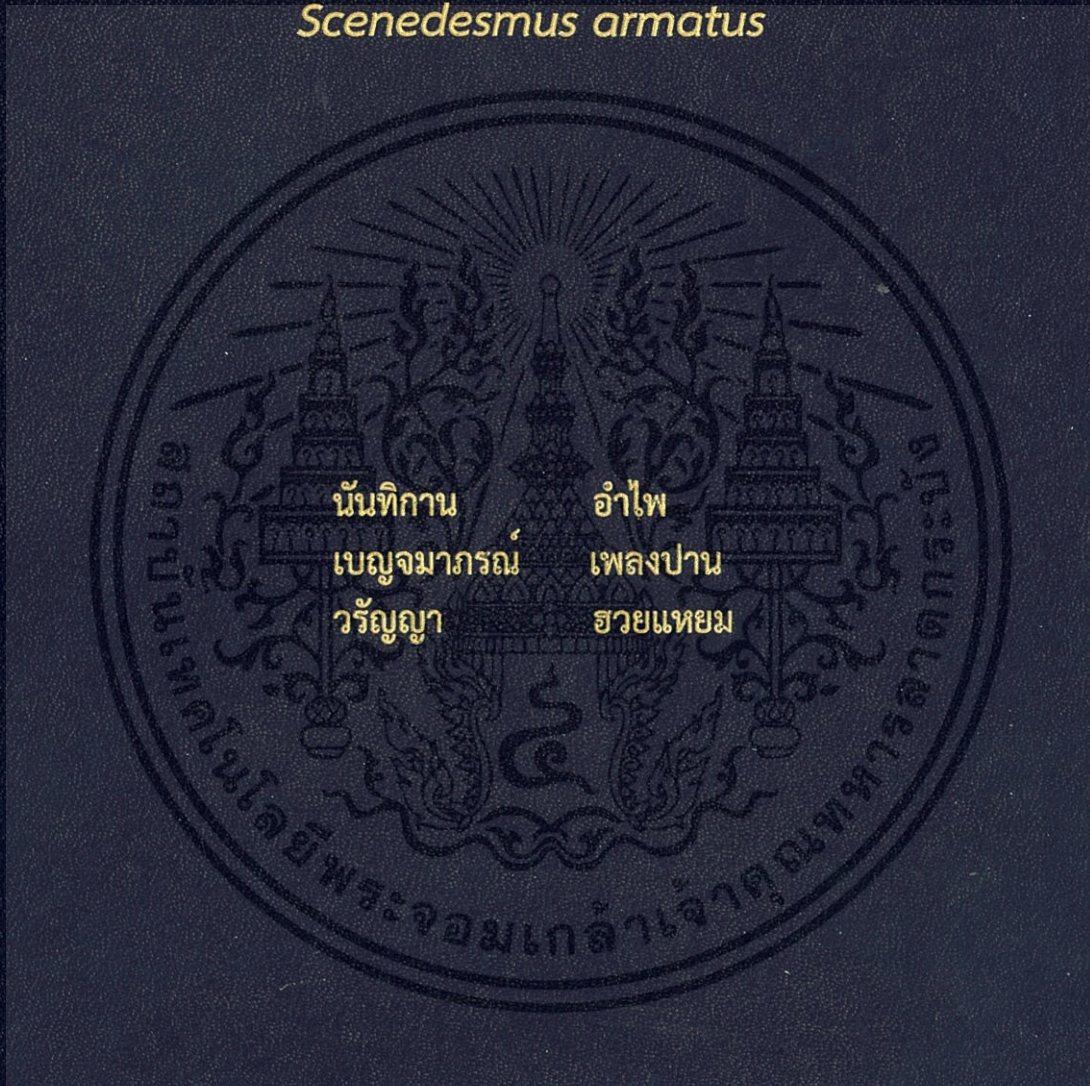


ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไบโอดีเซลของ  
*Scenedesmus armatus*

EFFECT OF CULTIVATION PARAMETER ON THE  
GROWTH AND BIODIESEL PRODUCTION OF  
*Scenedesmus armatus*



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไบโอดีเซลของ

*Scenedesmus armatus*

EFFECT OF CULTIVATION PARAMETER ON THE  
GROWTH AND BIODIESEL PRODUCTION OF

*Scenedesmus armatus*



T149423

นันทิกาน

อำไพ

เบญจมาภรณ์

เพลงปาน

วรัญญา

ฮวยแหยม

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 149423  
วันเดือนปี... - 8 ส.ค. 2561

b.1288540x

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

EFFECT OF CULTIVATION PARAMETER ON THE  
GROWTH AND BIODIESEL PRODUCTION OF  
*Scenedesmus armatus*



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
(BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไบโอดีเซลของ  
*Scenedesmus armatus*  
 Effect of Cultivation Parameter on the Growth and Biodiesel  
 Production of *Scenedesmus armatus*

ชื่อนักศึกษา นางสาวนันทิกาน อำไพ รหัสนักศึกษา 55051115  
 นางสาวเบญจมาภรณ์ เพลงปาน รหัสนักศึกษา 55051118  
 นางสาววรรุญา ฮวยแหยม รหัสนักศึกษา 55051161

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
 ภาควิชา ชีววิทยา  
 ปีการศึกษา 2558  
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงกมล เรือนงาม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
 (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. วินา ชูโชติ ประธานกรรมการ	
ดร. วิภาวี เตชดีศักดิ์ กรรมการ	
ผศ.ดร. ดวงกมล เรือนงาม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไบโอดีเซลของ <i>Scenedesmus armatus</i>			
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนันทิกาน	อำไพ	รหัสนักศึกษา	55051115
	นางสาวเบญจมาภรณ์	เพลงปาน	รหัสนักศึกษา	55051118
	นางสาววรัญญา	ฮวยแหยม	รหัสนักศึกษา	55051161
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
คณะ	วิทยาศาสตร์			
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)			
ปีการศึกษา	2558			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงกมล เรือนงาม			

#### บทคัดย่อ

โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 โดยมีแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรท ใช้ความเข้มข้นในช่วง 1.5-3.0 กรัม/ลิตร และแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ใช้ความเข้มข้นในช่วง 10-50 กรัม/ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร) เขย่าด้วยความเร็วรอบเป็น 110 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ พบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร โดยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นดังกล่าวมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของสาหร่าย ( $\mu_{max}$ ) เป็น 0.1340 ต่อวัน และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และในการเพิ่มปริมาณกลูโคส พบว่าความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร ได้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) เป็น 0.1702 ต่อวัน และไม่แตกต่างกับกลูโคสที่ความเข้มข้น 40, 30 และ 20 กรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากผลข้างต้น พบว่าการเพิ่มปริมาณกลูโคสมีส่วนให้เซลล์เจริญเติบโตรวดเร็วขึ้น และเมื่อพิจารณาการสะสมไขมันในเซลล์ ซึ่งเมื่อตรวจสอบการสะสมไขมันด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red) พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสจะมีการสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีไขมันสะสมเร็วกว่าในอาหารที่ไม่มีกลูโคส สำหรับการเพาะเลี้ยงในระบบขนาด 6 ลิตร (ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร) หัวฟันท่ออากาศแบบท่อตรงมีประสิทธิภาพการให้อากาศดีที่สุด สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบกรดไขมันชนิดปาล์มิติก (C16:0) และโอเลอิก (C18:1) มีประมาณ 0.05 และ 0.01 % (v/v) ตามลำดับ ซึ่งเป็นชนิดของกรดไขมันที่เหมาะสมจะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

**คำสำคัญ :** *Scenedesmus armatus* แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of Cultivation Parameter on the Growth and Biodiesel Production of <i>Scenedesmus armatus</i>		
Students	Miss Nanthikan	Ampai	Student ID 55051115
	Miss Benchamaporn	Phlengpan	Student ID 55051118
	Miss Waranya	Huayyam	Student ID 55051161
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Assist. Prof. Dr. Duangkamol Ruen-ngam		

### Abstract

In this special project focused on the effects of different nitrogen and carbon concentration in BG-11 medium on cell growth of *Scenedesmus armatus*. The sodium nitrate concentrations of the medium were varied from 1.5 - 3.0 g/l and glucose concentrations from 10 - 50 g/l, respectively. The culture was incubated at room temperature ( $27\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) in Erlenmeyer flask 250 ml. (medium volume 150 ml.) with circulate rate at 110 rpm with controlled light intensity at 3,400 Lux. Results showed the maximum cell growth of *S. armatus* in sodium nitrate concentration of 1.5 g/L and glucose concentration of 50 g/L and got the maximum specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ) at 0.1340 per day and no significantly different with concentration of 2.5 g/l at significant level of 95%. When increasing of glucose concentration, the maximum specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ) at 0.1702 per day with no significantly different with 40, 30 and 20 g/l at significant level of 95%. Increasing of glucose increased the maximum specific growth rate and increased in lipid accumulation on the first 3 days of the cultivation compared without glucose which lipid was examined by Nile red. In case of 6 liters cultivation medium volume 150 ml), the maximum specific growth rate was found by using straight tube sparger and results from gas chromatography analysis found the amount of palmitic acid (C16:0) and Oleic acid (C18:1) around 0.05 and 0.01 % (v/v), respectively which both fatty acid was good starter for biodiesel production.

**Keywords :** *Scenedesmus armatus*, Nitrogen source, Carbon source

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีทุกประการต้องขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ดวงกมล เรือนงาม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยเหลือชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้จัดทำใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผศ. วีณา ชูโชติ และ ดร. วิภาวี เดชดีศักดิ์ ที่ช่วยเหลือ แนะนำ และแก้ไขปัญหาในโครงการพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ สำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในความอนุเคราะห์บทความทางวิชาการ เอกสารความรู้ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบคุณ บิดา มารดา และพี่น้องทุกคน ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด และขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนทุกท่านที่เกี่ยวข้องที่ได้กล่าวถึงในที่นี้ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในความสำเร็จในครั้งนี้ด้วย

นันทิกาน อ่ำไพ  
เบญจมาภรณ์ เพลงปาน  
วรัญญา ฮวยแหยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สาหร่าย.....	3
2.1.1 สาหร่ายสีเขียว.....	3
2.1.2 สาหร่ายน้ำมัน.....	5
2.1.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algal cultivation).....	6
2.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	7
2.2.1 กระบวนการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	7
2.2.2 การสังเคราะห์แสง.....	8
2.2.3 กระบวนการในการสังเคราะห์ลิพิด (Lipid biosynthesis pathway).....	9
2.2.4 กรดไขมันที่พบในสาหร่ายขนาดเล็ก.....	11
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่าย.....	13
2.3.1 ผลของความเข้มแสง.....	13
2.3.2 ผลของอุณหภูมิ.....	14
2.3.3 ผลของพีเอช.....	14
2.3.4 ผลของคาร์บอน.....	15
2.3.5 ผลของไนโตรเจน.....	17
2.4 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Growth measurement).....	32
2.5 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่าย.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.1 กล้องจุลทรรศน์แบบ Fluorescence microscope.....	34
2.5.2 การวัดการเรืองแสงของไขมันด้วยสีย้อมไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscopy).....	35
2.6 การผลิตไบโอดีเซล.....	35
2.6.1 เทคโนโลยีการผลิตไบโอดีเซล.....	36
2.6.2 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชัน (Transesterification).....	37
2.6.3 ข้อดีและข้อระวังในการใช้น้ำมันไบโอดีเซล.....	38
2.7 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไขมันในสาหร่าย.....	38
2.7.1 แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC).....	38
2.7.2 ข้อดีของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี.....	41
2.7.3 ข้อเสียของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี.....	42
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	42
<b>บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....</b>	<b>45</b>
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	45
3.1.1 หัวเชื้อสาหร่าย.....	45
3.1.2 สารเคมีที่ใช้.....	45
3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้.....	46
3.2 แผนผังการทดลอง.....	48
3.3 การเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์.....	49
3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยง BG-11.....	49
3.3.2 การเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยง BG-11.....	49
3.4 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์.....	49
3.4.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11.....	49
3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับการทดลอง.....	50
3.5 การศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	50
3.6 การหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ สาหร่าย.....	51
3.6.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	51

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต.....	51
3.7 การหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	51
3.7.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ.....	51
3.7.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต.....	52
3.8 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยง.....	52
3.8.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11.....	52
3.8.2 การเพาะเลี้ยงในขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร (ปริมาตรอาหาร 4,000 มิลลิลิตร).....	52
3.9 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและปริมาณไขมันของสาหร่าย.....	53
3.9.1 วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer).....	53
3.9.2 วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD).....	55
3.9.3 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	55
3.9.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-Sulfuric method).....	55
3.9.5 การตรวจสอบปริมาณไขมันที่มีในเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีไนล์เรด.....	55
3.10 การสกัดและทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	56
3.10.1 การสกัดไขมันจากสาหร่าย.....	56
3.10.2 ทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไขมัน.....	56
3.11 การศึกษาปริมาณและชนิดของกรดไขมัน.....	56
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	57
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....</b>	<b>58</b>
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	58
4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน.....	61
4.3 ผลของความเข้มข้นกลูโคสที่แตกต่างกัน.....	68
4.4 ผลการตรวจสอบการสะสมไขมันที่มีในเซลล์ของสาหร่าย.....	76
4.5 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยง.....	80

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC).....	84
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	86
เอกสารอ้างอิง.....	88
ภาคผนวก.....	94
ภาคผนวก ก.....	95
ภาคผนวก ข.....	98
ภาคผนวก ค.....	144
ภาคผนวก ง.....	148
ภาคผนวก จ.....	153



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่าย <i>Scenedesmus bijugatus</i> .....	11
2.2 องค์ประกอบของกรดไขมันของ <i>N. salina</i> , <i>N. oceanic</i> , <i>N. oculata</i> .....	12
2.3 ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	19
3.1 สภาวะการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME).....	57
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	58
4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน.....	62
4.3 อัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทต่างกัน.....	66
4.4 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน.....	68
4.5 อัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสต่างกัน.....	73
4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ด้วยหัวพ่นอากาศ 3 แบบ.....	80
4.7 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> จากการคิดเทียบกับพื้นที่ได้กราฟรวมของกรดไขมันที่ใช้เป็นมาตรฐาน.....	84
4.8 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> จากการคิดเทียบกับพื้นที่ได้กราฟรวมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง.....	85
ก.1 แสดงสารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร BG-11.....	95
ก.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ.....	97
ก.3 การเตรียมสารละลายกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1 ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	97
ข.1 ข้อมูลการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	98
ข.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทแตกต่างกัน.....	99
ข.3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน.....	102
ข.4 แสดงความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร.....	118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข.5 ค่าการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริกในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มี ความเข้มข้นกลูโคสต่างกัน.....	120
ข.6 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	123
ข.7 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.0 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	125
ข.8 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	127
ข.9 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 3.0 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	129
ข.10 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	131
ข.11 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นกลูโคส 20 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	132
ข.12 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	133
ข.13 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นกลูโคส 40 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	134
ข.14 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มี ความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red).....	135
ข.15 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Myristic acid (C14:0) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	137
ข.16 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitic acid (C16:0) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	138
ข.17 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitoleic acid (C16:1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	139
ข.18 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Stearic acid (C18:0) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	140
ข.19 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Oleic acid (C18:1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	141
ข.20 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Linoleic acid (C18:2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	142
ข.21 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) ที่ได้จากสาหร่าย.....	143
ค.1 ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 22 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทต่างกัน.....	144

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค.2 ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 22 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสต่างกัน.....	146



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	4
2.2 แสดงช่วงการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	7
2.3 กระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์.....	10
2.4 แสดงการเพิ่มขึ้นของชีวมวลในแต่ละวันของความเข้มข้นที่แตกต่างกัน.....	15
2.5 การเพิ่มขึ้นของชีวมวล, ผลได้ของไขมัน และไขมันที่สะสมในเซลล์ ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน.....	16
2.6 แสดง Haemocytometer counting chamber.....	32
2.7 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่.....	33
2.8 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope).....	34
2.9 ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์.....	37
2.10 กลไกปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์.....	37
2.11 แสดง Block Diagram องค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.....	40
2.12 แสดงองค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.....	40
3.1 แสดงการนับเซลล์ที่ทับเส้นของสไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์.....	53
3.2 แสดงส่วนประกอบของสไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์.....	54
3.3 แสดงพื้นที่ของตารางบนสไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์.....	54
4.1 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	59
4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	59
4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	60
4.4 แบบจำลองระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	61
4.5 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มี โซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน.....	63
4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน.....	64
4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มี โซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน.....	65
4.8 เซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ถ่ายภาพ (Nikon ECLIPSE Ci) กำลังขยาย 40X ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความ เข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ).....	68

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มี กลูโคสความเข้มข้นต่างกัน.....	70
4.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน.....	71
4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มี กลูโคสความเข้มข้นต่างกัน.....	72
4.12 เซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ถ่ายภาพ (Nikon ECLIPSE Ci) กำลังขยาย 40X ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความ เข้มข้นของกลูโคสต่างกัน คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง, จ ตามลำดับ).....	75
4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่กับความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	76
4.14 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในวันที่ 21 ของการ เพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ).....	77
4.15 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง, จ ตามลำดับ).....	78
4.16 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในวันที่ 9 ของ การเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ) และที่ความเข้มข้นกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร (จ, ฉ, ช, ซ, ฅ ตามลำดับ).....	79
4.17 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ใช้ห้วฟนอากาศทั้ง 3 แบบ.....	81
4.18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ใช้ห้วฟน อากาศทั้ง 3 แบบ.....	81
4.19 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ที่ใช้ห้วฟนอากาศทั้ง 3 แบบ.....	82
4.20 ห้วฟนอากาศแบบห้วทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง ตามลำดับ.....	83
4.21 จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	84
ข.1 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11.....	105
ข.2 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	105

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.3 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	106
ข.4 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	106
ข.5 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	106
ข.6 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	107
ข.7 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	107
ข.8 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	107
ข.9 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	108
ข.10 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	108
ข.11 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	108
ข.12 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	109
ข.13 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	109
ข.14 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	109
ข.15 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	110
ข.16 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	110

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.17 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	110
ข.18 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	111
ข.19 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	111
ข.20 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	111
ข.21 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	112
ข.22 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	112
ข.23 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	112
ข.24 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	113
ข.25 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	113
ข.26 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	113
ข.27 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	114
ข.28 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	114
ข.29 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	114
ข.30 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	115

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.31 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	115
ข.32 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	115
ข.32 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	115
ข.33 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	116
ข.34 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1).....	116
ข.35 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2).....	116
ข.36 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3).....	117
ข.37 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4).....	117
ข.38 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	118
ข.39 การมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร.....	119
ข.40 กราฟมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (37-component FAMES standard mixture) ที่วิเคราะห์โดย GC-FID โดยใช้คอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm id, 0.25 $\mu$ m).....	136
ข.41 ตัวอย่างกราฟกรดไขมันโอเลอิก(Oleic acid, C18:1) ที่วิเคราะห์โดย GC-FID โดยใช้คอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm id, 0.25 $\mu$ m).....	136
ข.42 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Myristic acid (C14:0).....	137
ข.43 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitic acid (C16:0).....	138
ข.44 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitoleic acid (C16:1).....	139
ข.45 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Stearic acid (C18:0).....	140
ข.46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Oleic acid (C18:1).....	141
ข.47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Linoleic acid (C18:2).....	142

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.48 กราฟเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) จากน้ำมันสาหร่าย ที่วิเคราะห์โดย GC-FID โดยใช้คอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm id, 0.25 $\mu$ m).....	143
ง.1 หัวเชื้อบริสุทธิ์ <i>Scenedesmus armatus</i> ในหลอดอาหารเลี้ยง BG-11.....	148
ง.2 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์.....	148
ง.3 การนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer).....	149
ง.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD).....	149
ง.5 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	149
ง.6 แสดงขั้นตอนการฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus armatus</i> .....	151
ง.7 แสดงการสกัดไขมันจากสาหร่าย.....	152



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันโลกเข้าสู่ภavn้ำมันปิโตรเลียมขาดแคลน หลายภาคส่วนที่เกี่ยวข้องจึงพยายามหาพลังงานทางเลือกหรือพลังงานทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งและจัดว่าเป็นพลังงานสะอาดซึ่งที่ได้จากการใช้วัตถุดิบจากการเกษตรหรือเรียกว่าสารชีวมวล อันได้แก่ ปาล์ม ฝ้าย และถั่วเหลือง เป็นต้น การใช้วัตถุดิบทางการเกษตรดังกล่าวมีข้อจำกัดทางด้านผลผลิตต่อไร่จึงทำให้ได้ปริมาณไม่สม่ำเสมอ (นฤตชวรรณ, 2556) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ผลผลิตต่อไร่ในปริมาณสูง ดังนั้นสาหร่ายจึงเป็นวัตถุดิบหนึ่งเพื่อใช้ผลิตพลังงานทดแทน อีกทั้งสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการสะสมกรดไขมันในเซลล์สูง มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว รวมถึงประเทศไทยได้เปรียบทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่าย การเพาะเลี้ยงสาหร่ายประกอบด้วยปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง สายพันธุ์ของสาหร่าย สารอาหาร เป็นต้น ในด้านของสารอาหารมีส่วนสำคัญต่อการเจริญและสะสมไขมันของสาหร่าย อาทิ แหลงไนโตรเจน ซึ่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในโมเลกุลของโปรตีน คลอโรฟิลล์ อาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอ เป็นต้น แหลงไนโตรเจนจึงมีอิทธิพลต่อการปรับปรุงคุณภาพของไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก (Wu and Miao, 2014) แหลงไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) เมื่อเทียบกับ ยีสต์สกัด และยูเรีย (รัตนภรณ์ และงามนิจ, 2010) แหลงคาร์บอนมีความสำคัญในการสร้างไขมัน โดยพบว่าแหลงคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ กลูโคส เมื่อเทียบกับ กลีเซอริน ไกลซีน และแมนนิทอล (Cao และคณะ, 2014) การเพาะเลี้ยงโดยใช้แหลงคาร์บอนเป็นสารอินทรีย์ร่วมกับการใช้แสง พลังงานที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเร่งการเผาผลาญน้ำตาลกลูโคสซึ่งสามารถทำให้ผลิตชีวมวลสูง (Yamane และคณะ, 2011) มีการขนส่งกลูโคสเพิ่มขึ้นในเซลล์ ทำให้มีทั้งชีวมวล คาร์โบไฮเดรตและไขมันสูง (Pancha และคณะ, 2015) และในกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน จะเริ่มจากกลูโคสที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นไขมันสะสมในเซลล์ของสาหร่าย (Courchesne และคณะ, 2009) โดยพบว่ากรดไขมันที่เหมาะสมสำหรับผลิตไบโอดีเซล คือ ปาล์มมิติก (C16:0) โอเลอิก (C18:1) และไลโนเลอิก (C18:3) (Lin and Wu, 2015) นอกจากนี้สายพันธุ์สาหร่ายก็มีอิทธิพลต่อคุณภาพของกรดไขมันที่สาหร่ายสร้างขึ้น สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะผลิตไขมันที่แตกต่างกัน จากงานวิจัยในอดีตพบว่า *Scenedesmus* sp. สามารถผลิตน้ำมันที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพ (Wu and Miao, 2014) และผลผลิตที่ได้แตกต่างกันตามสภาวะที่เพาะเลี้ยงจึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะส่งเสริมให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดและผลิตกรดไขมันที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพต่อไป

การวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ สารอาหาร และลักษณะการเพาะเลี้ยง โดยศึกษาถึงแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การสะสมไขมัน และชนิดของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการใช้กลูโคสและโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างๆ รวมถึงการขยายขนาดของการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์และไขมันปริมาณมากและเร็วที่สุด เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต
- 1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต
- 1.2.3 ศึกษาขนาดของการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย
- 1.2.4 ศึกษาชนิดของไขมันที่พบในสาหร่าย เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสะสมไขมันของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ได้แก่ สารอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต คือ แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นต่างๆ และการขยายขนาดภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็น 6,000 มิลลิลิตร ในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีปริมาณการให้อากาศ 1,500 มิลลิลิตรต่อนาที ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) และศึกษาปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Scenedesmus armatus* โดยการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบสภาวะการเลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ ขนาดภาชนะเพาะเลี้ยง การให้อากาศ ความเข้มแสง แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*
- 1.4.2 ทราบชนิดของกรดไขมันที่สะสมในเซลล์ของสาหร่าย
- 1.4.3 ทราบถึงกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย
- 1.4.4 สามารถนำความรู้ดังกล่าวไปใช้เป็นพื้นฐานในการเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ในอนาคต

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 สาหร่าย

สาหร่าย เป็นสิ่งมีชีวิตพวกแรกของพวกยูคาริโอต (eukaryotes) ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำก่อน ที่ จะปรากฏพืชบก เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตัวเองโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายมีขนาดเล็กตั้งแต่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าจนกระทั่งถึงมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่มีขนาดใหญ่ ความยาวหลายเมตร สาหร่ายมีลักษณะรูปร่างง่ายๆ ไปจนถึงรูปร่างที่ซับซ้อน เช่น สาหร่ายเซลล์เดียว หลายเซลล์ กลุ่มเซลล์ หรือโคโลนี เป็นเส้นสายที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง บางครั้งจะเห็นเป็น ลักษณะคล้ายมีราก ลำต้น และใบคล้ายพืชชั้นสูง เรียกว่า ทัลลัส (thallus) ซึ่งในบรรดาสสิ่งมีชีวิตที่ สามารถสังเคราะห์แสงได้ พบว่าเป็นสาหร่ายประมาณร้อยละ 50-60 (ยูวดี, 2549) นอกจากนี้ สาหร่ายบางกลุ่มยังมีโครงสร้างเซลล์คล้ายแบคทีเรียและบางชนิดมีขนาดเคลื่อนที่ได้ลักษณะคล้าย สัตว์ สามารถแบ่งกลุ่มสาหร่ายอย่างง่ายได้เป็น 10 กลุ่ม คือ กลุ่มที่คล้ายพืช ได้แก่ ส่วนใหญ่ของ สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายไฟ สาหร่ายสีน้ำตาล สาหร่ายสีน้ำตาลแกมทอง และสาหร่ายสีแดง กลุ่มที่มี ลักษณะโครงสร้างเซลล์คล้ายแบคทีเรีย ได้แก่ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (ไซยาโนแบคทีเรีย , cyanobacteria) กลุ่มที่คล้ายสัตว์มีขนาดเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ บางส่วนของสาหร่ายสีเขียว ยูกลีนาอดีต ไดโนแฟลกเจลเลตเฮเทอโรคอนท์ และคริปโตโมแนส คนทั่วไปรู้จักสาหร่ายเหล่านี้ในชื่อ “ตะไคร่” (บนบก) “ตะไคร่น้ำ” หรือ “ซีแดด” (ในน้ำจืด) หรือ “น้ำแดง” “ซีปลาวาฬ” หรือ “วัชพืชทะเล” (ในทะเล) (อาภารัตน์, 2552)

#### 2.1.1 สาหร่ายสีเขียว (green algae)

สาหร่ายสีเขียว จัดอยู่ใน Division Chlorophyta สาหร่ายในดิวิชันนี้ ส่วนใหญ่มีสีเขียว เหมือนหญ้า (grass-green algae) ทั้งนี้เพราะในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุจำพวกคลอโรฟิลล์ทั้งเอและ บี จำนวนมาก ซึ่งบดบังรงควัตถุอื่นๆ ไว้ นอกจากนั้นยังมีรงควัตถุจำพวกแคโรทีน และแซนโทฟิลล์อีก หลายชนิด รงควัตถุทั้งหมดอยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งมีรูปร่างหลายแบบ สาหร่ายสีเขียว ส่วนใหญ่จะมี ไพรีนอยด์ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการสร้างแป้งในเซลล์สาหร่ายสีเขียวสามารถพบได้ ทั่วไปแทบทุกหนทุกแห่ง ประมาณร้อยละ 10 ของสาหร่ายสีเขียวทั้งหมดเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งจะ เจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสง และความสมบูรณ์ของสารอาหาร ส่วน อีกร้อยละ 90 ของสาหร่ายสีเขียวที่เหลือจะเป็นสาหร่ายน้ำจืด สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดอาจจะเจริญอยู่ ในน้ำตื้นๆ หรือน้ำลึกที่แสงส่องถึง (ยูวดี, 2549) สาหร่ายมีความหลากหลายมากที่สุดทั้งด้านรูปร่าง และวัฏจักรชีวิต ถึงแม้ว่าสาหร่ายสีเขียวเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่อาศัยอยู่ในน้ำ แต่ยังพบว่ามีแหล่งที่ อยู่ที่แตกต่างกันจำนวนมาก รวมทั้งพวกที่เจริญอยู่บนหิมะ บนเปลือกไม้ ในดิน อาศัยร่วมกับรา

(ไลเคน) สัตว์เซลล์เดียว และไฮดรา เป็นต้น ตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวน้ำจืด ที่มักพบทั่วไปได้แก่ สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวขนาดเล็ก เช่น *Chlorella* sp. สาหร่ายสีเขียวที่เซลล์รวมกันเป็นกลุ่ม เช่น *Scenedesmus* sp., *Pedistrum* sp., *Volvox* sp. และ *Oedogonium* sp. สาหร่ายสีเขียวที่เซลล์ต่อกันเป็นสาย เช่น *Spirogyra* sp. หรือเพอาน้ำ และ *Urothrix* sp. เป็นต้น สำหรับสาหร่ายสีเขียวที่เป็นสาหร่ายทะเล เช่น *Asetabularia* sp. และ *Ulva Codium* sp. เป็นต้น (ปิยรัตน์, 2554)

ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. (ยุวดี, 2549) ลำดับอนุกรมวิธานของ *Scenedesmus* sp. เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่มีลำดับอนุกรมวิธาน ตามระบบการจัดหมวดหมู่ของ Desikachary (1995) ดังนี้

Division: Chorophyta

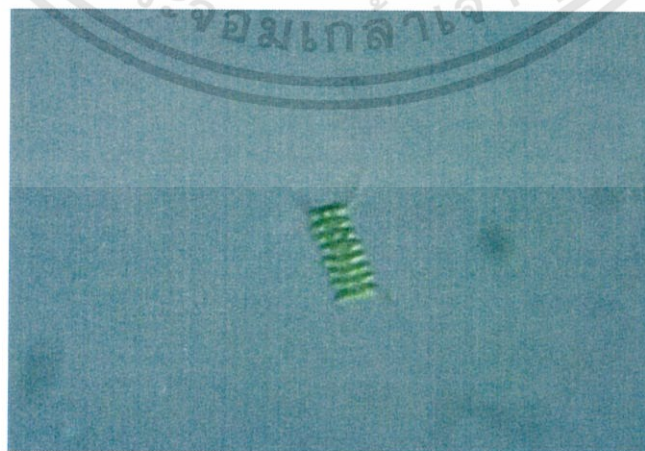
Class: Chlorophyceae

Order: Chlorococcales

Family: Scenedesmaceae

Genus: *Scenedesmus*

ลักษณะของ *Scenedesmus* sp. เป็นโคโลนีประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8 และ 32 เซลล์ มาเรียงต่อกันด้านข้างตามความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่ หรือทรงกระบอก หรือพระจันทร์ครึ่งซีก เซลล์ที่อยู่ด้านริมสุดทั้งสองด้านอาจมีหนาม (spine) ยื่นออกมา บางชนิดไม่มีคลอโรพลาสต์เป็นแผ่นเต็มเซลล์ มีเพริโนอยด์และนิวเคลียสเซลล์ละ 1 อัน สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ ซึ่งในแต่ละเซลล์จะสร้างออโตสปอร์เท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อแก่ก็จะหลุดออกมาจากผนังเซลล์ของแม่จับกันเป็นโคโลนีใหม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแกมมาที่มีแฟลกเจลลัม 2 เส้น และรวมกันแบบไอโซแกมมีท



รูปที่ 2.1 สาหร่าย *Scenedesmus armatus*

(ที่มา: <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB3/PCD2937/htmls/98.html>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.2 สาหร่ายน้ำมัน

สาหร่ายน้ำมันเป็นวัตถุดิบที่กำลังได้รับการสนใจจากทั่วโลก ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานไบโอดีเซล โดยสาหร่ายนั้นให้ผลผลิตสูง ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สาหร่ายขนาดเล็กจะมีไขมันเป็นส่วนประกอบของเซลล์ โดยปริมาณไขมันอาจสูงถึงร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้ง โดยสาหร่ายจะมีการผลิตน้ำมันขึ้นมา เมื่อเจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณสารอาหารจำกัด ภายใต้สภาวะแวดล้อมดังกล่าว เซลล์สาหร่ายจะหยุดการแบ่งตัว และมีการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นน้ำมัน ส่งผลให้องค์ประกอบของน้ำมันในสาหร่ายเพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทยมีสาหร่ายน้ำมันที่หลากหลายสายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. เป็นต้น (เบญจพร และคณะ, 2555. ประกาศิต และคณะ, 2555. อีชวาน และคณะ, 2556)

ชีวมวลของสาหร่าย ประกอบด้วยน้ำมันตามธรรมชาติ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต สาหร่ายหลายสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันได้มากกว่าร้อยละ 35 ของน้ำหนักแห้ง องค์ประกอบและโครงสร้างของน้ำมันที่พบในสาหร่าย มีลักษณะคล้ายคลึงกับพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น ถั่วเหลือง ปาล์ม หรือ เรพซีด เป็นต้น เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ ประกอบด้วย กรดไขมัน (fatty acid) ชนิดต่างๆ 3 โมเลกุล และกลีเซอรอล 1 โมเลกุล สาหร่ายขนาดเล็กจะผลิตกรดไขมันซึ่งมีความยาวของคาร์บอนอยู่ระหว่าง 12-22 อะตอม โดยกรดไขมันพบทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว กรดไขมันที่พบมากที่สุดจะเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน C16 และ C18 ซึ่งจำนวนกรดไขมันทั้งหมดจะแปรผันตามระยะเวลาของการเจริญ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง โดยพบว่าในสภาวะที่ไนโตรเจนมีปริมาณจำกัด หรือขาดไนโตรเจน สาหร่ายจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้งมาทดแทน ทำให้สาหร่ายมีปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้น (นฤตวรรณ, 2556)

วิธีการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย ประกอบด้วย 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ (physical extraction) และการสกัดด้วยวิธีทางเคมี (chemical extraction) ซึ่งการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ (physical extraction) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดคือ การบด (mechanical crushing) โดยการนำสาหร่ายตากแห้งมาคั้นด้วยเครื่อง (oil press) ซึ่งมีหลากหลายรูปแบบ เช่น สกรูหรือลูกสูบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ต้องการคั้น วิธีนี้สามารถสกัดน้ำมันได้ประมาณร้อยละ 75 ซึ่งส่วนใหญ่มักทำร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมี การสกัดด้วยวิธีทางเคมี (chemical extraction) เป็นวิธีที่นิยมนำมาสกัดน้ำมัน แต่ทว่าวิธีนี้มีข้อด้อยจากการใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารเคมีอันตราย ดังนั้นจึงควรเอาใจใส่ในการทำงานกับสารเคมีเพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้น ตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่ คือ เฮกเซน (hexane) เนื่องจากมีราคาถูก ส่วนเบนซีน (benzene) และอีเทอร์ (ether) ก็สามารถนำมาสกัดน้ำมันได้ แต่ตัวทำละลายเบนซีนจัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) การสกัดแบบซอกซ์เล็ต (soxhlet extraction) เป็นวิธีการสกัดสาหร่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์ภายใต้ความร้อน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไปและควบแน่นลงมา ในสาหร่าย ทำให้น้ำมันถูกสกัดออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเด่นของวิธีนี้คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดจะใช้ซ้ำไปมาอย่างต่อเนื่องเป็นการประหยัดตัวทำละลาย และการสกัดวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluids method) วิธีนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลาย โดยจะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์อยู่ในรูปของเหลวภายใต้ความดันและความร้อนซึ่งสามารถสกัดน้ำมันออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการสกัดและได้น้ำมันจากสาหร่ายแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทำให้เป็นไบโอดีเซลด้วยกระบวนการเปลี่ยนเอสเทอร์หรือทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) เช่นเดียวกับน้ำมันจากพืชชนิดอื่น (อรวรรณ, 2553)

### 2.1.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algal cultivation)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย คือ ปริมาณสารอาหาร ความเข้มแสง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร รวมถึงการควบคุมอุณหภูมิและการหมุนเวียนน้ำ เพื่อป้องกันการตกตะกอนของสาหร่าย ซึ่งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้นจะแบ่งออกได้ 2 แบบ คือ

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการ (อชวาน และคณะ, 2556) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีผลต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสาหร่าย โดยทั่วไปสามารถแบ่งสภาวะการเพาะเลี้ยงออกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ autotrophic cultivation, heterotrophic cultivation, mixotrophic cultivation

1.1 การเพาะเลี้ยงแบบ autotrophic cultivation เป็นการเพาะเลี้ยงโดยใช้แสง และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) จากธรรมชาติเป็นหลัก ในการเจริญและสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่างๆ

1.2 การเพาะเลี้ยงแบบ heterotrophic cultivation เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์ เช่น กลูโคส ซูโครส หรือกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงในที่ที่ไม่มีแสงหรือในที่มืดตลอดเวลา

1.3 การเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic cultivation การเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนและแสง เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ตามลำดับ โดยแสงที่ใช้อาจเป็นแสงจากธรรมชาติหรือแสงจากหลอดไฟ ภายในระยะเวลาที่เหมาะสม

2. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับอุตสาหกรรม (อาภารัตน์, 2552) โดยทั่วไปมี 3 วิธี ได้แก่ batch, semi-continuous และ continuous culture

2.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) เป็นการเพาะเลี้ยงโดยปล่อยให้สาหร่ายเจริญเติบโตจนถึงจุดที่ให้ผลผลิตชีวมวลหรือน้ำมันสูงสุด แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเพียงครั้งเดียว

2.2 การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous culture) เป็นการเพาะเลี้ยงโดยการแบ่งเก็บเกี่ยวชีวมวลเป็นระยะๆ เช่น เก็บชีวมวลครั้งละ 1 ใน 3 ของปริมาตรการเพาะเลี้ยงทุก 2-3 วัน แล้วทำการเติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ทดแทนให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม

2.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) เป็นการเพาะเลี้ยงโดยมีการเติมอาหารใหม่ให้แก่ระบบเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา และชีวมวลจะถูกเก็บเกี่ยวจากระบบในอัตราเดียวกัน ซึ่งเป็นอัตราใกล้เคียงกับอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของสาหร่ายสายพันธุ์นั้นๆ ระบบ

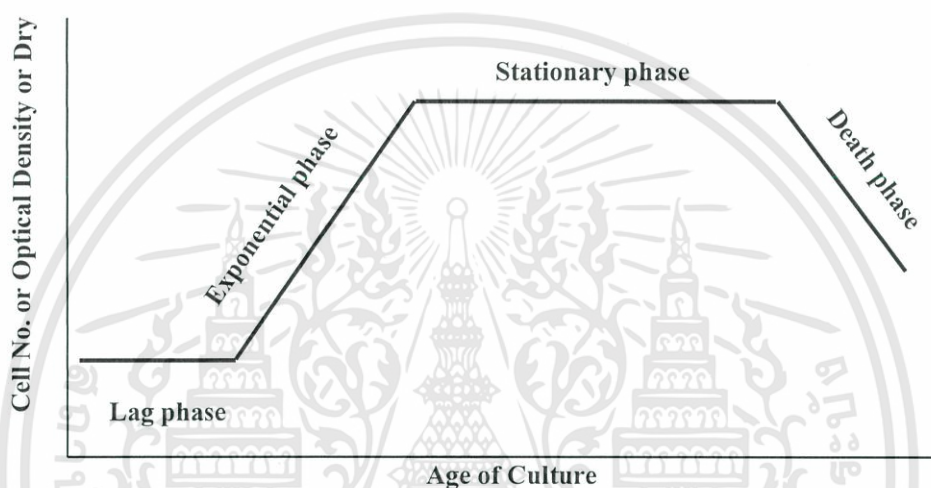
การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีประสิทธิภาพจะสามารถช่วยให้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายดำเนินไปได้ยาวนานเป็นเดือน

## 2.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

### 2.2.1 กระบวนการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ในการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้นจะมีช่วงในการเจริญเติบโตเป็นช่วงต่างๆ กันดังแสดงในรูปที่

2.2



รูปที่ 2.2 แสดงช่วงการเจริญเติบโตของสาหร่าย

จากรูปที่ 2.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็น 4 ช่วง (วัชระ, ม.ป.ป.) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่ายเริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ จะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้ เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยและพร้อมที่จะแบ่งตัว ระยะนี้อาจจะยาวนานแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และขบวนการต่างๆ ตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตแล้วเข้าสู่ระยะ Stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง จึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

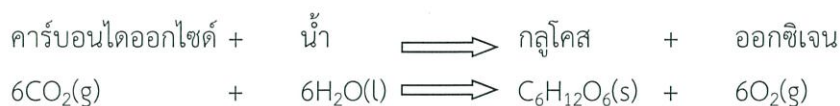
Xin และคณะ, (2011) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. LX1 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน (10-30 องศาเซลเซียส) พบว่าหลังจากวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. LX1 เข้าสู่ระยะคงที่ (stable phase) และมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $p > 0.12$ ) การวิเคราะห์ด้วย t-test ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีนัยสำคัญสูงกว่าที่ 10 องศาเซลเซียส ( $p < 0.0001$ ) ที่ 10 องศาเซลเซียส *Scenedesmus* sp. LX1 เจริญเติบโตอย่างช้าๆ แต่อย่างไรก็ตามหลังจาก 3 วัน มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น และสุดท้ายมีจำนวนเซลล์สูงขึ้นเกือบจะเท่ากับที่มีอุณหภูมิสูง

Tian-Yuan และคณะ, (2013) ศึกษาผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Scenedesmus* sp. LX1 ด้วย soluble algae products (SAP) ในช่วงเริ่มการเพาะเลี้ยงระยะการเจริญเติบโตจะไม่แตกต่างกัน หลังจากวันที่ 12 จะเริ่มเห็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายของทุกความเข้มข้น SAP ซึ่งในวันที่ 12 จะเป็นระยะเซลล์คงตัวของความเข้มข้น SAP ที่ 0, 6.4, 12.9 มิลลิกรัม DOC/ลิตร เมื่อความเข้มข้น SAP เพิ่มขึ้นก็จะยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus* sp. LX1 ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

Rai และ Gupta, (2016) ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus abundans* ในสูตรอาหารที่ความแตกต่างกัน คือ Fogg's, CHU-13 และ BG-11 ต่อการเจริญเติบโตของ *Scenedesmus abundans* จะพบว่าในทุกสูตรอาหารสาหร่ายจะเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงตัวในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร Fogg's จะมีความเข้มข้นชีวมวล  $70.23 \pm 0.001$  มิลลิกรัม/ลิตร/วัน ในสูตรอาหาร CHU-13 จะมีความเข้มข้นชีวมวล  $52.46 \pm 0.002$  มิลลิกรัม/ลิตร/วัน และสูตรอาหาร BG-11 จะมีความเข้มข้นชีวมวล  $47.4 \pm 0.002$  มิลลิกรัม/ลิตร/วัน

## 2.2.2 การสังเคราะห์แสง

การสังเคราะห์แสง คือ กระบวนการที่พืชสีเขียวใช้พลังงานจากดวงอาทิตย์สร้างสารประกอบที่พืชต้องการในการดำรงชีวิต ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงประกอบไปด้วย คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) 6 โมเลกุลจากอากาศรวมกับน้ำ ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 6 โมเลกุล เกิดเป็นกลูโคส ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 1 โมเลกุล แล้วปล่อยออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) 6 โมเลกุลกลับคืนสู่บรรยากาศ (อิทธิพล, 2542)



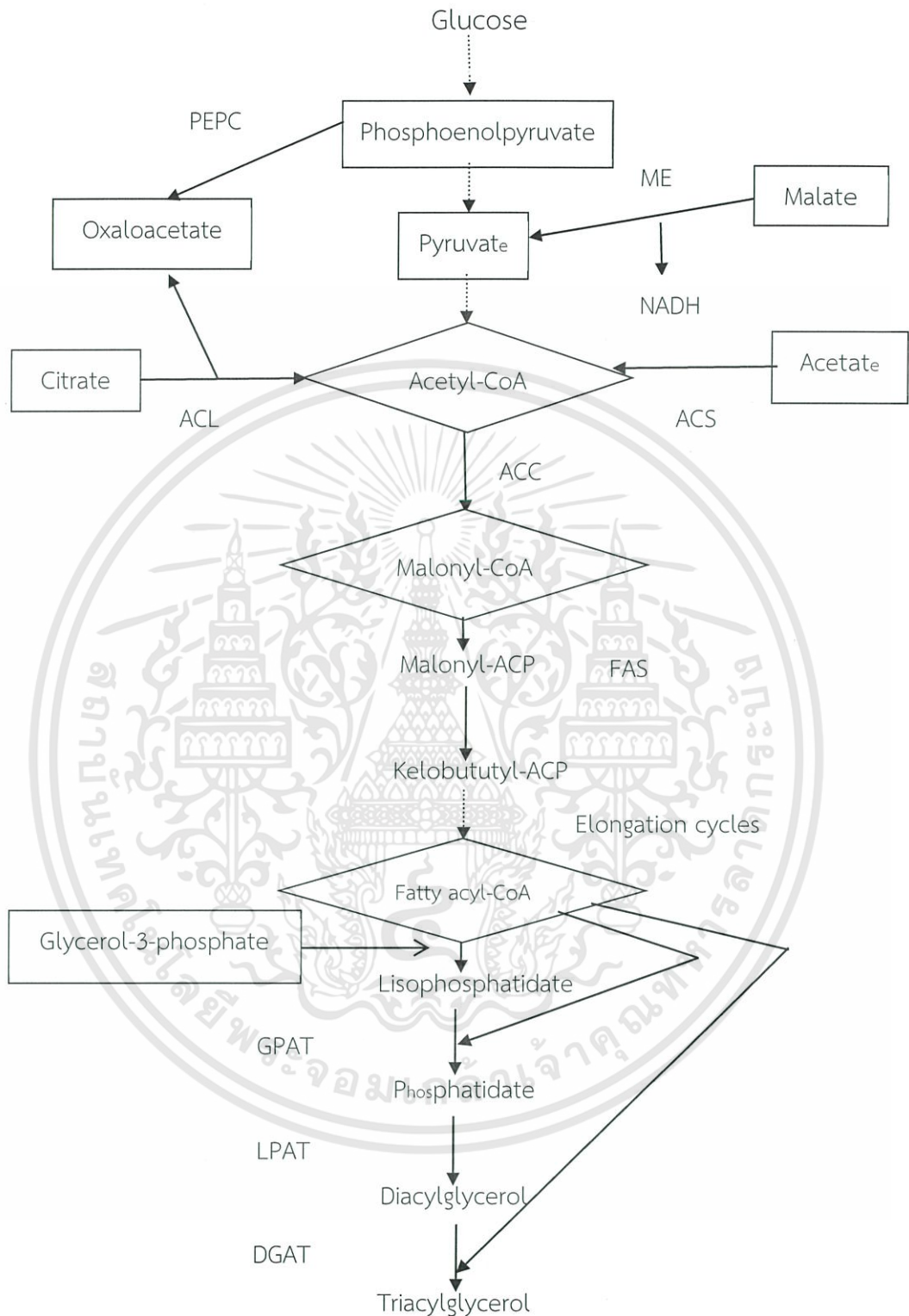
จากสมการดังกล่าวข้างต้นจะพบว่าผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงนั่นก็คือ น้ำตาล ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) และออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) จากกระบวนการดังกล่าวในเซลล์ของสาหร่ายจะใช้น้ำตาลที่ได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการสังเคราะห์แสงนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและในการผลิตลิปิดภายในเซลล์ของสาหร่ายต่อไป (อภิเชษฐ์, 2555)

### 2.2.3 กระบวนการในการสังเคราะห์ลิปิด (lipid biosynthesis pathway)

Courchesne และคณะ, (2009) ได้ทำการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ลิปิด โดยกระบวนการสังเคราะห์ลิปิดจะเริ่มจากเซลล์มีการย่อยสลายกลูโคสไปเป็นไพรูเวทด้วยวิถีไกลโคไลซิส และถูกนำ CO<sub>2</sub> ออกไปจากไพรูเวทแล้วมีการเติม CoA เข้ามาจึงกลายเป็น acetyl-CoA จากนั้น acetyl-CoA ก็เปลี่ยนไปเป็น malonyl-CoA ด้วยเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (ACC) ซึ่ง ACC เป็นตัวเร่งที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ลิปิด ซึ่งจะทำงานได้ก็ต่อเมื่อมี biotin carboxyl เป็นโคแฟกเตอร์ และจากนั้น malonyl-CoA ก็จะเปลี่ยนไปเป็น fatty acyl-CoA ด้วยเอนไซม์ fatty acid synthase (FAS) ซึ่งจะทำงานได้ก็ต่อเมื่อมี malonyl-ACP และ kelobututyl- ACP เป็นโคแฟกเตอร์ ต่อมา fatty acyl-CoA จะเข้ารวมกับ glycerol-3-phosphate กลายเป็น lisophosphatidate แล้วจากนั้น lisophosphatidate ก็จะเปลี่ยนไปเป็น phosphatidate ด้วยเอนไซม์ glycerol-3-phosphate acyl-transferase (GPAT) ต่อจากนั้น phosphatidate เปลี่ยนไปเป็น diacylglycerol ด้วยเอนไซม์ lysophosphatidate acyl-transferase (LPAT) และขั้นตอนสุดท้าย diacylglycerol เปลี่ยนไปเป็น triacylglycerol ด้วยเอนไซม์ diacylglycerol acyl-transferase (DGAT) ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์ลิปิดจะได้ Triacylglycerol เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยกระบวนการในการสังเคราะห์ลิปิด แสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กระบวนการสังเคราะห์ลิปิด

(ที่มา: Courchesne และคณะ, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.2.4 กรดไขมันที่พบในสาหร่ายขนาดเล็ก

Ashokkumar และคณะ, (2015) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus bijugatus* ซึ่งมีกรดไขมันที่สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ คือ palmitic acid (23.6 เปอร์เซ็นต์), oleic acid (27.2 เปอร์เซ็นต์) และ stearic acid (11.3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ประกอบด้วยคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันจะพบว่า *Scenedesmus bijugatus* ประกอบด้วยกรดไขมันทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่าย *Scenedesmus bijugatus*

ลำดับที่	กรดไขมัน	wt%
1	Myristic acid (C14:0)	7.2
2	Palmitic acid (16:0)	23.6
3	Stearic acid (C18:0)	11.3
4	Arachidic acid (C20:0)	4.21
5	Palmitoleic acid (C16:1)	5.06
6	Oleic acid (C18:1)	27.2
7	Linoleic acid (C18:2)	13.4
8	Elaidic acid (C18:1)	2.07
9	Arachidonic acid (C20:4)	1.54
10	Lauric acid (C12:0)	2.87
11	Behenic acid (C22:0)	0.52

(ที่มา: Ashokkumar และคณะ, 2015)

Cha และคณะ, (2011) ศึกษาผลของการผลิตน้ำมันและองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* (UMT-M1) และ *Chlorella sorokiniana* (K2-MB2) ที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรทต่างกัน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันได้สูงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ที่ความเข้มข้นไนเตรทในช่วง 0.18 ถึง 0.66 มิลลิโมล โดย *Chlorella vulgaris* สามารถผลิตได้ร้อยละ 10.20 ถึง 11.34 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* สามารถผลิตได้ร้อยละ 15.44 ถึง 17.32 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และกรดไขมันหลักที่พบได้แก่ C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 และ C18:3 นอกจากนี้ยังพบว่าในความเป็นจริงกรดไขมัน C16:1 และ C14:0 ไม่ค่อยพบในน้ำมันจากสาหร่ายส่วนใหญ่ ดังนั้นกรดไขมันที่พบทั่วไปและเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นไบโอดีเซล เช่น C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 และ C18:3 ควรจะทำการผสมกรดไขมันหรือผสมน้ำมันจากสาหร่ายที่ต่างกันเข้าด้วยกัน เนื่องจากในการผสมสาหร่ายทั้ง

สองสายพันธุ์เข้าด้วยกันจะสามารถผลิตน้ำมันให้ได้คุณภาพตามกรดไขมันที่ผลิตได้และเพื่อให้ได้ไบโอดีเซลที่มีคุณภาพ

Ratha และคณะ, (2013) ทำการศึกษาอัตราการสะสมไขมันและองค์ประกอบในสาหร่ายขนาดเล็กโดยการเสริมไนโตรเจน ประกอบด้วยสาหร่าย *Chlorella* sp. MIC-G4, *Chlorella* sp. MIC-G6 และ *Scenedesmus* sp. MIC-G8 ใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันคือ  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ , urea และ  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  พบว่า  $\text{NaNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สำหรับเสริมสร้างการสะสมไขมัน palmitic, linoleic และ alpha linolenic acids และพบว่าสาหร่าย MIC-G6 มีกรดไขมัน  $\alpha$ -linolenic acid สูงที่สุด คือร้อยละ 43.7 ของกรดไขมันทั้งหมด การวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี ที่มีคอลัมน์ DB-225 capillary column (30 m, 0.25 mm, i.d. 0.5 mm) อุณหภูมิขณะฉีดเป็น 230 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิดีเทคเตอร์เป็น 270 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มที่ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพิ่มขึ้นเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อ นาทีเป็นเวลา 20 นาที ใช้แก๊สตัวพาเป็นไนโตรเจน อัตราการฉีด 50:1 พบว่าสาหร่ายมีการสะสมกรดไขมันชนิดที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอมเป็นองค์ประกอบ

Kang และคณะ, (2016) ศึกษาผลของ LEDs ในการสะสมไขมันโดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบสองเฟส (two phase culture) กับสาหร่ายสามชนิด คือ *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis oceanic* และ *Nannochloropsis oculata* การวิเคราะห์กรดไขมันของสาหร่ายแสดงที่ร้อยละ 85-87 ของน้ำหนักแห้ง กรดไขมันทั้งหมดจาก *N. salina*, *N. oceanica* และ *N. oculata* ประกอบด้วยกรดไขมันชนิด palmitic acid (C16:0) และ oleic acid (C18:1) องค์ประกอบของกรดไขมันแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดไขมันของ *N. salina*, *N. oceanic*, *N. oculata*

กรดไขมัน	<i>Nannochloropsis salina</i> (%w/w)	<i>Nannochloropsis oceanic</i> (%w/w)	<i>Nannochloropsis oculata</i> (%w/w)
C14:0	0.50	0.82	0.41
C16:0	48.81	49.66	47.09
C18:0	3.11	4.38	5.26
C18:1	38.41	36.83	38.56
C18:2	3.52	4.25	5.50
C18:3	4.95	3.50	2.72
C20:0	0.27	0.28	0.19
C22:0	0.37	0.28	0.27

(ที่มา: Kang และคณะ, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่าย

### 2.3.1 ผลของความเข้มแสง

แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายเนื่องจากว่าในการสังเคราะห์อาหารของสาหร่ายนั้น จำเป็นต้องใช้แสงในกระบวนการการสังเคราะห์แสง เพื่อจะสร้างอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต การเปลี่ยนสารอนินทรีย์จากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายให้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์แล้วนำไปใช้ภายในเซลล์ เพื่อการเจริญเติบโตหรือการสังเคราะห์แสงนั้น พลังงานจากแสงจะไปกระตุ้นในการเปลี่ยนสารอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ ดังนั้นหากสาหร่ายได้รับแสงเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราในการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย จนถึงจุดสูงสุดของความเข้มแสงปริมาณหนึ่ง ทำให้ได้อัตราในการเจริญเติบโตของสาหร่ายสูงสุด แล้วหากเพิ่มปริมาณแสงขึ้นจะทำให้แสงไปมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลง เรียกบริเวณนี้ว่า photoinhibited region (อภิเชษฐ์, 2555)

Damiani และคณะ, (2010) ศึกษาการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยทำการศึกษาในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดต่างเป็นกลาง ให้อากาศ และให้แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยสภาวะการให้แสงเป็นชั่วโมงสว่างต่อมืดคือ 12:12 ได้ปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 34.85 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Cheirsilp และ Torpee, (2012) สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีความต้องการความเข้มแสงไม่เท่ากัน จากรายงานวิจัยจะศึกษาผลกระทบของความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายทะเล *Chlorella* sp. และ *Nannochloropsis* sp. โดยจะพบว่า *Chlorella* sp. มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นร้อยละ 44 การผลิตไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 15 จากความเข้มแสงที่เพิ่มจาก 2,000 ถึง 8,000 ลักซ์ ส่วน *Nannochloropsis* sp. จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นร้อยละ 128 และมีการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 68 จากความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้น 2,000 ถึง 10,000 ลักซ์ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อความเข้มแสงสูงสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ดี แต่ผลิตไขมันได้น้อย ถ้าความเข้มแสงต่ำสาหร่ายจะเจริญเติบโตได้น้อย แต่ผลิตไขมันได้มาก

Prokash Rai และคณะ, (2016) วิจัยศึกษาผลกระทบความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย และการผลิตไขมันของเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus abundans* โดยให้ความเข้มแสงแตกต่างกัน 27, 40.5, 54 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ที่ความเข้มแสง 40.5 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จะมีชีวมวลสูงสุด 1.342 กรัม/ลิตร ผลิตไขมันได้ 0.644 กรัม/ลิตร และมีไขมันสะสมภายในเซลล์ร้อยละ 48 เมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 54 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ความหนาแน่นของเซลล์จะเพิ่มขึ้น แต่จะผลิตไขมันได้ลดลง ซึ่งผลิตไขมันได้ 0.358 กรัม/ลิตร มีไขมันสะสมภายในเซลล์ร้อยละ 29.6 ที่ความเข้มแสง 27 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที จะมีอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันต่ำกว่าความเข้มแสงอื่น มีไขมันสะสมภายในเซลล์ร้อยละ 33

### 2.3.2 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิของสภาวะแวดล้อม ในการเจริญเติบโตของสาหร่ายแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของสาหร่าย สาหร่ายบางชนิดสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีภูมิอากาศร้อน เช่น น้ำพุร้อน สาหร่ายบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในภูมิอากาศหนาวเย็น ทำให้อุณหภูมิของสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วย อีกทั้งอุณหภูมิของสภาวะแวดล้อมยังมีผลต่อ เอนไซม์ของสาหร่ายที่ใช้ในการสังเคราะห์อาหารภายในเซลล์อีกด้วย ถ้าหากอุณหภูมิของสภาวะแวดล้อมมีค่าเพิ่มขึ้นก็จะทำให้อัตราในการสังเคราะห์แสงเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วยแต่หากว่าอุณหภูมิของสภาวะแวดล้อมเพิ่มสูงขึ้นมากเกินไปก็จะไปทำให้คุณสมบัติของเอนไซม์บางชนิดของสาหร่ายเสียสภาพไปทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงจึงไปมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยเช่นกัน (อภิเชษฐ์, 2555)

Cao และคณะ, (2014) ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อ *Chlorella minutissima* UTEX 2341 จะพบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะมีผลได้ไขมันสูงสุด 1.32 กรัม/ลิตร แต่จะผลิตไขมันได้ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส สันนิษฐานว่าที่อุณหภูมิต่ำหรือสูง จะทำให้ lipid metabolic pathway เปลี่ยนไป รวมทั้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่ *Chlorella minutissima* UTEX 2341 มีไขมันสะสมในเซลล์สูงสุด แต่จะมีการสะสมไขมันลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส

Converti และคณะ, (2009) จะพบว่า *C. vulgaris* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและผลิตไขมันจะอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับการแยก *Dunaliella* sp. จาก Great Salt Lake

พิมพ์ปวีณ์ และคณะ, (2557) ศึกษาเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อการผลิตมวลชีวภาพของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เลี้ยงในวันที่ 0-9 ของการทดลอง ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $1.54 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร/วัน หรือ 1.73 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน และหลังจากวันที่ 9 ของการทดลอง พบว่าผลผลิตมวลชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น โดยหากเลี้ยงที่ 27 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงที่สุดถึง 11.53 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน รองลงมาคือเลี้ยงที่ 25 และ 10 องศาเซลเซียส ที่มีผลผลิตมวลชีวภาพเท่ากับ 5.78 และ 1.80 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหากย้ายสาหร่ายจาก 25 องศาเซลเซียส ไปเลี้ยงที่ 27 องศาเซลเซียส จะสามารถส่งเสริมการเติบโตของสาหร่ายได้ดี ในขณะที่การย้ายเซลล์เลี้ยงที่ 10 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่ายจะมีการเติบโตต่ำลง

### 2.3.3 ผลของพีเอช

ความเป็นกรด-เบส หรือค่า pH เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก เนื่องจากมีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอน (inorganic carbon) ในรูปต่างๆ (ZHU และคณะ, 2013) เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5 รูปของ DIC (dissolved inorganic carbon ; DIC) ส่วนใหญ่คือ CO<sub>2</sub> เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.6 จะมี DIC ในรูปของ CO<sub>2</sub> และ

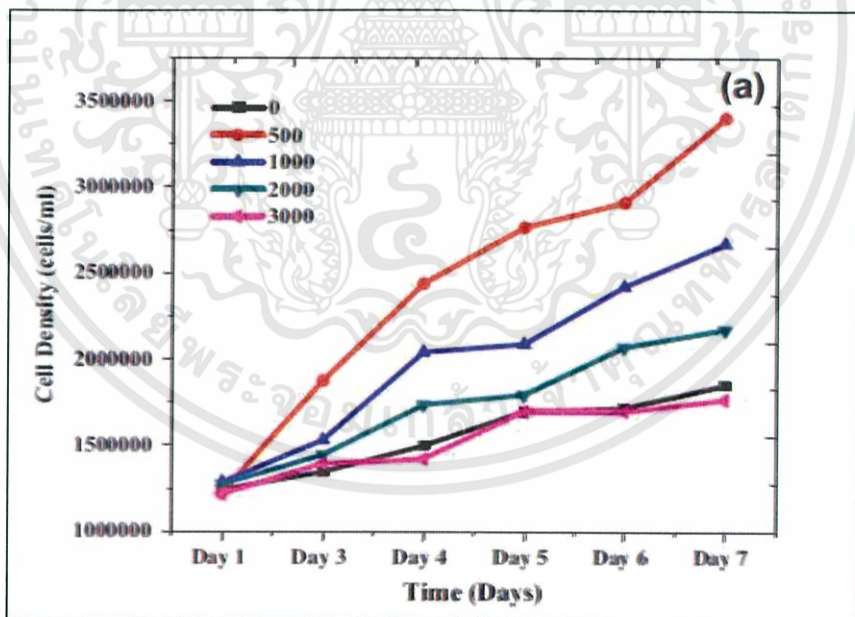
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$\text{HCO}_3^-$  ในปริมาณเท่าๆ กัน และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงถึง 8.3 รูปของ DIC เกือบทั้งหมดจะเป็น  $\text{HCO}_3^-$  ดังนั้นการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง จึงมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เพื่อให้สาหร่ายขนาดเล็กสามารถดูดซึมและนำ  $\text{CO}_2$  มาใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้น (นุชนาถ, 2557)

Yeh และคณะ, (2012) รายงานวิจัยศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ESP-31 โดยทำการทดลองให้ pH ต่างกัน ดังนี้ 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 จะพบว่าที่ pH 7.5 จะผลิตชีวมวลได้สูงสุด  $2.39 \pm 0.10$  กรัม/ลิตร และที่ pH 7 จะผลิตไขมันได้มากที่สุด คือ  $986 \pm 15$  มิลลิกรัม/ลิตร

#### 2.3.4 ผลของคาร์บอน

Chandra และคณะ, (2014) ศึกษาผลกระทบของกลูโคสที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยจะมีความเข้มข้นของกลูโคส 5 ระดับคือ 0, 500, 1000, 2000, 3000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสามารถผลิตชีวมวลได้ 2.06, 3.44, 3.32, 2.71, 2.47 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีความหนาแน่นเซลล์  $18.5 \times 10^5$ ,  $34.5 \times 10^5$ ,  $25.5 \times 10^5$ ,  $20 \times 10^5$ ,  $15.5 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสมากขึ้นมันจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic ซึ่งจะกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยแสง และคาร์บอนไดออกไซด์ ผลการทดลองนี้จะแสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงการเพิ่มขึ้นของชีวมวลในแต่ละวันของความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

(ที่มา: Chandra และคณะ, 2014)

Yamane และคณะ, (2011) สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., Diatoms จะพบว่า ATP ที่ได้เกิดจากปฏิกิริยา photochemical เพราะเร่งการเผาผลาญน้ำตาล กลูโคสในการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นอินทรีย์คาร์บอนหรืออนินทรีย์คาร์บอนก็ได้ ซึ่งสามารถทำให้ผลิตชีวมวลสูงในระยะเวลาเจริญเติบโตใน growth phase

Cao และคณะ, (2014) ศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก จะพบว่า glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ตามด้วย glycerin, mannitol และ glycine ผลการเพิ่ม glucose จะทำให้ชีวมวลสูงสุดเป็น 8.98 กรัม/ลิตร ผลได้ไขมัน 0.89 กรัม/ลิตร และไขมันที่สะสมในเซลล์ร้อยละ 10.10 ส่วนการเพิ่ม glycerin ชีวมวลและไขมันที่สะสมในเซลล์เท่ากับ 7.4 กรัม/ลิตร และร้อยละ 10.06 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองจะสามารถแสดงได้ตามรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การเพิ่มขึ้นของชีวมวล, ผลได้ไขมัน และไขมันที่สะสมในเซลล์ ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน (ที่มา: Cao และคณะ, 2014)

ชรินทร์ และคณะ, (2557) ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. แบบเฮเทอโรโทรฟด้วยน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ที่ผลิตจากปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน เพื่อทดแทนอาหารสังเคราะห์สูตร N8 และทำการเปรียบเทียบปริมาณไขมันในสาหร่ายระหว่างการเลี้ยงด้วยน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน อาหารสังเคราะห์สูตร N8 อาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกลูโคส และอาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 วัน จากการทดลองพบว่า การเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกลูโคส ให้ผลผลิตดีที่สุด กล่าวคือ ให้ค่าความเข้มข้นเซลล์สูงสุด ปริมาณของไขมัน และอัตราการผลิตไขมันเชิงปริมาตร เท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร 0.35 กรัมต่อลิตร และ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ รองลงมาคือการเลี้ยง

สาหร่ายด้วยน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ให้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด ปริมาณของไขมัน และอัตราการผลิตไขมันเชิงปริมาตร เท่ากับ 2.80 กรัมต่อลิตร 0.23 กรัมต่อลิตร และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์สูตร N8 ผสมกลูโคส จึงสามารถใช้ทดแทนอาหารสังเคราะห์ได้ แต่การจะให้ประสิทธิภาพ ผลดีที่สุดจะต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนลงไปให้อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วย

ชมพูนุท, (2543) การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารคาร์บอนอินทรีย์ ที่มีผลต่อการเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* สายพันธุ์ AM9901 (สายพันธุ์แยกจากอ่าวไทย) ผลของการเปรียบเทียบแหล่งของคาร์บอนต่อการเติบโตพบว่า *A. delicatissima* เติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร F/2 ที่มีการเติมกลูโคส 1 กรัมคาร์บอน/ลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient broth) และสาหร่ายจะมีอัตราการเติบโตสูงขึ้นอีก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 4 กรัมคาร์บอน/ลิตร ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นอีกเป็น 8, 12 และ 16 กรัมคาร์บอน/ลิตร กลับทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลง

### 2.3.5 ผลของไนโตรเจน

ปริมาณไนโตรเจนจะมีผลต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย โดยปกติไนโตรเจน มีหน้าที่หลักในการสังเคราะห์แสง เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารหลายชนิดภายในเซลล์ เช่น โปรตีน คลอโรฟิลล์ กรดนิวคลีอิก สังเคราะห์รงควัตถุ ช่วยในกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (สุนิรัตน์, 2549) ในสภาวะที่มีการขาดไนโตรเจนหรือมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน จะส่งผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุของเซลล์ ในส่วนของอาหารสะสมจะเกิดการสะสมของสารประกอบคาร์บอนในปริมาณเพิ่มขึ้น เช่น พวกลิพิดหรือโพลีแซคคาไรด์ เป็นผลให้เกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Hammond และ Glatz, 1988)

Xin และคณะ, (2010) ใช้สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อปริมาณไขมัน โดยมีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) แตกต่างกันว่า 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 25.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยมีระดับความเข้มข้นไนโตรเจนเริ่มต้นที่ 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารสูตร BG-11 ระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมิดในอัตรา 14:10 ชั่วโมง ความเข้มแสง 55-60 ไมโครโมลโปรตอน/ตารางเมตร/วินาที พบว่าที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ปริมาณไขมันสูงสุดถึงร้อยละ 30

Converti และคณะ, (2009) ได้ทดลองลดความเข้มข้น  $\text{NaNO}_3$  ในการเลี้ยง *C. vulgaris* ในสภาวะ  $\text{NaNO}_3$  ที่ 1.500, 0.750 และ 0.375 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในสูตรอาหาร Bold's Basal Medium โดยนำไปเลี้ยงใน Erlenmeyer flask 2 ลิตร นาน 14 วัน ให้ความเข้มแสง 70.0 ไมโครอิเล็กตรอน/ตารางเมตร/วินาที จากผลจะพบว่าระดับ  $\text{NaNO}_3$  ที่ 0.375 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ *C. vulgaris* มีปริมาณไขมันสูงที่สุดคือ  $15.31 \pm 0.51$  เปอร์เซ็นต์ เพราะเมื่อ  $\text{NaNO}_3$  ลดลงทำให้สาหร่ายเกิดความเครียด จึงทำให้มีปริมาณไขมันสูงและไขมันที่มาจากขบวนการ metabolism โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนอาหารสะสมจากแป้งเป็นไขมันแทน เมื่อเทียบกับการทดลองลดความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaNO<sub>3</sub> ในการเลี้ยง *Nannochloropsis oculata* ในสภาวะ NaNO<sub>3</sub> ที่ 0.300, 0.150 และ 0.075 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในสูตรอาหาร Guillard นำไปเลี้ยงใน Erlenmeyer flask 2 ลิตร นาน 14 วัน ให้ความเข้มข้นแสง 70.0 ไมโครอิเล็กตรอน/ตารางเมตร/วินาที ผลพบว่าระดับ NaNO<sub>3</sub> ที่ 0.075 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ *N. oculata* มีปริมาณไขมันสูงสุดคือ  $15.86 \pm 0.59$  เปอร์เซ็นต์ เพราะเมื่อ NaNO<sub>3</sub> ลดลงทำให้สาหร่ายเกิดความเครียดจะทำให้มีปริมาณไขมันสูงและไขมันที่มาจากขบวนการ metabolism โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนอาหารสะสมจากแป้งเป็นไขมันแทน แต่สาเหตุที่ในการทดลองลดปริมาณไนโตรเจนที่ 100 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไขมันดีที่สุด คาดว่า *Hapalosiphon* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งมี heterocyst ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศเองได้ ดังนั้นเมื่อมีการลดปริมาณไนโตรเจนลงจึงไม่มีผลต่อปริมาณไขมันใน *Hapalosiphon* sp.

