีเซอรอลเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิลทรานเฟอร์เรส (Diaccylglycerol Acyltransferase) เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันและกระตุ้นกระบวนการฟอสโฟลิพิดไฮโดรไลซิส (Phospholipid Hydrolysis) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน เอซิล-โคเอ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนไปเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (Li *et al*., 2011)

สาหร่ายขนาดเล็กหลายสายพันธุ์มีไขมันเป็นส่วนประกอบของเซลล์ โดยปริมาณไขมันอาจสูงถึงร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้ง โดยสาหร่ายที่มีปริมาณไขมันเพียงพอหรือมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลคือ ไดอะตอมและสาหร่ายสีเขียวโดยในช่วงที่สาหร่ายเข้าระยะการเจริญคงที่เป็นที่นิยมที่สุดในการนำมาผลิตไบโอดีเซล เช่น *Botryococcus btounii* มีไขมันร้อยละ 25-75 ของน้ำหนักแห้ง *Chlorella* sp. ร้อยละ 10-48 ของน้ำหนักแห้ง *Euglena gracilis* ร้อยละ 14-20 ของน้ำหนักแห้ง *Nannochloris* sp. ร้อยละ 20-56 ของน้ำหนักแห้ง และ *Scenedesmus dimorphus* ร้อยละ 16-40 ของน้ำหนักแห้ง

ตารางแสดง 2.2 ปริมาณน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด

สาหร่ายขนาดเล็ก	ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)
Ankistrodesmus sp.	24-31
Botryococcus braunii	25-75
Chlamydomonas reinhardtii	21
Chlorella sp.	10-48
Chlorella vulgaris	5-58
Euglena gracilis	14-20
Nannochloris sp.	20-56
Scenedesmus dimorphus	16-40
Schizochytrium sp.	50-77

ที่มา : Xiaodong, 2009

จากรายงานการศึกษาวิจัยพบว่าการผลิตไบโอดีเซลจากพืชนั้นจำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกมากเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กซึ่งใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกน้อยกว่าหลายเท่าตัว (Yusuf Chisti, 2007) สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเจริญเติบโตได้ทุกที่ที่มีแสงแดดเพียงพอและบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในน้ำเค็มสาหร่ายทั้งหมดจะมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดนิวคลีอิกในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.2 (Demirbas, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์สาหร่าย	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	กรดนิวคลีอิก
Scenedesmus obliguus	50-56	10-17	12-14	3-6
Scenedesmus	47	-	1.9	-
Scenedesmus dimorphus	7-18	21-52	16-40	-
Chlamyomonas	48	17	21	-
Chlorella pyreniodosa	57	26	2	-
Chlorella vulgaris	51-58	12-17	14-22	4.5
Spirogyra sp.	6-20	33-64	11-21	-
Dunaliella bioculata	49	4	8	-
Dunaliella salina	57	32	6	-
Euglena gracilis	39-61	14-18	14-20	-
Prymnesium parvum	28-45	25-33	22-38	1-2
Tetraselmis maculate	52	15	3	-
Porphyridium cruentum	28-39	40-57	9-14	-
Spiulina platensis	46-63	8-14	4-9	2.5
Spiulina maxima	60-71	13-16	6-7	3-4.5
Synechoccus sp.	63	15	11	5
Anabaena cylindrical	43-65	25-30	4-7	-

ที่มา : Demirbas, 2011

Yusuf Chisti (2007, 2008) รายงานว่าสาหร่ายที่มีเซลล์ขนาดเล็กเป็นทางเลือกที่ดีที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากประสิทธิภาพในการเปลี่ยนพลังงานแสงมาเป็นพลังงานเคมีโดยการสังเคราะห์แสง ผลผลิตน้ำมันที่ได้ (ลิตรต่อเฮกตาร์) และความต้องการพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงที่น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆซึ่งหัวใจสำคัญของการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กในทางอุตสาหกรรมคือ การเพิ่มปริมาณไขมันทั้งหมด (Lipid Content)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก (พัฒนศักดิ์และสุนีรัตน์, 2560)

2.4.1 ชนิดของสาหร่าย

สาหร่ายที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตไขมันเพื่อเป็นพลังงานควรมีอัตราการเจริญโตสูง ให้ปริมาณไขมันสูงทนต่อสภาวะแวดล้อมและมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงสูงนอกจากนี้ควรให้ผลพลอยได้ที่มีมูลค่าสูงด้วยการคัดแยกสายพันธุ์จากธรรมชาติ (Novel Habitats And Ecosystem) ควรมีวิธีการคัดเลือกที่รวดเร็ว เพื่อค้นหาธาตุอาหารใดมีปริมาณไขมันสูง และมีการเก็บรวบรวมข้อมูล ความแตกต่างในแต่ละธาตุอาหารไว้ เช่น ปริมาณไขมัน และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม การปรับปรุงพันธุ์สาหร่ายที่แยกได้จากธรรมชาติเพื่อให้สาหร่ายมีการผลิตไขมันสูงขึ้น เช่น การใช้สารเคมีหรือแสงยูวี รวมทั้งการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม อีกทั้งควรศึกษาวิถีการสังเคราะห์ไขมันระดับยีนและการควบคุมผลของสภาวะแวดล้อมที่มีต่อการสร้างและสะสมไขมันองค์ประกอบของผนังเซลล์ซึ่งจะส่งผลต่อการสกัด

วิธีการแยกเชื้อสาหร่าย (Isolation Method) แบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้ (ขจรเกียรติ์, 2550)

2.4.1.1 Enrichment Method : วิธีนี้ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมเฉพาะสาหร่ายชนิดที่ต้องการ เช่น การเตรียมอาหารที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายชนิดที่ต้องการศึกษา ซึ่งจะทำให้สาหร่ายชนิดอื่นไม่เจริญหรือเจริญได้น้อย

2.4.1.2 Manipulative Method : วิธีแยกสาหร่ายชนิดที่ต้องการออกจากสาหร่ายชนิดอื่นๆโดยวิธีกล หรือวิธีการทางฟิสิกส์ เช่น การปั่น การใช้ปิเปต การเขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้นเป็นต้น

2.4.1.3 Antibiotic Method : วิธีใช้ยาปฏิชีวนะฆ่าสาหร่ายหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่เราไม่ต้องการ ซึ่งยาปฏิชีวนะที่นิยม คือ

-เพนนิซิลิน ฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดี โดยไปห้ามการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพวกแบคทีเรียแกรมบวก)

-สเตรปโตมัยซิน ฆ่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้ดี โดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซมชนิด 70s ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น

-คลอแรมเฟนนิคอล ฆ่าแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบโดยไปห้ามการทำงานของไรโบโซมชนิด 70s ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกัน

2.4.2 ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง(แพรพิลาศและผกาวดี, 2553)

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้เซลล์ในปริมาณมากและมีการสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ในปริมาณสูงนั้นมีปัจจัยสำคัญ คือ แหล่งอาหาร แสง อุณหภูมิ

2.4.2.1 แหล่งอาหาร (Nutrients) ไม่ว่าจะเป็นคาร์บอนหรือไนโตรเจนโดยคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งสาหร่ายสามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายได้ในน้ำซึ่งอยู่ในรูปของคาร์บอนเนตและไบคาร์บอนเนต นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วไนโตรเจนก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อการชักนำให้สะสมน้ำมันโดยจำเป็นต้องมีการควบคุมการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนหรือมีในปริมาณที่จำกัดจะมีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์น้ำมันของสาหร่ายเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงขึ้น (Widjaja *et al*., 2009) นอกจากนี้ไนโตรเจนมีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนเมตาบอลิซึมในเซลล์สาหร่าย อีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกรดอะมิโนโปรตีน และเอนไซม์ภายในเซลล์

2.4.2.2 แสง (Light) แสงมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไป ถ้ามีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยมีการให้แสงด้วยไฟควรให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ เพราะแสงที่ได้จะมีอุณหภูมิไม่สูงเหมือนแสงจากหลอดไฟชนิดอื่นนอกจากนี้การควบคุมช่วงเวลาการให้แสงสลับกับการหยุดให้แสงจะส่งผลให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีกว่าการให้แสงตลอดเวลาโดยช่วงแสงสว่างที่นิยมใช้คือ 16 ชั่วโมงสว่าง 8 ชั่วโมงมืด เป็นต้น

2.4.2.3 อุณหภูมิ (Temperature) มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์สาหร่ายและการทำงานของเอนไซม์รวมถึงโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆในเซลล์สาหร่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณในเซลล์สาหร่าย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายแต่ละชนิด

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดการสะสมน้ำมันไม่ว่าจะเป็นความเค็ม หรือบางครั้งอาจมีการเติมสารอาหารบางอย่างลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสะสมน้ำมันภายในเซลล์สาหร่ายให้สูงขึ้น

2.4.3. วิธีเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก (Barsanti และ Gualtieri, 2006)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละพันธุ์นั้นจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆให้มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง โดยปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายคือ คุณภาพและปริมาณของสารอาหาร แสง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง รวมถึงการกวนผสมเพื่อป้องกันการตกตะกอนของสาหร่ายด้วย ซึ่งระบบการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปแบ่งได้ดังนี้

2.4.3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิด (Close system) โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Photobioreactor) แบบต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบท่อ (Turbularphoto bioreactor) ข้อได้เปรียบการเพาะเลี้ยงในระบบปิดคือ เป็นระบบที่สะอาด ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย สามารถควบคุมจัดการสภาพแวดล้อม และปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโดทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพและปริมาณสูงการเพิ่มปริมาณการเกาะเลี้ยงให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (Scale up) ทำได้ยากและในระบบปิดส่วนใหญ่จะใช้เครื่องกำเนิดแสงรูปแบบต่างๆเพื่อให้สาหร่ายใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง (Borowitzka, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดท่อแบบให้แสง
ที่มา: นพ.วัลลภ, 2558

2.4.3.2 การเพาะเลี้ยงในระบบเปิด (Open System) เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อที่มีใบพัดกวนผสม (Paddle-Wheel Raceway Pond) แสดงดังรูปที่ หรือการเพาะเลี้ยงในบ่อที่ทำให้เกิดการหมุนวนของน้ำอยู่ตลอดเวลา (Circular Pond) ข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดคือ ใช้งบประมาณในการเพาะเลี้ยงต่ำ เพราะสามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงโดยตรง สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ปริมาณมาก ส่วนข้อจำกัดคือ การควบคุมสภาพแวดล้อมนั้นทำได้ยาก มีการปนเปื้อนสูง (Borowitzka, 1999)

รูปที่ 2.5 การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดในบ่อกวนผสม (raceway pond)
ที่มา: นพ.วัลลภ, 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายยังมีการแบ่งสภาวะในการเพาะเลี้ยงออกเป็น 3 สภาวะ ได้แก่

1. การเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค (Autotrophic Cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยง สาหร่ายโดยต้องการใช้แสง และคาร์บอนไดออกไซด์จากธรรมชาติเป็นหลัก ในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์สารชีวมวลต่างๆ (สาวิตรี, 2554)

2. การเพาะเลี้ยงแบบเฮทเทอโรโทรฟิค (Heterptrophic Cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น กลูโคส ซูโครส หรือกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานซึ่งจะเพาะเลี้ยงในที่ที่ไม่มีแสงหรือในที่มืดตลอดเวลา (Bouarab *et al*., 2004)

3. การเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิค (Mixotrophic Cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนและแสง เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานตามลำดับโดยที่แสงที่ใช้อาจเป็นแสงจากธรรมชาติ (แสงอาทิตย์) หรือแสงจากหลอดไฟ ภายในระยะเวลาที่เหมาะสม เช่น บ่อเปิด (Raceway) หรือในระบบปิด (Photo-bioreactor) ซึ่งต้องมีพารามิเตอร์ที่ต้องควบคุมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด (Optimum Productivity) เช่น ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มแสง อัตราการกวนและความปั่นป่วน (turbulence) การให้แสงและผลของออกซิเจนละลาย (สาวิตรี, 2554 :, พัฒนศักดิ์และสุนีรัตน์, 2560)

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบกะ (Batch Culture) สามารถแบ่งระยะการเติบโดออกเป็นระยะ (สุธาศิลและณัฐศิลป์, 2554) (รูปที่2.5)

1.ระยะปรับตัว (Lag Phase) เป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ เช่น แสง อุณหภูมิ และสารอาหาร เป็นต้น ระยะนี้สาหรายยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ดังนั้นจึงยังไม่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มช่วงระยะนี้เร็วเพียงใดขึ้นอยู่กับอายุหรือความแข็งแรงของเซลล์สาหร่ายตั้งต้นที่นำมาใช้และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่เลี้ยง ถ้าสภาพทั้งสองมีความเหมาะสม สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะที่สองได้เร็วขึ้น

2.ระยะเติบโตทวีคูณ (Exponential Phase หรือ Log Phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว เซลล์ใหม่จะถูกสร้างขึ้นในอัตราที่คงทีและเพิ่มเป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง และเป็นระยะที่เซลล์มีเมตาบอลิซึมสูงสุด จึงมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงด้วย ระยะนี้จะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและคุณสมบัติทางกายภาพของสภาพแวดล้อม รวมทั้งปริมาณของเสียที่สาหร่ายขับออกมา

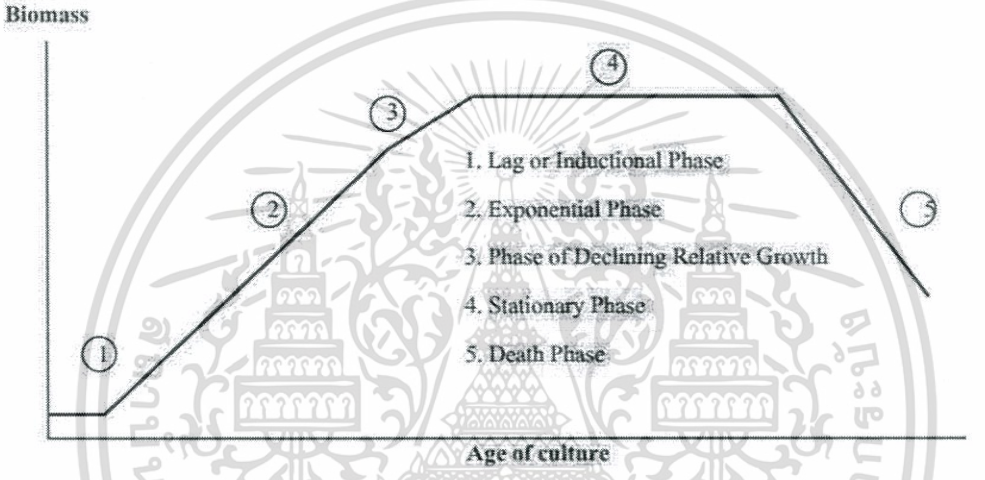
3.ระยะเฉื่อย (Retardation Phase) เป็นระยะที่สาหร่ายเริ่มมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนช้าลงและอัตราการเจริญเติบโตเริ่มที่จะลดลง

4.ระยะคงที่ (Stationary Phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีปริมาณสูงสุดและค่อนข้างคงที่ อัตราการเจริญเติบโตจะเท่ากับอัตราการตายรวมกับการแตกสลายของเซลล์ ดังนั้น อัตราการเพิ่มจำนวนจึงมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ ทั้งนี้เนื่องจากในระยะนี้สาหร่ายมีการปลดปล่อยสารพิษ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกมามากขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสในอาหาร หรือการได้รับแสงไม่เพียงพอ เนื่องจากการบดบังแสงซึ่งกันและกันของสาหร่าย อย่างไรก็ตามองค์ประกอบบางอย่างภายในเซลล์สาหร่าย อาจมีปริมาณเพิ่มขึ้นหรือบางอย่างอาจมีปริมาณลดลง เนื่องจากการขาดแคลนแร่ธาตุอาหารที่สำคัญ

5.ระยะตาย (Death Phase) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายเริ่มลดลง อัตราส่วนของการหายใจต่อการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น เนื่องจากอาหารของสาหร่ายหมดลง สารพิษที่ปล่อยออกมานอกเซลล์มีความเข้มข้นมากขึ้นจึงทำให้สาหร่ายเริ่มตายมากขึ้น



รูปที่ 2.6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

ที่มา : ลัดดา, 2543

2.5 วิธีวัดการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย มีหลายวิธีดังนี้

การนับเซลล์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมาก โดยใช้อุปกรณ์เป็นกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับก่อนที่จะทำการนับเซลล์ควรทำการล้างสไลด์ให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ตัวอย่างที่จะนับควรทำการดองด้วยน้ำยาฟอร์มาลีนร้อยละ 4 หยดตัวอย่างลงบนสไลด์และปิดด้วยกระจกสไลด์รอให้เซลล์ตกตะกอนก่อนแล้วจึงทำการนับเซลล์ ก่อนการนับควรดูด้วยกำลังขยายต่ำๆ เพื่อทำการสำรวจว่าเซลล์กระจายตัวสม่ำเสมอหรือไม่ และความหนาแน่นของเซลล์ไม่ควรมากเกินไปจนทำให้การนับเป็นไปได้ยาก ถ้าหนาเกินไป ก็ควรเตรียมสไลด์ใหม่ หรือการนับเซลล์อาจจะใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า โคลเตอร์ ซึ่งเป็นอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ นิยมใช้นับเซลล์ที่ไม่เป็นเส้นสาย และเซลล์ที่มีลักษณะกลม เป็นอุปกรณ์ที่สามารถนับเซลล์ได้อย่างรวดเร็วแต่มีราคาที่แพงมาก ผู้ใช้ต้องดูแลและทำความสะอาดเป็นอย่างดี เครื่องมือถึงจะมีความถูกต้องแม่นยำในการวัด

การวัดความขุ่นหรือการกระจายตัวของแสง เป็นการวัดที่นิยมในการวัดสาหร่ายที่มีความบริสุทธิ์ สามารถวัดได้ง่ายและข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลของชีวมวลที่เพิ่มขึ้น โดยการวัดจากค่า

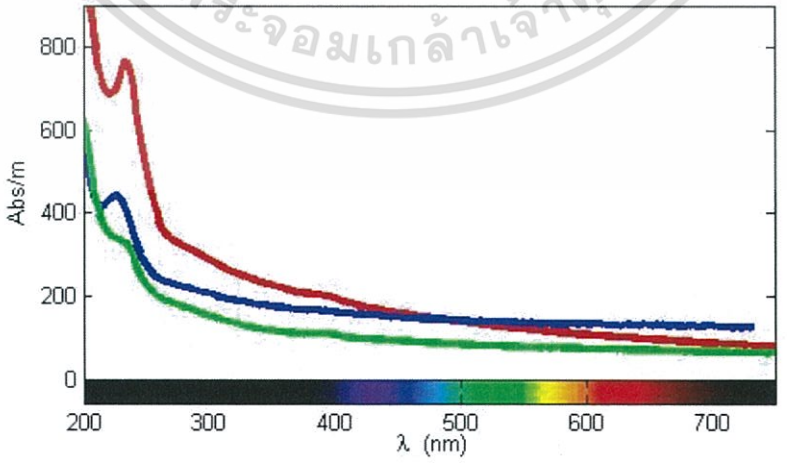
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักเซลล์แห้ง อุปกรณ์ที่ใช้เรียกว่า Colorimeter หรือเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ความเข้มแสงจะลดลงเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น

การวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง เหมาะสำหรับการวัดเซลล์ที่เป็นเส้นสายไม่สามารถนับจำนวนได้จากวิธีอื่นๆ วิธีการวัดจะทำการวัดทุกวันแล้วนำมาพล๊อตกราฟ โดยเก็บตัวอย่างที่จะทำการวัดโดยการกรองแบบปั่นเหวี่ยง และนำตัวอย่างไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิประมาณ 70-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 ชั่งโมง หรือจนน้ำหนักเซลล์คงที่ และนำแผ่นกรองออกจากตู้อบและนำไปใส่ในโถดูดความชื้นประมาณ 15-30 นาที รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร การวัดคลอโรฟิลล์ เป็นวิธีที่วัดได้อย่างรวดเร็ว โดยทำการเก็ยตัวอย่าง และทำการกรองเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง ต่อจากนั้นจึงสกัดสารสีโดยการเติมสารละลายเคมี ที่นิยมคือ อะซิโดน เมทานอลหรือ อีเทอร์ เมื่อสกัดสารสีออกมาแล้วจึงนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง เพื่อแยกตะกอนหรือสารปนเปื้อนออก นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าคลอโรฟิลล์ และเซลล์สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีปริมาณสารคลอโรฟิลล์แตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย ทั้งนี้ผู้ที่ทำการวัดจะต้องเลือกใช้ความยาวคลื่นแสงให้เหมาะสมกับแต่ละชนิดของสาหร่ายที่จะวัด

2.5.1เครื่องมือที่ใช้ในการวัดการเจริญเติบโตเซลล์

2.5.1.1 UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง Ultra Violet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190- 1000 นาโนเมตร ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนหรือสารอนินทรีย์ ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันและปริมาณการดูดกลืนรังสีก็ขึ้นอยู่กับความเข้มของสารนั้น การดูดกลืนแสงของสารต่างๆ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร จึงสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นเทคนิคที่ให้สภาพไวที่ดีและใช้กันอย่างแพร่หลาย ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่าความยาวคลื่น (Wavelength) ซึ่งเรียกว่า Spectrum (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.7 UV-VIS spectrum
ที่มา : Lukess, 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (รูปที่ 2.7) ประกอบด้วย

2.5.1.1.1 Light source

แหล่งกำเนิดรังสี เป็นส่วนที่ให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการออกมาอย่างต่อเนื่องและคงที่ รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอ หลอดกำเนิดรังสีมีหลายชนิดตามความยาวคลื่นรังสีที่เปล่งออกมา เช่น UV จะใช้หลอด H2 and D2 Lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 นาโนเมตร และช่วง Visible ใช้หลอด Tungsten/Halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 นาโนเมตร

2.5.1.1.2 Monochromator

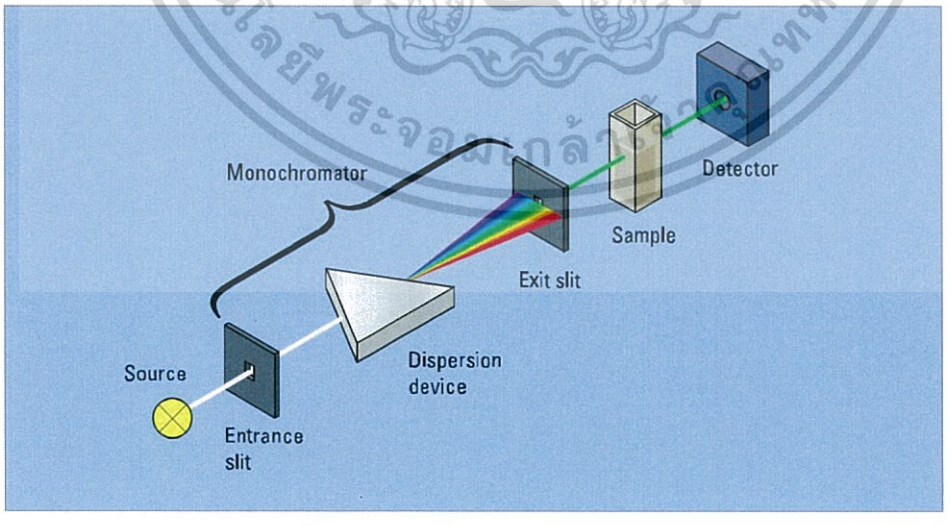
เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสงซึ่งเป็นพอลิโครเมติกให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆหรือมีความยาวคลื่นเดียวใช้ฟิลเตอร์ปริซึมหรือเกรตติ้ง

2.5.1.1.3 Cell sample

เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง บางครั้งอาจเรียกว่า Cuvettes ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ เซลล์ที่ทำด้วยแก้วจะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะแก้วจะดูดกลืนรังสีในช่วงยูวีได้และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกาและควอร์ต ซึ่งใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

2.5.1.1.4 Detector

ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้า เครื่องวัดรังสีมีหลายชนิดที่นิยม ได้แก่ Photomultiplier Tube และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (Silicon Diode Detector)



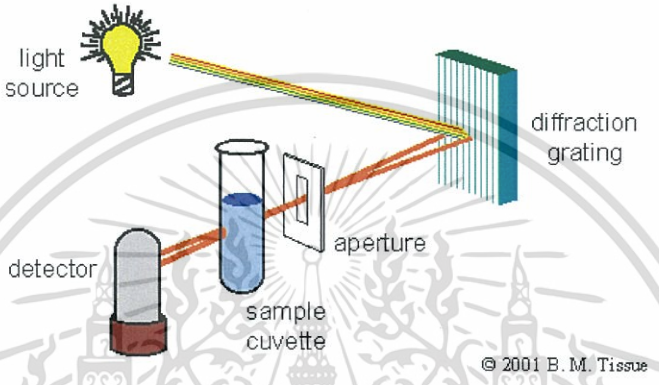
รูปที่ 2.8 องค์ประกอบของเครื่อง UV-VIS spectrophotometer
ที่มา : สุภาพร, 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องสเปคโทรโฟโทมิเตอร์ที่ใช้โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.5.1.2.1 Single-Beam Spectrophotometer

เมื่อลำรังสีออกจากแหล่งกำเนิดรังสีจะผ่านเลนส์โมโนโครเมเตอร์ที่เป็น Grating ผ่านสารตัวอย่าง แล้วจึงเข้าสู่อุปกรณ์ตรวจรับสัญญาณ เนื่องจากสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ประเภทนี้ใช้ลำรังสีเพียงลำเดียวผ่านจากโมโนโครมิเตอร์ไปสู่สารละลายที่ต้องการวัดรังสีนี้จะไปสู่อุปกรณ์ตรวจจับสัญญาณเลย การวัดแต่ละครั้งจึงต้องใช้เซลล์ 2 เซลล์ให้ลำรังสีผ่านสลับกัน

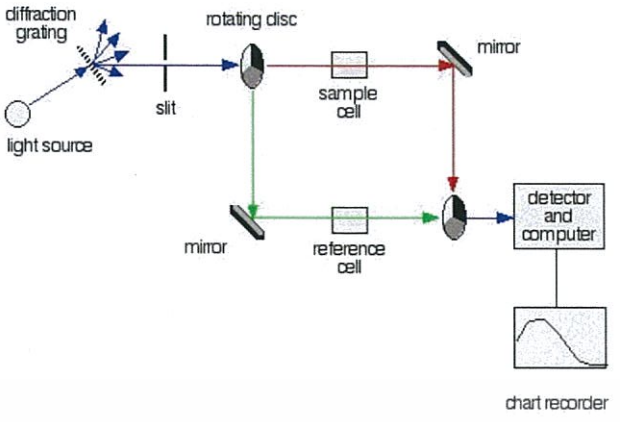


รูปที่ 2.9 Single-Beam spectrophotometer

ที่มา : Brian, 2000

2.5.1.2.2 Double-Beam Spectrophotometer ลำรังสีจะผ่านโมโนโครเมเตอร์ 2 ครั้งด้วยกัน ทำให้ได้ลำรังสีความยาวคลื่นเดียวอย่างมีประสิทธิภาพและความละเอียดมากขึ้น เมื่อออกจาก Exit Slit แล้ว ลำรังสีจะไปสู่อุปกรณ์ตัดลำรังสี (Beam Chopper) ก็จะสะท้อนไปผ่านสารตัวอย่าง ในขณะเดียวกันลำรังสีจะผ่านไปผ่านสารอ้างอิง ด้วยวิธีนี้ ลำรังสีลำเดียวที่ผ่านโมโนโครเมเตอร์จะถูกอุปกรณ์ตัดลำรังสีแยกออกเป็นลำรังสีสองลำที่มีความเข้มเท่ากันตลอดเวลา เมื่อลำรังสีทั้งสองนี้ไปตกกระทบ Phototube ความแตกต่างของความเข้มจะกลายเป็นสัญญาณส่งต่อไปยังอุปกรณ์บันทึกสัญญาณต่อไปในการใช้สเปคโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำรังสีคู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 Double beam spectrophotometer
ที่มา : Jim, 2006

2.5.1.3 Haemacytometer Counting Chamber สไลด์ Haemacytometer 1 อัน จะมีช่องสี่เหลี่ยมเล็กๆ 2 ช่อง อยู่พื้นที่ตรงกลางสไลด์ แต่ละช่องมีพื้นที่เท่ากับ 1 มิลลิเมตร ภายในแต่ละช่องจะมีตาราง แบ่งเป็นตาราง 5x5 โดยแต่ละตารางมีพื้นที่เท่ากับ 0.0025 ตาราง มิลลิเมตร จะมีความลึก 0.1000 มิลลิเมตร บริเวณรอบตารางสี่เหลี่ยมจะล้อมรอบด้วยร่องลึก ขนาดใหญ่ให้น้ำขังได้ นิยมใช้สำหรับสาหร่ายขนาดเล็ก (0.5-10 ไมครอน) สไลด์นับเซลล์แบบนี้จุน้ำได้ปริมาตรที่แน่นอนสามารถใช้นับสาหร่ายที่มีชีวิตและตายแล้ว

รูปที่ 2.11 Haemacytometer counting chamber
ที่มา : Jeff, 2018

ในการนับสาหร่ายจะหยดน้ำตัวอย่างลงไป 1 หยดและนับจำนวนเซลล์สาหร่ายที่อยู่บนตาราง สี่เหลี่ยมและสามารถคำนวนค่าเป็นจำนวนสาหร่ายต่อปริมาตรน้ำได้

ปริมาตรของ Haemacytometer counting chamber = ความกว้าง x ความยาว x ความลึก
(ภายในตารางสี่เหลี่ยม 1 ตาราง) = 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร
= 0.1 ตารางมิลลิเมตร หรือ 1/10 ตารางมิลลิเมตร
= 0.0001 ตารางเซนติเมตร หรือ $1/10^4$ ตารางเซนติเมตร
= $1/10^4$ มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

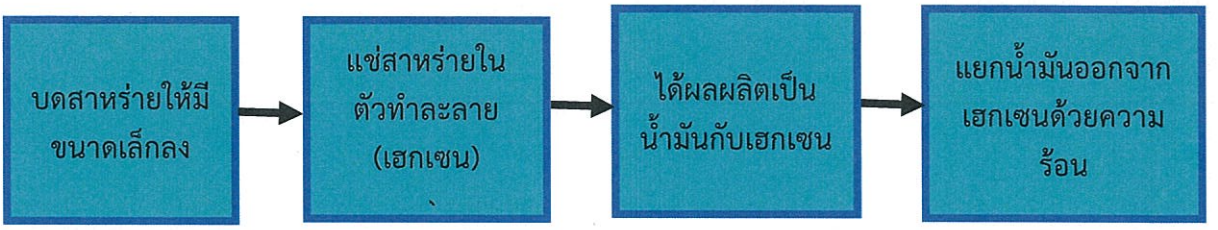
2.6 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

การสกัดตัวทำละลายเป็นการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีดั้งเดิม จะมีหลักการที่เกี่ยวข้อง 2 หลักการที่สำคัญคือ การสกัดด้วยทำละลาย (Solvent Extraction) และการวัดน้ำหนัก (Gravimetric Determination) หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบ (Crude Extraction) ที่ได้มาทำการแยกไขมันที่เป็นกลางและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง(Thin-Layer Chromatography, TLC) โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas Chromatography, GC) หรือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Lipid Chromatography, HPLC) แต่การดำเนินการด้วยวิธีนี้ยังมีปัญหาที่สำคัญคือใช้เวลาและใช้แรงงานมาก ทำให้ยากต่อการคัดแยกสาหร่ายที่มีจำนวนมาก อีกทั้งยังต้องศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายที่อาจจะมีผลต่อไขมันที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่าย เช่น การเกิดการปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) เป็นผลให้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านสนใจถึงการวัดแหล่งกำเนิดของไขมันด้วยวิธีอื่น (Blighและ Dyer, 1959 ; Cooksey *et al.*, 1987; Eltgroth *et al.*, 2005; Lzard Limberger, 2003)

Morowvat *et a.l*, (2010) ศึกษาปริมาณน้ำมันในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BG-11 ซึ่งมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อย่างไม่จำกัด ภายใต้การให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ซึ่งเป็นระยะที่สาหร่ายผลิตน้ำมันได้สูงที่สุด จึงนำสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ไปสกัดน้ำมันโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเอทานอล (1:2) พบว่าปริมาณน้ำมันที่สกัดได้คือ ร้อยละ 25 ของมวลชีวภาพ แล้วนำน้ำมันที่สกัดได้นั้นไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทรกราฟี เพื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. ประกอบด้วยกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์คือ กรดโดโคซาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (Docosanoic Acid Methyl Ester) กรดเต-ตราเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (Tetradecanoic Acid Methyl Ester) กรดเฮกซะเดตะโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (Hexadecanoic Acid Methyl Ester) และกรดโนนะโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (Nonanoic Acid Methyl Ester)

วิธีสกัดไขมันโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvents Extraction) ในทางอุตสาหกรรมมีการนำเอาตัวทำละลายมาช่วยในการสกัดน้ำมันให้ได้น้ำมันออกมามากที่สุด ส่วนใหญ่การใช้ตัวทำละลายจะสกัดได้มากกว่าร้อยละ 90 ของปริมาณน้ำมันที่มีในวัตถุดิบ การสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายเป็นการสกัดที่ใช้ในโรงงานผลิตน้ำมันพืชทั่วไป โดยนำวัตถุดิบที่เป็นส่วนที่ให้น้ำมันมาจากนั้นนำไปตากแดดหรืออบไล่ความชื้นก่อนแล้วจึงไปแช่ในตัวทำละลาย ตัวทำละลายมีอยู่หลายชนิด เช่น อีเทอร์ เบนซีน และที่นิยมมากที่สุดคือ เฮกเซน ก็จะได้สารละลายที่มีส่วนผสมของน้ำมันและเฮกเซนออกมาจากนั้นจึงนำไปแยกตัวทำละลายออกจากน้ำมันโดยการระเหยโดยใช้ความร้อน เพื่อแยกน้ำมันออกจากโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย แสดงดังรูป 2.11 (พิจักษ์และคณะ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 แสดงขั้นตอนการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายจากสาหร่าย (พิจักษ์และคณะ, 2554)

2.7 การสกัดสารโดยใช้เครื่องซอกห์เลต (Soxhlet Extraction)

เทคนิคการสกัดน้ำมันด้วยเครื่องซอกห์เลต เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันและมีการพัฒนาเทคนิคอื่นขึ้นมาทดแทนคือ การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง(SPE) โดยเทคนิคนี้เหมาะสำหรับแยกสารอินทรีย์ที่ไม่เสถียรที่ความร้อนสูงออกจากสารผสมที่เป็นของแข็ง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ค่อนข้างทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากมากนัก แต่ใช้เวลาสกัดนาน มีตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้มักมีความเป็นพิษทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

พิจักษ์และคณะ (2554) ได้ทำการทดลองสกัดน้ำมันจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. โดยใช้เครื่องสกัดน้ำมันซอกห์เลตพบว่าปริมาณน้ำมันจากสาหร่ายแห้งมีผลได้ประมาณร้อยละ 25 โดยน้ำหนักซึ่งปริมาณที่ได้น้อยกว่าผลการวิจัยข้างต้น อาจเป็นเพราะปริมาณสาหร่ายแห้งที่ใช้ในการสกัดมีค่อนข้างน้อย ปริมาณน้ำมันที่ได้น้อยตามไปด้วย เพราะมีน้ำมันบางส่วนติดอยู่ที่ก้นภาชนะที่ใช้การทดลองซึ่งเป็นผลให้มีปริมาณผลได้น้ำมันไม่ได้ตามที่กำหนด

หลักการของเครื่องมือซอกห์เลต เติมตัวทำละลายลงในเครื่องซอกห์เลต โดยตัวทำละลายจะมีการหมุนเวียนผ่านสารที่ต้องการสกัดตลอดเวลา สารสกัดที่ได้จะมีความเข้มข้นมากขึ้นส่วนตัวทำละลายจะมีการระเหย และเกิดการควบแน่นกลับมาใช้ได้อีก (กิตติกรและคณะ, 2551)

รูปที่ 2.13 เครื่องซอกห์เลต
ที่มา : Scitrader, 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 ข้อดีและข้อเสียของการใช้สาหร่ายในการผลิตไบโอดีเซล

2.8.1 ข้อดีของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่าย

2.8.1.1 ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูง

สาหร่ายมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูง ประมาณร้อยละ 3-8 ของพลังงานแสงอาทิตย์ที่ได้รับสามารถเปลี่ยนเป็นชีวมวลได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่สามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ได้เพียง ร้อยละ 0.5 โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งใช้สารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ที่อยู่ในน้ำเสียได้ จึงเป็นการช่วยบำบัดน้ำเสียและผลิตพลังงานไปพร้อมกัน ที่สำคัญ คือ สาหร่ายใช้เวลาในการเจริญเติบโตน้อยโดยแบ่งตัวเพียง 1-10 วัน และสะสมไขมันได้สูงถึงร้อยละ 40-80 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสาหร่ายให้ปริมาณน้ำมันต่อพื้นที่เพาะเลี้ยงมากกว่าพืช 10-20 เท่า นอกจากนี้สาหร่ายสามารถเลี้ยงได้ในน้ำเค็มหรือพื้นที่ที่ไม่เหมาะสมในการเพาะปลูกพืช และสามารถเพาะเลี้ยงได้ในระบบถังหมัก ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงจึงทำให้สามารถเลี้ยงได้ตลอดปี (พัฒนศักดิ์และสุนีรัตน์, 2560)

2.8.1.2 พื้นที่และระยะเวลา

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย ไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่มาก ทำได้ทุกฤดูกาล อีกทั้งยังใช้เวลาเพียง 1-2 สัปดาห์ ก็สามารถนำมาสกัดเป็นน้ำมันได้แล้ว ขณะที่พืชน้ำมันชนิดอื่นๆ ที่นำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล เช่น สบู่ดำ ปาล์มน้ำมัน การเพาะปลูกจะใช้เวลานานและใช้พื้นที่มาก (รัตนภรณ์, 2551)

2.8.1.3 สายพันธุ์

สำหรับประเทศไทยมีสายพันธุ์สาหร่ายประมาณ 1,000 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติของประเทศที่ใช้ในการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดีที่สุด เพื่อที่จะเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมากที่สุดประเทศหนึ่งเช่นกัน นอกจากคัดเลือกสายพันธุ์จากธรรมชาติแล้ว ยังมีการวิจัยเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิคด้านจีโนมิก (Genomic) และเมตาบอลิซึม (อาภารัตน์และคณะ, 2556)