Cao และคณะ, (2014) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยง *C. minutissima* UTEX 2341 ภายใต้สภาวะขาดไนโตรเจน 6 วันแรกจะเพาะเลี้ยงแบบปกติ ส่วน 3 วันหลังจะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน พบว่าเมื่อขาดไนโตรเจนจะมีไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 29.19 ของน้ำหนักแห้งของสาหร่าย ผลได้ไขมัน 2.45 กรัม/ลิตร และผลได้สัมประสิทธิ์คาร์บอนเป็น 0.09 กรัม/กรัม

James และคณะ, (2011) เมื่อเวลาการเจริญเติบโตสิ้นจะไปลดการสะสมไขมัน และเป็นสาเหตุทำให้เซลล์หยุดชะงักได้ และผลิตน้ำมันต่ำเช่นกัน และการเพาะเลี้ยง *Chlamydomonas reinhardtii* พบการสังเคราะห์น้ำมันสูงสุดระหว่างวันที่ 2 และ 3 เมื่อมีการขาดไนโตรเจน

Chen และคณะ, (2011) พบว่าอัตราการเจริญสูงสุดของ *Dunaliella tertiolecta* พบที่ความเข้มข้น 23 มิลลิโมล/ลิตรของโซเดียมไนเตรท (NaNO<sub>3</sub>) และอัตราการเจริญไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทเป็น 46 มิลลิโมล/ลิตร

Wu และ Miao, (2014) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* และ *Scenedesmus obliquus* ศึกษาการเจริญเติบโตในความเข้มข้นของไนเตรทที่ต่างกันคือ 0, 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.5 กรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้นไนเตรท 0 กรัม/ลิตร มีชีวมวลของ *Chlorella pyrenoidosa* และ *Scenedesmus obliquus* เท่ากับ 0.42 กรัม/ลิตร และ 0.55 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การจำกัดไนโตรเจนมีผลให้การเจริญเติบโตลดลง เพราะในอาหารที่มีไนโตรเจนไม่เพียงพอ ทำให้ขาดโมเลกุลของไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จากการทดลองพบว่าชีวมวลสูงสุดของ *Chlorella pyrenoidosa* เท่ากับ 2.03 กรัม/ลิตร และ *Scenedesmus obliquus* เท่ากับ 2.70 กรัม/ลิตร ของความเข้มข้นไนเตรท 0.9 กรัม/ลิตร และ 0.6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่มีความเข้มข้นไนเตรท 0 กรัม/ลิตร *Chlorella pyrenoidosa* มีอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุด ( $P_{max}$ ) เท่ากับ 0.471 กรัม/ลิตร/วัน และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) เท่ากับ 0.747 ต่อวัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 0.6 กรัม/ลิตร *Scenedesmus obliquus* มีอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุด ( $P_{max}$ ) เท่ากับ 0.379 กรัม/ลิตร/วัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 0.3 กรัม/ลิตร และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) เท่ากับ 0.542 ต่อวัน ภายใต้ความเข้มข้นไนเตรท 0.9 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ผู้วิจัย	สภาวะการเพาะเลี้ยง										ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ			
1. รัตนาภรณ์ สិងห์ และ งามนิจ นนทได้, 2010	- สภาวะเขย่าที่ 130 รอบ/นาที ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก (Heterotrophic Cultivation)	KKU-S2	BG-11 medium	- glucose	- NaNO <sub>3</sub> - Yeast extract - Urea	-	อากาศ	30°C			การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิกของสาหร่าย KKU-S2 ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร ซิวมวล, ไขมัน และการใช้กลูโคสค่อยๆ เพิ่มขึ้น และผลได้ไขมันสูงสุดที่ร้อยละ 30.5 ซิวมวลและไขมันลดลงหลังจากวันที่ 8 เนื่องจากกลูโคสถูกใช้หมดไป แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ NaNO <sub>3</sub> ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร มีไขมันสูงสุด ผลของกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 กรัม/ลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร มีปริมาณ ซิวมวลและไขมันสูงสุดที่เป็น 6.3 กรัม/ลิตรและ 47.8 %CDW ตามลำดับ วิเคราะห์ด้วย GC มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวและอิ่มตัวเป็นร้อยละ 36.1 และ 63.9 จากไขมันทั้งหมด ตามลำดับ

สภาวะการเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
2. Wang Yan และคณะ, 2012	Heterotrophic cultivation สภาวะเขย่า การเลี้ยงแบบ Fed-batch culture	<i>Chlorella kessleri</i>	1. no C-N-feeding culture 2. intermittent C-N-feeding culture 3. successive C-N-feeding culture	Glucose (100 mmol l <sup>-1</sup> )	KNO <sub>3</sub> (10 mmol l <sup>-1</sup> )	ไม่มีแสง	-	27±1°C	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella kessleri</i> ภายใต้สภาวะ Heterotrophic ในลักษณะการเติมอาหารแบบ Fed-batch culture พบว่าการเติมอาหารแบบ intermittent C-N-feeding มีประสิทธิภาพการผลิตไขมันทั้งหมดเพิ่มขึ้นมากกว่าแบบ successive หรือ no C-N-feeding มีชีวมวล 17.60 กรัม/ลิตร ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง และมี Total fatty acids เท่ากับ 8.39±0.45 กรัม/ลิตร

สภาวะการเพาะเลี้ยง									
ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิดอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
3. Leesing และคณะ, 2013	- สภาวะเขย่า 150 rpm - Photoautotrophic - Heterotrophic	<i>Chlorella</i> sp. MSU1 <i>Chlorella</i> sp. MSU2 <i>Chlorella</i> sp. MSU3	Bristol's medium	- glucose (20, 30, 40, 50 g/L)	- NaNO <sub>3</sub> (250 mg/L)	80W cool-white fluorescent lamps	-	28-30°C	ภายใต้สภาวะ photoautotrophic มีชีวมวล 1.67 กรัม/ลิตร มีไขมัน 23.94 มก./ลิตร ชีวมวล 1.2 กรัม/ลิตร มีไขมัน 37.0 มก./ลิตร ชีวมวล 1.13 กรัม/ลิตร มีไขมัน 36.4 มก./ลิตร ภายใต้สภาวะ heterotrophic มีชีวมวล 2.33 กรัม/ลิตร มีไขมัน 94.9 มก./ลิตร ชีวมวล 2.73 กรัม/ลิตร มีไขมัน 398.9 มก./ลิตร ชีวมวล 5.28 กรัม/ลิตร มีไขมัน 67.0 มก./ลิตร จากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. MSU1, <i>Chlorella</i> sp. MSU2 และ <i>Chlorella</i> sp. MSU3 ตามลำดับ การผลิตไขมันภายใต้สภาวะ heterotrophic ของ <i>Chlorella</i> sp. MSU2 สูงสุดเท่ากับ 797.7 มก./ลิตร อัตราการผลิตไขมันสูงสุด (QP) เท่ากับ 132.9 มก./ลิตร/วัน ที่กลูโคส 40 กรัม/ลิตร ผลได้สูงสุด 0.733 ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร

สภาวะการเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
4. Wang และคณะ, 2013	- indoor experiments (glass columns) - outdoor experiments (glass panel photobioreactors)	BG-11 medium	2% CO <sub>2</sub> (outdoor)	- NaNO <sub>3</sub> ความเข้มข้น 0, ¼, ½, 1 จากความเข้มข้นทั้งหมดใน BG-11	แสงอาทิตย์	-	25±2°C (indoor) 38°C (outdoor)	สภาวะ indoor ในอาหารที่มีไนเตรตต่างกันคือที่ 0, ¼, ½, 1 จากทั้งหมดใน BG-11 ความเข้มข้น 510 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เซลล์เริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร ผลคือเมื่อมีไนเตรตมากขึ้น มีผลทำให้ปริมาณไขมันในเซลล์ลดลง ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ความเข้มข้น 1200 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที ให้ปริมาณไขมันทั้งหมดมากที่สุดร้อยละ 45 ในอาหารที่มีไนเตรตต่ำ (100 มิลลิกรัม/ลิตร) และสภาวะ outdoor ในอาหารที่มีไนเตรต 128 มก./ลิตร (1/2N in BG-11 medium) มีมวลเซลล์สูงกว่าที่ 64 มก./ลิตร (1/4N in BG-11 medium) เป็น 6.5 กรัม/ลิตรและ 5.9 กรัม/ลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณไขมันทั้งหมดที่ 64 มก./ลิตร มากกว่า 128 มก./ลิตร และเลี้ยงในอาหารที่มีไนเตรต 64 มก./ลิตร ที่

สภาวะการเพาะเลี้ยง									
ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง	
5. Wu และ Miao, 2014	1 L Erlenmeyer flask (อาหาร 650 มิลลิลิตร)	BG-11 medium	-	Nitrate ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.5 g/L	6,000 Lux	อากาศ	25±2°C	มีเซลล์เริ่มต้นต่างกัน 0.28, 0.66, 1.29 และ 2.28 กรัม/ลิตร ไขมันทั้งหมดสูงสุดเป็นร้อยละ 36.6 ที่ความเข้มข้นเซลล์ 0.28 กรัม/ลิตร ผลได้ไขมันสูงสุด 0.17 กรัม/ลิตร/วัน ในวันที่ 4-6	
		<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i>						คุณภาพของไบโอดีเซลและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>C. pyrenoidosa</i> และ <i>S. obliquus</i> ในการตอบสนองต่อระดับไนเตรตที่ต่างกัน ซึ่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในโมเลกุลของโปรตีน คลอโรฟิลล์ RNA DNA เป็นต้น และเป็นหนึ่งในสารอาหารที่สำคัญของสาหร่ายขนาดเล็ก ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนจะมีผลทำให้การสังเคราะห์แสงและการสังเคราะห์โปรตีนลดลง แต่มีการเพิ่มขึ้นของไขมันและคาร์โบไฮเดรต อัตราการ	

สภาวะการเพาะเลี้ยง									
ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การใช้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง	
ผู้วิจัย									สังเคราะห์ไขมันสูงซึ่งในอาหารที่มีไนโตรเจนขาดแคลน (0 กรัม/ลิตร) ซึ่งเพิ่ม ขึ้นในอัตราร้อยละ 48 สำหรับ <i>S. obliquus</i> และร้อยละ 90 สำหรับ <i>C. pyrenoidos</i> ตามลำดับ การจำกัดไนโตรเจนมีประสิทธิภาพสำหรับกระตุ้นการสะสมไขมัน การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบกรดไขมันและการปรับปรุงคุณสมบัติไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กจากอิทธิพลของไนโตรเจนที่ขาดแคลนสำหรับสายขนาดเล็ก <i>C. pyrenoidos</i> ที่เพาะเลี้ยงกับไนเตรทมี linoleic และ linolenic สูง (>54%) เป็นผลให้ DU สูง (>118%) และ IV สูง (>133 g I2 100 g <sup>-1</sup> ) และมีค่า CN ต่ำ (<44) ซึ่งมีแนวโน้มที่จะผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณสมบัติการเผาไหม้และเสถียรภาพออกซิเดชันที่เมิต ซึ่งไบโอดีเซลจาก

สภาวะการเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสายพันธุ์	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การใช้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
6. Cao และคณะ, 2014	เพาะเลี้ยงแบบ low-nutrition heterotrophic	<i>Chlorella minutissima</i> UTEX 2341	OM medium	- glycerin - glucose - glycine - manitol - Sodium acetate - sodium bicarbonate	ขาดไนโตรเจน	Cool white Fluorescent tube	-	20,25,30,35,40°C	<i>S. obliquus</i> ที่ระดับไนเตรตต่างๆ มีค่าเท่ากับไปโอดีเซลมาตรฐาน ที่ระดับไนเตรต 0.3 กรัม/ลิตร เป็นระดับที่ดีที่สุด สำหรับเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล เมื่อขาดไนโตรเจนมีไขมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 29.19 ของน้ำหนักแห้ง ผลิตได้ไขมัน 2.45 กรัม/ลิตร และสัมประสิทธิ์คาร์บอน 0.09 กรัม/กรัม ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีอิทธิพลต่อการเจริญโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า glucose ผลิตชีวมวลได้ดีที่สุด มีชีวมวลสูงสุด 8.98 กรัม/ลิตร ผลิตได้ไขมัน 0.89 กรัม/ลิตร และไขมันสะสมในเซลล์ร้อยละ 10.10 รองลงมาคือ glycerin มีชีวมวล 7.4 กรัม/ลิตร และไขมันสะสมร้อยละ 10.06 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตไขมันพบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีการผลิต

สภาวะการเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
7. Chandra และคณะ, 2014	เพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic	microalgae	Designed synthetic waste (DSW)	glucose (0,500,1000, 2000,3000 mg/L)	-	Fluorescent White lamp with 3500 Lux	-	28°C	ชีวมวลแห้งได้มากที่สุด ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะมีไขมันสะสมในเซลล์ต่ำและผลิตชีวมวลได้ไม่ดี ซึ่งการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กลงจะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม
									ช่วง growth phase เพราะเลี้ยงในความเข้มข้นกลูโคสต่างกัน ผลิตชีวมวลได้สูงสุด 3.44 กรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้น 500 มก./ลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น จะไปยับยั้งการเจริญของสาหร่ายได้ และมีความหนาแน่นเซลล์ $34.5 \times 10^5$ เซลล์/มล. ในช่วง stress phase เพราะเลี้ยงที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ และขาดแคลนไนโตรเจน ผลิตชีวมวลได้สูงสุด 3.937 กรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้นกลูโคส 500 มก./ลิตร และมากกว่าที่ไม่ขาดไนโตรเจน

สภาวะการเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิดอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
8. Lin และ Wu, 2015	Mixotrophic condition ใน 1 L serum bottle ที่มีอาหาร 0.8 ลิตร	<i>Chlorella</i> sp. Y8-1	Modified Walne medium	Organic carbon source และ 10%CO <sub>2</sub> ที่ 2 w/m	Urea	4,300 Lux	-	30°C	การผลิตไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. Y8-1 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ ได้แก่ autotrophic (CO <sub>2</sub> , with light), heterotrophic (sucrose, with light) และ mixotrophic (organic carbon source and CO <sub>2</sub> , with light) พบว่า mixotrophic สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. Y8-1 มีไขมันร้อยละ 35.5±4.2 และมีอัตราการผลิตไขมัน 0.01 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งสูงกว่าที่เลี้ยงในสภาวะ autotrophic และ heterotrophic การวิเคราะห์ไขมันส่วนใหญ่เป็น palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1) linoleic acid (C18:2) และ linolenic acid (C18:3) เป็นองค์ประกอบหลักของไขมัน <i>Chlorella</i> sp. Y8-1 ซึ่งเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

สภาวะการเพาะเลี้ยง									
ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสัณฐาน	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
9. Pancha และคณะ, 2015	Mixotrophic cultivation สภาวะเขย่า	<i>Scenedesmus</i> sp. CCNM 1077	BG-11 medium	- glucose - fructose - galactose - maltose - lactose - sucrose - glycerol	nitrate	- 0, 30, 60 และ 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-	25±2°C	จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดให้ชีวมวลสูงสุด 757.24 มก./ลิตร อัตราการผลิตชีวมวล 79.64 มก./ลิตร/วัน และอัตราการเจริญ 0.23 ต่อวัน ในสภาวะ mixotrophic มีการขนส่งกลูโคสเพิ่ม ขึ้นในเซลล์ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของคาร์โบไฮเดรตและการสะสมโปรตีนในเซลล์ต่ำ ดังนั้น กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง mixotrophic ของ <i>Scenedesmus</i> sp. CCNM 1077 ที่มีชีวมวลคาร์โบไฮเดรตและไขมันสูง ที่ความเข้มข้น 4 กรัม/ลิตร มีชีวมวลสูงสุด 958.60 มก./ลิตร อัตราการผลิตชีวมวล 104.93 มก./ลิตร/วัน และอัตราการเจริญ 0.26 ต่อวัน

สภาวะการเพาะเลี้ยง									
ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสัณหา	ชนิดอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง	
ผู้วิจัย								และความเข้มแสง 150 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เหมาะสมที่สุด มีชีวมวลสูงสุด 1.23 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตชีวมวล 139.18 มก./ลิตร/วัน และอัตราการเจริญ 0.29 ต่อวัน ในสภาวะขาดไนโตรเจนทำให้ชีวมวลต่ำลง แต่การเติมกลูโคสมีความสำคัญในการกระตุ้นการผลิตชีวมวลในสภาวะขาดไนโตรเจน ดังนั้นการเลี้ยงแบบ mixotrophic ในสภาวะขาดสารอาหารเป็นการเพาะเลี้ยงที่ดีในการกระตุ้นการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพของสาหร่ายโดยไม่มีการสูญเสียชีวมวลมากนัก อีกทั้งมีการเพิ่มขึ้นของไบโमे้นและคาร์โบไฮเดรตในเซลล์สาหร่าย	

สภาวะการเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัย	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง
10. Kim และคณะ, 2015	- สภาวะเขย่าที่ 150 รอบ/นาที ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic)	<i>Scenedesmus</i> sp.	BG-11 medium	-	-	-140 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	อากาศ	27°C	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus</i> sp. ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งสาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ในน้ำเสียจะต้องขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในการทดลองนี้ได้ใช้อัตราส่วน N/P ที่ 4.6 ในการแยกสาหร่ายจากน้ำเสียพบว่าสาหร่ายนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ในอัตราส่วนที่ N/P ต่ำและมีค่าความเข้มข้นของเกลือสูง สามารถผลิตมวลชีวภาพได้ 0.37 กรัม/ลิตร/วัน มวลชีวภาพของสาหร่ายที่จะนำไปผลิตไบโอดีเซลมีอยู่แค่ร้อยละ 8.74 (w/w) ซึ่งอยู่ในระดับที่น้อยเป็นผลจากความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่สูง การศึกษานี้ได้ผลิตผลิตมวลชีวภาพแค่ 0.03 กรัม/ลิตร/วัน และมีกรดไขมัน C16-C18 ในสาหร่ายถึงร้อยละ 76.68

สภาวะการเพาะเลี้ยง									
ลักษณะการเพาะเลี้ยง	ชนิดสาหร่าย	ชนิด/สารอาหาร	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	การให้แสง	การให้อากาศ	อุณหภูมิ	ผลการทดลอง	
- สภาวะเขย่าที่ 130 rpm ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic)	<i>Scenedesmus bijuga</i>	BG-11 medium	-	-	$80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-	30°C	ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Scenedesmus bijuga</i> ในน้ำที่ดึงจากเศษอาหารที่ย่อยแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยนำมาทำการเจือจางผสมกับน้ำที่ดึงจากระบบบำบัดน้ำเสีย. โดยใช้อัตราส่วนที่ 1/10, 1/20 และ 1/30 เพื่อหาอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมในการสร้างชีวมวลเพื่อผลิตไบโอดีเซล พบว่าการเจือจางที่ 1/20 ให้การผลิตมวลชีวภาพสูงสุด 1.49 กรัม/ลิตร เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดที่จะนำไปผลิต FAMES แต่ปริมาณไขมันที่ผลิตได้สูงสุดอยู่ที่การเจือจางที่ 1/10 ได้เท่ากับร้อยละ 35.06 และไขมันที่ผลิตได้สูงสุดอยู่ที่การเจือ 1/20 ได้เท่ากับ 15.59 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน	

## 2.4 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Growth measurement)

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน ดังต่อไปนี้ คือ

1. การนับเซลล์ (cell counting) เป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับกันมาก โดยใช้สไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ซึ่งเป็นการวัดการเจริญได้โดยตรง โดยการนับจำนวนเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถนับได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ข้อเสียคือ ถ้าเซลล์มีจำนวนมากต้องทำการเจือจางก่อน และใช้เวลานานในการนับจำนวนเซลล์

สไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) เป็นตารางหรือกริด จะมีหลายขนาดด้วยกัน เช่น ขนาด  $1 \times 1$  มิลลิเมตร (1 ตารางมิลลิเมตร) ขนาดละเอียดลงไป  $0.25 \times 0.25$  มิลลิเมตร (0.0625 ตารางมิลลิเมตร),  $0.25 \times 0.20$  มิลลิเมตร (0.05 ตารางมิลลิเมตร) และ  $0.20 \times 0.20$  มิลลิเมตร (0.04 ตารางมิลลิเมตร) ส่วนความลึกจะกำหนดไว้ที่ 0.1 มิลลิเมตร เพราะฉะนั้นจะทำให้เราทราบค่าปริมาตรได้ โดยใช้สูตร กว้าง  $\times$  ยาว  $\times$  สูง ตัวอย่างเช่น ตารางขนาด  $1 \times 1$  มิลลิเมตร ความลึก 0.1 มิลลิเมตร จะมีปริมาตรเท่ากับ  $1 \text{ มิลลิเมตร} \times 1 \text{ มิลลิเมตร} \times 0.1 \text{ มิลลิเมตร} = 0.1$  ตารางมิลลิเมตร หรือ  $1/10$  ตารางมิลลิเมตร หรือ  $0.0001$  ตารางเซนติเมตร หรือ  $1/10^4$  มิลลิลิตร (<http://glasswarechemical.com/materials/>)



รูปที่ 2.6 แสดง haemocytometer counting chamber

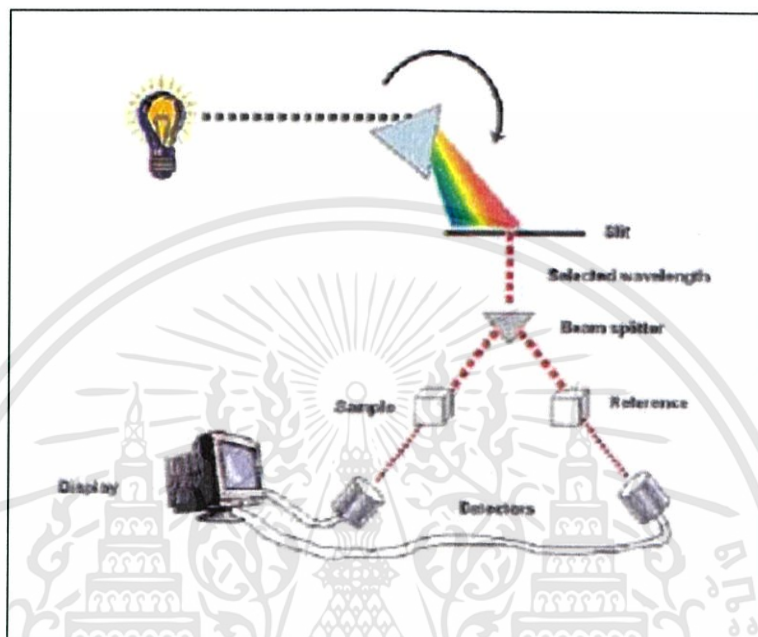
(ที่มา: <http://www.graymed.com.au/haemocytometer-haemocytometers>)

2. การวัดความหนาแน่น (optical density measurement) การวัดความหนาแน่นของสาหร่ายจากค่าการดูดกลืนแสง เป็นวิธีการวัดที่นิยมในสาหร่ายที่มีความบริสุทธิ์ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และใช้ความยาวคลื่นประมาณ 560 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มแสงจะลดลงเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ข้อดีก็คือ สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ข้อเสียก็คือ เป็นการวัดจำนวนเซลล์ทั้งหมดซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าเซลล์นั้นมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต

ในการวัดความหนาแน่นของสาหร่ายสามารถใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ (double beam spectrophotometer) ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงออกจากช่องแสงออก (exit slit) แล้ว ลำแสงจะไปสู่อุปกรณ์ตัดลำแสง (beam chopper) ซึ่งจะทำให้หน้าที่ยึดลำแสงไปผ่านสารตัวอย่าง (sample) ในขณะที่ต่อมาจะสะท้อนลำแสงไปผ่านสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ้างอิง (reference) ซึ่งก็คือแบล็ค โดยลำแสงทั้งสองจะมีความเข้มแสงเท่ากันก่อนที่จะผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิง เมื่อลำแสงทั้งสองนี้ไปตกกระทบบนตัวตรวจจับสัญญาณ ความแตกต่างของความเข้มแสงหลังจากผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิงจะกลายเป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ([http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/colorlight/page4\\_3.html](http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/colorlight/page4_3.html).)



รูปที่ 2.7 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่

(ที่มา: [http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4\\_3.html](http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_3.html))

3. การวัดน้ำหนักแห้ง (dry weight determination) การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายจากการหาน้ำหนักของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยการนำเซลล์สาหร่ายไปทำให้แห้ง แล้วนำไปหาน้ำหนักของมวลที่เพิ่มขึ้น เป็นวิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งที่เหมาะสมสำหรับการวัดเซลล์ที่เป็นเส้นสายที่ไม่สามารถวัดได้ด้วยวิธีอื่นๆ วิธีการวัดจะทำการเก็บตัวอย่างที่ต้องการวัด และนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 70-100 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ และนำมารายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหารที่มีการเติมน้ำตาล (กลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเสริมให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จำเป็นต้องมีการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลที่คงเหลือในอาหาร เพื่อประเมินการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมกลูโคส เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วในการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งน้ำตาลรีดิซและน้ำตาลอื่นในธรรมชาติที่อาจอยู่ในรูปของ mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide โดยน้ำตาลเหล่านี้จะทำปฏิกิริยา

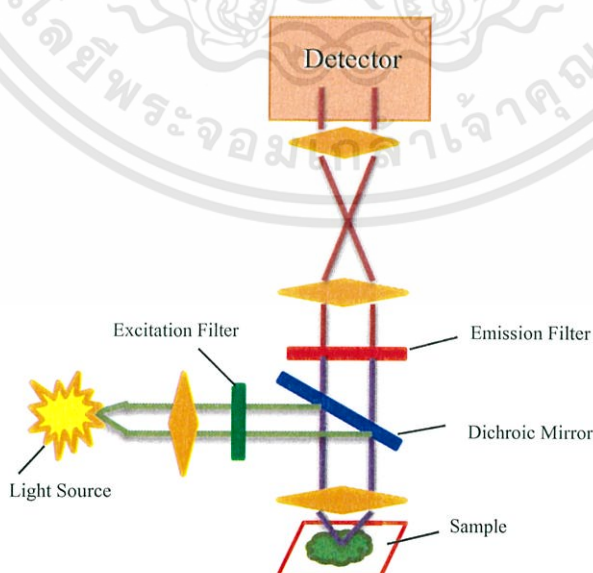
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับฟีนอลและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบที่มีสี และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 480-490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยา เชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligosaccharide และ polysaccharide พันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลถูกตัดออกจากกันด้วยกรด พร้อมทั้งเกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำออกและมีการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอลกลายเป็นสารประกอบไตรเอริลมีเทนที่มีสีส้ม (triarylmethane dyes) (เสาวนาภรณ์, 2557)

## 2.5 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่าย

### 2.5.1 กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence microscope

กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) ถูกนำมาใช้ในห้องวิจัยหรือห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ที่มีคุณสมบัติการเรืองแสงหรือเปล่งแสงได้เอง เมื่อได้รับพลังงานจากแหล่งกำเนิดที่มีพลังงานสูง เช่น แสงยูวี ซึ่งเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำ จึงเป็นแสงที่มีพลังงานสูง เมื่อถูกยิงไปกระทบกับวัตถุที่มีความสามารถดูดกลืนแสงได้ วัตถุนั้นก็จะปลดปล่อยพลังงานออกมาเป็นแสงที่ตาเราสามารถมองเห็นได้ (visible light) ซึ่งเป็นแสงที่มีค่าความยาวคลื่นสูง หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.8 โดยเริ่มที่แสงจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) ซึ่งจะส่องผ่านระบบเลนส์ต่างๆ และส่องผ่านลงไปยังตัวอย่าง (sample) จากนั้นตัวอย่างจะเกิดการเรืองแสง ทำให้สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากหลักการดังกล่าวข้างต้นนี้เอง จึงถูกนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถทำการย้อมสีที่สามารถทำปฏิกิริยากับแสงยูวี แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นได้ (<http://www.microscopes.in.th/220/Cfluorescence.html>)



รูปที่ 2.8 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope)

(ที่มา: <http://www.microscopes.in.th/220/Cfluorescence.html>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.2 การวัดการเรืองแสงของไขมันด้วยสีย้อมไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscopy)

การวัดการเรืองแสงด้วยสีย้อมไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscopy) เป็นการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว สำหรับขั้นตอนการตรวจสอบไขมันในเบื้องต้น ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีไนล์เรดนั้นจะเป็นเพียงการวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือกึ่งเชิงปริมาณของไขมัน ซึ่งไม่สามารถบอกได้เป็นตัวเลขที่แน่นอน อาจกล่าวได้ว่าเป็นเพียงการประเมินเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีไขมันภายในเซลล์ สีย้อมไนล์เรด มีชื่อตามระบบ IUPAC คือ 9-diethylamino-5-benzo [α] phenol-xazinone หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Nile red oxazine ซึ่งเป็นสีย้อมที่ชอบไขมัน จะเรืองแสงสีเหลืองเมื่อสภาพแวดล้อมมีส่วนผสมของไขมัน ในช่วงความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 485 นาโนเมตร และจะปลดปล่อยที่ความยาวคลื่น 552 นาโนเมตร (552/636 นาโนเมตร ในเมทานอล) ทั้งนี้การเรืองแสงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้ (กิตติคุณ และคณะ, 2554)

Yen Doan และคณะ, (2011) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายทะเลเพื่อการผลิตไบโอดีเซล ทำการตรวจสอบปริมาณไขมันด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red, NR) โดยการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายในช่วงการเจริญเติบโตเดียวกันปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมน้ำ 10 ไมโครลิตร ของสีย้อมไนล์เรดลงในเซลล์สาหร่าย ผสมให้เข้ากัน 1 นาที บ่มในที่มืด 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไนล์เรดจะเรืองแสงสีเหลืองของภายใต้ฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อละลายในไขมัน ตรวจวัดด้วยการกระตุ้นและการปลดปล่อยที่ความยาวคลื่น 480 และ 575 นาโนเมตร ตามลำดับ

Susilaningih และคณะ, (2014) ทำการตรวจสอบการสะสมไขมันเบื้องต้นในเซลล์สาหร่าย โดยใช้การเรืองแสงของไนล์เรด ไนล์เรดเกือบจะไม่เรืองแสงในน้ำแต่จะเรืองแสงอย่างมากกับแสงสีแดง เมื่อในสภาพแวดล้อมอุดมไปด้วยไขมันซึ่งจะเกิดการเรืองแสงได้อย่างว่องไว ไขมันที่สะสมในเซลล์ที่ไม่มีขั้ว (neutral lipids) เช่น คอเลสเตอรอล (cholesterol) ไลโปโปรตีน (lipoproteins) และไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) จะเรืองแสงสีเขียว ในขณะที่ไขมันที่มีขั้ว (polar lipids) เช่น ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) จะเรืองแสงสีแดง ทั้งหมดจะถูกตรวจสอบด้วยไนล์เรด โดยใช้ 1 มิลลิลิตรของเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยง นำมาเติมน้ำ 10 ไมโครลิตร ของไนล์เรดในอะซิโตน (500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นผสมให้เข้ากัน 1 นาที บ่ม 10 นาที และนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ จะปรากฏสีแดงจุดจุดและคัดเลือกเพื่อใช้ในงานวิจัยต่อไป

## 2.6 การผลิตไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นเชื้อเพลิงดีเซลที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือสาหร่าย ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลทางเลือก นอกเหนือจากดีเซลที่ผลิตจากปิโตรเลียม โดยมีสมบัติการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลจากปิโตรเลียมมาก และสามารถใช้แทนกันได้ (อ้อยใจ และคณะ, 2550) ซึ่งไบโอดีเซล เป็นชื่อเรียกที่หมายถึงเชื้อเพลิงที่ผลิตจากน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ โดยผ่านกระบวนการทางเคมี เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างไขมันให้เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน

เป็นเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเครื่องยนต์ (พิสมัย และลลิตา, 2549)

การนำน้ำมันพืชไปใช้โดยตรง หรือนำน้ำมันพืชไปผสมกับกับดีเซล ในกรณีนี้จะไม่ถือว่าเป็นไบโอดีเซล การที่จะเรียกว่าไบโอดีเซลนั้นต้องผ่านกระบวนการทางเคมีกับแอลกอฮอล์โดยมีตัวเร่งก่อนที่เรียกว่า ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน เป็นอัลคิลเอสเทอร์แล้วเท่านั้น ดังนั้นหากนำน้ำมันพืชไปใช้ผสมโดยไม่ผ่านกระบวนการดังกล่าว จะไม่เรียกว่าเป็นไบโอดีเซล (อ้อยใจ และคณะ, 2550)

2.6.1 เทคโนโลยีการผลิตไบโอดีเซล (พิสมัย และลลิตา, 2549) แบ่งเป็น 3 กระบวนการได้แก่

1. กระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification process) ที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเมทานอล มีข้อดี คือเป็นเทคโนโลยีที่มีการลงทุนไม่สูงนัก เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิต่ำ และความดันต่ำกว่า 2 บรรยากาศ ผลได้ของปฏิกิริยาสูงถึงร้อยละ 98 แต่กระบวนการนี้จะไม่เหมาะกับวัตถุดิบที่มีปริมาณกรดไขมันสูง เนื่องจากจะเกิดสบู่ และส่งผลให้ผลได้ (yield) ของกระบวนการผลิตลดลง

2. กระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification process) ที่ใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเมทานอล จะสามารถใช้ได้กับวัตถุดิบทุกชนิด และค่ากรดไขมันอิสระทุกระดับ แต่ข้อด้อยคือ ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานาน และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงกว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จึงทำให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยสูงกว่า

3. กระบวนการ 2 ขั้นตอน (two-stage process) ขั้นตอนที่ 1 เป็นปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน และขั้นตอนที่ 2 เป็นปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน เป็นการแก้ปัญหาจุดด้อยของ 2 กระบวนการข้างต้น กล่าวคือ สามารถใช้ได้กับน้ำมันที่มีค่ากรดไขมันอิสระสูง ในขณะเดียวกันก็มีการใช้พลังงานต่ำ โดยหลักการ คือ ใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เปลี่ยนกรดไขมันอิสระที่อยู่ในน้ำมันให้เป็นสารเอสเทอร์ก่อนเป็นปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน จากนั้นจึงใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ถึงแม้ว่ากระบวนการนี้จะใช้พลังงานต่ำกว่ากระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนเดียว แต่หากวัตถุดิบมีค่ากรดสูงมากๆ กระบวนการในขั้นตอนแรกจะใช้เวลามากขึ้น ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยของไบโอดีเซลสูงขึ้นตามไปด้วย

อย่างไรก็ตามในการผลิตต้องคำนึงถึงการทำให้ปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ เพื่อให้ได้ผลได้สูงสุด และเกิดการสูญเสียน้อยที่สุด นอกจากนั้นแล้วยังต้องทำให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์ตามมาตรฐานที่กำหนดด้วย ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อผลได้ (yield) ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่

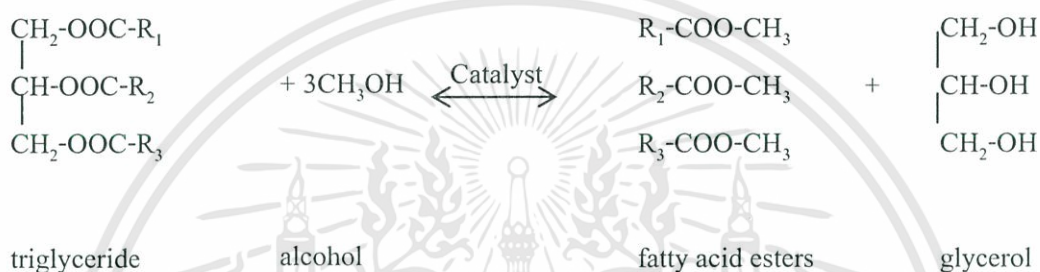
1. อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา
2. อัตราส่วนระหว่างน้ำมันกับแอลกอฮอล์
3. ชนิดและความเข้มข้นของสารเร่งปฏิกิริยา
4. การผสมสารตั้งต้น
5. ความบริสุทธิ์ของสารตั้งต้น

2.6.2 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (นฤตชวรณ, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6.2 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (นฤตชวรรณ, 2556)

ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งมักจะถูกเรียกว่า แอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) คือกระบวนการตัดโมเลกุลของไขมันจากน้ำมันพืช หรือไขมันจากสัตว์ให้มีขนาดเล็กลง เพื่อลดความหนืดให้กับน้ำมัน และให้น้ำมันมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล โดยเกิดจากการทำปฏิกิริยาของน้ำมันหรือไขมันจากพืช และสัตว์กับแอลกอฮอล์ เพื่อเกิดเอสเทอร์ และกลีเซอรอล มักจะใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยา และให้ได้ผลได้ (yield) ของปฏิกิริยาสูง เนื่องจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ จึงต้องใช้แอลกอฮอล์ที่มากเกินไป เพื่อให้สมดุลเลื่อนไปทางด้านของผลได้ไบโอดีเซลให้มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยแบบผันกลับได้ที่ต่อเนื่องกัน 3 ขั้นตอน คือเริ่มจากไตรกลีเซอไรด์ เปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ เป็นโมโนกลีเซอไรด์ ตามลำดับ สุดท้ายได้เป็นเอสเทอร์ กับกลีเซอรอล ดังแสดงในรูป 2.10 จากกลไกข้างล่างพบว่าแต่ละขั้นตอนย่อยจะได้ 1 โมล ของเอสเทอร์ แม้ว่าจะเป็นปฏิกิริยาผันกลับได้ แต่สมดุลจะโน้มเอียงไปทางผลิตภัณฑ์ คือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid ester) และกลีเซอรอล



รูปที่ 2.10 กลไกปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์ที่ใช้ต้องเป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ หรือทุติยภูมิ สายโซ่ตรงที่มีหมู่ OH เพียงหมู่เดียว ซึ่งที่นิยมใช้มากที่สุดคือ เมทานอล และเอทานอล โดยเฉพาะเมทานอล เนื่องจากมีราคาถูก และมีข้อได้เปรียบในเชิงฟิสิกส์ และเคมีในตัวของมันเอง จากการเป็นแอลกอฮอล์ที่มีขั้ว และมีไซส์สั้นที่สุด ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างรวดเร็ว และละลายตัวเร่งปฏิกิริยาแอลคาไลได้ง่าย

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเกิดได้ที่ความดันบรรยากาศ ตั้งแต่อุณหภูมิห้องถึงจุดเดือดของแอลกอฮอล์ (ประมาณ 65 องศาเซลเซียส) ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้โดยทั่วไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเอกพันธ์ (homogeneous catalyst) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ กรด และด่าง ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเร็วกว่าที่ใช้กรดเป็นตัวเร่ง และมักใช้ในอุตสาหกรรม แต่ต้องใช้ไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ที่ปราศจากน้ำ หรือมีน้ำน้อยที่สุด เนื่องจากน้ำจะทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน (saponification) สบู่ที่เกิดขึ้นจะทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยามีปริมาณน้อยลง ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอลไม่แยกออกจากกัน หรือใช้เวลานานในการแยก และทำให้ร้อยละผลได้ของไบโอดีเซลลดลง

### 2.6.3 ข้อดีและข้อควรระวังในการใช้น้ำมันไบโอดีเซล (คมสัน และคณะ, 2550)

ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติทางกายภาพคล้ายกับดีเซลปกติมาก แต่ให้การเผาไหม้ที่สะอาดกว่า ไอเสียมีคุณภาพที่ดีกว่า ทั้งนี้เพราะไบโอดีเซลมีองค์ประกอบของสารออกซิเจนอัด (oxygenate) ปริมาณสูง ช่วยให้การเผาไหม้ในกระบอกสูบมีความสมบูรณ์หมดจดยิ่งขึ้นกว่าดีเซลปกติ จึงมีคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่า และเนื่องจากไม่มีกำมะถันในไบโอดีเซลจึงไม่มีปัญหาเรื่องซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และยังมีค่าล่อสันสูง ซึ่งจะช่วยให้ชิ้นส่วนในระบบน้ำมันเชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ มีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น นอกจากนี้ยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย จึงไม่ทำให้เกิดการอุดตันของระบบไอเสียได้ง่าย ช่วยยืดอายุการใช้งานของเครื่องยนต์เป็นอย่างดี สามารถดมมลพิษทางอากาศ ซึ่งเป็นผลจากการเผาไหม้ในเครื่องยนต์ได้ส่วนหนึ่ง คุณสมบัติในการหล่อลื่นดีกว่าน้ำมันดีเซล จึงมีการนำไบโอดีเซลมาใช้ผสมน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่างๆ กัน หรือใช้โดยไม่ต้องผสมกับน้ำมันดีเซลเลยก็ได้ อย่างไรก็ตามไบโอดีเซลเป็นตัวทำลายที่ดีจึงอาจทำให้ท่อทางเดินน้ำมัน ซึ่งทำจากยางและพลาสติกบวม และรั่วได้ ดังนั้นการใช้ไบโอดีเซลในรถยนต์จะต้องสอบถามบริษัทผู้ผลิตรถยนต์ก่อนว่าสามารถใช้ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงได้หรือไม่ นอกจากนี้การเปลี่ยนไส้กรองอาจต้องทำการตรวจสอบและเปลี่ยนบ่อยขึ้น แต่ก็ได้เป็นเรื่องยุ่งยากมากนัก

## 2.7 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไขมันในสาหร่าย

### 2.7.1 แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) (แมน และคณะ, 2553)

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่ใช้สำหรับแยกสารผสมซึ่งคล้ายกับลิควิดโครมาโทกราฟี (LC) แต่เทคนิคที่ใช้แยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นแก๊สเฟสได้ที่อุณหภูมิหนึ่ง (ไม่เกิน 450 องศาเซลเซียส) และต้องเสถียรที่อุณหภูมินั้น ถ้าสารใดเปลี่ยนให้เป็นแก๊สเฟสยาก ก็อาจใช้เทคนิคอื่นๆ บางอย่างเข้าช่วยได้ เช่น อาศัยปฏิกิริยาเคมีเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์อื่นๆ เช่น ถ้าสารตัวอย่างเป็นกรดที่มีจุดเดือดสูง อาจจะใช้วิธีทำให้เป็นเอสเทอร์จุดเดือดจะได้ต่ำลง หรืออาจใช้หลักการแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) ให้กลายเป็นสารที่มีสถานะเป็นแก๊สได้แล้วให้แก๊สนั้นผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยสารที่จะทำหน้าที่แยกซึ่งเรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือเรียกว่า carrier gas การเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรกิริยา (interaction) ของสารที่จะแยกกับแก๊สพาจะไม่เกิดขึ้นหรือไม่มีความสำคัญ ส่วน stationary phase ซึ่งอาจเป็น solid หรือ liquid ก็ได้ stationary phase นี้จะประกอบไปด้วยสารที่สามารถดูดซับ (adsorbed) สารที่จะแยกได้ในทางปฏิบัติอาจเป็น gas-solid chromatography (GSC) หรือ gas-liquid chromatography (GLC)

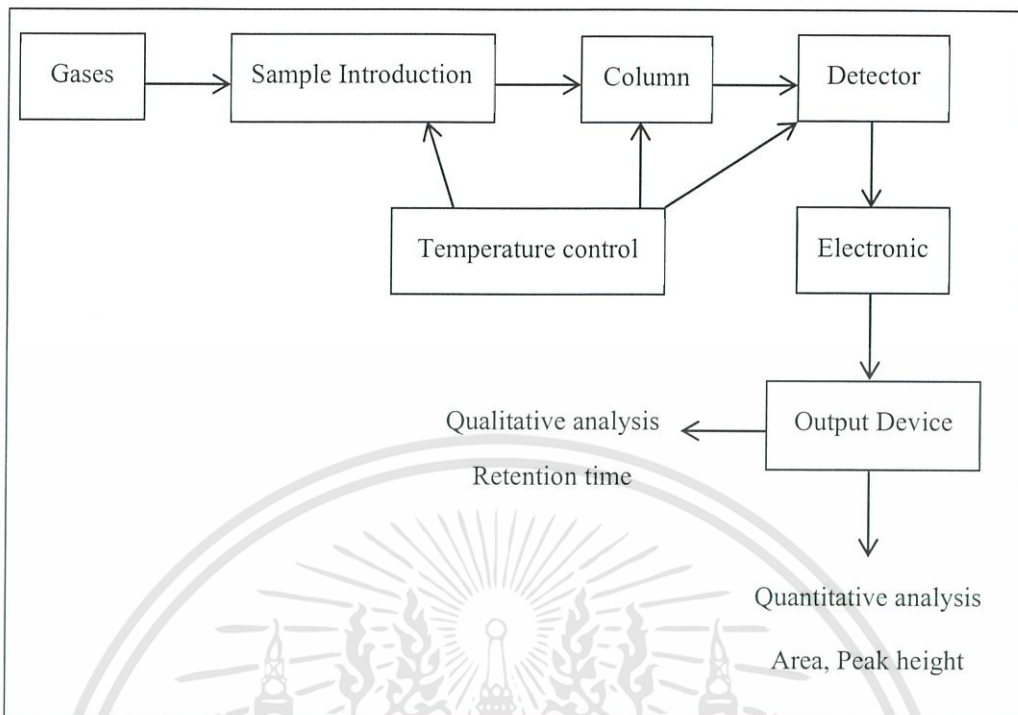
ประเภทของแก๊สโครมาโทกราฟี แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

1. แก๊ส-ของแข็งโครมาโทกราฟี (GSC) วิธีนี้ใช้ stationary phase เป็นของแข็งที่สามารถดูดซับ (adsorption) สารที่เป็นแก๊สซึ่งต้องการแยก และไม่มีสารอื่นใดเคลือบอยู่ ส่วนใหญ่วิธีนี้ค่อนข้างแคบ เพราะใช้แยกเฉพาะสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่มีโมเลกุลเล็กๆ ดังนั้นคอลัมน์ที่ใช้มักจะบรรจุด้วย active solids เช่น molecular sieves หรือ porous polymers, silica gel, alumina และ activated carbon เป็นต้น

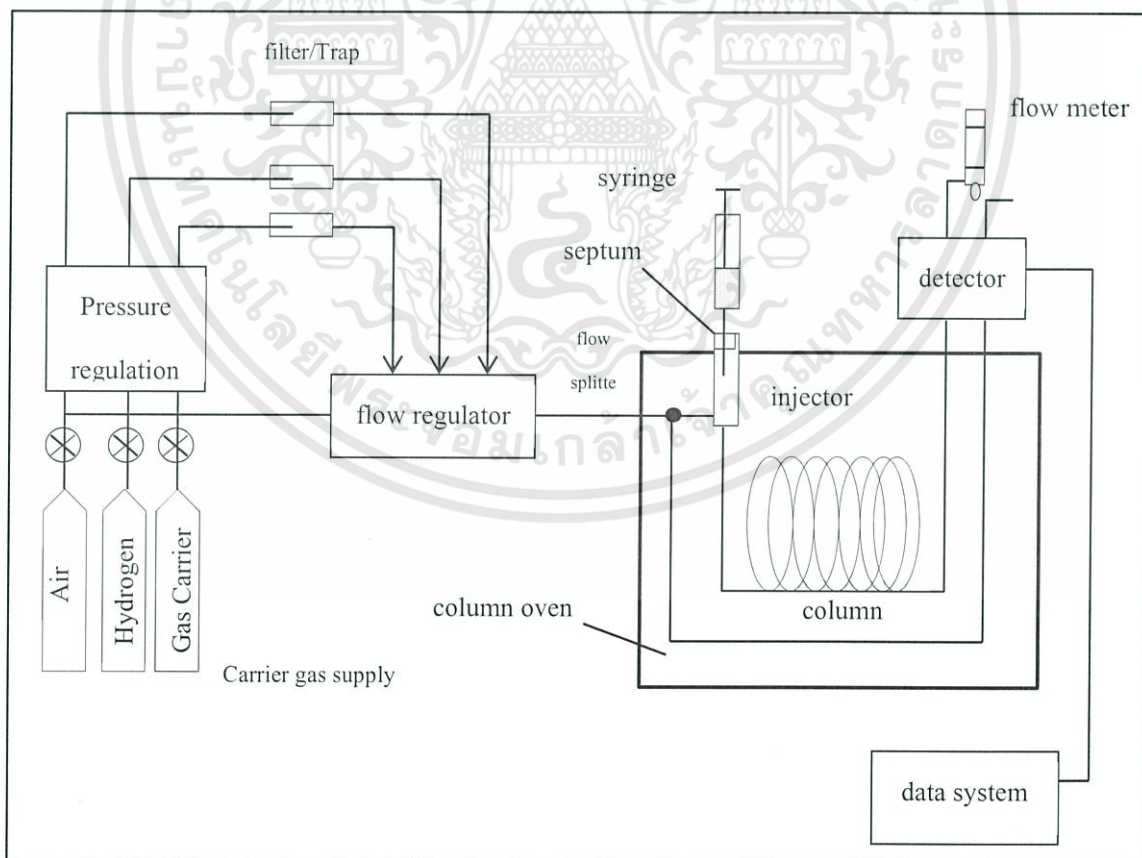
2. แก๊ส-ของเหลวโครมาโทกราฟี (GLC) วิธีนี้ใช้ stationary phase เป็นของเหลวซึ่งอาจเป็นสารที่เป็นของแข็งนำไปละลายในตัวทำละลายที่ระเหยง่ายและนำไปเคลือบบน solid supports ซึ่งมีคุณสมบัติเฉื่อยและไม่มีผล กระทบต่อกระบวนการแยกสาร เมื่อสารตัวอย่างที่เป็นแก๊สหรือไอของสารที่ผสมกันอยู่ เมื่อผ่านคอลัมน์สารจะแยกออกจากกันได้ด้วยการกระจายตัวที่แตกต่างกันระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งทำหน้าที่เป็น liquid phase หรือมีค่า partition coefficient ต่างกัน ถ้าสารใดหรือแก๊สใดละลายใน liquid phase ได้ดีกว่าจะถูกจับไว้นาน โครมาโทแกรมของสารนี้จะออกมาทีหลัง ค่า retention time จะมากกว่าแก๊สหรือไอของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ก่อนค่า retention time จะน้อยกว่าเพราะถูกจับไว้ไม่ได้

ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้ในการแยกแก๊สผสมหรือสารผสมที่เป็นไอกันอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันเทคนิคในการวิเคราะห์สารด้วยวิธี GC-MS จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างมาก เพราะใช้ได้ดีทั้งคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ mass spectrometer จึงใช้เป็น detector สามารถบอกชนิดของสารได้อย่างถูกต้องแน่นอน ต่างกับ detectors ที่ใช้ใน GC ทั่วไป

ในการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคนี้นั้น จำเป็นจะต้องเรียนรู้ถึงสื่อต่างๆ ที่สำคัญและเกี่ยวข้องให้เข้าใจเสียก่อน ก่อนที่จะลงมือทำการวิเคราะห์ นั่นคือหลักการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟี เพื่อให้เข้าใจขึ้นจะขอแสดงองค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 และรูปที่ 2.12 และขั้นตอนการทำงานอย่างย่อๆ เสียก่อน เพื่อจะได้มองเห็นภาพรวมของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีดังนี้



รูปที่ 2.11 แสดง Block Diagram องค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ 2.12 แสดงองค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. แก๊สที่ใช้ทำงานกับเครื่อง GC มี 3 ชนิด คือ
  - แก๊สเฉื่อย ได้แก่ ฮีเลียม หรืออาร์กอนหรือไนโตรเจนซึ่งใช้เป็นแก๊สพา (carrier gases) เพื่อจะใช้พาไอของสารหรือแก๊สตัวอย่างเข้าคอลัมน์
  - แก๊สไฮโดรเจนเพื่อใช้ใน Flame Ionization Detector (FID)
  - อากาศ (air) เพื่อใช้ผสมกับไฮโดรเจนใน FID แก๊สทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีหัววัดความดัน (gas regulators) เพื่อใช้ควบคุมอัตราการไหลของแก๊ส
2. gas traps และ filters เป็นส่วนช่วยทำให้ระบบของแก๊สที่จะใช้งานสะอาดและบริสุทธิ์ ซึ่งมีลักษณะเป็น cartridge (ดังรูป) คือมี
  - molecular sieve trap ใช้ดูดความชื้น
  - oxygen trap เป็น cartridge ที่จับแก๊สออกซิเจน
  - hydrocarbon filter ใช้จับแก๊สไฮโดรคาร์บอนและไอของน้ำมันสำหรับ carrier gases ( $H_2$ , Ne, Ar,  $N_2$ ) ควรจะต้องผ่าน filter อากาศควรจะต้องผ่าน charcoal filter
3. ส่วนที่จะฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ (injection port)
4. คอลัมน์ (column) เป็นส่วนที่ใช้สำหรับแยกสารซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่สุด
5. ดีเทคเตอร์ (detectors) เป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์
6. ส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) การควบคุมอุณหภูมิให้คอลัมน์ detector และ injector ซึ่งมีความสำคัญมาก เพราะมีผลต่อข้อมูลการวิเคราะห์
7. ส่วนที่ใช้ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ ได้แก่ อินทิเกรเตอร์เครื่องบันทึกโครมาโทแกรมหรือ data processor หรือคอมพิวเตอร์

ดังนั้นในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้เทคนิค GC นั้นสามารถแสดงให้เห็นได้ง่ายๆ ดังนี้ คือ เมื่อเลือกสภาวะต่างๆ ของการวิเคราะห์ และจัดสภาวะของเครื่อง GC ได้เรียบร้อยแล้ว จึงนำสารตัวอย่างไปฉีดเข้าที่ sample injection port สารจะกลายเป็นไอแล้วถูก gas carrier พาเข้าคอลัมน์อย่างช้าตาม flow rate ที่ต้องการ สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆ ที่คอลัมน์นี้ แล้วออกไปสู่ดีเทคเตอร์จะทำให้เกิดสัญญาณขึ้น ซึ่งสามารถ print out ออกมาเป็นโครมาโทแกรมก็จะทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถทราบองค์ประกอบของสารตัวอย่างได้ ถ้าจะหาปริมาณก็ต้องวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานที่สภาวะเดียวกันต่อไป

### 2.7.2 ข้อดีของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

ข้อดีของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีนั้นมีมากและได้รับความนิยมใช้ในการแยกแก๊สพอที่จะสรุปได้ดังนี้

1. ใช้แยกสารต่างๆ ได้ดี มีค่าการแยกสูง (high resolution)
2. มีความไวสูงสามารถใช้วิเคราะห์สารบางชนิดได้ถึงระดับ ppm และ ppb
3. ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยอยู่ในระดับเป็นนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์ทำได้ง่ายและสะดวก
5. เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มาก
6. เป็นเทคนิคที่มีขีดความสามารถในการแยกสูง
7. อุปกรณ์ที่ใช้วัดมีหลายชนิดและใช้ได้อย่างเหมาะสมและไวต่อการวัด
8. สามารถออกแบบเป็นอัตโนมัติได้

### 2.7.3 ข้อเสียของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

1. สารตัวอย่างต้องระเหยหรือกลายเป็นไอได้
2. สารตัวอย่างต้องมีการเตรียมก่อนอย่างถูกต้องและเหมาะสมเพื่อแยกเอาส่วนที่ไม่ระเหยออก
3. ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์อื่นที่เฉพาะเข้าร่วมด้วยเพื่อให้เกิดความแน่ใจ เช่น ใช้ MS
4. สารที่วิเคราะห์ได้มีจำกัดคือมวลโมเลกุลต้องไม่สูง (ต่ำกว่า 600-800)
5. สารประกอบพวกไอออนิก เช่น พวกเกลือต่างๆ

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Alvarez-Díaz และคณะ, 2015 การบำบัดน้ำเสียและการผลิตไบโอดีเซลจาก *Scenedesmus obliquus* ในการเพาะเลี้ยงแบบ 2 สภาวะ โดยใช้สาหร่าย *Scenedesmus obliquus* โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ 2 สภาวะ (1.) เพาะเลี้ยงแบบกะ (batch) ในน้ำเสีย (2.) ใช้สภาวะในการควบคุมที่แตกต่างกันของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) และความเข้มแสง ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมในการผลิตไขมัน ซึ่งจะทำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณไขมันจากร้อยละ 35.8 ให้ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 49 และ ω-3 fatty acid ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากคาร์บอนไดออกไซด์ และความเข้มแสง แต่ในทางกลับกันเมื่อทั้งสองปัจจัยนั้นมารวมกันจะทำให้การทำงานร่วมกันกับ ω-3 eicosapentaenoic เป็นผลทำให้ปริมาณกรดไขมันลดลงร้อยละ 1 ซึ่งเป็นส่วนที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล (EU ได้กำหนดไว้)

Nwokoagbara และคณะ, 2015 ไบโอดีเซลจากสาหร่าย: เกณฑ์ในการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก ในการศึกษานี้ได้ใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกแบบ MCDA คือการระบุสายพันธุ์สาหร่ายที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตไบโอดีเซล โดยสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ใช้มาวิเคราะห์ คือ *Heynigia* sp., *Scenedesmus* sp., *Niracticinium* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* และ *Auxenochlorella protothecoides* ซึ่งวิธี MCDA มีทั้งหมด 5 ขั้นตอน เพื่อใช้ในการประเมินสายพันธุ์ของสาหร่ายที่แตกต่างกันมีดังนี้กระบวนการวิเคราะห์ของลำดับชั้น (AHP), การชั่งน้ำหนักรวม (WSM), การชั่งน้ำหนักผลิตภัณฑ์ (WPM), Discrete Compromise Programming (DCP) และ Technique for the Order of Preference to the Ideal Solution (TOPSIS) และเมื่อทำการเปรียบเทียบในการตรวจสอบน้ำหนัก, ไขมันและอัตราการเจริญเติบโต จึงสรุปได้ว่าสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ถูกคัดเลือกให้เป็นสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเนื่องจากมีปริมาณไขมันสูงและอัตราการ

เจริญเติบโตที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับอีก 5 สายพันธุ์ที่เหลือ และผลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้สามารถนำวิธี MCDA มาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายได้

Ashokkumar และคณะ, (2015) สาหร่ายถือเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงทดแทน ในการศึกษานี้จะใช้สาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus bijugatus* ซึ่งพบในแหล่งน้ำจืดนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยจะเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังเพาะเลี้ยงให้แสงแบบแนวตั้ง (ความจุ 250 ลิตร) แบบกึ่งต่อเนื่อง ในระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. bijugatus* จะมีปริมาณชีวมวลและไขมันเพิ่มขึ้น ซึ่งผลิตชีวมวลแห้งได้ 0.26 กรัม/ลิตร/วัน และผลิตไขมันได้ 63 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน สำหรับการเก็บเกี่ยวชีวมวลจะใช้กระบวนการการเกิดตะกอน (coagulation) และการรวมตัวของตะกอน (flocculation) โดยใช้ Iron (III) sulfate และโพลีเมอร์อินทรีย์เข้ามาช่วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวให้ได้ร้อยละ 98 ส่วนการสกัดไขมันจะใช้ hexane : diethyl ether ในอัตราส่วน 1:2 จึงจะได้ผลผลิตในการสกัดสูงสุด และจากการศึกษาครั้งนี้กระบวนการเอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification) และทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนไขมันให้เป็นไบโอดีเซล ซึ่งผลได้ไบโอดีเซลสูงสุดจะอยู่ที่ 0.21 กรัม/กรัม ของชีวมวลแห้ง ใช้กรด-เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อได้น้ำมันไบโอดีเซลมาแล้วก็ต้องปรับคุณสมบัติน้ำมันไบโอดีเซลให้สอดคล้องกับข้อกำหนดตามมาตรฐาน ASTM D6751 ส่วนไขมันที่เหลือจากการสกัด จะสามารถผลิตไบโอเอทานอลได้ 0.158 กรัม ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ได้รับการยืนยันแล้วว่าไขมันที่เหลือจากการสกัดสามารถนำมาทำไบโอเอทานอลได้

Guldhe และคณะ, (2014) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของการทำแห้งและเทคนิคการทำลายเซลล์เพื่อการได้มาของไขมันในสาหร่ายสำหรับการผลิตไบโอดีเซล สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ถูกเลี้ยงภายใต้แสงธรรมชาติที่ 400-1200 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที และอุณหภูมิ 18-27 องศาเซลเซียส ในบ่อเปิดทรงกลมขนาด 8000 ลิตร ด้วยอาหาร BG-11 ให้อากาศด้วยปั๊มแบบจุ่มในน้ำด้วยอัตราการไหล 110 ลิตร/นาที การสะสมไขมันใน *Scenedesmus* sp. ตรวจวัดด้วยวิธีไนล์เรด (nile red staining) การเก็บเกี่ยวในวันที่ 21 ภายใต้แรงโน้มถ่วงโดยการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) และเทคนิคการทำแห้งประกอบด้วย 3 เทคนิค คือ 1.) การทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ (sun drying) วางมวลสาหร่ายบนโต๊ะที่ปูด้วยพลาสติกหนา 1500 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 2.) การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) นำมวลสาหร่ายสดแช่แข็งข้ามคืนที่อุณหภูมิ -84 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (sublimation) เป็นไอน้ำด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ ขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำ 3.) การทำแห้งด้วยตู้อบความร้อน (oven drying) โดยใช้ตู้อบลมร้อน (hot air oven) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การทำลายเซลล์และการสกัด ดัดแปลงจากวิธีของ Lee และคณะ สำหรับการสกัดด้วยไมโครเวฟ (microwave extraction) และวิธีของ Kumari และคณะ สำหรับการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง (sonication extraction) ไขมันสาหร่ายที่ได้ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl esters, FAME)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ปริมาณ FAME ที่ได้วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, Shimadzu GC-2014, Japan) ผลที่ได้พบว่าการทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ เป็นเทคนิคที่ใช้พลังงานน้อย และสามารถใช้ทำมวลสารห่วยแห้งในปริมาณมากได้ และการสกัดด้วยไมโครเวฟให้ผลได้สูงกว่าการสกัดด้วยเครื่องแยกสารด้วยเสียงที่มีความถี่สูง ไขมันที่สกัดได้จากสารห่วย *Scenedesmus* sp. ทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันให้ผลได้ไบโอดีเซลเป็นร้อยละ  $91.75 \pm 0.25$  ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าวิธีการทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ง่ายและประหยัด และการทำลายเซลล์ด้วยไมโครเวฟเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งอาจจะเป็นขั้นตอนของกระบวนการที่เป็นไปได้ในการผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่ในอนาคตจากสารห่วย *Scenedesmus* sp.