2.8.1.4 สารอาหาร

สาหร่ายขนาดเล็กมีสิ่งที่ได้เปรียบพืชน้ำมันอื่นๆ หลายประการ นอกจากจะมีกรดไขมันสูงแล้วสาหร่ายขนาดเล็กยังเพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้สารอาหารที่ไม่ซับซ้อนมากนักคือ สามารถใช้ของเหลือทิ้งได้ เช่น น้ำเสียจากโรงงาน หรือใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น การเก็บเกี่ยวได้เร็วประมาณ 2-3 สัปดาห์ ก็เก็บเกี่ยวได้แล้ว เลี้ยงสาหร่ายยังสามารถเลี้ยงสาหร่ายรุ่นต่อๆไปได้อีกหลายครั้ง (นุชนาถ, 2557)

2.8.2 ข้อเสียของการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่าย

2.8.2.1 ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยง (พัฒนศักดิ์และสุนีรัตน์, 2560)

ประสิทธิภาพในการออกแบบและการทดสอบถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพแบบชนิดให้แสง (Photobioreactor) ยังมีไม่มาก จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงต่ำลง ต้นทุนในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายสูง (Separation) เพื่อให้เกิดความคุ้มทุนมากขึ้น จึงมีแนวคิดที่จะนำผลพลอยได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมาใช้ โดยสาหร่ายนั้นจะประกอบด้วย ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีน ไขมันที่ได้จะถูกแยกออกไปผลิตเป็นไบโอดีเซล ส่วนคาร์โบไฮเดรตนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล และโปรตีนนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์

2.8.2.2 ต้นทุน (รัตนภรณ์, 2551)

กระบวนการเลี้ยงสาหร่ายจำเป็นต้องมีคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูง หากนำคาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้น จำเป็นต้องให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ ซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากในการทำคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค “Clean Coal Gasification Systems” (วรวุฒิ, 2555) การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น เช่น มันสำปะหลัง ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายจะสูงกว่าเท่าตัว ในอนาคตหากมีการพัฒนากระบวนการผลิต เชื่อว่าจะสามารถลดต้นทุนให้ใกล้เคียงกับพืชพลังงานทดแทนอื่นๆได้แน่นอน

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์จำพวกไบโอดีเซลและโอเมก้าสามของไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก

Ian *et al.*, (2013) : ได้ทำการวิจัยและศึกษาเรื่องการเพิ่มประสิทธิภาพผลผลิตที่ได้จากไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยเขาได้เลือกสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิดที่นิยมนำมาทำไบโอดีเซลนั่นก็คือ *Nannochloropsis* sp.และ *Chlorella* sp.เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กทั้งสองชนิดนั้นสามารถพบได้มากในทะเลและแหล่งน้ำ นอกจากการให้ความสำคัญกับการนำสาหร่ายขนาดเล็กไปทำเป็นไบโอดีเซลแล้วพวกเขายังให้ความสนใจเกี่ยวกับโอเมก้าสามที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็กพวกนี้อีกด้วย โดยพวกเขาเชื่อว่าสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็กพวกนี้นั้นสามารถนำไปเพิ่มคุณค่าได้ เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากธรรมชาติหากมีปริมาณที่มากจนคุ้มค่าต่อการลงทุน พวกเขาจึงได้ทำลองเลี้ยงสาหร่ายทั้งสองชนิดในอาหารที่ทำให้เกิดสภาวะ 2 แบบ นั่นก็คือสภาวะขาดธาตุไนโตรเจน และสภาวะที่มีธาตุไนโตรเจนสมบูรณ์ เพื่อสังเกตว่าสภาวะใดที่สาหร่ายขนาดเล็กจะสามารถผลิตไขมันออกมาได้มากที่สุดและไขมันที่ผลิตขึ้นมานั้นเป็นไขมันประเภทใดบ้าง โดยเลี้ยงในอุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียสในวงจรที่มีแสงและไม่มีแสงอย่างละ 12 ชั่วโมงสลับกันในอาหารสูตร f-medium โดยอาหารทั้งสองสภาวะนั้นจะมีแหล่งไนโตรเจนมาจากไนเตรตเหมือนๆกันแต่ต่างกันที่ปริมาณที่ใส่ ปริมาณของอาหารที่เลี้ยงสาหร่ายในสภาวะขาดธาตุไนโตรเจนนั้นใส่ไนเตรต 0.5 มิลลิโมลาร์แต่อาหารที่เลี้ยงสาหร่ายในสภาวะที่มีไนโตรเจนสมบูรณ์นั้นใส่ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์ เมื่อเลี้ยงสาหร่ายจนครบ 10 วันจึงนำไปปั่นแยกเซลล์และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาเข้าสู่ขั้นตอนการสกัด โดยใช้วิธี Bligh and Dyer (1959) ในการสกัด นั่นคือการให้ไขมันที่ต้องการจะวิเคราะห์ละลายอยู่ในตัวทำละลายเมทานอลและคลอโรฟอร์มที่นำมาผสมกันรอให้แน่ใจว่าไขมันนั้นละลายอยู่ในตัวทำละลายได้หมดก่อนจะเติมน้ำกลั่นและนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้น โดยส่วนที่ต้องการจะนำมาใช้คือสารละลายคลอโรฟอร์มขั้นตอนต่อมาคือการลดปริมาตรสารละลายและตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีน้ำลงเหลือจากขั้นตอนนี้เพื่อไม่ให้รบกวนการวิเคราะห์เมื่อฉีดสารเข้าเครื่องวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gas Chomatography-Mass spectrometer (GC-MS) ในการวิเคราะห์ผลให้ ก่อนที่จะฉีดไขมันที่สกัดได้เข้าเครื่องวิเคราะห์นอกจากเราจะต้องแน่ใจว่าไม่มีน้ำอยู่ในแล้วยังต้องเปลี่ยนไขมันให้อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ เพื่อให้เหมาะสมกับคอลลัมน์ของเครื่อง GC-MS อีกด้วย และเมื่อได้ผลจากการวิเคราะห์ออกมาก็พบว่า สาหร่ายขนาดเล็กที่เลี้ยงในสภาวะขาดธาตุไนโตรเจนนั้นมีการผลิตไขมันโดยรวมมากกว่าในสภาวะที่มีไนโตรเจนสมบูรณ์และปริมาณไขมันประเภท Neutral Lipids มีค่าแตกต่างกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วจะพบว่าสาหร่าย*Chlorella* sp.สามารถผลิตไขมันทั้งในสภาวะขาดธาตุไนโตรเจนและสภาวะธาตุไนโตรเจนสมบูรณ์ได้ดีกว่า *Nannochlorosis* sp. อีกด้วย

2.9.2 การประเมินประสิทธิภาพของการใช้ตัวทำละลายที่เลือกในการสกัดไขมันจากมวลชีวภาพสาหร่ายโดยวิธีการซ็อกเลต

Krishan, Kandasamy และ Faizal (2013) : ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับเรื่องการใช้สารละลายในการสกัดไขมันจากสาหร่ายพวกเขาเลือกการวิธีการสกัดแบบซ็อกเลตในการสกัดไขมันเพราะว่าเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานและง่ายรวมถึงยังสามารถใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรมอีกด้วย โดยสาหร่ายที่พวกเขาสนใจนำมาเป็นตัวสกัดไขมันนั้นก็คือสารหร่าย *Chlorella* sp. เนื่องจากเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่รู้จักกันดีในวงการอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ต่างๆ เพราะสามารถผลิตไขมันได้ในปริมาณมาก เมื่อได้สาหร่ายที่จะทำการวิจัยแล้วขั้นตอนต่อไปก็คือการเลือกสารละลายที่เหมาะสมในการนำมาสกัด วิธีการเลือกสารละลายที่เหมาะสมสิ่งที่ควรทำเป็นอย่างแรกคือการดูลำดับค่าความมีขั้วของสารละลายต่างๆและค่าการละลายของสารนั้นๆด้วย หลังจากได้ค่าเหล่านี้แล้วจะให้สามารถเลือกสารละลายที่เหมาะสมต่อการนำไปสกัดด้วยวิธีการซ็อกเลตได้ สารละลายที่นำมาทำการสกัดมีด้วยกัน 2 แบบ คือสารละลายแบบผสมและไม่ผสม กำหนดช่วงเวลาประมาณ 1-5 ชั่วโมงเป็นเวลามาตรฐานในการสกัดเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด นอกจากการสกัดแล้วขั้นตอนที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งก็คือการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจวัดคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายโดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectroscopy ในการตรวจ และขั้นตอนสุดท้ายนั้นก็คือการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography เมื่อผ่านการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC แล้วสิ่งที่พบก็คือ สารละลาย เอทานอล, คลอโรฟอร์มและเฮกเซนเป็นสารละลายที่เหมาะสมในการนำมาสกัดไขมันมากกว่าสารละลายตัวอื่นๆ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดไขมันที่ดีอยู่ในช่วงประมาณ 3 ชั่วโมง ส่วนผลของสารละลายที่สามารถสกัดไขมันออกมาในปริมาณมากที่สุดคือสารละลายผสมระหว่าง คลอโรฟอร์ม:เอทานอลในอัตราส่วน 1:1 นั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.3 การคัดเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีไขมันสูงแบบชีวมวลเพื่อความเป็นไปได้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ

สุนีรัตน์, ศักดิ์ชัย, ปวีณาและมณฑล (2555) : ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย, สาหร่ายสีเขียว, สาหร่ายสีแดง, สาหร่ายสีน้ำตาล, ไดอะตอม มาทำการวิเคราะห์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้มากที่สุดและผลที่ออกมาพบว่าสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ในปริมาณที่มากที่สุด 13.2±0.2% และกรดไขมันที่มีปริมาณมากที่สุดในสาหร่ายทุกชนิดคือ palmitic acid โดยจะตรวจพบโอเมก้า Linoleic acid ในสาหร่ายเกือบทุกชนิด ตรวจพบ DHA ใน *Mastigocladopsis, Chlorella, Chaetoceros, Tetraselmis* และ *Sargassum* พบ EPA ใน *Chlorella, U. intestinalis, Chaetoceros, Isochrysis, Tetraselmis* และ *Acanthophora* สภาวะที่เหมาะสมต่อสาหร่ายแต่ละชนิดในการผลิตน้ำมันคือ สาหร่าย *Hapalosiphon* sp. เลี้ยงภายใต้การได้รับแสงต่อเนื่องจะมีไขมันสูงสุด 23.31±1.92%, *Oscillatoria limnetica* เลี้ยง 40 วัน มีไขมันสูงสุด 19.45±0.61%, *Botryococcus braunii* เลี้ยง 40 วัน มีไขมันสูงสุด 46.56±10.43% และ *Scenedesmus dimorphus* เลี้ยงภายใต้อาหารที่เพิ่มธาตุเหล็กมาขึ้น 250% มีไขมันสูงสุด 24.7±0.49% การเลี้ยงสาหร่าย *S. dimorphus* ในระดับมหมวล ด้วยปุ๋ยสูตร 18-12-6 ที่ 5 กรัมต่อลิตร ให้ไขมันมากที่สุด 44.83±2.10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สายพันธุ์สาหร่าย

3.1.1. KS03

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้

1. ไฮโดรคลอริก เข้มข้น 37% ยี่ห้อ ANALAR NORMAPUR เกรดวิเคราะห์
2. เอทานอล ยี่ห้อ L-Pure เกรดวิเคราะห์
3. คลอโรฟอร์ม ยี่ห้อ Carlo erba เกรดวิเคราะห์
4. เมทานอล ยี่ห้อ Fisher Scientific (UK) เกรดวิเคราะห์
5. เฮกเซน ยี่ห้อ Merck เกรดวิเคราะห์
6. กรดแอซิติก (Glacial acetic acid) ยี่ห้อ Duksan เกรดวิเคราะห์
7. กรดบอริก (H_3BO_3) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
8. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
9. คอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
10. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
11. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
12. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
13. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
14. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
15. ผงวุ้น (Agar Agar)
16. โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
17. เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
18. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
19. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
20. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
21. แมงกานิสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
22. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
23. Tris (base)
24. แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$] ยี่ห้อ Loba chemie เกรดวิเคราะห์
25. เอทิลีนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลต์ไดไฮเดรต ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
26. โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิกไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27. โซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิก ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์
28. โซเดียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2SO_4 \cdot 7H_2O$) ยี่ห้อ loba chemie เกรดวิเคราะห์

3.2.2 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (แพรกซ์แอร์, ประเทศไทย)
2. ก๊าซฮีเลียมบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (UHP grade)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave); Hiryama: Hiclave
2. ตู้อบลมร้อน; WTB binder: DE5
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow); MM-tech: Cleanline BS-120
4. เตาอบไมโครเวฟ
5. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง; Adventure :AR2140
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermoscientific); Genesys 10S UV-VIS
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงขนาดเล็ก (microcentifuge); Eppendorf:5415R
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centifuge); Hermle:Z36HK
9. เครื่องผสมสาร (vortex); Kuzzeit
10. ปิเปตแก้วขนาด 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร
11. ไมโครปิเปตขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
12. เครื่องแก้วต่างๆ (Glasswares)
13. ตู้ดูดควัน; AstercairAstec
14. โถดูดความชื้น (Desiccator)
15. ชุดอุปกรณ์สกัดไขมัน (Soxhlet apparatus)
16. ตู้อบลมร้อน (Hot air over)(Delta Laboratory, 137FX, Thailand)
17. ขวดรูปชมพู่ขนาด 100, 250 มิลลิลิตร
18. ขวดปรับปริมาตรขนาด 10, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
19. บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
20. แท่งแก้วคนสาร
21. หลอด Centrifuge ขนาด 2 และ 50 มิลลิลิตร
22. หลอดหยดสาร (Dropper)
23. จานเลี้ยงเชื้อ (Plate)
24. ตะเกียงแอลกอฮอล์
25. อลูมิเนียมลูป
26. Waterbath

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการเตรียมสารเคมี

3.4.1 สารละลายสต็อคที่ 1

ชั่ง Tris 24.20 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.4.2 สารละลายสต็อคที่ 2

ชั่ง NH_4Cl 3.75 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 กรัม และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.4.3 สารละลายสต็อคที่ 3

ชั่ง K_2HPO_4 2.88 กรัม และ KH_2PO_4 1.44 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4.4 สารละลายสต็อคที่ 4

ชั่ง $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 0.5000 กรัม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2200 กรัม H_3BO_3 0.1140 กรัม $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0500 กรัม $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0500 กรัม $CoCl_4 \cdot 6H_2O$ 0.0160 กรัม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0160 กรัม และ$(NH_4)6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4.5 สารละลายสต็อคที่ 5

ชั่ง NH_4Cl 3.75 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 กรัม และNaCl 0.1990 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.4.6 สารละลายสต็อคที่ 6

ชั่ง $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 2.95 กรัม และ$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.37 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4.7 สารละลายสต็อคที่ 7

ชั่ง NaCl 2.48 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 กรัม และ$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.4.8 สารละลายสต็อคที่ 8

ชั่ง NH_4Cl 3.75 กรัม$Na_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 กรัม และ$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัมป รับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.4.9 สารละลายสต็อคที่ 9

ชั่ง NH_4Cl 3.75 กรัม $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.83 กรัม และ$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.4.10 สารละลายสต็อคที่ 10

ชั่ง $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 0.5000 กรัม $ZnCl_2$ 0.1042 กรัม H_3BO_3 0.1140 กรัม $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0500 กรัม $CoCl_4 \cdot 6H_2O$ 0.0160 กรัม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0160 กรัม และ$(NH_4)6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4.11 สารละลายสต็อคที่ 11

ชั่ง $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 0.5000 กรัม $ZnSO_4 \cdot H_2O$ 0.2200 กรัม H_3BO_3 0.1140 กรัม $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0500 กรัม$CoCl_4 \cdot 6H_2O$ 0.0160 กรัม$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0160 กรัม และ$(NH_4)6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.12 สารละลายสต็อคที่ 12

ชั่ง $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ 0.5000 กรัม $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.2200 กรัม H_3BO_3 0.1140 กรัม $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.0500 กรัม $CoCl_4{\cdot}6H_2O$ 0.0160 กรัม $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 0.0160 กรัม และ $(NH_4)6MO_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ 0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4.13 สารละลายสต็อคที่ 13

ชั่ง $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ 0.5000 กรัม H_3BO_3 0.1140 กรัม $MnCl{\cdot}4H_2O$ 0.0500 กรัม $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.0500 กรัม $CoCl_4{\cdot}6H_2O$ 0.0160 กรัม $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 0.0160 กรัม และ $(NH_4)6MO_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ 0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4.14 สารละลายสต็อคที่ 14

ชั่ง $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ 0.5000 กรัม $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.2200 กรัม H_3BO_3 0.1140 กรัม $MnCl{\cdot}4H_2O$ 0.0500 กรัม $FeSO_4{\cdot}7H2O$ 0.0500 กรัม $CoCl_4{\cdot}6H_2O$ 0.0160 กรัม และ $(NH_4)6MO_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ 0.0077 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4.15 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 2 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 4 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.16 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-Ca)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 5 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 4 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.17 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-K)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 2 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 6 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 4 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.18 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-N)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 7 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 4 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.19 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-Mg)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 8 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 4 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.20 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-S)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 9 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 10 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.21 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-P)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 2 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 4 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 10 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.22 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-Fe)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 2 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 11 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.23 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-Mn)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 2 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 12 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.24 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-Zn)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 2 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 13 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.25 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-Cu)

ปิเปตสารละลายสต็อคที่ 1 10 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 2 25 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 3 1 มิลลิลิตร สารละลายสต็อคที่ 14 1 มิลลิลิตรและ CH_3COOH (conc.) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.4.26 สารละลายสต็อค ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% มา 8.3 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.5 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-Acetate-Phosphate (TAP), TAP-Ca, TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-S, TAP-Cu, TAP-Mn, TAP-Mg, TAP-Fe, TAP-Zn

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อควรใช้เครื่องแก้วที่สะอาด ผ่านการล้างมาเป็นอย่างดี ไม่ปนเปื้อนสารใดๆ หลังจากนั้นผสมสารเคมีตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ภาชนะที่เตรียมควรมีปริมาตรมากกว่าปริมาตรของอาหารที่เลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เท่า เพื่อความสะดวกในการผสมและป้องกันฟองที่เกิดจากการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนในการเลี้ยงเชื้อบนจานเลี้ยงเชื้อจะต้องทำเป็นอาหารแข็ง โดยใส่ผลวุ้น(Agar) ลงไป โดยใส่ลงไปประมาณ 1.5% ของอาหารเหลวที่ต้องการนำไปทำเป็นอาหารแข็ง เมื่อผสมทุกอย่างเสร็จ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Sterilized) ในเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อโดยต้องรอให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสก่อนเพื่อไม่ให้ความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำละลายรูปทรงของจานเพาะเลี้ยงที่เป็นพลาสติก ซึ่งในขั้นตอนนี้ควรทำในตู้ปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน หลังจากเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อแล้ว รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ต้องแน่ใจว่าไม่มีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝาจานเลี้ยงเชื้อ เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ใช้เชื้อแค่เพียง 1 โคโลนีมาเป็นตัวตั้งต้นก็เพียงพอ โดยจะเกลี่ยเชื้อให้กระจายไปทั่วผิวหน้าของอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสงบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 5-7 วัน

สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 ในอาหารเหลว ทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปบ่มในตู้เขย่าแบบใช้แสงเขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ความเข็มแสง 1,500 ลักซ์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

3.7 วิธีวัดปริมาณของสาหร่ายสีเขียว KS03 ในอาหารสูตรต่างๆ

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวนั้น สามารถทำได้โดยการวัดค่า OD750 เป็นการวัดค่าความขุ่นของสาหร่าย เนื่องจากว่าสาหร่ายอาจมีการสร้างเซลล์เกิดขึ้นแต่ไม่มีการสร้างหรือสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ทำให้การสังเกตสีและความเขียวของสาหร่ายไม่สามารถระบุจำนวนหรือปริมาณเซลล์ของสาหร่ายได้อย่างถูกต้อง ก่อนนำไปวัดค่าความขุ่น ต้องทำการเจือจางสาหร่าย 6 เท่า เพื่อให้ค่าความขุ่นอยู่ในช่วงที่ไม่เกินกราฟมาตรฐาน หลังจากทำการวัดค่า OD750 ด้วยเครื่อง UV Spectrometer ที่ความเข้มแสง 750 นาโนเมตร โดยวัดค่าทั้งหมด 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนำค่าเฉลี่ยของแต่ละสูตรอาหารที่ได้ไปคำนวณจากสมการที่ 3.1 ดังต่อไปนี้

$$Y = 2.2938X$$

ที่มา : นางสาว ธนพร นักศึกษาปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โดย ค่า Y คือ ค่า OD750 เฉลี่ยที่วัดได้ (ค่า OD750 6 เท่า)

ค่า X คือ น้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย (mg/ml)

เมื่อได้ค่า X แล้วจะนำมาหาปริมาณของเซลล์สาหร่ายจริงที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการนำมาคูณกับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในขวดรูปชมพู่นั่นก็คือ 50 มิลลิลิตร จึงจะได้จำนวนเซลล์จริงๆที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.8 วิธีการศึกษาปริมาณไขมันที่สาหร่ายสีเขียว KS03 ผลิตได้ในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ

จากการทดลองเพื่อหาปริมาณและประเภทของไขมันที่สาหร่ายสีเขียว KS03 ผลิตในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ โดยเลี้ยงในอาหาร TAP (Normal), TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-Ca, TAP-Mn, TAP-Cu, TAP-Mg, TAP-S, TAP-Zn, TAP-Fe เพื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่สาหร่ายสีเขียวผลิตได้ โดยจะเลือก 3 อันดับแรกที่มีปริมาณไขมันสูงที่สุดมาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometer (GC-MS) ในขั้นตอนก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS นั้นต้องทำการสกัดตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวที่เจริญเติบโตในสภาวะขาดธาตุอาหารครบตามกำหนดระยะเวลา 5-7 วัน โดยการสกัดนั้นใช้วิธีการ Soxhlet Extraction เพื่อแยกไขมันออกมาโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้หลักการ “Like Dissolve Like” นั่นก็คือ การเลือกสารละลายที่สามารถเป็นตัวทำละลายไขมันตามสภาพขั้ว เพื่อแยกไขมันออกมาจากสารอื่นที่มีสภาพขั้วแตกต่างออกไปโดยจะทำการสกัดซ้ำๆเป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อให้มั่นใจว่าสารที่เราต้องการวิเคราะห์หรือไขมันนั้นสามารถถูกละลายลงมาอยู่ในตัวทำละลายได้หมด โดยสารละลายที่ใช้เป็นตัวทำละลายไขมันคือ Chloroform:Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ใช้ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดโดยประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส (Krishan, Kandasamy และ Faizal, 2013)

เมื่อทำการสกัดไขมันจะละลายอยู่ในตัวทำละลายภายในขวดก้นกลม ซึ่งต้องทำการแยกไขมันออกจากสารละลายเพื่อจะวิเคราะห์ไขมันเพียงอย่างเดียว โดยต้องถ่ายสารละลายจากขวดก้นกลมไปใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ขวด แล้วนำไปให้ความร้อนด้วย Water Bath ที่อุณหภูมิประมาณ 80-100 องศาเซลเซียสและขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้ดูดควันเท่านั้น เมื่อลดปริมาตรได้ประมาณ 10 มิลลิลิตร จะทำการถ่ายสารละลายลงหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วจึงนำลดปริมาตรต่อจนเหลือประมาณ 2 มิลลิลิตร เมื่อลดปริมาตรได้ 2 มิลลิลิตรแล้วจะนำไปไล่ออกซิเจนออก เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์ ด้วยก๊าซอาร์กอนที่ใช้ต้องเป็นอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999% ไล่สารละลายจนสารละลายแห้ง เหลือเพียงแต่ไขมันที่จะนำมาวิเคราะห์เท่านั้น นำหลอดทดลองมาชั่งน้ำหนักหาน้ำหนักไขมัน โดยหาได้จากสมการที่ 3.2 ดังต่อไปนี้

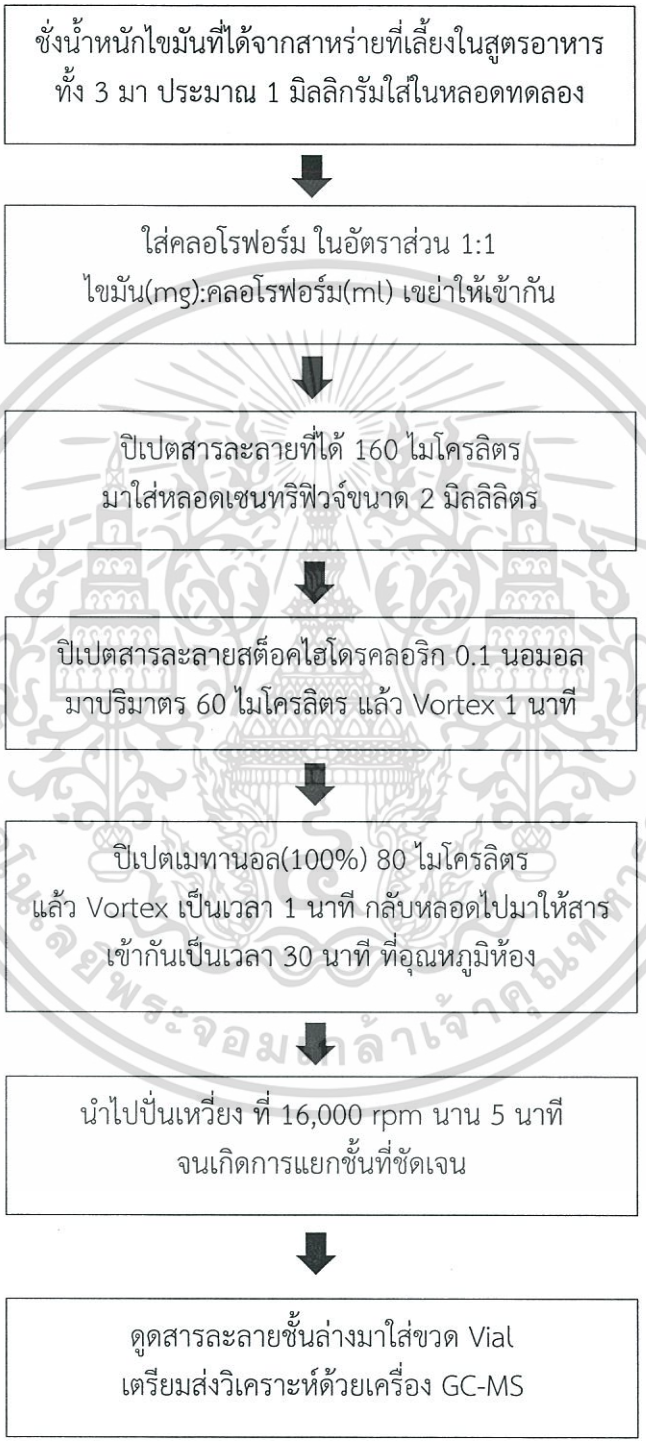
$$\text{น้ำหนักไขมัน (mg)} = \text{น้ำหนักหลอดทดลองหลังไล่ระบบด้วยอาร์กอน} - \text{น้ำหนักหลอดทดลองก่อนใช้}$$

หลังจากได้น้ำหนักไขมันแล้วนำคิดเป็นน้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย นำมาเปรียบเทียบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะขาดธาตุอาหารชนิดใด ที่มีปริมาณไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมากน้อยเพียง เมื่อทราบอันดับของอาหารที่เลี้ยงเชื้อที่ทำให้สาหร่ายผลิตปริมาณไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งแล้ว เลือกอันดับสูตรอาหารที่มีการผลิตไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด 3 อันดับแรกมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS นั่นสภาวะของไขมันที่จะทำการวิเคราะห์ต้องอยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ เพื่อให้เหมาะสมกับคอลัมน์ของเครื่อง GC โดยสามารถเตรียมได้ด้วยวิธีดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ของเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	VF-5MS column 30 m, 0.25 mm film thickness, 10 m integra guard column
Temperature	250 °C, MS transfer line 280 °C, the ion source injection 250 °C and the quadrupole at 150 °C
Carrier gas	Helium (Flow rate 1.1 ml/min)
Agitator speed	500 rpm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

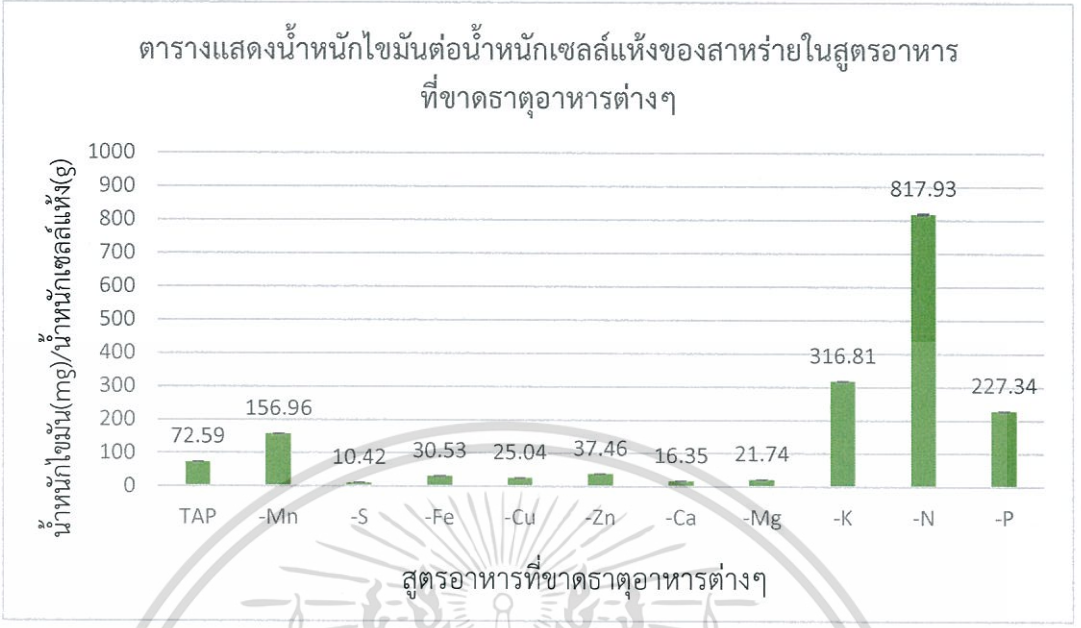
บทที่4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลของการวิจัยนี้สามารถทราบได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่ปราศจากธาตุอาหาร 10 ธาตุอาหาร ดังต่อไปนี้ TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-Mn, TAP-Fe, TAP-Mg, TAP-S, TAP-Zn, TAP-Ca, TAP-Cu แล้วนำสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารทั้ง 10 อาหารรวมกับอาหารชุดควบคุมที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ (TAP) ไปสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้วิธีการ Soxhlet Extraction คำนวณหาปริมาณไขมันของสาหร่ายที่ได้จากสมการที่ 3.1 เปรียบเทียบน้ำหนักไขมันทำการสกัดได้กับชุดควบคุมที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ แล้วนำวิเคราะห์ชนิดไขมันด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้นั้นอยู่ในรูปของกราฟโครมาโตแกรม (Chromatogram) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการตรวจวัดกับระยะเวลาที่สารตัวอย่างออกมาจากคอลัมน์ โดยแสดงผลจากการวิเคราะห์ต่างๆดังต่อไปนี้

4.1 ปริมาณไขมันจากสาหร่ายในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ

การหาปริมาณไขมันจากสาหร่ายที่สกัดได้นั้น มีการเก็บผลการทดลอง 2 ค่า คือ น้ำหนักของไขมันจากสาหร่ายที่สกัดได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมและน้ำหนักของเซลล์แห้งมีหน่วยเป็นกรัม เมื่อนำค่าทั้ง 2 มาหารกันจะทำให้ทราบปริมาณไขมันที่สาหร่ายสามารถผลิตได้ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งการหาน้ำหนักเซลล์สาหร่ายแห้งนั้นสามารถทำได้โดยนำเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ไปวัดค่า OD_{750} ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectroscopy นำค่าที่วัดมาคำนวณตามสมการที่ 3.1 จะได้น้ำหนักแห้งของเซลล์ ต่อมาคือส่วนของการหาน้ำหนักของไขมันโดยหลังทำการวัดค่า OD_{750} จะนำสาหร่ายเข้าสู่ขบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้วิธี Soxhlet Extraction ในการสกัดไขมันจากสาหร่ายเนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและสามารถทำได้ง่าย มีขั้นตอนการเตรียมที่ไม่ยุ่งยากโดยเริ่มจากการนำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส ย้ายเซลล์สาหร่ายที่ทำการแยกเรียบร้อยแล้วใส่ถ้วยอลูมิเนียมขนาดเล็กที่พับเตรียมไว้ก่อนจะนำไปอบแห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำไปไว้ในเดซิเคเตอร์เพื่อดูดความชื้นออกจากเซลล์สาหร่ายจนครบ 24 ชั่วโมงก็สามารถนำสาหร่ายเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดได้โดยถ้วยอลูมิเนียมขนาดเล็กลงใน Thimble และให้ความร้อนกับสารละลาย Chloroform:Ethanol (1:1) ที่อุณหภูมิประมาณ 60 °C ทำการสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้สารละลายที่มีตัวอย่างไขมันจากสาหร่ายอยู่ ระเหยตัวทำละลายจนแห้งจะได้ไขมันที่สกัดได้แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก เมื่อได้ค่าน้ำหนักของไขมัน(mg)และน้ำหนักของเซลล์แห้ง(g)แล้ว นำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆ จะได้ดังรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 น้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในสูตรอาหารต่างๆ

จากรูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นถึงน้ำหนักไขมันในหน่วยมิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม โดยผ่านการวัดค่า OD_{750} ทั้งหมด 3 ครั้ง ทำให้ได้ค่าน้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/g) โดยอาหารในชุดควบคุมที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ (TAP) ให้น้ำหนักไขมัน 72.59 มิลลิกรัมต่อเซลล์แห้ง 1 กรัมจะสังเกตได้ว่าจากรูปที่ 4.1 นี้มีสูตรอาหารที่ให้น้ำหนักไขมันมากกว่าชุดควบคุมอยู่ 4 ชนิดอาหาร คือ TAP-N, TAP-K, TAP-P, TAP-Mn ตามลำดับ โดยสูตรอาหารที่เหลือนั้นให้น้ำหนักไขมันน้อยกว่าชุดควบคุมทั้งหมด เมื่อเลือกพิจารณาเฉพาะสภาวะขาดธาตุอาหารที่สาหร่ายอาจมีการผลิตไขมันในปริมาณมากพอที่จะขยายผลต่อไปในด้านอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพิจารณาสภาวะขาดธาตุอาหาร 3 อันดับแรกที่มีน้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าสภาวะธาตุอาหารปกติ (TAP) โดยเมื่อเทียบน้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นเปอร์เซ็นต์ในอาหารแต่ละชนิดแล้วจะได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เทียบน้ำหนักไขมันภายในเซลล์แห้ง 1 กรัมเป็นเปอร์เซ็นต์ในสาหร่าย KS03

ชนิดอาหาร	น้ำหนักไขมันในเซลล์แห้ง 1 กรัม (mg)	ร้อยละไขมันในเซลล์
TAP	72.59 ±	7.26±
-N	817.93±	81.79±
-K	316.81±	31.68±
-P	227.34±	22.73±

จะเห็นว่าปริมาณไขมันในอาหาร TAP มี 7.26% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่อาหารชนิด TAP–N นั้นมีปริมาณไขมันมากถึง 81.79% ของน้ำหนักเซลล์ไขมันซึ่งได้ปริมาณไขมันมากกว่าการเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ถึง 11.27 เท่าและปริมาณไขมันในอาหารชนิด TAP–K, TAP-P ได้ปริมาณเป็น 31.68%, 22.73%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็น 4.36 และ 3.16 เท่าของอาหาร TAP ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไขมันจากงานวิจัยอ้างอิง (Ian *et al.*, 2013) จะพบว่าเปอร์เซ็นต์ของไขมันในเซลล์เป็นดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไขมันในเซลล์ของสาหร่ายสองชนิดจากอาหารทั้งสองสูตร

ชนิดของสาหร่าย	ชนิดอาหาร (f-medium)	เปอร์เซ็นต์ไขมันในเซลล์
Chlorella sp.	เติมไนโตรเจน	10.1% ±4.1%
	ขาดไนโตรเจน	12.9% ±2.8%
Nannochloropsis sp.	เติมไนโตรเจน	6.98% ±0.5%
	ขาดไนโตรเจน	11.6% ±4.8%

ที่มา : Ian *et al.*, 2013

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าปริมาณไขมันในสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วจะพบว่าอาหารสูตรที่ขาดธาตุไนโตรเจนนั้นมีปริมาณไขมันมากกว่าอาหารสูตรที่มีธาตุไนโตรเจนสมบูรณ์โดยประมาณ 3-4% และปริมาณไขมันมีอยู่ประมาณ 7-12% ของน้ำหนักเซลล์ เมื่อนำตารางทั้งสองมาเปรียบเทียบกันแล้วจะเห็นว่า อาหารสูตรที่มีธาตุอาหารไนโตรเจนสมบูรณ์นั้น คือ TAP และ f-medium มีเปอร์เซ็นต์ไขมันในเซลล์ใกล้เคียงกันซึ่งอยู่ในช่วง 7% และ 10% ของน้ำหนักเซลล์ แต่ในสภาวะขาดธาตุอาหารไนโตรเจนนั้น อาหาร TAP-N มีปริมาณไขมันมากขึ้นถึง 81.79% ซึ่งมากกว่าปริมาณไขมันในอาหาร f-medium สูตร N-deplete ถึง 6-7 เท่า

ทั้งนี้เหตุผลที่ปริมาณไขมันของอาหารทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นไม่เท่ากันนั้น สามารถอธิบายได้ว่าสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายมีความแตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณธาตุอาหารที่สาหร่ายได้รับไม่เท่ากัน นอกจากนี้งานวิจัยอ้างอิง (Ian *et al.*, 2013) ยังเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 10 วันในสภาวะได้รับแสงสว่าง:ไม่ได้รับแสงสว่าง ในอัตราส่วน 12:12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 17 °C ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่เลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 5 วันโดยเลี้ยงในสภาวะได้รับแสงที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์และอุณหภูมิ 36°C ตามลำดับ อีกหนึ่งปัจจัยที่อาจส่งผลให้ค่าที่ได้ตแตกต่างกันก็คือ ชนิดของสาหร่ายที่นำมาเพาะเลี้ยง ใช้ซึ่งสิ่งเหล่านี้อาจส่งผลให้สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-N นั้นมีเปอร์เซ็นต์ไขมันมากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร f-medium สูตร N-deplete อย่างไรก็ตาม ไขมันที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะขาดธาตุอาหารทั้ง 3 ที่พิจารณาจากสูตรอาหารขาดธาตุไนโตรเจน โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส ที่ทำให้สาหร่ายมีการผลิตไขมันในปริมาณมากพอจะนำมาทำ การวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ในขั้นตอนต่อไป