Chen และคณะ, (2014) ได้ศึกษาวิธีการใหม่ในการผลิตไบโอดีเซลที่ประกอบด้วยการสกัดน้ำมันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันจากสารห่วยเปียก โดยขั้นตอนประกอบไปด้วยการเตรียมมวลสารห่วยสด จากการใช้ไมโครเวฟช่วยในการทำลายเซลล์ ที่ 300 วัตต์ เป็นเวลา 10 นาที และกรองแยกมวลสารห่วยออกจากเมทานอลจะได้ก้อนตะกอนสารห่วย และทำการสกัดน้ำมันกับเฮกเซน โดยใช้ก้อนตะกอนสารห่วยประมาณ 5 กรัม กับอัตราส่วนของเฮกเซนต่อเมทานอล, อุณหภูมิ และเวลาของการสกัดที่แตกต่างกันไป เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด และสภาวะที่เหมาะสม คือ เมื่ออัตราส่วนเฮกเซนต่อเมทานอลเป็น 3:1 (30 มล. : 10 มล.) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเวลา 80 นาที การได้มาของผลได้น้ำมันมากกว่าร้อยละ 95 และในขั้นตอนทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ปัจจัยที่ศึกษา คือ อัตราส่วนน้ำมันต่อเมทานอล เวลา และอุณหภูมิ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมคือ อัตราส่วนน้ำมันต่อเมทานอลเป็น 6:1 ที่มีร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักแห้ง NaOH อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผลได้ปฏิกิริยาสูงกว่าร้อยละ 95 ซึ่งวิธีการดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลจากสารห่วยสดที่มีประสิทธิภาพ

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

##### 3.1.1 หัวเชื้อสาหร่าย

หัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *Scenedesmus armatus*

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ดวงกมล เรือนงาม

##### 3.1.2 สารเคมีที่ใช้

สำหรับเตรียมอาหาร BG-11 (Blue-Green medium) (แสดงสูตรในภาคผนวก ก)

1.  $\text{NaNO}_3$  (UNIVAR, Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
2.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (CARLO ERBA REAGENTS, Garlo Erba Reagenti SpA, Milan)
3.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fluka, Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs)
4.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (CARLO ERBA REAGENTS, Garlo Erba Reagenti SpA, Milan)
5. Citric acid (AnalaR NORMAPUR, VWR International bvba, Belgium)
6. Ferric ammonium citrate (Fluka, Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs)
7. EDTA disodium magnesium salt (AnalaR NORMAPUR, VWR International bvba, Belgium)
8.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (CARLO ERBA REAGENTS, Garlo Erba Reagenti SpA, Milan)
9.  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (EMSURE, EMD Millipore Corporation, Germany)
10.  $\text{MnCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CARLO ERBA REAGENTS, Garlo Erba Reagenti SpA, Milan)
11.  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (CARLO ERBA REAGENTS, Garlo Erba Reagenti SpA, Milan)
12.  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (BDH, BDH Chemical Ltd, England)
13.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (CARLO ERBA REAGENTS, Garlo Erba Reagenti SpA, Milan)
14.  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (MERCK, E. Merck Darmstadt, Germany)
15. น้ำกลั่น
16. วุ้น (Agar) สำหรับเตรียมอาหารแข็ง
17. Glucose

สำหรับการสกัดและทรานเอสเทอร์ิฟิเคชัน

18. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (RCl Labscan, V.S.CHEM HOUSE, Thailand)
19. เมทานอล (Methanol) (MACRON FINE CHEMICALS, Avantor Performance Materials, Inc., USA)

20. เฮกเซน (Haxen) (MACRON FINE CHEMICALS, Avantor Performance Materials, Inc., USA)

21. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) (AnalaR, VWR International Ltd., England)

สำหรับการตรวจสอบปริมาณไขมันและการวิเคราะห์น้ำตาล

22. สารละลายอะซีโตน (RCL Labscan, V.S.CHEM HOUSE, Thailand)

23. สารละลายไนลเรด (SIGMA, SIGMA-AROLICH, Germany)

24. สารละลายโดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Fisher Chemical, European Distribution Center, Belgium)

25. ฟีนอล (Phenol) (Panreac, Panreac Quimica S.L.U., EU)

26. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% (Sulfuric acid) (QReC, QReC New Zealand)

27. Oleic acid (Ph. Eur.) pure (AppliChem Panreac, ITW Companies, Germany)

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้

1. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (BV4-04, FLEXLAB)

2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (ES-315, TOMY, Japan)

3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (ED 115, BINDER, USA)

4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (ECLIPSE E100LED MV R, Nikon, Japan)

5. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) (Nikon 80i, Japan)

6. โครมาโตกราฟีแบบแก๊ส (Gas Chromatography) (Shimadzu GC-2014, Japan)

7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu UV-1800, Japan)

8. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) (Heizbad Hei-VAP, Heidolph, Germany)

9. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter) (Takemura, DM-28, Japan)

10. สไลด์นับเซลล์ ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) (BOECO, deep 1/10 mm, Germany)

11. เครื่อง Ultrasonic cleaner (Model-2800HT, TRU-SWEEP, New York)

12. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Mini Centrifuge, TOMOS, USA)

13. เครื่องผสมสาร (Vortex) (VORTEX GENIE 2, Scientific Industries Si, U.S.)

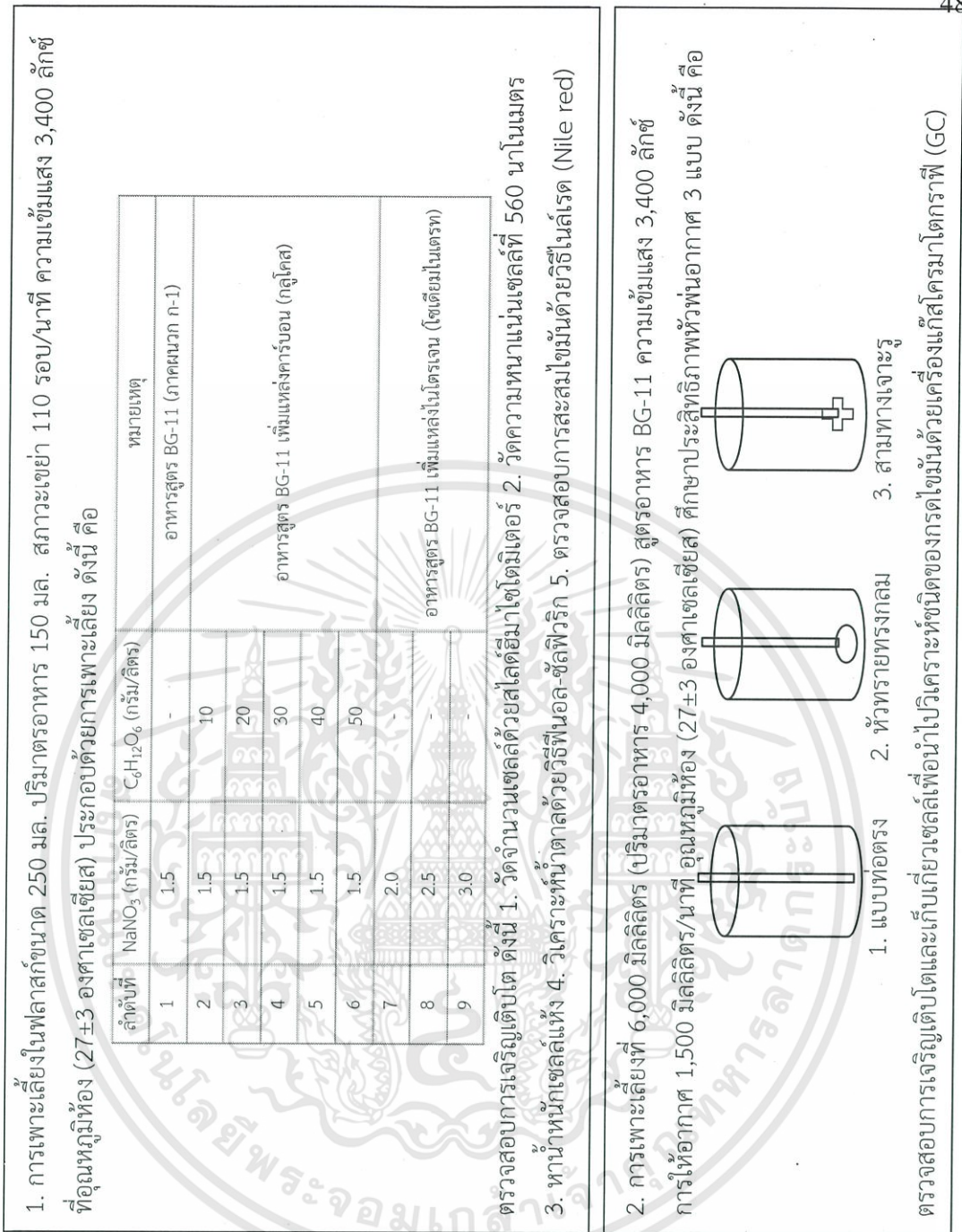
14. เครื่องปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 58W แรงลม 70 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.028

เมกะปาสคาล (AP-40, Yamano, China)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. เครื่องปั๊มอากาศ กำลังไฟ 47W แรงลม 70/40 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.038/0.044 เมกะปาสคาล (HP-8000, Atman, China)
16. เครื่องเขย่า (shaker)
17. เดซิคเคเตอร์ (Desiccator) (DURAN, Vackuumfest, England)
18. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (OHAUS, PA214, USA)
19. คิวเวต (Cuvette) ขนาด 1 มิลลิลิตร (VWR, Germany)
20. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
21. หลอดไฟ (T5 HE 21W/865BP, OSRAM, China)
22. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) (Z383K, HERMLE, Germany)
23. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (PYREX)
24. กระจกตวง (Graduated cylinder) (VIT LAB, Germany)
25. ไมโครปิเปต (Micropipette) (BRAND, Transferpette, Germany)
26. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
27. เครื่องคนสาร (Magnetic stirrer & Hotplate, Fisher Scientific, U.S.A.)
28. ตัวต่อปรับปริมาณอากาศ
29. สายยางขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร
30. หัวทรายทรงกลม, สามทางเจาะรู

### 3.2 แผนผังการทดลอง



การเพาะเลี้ยงสาหร่าย  
*Scenedesmus armatus*

### 3.3 การเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์

#### 3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยง BG-11

1. ชั่งธาตุอาหารปริมาณต่างๆ ตามสูตรอาหาร BG-11 ในภาคผนวก ก-1 ใส่ลงในน้ำกลั่น
2. เติมน้ำปริมาณ 15 กรัม/ลิตร
3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร
4. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้สารละลาย HCl 0.1 โมล และ NaOH 0.1 โมล ให้มีค่า pH 6.9
5. หลอมละลายวุ้นในเตาอบไมโครเวฟ ให้วุ้นละลายจนหมด
6. ใช้ปิเปตดูดอาหารใส่ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร และปิดด้วยจุกสำลี
7. นำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
8. รอให้อาหารเย็นลงเล็กน้อย และวางเลี้ยงให้ด้านบนของหลอดอยู่สูงกว่าด้านล่าง หลอดเล็กน้อย เพื่อให้มีพื้นที่ผิวหน้าอาหารมากขึ้น ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว และเก็บไว้ในที่สะอาด เพื่อนำไปใช้ต่อไป

#### 3.3.2 การเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยง BG-11

1. นำหลอดอาหารเลี้ยง BG-11 ที่เตรียมไว้ และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เช่าตู้ถ่ายเชื้อ และเปิดแสง UV เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในหลอดอาหาร และฆ่าเชื้อภายในตู้ถ่ายเชื้อ
2. ใช้ลูปเผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็นลง และเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูป ถ่ายใส่ในหลอดอาหารใหม่ โดยใช้เทคนิค simple streak
3. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) ให้ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ การเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถเก็บไว้ได้นานหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน ระยะเวลาการเปลี่ยนอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ

### 3.4 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์

#### 3.4.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11

1. ชั่งธาตุอาหารปริมาณต่างๆ ตามสูตรอาหาร BG-11 ในภาคผนวก ก-1 ใส่ลงในน้ำกลั่น
2. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่า pH 6.9

4. บรรจุอาหารเหลวปริมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และปิดด้วยจุกสำลี
5. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และเก็บไว้ในที่สะอาด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.4.2 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับการทดลอง

1. นำพลาสติกอาหารเหลวที่เตรียมได้ และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เข้าตู้ถ่ายเชื้อ เปิดแสง UV เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน
2. ใช้เข็มเย็บเชื้อปลายกลม เผลาไปจนร้อนแดง รอให้เย็นลง และเขี่ยเชื้อจากหัวเชื้อบริสุทธิ์ที่อยู่ในหลอดอาหารเลี้ยง BG-11 ที่ไม่มีการปนเปื้อน ใส่ลงในพลาสติกอาหารเหลว BG-11 ที่เตรียมไว้
3. เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า 110 รอบ/นาที ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์ตามที่ต้องการ

#### 3.5 การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย

1. เตรียมอาหารเหลว BG-11 ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.1
2. นำพลาสติกอาหารเหลวที่เตรียมได้ และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เข้าตู้ถ่ายเชื้อ เปิดแสง UV เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน
3. นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายที่มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ  $\times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรมีค่า 0.3-0.6 เติมลงในอาหารเหลว BG-11 ปริมาณ 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า 110 รอบ/นาที ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส)
5. ตรวจสอบผลการเจริญเติบโตด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง และการหาปริมาณเซลล์แห้ง ทำการตรวจสอบทุก 3 วัน เพื่อหาการเข้าสู่ระยะคงที่ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ และทำการวิเคราะห์ผลที่ได้

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เป็นการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย

### 3.6 การหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

- 3.6.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ
1. ชั่งธาตุอาหารปริมาณต่างๆ ตามสูตรอาหาร BG-11 ในภาคผนวก ก-1 โดยมีความเข้มข้น  $\text{NaNO}_3$  เป็น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 กรัม/ลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น
  2. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร
  3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่า pH 6.9
  4. บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และปิดด้วยจุกสำลี
  5. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
  6. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และเก็บไว้ในที่สะอาด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป
- 3.6.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อหาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต
1. นำฟลาสก์อาหารเหลวที่เตรียมได้ และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เข้าตู้ถ่ายเชื้อ เปิดแสง UV เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน
  2. นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายที่มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ  $\times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรมีค่า 0.3-0.6 เติมลงในอาหารเหลว BG-11 ที่มี  $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
  3. เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า 110 รอบ/นาที ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส)
  4. ตรวจสอบผลการเจริญเติบโตด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง และการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการตรวจสอบทุก 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน (11 ครั้ง) และทำการวิเคราะห์ผลที่ได้

### 3.7 การหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

- 3.7.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11 ที่มีกลูโคส ความเข้มข้นต่างๆ
1. ชั่งธาตุอาหารปริมาณต่างๆ ตามสูตรอาหาร BG-11 ในภาคผนวก ก-1 ใส่ลงในน้ำกลั่น และเพิ่มกลูโคสที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร
  2. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร
  3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่า pH 6.9

4. บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และปิดด้วยจุกสำลี
5. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และเก็บไว้ในที่สะอาด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.7.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

1. นำพลาสติกอาหารเหลวที่เตรียมได้ และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เข้าสู่ตู้ถ่ายเชื้อ เปิดแสง UV เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน
2. นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายที่มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ  $\times 10^6$  เซลล์/ มิลลิลิตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรมีค่า 0.3-0.6 เติมลงในอาหารเหลว BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่า 110 รอบ/นาที ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส)
4. ตรวจสอบผลการเจริญเติบโตด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดในอาหารด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก ทำการตรวจสอบทุก 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน (8 ครั้ง) และทำการวิเคราะห์ผลที่ได้

## 3.8 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยง

### 3.8.1 การเตรียมอาหารเหลว BG-11

1. ชั่งธาตุอาหารปริมาณต่างๆ ตามสูตรอาหาร BG-11 ในภาคผนวก ก-1
2. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่า pH 6.9
4. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และเก็บไว้ในที่สะอาด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.8.2 การเพาะเลี้ยงในขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร (ปริมาตรอาหาร 4,000 มิลลิลิตร)

1. เตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 3.4
2. นำขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง อาหารเหลวที่เตรียมได้ และอุปกรณ์ที่ต้องใช้ เข้าสู่ตู้ถ่ายเชื้อ เปิดแสง UV เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน (การฆ่าเชื้อขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร แสดงในภาคผนวก ง-3)

3. นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายที่มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ  $\times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรมีค่า 0.3-0.6 เติมนลงในอาหารเหลว BG-11 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.1 ปริมาณ 10% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) อัตราการให้อากาศ 1,500 มิลลิลิตร/นาที่
5. ตรวจสอบผลการเจริญเติบโตด้วยการนับเซลล์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซลและทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันต่อไป

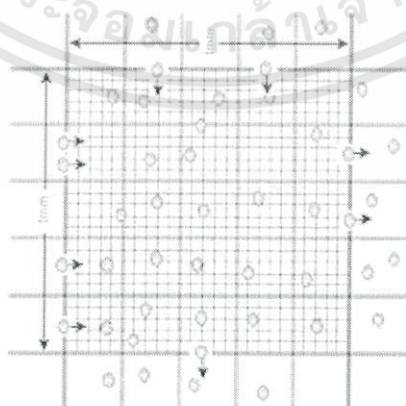
### 3.9 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและปริมาณไขมันของสาหร่าย

#### 3.9.1 วิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยใช้สไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)

1. หยดตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการนับลงบนสไลด์ 1 หยด ในช่องสี่เหลี่ยม (load port) ของสไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ที่มีกระจกปิดสไลด์ปิดอยู่
2. วางสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เซลล์สาหร่ายจมลงสู่พื้นสไลด์
3. วางสไลด์บนแท่นวางสไลด์ของกล้องจุลทรรศน์ ปรับกล้องโดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำสุดไปกำลังขยายที่สูงขึ้น
4. นับจำนวนเซลล์สาหร่ายในแต่ละช่องเล็ก หรือนับช่องใหญ่แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับและนำไปคูณด้วย  $2.5 \times 10^5$  จะได้ปริมาณเซลล์/มิลลิลิตร

หมายเหตุ ถ้าสาหร่ายทับเส้นให้เลือนับด้านใดด้านหนึ่ง ดังนี้

- นับด้านเส้นแนวบน และเส้นแนวขวา ไม่นับด้านเส้นแนวล่าง และเส้นแนวซ้าย
- นับด้านเส้นแนวล่าง และเส้นแนวซ้าย ไม่นับด้านเส้นแนวบน และเส้นแนวขวา



รูปที่ 3.1 แสดงการนับเซลล์ที่ทับเส้นของสไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์

(ที่มา: [http://site.iugaza.edu.ps/mwhindi/files/Lab5\\_Monitoring-algal-populations.pdf](http://site.iugaza.edu.ps/mwhindi/files/Lab5_Monitoring-algal-populations.pdf))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



### 3.9.2 วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD)

1. ใส่ตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการวัดลงในคิวเวต
2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

### 3.9.3 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

1. นำหลอดเซนตริฟิวส์ขนาดเล็ก (eppendorf) อบในตู้อบลมร้อน 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง
2. ชั่งน้ำหนักหลอดด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกน้ำหนักที่ได้
3. เก็บตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง mini centrifuges (spin down) เป็นเวลา 10 นาที
4. เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยง เพื่อล้างเซลล์
5. นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. นำหลอดที่อบแห้งใส่ในเดซิเคเตอร์ ให้เย็นลง ประมาณ 1 ชั่วโมง
7. ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักที่ได้ และรายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (กรัม/ลิตร)

### 3.9.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-Sulfuric method) (ดัดแปลงจาก Albalasmeh และคณะ, 2013)

1. นำสารละลายอาหาร BG-11 ที่เลี้ยงสาหร่าย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลายฟีนอล 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. ค่อยๆ เติมน้ำตาลละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ และคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล

### 3.9.5 ตรวจสอบปริมาณไขมันที่มีในเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีไนล์เรด (เวินา และคณะ, 2557)

1. เก็บตัวอย่างสาหร่ายจากทุกๆ ฟลasks ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง mini centrifuges (spin down) เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
2. นำส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนมาเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
3. ย้อมด้วยสีไนล์เรด (Nile Red) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
4. นำไปตรวจปริมาณไขมันด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ถ้ามีไขมันจะเห็นการเรืองแสงสีเหลือง

### 3.10 การสกัดและทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

#### 3.10.1 การสกัดไขมันจากสาหร่าย (ดัดแปลงจาก Ahmad และคณะ, 2013)

1. เซลล์สาหร่ายแห้ง น้ำหนัก 0.3 กรัม ผสมกับคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 22.72:45.45 มิลลิลิตร นำไป sonicated เป็นเวลา 25 นาที
2. ผสมบนเครื่องคนสาร (magnetic stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.5 นำกากที่กรองได้ไปสกัดซ้ำอีกครั้ง
4. นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตัวอย่างไขมันแห้งที่ได้ และเก็บไว้ทรานเอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป

#### 3.10.2 ทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไขมัน (Ahmad และคณะ, 2013)

1. ชั่งน้ำหนักไขมัน 10 มิลลิกรัม ละลายในเฮกเซน 2 มิลลิลิตร และเติม 200 ไมโครลิตร ของ 2 M methanolic KOH (ตัวเร่งปฏิกิริยา)
2. ผสมด้วย vortex เป็นเวลา 2-5 นาที และตามด้วยการปั่นเหวี่ยงสั้นๆ เก็บชั้นบนของเฮกเซนไว้วิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) ต่อไป

### 3.11 การศึกษาปริมาณและชนิดของกรดไขมัน

นำเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์ของสาหร่ายโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) (Shimadzu GC-2014, Japan) ที่ประกอบด้วยดีเทคเตอร์ FID (flame ionization detector) และคอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m) (J&W 122-7032) สภาวะของการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3.1 การเทียบดูชนิดของกรดไขมันโดยใช้กราฟมาตรฐาน FAME ของ David และคณะ, (2005) (รูปที่ ข.40) (ภาคผนวก ข-5) และใช้กรดไขมันโอเลอิก (Oleic Acid (Ph. Eur.) pure, pharma grade) ที่ความเข้มข้น 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% (วิธีเตรียมในภาคผนวก ก-5) เป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาปริมาณของกรดไขมัน (ภาคผนวก ข-5)

### ตารางที่ 3.1 สภาวะการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME)

Inlet temperature	250 <sup>o</sup> C
Injection volume	1 $\mu$ l
Split ratio	1/50
Carrier gas	Hydrogen
Head pressure	53 kPa constant pressure (36 cm/s at 50 <sup>o</sup> C)
Oven temperature	50 <sup>o</sup> C, 1 min, 25 <sup>o</sup> C/min to 200 <sup>o</sup> C, 3 <sup>o</sup> C/min to 230 <sup>o</sup> C, 18 min.
Detector temperature	280 <sup>o</sup> C
Detector gases	Hydrogen: 40 mL/min; Air: 450 mL/min; Helium make-up gas: 30 mL/min.

(ที่มา: David และคณะ, 2005)

### 3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เป็นการวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่ากลางระหว่างประชากรโดยการวิเคราะห์ผ่านค่าความแปรปรวน (Variance) เราเรียกว่า “Analysis of Variance “ หรือเรียกง่ายๆ ว่า ANOVA ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของประชากรได้พร้อมกันมากกว่า 2 ประชากร ซึ่งถ้าเราใช้ T-Test จะทำได้มากที่สุดแค่ 2 ประชากรเท่านั้น และวิเคราะห์ได้มากกว่า 1 ปัจจัย (Factor) ซึ่ง T-Test จะทำได้เพียงปัจจัยเดียวเท่านั้น ซึ่งในวิเคราะห์ค่าทางสถิติของผลการทดลองการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จะใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 วิธีการใช้งานโปรแกรมดังแสดงในภาคผนวก จ-1

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

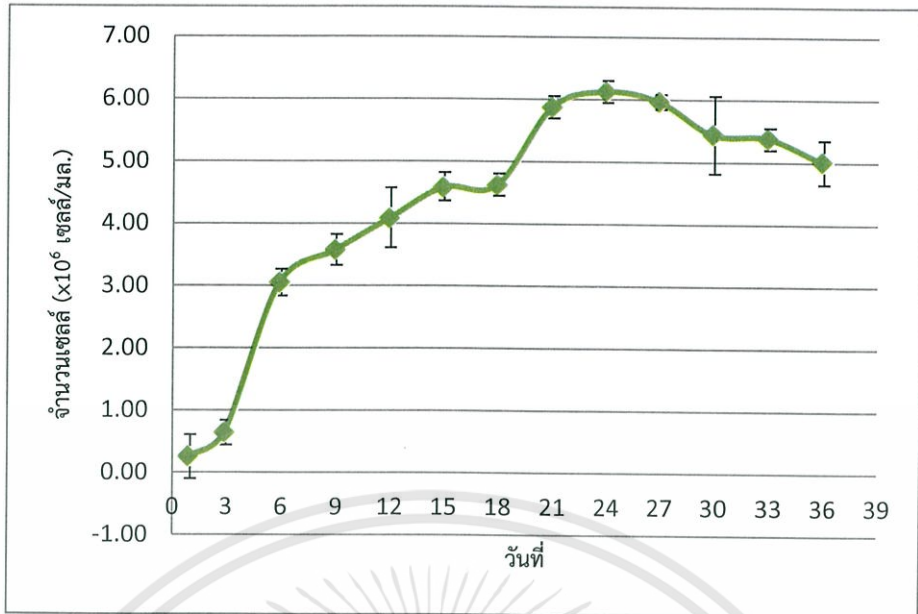
#### 4.1 ผลการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในอาหาร BG-11 ( $\text{NaNO}_3$  1.5 กรัม/ลิตร) เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโต ของสาหร่าย เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่าที่ 110 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน วัดการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าที่ได้ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญดังรูปที่ 4.1-4.3

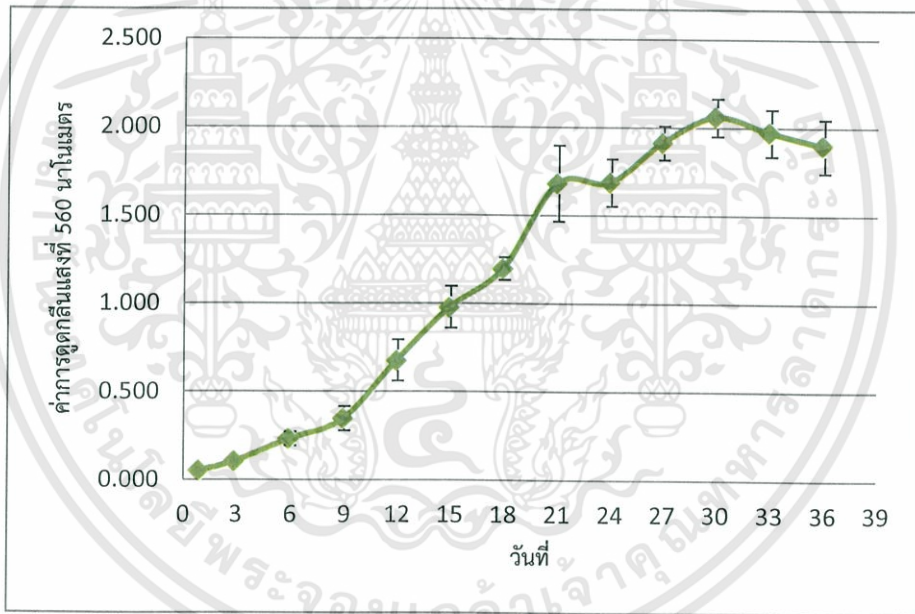
ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

วันที่/ครั้งที่	การวัดการเจริญ		
	จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)	OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1/1	0.25 $\pm$ 0.35	0.050 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
3/2	0.64 $\pm$ 0.19	0.104 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.07
6/3	3.05 $\pm$ 0.21	0.232 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.07
9/4	3.58 $\pm$ 0.24	0.347 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.14
12/5	4.09 $\pm$ 0.48	0.678 $\pm$ 0.12	1.20 $\pm$ 0.42
15/6	4.59 $\pm$ 0.22	0.979 $\pm$ 0.12	1.70 $\pm$ 0.00
18/7	4.63 $\pm$ 0.17	1.199 $\pm$ 0.06	2.10 $\pm$ 0.14
21/8	5.88 $\pm$ 0.17	1.682 $\pm$ 0.21	2.35 $\pm$ 0.21
24/9	6.13 $\pm$ 0.17	1.687 $\pm$ 0.13	2.20 $\pm$ 0.35
27/10	5.97 $\pm$ 0.12	1.913 $\pm$ 0.10	2.60 $\pm$ 0.07
30/11	5.44 $\pm$ 0.62	2.059 $\pm$ 0.11	2.30 $\pm$ 0.56
33/12	5.38 $\pm$ 0.17	1.971 $\pm$ 0.13	2.20 $\pm$ 0.28
36/13	5.00 $\pm$ 0.35	1.896 $\pm$ 0.15	1.90 $\pm$ 0.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

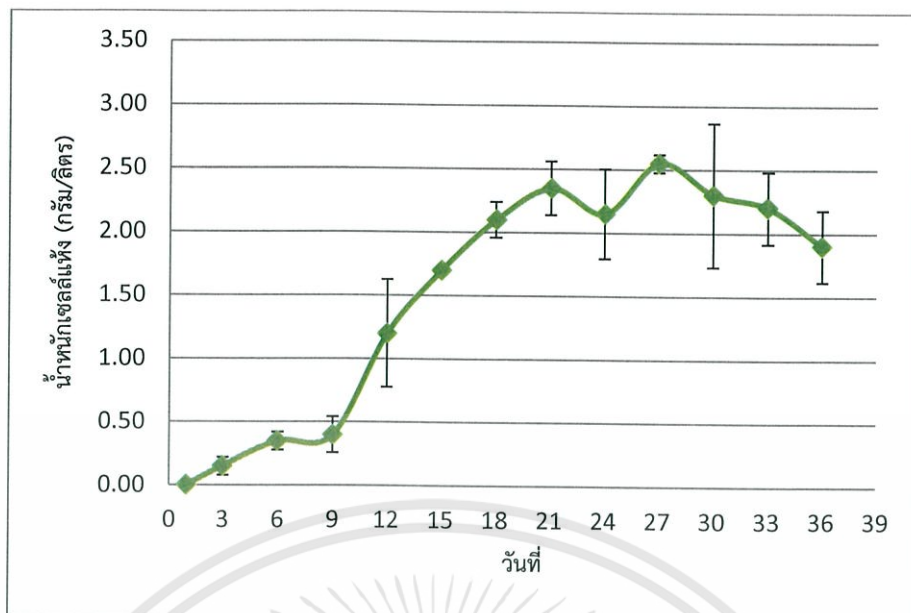


รูปที่ 4.1 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*



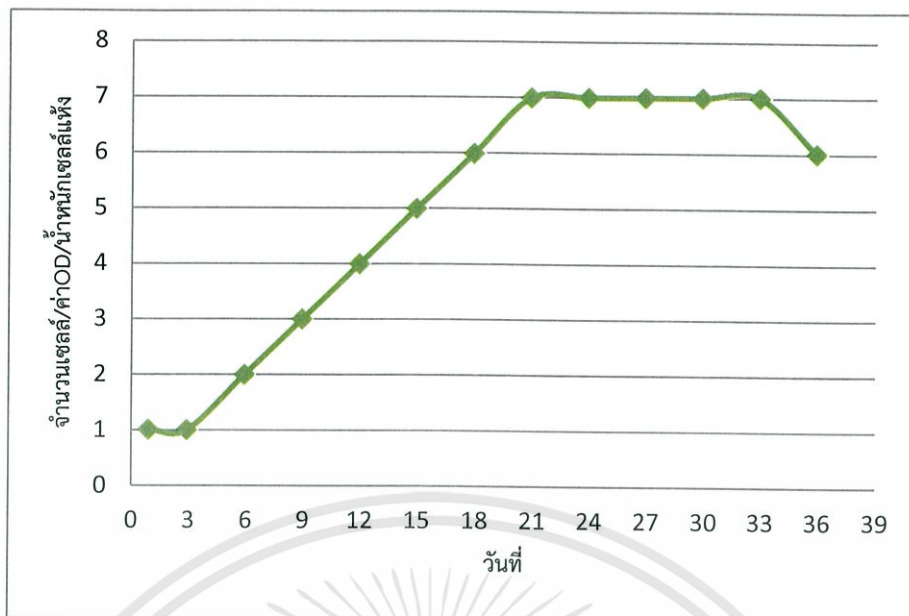
รูปที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการนับจำนวนเซลล์ (เซลล์/มล.) การวัดความหนาแน่นโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (optical density measurement, OD) และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากสามารถทำได้อย่างรวดเร็วและสะดวกในการวัด ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป การกระทำทั้งสามวิธีจึงเป็นผลดีที่จะได้ค่าที่มีความแม่นยำยิ่งขึ้น และจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เพื่อวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร BG-11 โดยใช้การวัดการเจริญทั้งสามวิธี พบว่าสาหร่ายมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มคงที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $5.88 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่วันที่ 21 มีค่าการดูดกลืนแสง 1.682 และหาน้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 1 ถึงวันที่ 9 เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และเพิ่มสูงขึ้นหลังจากวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง และเริ่มคงที่ในวันที่ 21 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.35 กรัม/ลิตร หลังจากวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตที่ลดลง และมีอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) เท่ากับ 0.0453 ต่อวัน (รูปที่ ข.1) (ภาคผนวก ข) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณเซลล์มากที่สุดแต่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน เมื่อเทียบกับ *Ankistrodesmus* sp. W53 และ *Chlorella vulgaris* ที่เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และ *Chlorella* sp. ED54 เข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เข้าสู่ระยะคงที่ช้ากว่าสายพันธุ์อื่น อาจเนื่องจากการใช้สารอาหารในการเจริญน้อยหรือสูตรอาหาร BG-11 ไม่เหมาะต่อการเจริญจึงทำให้ระยะเวลาที่เข้าสู่ระยะคงที่นานกว่าสายพันธุ์อื่น (วีณา และคณะ, 2557)



รูปที่ 4.4 แบบจำลองระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

จากผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโต จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นในรูปที่ 4.1-4.3 สามารถนำมาสร้างแบบจำลองระยะการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ดังรูปที่ 4.4 จากรูปในช่วงของ 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะอยู่ในช่วงของการปรับตัว (lag phase) ให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อม จึงมีการเพิ่มจำนวนเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นสาหร่ายจะเข้าสู่ระยะการแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) เพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมีจำนวนเซลล์มากที่สุด และจะเริ่มคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง อาจเนื่องมาจากสารอาหารเริ่มน้อยลง ทำให้การเจริญเติบโตช้าขึ้น และมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย และหลังจากนั้นสาหร่ายจะเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) ซึ่งอาจเป็นผลจากสารอาหารที่หมดลงและของเสียที่สาหร่ายสร้างขึ้นไปยับยั้งการเจริญเติบโต

#### 4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน

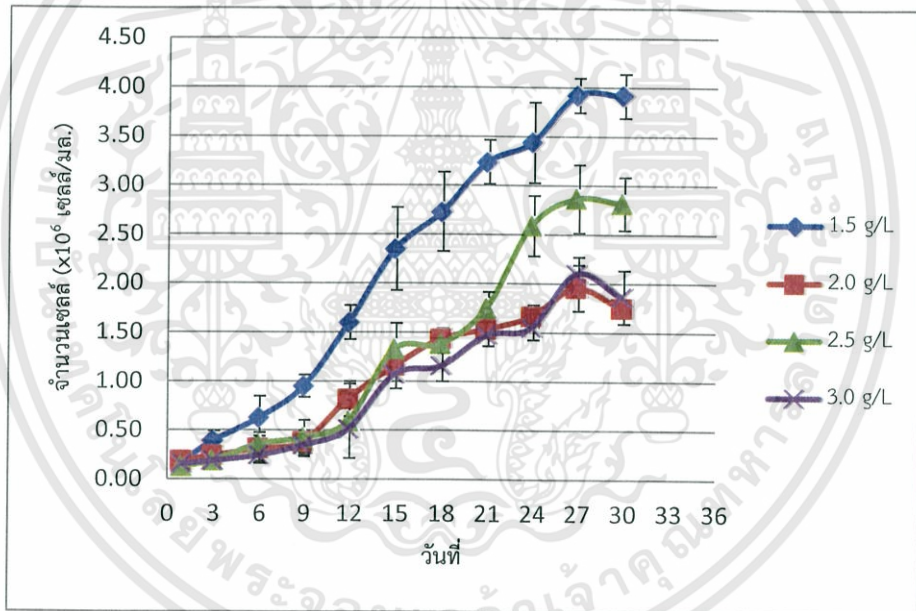
ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ต่างกัน คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร ภายใต้สภาวะเขย่า 110 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน รวม 11 ครั้ง วัดการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสง และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลที่ได้จากการวัดการเจริญเติบโต ดังแสดงในตารางที่ 4.2 นำค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จากตารางที่ 4.2 ไปสร้างกราฟการเจริญดังรูปที่ 4.5-4.7