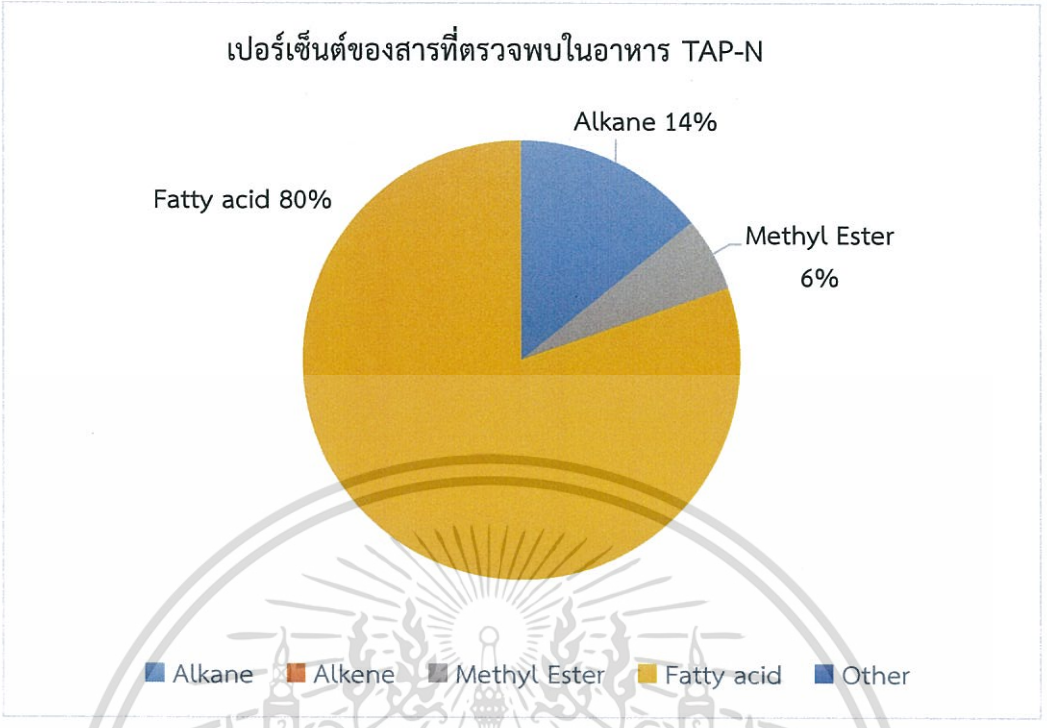
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry

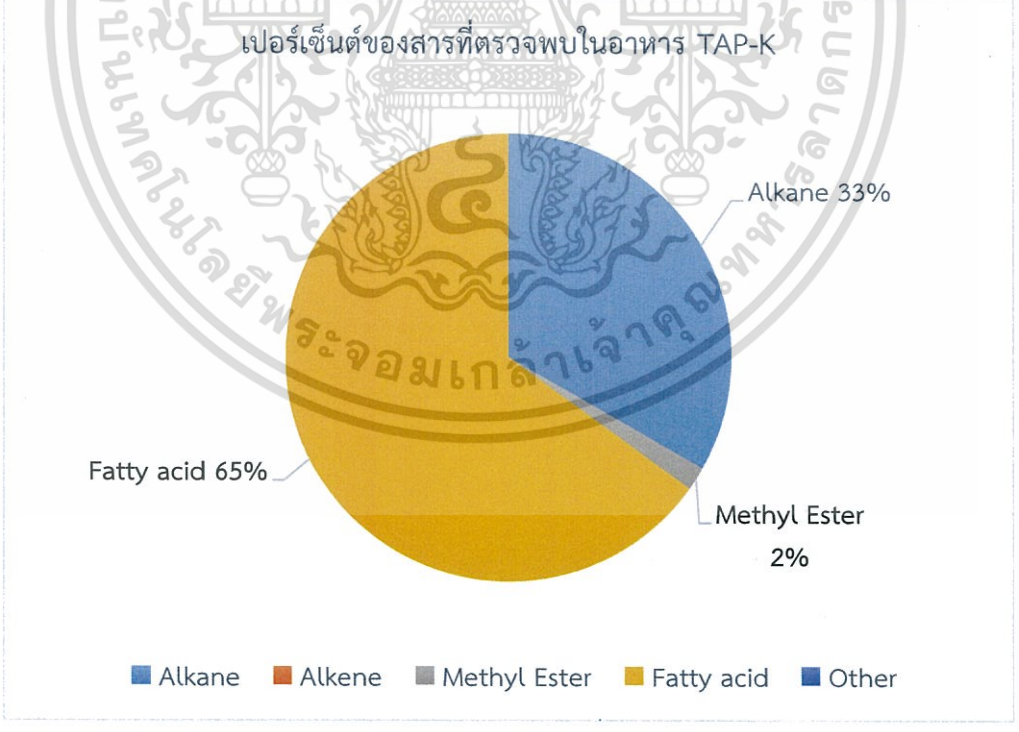
จากการเลือกพิจารณาเฉพาะไขมันจากสาหร่ายในอาหารสูตร TAP-N, TAP-P, TAP-K แล้วนำไขมันจากสาหร่ายที่ผ่านการสกัดและไล่สารละลายจนแห้งมาเปลี่ยนให้อยู่ของเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) เพื่อเตรียมฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์ GC-MS โดยชั่งน้ำหนักไขมันจากสาหร่ายประมาณ 1-4 มิลลิกรัมใส่หลอดทดลองแล้วเติมคลอโรฟอร์มในอันตราส่วน น้ำหนักไขมันจากสาหร่ายต่อปริมาตรคลอโรฟอร์มเป็น 1:1 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แล้วเขย่าให้สารทั้งสองผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปตสารละลายที่ได้ใส่ใส่ไมโครเซนทริฟิวส์ เติมเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 แล้วจึงเติมกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 0.1 โมลาร์เพื่อเร่งปฏิกิริยา นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวส์ จะสังเกตได้ว่าหลังผ่านการปั่นเหวี่ยง สารละลายจะแยกชั้นชัดเจนโดยชั้นสารละลายที่จะนำไปวิเคราะห์นั้นอยู่ที่ชั้นล่างสุดจึงปิเปตสารละลายชั้นล่างเพื่อนำมาฉีดเข้าเครื่อง GC-MS โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS นั้นจะเลือกช่วงคาร์บอนที่ทำวิเคราะห์อยู่ในช่วง C10-C38 ซึ่งผลจากการวิเคราะห์นั้นเป็นไปตาม รูปที่ 4.2-4.5 ตามลำดับ โดยโครมาโตแกรมของไขมันที่สกัดได้และพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสารแต่ล่ะตัวอย่างนั้นได้แสดงไว้ในภาคผนวก ง

รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหาร TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

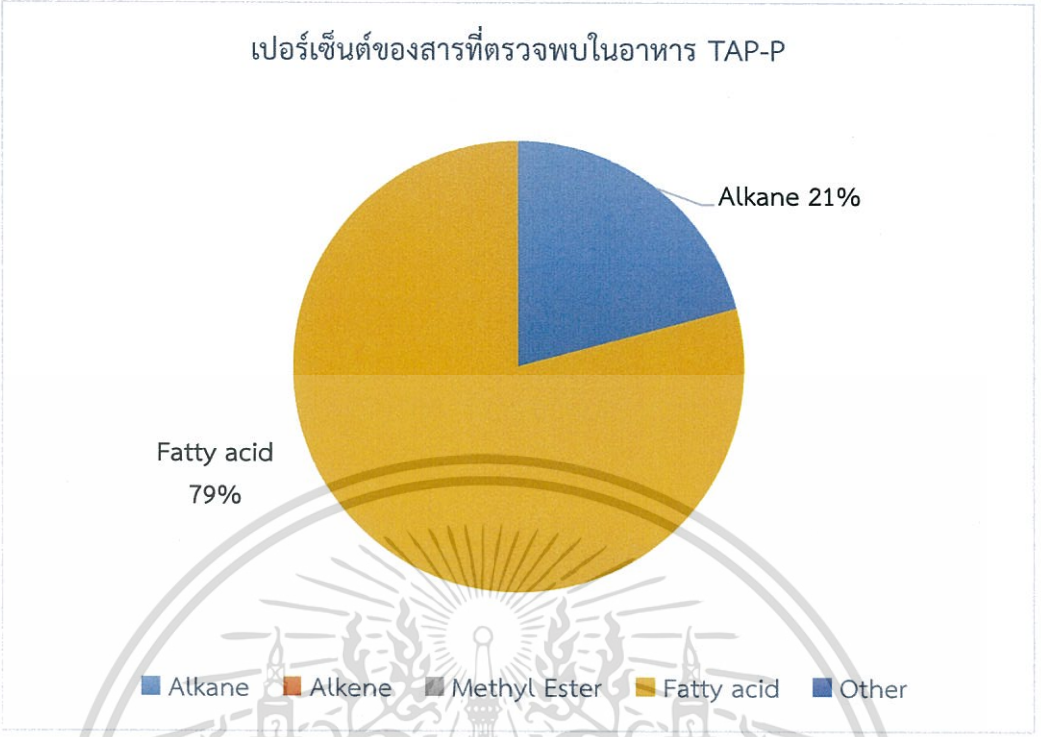


รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหาร TAP-N



รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหาร TAP-K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ของสารที่พบในไขมันสาหร่ายจากอาหาร TAP-P

จากรูปที่ 4.2-4.5 แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์ของสารแต่ละประเภทที่ถูกตรวจพบจากไขมันที่สกัดได้ โดยทุกๆสภาวะนั้นมีอัตราส่วนของกรดไขมันประมาณ 70-80% ซึ่งเป็นสารที่มีตรวจพบได้มากที่สุด หากเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่ได้จากอาหาร TAP ที่มีเปอร์เซ็นต์กรดไขมันสูงถึง 82% แล้ว อาหารในสภาวะขาดธาตุอาหารอื่นๆนั้นให้สัดส่วนของกรดไขมันลดลง 2-17% โดยสูตรอาหารที่ให้ปริมาณกรดไขมันแตกต่างจากอาหาร TAP มากที่สุดคือ อาหารสูตร TAP-K ที่มีเปอร์เซ็นต์กรดไขมันเพียง 65% (รูปที่ 4.4) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันน้อยที่สุด นอกจากกรดไขมันแล้วสารที่พบในปริมาณมากรองลงมาจากกรดไขมันคือ สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็นโซ่ตรง (Alkane) ที่ถูกสาหร่ายสังเคราะห์ขึ้นมาและตรวจพบอยู่ในไขมันจากสาหร่ายประมาณ 17-30% สิ่งหนึ่งที่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันจากสาหร่ายที่ตรวจพบได้ นั่นก็คือสารประเภทเมทิลเอสเทอร์ที่ตรวจพบอยู่ในอาหารเกือบทุกสูตรยกเว้น อาหารสูตร TAP-P เนื่องมาจากการเปลี่ยนรูปของสารก่อนที่จะทำการฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์ GC-MS นั้นอาจไม่สมบูรณ์ ทำให้ยังพบสารที่อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ปรากฏอยู่ในผลวิเคราะห์ด้วย ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากอาหารทุกๆสูตรประมาณ 4% แต่การวิเคราะห์ครั้งนี้นั้นให้ความสนใจแค่เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันจากสาหร่าย จึงนำไปสู่การจำแนกกรดไขมันแต่ละชนิดที่ตรวจพบในตัวอย่างไขมันจากสาหร่ายที่ได้จากอาหารแต่ละสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 องค์ประกอบของกรดไขมันที่สกัดได้

จากผลโครมาโตแกรม (ภาคผนวก ง) ของตัวอย่างไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะขาดธาตุอาหารต่างๆนั้น ได้ระบุพื้นที่ใต้กราฟและเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ตรวจพบ โดยมีการแจกแจงไว้ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่พบในไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร

กรดไขมันที่ตรวจพบ	อาหารแต่ละสูตร			
	TAP (%)	TAP-N (%)	TAP-K (%)	TAP-P (%)
Tetradecanoic acid (C14:0)	7	15	9	9
Hexadecenoic acid (C16:0)	27	13	16	27
9-Hexadecenoic acid (C16:1)	3	0	5	0
Octadecanoic acid (C18:0)	3	0	0	0
Cis-octadecaenoic acid (C18:1n9c)	10	8	8	15
Cis-octadecadienoic acid (C18:2n6c)	4	5	7	20
Trans-octadecadienoic acid (C18:2n6t)	3	5	10	5
Nonadecanoic acid (C19:0)	3	0	5	0
Eicosanoic acid (C20:0)	3	8	6	11
Tricosanoic acid (C23:0)	5	10	9	5
Tetracosanoic acid (C24:0)	9	12	12	8
Pentacosanoic acid (C25:0)	8	14	14	0
Hexacosanoic acid (C26:0)	15	10	0	0
รวม	100	100	100	100

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่ากรดไขมันที่พบในไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงอาหารทั้ง 4 สูตร มีจำนวน13 ชนิด โดยกรดไขมันที่พบได้จากอาหารทุกๆสูตรนั้นมีทั้งหมด 8 กรดไขมัน คือ Tetradecanoic acid, Hexadecenoic acid, *Cis*-octadecaenoic acid, *Cis*-octadecadienoic acid, *Trans*-octadecadienoic acid, Eicosanoic acid, Tricosanoic acid และTetracosanoic acid และกรดไขมันที่มีเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างมากในไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร คือ Hexadecenoic acid ที่มีปริมาณโดยเฉลี่ย 21% โดยมีเปอร์เซ็นต์ที่พบในอาหาร TAP กับอาหาร TAP-P มากที่สุดอยู่ที่ 27% และในส่วนของกรดไขมันที่พบได้น้อยและยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบแค่ในอาหาร TAP สูตรเดียวเท่านั้น มีเปอร์เซ็นต์เพียง 3% ของกรดไขมันที่ได้จากสาหร่ายใน อาหาร TAP ทั้งหมดคือ Octadecanoic acid ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ian *et al.*, 2013 ที่ พบว่าการเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร f-medium ทั้ง 2 สภาวะที่มีปริมาณ Hexadecenoic acid อยู่ที่ 29% โดยเฉลี่ย และพบ Octadecanoic acid อยู่ที่ 3% โดยเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การเลี้ยงสาหร่าย KS03 ด้วยสูตรอาหาร TAP แต่ละสภาวะขาดธาตุอาหารนั้น เมื่อให้แสงที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์และอุณหภูมิที่ 36 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 5 วัน ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่ดีและสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณมากพอที่จะนำมาวิเคราะห์ได้ หลังจากทำการสกัดไขมันออกจากเซลล์สาหร่ายแล้ว หาน้ำหนักของไขมันที่สาหร่ายผลิตได้ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจากรูปที่ 4.1 ทำให้ทราบได้ว่า สภาวะที่สาหร่าย KS03 สามารถผลิตไขมันได้มากกว่าปกติ คือ สภาวะขาดธาตุอาหารไนโตรเจน, โพแทสเซียม, ฟอสฟอรัส และ แมงกานีส และเมื่อนำไขมันที่มากที่สุด 3 อันดับแรกไปวิเคราะห์ผลจะเห็นได้ว่าผลการวิเคราะห์ไขมันด้วยเครื่อง GC-MS นั้น แสดงกราฟโครมาโตแกรม (ภาคผนวก ง) ของไขมันจากสาหร่าย KS03 โดยตรวจพบสารดังนี้ คือ กรดไขมัน (Fatty acid) สารโครงสร้างโซ่ตรง (Alkane) และสารในกลุ่มของเมทิลเอสเทอร์ (Methyl Ester) เมื่อคิดพื้นที่ใต้กราฟของสารแต่ละชนิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้ว พบว่ากรดไขมันมีเปอร์เซ็นต์มากที่สุดจากการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายที่เลี้ยงทุกๆสภาวะอาหารโดยรวม ทำให้ทราบได้ว่า สาหร่าย KS03 สามารถผลิตกรดไขมันออกมาได้ดังนั้นจึงเลือกพิจารณาเฉพาะกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 13 ชนิด จากทุกๆตัวอย่างแล้วพบว่า Hexadecenoic acid/Palmitic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่พบมากในทุกๆสภาวะขาดธาตุอาหาร แต่จะพบว่ากรดไขมันทั้ง 13 ชนิดนั้นไม่มีกรดไขมันจำพวกโอเมก้าอยู่เลย จึงสรุปได้ว่าไขมันจากสาหร่ายที่ผลิตได้ในสภาวะอาหารสมบูรณ์ (TAP) มีกรดไขมันหลากหลายประเภทมากกว่า และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการนำไปต่อยอดงานวิจัยทางด้านอุตสาหกรรมเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของไขมันค่อนข้างมาก คือ อาหารสมบูรณ์ (TAP), อาหารขาดธาตุอาหารไนโตรเจน (TAP-N), อาหารขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัส (TAP-P)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรให้ความร้อนในขั้นตอนการเปลี่ยนไขมันให้เป็นเมทิลเอสเทอร์ (FAME) เนื่องจากต้องให้แน่ใจว่าการเกิดปฏิกิริยาเป็นไปอย่างสมบูรณ์และไขมันเปลี่ยนรูปเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้หมด

2. เนื่องจากใช้เวลาในการรอสารตัวอย่างส่งไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS นานทำให้สารตัวอย่างระเหยจนหมดจึงควรตรวจวัดทันทีหลังจากที่เปลี่ยนสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์

3. หากมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดเพียงพอ ควรทำการสกัดมากกว่า 1 ครั้งเพื่อใช้เปรียบเทียบผลทางสถิติได้

4. นอกจากการนำไปทำไบโอดีเซลแล้วกรดไขมันจำพวก Palmitic acid, Oleic acid และ Linoleic acid ที่ตรวจวัดได้ในปริมาณมาก กรดไขมันเหล่านี้เป็นกรดไขมันที่สามารถนำมารับประทานหรือใช้ในการประกอบอาหาร จึงสามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารได้

5. เนื่องจากปริมาณของกรดไขมัน *Cis*-octadecadienoic acid (C18:2n6c)/Linoleic acid ที่ทำการสกัดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหาร TAP-P ได้นั้นค่อนข้างมากจึงสามารถนำไปต่อยอดในส่วนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำอาหารเสริมหรือยา เพราะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและการดอุดตันของโคเลสเตอรอลร้าย (LDL) ทั้งยังเป็นกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. (2550). **บทปฏิบัติการที่2 เทคนิคการคัดแยกเชื้อสาหรายและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์.** [Online]. Available : http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/B0XCL6LThu25957.pdf

นุชนาถ แช่มช้อย. (2557). **การเพาะเลี้ยงและการนำสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้ประโยชน์.** กรุงเทพฯ : วารสาร มฉก.วิชาการ. 17 : 169-183

ผกาวดี แกวกันเนตร และพนิดา รัตนพลที. (2552). **ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากฐ้ามันที่ได้จากสาหราย.** กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวฺยิยแหงชาติ.

พัฒนศักดิ์ ชิวปรีชา และสุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. (2560). **สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว.** กรุงเทพฯ : วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 35(2) : 19-30

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2010). **กรดลิโนเลอิก.** [Online]. Available : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1647/linoleic-acid

ลัดดา วงศรัตน. (2544). **แพลงกตอนพืช**. พิมพครั้งที่ 2. กรงุเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร.

วัลลภ พรเรืองวงศ์. (2558). **การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดในบ่อกวนผสม.** [Online]. Available : http://oknation.nationtv.tv/blog/health2you

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

สาวิตรี ไทรทับทิม. (2554). **การบำบัดน้ำเสียโดยใช้สาหร่าย.** [Online]. Available : http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf

อาภารัตน์ มหาขันธ์ และคณะ. (2560). **การวิจัยและพัฒนาประโยชน์จากสาหร่ายน้ำจืด.** [Online]. Available : http://www.tistr.or.th/bsd/Seaward.html

อุรัจฉวี อุณหเลขกะ. (2555). **การเปรียบเทียบสาหร่ายกับพืชน้ำมัน**. [Online]. Available : http://www.tei.or.th/publications/2013-download/2013-TBCSD-Greenbusiness-y6-3.pdf

Anneken, David J.; Both, Sabine; Christoph, Ralf; Fieg, Georg; Steinberner, Udo; Westfechtel and Alfred. (2006). **Fatty Acids**. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH.doi:10.1002/14356007.a10_245.pub2

Ayhan Demirbas and Faith Demirbas. (2011). **Importance of algae oil as a source of biodiesel.** Energy Conversion and Management. 52(1) : 163-170

Brian M. (2000). **Single-Beam UV-Vis Spectrophotometer**. [Online]. Available : http://www.tissuegroup.chem.vt.edu/chem-ed/spec/uv-vis/singlebeam.html

Cherdsak Maneeruttanarungroj, Peter Lindblad and Aran Incharoensakdi. (2010). **A newly isolated green alga, Tetraspora sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production**. International journal of hydrogen energy. 35 (2010) : 13193 – 13199

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jim Clark. (2006). **A double beam UV-Visible absorption spectrometer.** [Online]. Available : https://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/spectrometer.html

Krishan Ramluckan *et al*,. (2013). **An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method.** Fuel 116 (2014) 103–108

Liu and Benning . (2012). **Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself.** [Online]. Available : https://www.semanticscholar.org/paper/Lipid-metabolism-in-microalgae-distinguishes-itsel-Liu-Benning/10ecd92f01d19636c037bf831d14aeae98b34682/figure/1

Salvador Gregori. (2017). **Chlorella.** [Online]. Available : http://www.binipatia.com/chlorella/

Xiaodong Deng , Yajun Li and Xiaowen Fei. (2009). **Advantages of microalgae for biodiesel.** Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. 3(13) : 1008-1014

Yusuf Chisti. (2007). **Biodiesel from microalgae.** Biotechnology Advances. 25(1) : 294-306

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

อาหารแข็ง

1. นำอาหาร TAP ที่เตรียมไว้ตามสูตรอาหาร ใส่ลงในบีกเกอร์ปริมาตร 250 ใส่ลงไปปริมาณ 200 มิลลิลิตร
2. ใส่ผงวุ้น (Agar Agar) ในปริมาณ 3 กรัม โดยใส่ลงไปประมาณ 1.5% ของอาหารเหลวที่ต้องการนำไปทำเป็นอาหารแข็ง
3. จากนั้นคนให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
4. แล้วนำมาเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อโดยต้องรอให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาก่อนเพื่อไม่ให้ความร้อนจากอาหารเลี้ยงเชื้อละลายจานเลี้ยงเชื้อที่เป็นพลาสติก
5. เปิด UV ภายในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อที่จะทำให้ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียลงในอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ภายในตู้ไม่มีการปนเปื้อน
6. หลังจากนั้นให้ทำการปิด UV และทำการกดปุ่มเปิดไฟภายในตู้กับปุ่ม Air flow อากาศจากภายนอกถูกดูดเข้าไปในเครื่องผ่านรูตระแกรงด้านหน้า (Front Perforation) โดยไม่ผ่านพื้นที่ทำงานด้านใน เข้าไปด้านหลังเครื่องและถูกกรองโดย HEPA Filter ที่ด้านบนของเครื่อง กลายเป็นอากาศสะอาด (Clean Particle-Free Air) พัดลงมาภายในพื้นที่ทำงาน การหมุนเวียนของอากาศลักษณะนี้ทำให้ผลิตภัณฑ์หรืองานที่กำลังทำอยู่ถูกป้องกันจากสิ่งปนเปื้อนภายนอก (Product Protection)
7. เอาอุปกรณ์ทั้งหมดใส่ในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) จากนั้นทำการจุดตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner) เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนจากภายนอกตู้สู่ภายในตู้ปลอดเชื้อ
8. หลังจากเทอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 20 มิลลิลิตร รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ต้องแน่ใจว่าไม่มีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝาจานเลี้ยงเชื้อ เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้
9. นำไปเขี่ยเชื้อสาหร่ายที่เป็น สาหร่ายเริ่มต้น (Starter) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) แตะตัวอย่างหรือ สิ่งส่งตรวจแล้วลากหรือขีด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Agar Plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น
10. หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมารนไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดบริเวณห่วงเขี่ยเชื้อให้หมดจากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบ
11. เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจะมีการศึกษาเชื้อต่อไปในด้านต่างๆ ซึ่งจะต้องมีการถ่ายเชื้อจากอาหารเดิมไปยังอาหารใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

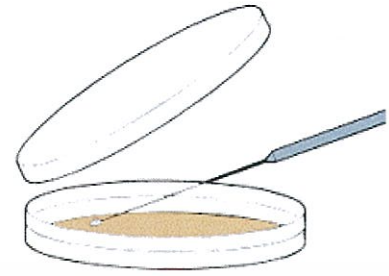
ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak Plate

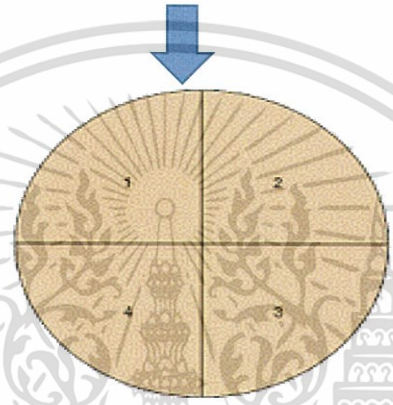
รูปที่ ข-1 การขีดอาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อ

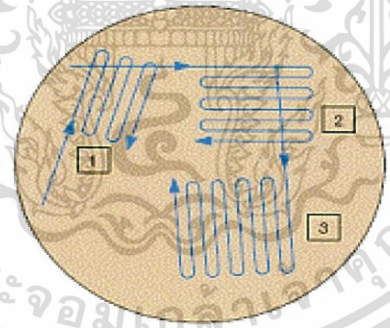
1. ทำการระบุ ชื่อ-นามสกุล วันที่ทำการทดลอง ที่ด้านล่างของจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงอยู่
2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเอาเชื้อออกจากหลอดเซนติฟิวก์พลาสติก (Centrifuge Tube) ทีมีสาหร่ายอยู่ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic Technique)
3. ทำการ Streak เชื้อที่อยู่ปลายห่วงเขี่ยเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมไว้แล้วด้วยความระมัดระวัง
4. เปิดฝาจานเพาะเชื้อให้มีช่องว่างเพียงพอที่จะสอดห่วงเขี่ยเชื้อเข้าไปง่ายแล้วสอดห่วงเขี่ยเชื้อที่มีสาหร่ายอยู่ทำการ Streak ที่พื้นที่หมายเลข 1 โดยในการ Streak จะต้องไม่ทำให้ผิวของอาหารแตกและไม่ควรใช้พื้นที่เยอะสำหรับพื้นที่หมายเลข 1 เพราะจุดประสงค์ต้องการเชื้อที่เป็น Single Colony
5. เมื่อ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 1 แล้วให้นำห่วงเขี่ยเชื้อออกมาฆ่าเชื้อโดยการรนไฟ หลังจากนั้นทำให้ห่วงเขี่ยเชื้อเย็นลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้ๆ
กับบริเวณหมายเลข 1
6. หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ Cross streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวรพื้นที่หมายเลข 1 แล้วทำการ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2
7. เมื่อ streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 2 แล้วให้นำห่วงเขี่ยเชื้อออกมาฆ่าเชื้อโดยการเผาไฟ หลังจากนั้นทำให้ห่วงเขี่ยเชื้อลงโดยการแตะที่ขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้ๆกับบริเวณพื้นที่หมายเลข 2
8. หมุนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการ Streak บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 แล้วทำการ Cross Streak โดยจุดเริ่มต้นจะอยู่ที่บริเวรพื้นที่หมายเลข 2 แล้วทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 3 ถ้าหากจำเป็นสามารถทำการ Streak ที่บริเวณพื้นที่หมายเลข 4 ได้
9. กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมงแล้วสังเกตการณ์เจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการขีดเพลตด้วยเทคนิค Streak Plate







รูปที่ ข-2 ขั้นตอนการขีดเพลตด้วยเทคนิค Streak Plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การสกัดไขมันด้วยวิธีการ Soxhlet Extraction

รูปที่ ค-1 การสกัดตัวอย่างไขมันจากสาหร่ายด้วยวิธีการ Soxhlet Extraction

จากการสกัดไขมันด้วยวิธีการซอกห์เลตใช้สารละลาย Chloroform : Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 อ้างอิงจากข้อมูลการวิจัยเมื่อใช้ตัวทำละลายผสมในสัดส่วนเท่ากันมีประสิทธิภาพดีกว่าใช้ตัวทำละลายเดี่ยว เนื่องจากโมเลกุลของตัวทำละลายผสมและโมเลกุลของสาหร่ายชีวมวลมีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลตามกฎของแรง Van Der Waals และค่า Polarity ที่ใกล้เคียงกันเกิดการสกัดไขมันในปริมาณมาก เพิ่มจำนวนการผลิตของค่า FAME และใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่าใช้ตัวทำละลายเดี่ยว

ตาราง ค-1 ปริมาตรของค่า FAME ที่ใช้ในการเลือกตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	%ไขมันที่สกัดได้	ค่า FAME (wt%)
Chloroform	7.26	76.60
Ethanol	9.40	51.87
Hexane	4.81	18.09

ที่มา : Krishan Ramluckan *et al.*, 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดไขมันด้วยวิธีการ Soxhlet Extraction

1. นำสาหร่ายมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสและเซลล์ออกจากกัน
2. อบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำไปไว้ในเดซิเคเตอร์ เพื่อกำจัดความชื้นในเซลล์สาหร่าย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำสาหร่ายที่ปราศจากความชื้นไปใส่ใน Extraction thimble แล้วปิดด้วยสำลีเพื่อกันไม่ให้ตัวอย่างสาหร่ายหลุดออกมาระหว่างทำการสกัด
5. เปิดเครื่องหล่อเย็นตั้งอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสแล้วรอจนได้อุณหภูมิที่ตั้งเอาไว้แล้วจึงเปิดระบบปั้ม
6. ใช้สารละลาย Chloroform : Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ใส่ใน ขวดก้นกลมแล้วนำ Grease ทาระหว่างข้อต่อของเครื่องซอกห์เลตแล้วจึงต่ออุปกรณ์
7. ทำการเปิดเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายเดือดแล้วละเหยเป็นไออยู่ภายในซอกห์เลตทำการสกัด 3 ชั่วโมงเพื่อให้แน่ใจว่าสารที่วิเคราะห์นั้นถูกละลายอยู่ในสารละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
วิธีการใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermoscientific)

รูปที่ ง-1 เครื่อง UV-Vis spectroscopy ที่ใช้ในการวัด OD

วิธีการใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermoscientific)

1. นำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารที่ต้องการมาด้วยปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ปิเปตในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
3. หลังจากนั้นทำการเจือจาง 6 เท่า โดยปิเปตน้ำกลั่นในปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
4. หลังจากนั้นให้นำเอาสารที่ต้องการจะวัดค่าการดูดกลืนแสงเข้าสู่เครื่อง
5. ให้ทำการเปิดเครื่อง แล้วกดตั้งค่าให้เป็น absorbance ตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร
5. ใส่คิวเวต blank ลงในช่อง (b) หลังจากนั้นทำการกด set blank แล้วทำการกด Enter
6. ใส่คิวเวตตัวอย่างที่เหลือเรียงตามช่องจาก 1-5 แล้วทำการกด Enter เพื่อทำการวิเคราะห์
7. ทำการวัดจนครบ 11 ตัวอย่าง โดยทำการวัดทั้งหมด 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ข้อมูลผลการทดลอง

1. สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่นำมาวิเคราะห์

สาหร่าย KS03 เป็นสาหร่ายสีเขียวที่พบภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง หรืออยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มเซลล์ และอาจมีขนาดใหญ่มากมองดูคล้ายมีราก ลำต้น และใบ ซึ่งรวมเรียกว่า ทัลลัส (Thallus) แอลจีสามารถเจริญได้ทุกแห่งที่มีความชื้นและสภาพทางกายภาพเคมีที่มีความเหมาะสม ซึ่งส่วนมากเจริญได้ดีในน้ำทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม มีน้อยชนิดมากที่พบตามผิวของหินหรือเปลือกไม้ ส่วนแอลจีที่อยู่ได้ในสภาพที่ค่อนข้างแห้งแล้งจะมีการคงสภาพพักตัวไว้ (Dormant) สาหร่ายมีแหล่งอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ซึ่งจะมีคุณสมบัติทางเคมีหรือกายภาพที่เหมาะสม

2. สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่นำมาอ้างอิง

สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวคลอเรลลา *(Chlorella)* เซลล์ของ *Chlorella* sp. มีขนาดเล็กประมาณ 2-12 ไมโครเมตร รูปร่างทรงกลม หรือเป็นรูปไข่ ครอโรพลาสต์มักอยู่ด้านข้าง หรือเป็นรูปถ้วย อาจมีหรือไม่มีไพรีนอยด์ ผนังเซลล์ค่อนข้างบาง ผนังเซลล์จะประกอบไปด้วยสารพวก Sporopollenin มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้าง 2 ถึง 8 ออโตสปอร์ (Autospore) ต่อเซลล์ ซึ่งจะปล่อยออกทางผนังของเซลล์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศยังไม่มีรายงานการค้นพบที่แน่ชัด (ลัดดา, 2544)

3. การผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงที่สุด

ตารางที่ จ-1 แสดงปริมาณค่า OD_{750} ที่ตรวจวัดได้

ค่า OD_{750} ที่ตรวจวัดได้ (เจือจาง 6 เท่า)			
ชนิดของอาหาร	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
TAP	0.254	0.253	0.254
-Mn	0.240	0.240	0.240
-S	0.238	0.238	0.238
-Fe	0.205	0.205	0.205
-Cu	0.201	0.202	0.202
-Zn	0.198	0.198	0.198
-Ca	0.186	0.181	0.183
-Mg	0.056	0.055	0.056
-K	0.044	0.044	0.044
-N	0.020	0.020	0.020
-P	0.015	0.015	0.015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

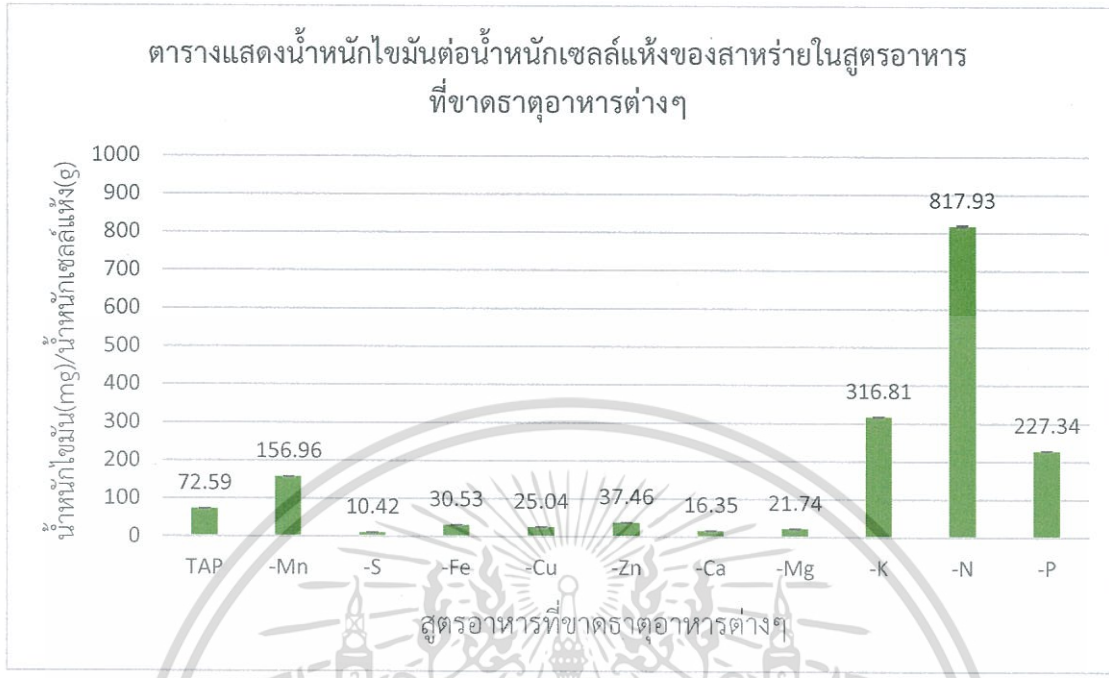
ตารางที่ จ-2 แสดงปริมาณค่า OD_{750}

ค่า OD_{750}				
ชนิดของอาหาร	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**เฉลี่ย**
TAP	1.520	1.518	1.521	1.521
-Mn	1.440	1.440	1.440	1.440
-S	1.430	1.428	1.428	1.428
-Fe	1.230	1.230	1.230	1.230
-Cu	1.210	1.212	1.209	1.209
-Zn	1.190	1.188	1.188	1.188
-Ca	1.120	1.086	1.101	1.101
-Mg	0.340	0.330	0.333	0.333
-K	0.260	0.264	0.264	0.264
-N	0.120	0.120	0.120	0.120
-P	0.090	0.090	0.090	0.090

ตารางที่ จ-3 แสดงปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella sp.*

น้ำหนักไขมัน(mg)/น้ำหนักเซลล์แห้ง(g)					
ชนิดของอาหาร	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**เฉลี่ย**	**error (%)**
TAP	72.449	72.735	72.590	72.590	0.39
-Mn	156.956	156.956	156.960	156.960	0.00
-S	10.420	10.420	10.420	10.420	0.00
-Fe	30.528	30.528	30.530	30.530	0.00
-Cu	25.106	24.981	25.040	25.040	0.50
-Zn	37.463	37.463	37.460	37.460	0.00
-Ca	16.131	16.576	16.350	16.350	0.02
-Mg	21.545	21.937	21.740	21.740	1.81
-K	316.805	316.805	316.810	316.810	0.00
-N	817.931	817.930	817.930	817.930	0.00
-P	227.341	227.341	227.340	227.340	0.00
ค่า Error เฉลี่ย					0.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ-1 แผนภูมิแท่งแสดงน้ำหนักไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในสูตรอาหารต่างๆ