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่แตกต่างกัน

วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้น NaNO <sub>3</sub> (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ		
		จำนวนเซลล์ × 10 <sup>6</sup> (เซลล์/มล.)	OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1/1	1.5	0.16±0.03	0.052±0.00	0.23±0.05
	2.0	0.19±0.01	0.049±0.00	0.28±0.10
	2.5	0.13±0.04	0.054±0.00	0.23±0.10
	3.0	0.16±0.01	0.061±0.01	0.23±0.10
3/2	1.5	0.39±0.10	0.101±0.02	0.33±0.05
	2.0	0.24±0.09	0.076±0.00	0.40±0.08
	2.5	0.19±0.05	0.081±0.02	0.25±0.13
	3.0	0.19±0.03	0.070±0.02	0.28±0.13
6/3	1.5	0.63±0.22	0.161±0.08	0.40±0.14
	2.0	0.31±0.13	0.104±0.00	0.40±0.08
	2.5	0.36±0.12	0.148±0.07	0.38±0.15
	3.0	0.24±0.08	0.094±0.03	0.35±0.13
9/4	1.5	0.95±0.12	0.203±0.16	0.30±0.08
	2.0	0.38±0.11	0.145±0.03	0.23±0.10
	2.5	0.43±0.18	0.195±0.08	0.28±0.10
	3.0	0.35±0.12	0.112±0.04	0.20±0.12
12/5	1.5	1.60±0.17	0.526±0.26	0.43±0.17
	2.0	0.82±0.18	0.291±0.14	0.20±0.08
	2.5	0.59±0.23	0.471±0.25	0.35±0.13
	3.0	0.51±0.17	0.166±0.08	0.20±0.08
15/6	1.5	2.35±0.42	0.913±0.23	0.45±0.24
	2.0	1.16±0.17	0.379±0.19	0.28±0.13
	2.5	1.33±0.26	0.730±0.13	0.35±0.13
	3.0	1.08±0.15	0.357±0.20	0.40±0.08
18/7	1.5	2.73±0.40	1.177±0.16	0.58±0.36
	2.0	1.44±0.10	0.686±0.24	0.43±0.10
	2.5	1.39±0.09	0.828±0.09	0.45±0.10
	3.0	1.16±0.17	0.745±0.10	0.50±0.08
21/8	1.5	3.24±0.23	1.238±0.10	1.05±0.19
	2.0	1.54±0.03	0.952±0.12	0.75±0.19
	2.5	1.75±0.16	1.030±0.09	1.00±0.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

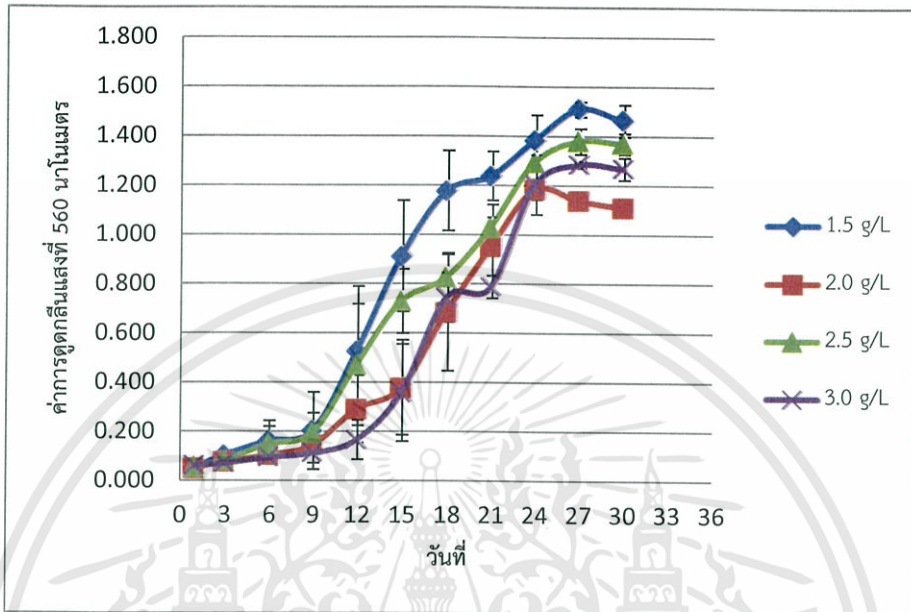
	3.0	1.48±0.12	0.788±0.05	0.90±0.08
24/9	1.5	3.44±0.41	1.382±0.10	1.05±0.06
	2.0	1.67±0.11	1.184±0.04	0.80±0.12
	2.5	2.59±0.31	1.292±0.11	0.90±0.08
	3.0	1.55±0.13	1.203±0.12	1.03±0.09
27/10	1.5	3.92±0.17	1.509±0.03	1.03±0.05
	2.0	1.96±0.23	1.139±0.04	0.08±0.08
	2.5	2.87±0.35	1.379±0.05	0.70±0.12
	3.0	2.10±0.17	1.284±0.01	0.80±0.08
30/11	1.5	3.91±0.23	1.462±0.07	0.98±0.10
	2.0	1.75±0.06	1.110±0.02	0.80±0.08
	2.5	2.82±0.27	1.369±0.04	0.68±0.10
	3.0	1.86±0.27	1.267±0.04	0.73±0.10



รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน

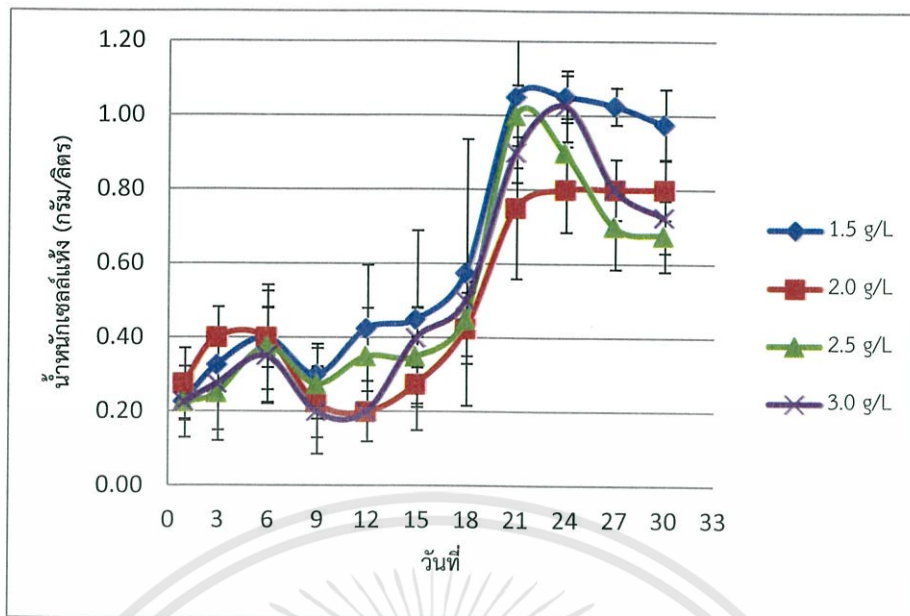
การนับจำนวนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท (NaNO<sub>3</sub>) ที่แตกต่างกัน คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร ได้ผลดังตารางที่ 4.2 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างจำนวนเซลล์และระยะเวลาการเจริญ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าจำนวนเซลล์ในสามวันแรกของการเพาะเลี้ยงมีจำนวนใกล้เคียงกัน และในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร และมี

จำนวนเซลล์เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 27 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ  $3.92 \times 10^6$  เซลล์/มล. และเมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 11 ครั้ง (30 วัน) พบว่าจำนวนเซลล์ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีจำนวนเซลล์มากที่สุด



รูปที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน

การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร ได้ค่าดังตารางที่ 4.2 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและระยะเวลาการเจริญ ดังรูปที่ 4.6 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 1 ถึงวันที่ 9 มีค่าใกล้เคียงกันในทุกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท และในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่าความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทอื่นๆ รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 2.5, 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง (30 วัน) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด



รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน

วัดการเจริญโดยหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร ได้ผลดังตารางที่ 4.2 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและระยะเวลาการเจริญ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงในทุกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท โดยความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทที่ 1.5 กรัม/ลิตร มีค่ามากที่สุด คือเท่ากับ 1.05 กรัม/ลิตร และเมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 11 ครั้ง (30 วัน) พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) เท่ากับ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร เพื่อศึกษาความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย พบว่าที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากธาตุอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งธาตุไนโตรเจนเป็นสารอาหารชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งหากเพิ่มธาตุไนโตรเจนจะสามารถส่งเสริมให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นได้ ในทางตรงกันข้ามเมื่อลดธาตุไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงลงจะทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำลง แต่จะสามารถเพิ่มการสะสมไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายได้เช่นกัน และจากการทดลองเพิ่มธาตุอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนนั่นคือ โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการเพิ่มโซเดียมไนเตรทให้สูงขึ้น ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตให้สาหร่ายมีจำนวนเซลล์ที่มากขึ้นได้ อาจเนื่องมาจากสัดส่วนของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งมักถูกใช้เป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยง โดยหากสัดส่วนระหว่างธาตุดังกล่าวสูงเกินไป แสดงว่าปริมาณของฟอสฟอรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไป และในทางตรงกันข้าม หากสัดส่วนมีค่าต่ำเกินไป ควรเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (นุชนาถ, 2557) อีกเหตุผลที่เป็นไปได้คือสาหร่ายเติบโตอย่างรวดเร็วกับไนโตรเจนที่อุดมสมบูรณ์ซึ่งฟอสฟอรัสเริ่มหมดลงและทำให้อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสไม่สมดุลกัน (Kolber และคณะ, 1988) ในการเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจน อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและจะลดลง แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่สูงจะยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตได้ (Wang และคณะ, 2010 และ Yin และคณะ, 2008) ดังนั้นอัตราส่วนของสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงมีความสำคัญในการเพิ่มชีวมวลของสาหร่าย รวมถึงการสะสมไขมันของสาหร่ายด้วยเช่นกัน

จากผลการนับจำนวนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ต่างกัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ (ตารางที่ ข.2) (ภาคผนวก ข) นำค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในแต่ละซ้ำมาหาอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{\text{max}}$ ) (รูปที่ ข.2-ข.17) (ภาคผนวก ข) แสดงผลดังตารางที่ 4.3 และนำไปหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.3 อัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{\text{max}}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทต่างกัน

ความเข้มข้น $\text{NaNO}_3$ (กรัม/ลิตร)	ซ้ำที่	อัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{\text{max}}$ ) (ต่อวัน)
1.5	1	0.1438
	2	0.1224
	3	0.1542
	4	0.1157
	เฉลี่ย	$0.1340 \pm 0.02^a$
2.0	1	0.1107
	2	0.1092
	3	0.0803
	4	0.0924
	เฉลี่ย	$0.0982 \pm 0.01^b$
2.5	1	0.1136
	2	0.1353
	3	0.1163
	4	0.0965
	เฉลี่ย	$0.1154 \pm 0.02^{ab}$

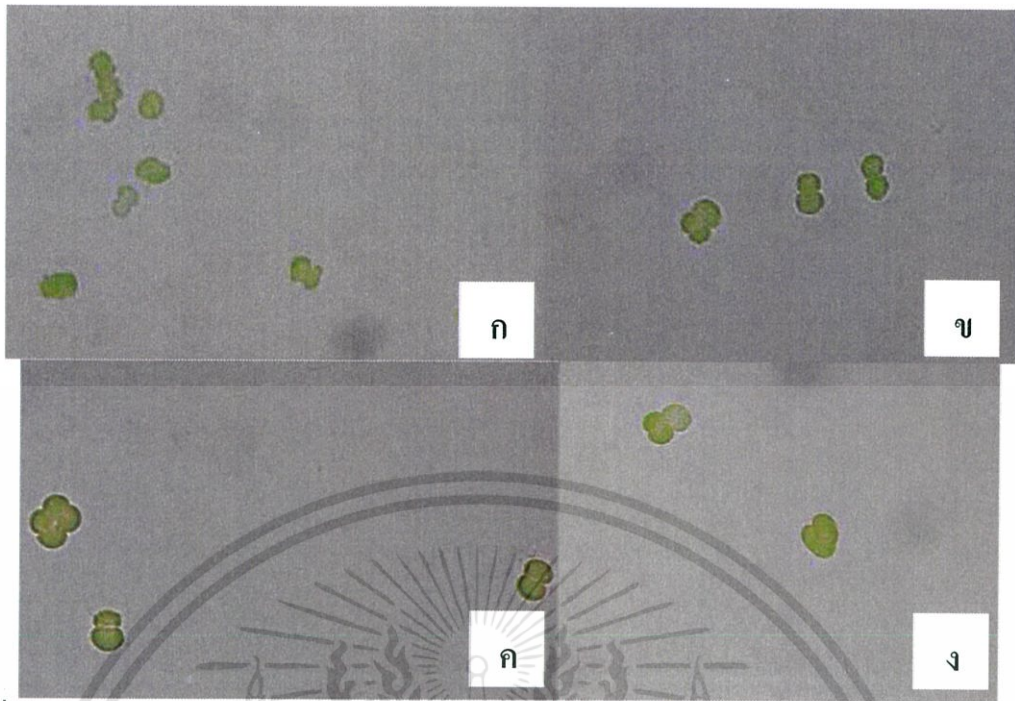
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.0	1	0.1086
	2	0.1061
	3	0.0514
	4	0.0842
	เฉลี่ย	0.0876±0.02 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: a,b หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ซึ่งมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยเป็น 0.1340 ต่อวัน รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 2.5, 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยเป็น 0.1154, 0.0982 และ 0.0876 ต่อวัน ตามลำดับ และเมื่อนำไปหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ ค.1) (ภาคผนวก ค) พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราการเจริญจำเพาะที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.0 และ 3.0 กรัม/ลิตร และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัม/ลิตร ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร จึงมีความเหมาะสมที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย

นอกจากนี้ในการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร พบว่าเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร มีลักษณะรูปร่างกลมรี เป็นกลุ่มเซลล์เกาะติดกัน 2 เซลล์ และ 4 เซลล์ แต่ที่ความเข้มข้น 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร พบกลุ่มเซลล์เกาะติดกัน 2 เซลล์และพบที่เป็น 4 เซลล์จำนวนน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทที่สูงเกินไป ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 เซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ (Nikon ECLIPSE Ci) กำลังขยาย 40X ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทต่างกัน คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ)

#### 4.3 ผลของความเข้มข้นกลูโคสที่แตกต่างกัน

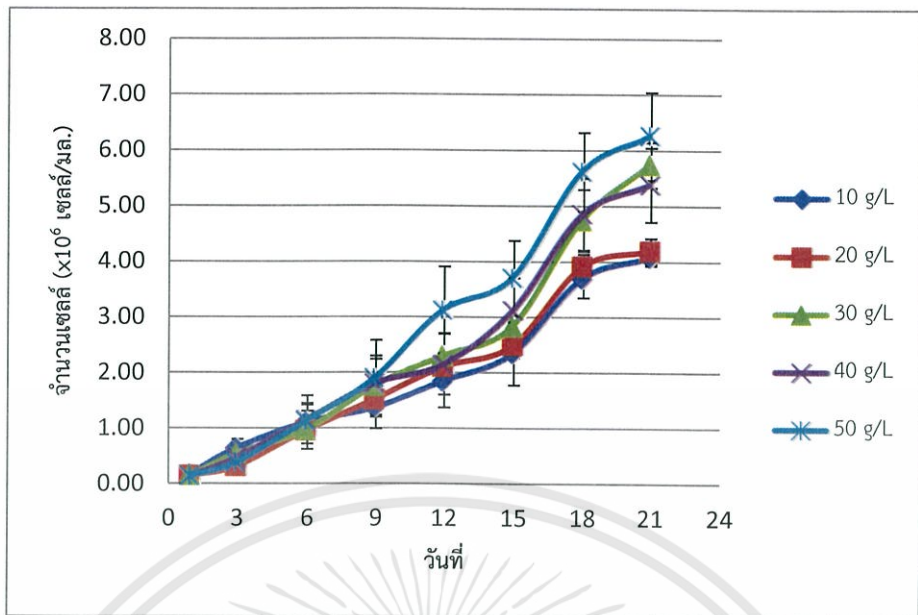
ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่ คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร ภายใต้สภาวะเขย่า 110 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างสาหร่ายทุก 3 วัน รวม 8 ครั้ง วัดการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลที่ได้ดังตารางที่ 4.4 นำค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ไปสร้างกราฟการเจริญดังรูปที่ 4.9-4.11

ตารางที่ 4.4 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน

วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ		
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)	OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1/1	10	0.16 $\pm$ 0.05	0.048 $\pm$ 0.00	0.28 $\pm$ 0.05
	20	0.14 $\pm$ 0.02	0.049 $\pm$ 0.00	0.28 $\pm$ 0.05
	30	0.14 $\pm$ 0.03	0.048 $\pm$ 0.00	0.18 $\pm$ 0.10

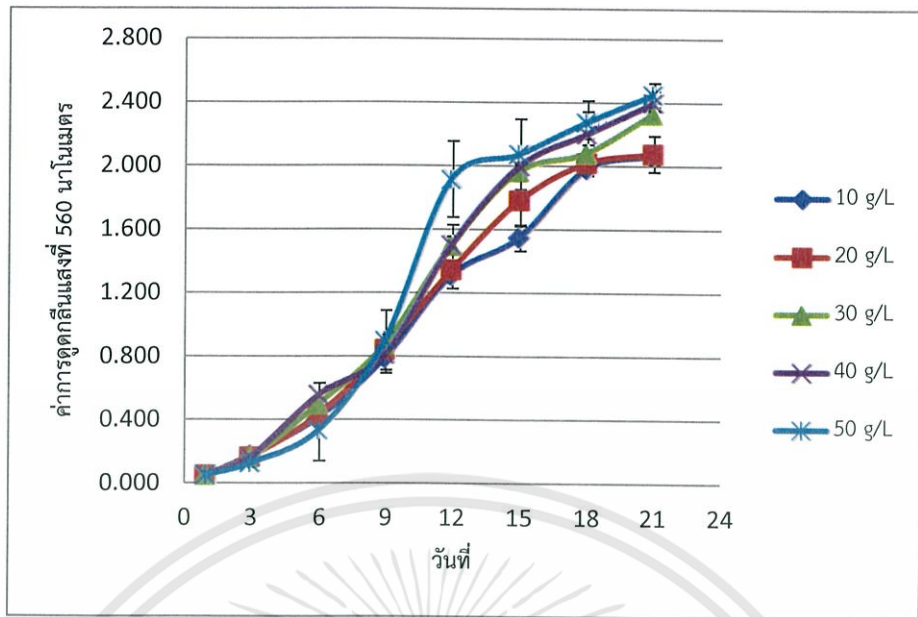
	40	0.14±0.03	0.051±0.00	0.23±0.05
	50	0.14±0.03	0.050±0.00	0.15±0.06
3/2	10	0.64±0.16	0.174±0.01	0.38±0.10
	20	0.31±0.15	0.165±0.04	0.33±0.10
	30	0.54±0.18	0.162±0.00	0.33±0.10
	40	0.47±0.23	0.164±0.00	0.25±0.06
	50	0.38±0.15	0.126±0.03	0.33±0.10
6/3	10	1.11±0.31	0.416±0.04	0.25±0.06
	20	0.96±0.34	0.433±0.03	0.33±0.10
	30	0.98±0.17	0.499±0.02	0.45±0.13
	40	1.15±0.43	0.557±0.07	0.55±0.10
	50	1.13±0.31	0.334±0.19	0.33±0.10
9/4	10	1.38±0.38	0.792±0.03	0.73±0.25
	20	1.53±0.33	0.845±0.02	0.88±0.19
	30	1.77±0.47	0.875±0.03	1.05±0.17
	40	1.81±0.48	0.813±0.12	0.70±0.22
	50	1.91±0.67	0.900±0.19	1.08±0.39
12/5	10	1.85±0.48	1.311±0.08	1.15±0.15
	20	2.11±0.18	1.347±0.03	1.13±0.15
	30	2.31±0.40	1.500±0.06	1.40±0.43
	40	2.15±0.55	1.503±0.13	1.33±0.44
	50	3.13±0.78	1.916±0.24	1.28±0.30
15/6	10	2.34±0.57	1.547±0.08	1.25±0.17
	20	2.49±0.23	1.784±0.16	1.30±0.26
	30	2.83±0.20	1.965±0.06	2.05±0.19
	40	3.12±0.58	1.998±0.01	2.18±0.31
	50	3.70±0.67	2.073±0.22	1.98±0.05
18/7	10	3.69±0.34	1.981±0.04	1.45±0.31
	20	3.91±0.22	2.020±0.02	1.65±0.13
	30	4.74±0.56	2.080±0.09	2.40±0.18
	40	4.85±0.64	2.201±0.14	2.40±0.42
	50	5.61±0.70	2.273±0.14	2.75±0.30
21/8	10	4.07±0.14	2.065±0.05	1.50±0.18
	20	4.19±0.22	2.078±0.11	1.65±0.19
	30	5.74±0.41	2.326±0.02	2.53±0.15
	40	5.38±0.67	2.396±0.08	2.68±0.33
	50	6.26±0.79	2.448±0.08	2.93±0.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



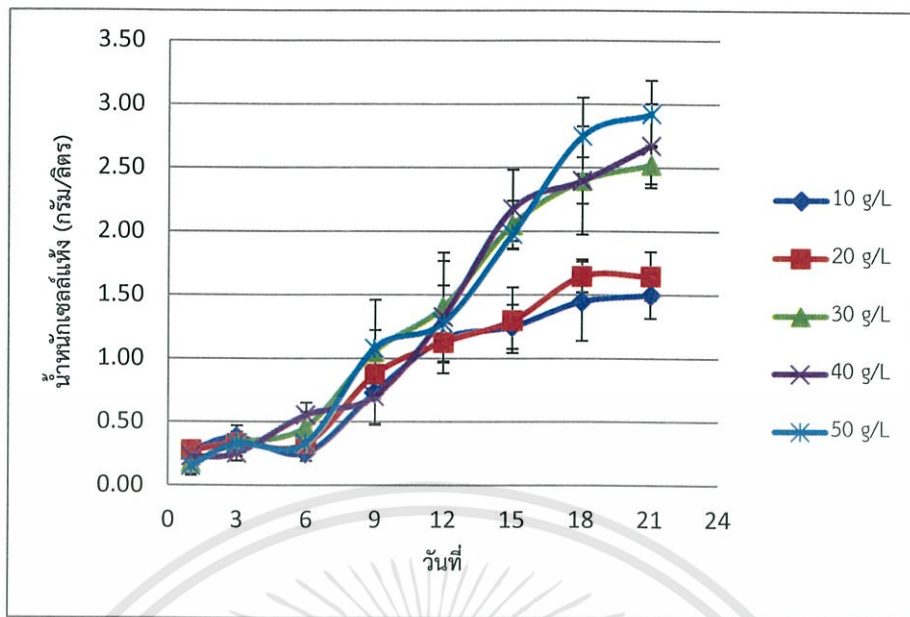
รูปที่ 4.9 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน

การนับจำนวนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 4.4 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างจำนวนเซลล์และระยะเวลาการเจริญ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าจำนวนเซลล์ที่ได้จากความเข้มข้นกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 9 มีค่าไม่แตกต่างกัน มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง และหลังจากวันที่ 9 จำนวนเซลล์ที่นับได้จากความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร มีจำนวนเซลล์มากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด และเจริญเติบโตสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยงจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ ซึ่งเมื่อนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงพบว่ามีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 8 ครั้ง (21 วัน) พบว่าจำนวนเซลล์ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร มีจำนวนเซลล์มากที่สุด



รูปที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน

การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีการเพิ่มกลูโคสความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร ได้ค่าดังตารางที่ 4.4 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและระยะเวลาการเจริญ ดังรูปที่ 4.10 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 1 ถึงวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงมีค่าใกล้เคียงกันมาก และหลังจากวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงค่าการดูดกลืนแสงเริ่มแสดงค่าที่ต่างกันมากขึ้น สาหร่ายเริ่มมีสีเขียวมากขึ้นหลังจากเลี้ยงได้ 12 วัน และมีสีเขียวเข้มในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง และเริ่มคงที่ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากการวัดค่าในวันที่ 21 นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงจากทุกความเข้มข้นของกลูโคสไปหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 8 ครั้ง (21 วัน) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร มีค่ามากที่สุด



รูปที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน

การหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 4.4 นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและระยะเวลาการเจริญ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากความเข้มข้นกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 มีค่าใกล้เคียงกันมาก และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร มีค่ามากที่สุด และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่ความเข้มข้นกลูโคส 40, 30, 20 และ 10 กรัม/ลิตร มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงตามลำดับ เมื่อนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้งไปหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 8 ครั้ง (21 วัน) พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร มีค่ามากที่สุด

จากผลการนับจำนวนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) ต่างกัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ (ตารางที่ ข.3) (ภาคผนวก ข) นำค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในแต่ละซ้ำมาหาอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) (รูปที่ ข.18-ข.37) (ภาคผนวก ข) แสดงผลดังตารางที่ 4.5 และนำไปหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.5 อัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคสต่างกัน

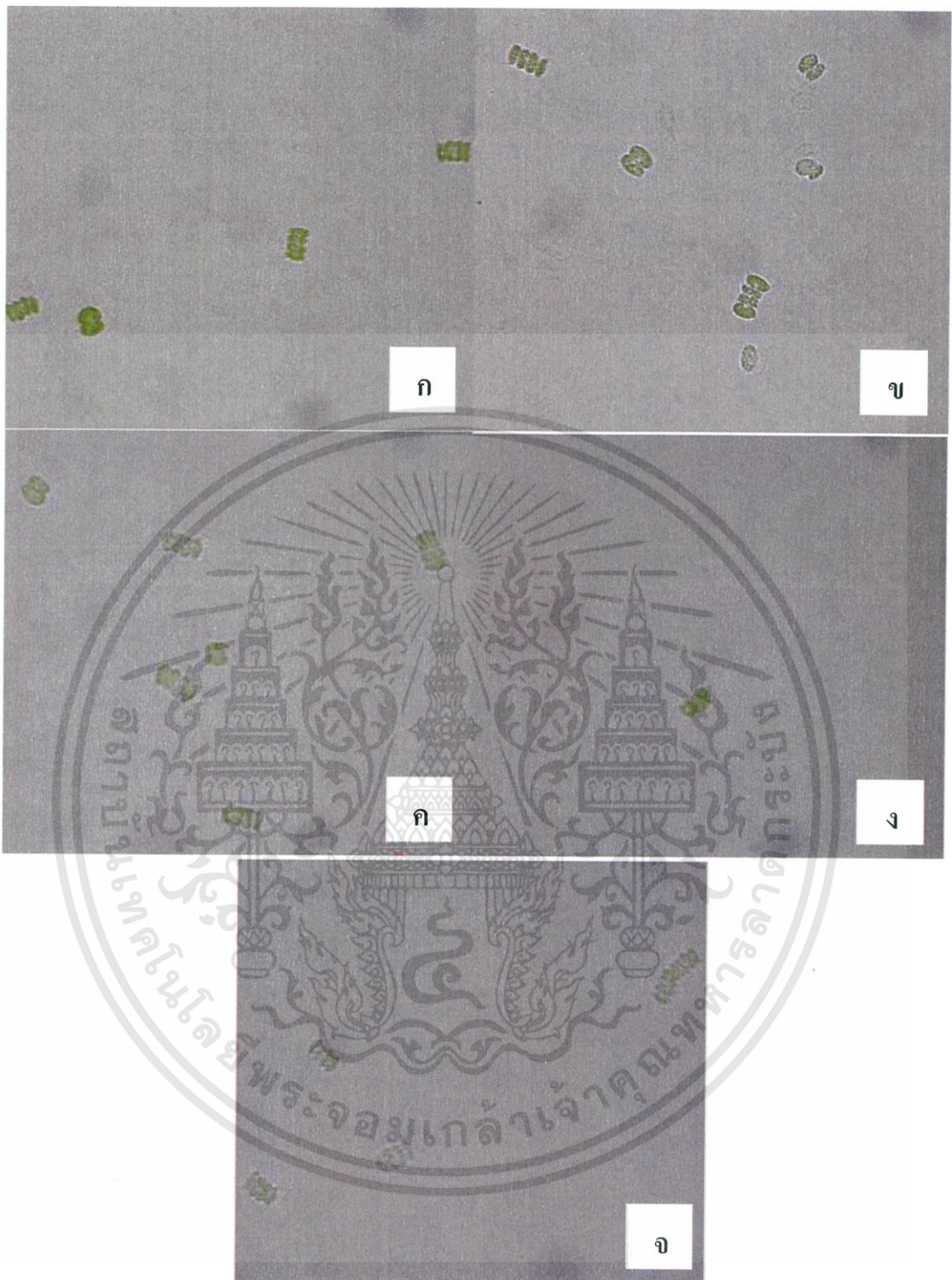
ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ซ้ำที่	อัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) (ต่อวัน)
10	1	0.0946
	2	0.1158
	3	0.1070
	4	0.1183
	เฉลี่ย	0.1089±0.01 <sup>b</sup>
20	1	0.0897
	2	0.1187
	3	0.1791
	4	0.1638
	เฉลี่ย	0.1378±0.04 <sup>ab</sup>
30	1	0.1531
	2	0.1425
	3	0.1495
	4	0.1088
	เฉลี่ย	0.1385±0.02 <sup>ab</sup>
40	1	0.1597
	2	0.1945
	3	0.1300
	4	0.1043
	เฉลี่ย	0.1471±0.04 <sup>ab</sup>
50	1	0.1884
	2	0.1971
	3	0.1457
	4	0.1495
	เฉลี่ย	0.1702±0.03 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: a,b หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยเท่ากับ 0.1702 ต่อวัน ซึ่งมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้นกลูโคส 40, 30, 20 และ 10 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยเท่ากับ 0.1471, 0.1385, 0.1378 และ 0.1089 ต่อวัน ตามลำดับ และเมื่อนำไปหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่

ระดับความเข้มข้นร้อยละ 95 (ตารางที่ ค.2) (ภาคผนวก ค) พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ความเข้มข้นกลูโคส 20, 30 และ 40 กรัม/ลิตร ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้เมื่อมีความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มชีวมวลให้สูงขึ้นได้

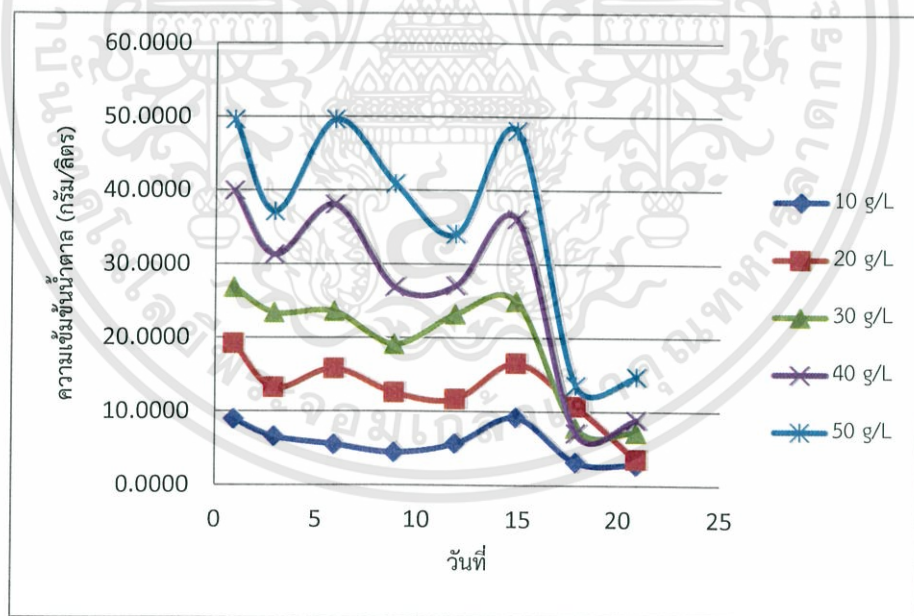
การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร พบว่าหลังจากวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะที่เปลี่ยนไป คือเซลล์ตายลง และมองไม่เห็นเป็นลักษณะของตัวเซลล์ จึงไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ อีกทั้งสาหร่ายมีสีเขียวที่อ่อนลง จากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลืองขุ่น ซึ่งอาจมีผลมาจากมีจุลินทรีย์เกิดขึ้นในฟลาस्कที่เพาะเลี้ยง เนื่องจากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่ายแล้ว ยังเป็นอาหารของจุลินทรีย์ในหลายๆ ชนิดอีกด้วย การเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส จึงจำเป็นต้องมีความปลอดภัยที่ตีมาก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อและป้องกันเซลล์ตาย การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายได้อย่างมาก ซึ่งจากการทดลองได้ชี้ให้เห็นแล้วว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีการเติมกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 เซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ (Nikon ECLIPSE Ci) กำลังขยาย 40X ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของกลูโคสต่างกัน คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง, จ ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก เป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่าง น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ โพลีแซ็กคาไรด์ และอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ รวมทั้งสารประกอบเมทิล เอสเทอร์ที่มีหมู่รีดิวซ์อิสระ ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณน้ำตาลที่ทำ ปฏิกิริยา ซึ่งสามารถหาความเข้มข้นของน้ำตาลได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ดังแสดงในภาคผนวก ข-3 ซึ่งจากการทดลองเพาะเลี้ยง สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร เพื่อศึกษาผลของการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่ง คาร์บอน เมื่อนำอาหารที่เพาะเลี้ยงมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหารเมื่อ จำนวนวันในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าปริมาณน้ำตาลในวันที่ 3 ของ การเพาะเลี้ยงมีปริมาณลดลง และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ โดยเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 18 ของการ เพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลมีค่าลดต่ำลงมาก ซึ่งผลจากการตรวจนับจำนวนเซลล์สาหร่ายพบว่ามี จำนวนเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายมีการนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโต และสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่มีการเติมกลูโคสเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี การเติมกลูโคส แต่ต้องระวังการใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่สูงเกินไป อาจมีผลไปยังการเจริญเติบโต ของสาหร่ายด้วยเช่นกัน