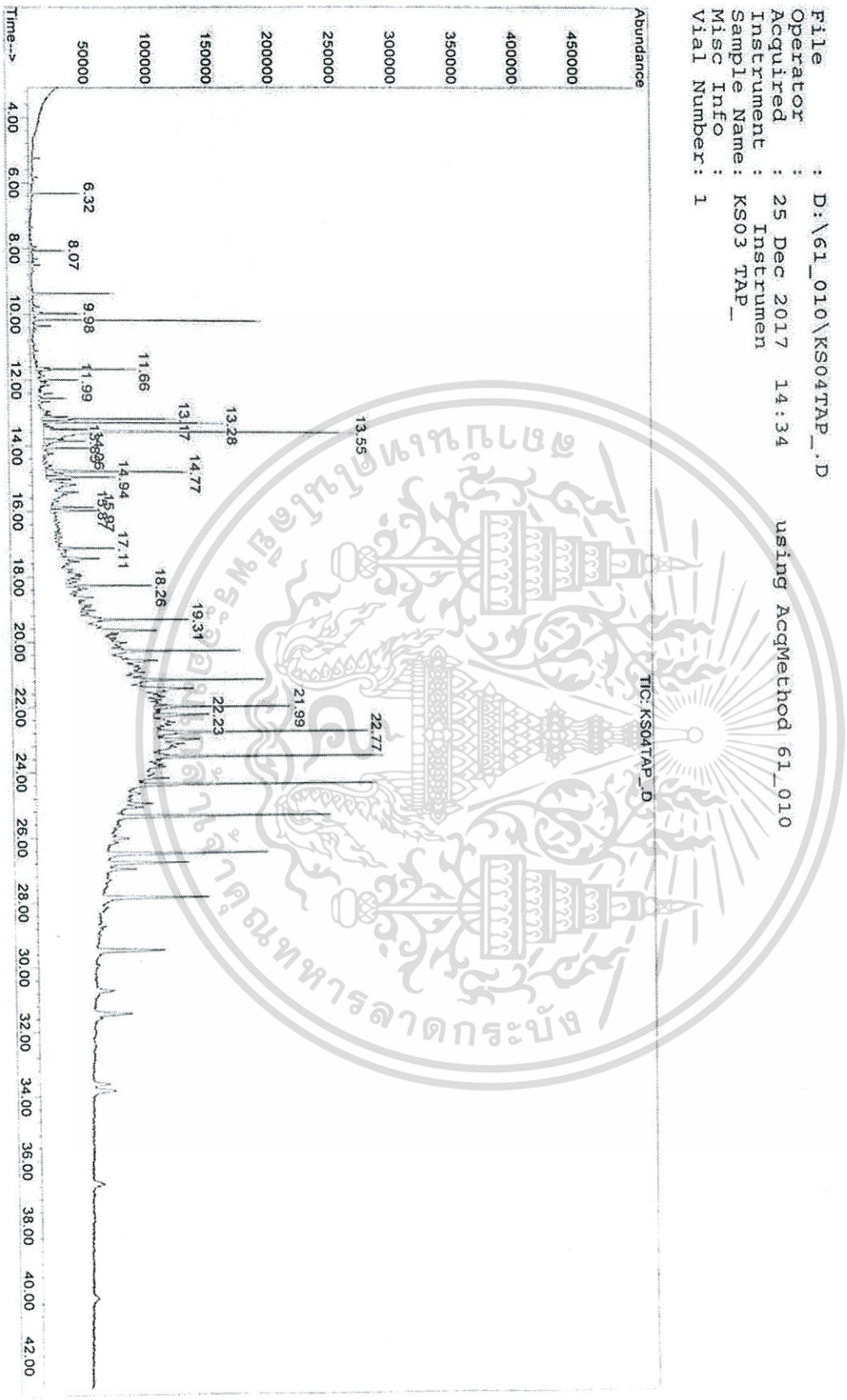
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
ผลการวิเคราห์การสะสมไขมันในเซลล์สาหร่าย

ตารางที่ ฉ-1 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในอาหาร TAP

ลำดับจุดยอดขอกราฟ (Peak)	รีเทนชันไทม์ R.T (min)	พื้นที่ใต้กราฟ (Corr.area)	ชื่อสาร
1	6.323	54692	Undecane (C11)
2	8.067	28130	Hexadecane (C16)
3	9.980	57309	Nonadecane (C19)
4	11.660	133403	Heneicosane (C21)
5	11.990	57418	Docosance (C22)
6	13.166	204859	Tetradecanoic acid (C14:0)
7	13.282	194547	n-Hexadecenoic acid methyl ester (C16:Me)
8	13.547	816097	Hexadenoic acid (C16:0)
9	13.851	103266	9-Hexadecanoic acid (C16:1)
10	14.064	81555	Octadecanoic acid (C18:0)
11	14.769	292081	Cis-Octadecaenoic acid (C18:1n9c)
12	14.943	131497	Cis-Octadecadienoic acid (C18:2n6c)
13	15.867	76450	Trans-Octadecadienoic acid (C18:2n6t)
14	15.971	104264	Nonadecanoic acid (C19:0)
15	17.115	96916	Eicosanoic acid (C20:0)
16	18.258	150307	Tricosanoic acid (C23:0)
17	19.305	259071	Tetracosanoic acid (C24:0)
18	21.993	235104	Pentacosanoic acid (C25:0)
19	22.226	171860	14-BETA-H-PREGNA (C21)
20	22.769	433320	Hexacosanoic acid (C26:0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

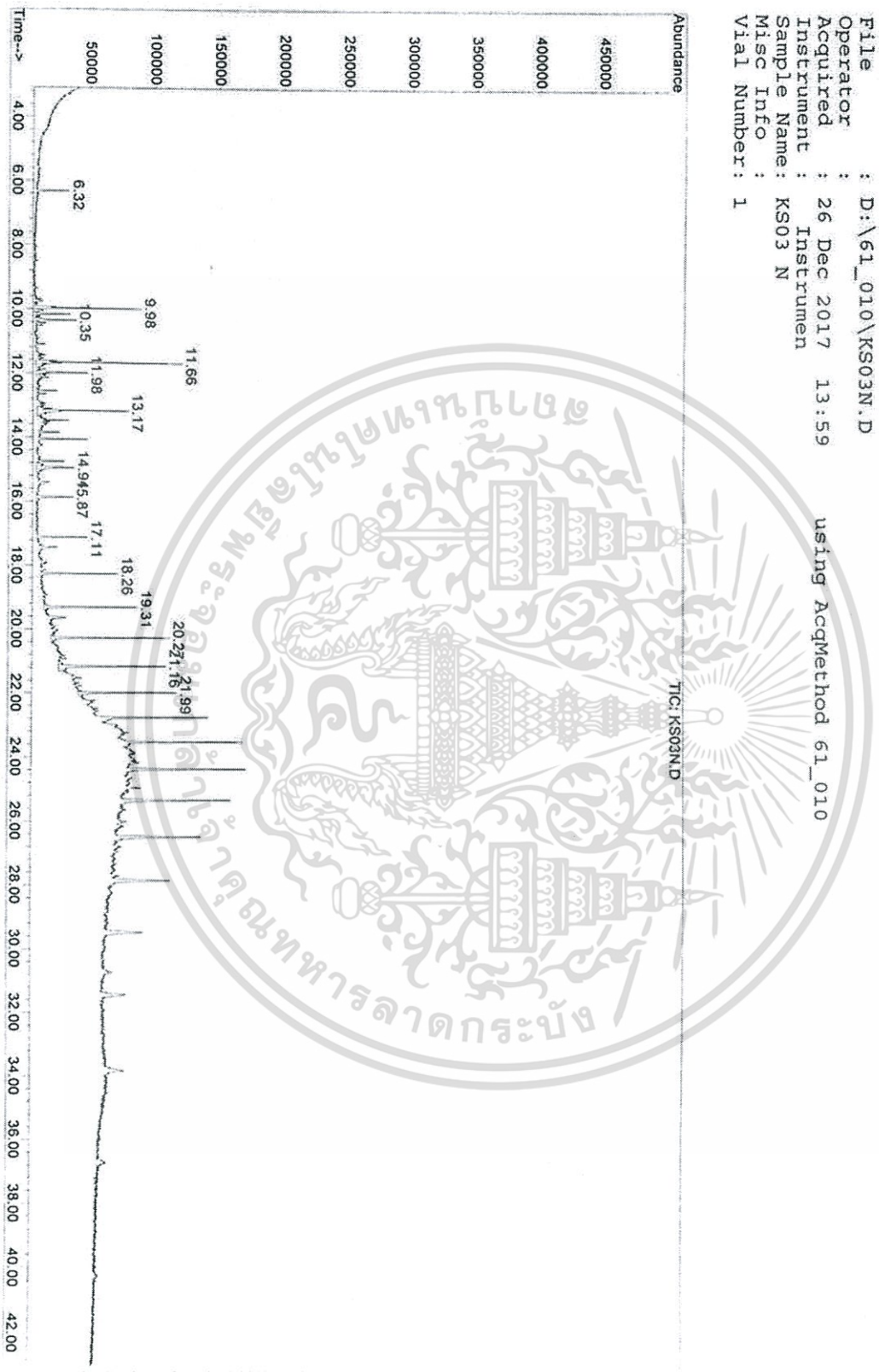


รูปที่ ฉ-1 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP

ตารางที่ ฉ-2 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในอาหาร TAP-N

ลำดับจุดยอดขอกราฟ (Peak)	รีเทนชันไทม์ R.T (min)	พื้นที่ใต้กราฟ (Corr. Area)	ชื่อสาร
1	6.322	36326	Undecane (C11)
2	9.980	158812	Hexadecane (C16)
3	10.355	69752	Docosance (C22)
4	11.660	217848	Tereadecanoic (C14:0)
5	11.983	101749	n-Hexadecenoic acid methyl ester (C16:Me)
6	13.166	199575	Hexadecenoic acid (C16:0)
7	14.943	122213	Cis-Octadecaenoic acid (C18:1n9c)
8	15.867	72427	Cis-Octadecadienoic acid (C18:2n6c)
9	17.114	82408	Trans-Octadecadienoic acid (C18:2n6t)
10	18.258	113176	Eicosanoic acid (C20:0)
11	19.305	71849	Tricosanoic acid (C23:0)
12	20.268	91189	Tetracosanoic acid (C24:0)
13	21.160	82526	Pentacosanoic acid (C25:0)
14	21.993	76169	Hexacosanoic acid (C26:0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

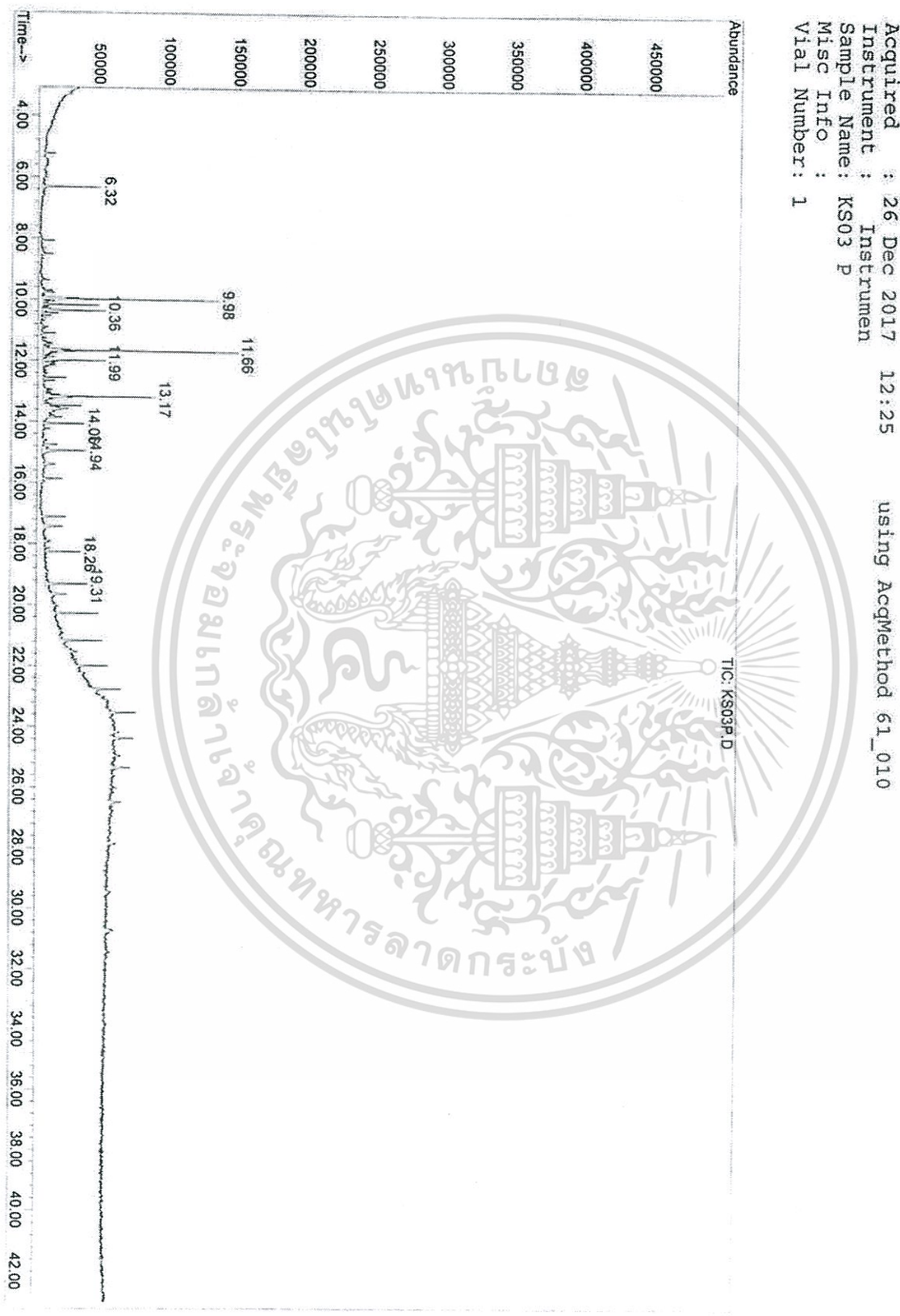


รูปที่ ฉ-2 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-N

ตารางที่ ฉ-3 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในอาหาร TAP-P

ลำดับจุดยอดขอกราฟ (Peak)	รีเทนชันไทม์ R.T (min)	พื้นที่ใต้กราฟ (Corr.area)	ชื่อสาร
1	6.323	82975	Undecane (C11)
2	9.980	187894	Hexadecane (C16)
3	10.355	91591	Tetradecanoic acid (C14:0)
4	11.667	283142	Hexadecenoic acid (C16:0)
5	11.990	151146	Cis-Octadecaenoic acid (C18:1n9c)
6	13.166	209670	Cis-Octadecadienoic acid (C18:2n6c)
7	14.065	51779	Trans-Octadecadienoic acid (C18:2n6t)
8	14.943	113620	Eicosanoic acid (C20:0)
9	18.259	49136	Tricosanoic acid (C23:0)
10	19.305	80274	Tetracosanoic acid (C24:0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

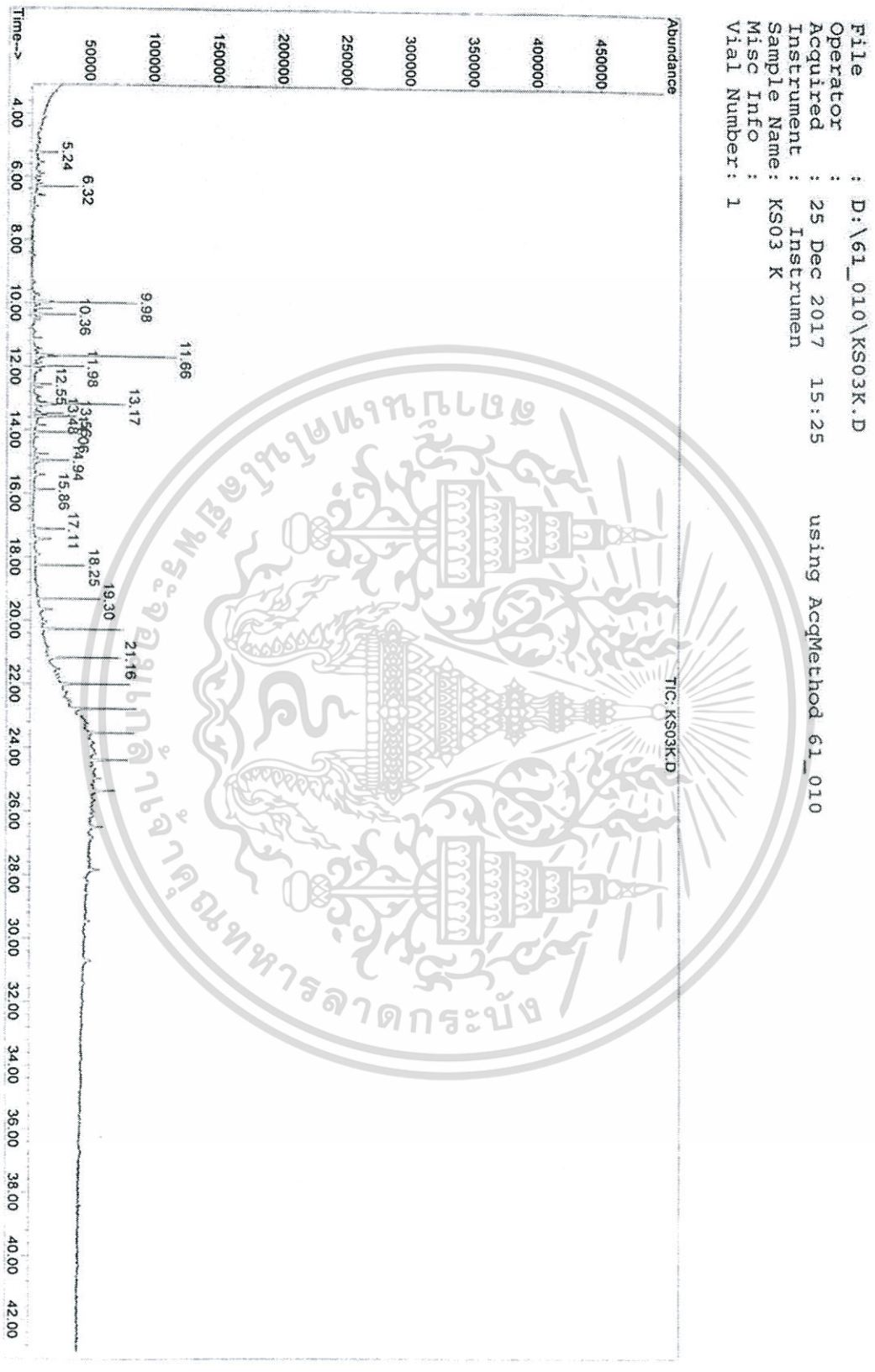


รูปที่ ฉ-3 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-P

ตารางที่ ฉ-4 แสดงผลการวิเคราะห์การสะสมไขมันของสาหร่าย KSO3 ในสภาวะขาดธาตุอาหาร -K

ลำดับจุดยอดของกราฟ (Peak)	รีเทนชันไทม์ R.T (min)	พื้นที่ใต้กราฟ (Corr.Area)	ชื่อสาร
1	5.237	35887	Decane (C10)
2	6.323	46500	Undecane (C11)
3	9.980	119093	Hexadecane (C16)
4	10.355	55914	Heneicosane (C21)
5	11.660	164245	Docosane (C22)
6	11.983	7555	Tetradecanoic acid (C14:0)
7	12.552	21990	n-Hexadecenoic acid methyl ester (C16:0)
8	13.166	131033	Hexadecenoic acid (C16:0)
9	13.476	39659	9-Hexadecenoic acid (C16:1)
10	13.560	65458	Cis-Octadecaenoic acid (C18:1n9c)
11	14.058	53728	Cis-Octadecadienoic acid (C18:2n6c)
12	14.937	82049	Trans-Octadecadienoic acid (C18:2n6t)
13	15.861	37194	Nonadecanoic acid (C19:0)
14	17.108	49372	Eicosanoic acid (C20:0)
15	18.252	76972	Tricosanoic acid (C23:0)
16	19.229	99181	Tetracosanoic acid (C24:0)
17	21.160	114852	Pentacosanoic acid (C25:0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