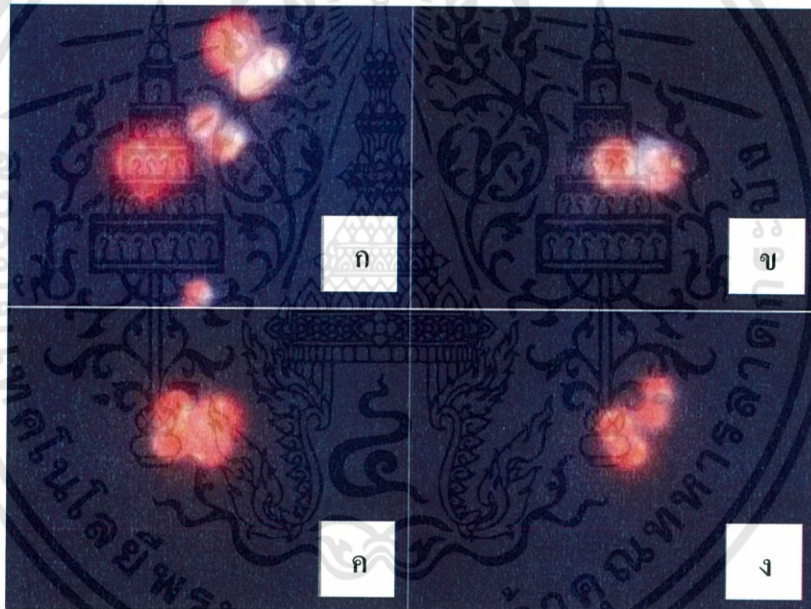


รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่กับความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

#### 4.4 ผลการตรวจสอบการสะสมไขมันที่มีในเซลล์ของสาหร่าย

จากการตรวจสอบปริมาณไขมันในเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยง ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) เท่ากับ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร นำเซลล์สาหร่ายไปตรวจสอบการสะสมไขมันที่มีในเซลล์สาหร่ายด้วยสีย้อมไนล์เรด (Nile red) จาก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบพบว่าทุกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท เริ่มเห็นการเรืองแสงของหอยดไขมันในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และมีหอยดไขมันเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่เพิ่มขึ้น และพบว่าจะมีหอยดไขมันหนาแน่นมากขึ้นในเซลล์เมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงตัวในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งการสะสมของไขมันจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง อาทิเช่น สารอาหาร สายพันธุ์ของสาหร่าย อุณหภูมิ แสงสว่าง เป็นต้น จากการเพาะเลี้ยงโดยเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมไนเตรทในอาหารให้มากขึ้น เพื่อส่งเสริมให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ซึ่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของสาหร่าย หากขาดไนโตรเจนสาหร่ายจะเจริญเติบโตน้อยลงและมีการสะสมไขมันมากขึ้น แต่จากการเพาะเลี้ยงพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่มากเกินไป จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้มีจำนวนเซลล์น้อย และสาหร่ายเกิดความเครียด จึงส่งผลให้มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นในเซลล์ ซึ่งจะสังเกตเห็นหอยดไขมันในเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 3.0 กรัม/ลิตร มีหอยดไขมันจำนวนมากในเซลล์ ดังรูปการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเซลล์สาหร่ายแสดงในรูปที่ 4.14

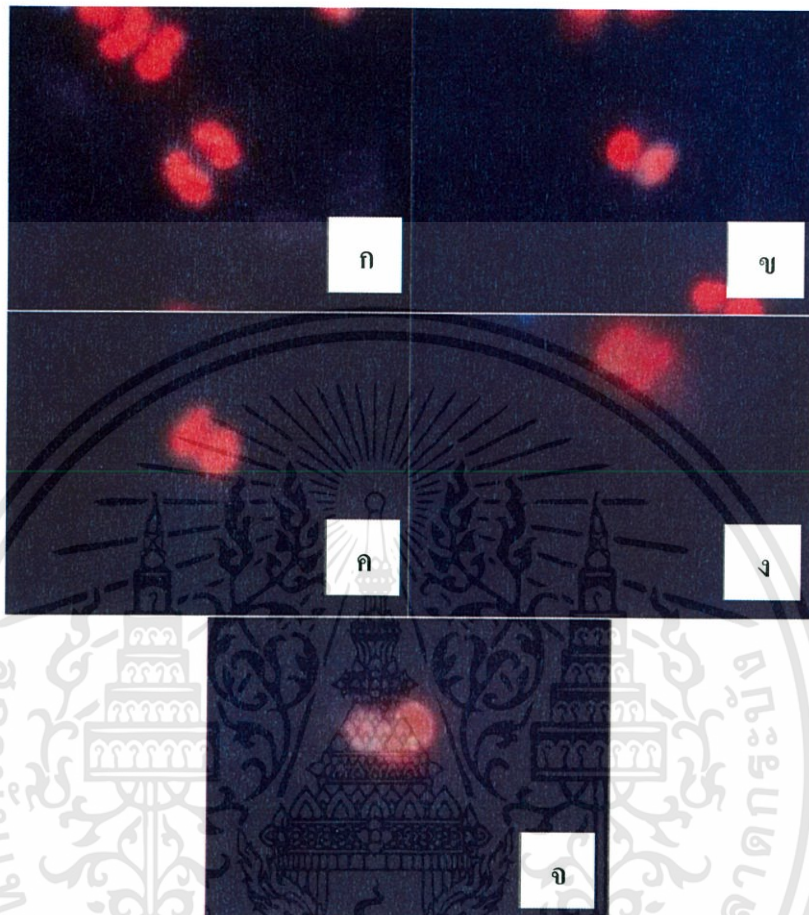


รูปที่ 4.14 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ)

จากการตรวจสอบปริมาณไขมันในเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร นำเซลล์สาหร่ายไปตรวจสอบการสะสมไขมันที่มีในเซลล์สาหร่ายด้วยสีย้อมไนล์เรด (Nile red) จากการตรวจสอบพบว่า การเรืองแสงของหอยดไขมันเริ่มสังเกตเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ในทุกความเข้มข้นของกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 4.15 และมีการสะสมหอยดไขมันเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนวันที่เพิ่มขึ้น การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันภายในเซลล์ของสาหร่าย เนื่องจากในกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน จะเริ่มจากการย่อยสลายกลูโคสที่ได้จากการสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

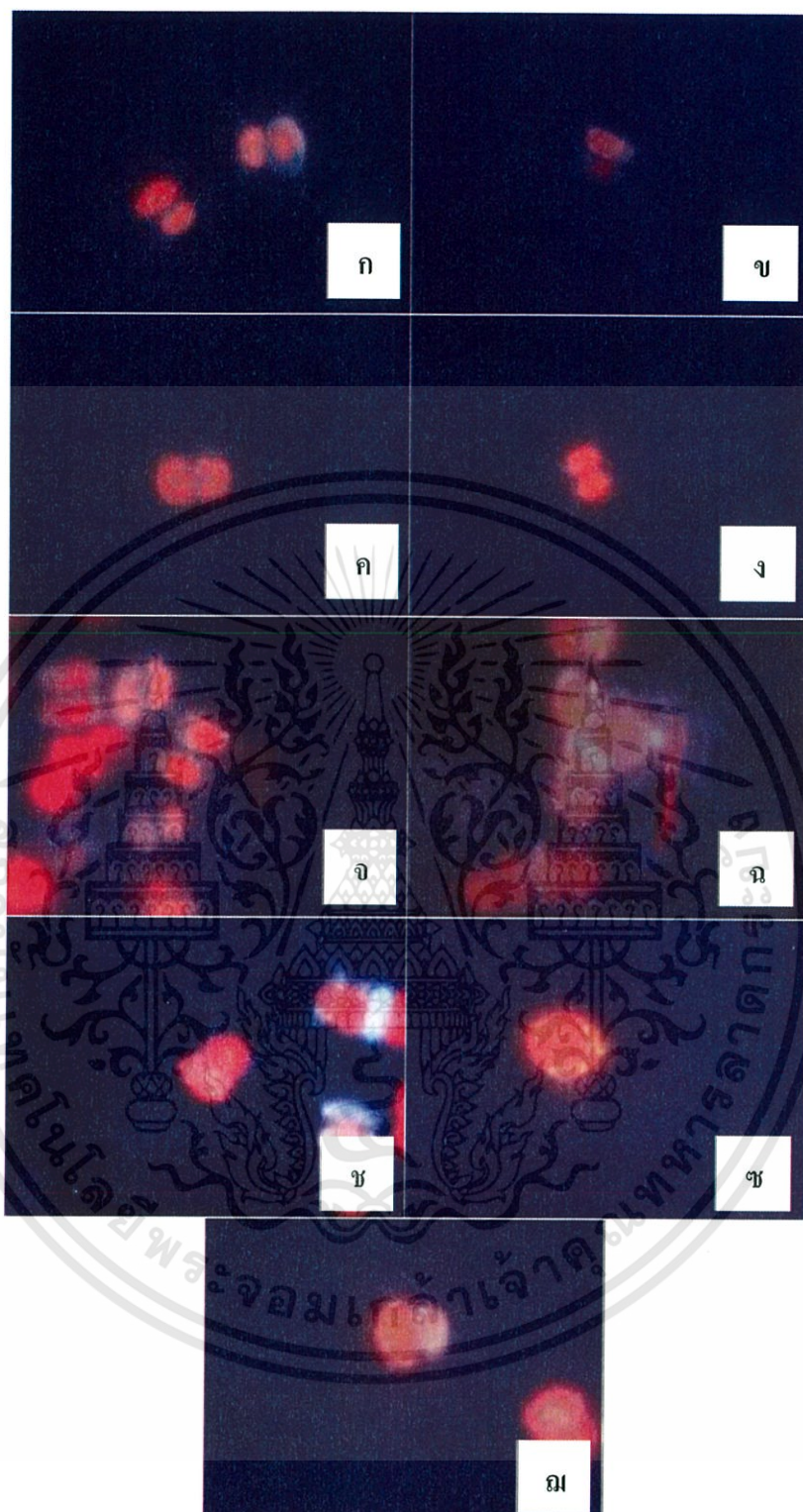
แสงของสาหร่ายและเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ไขมัน (Courchesen และคณะ, 2009) ทำให้สาหร่ายมีไขมันสะสมในเซลล์เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.15 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง, จ ตามลำดับ)

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร และในอาหาร BG-11 ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส 10, 20, 30, 40, และ 50 กรัม/ลิตร นำเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปตรวจสอบปริมาณการสะสมไขมันในเซลล์ด้วยวิธีไนลเรด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าการสะสมไขมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสมีการสะสมไขมันมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลูโคสสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายให้สูงขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม/ลิตร (ก, ข, ค, ง ตามลำดับ) และที่ความเข้มข้นกลูโคส 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม/ลิตร (จ, ฉ, ช, ซ, ฅ ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ผลการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง

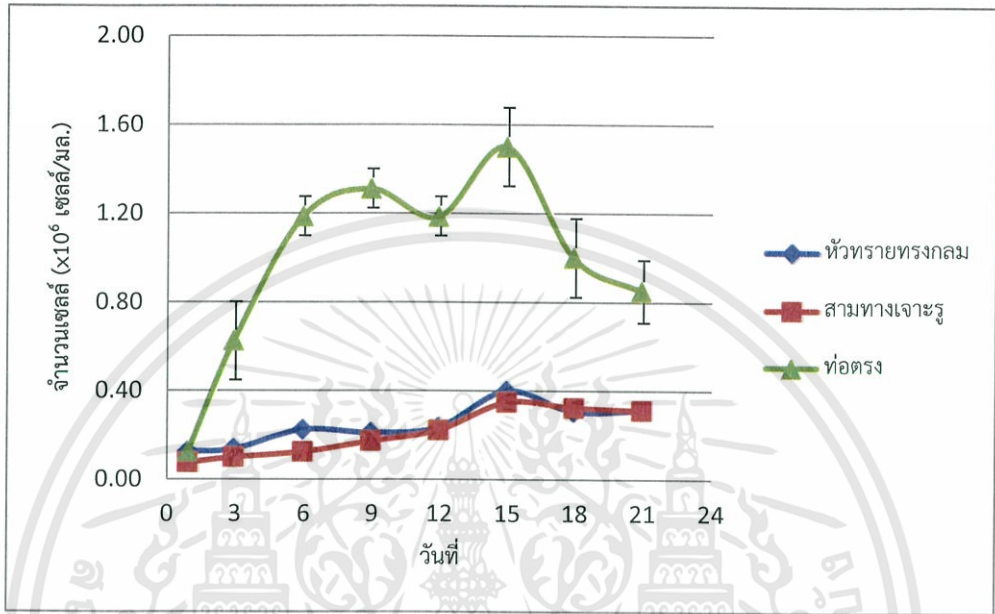
ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณอาหาร 4,000 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 ที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) อัตราการให้อากาศ 1,500 มิลลิลิตร/นาที่ โดยใช้หัวฟ่นอากาศที่ต่างกัน คือ หัวทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวฟ่นอากาศแบบต่างๆ ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและมีจำนวนเซลล์ที่มากขึ้น ผลการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และหาหน้าหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ด้วยหัวฟ่นอากาศ 3 แบบ

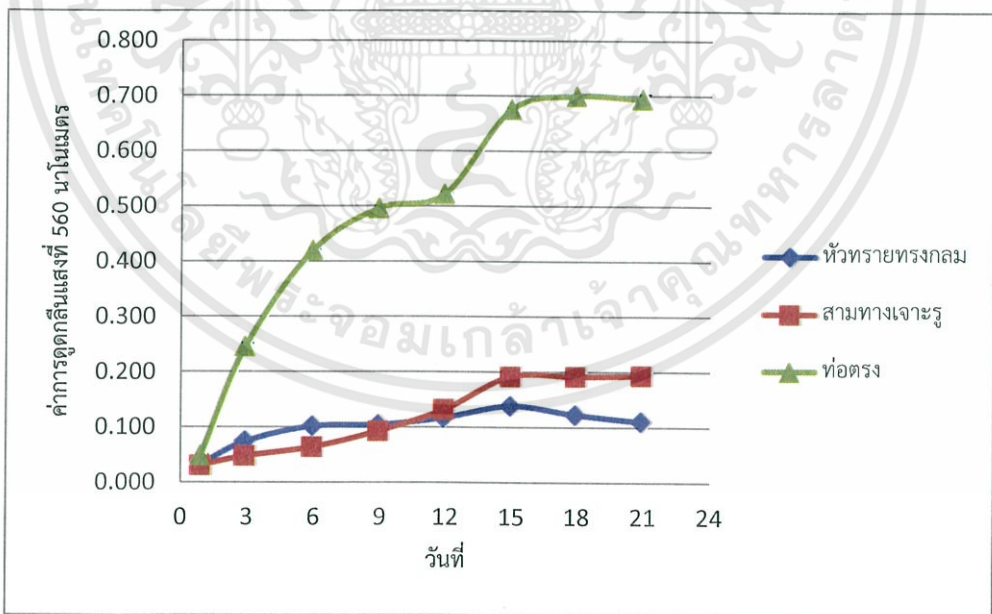
วันที่/ครั้งที่	ชนิดของหัวฟ่นอากาศ	การวัดการเจริญ		
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)	OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
1/1	หัวทรายทรงกลม	0.13 $\pm$ 0.00	0.032 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.07
	สามทางเจาะรู	0.08 $\pm$ 0.00	0.031 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	ท่อตรง	0.13 $\pm$ 0.00	0.048 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.07
3/2	หัวทรายทรงกลม	0.14 $\pm$ 0.02	0.074 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00
	สามทางเจาะรู	0.10 $\pm$ 0.00	0.048 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.07
	ท่อตรง	0.63 $\pm$ 0.18	0.246 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.00
6/3	หัวทรายทรงกลม	0.23 $\pm$ 0.03	0.102 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.07
	สามทางเจาะรู	0.13 $\pm$ 0.00	0.064 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
	ท่อตรง	1.19 $\pm$ 0.09	0.420 $\pm$ 0.00	0.35 $\pm$ 0.07
9/4	หัวทรายทรงกลม	0.21 $\pm$ 0.02	0.105 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
	สามทางเจาะรู	0.18 $\pm$ 0.00	0.094 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
	ท่อตรง	1.31 $\pm$ 0.09	0.497 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.00
12/5	หัวทรายทรงกลม	0.24 $\pm$ 0.02	0.118 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
	สามทางเจาะรู	0.23 $\pm$ 0.03	0.133 $\pm$ 0.00	0.15 $\pm$ 0.07
	ท่อตรง	1.19 $\pm$ 0.09	0.523 $\pm$ 0.00	0.55 $\pm$ 0.07
15/6	หัวทรายทรงกลม	0.40 $\pm$ 0.00	0.139 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
	สามทางเจาะรู	0.35 $\pm$ 0.03	0.192 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.00
	ท่อตรง	1.50 $\pm$ 0.18	0.676 $\pm$ 0.00	0.60 $\pm$ 0.14
18/7	หัวทรายทรงกลม	0.31 $\pm$ 0.01	0.123 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
	สามทางเจาะรู	0.33 $\pm$ 0.00	0.192 $\pm$ 0.00	0.15 $\pm$ 0.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ท้อตรง	0.81±0.09	0.700±0.00	0.50±0.14
21/8	หัวทรายทรงกลม	0.31±0.00	0.110±0.00	0.10±0.00
	สามทางเจาะรู	0.31±0.02	0.194±0.00	0.20±0.00
	ท้อตรง	0.75±0.00	0.694±0.01	0.55±0.07

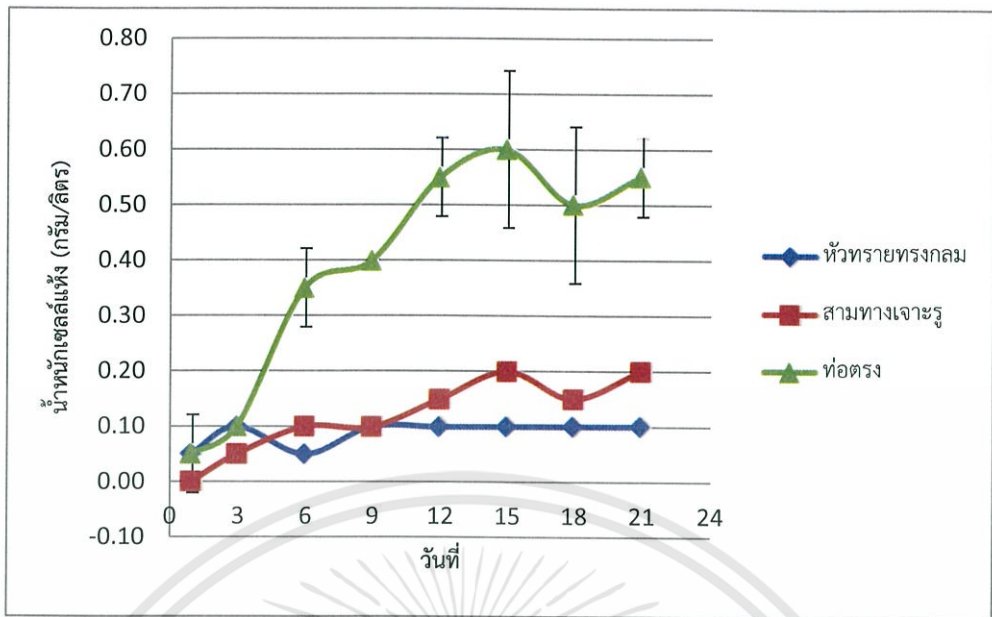


รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้หัวฟ้นอากาศทั้ง 3 แบบ



รูปที่ 4.18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้หัวฟ้นอากาศทั้ง 3 แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ใช้ห้วพ่นอากาศทั้ง 3 แบบ

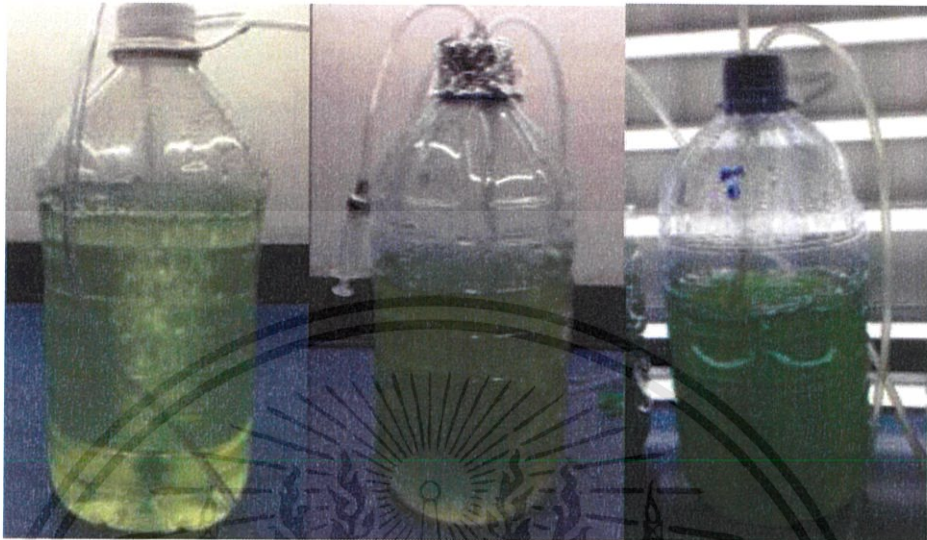
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร (ปริมาตรอาหาร 4,000 มิลลิลิตร) โดยใช้ห้วพ่นอากาศ 3 แบบ คือ ห้วทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อดรง ผลการเจริญเติบโตแสดงดังรูปที่ 4.17-4.19 พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้ห้วพ่นอากาศแบบท่อดรง มีค่าจำนวนเซลล์ ค่าการดูดกลืนแสง และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง มีค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับห้วพ่นอากาศแบบห้วทรายทรงกลมและสามทางเจาะรู ซึ่งเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน ห้วพ่นอากาศแบบท่อดรงจึงมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในขนาดใหญ่ ข้อดีของการใช้ห้วพ่นแบบท่อดรงในการให้อากาศ พบว่าอากาศที่พ่นลงไปในช่วงสามารถกระจายได้ทั่วถึงกันขวด เกิดการกวนของอาหารเพาะเลี้ยงได้อย่างทั่วถึง ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งการฆ่าเชื้อสามารถทำได้ง่ายโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ดังนั้นการใช้ห้วพ่นอากาศแบบท่อดรงจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขนาดการเพาะเลี้ยงที่ใหญ่ขึ้น

การใช้ห้วทรายทรงกลมในการเพาะเลี้ยง จะให้พองอากาศที่ละเอียดพุ่งขึ้นด้านบน ทำให้เซลล์สาหร่ายตกตะกอน เนื่องจากโดยทั่วไปห้วทรายทรงกลมมักนิยมใช้ให้อากาศในตู้เลี้ยงปลา ซึ่งต้องการให้ออกซิเจนในตู้ปลาและไม่ต้องการให้น้ำขุ่นเนื่องจากการพ่นอากาศออกจากห้วทรายทรงกลม การนำห้วทรายทรงกลมมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงประสบกับปัญหาเซลล์สาหร่ายตกตะกอนและเจริญเติบโตได้ไม่ดี อีกทั้งการใช้ห้วทรายทรงกลมจะทำการฆ่าเชื้อได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากไม่สามารถนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ได้ อีกทั้งยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ง่าย

การใช้ห้วพ่นแบบสามทางเจาะรูให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย พบว่าสามทางเจาะรู เมื่อใส่ลงไปในช่วงเพาะเลี้ยงจะลอยขึ้นจากก้นขวด และบังคับทิศทางค่อนข้างยาก เนื่องจากมีน้ำหนักเบา และต้องใช้กำลังลมที่มากในการพ่นอากาศเข้าไปเพื่อให้อากาศออกมาครบทุกทาง และยังทำให้เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

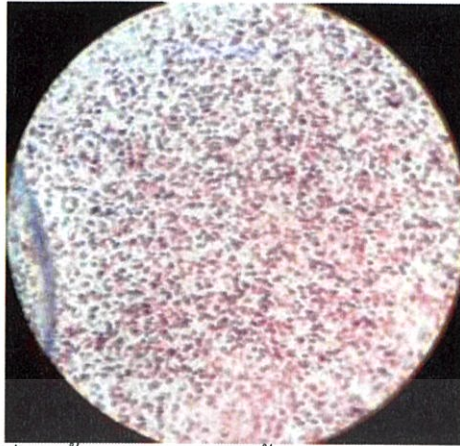
สาหร่ายอีกฝั่งของขวดที่อากาศผ่านไปไม่ถึงตกตะกอนและเติบโตไม่ดี ลักษณะการให้อากาศของหัวพ่นอากาศทั้ง 3 แบบ แสดงดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง ตามลำดับ

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในขวดขนาด 6,000 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 4,000 มิลลิลิตร ด้วยอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบท่อตรง เพาะเลี้ยงแบบแบทช์ (Batch cultivation) คือการเก็บเกี่ยวครั้งเดียวหลังจากการเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ทำการวัดการเจริญเติบโตพบว่าจำนวนเซลล์เท่ากับ  $3.125 \times 10^6$  เซลล์/มล. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 1.150 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.95 กรัม/ลิตร การเก็บเกี่ยวเพียงครั้งเดียวจะทำให้ได้เซลล์จำนวนมาก สาหร่ายเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ไม่เกิดการหยุดสักร่างเนื่องจากสภาวะไม่คงที่จากการเก็บเกี่ยวหลายๆ ครั้ง ซึ่งจะเห็นได้จากผลการวัดการเจริญเติบโต ดังรูปที่ 4.17-4.19 พบว่าจำนวนเซลล์มีค่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับการเก็บเกี่ยวเพียงครั้งเดียว และการเก็บเกี่ยวเพียงครั้งเดียวยังจะช่วยให้หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนในขวดเพาะเลี้ยงหากทำการเก็บตัวอย่างหลายๆ ครั้ง ทำให้สาหร่ายเกิดการปนเปื้อนและไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งจากการนำสาหร่ายที่เจริญเติบโตช้า ไปตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนพบว่ามีทั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ แสดงในรูปที่ 4.21 ซึ่งปนเปื้อนลงไปในช่วงที่เพาะเลี้ยง ทำให้สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

#### 4.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)

ผลการวิเคราะห์น้ำมันจากสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร โดยนำน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายมาผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) โดยมีเบส (KOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) นำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่พบในเซลล์ของสาหร่ายโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (Shimadzu GC-2014, Japan) ที่ประกอบด้วยดีเทคเตอร์ FID (flame ionization detector) และคอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m) จากผลการวิเคราะห์พบว่าสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดที่มีจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม ซึ่งเป็นกรดไขมันที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดที่พบดังแสดงในตารางที่ 4.7 และตารางที่ 4.8 ซึ่งได้จากการคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงจากกรดไขมันที่ใช้เป็นมาตรฐาน (รูปที่ ข.42-ข.47) (ภาคผนวก ข-5) และจากการคำนวณโดยใช้สมการที่ ข.2 (ภาคผนวก ข-5)

ตารางที่ 4.7 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จากการคิดเทียบกับกรดไขมันที่ใช้เป็นมาตรฐาน

ลำดับที่	ชนิดกรดไขมัน	%v/v
1	Myristic acid (C14:0)	0.01
2	Palmitic acid (C16:0)	0.05
3	Palmitoleic acid (C16:1)	0.01
4	Stearic acid (C18:0)	0.05
5	Oleic acid (C18:1)	0.01
6	Linoleic acid (C18:2)	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในสาหร่าย *Scenedesmus armatus* จากการ  
คิดเทียบกับพื้นที่ได้กราฟรวมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง

ลำดับที่	ชนิดกรดไขมัน	%v/v
1	Myristic acid (C14:0)	0.79
2	Palmitic acid (C16:0)	41.99
3	Palmitoleic acid (C16:1)	0.21
4	Stearic acid (C18:0)	4.05
5	Oleic acid (C18:1)	42.94
6	Linoleic acid (C18:2)	10.01



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาทดลองถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไบโอดีเซลของ *Scenedesmus armatus* ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 สามารถสรุปผลการทดลองดังนี้

การศึกษามลของความสัมพันธ์ไนโตรเจนในเตรทที่แตกต่างกัน ( $\text{NaNO}_3 = 1.5, 2.0, 2.5$  และ  $3.0$  กรัม/ลิตร) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น  $1.5$  กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ  $0.1340$  ต่อวัน และมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ  $95$  กับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น  $2.0$  และ  $3.0$  กรัม/ลิตร ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ความเข้มข้น  $1.5$  กรัม/ลิตร จึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และให้ชีวมวลสูงที่สุด ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์ของสาหร่ายพบว่าจะหนาแน่นขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่  $21$  ของการเพาะเลี้ยง

การศึกษามลของความสัมพันธ์กลูโคสที่แตกต่างกัน ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 10, 20, 30, 40$  และ  $50$  กรัม/ลิตร) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมัน พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส  $50$  กรัม/ลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ  $0.1702$  ต่อวัน และให้ชีวมวลสูงที่สุด การวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ  $95$  พบว่าที่ความเข้มข้น  $50$  กรัม/ลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้น  $10$  กรัม/ลิตร ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์ของสาหร่ายพบว่ามีหยดไขมันตั้งแต่วันที่  $3$  ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มมากขึ้นตามจำนวนวันที่เพิ่มขึ้น

จากการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเป็น  $6,000$  มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร  $4,000$  มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น  $3,400$  ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) อัตราการให้อากาศ  $1,500$  มิลลิลิตร/นาที่ โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบต่างๆ คือ หัวทรายทรงกลม สามทางเจาะรู และแบบท่อตรง พบว่าหัวพ่นอากาศแบบท่อตรงมีประสิทธิภาพการให้อากาศดีที่สุด มีชีวมวลสูงที่สุด และมีการกระจายของอากาศได้ทั่วถึง เกิดการกวนวนของอาหารเพาะเลี้ยงและไม่ทำให้เซลล์สาหร่ายตกตะกอน จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ให้อากาศในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป

การศึกษานิตและปริมาณของกรดไขมันที่พบในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนในเตรท  $1.5$  กรัม/ลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบกรดไขมันที่มีคาร์บอน  $16$  และคาร์บอน  $18$  อะตอม ซึ่งเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายน้ำมันได้ในอนาคต

## ข้อเสนอแนะ

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส จะเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ง่าย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจึงต้องระมัดระวังและมีความปลอดภัยเป็นอย่างมาก อีกทั้งการฆ่าเชื้ออาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสจะทำให้เกิดการไหม้ได้ง่าย ดังนั้นจึงควรฆ่าเชื่อน้ำตาลแยกออกจากอาหารแล้วจึงนำมาผสมกัน

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายจะใช้สารเคมีหลายชนิด ซึ่งสารบางชนิดเมื่อมารวมกันจะไม่ละลายและตกตะกอน ดังนั้นจึงควรแยกสารเคมีแต่ละตัวและหลอมละลายให้สารละลายจนหมดก่อนแล้วจึงนำมาผสมกันและนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

3. การฆ่าเชื้อขวดพลาสติกขนาดใหญ่เพื่อใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย ไม่สามารถนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้ (Autoclave) เนื่องจากจะทำให้พลาสติกละลาย จึงต้องฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% และต้องล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลายๆ ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีแอลกอฮอล์ตกค้างอยู่ในขวดที่จะนำไปเพาะเลี้ยงสาหร่าย

4. การใช้หัวทรายทรงกลม และสามทางเจาะรูในการให้อากาศในขวดเพาะเลี้ยงไม่สามารถฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้ จึงต้องใช้แอลกอฮอล์ในการฆ่าเชื้อและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ง่าย เนื่องจากแอลกอฮอล์ตกค้างและหัวทรายทรงกลมมีลักษณะขรุขระทำให้การทำความสะอาดให้ปราศจากจุลินทรีย์ทำได้ยาก

5. การตรวจสอบปริมาณไขมันด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red) จะต้องทำด้วยความรวดเร็ว เนื่องจากสารละลายไนล์เรดจะไวต่อแสงยูวีและต้องหลีกเลี่ยงการโดนแสงให้น้อยที่สุด