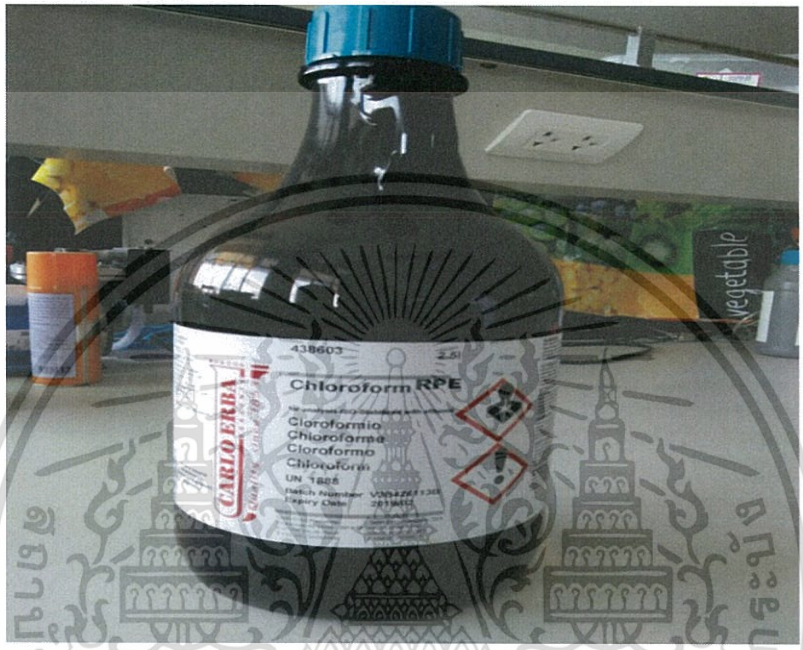


รูปที่ ฉ-4 โครมาโตแกรมของไขมันจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP-K

ภาคผนวก ช
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

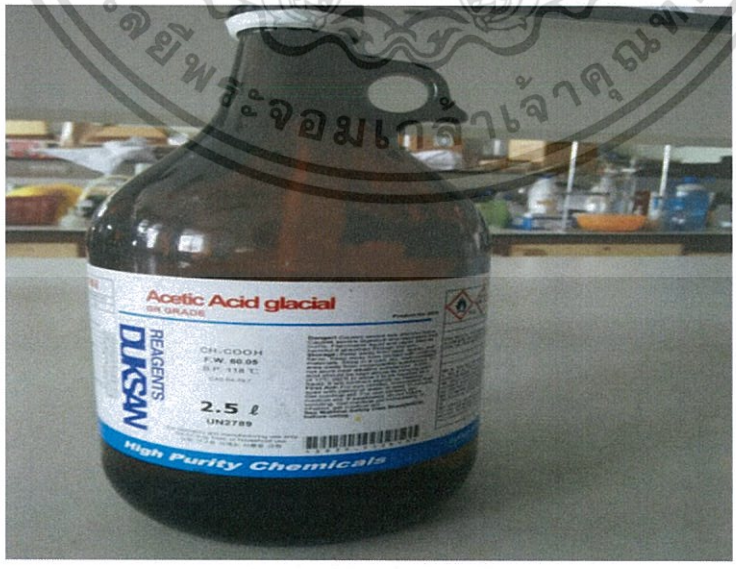
สารเคมี

1.



รูปที่ ช-1 คลอโรฟอร์ม ยี่ห้อ Carloerba เกรดวิเคราะห์

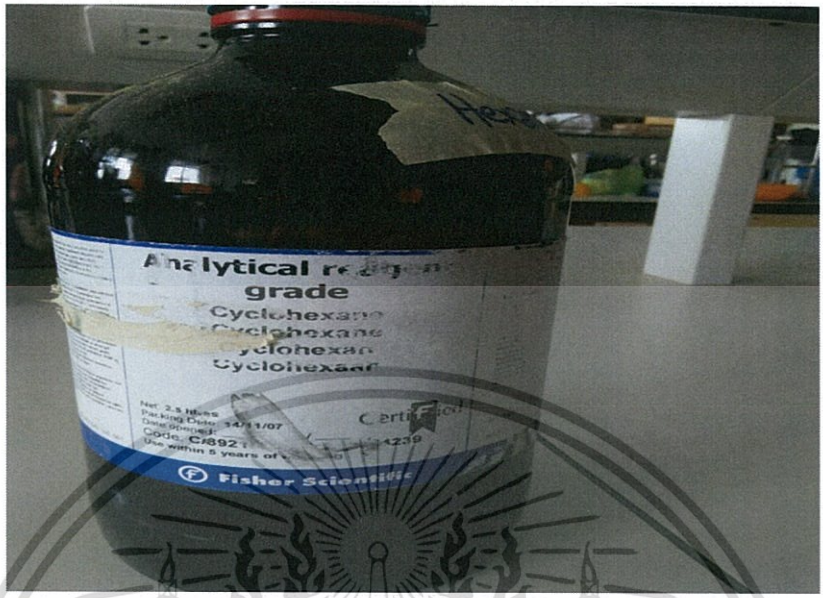
2.



รูปที่ ช-2 กรดแอซิติก (Glacial acetic acid) ยี่ห้อ Duksan เกรดวิเคราะห์

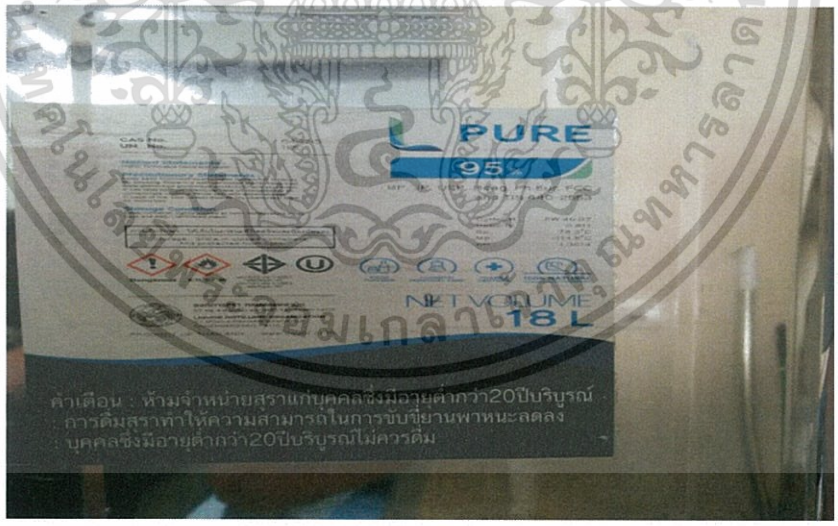
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.



รูปที่ ช-3 เฮกเซน ยี่ห้อ certified เกรดวิเคราะห์

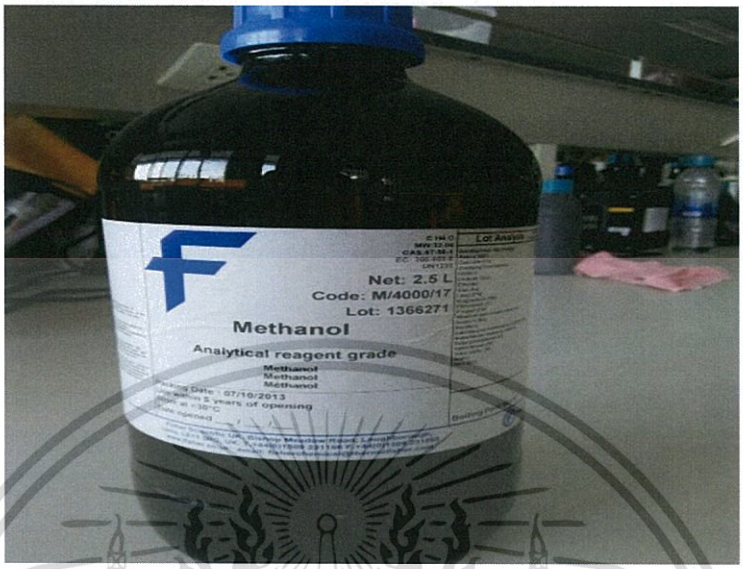
4.



รูปที่ ช-4 เอทานอล ยี่ห้อ L-Pure เกรดอุตสาหกรรม

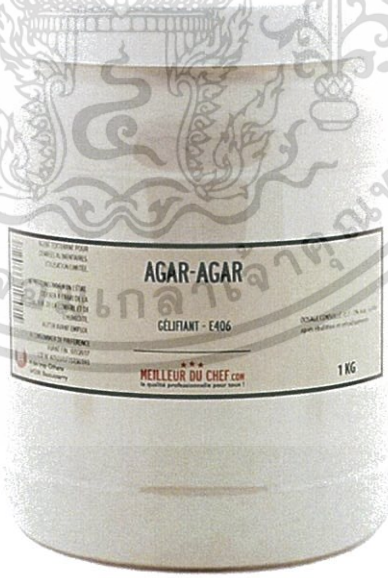
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.



รูปที่ ช-5 เมทานอล ยี่ห้อ Fisher Scientific (UK) เกรดวิเคราะห์

6.

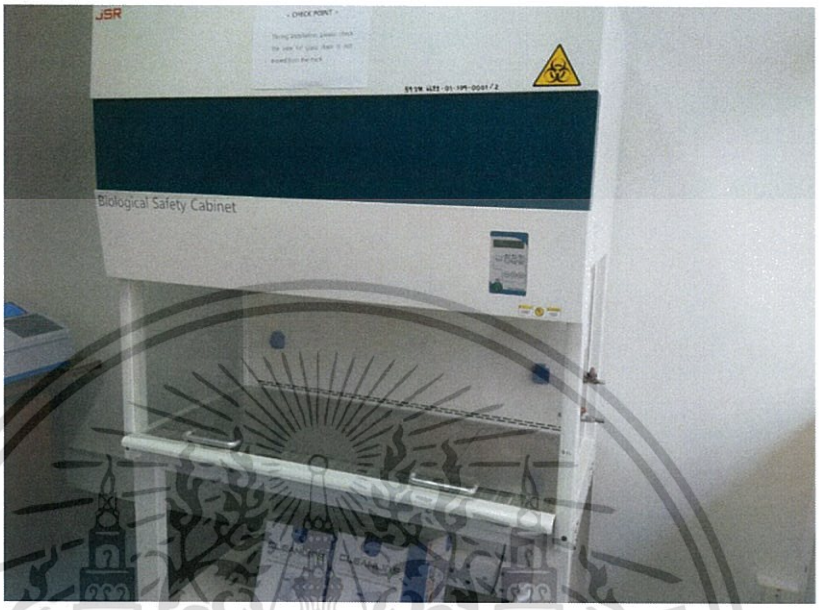


รูปที่ ช-6 ผงวุ้น (Ager Ager)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์ที่ใช้

7.



รูปที่ ช-7 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow); MM-tech: Cleanline BS-120

8.

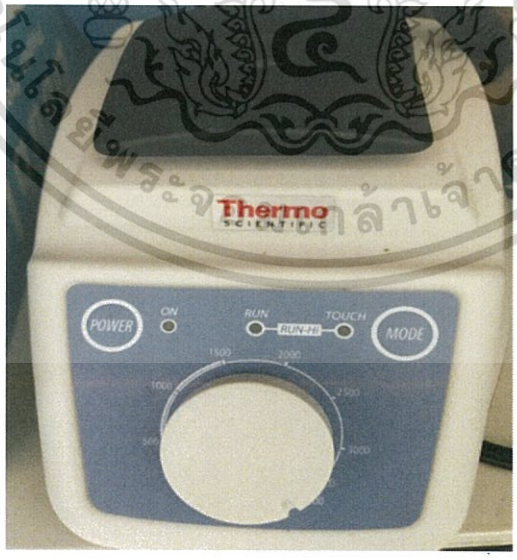
รูปที่ ช-8 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave); Hiryama: Hiclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.

รูปที่ ช-9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge); Hermle: Z36HK

10.



รูปที่ ช-10 เครื่องผสมสาร (Vortex); thermo scientific

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11.

รูปที่ ช-11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermoscientific); Genesys 10SUV-VIS Spectroscopy

12.

รูปที่ ช-12 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง; Adventure: AR2140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13.

รูปที่ ช-13 ชุดอุปกรณ์สกัดไขมัน (Soxhlet apparatus)

14.

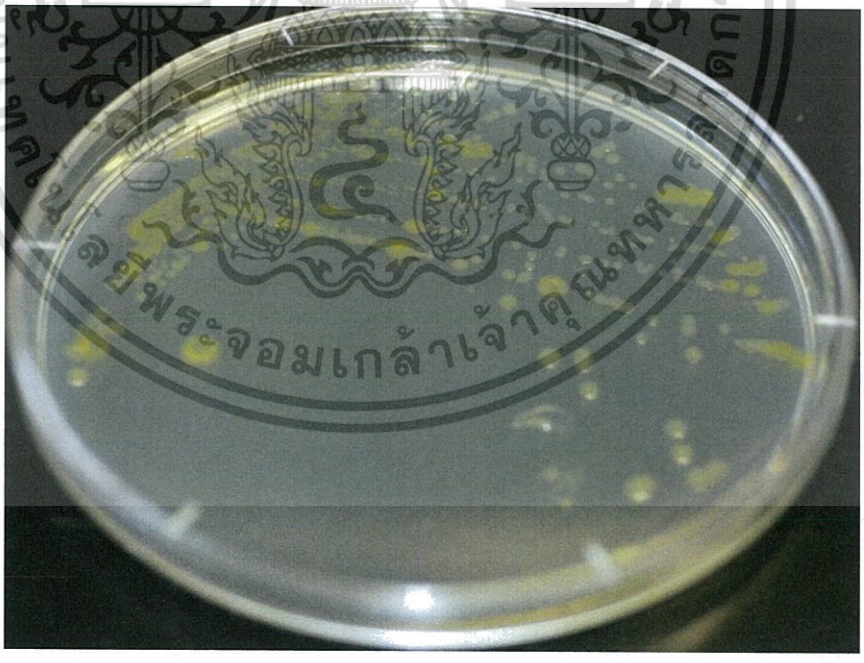
รูปที่ ช-14 โถดูดความชื้น (Desiccator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15.

รูปที่ ช-15 ถังแก๊ส อาร์กอน

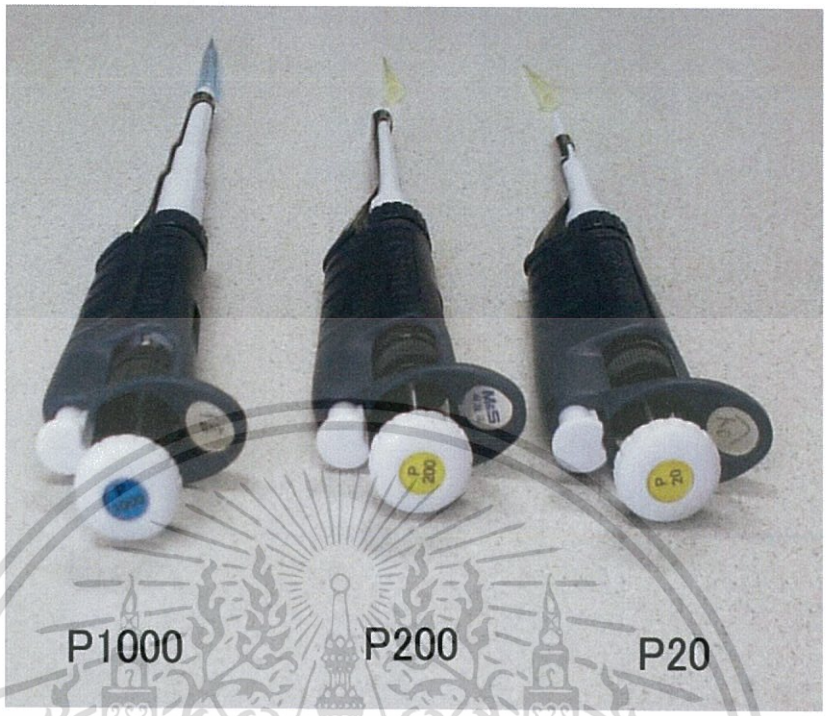
16.



รูปที่ ช-16 จานเลี้ยงเชื้อ (Plate)

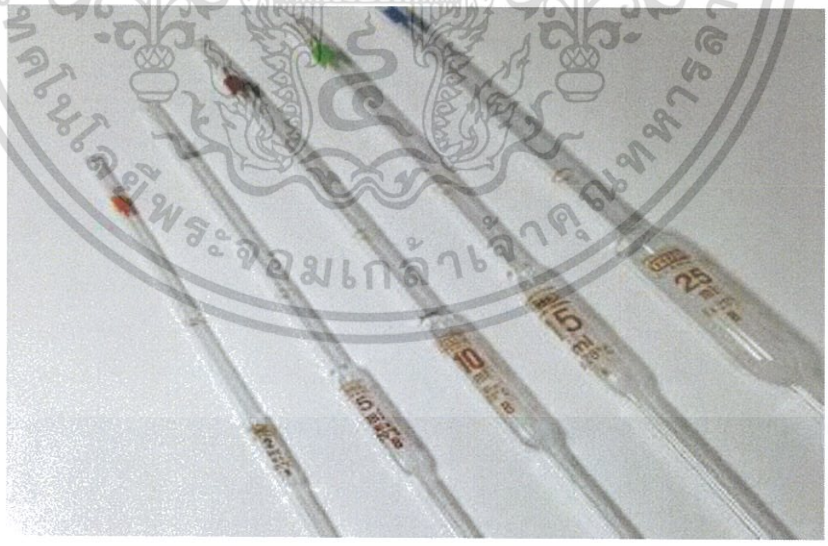
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17.



รูปที่ ช-17 ปิเปตแก้วขนาด 1, 5, 10,15 และ 25 มิลลิลิตร

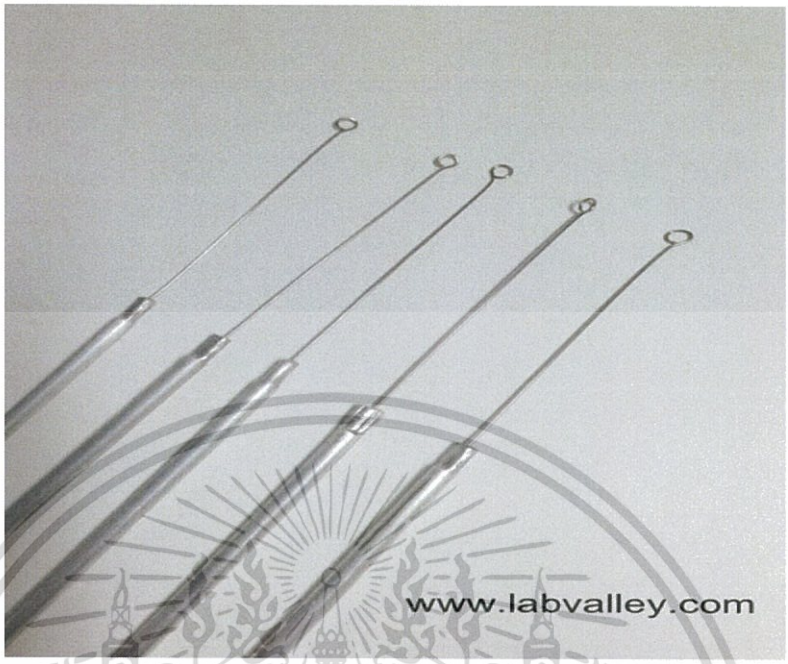
18.



รูปที่ ช-18 ไมโครปิเปตขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19.



รูปที่ ช-19 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

20.

รูปที่ ช-20 ตะเกียงแอลกอฮอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้