## เอกสารอ้างอิง

- กิตติคุณ สุคันโธวงศ์, ธนียา แซ่โอ้ว และสันติสุข ขวัญศิริวณิช. 2554. “การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูงด้วยวิธีการย้อมสีไนลเรด.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ค้นหวันที่ 18 พฤษภาคม 2559. หลักการทำงานกล้องจุลทรรศน์ Fluorescence Microscope [Online]. Available: <http://www.microscopes.in.th/220/Cfluorescence.html>
- ค้นหวันที่ 22 ธันวาคม 2558. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย. [Online]. Available : [https://app.enit.kku.ac.th/mis/administrator/doc\\_upload/20140308094137.pdf](https://app.enit.kku.ac.th/mis/administrator/doc_upload/20140308094137.pdf).
- ค้นหวันที่ 24 ธันวาคม 2558. สถาบันนวัตกรรมและพัฒนาระบบการเรียนรู้ออนไลน์ มหาวิทยาลัยมหิดล. รูปแบบของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ [Online]. Available: [http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4\\_3.html](http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_3.html).
- ค้นหวันที่ 24 ธันวาคม 2558. หลักการ Haemocytometer [Online]. Available: <http://glasswarechemical.com/materials C-hemocytometer/>
- คมสัน หุตะแพทย์, สุัทศนา กำเนิดทอง, กำพล กาทอง และณัฐภูมิ สุดแก้ว. 2550. ทำไบโอดีเซลใช้เอง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เกษตรกรรมธรรมชาติ
- ชมพูนุท ชัยรัตน์. 2543. “การเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ที่เลี้ยงโดยใช้คาร์บอนอินทรีย์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ชรินทร์ ขอพิง, ดร. สาวิตรี จันทรานุรักษ์ และพีรพงษ์ เขาวนพงษ์. 2557. “การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. แบบเฮเทอโรทรอปด้วยน้ำหมักมูลไส้เดือนดิน.” วารสาร 34<sup>th</sup> The National Graduate Research Conference.
- ธนะพันธุ์ พิริยธนาสิน, ธาดา พิรพันธุ์พิรุฬ และรัชวัฒน์ ตั้งตระกูลพิพัฒน์. 2552. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นฤตชวรรณ สัญญาโน. 2556. “การเก็บเกี่ยวและผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นุชนาด แซ่มซ้อย. 2557. “สาหร่ายขนาดเล็ก: การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์.” วารสาร มฉก. 34: 169-189.
- เบญจพร สุขอุ้ม, เสาวลักษณ์ อาดำ และเจี๊ญนูริดา เวาะเลง. 2555. “การศึกษาการเจริญองค์ประกอบของเซลล์และการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปิยรัตน์ มูลศรี. 2554. “การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายในท้องถิ่นของจังหวัดเพชรบูรณ์.” รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.
- พิมพ์ปวีณ์ เรืองเกษตรกิจ, รติพรรณ คัมภีร์ญาณนนท์, ปวีณา ตปนียวรวงศ์ และมะลิวัลย์ คุตะโค. 2557. “ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและปริมาณไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armatus*.” หน้า 222-229. ในการประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัย ครั้งที่ 5. นครราชสีมา : คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน.
- พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล และลลิตา อัตนโก. 2549. รอบรู้...เรื่องราว ไบโอดีเซล. พิมพ์ครั้งที่ 1. ปทุมธานี : พิมพ์พิณิจ การพิมพ์
- แม่น อมรสิทธิ์ และคณะ. 2553. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ Principles and Techniques of Instrumental Analysis PART II Chromatography and Others. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด
- ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ. 2553. การพัฒนาการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่ายขนาดเล็ก ระยะที่ 1. เชียงใหม่ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : โชตนาพรินท์
- รัตนภรณ์ สีสิ่ง และงามนิจ นนทโส. 2010. “การผลิตน้ำมันจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิค.” KKU Res J 15 (9): 787-793.
- วรรณิ ปะกังกร. 2542. “การผลิตกรดไขมันอิสระด้วยเอนไซม์ไลเปสในกากร้าข้าว.” วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- วีณา ชูโชติ, กิตติคุณ สุคันโรวงค์, ธนียา แซ่อ้าว และสันติสุข ขวัญศิริวณิช. 2557. “การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูง.” วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 84-92.
- เสาวนาภรณ์ โชคสกุลพร. 2557. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากอ้อยเลาโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด.” โครงการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม.
- อรรวรรณ สัมฤทธิ์เดชขจร. 2553. “เชื้อเพลิงจากสาหร่าย.” ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. ตุลาคม-ธันวาคม : 29-35.
- อ้อยใจ ทองเมอ, วิฑูรช กู๊ดวิน และอุกฤษฏ์ สหพัฒน์สมบัติ. 2550. รู้จักไบโอดีเซลใน 4 ชั่วโมง. พิมพ์ครั้งแรก. ปทุมธานี : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- อชวาน เจาะอาแวง, วันเฉลิม สังข์ทอง และสินทิพย์ ด่านสุวรรณเมฆ. 2556. “การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อารัตน์ มหาพันธ์. 2552. *สาหร่าย...คำตอบสุดท้ายของพลังงาน*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
- อิทธิพล แจ่มชัด. 2542. *คาร์บอน (CARBON)*. พิมพ์ครั้งแรก. กรุงเทพฯ : แพลน พรีนซ์ตั้ง
- อภิเชษฐ์ จินดา. 2555. “การวิเคราะห์พารามิเตอร์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลา แบบไม่ต่อเนื่องเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับไบโอดีเซลในปฏิกรณ์ชีวภาพเปิดแบบแนวตั้ง.” *วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมพลังงาน)*, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Ahmad, I. Fatma, Z. Yazdani, S. and Kumar, S. 2013. “DNA barcode and lipid analysis of new marine algae potential for biofuel.” *Algal Research*. 2: 10-15.
- Albalasmeh, A. Berhe, A. and Ghezzehei, T. 2013. “A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry.” *Carbohydrate Polymers*. 97: 253-261.
- Álvarez-Díaz, P.D. Ruiz, J. Arbib, Z. Barragán, J. Garrido-Pérez, M.C. and Perales, J.A. 2015. “Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process.” *Bioresource Technology*. 181: 90–96.
- Ashokkumar, V. Salam, Z. Tiwari, O.N. Chinnasamy, S. Mohammed, S. and Nasir Ani, F. 2015. “An integrated approach for biodiesel and bioethanol production from *Scenedesmus bijugatus* cultivated in a vertical tubular photobioreactor.” *Energy Conversion and Management*. 101: 778-786.
- Cao, J. Yuan, H. Li, B.Z. and Yang, J.S. 2014. “Significance evaluation of the effects of environmental factors on the lipid accumulation of *Chlorella minutissima* UTEX 2341 under low-nutrition heterotrophic condition.” *Bioresource Technology*. 152: 177-184.
- Cha, T.S. Chen, J.W. Goh, E.G. Aziz, A. and Loh, S.H. 2011. “Differential regulation of fatty acid biosynthesis in two *Chlorella* species in response to nitrate treatments and the potential of binary blending microalgae oils for biodiesel application.” *Bioresource Technology*. 102: 10633-10640.
- Chandra, R. Rohit, M.V. Swamy, Y.V. and Mohan, S.V. 2014. “Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation.” *Bioresource Technology*. 165: 279–287.
- Cheirsilp, B. and Torpee, S. 2012. “Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- glucose concentration and fed-batch cultivation.” *Bioresource Technology*. 110: 510-516.
- Chen, C-L. Change, J-S. Huang, C-C. Ho, K-C. Hsiao, P-X. and Wu, M-S. 2014. “A novel biodiesel production method consisting of oil extraction and transesterification from wet microalgae.” *Energy Procedia*. 61: 1294-1297.
- Chen, M. Tang, H. Ma, H. Holland, T.C. Simon Ng, K.Y. and Salley, S.O. 2011. “Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*.” *Bioresource Technology*. 102: 1649-1655.
- Chisti, Y. 2007. “Biodiesel from microalgae”. *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.
- Converti, A. Casazza, A.A. Ortiz, E.Y. Perego, P. Borghi, M.D. 2009. “Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production.” *Chemical Engineering and Processing*. 48: 1146-1151.
- Courchesne, N.M.D. Parisen, A. Wang, B. Lan, C.Q. 2009. “Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches.” *Journal of Biotechnology*. 141: 31-41.
- Damiani, M. C. Popovich, C. A. Constenla, D. Leonardi, P. I. 2010. “Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock.” *Bioresource Tech*. 101: 3801 – 3807.
- David, F. Sandra, P. and Vickers, A.K. 2005. **Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters**. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-3760EN.pdf>
- Guldhe, A. Singh, B. Rawat, I. Ramluckan, K. and Bux, F. 2014. “Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production.” *Fuel*. 128: 46–52.
- James, G.O. Hocart, C.H. Hillier, W. Chen, H. Kordbacheh, F. Price, G.D. and Djordjevic, M.A. 2011. “Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation.” *Bioresource Technology*. 102: 3343-3351.
- Kang, C-H. Ra, C-H. Jung, J-H. Jeong, G-T. and Kim, S-K. 2016. “Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae.” *Bioresource Technology*. 212: 254-261.

- Kim, G-Y. Yun, Y-M. Shin, H-S. Kim, H-S. and Han, J-I. 2015. "Scenedesmus-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production." *Bioresource Technology*. 196: 235-240.
- Kolber, Z. Zehr, J. and Falkowski, P. 1988. "Plant Physiol." 88: 923.
- Leesing, R. Sihawong, S. and Duangkeaw, N. 2013. "Producing of Microalgal Lipid by Isolated Microalgae under Photoautotrophic and Heterotrophic Cultivations." *APCBEE Procedia*. 7: 48-53.
- Lin, T-S. and Wu, J-Y. 2015. "Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition." *Bioresource Technology*. 184: 100-107.
- Nwokoagbara, E. Olaleye, and A. Wang, M. 2015. "Biodiesel from microalgae: The use of multicriteria decision analysis for strain selection." *Fuel*. 159: 241-249.
- Pancha, I. Chokshi, K. and Mishra, S. 2015. "Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077." *Bioresource Technology*. 179: 565-572.
- Prakash. Rai, M. and Gupta, S. 2016. "Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*." *Energy Conversion and Management*. 1-8.
- Ratha, S.K. Prasanna, R. Prasad, R. Sarika, C. Dhar, D.W. and Saxena, A.K. 2013. "Modulating lipid accumulation and composition in microalgae by biphasic nitrogen supplementation." *Aquaculture*. 392-395: 69-76.
- Shin, DY. Cho, HU. Chistian Utomo, J. Choi, Y-N. Xu Xu, and Moon Park, J. 2015. "Biodiesel production from *Scenedesmus bijuga* grown in anaerobically digested food wastewater effluent." *Bioresour Technol*. 184: 215-221.
- Susilaningsih, D. Khuzaemah. Rahman, D.Y. and Sekiguchi, H. 2014. "Screening for lipid depositor of Indonesian microalgae isolated from seashore and peatland." *International journal of hydrogen energy*. 39: 19394-19399.
- Wang L, Zh. Wen H, Ch. Zou, Y. Zhou W, W. Xie T, H. Zhang Y, K. 2010. "Microbiology." 37: 336.
- Wang L., Li Y., Sommerfeld M., Hu Q. 2013. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid." *Bioresource Technology*. 129: 289-295.

- Wang, Y. Chen, T. and Qin, S. 2012. "Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements." *Biomass and Bioenergy*. 47: 402-409.
- Wu, H. and Miao, X. 2014. "Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels." *Bioresource Technology*. 170: 421-427.
- Xin, L. Hong-ying, H. and Jia, Y. 2010. "Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent." *New Biotechnology*. 27: 59-63.
- Xin, L. Hong-ying, H. and Yu-ping, Z. 2011. "Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature." *Bioresource Technology*. 102: 3098-3102.
- Yeh, K-L. Chen, C-Y. Chang, J-S. 2012. "pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source." *Biochemical Engineering Journal*. 64: 1-7.
- Yen Doan, T.T. Sivaloganathan, B. and Obbard, J.P. 2011. "Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock." *Biomass and Bioenergy*. 35: 2534-2544.
- Yin C, L. Liang, Y. and Zhang Q, F. 2008. *Fisheries Sci.* 27: 27.
- ZHU, J. RONG, J. and ZONG, B. 2013. "Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel." *Chinese Journal of Catalysis*. 34: 80-100.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

#### ก-1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร

ตารางที่ ก.1 แสดงสารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร BG-11

สารเคมี	ความเข้มข้น (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.04
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA disodium magnesium salt	0.01
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
*Trace element (ใช้ 1 มิลลิลิตร/ลิตร)	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.049

หมายเหตุ กรณีอาหารแข็งใช้วุ้น (Agar) 15 กรัม/ลิตร

(ที่มา: Wu Hongqin and Miao Xiaoling, 2014)

## ก-2 การเตรียมสารเคมีสำหรับตรวจสอบปริมาณไขมันด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)

1. สารละลายอะซิโตน ความเข้มข้นร้อยละ 90

ใช้อะซิโตน 90 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายไนล์เรด 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งไนล์เรดผง 0.001 กรัม ละลายในอะซิโตน 10 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ปิดฝาให้แน่น และเก็บไว้ในที่เย็น

3. สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 25

ใช้ DMSO เข้มข้น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น รอให้เย็น เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา และเก็บไว้ในที่เย็น

## ก-3 การเตรียมสารละลายสำหรับทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไขมัน

1. สารละลาย 2 M methanolic KOH

การคำนวณ :  $\text{KOH} = 100 \text{ ml} \times 2 \text{ M} / 1000 \text{ ml} \times 56 \text{ g} / 1 \text{ mol} = 11.2 \text{ g}$

ดังนั้นชั่ง KOH หนัก 11.2 กรัม ละลายในเมทานอล 100 มิลลิลิตร

## ก-4 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก

1. สารละลายฟินอล 5%

ชั่งน้ำหนักฟินอล 5 กรัม ใส่ในปิ๊กเกอร์ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 30-40 มิลลิลิตร จากนั้นเทใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างปิ๊กเกอร์อีกครั้ง เพื่อให้สารถูกชะออกจนหมด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

นำน้ำตาลกลูโคสไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1%

3. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1%

ทำการเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1% ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คำนวณปริมาตรสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องใช้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \dots\dots\dots (ก.1)$$

โดยที่  $C_1, C_2$  คือ ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

$V_1, V_2$  คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร)

ตารางที่ ก.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายกลูโคส มาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)
0	0	10	10
20	1	9	10
40	2	8	10
60	3	7	10
80	4	6	10
100	5	5	10

### ก-5 การเตรียมกรดไขมันสำหรับวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)

ตารางที่ ก.3 การเตรียมสารละลายกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% v/v)	กรดไขมัน ( $\mu\text{l}$ )	เฮกเซน ( $\mu\text{l}$ )	ปริมาตร ( $\mu\text{l}$ )
2%	100	4,900	5,000
4%	200	4,800	5,000
6%	300	4,700	5,000
8%	400	4,600	5,000
10%	500	4,500	5,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### ค่าการวิเคราะห์

#### ข-1 ค่าการวิเคราะห์ต่างๆ

ตารางที่ ข.1 ข้อมูลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

วันที่/ ครั้งที่	การวัดการเจริญ								
	จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)			OD			น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
1/1	0.50	0.00	0.25	0.049	0.050	0.050	0.00	0.00	0.00
3/2	0.78	0.50	0.64	0.110	0.098	0.104	0.20	0.10	0.15
6/3	3.20	2.90	3.05	0.259	0.204	0.232	0.30	0.40	0.35
9/4	3.75	3.40	3.58	0.396	0.298	0.347	0.50	0.30	0.40
12/5	4.43	3.75	4.09	0.760	0.595	0.678	1.50	0.90	1.20
15/6	4.75	4.43	4.59	1.063	0.895	0.979	1.70	1.70	1.70
18/7	4.75	4.50	4.63	1.153	1.244	1.199	2.20	2.00	2.10
21/8	6.00	5.75	5.88	1.834	1.529	1.682	2.50	2.20	2.35
24/9	6.25	6.00	6.13	1.782	1.592	1.687	2.40	1.90	2.22
27/10	6.05	5.88	5.97	1.981	1.845	1.913	2.60	2.50	2.60
30/11	5.88	5.00	5.44	2.134	1.983	2.059	2.70	1.90	2.30
33/12	5.50	5.25	5.38	1.877	2.065	1.971	2.40	2.00	2.20
36/13	5.25	4.75	5.00	1.788	2.003	1.896	2.10	1.70	1.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน

วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้น $\text{NaNO}_3$ (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ												น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)												OD			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
1/1	1.5	0.125	0.175	0.175	0.175	0.16	0.049	0.050	0.058	0.049	0.052	0.30	0.20	0.20	0.20	0.23	
	2.0	0.175	0.200	0.175	0.200	0.19	0.045	0.046	0.059	0.046	0.049	0.30	0.40	0.20	0.20	0.28	
	2.5	0.100	0.175	0.125	0.100	0.13	0.050	0.056	0.062	0.049	0.054	0.30	0.30	0.10	0.20	0.23	
	3.0	0.150	0.150	0.175	0.150	0.16	0.052	0.052	0.076	0.063	0.061	0.30	0.30	0.20	0.10	0.23	
3/2	1.5	0.275	0.325	0.475	0.475	0.39	0.110	0.115	0.070	0.110	0.101	0.40	0.30	0.30	0.30	0.33	
	2.0	0.175	0.175	0.375	0.225	0.24	0.077	0.081	0.072	0.073	0.076	0.40	0.50	0.30	0.40	0.40	
	2.5	0.175	0.250	0.200	0.125	0.19	0.106	0.078	0.074	0.067	0.081	0.30	0.40	0.10	0.20	0.25	
	3.0	0.225	0.175	0.175	0.175	0.19	0.082	0.046	0.078	0.075	0.070	0.40	0.30	0.10	0.30	0.28	
6/3	1.5	0.700	0.625	0.325	0.850	0.63	0.259	0.094	0.093	0.198	0.161	0.30	0.60	0.40	0.30	0.40	
	2.0	0.225	0.200	0.350	0.475	0.31	0.103	0.101	0.105	0.108	0.104	0.40	0.50	0.40	0.30	0.40	
	2.5	0.525	0.325	0.250	0.325	0.36	0.229	0.085	0.092	0.187	0.148	0.50	0.50	0.20	0.30	0.38	
	3.0	0.300	0.125	0.250	0.300	0.24	0.110	0.053	0.100	0.112	0.094	0.40	0.50	0.20	0.30	0.35	
9/4	1.5	0.850	0.850	1.050	1.050	0.95	0.396	0.037	0.123	0.254	0.203	0.30	0.20	0.30	0.40	0.30	
	2.0	0.250	0.325	0.475	0.475	0.38	0.177	0.130	0.107	0.165	0.145	0.10	0.30	0.30	0.20	0.23	
	2.5	0.575	0.225	0.325	0.575	0.43	0.290	0.097	0.178	0.213	0.195	0.40	0.20	0.20	0.30	0.28	
	3.0	0.275	0.325	0.275	0.525	0.35	0.154	0.060	0.102	0.132	0.112	0.10	0.10	0.30	0.30	0.20	

ตารางที่ ข.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (ต่อ)

วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้น $\text{NaNO}_3$ (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ												น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)												OD			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
12/5	1.5	1.800	1.675	1.525	1.400	1.60	0.760	0.150	0.574	0.621	0.526	0.60	0.20	0.40	0.50	0.43	
	2.0	0.750	0.625	0.850	1.050	0.82	0.414	0.134	0.218	0.398	0.291	0.30	0.10	0.20	0.20	0.20	
	2.5	1.050	0.125	0.575	0.625	0.59	0.638	0.103	0.563	0.578	0.471	0.50	0.20	0.30	0.40	0.35	
	3.0	0.500	0.125	0.850	0.575	0.51	0.259	0.065	0.186	0.153	0.166	0.20	0.10	0.30	0.20	0.20	
15/6	1.5	2.950	2.250	1.950	2.250	2.35	1.063	0.577	1.012	0.998	0.913	0.70	0.20	0.30	0.60	0.45	
	2.0	1.400	1.050	1.050	1.150	1.16	0.598	0.129	0.376	0.411	0.379	0.40	0.10	0.30	0.30	0.28	
	2.5	1.700	1.150	1.325	1.150	1.33	0.800	0.643	0.876	0.599	0.730	0.50	0.20	0.40	0.30	0.35	
	3.0	1.150	0.850	1.150	1.150	1.08	0.503	0.067	0.456	0.402	0.357	0.30	0.40	0.50	0.40	0.40	
18/7	1.5	3.250	2.410	2.410	2.850	2.73	1.315	0.985	1.101	1.308	1.177	0.90	0.10	0.50	0.80	0.58	
	2.0	1.375	1.325	1.525	1.525	1.44	0.742	0.342	0.894	0.764	0.686	0.50	0.50	0.30	0.40	0.43	
	2.5	1.525	1.325	1.375	1.325	1.39	0.845	0.844	0.921	0.701	0.828	0.50	0.50	0.30	0.50	0.45	
	3.0	1.050	1.050	1.400	1.150	1.16	0.667	0.890	0.723	0.699	0.745	0.50	0.50	0.40	0.60	0.50	
21/8	1.5	3.250	2.950	3.500	3.250	3.24	1.153	1.152	1.322	1.325	1.238	1.20	1.20	0.80	1.00	1.05	
	2.0	1.525	1.525	1.525	1.575	1.54	0.858	0.958	1.104	0.987	0.952	0.80	1.00	0.60	0.60	0.75	
	2.5	1.575	1.675	1.950	1.800	1.75	0.975	0.975	1.167	1.002	1.030	1.00	1.10	0.90	1.00	1.00	
	3.0	1.575	1.375	1.575	1.375	1.48	0.748	0.748	0.835	0.821	0.788	1.00	0.90	0.90	0.80	0.90	

ตารางที่ ข.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไม่เท่ากัน (ต่อ)

วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้น $\text{NaNO}_3$ (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ												น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)				OD				OD				ข้อที่ 1	ข้อที่ 2	ข้อที่ 3	ข้อที่ 4
		ข้อที่ 1	ข้อที่ 2	ข้อที่ 3	ข้อที่ 4	ข้อที่ 1	ข้อที่ 2	ข้อที่ 3	ข้อที่ 4	ข้อที่ 1	ข้อที่ 2	ข้อที่ 3	ข้อที่ 4				
24/9	1.5	3.800	2.950	3.750	3.250	3.44	1.408	1.234	1.410	1.477	1.382	1.10	1.10	1.00	1.00	1.05	
	2.0	1.675	1.800	1.675	1.525	1.67	1.206	1.206	1.122	1.201	1.184	0.90	0.90	0.70	0.70	0.80	
	2.5	2.850	2.850	2.410	2.250	2.59	1.393	1.378	1.209	1.187	1.292	1.00	1.00	0.80	0.90	0.90	
	3.0	1.375	1.575	1.675	1.575	1.55	1.267	1.267	1.021	1.256	1.203	1.10	1.10	1.10	1.00	1.03	
27/10	1.5	4.125	3.800	4.000	3.750	3.92	1.529	1.529	1.465	1.511	1.509	1.00	1.00	1.00	1.10	1.03	
	2.0	1.950	1.950	2.250	1.675	1.96	1.162	1.162	1.087	1.144	1.139	0.80	0.80	0.70	0.90	0.80	
	2.5	3.250	2.950	2.850	2.410	2.87	1.401	1.401	1.411	1.301	1.379	0.80	0.80	0.60	0.80	0.70	
	3.0	2.250	2.250	1.950	1.950	2.10	1.273	1.273	1.302	1.289	1.284	0.80	0.80	0.70	0.90	0.80	
30/11	1.5	3.800	3.800	4.250	3.800	3.91	1.488	1.495	1.365	1.501	1.462	0.90	1.00	1.10	0.90	1.00	
	2.0	1.700	1.700	1.800	1.800	1.75	1.112	1.098	1.088	1.143	1.110	0.90	0.70	0.80	0.80	0.80	
	2.5	2.950	2.950	2.950	2.410	2.82	1.400	1.344	1.409	1.322	1.369	0.70	0.60	0.60	0.80	0.68	
	3.0	1.675	1.675	2.250	1.850	1.86	1.209	1.256	1.299	1.305	1.267	0.70	0.60	0.80	0.80	0.73	

ตารางที่ ข.3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน

วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ												น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)												OD			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
1/1	10	0.175	0.125	0.225	0.125	0.16	0.051	0.046	0.044	0.052	0.048	0.30	0.30	0.20	0.30	0.28	
	20	0.125	0.175	0.150	0.125	0.14	0.049	0.051	0.044	0.051	0.049	0.30	0.30	0.20	0.30	0.28	
	30	0.150	0.175	0.100	0.150	0.14	0.049	0.048	0.047	0.049	0.048	0.30	0.10	0.20	0.10	0.18	
	40	0.125	0.175	0.125	0.125	0.14	0.045	0.056	0.051	0.051	0.051	0.20	0.20	0.20	0.30	0.23	
	50	0.175	0.125	0.125	0.125	0.14	0.042	0.057	0.051	0.049	0.050	0.20	0.10	0.20	0.10	0.15	
3/2	10	0.875	0.575	0.575	0.525	0.64	0.183	0.178	0.156	0.179	0.174	0.40	0.30	0.30	0.50	0.38	
	20	0.275	0.525	0.175	0.275	0.31	0.181	0.179	0.112	0.186	0.165	0.30	0.40	0.20	0.40	0.33	
	30	0.450	0.450	0.450	0.800	0.54	0.166	0.167	0.159	0.155	0.162	0.40	0.20	0.30	0.40	0.33	
	40	0.425	0.200	0.500	0.750	0.47	0.163	0.162	0.165	0.166	0.164	0.30	0.20	0.20	0.30	0.25	
	50	0.325	0.200	0.500	0.500	0.38	0.156	0.090	0.134	0.122	0.126	0.30	0.20	0.40	0.40	0.33	
6/3	10	1.375	0.800	0.875	1.375	1.11	0.421	0.379	0.398	0.465	0.416	0.20	0.20	0.30	0.25		
	20	1.475	0.775	0.775	0.825	0.96	0.442	0.457	0.398	0.433	0.40	0.20	0.30	0.40	0.33		
	30	0.825	1.125	0.825	1.125	0.98	0.467	0.515	0.501	0.511	0.499	0.50	0.40	0.30	0.60	0.45	
	40	1.125	0.725	1.000	1.750	1.15	0.563	0.453	0.601	0.611	0.557	0.50	0.70	0.50	0.55		
	50	1.000	0.775	1.250	1.500	1.13	0.567	0.161	0.421	0.187	0.334	0.40	0.20	0.30	0.40	0.33	

ตารางที่ ข.3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของเกลือโคสที่แตกต่างกัน (ต่อ)

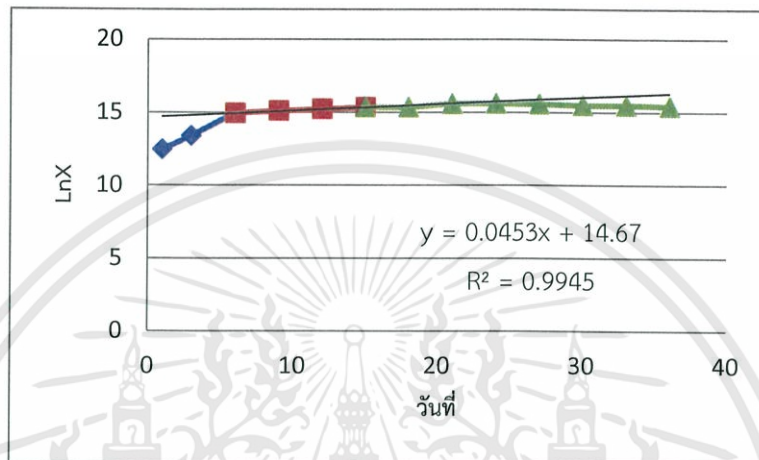
วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้นเกลือโคส (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ												น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)												OD			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
9/4	10	1.875	1.100	1.050	1.475	1.38	0.819	0.759	0.776	0.812	0.792	0.80	0.10	0.40	0.70	0.73	
	20	1.350	1.775	1.150	1.825	1.53	0.818	0.832	0.856	0.873	0.845	0.10	0.10	0.60	0.90	0.88	
	30	1.875	1.825	1.125	2.250	1.77	0.835	0.885	0.901	0.878	0.875	0.10	1.30	0.90	1.00	1.05	
	40	1.875	1.125	2.000	2.250	1.81	0.965	0.782	0.673	0.832	0.813	0.50	0.10	0.60	0.70	0.70	
	50	2.750	1.125	2.000	1.750	1.91	0.987	0.619	0.987	1.005	0.900	1.60	1.10	0.90	0.70	1.08	
12/5	10	2.000	2.000	1.150	2.250	1.85	1.324	1.263	1.234	1.423	1.311	1.30	1.20	0.90	1.20	1.15	
	20	2.250	2.075	1.875	2.250	2.11	1.323	1.388	1.333	1.344	1.347	1.20	1.30	1.00	1.00	0.13	
	30	1.725	2.425	2.425	2.650	2.31	1.564	1.528	1.467	1.442	1.500	1.40	0.20	1.00	1.20	1.40	
	40	2.250	1.350	2.500	2.500	2.15	1.675	1.456	1.378	1.502	1.503	1.60	1.80	1.00	0.90	1.33	
	50	4.075	2.175	3.250	3.000	3.13	2.247	1.677	1.862	1.876	1.916	1.70	1.20	1.20	1.00	1.28	
15/6	10	3.025	1.775	2.000	2.575	2.34	1.632	1.552	1.435	1.567	1.547	1.40	1.30	1.00	1.30	1.25	
	20	2.575	2.375	2.250	2.775	2.49	1.616	1.903	1.673	1.943	1.784	1.60	1.00	1.20	1.40	1.30	
	30	2.775	2.950	2.575	3.025	2.83	1.983	2.001	1.877	1.998	1.965	2.30	2.10	1.90	1.90	2.05	
	40	3.975	2.75	2.750	3.000	3.12	2.001	1.982	1.998	2.011	1.998	2.60	2.20	2.00	1.90	2.18	
	50	4.300	2.750	3.750	4.000	3.70	2.403	2.002	1.954	1.931	2.073	2.00	2.00	2.00	1.90	1.98	

ตารางที่ ข.3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน (ต่อ)

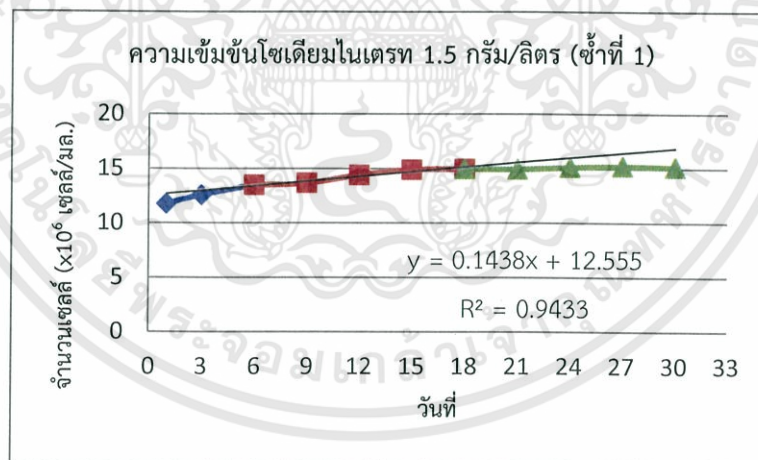
วันที่/ครั้งที่	ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)	การวัดการเจริญ												น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
		จำนวนเซลล์ $\times 10^6$ (เซลล์/มล.)												OD			
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
18/7	10	3.925	3.600	3.250	3.975	3.69	1.939	2.025	1.956	2.002	1.981	1.70	1.50	1.00	1.60	1.45	
	20	4.100	3.975	3.600	3.975	3.91	2.041	2.034	1.997	2.006	2.020	1.80	1.50	1.60	1.70	1.65	
	30	5.500	4.750	4.500	4.200	4.74	2.201	2.104	2.011	2.002	2.080	2.60	2.50	2.20	2.30	2.40	
	40	5.500	5.150	4.000	4.750	4.85	2.224	2.109	2.076	2.393	2.201	2.60	2.90	2.00	2.10	2.40	
	50	6.55	5.150	5.000	5.750	5.61	2.456	2.300	2.203	2.134	2.273	3.00	3.00	2.40	2.60	2.75	
21/8	10	4.250	4.000	3.925	4.100	4.07	2.000	2.046	2.101	2.113	2.065	1.40	1.70	1.30	1.60	1.50	
	20	4.500	4.200	3.975	4.100	4.19	2.220	1.970	2.003	2.118	2.078	1.90	1.50	1.70	1.50	1.65	
	30	5.675	5.250	5.775	6.250	5.74	2.301	2.345	2.311	2.345	2.326	2.70	2.60	2.40	2.40	2.53	
	40	5.775	6.000	4.500	5.250	5.380	2.472	2.365	2.302	2.445	2.396	2.90	0.30	2.30	2.50	2.68	
	50	7.250	5.775	5.500	6.500	6.26	2.524	2.499	2.365	2.403	2.448	3.20	3.10	2.70	2.70	2.93	

## ข-2 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

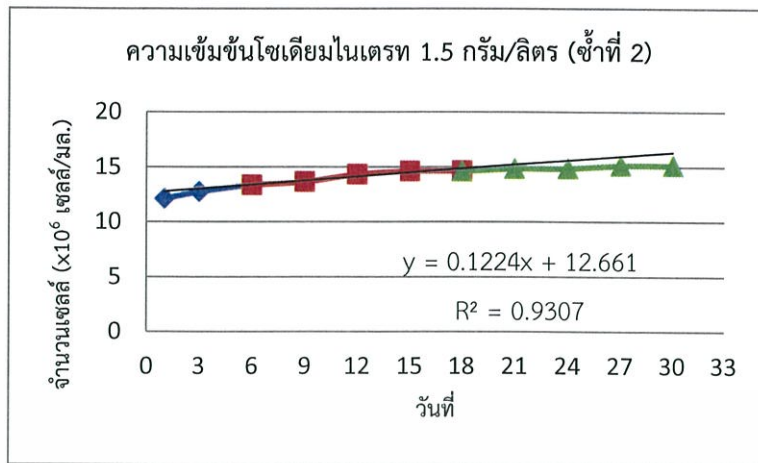
ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate,  $\mu_{max}$ ) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามาก ยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว ถ้าเซลล์ไม่มีการเจริญ ค่า  $\mu_{max}$  จะมีค่า = 0 ดังนั้นการวาดกราฟระหว่าง  $\ln X$  กับเวลา ในช่วง exponential phase หรือ log phase จะได้กราฟเส้นตรง และความชัน (slope) ของกราฟจะเป็นค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ )



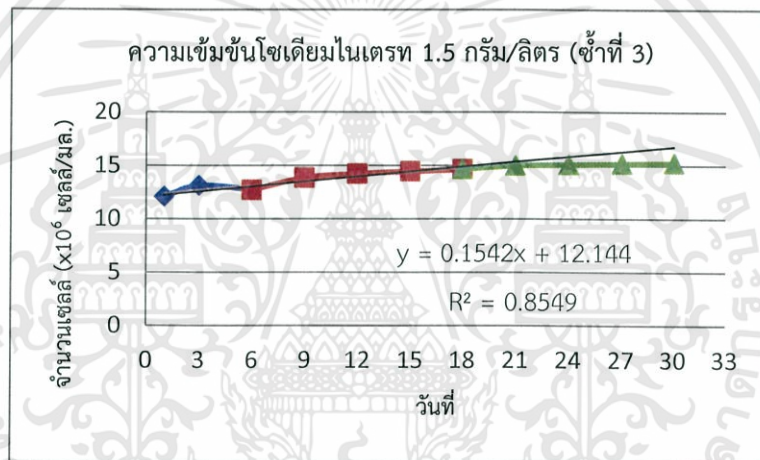
รูปที่ ข.1 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11



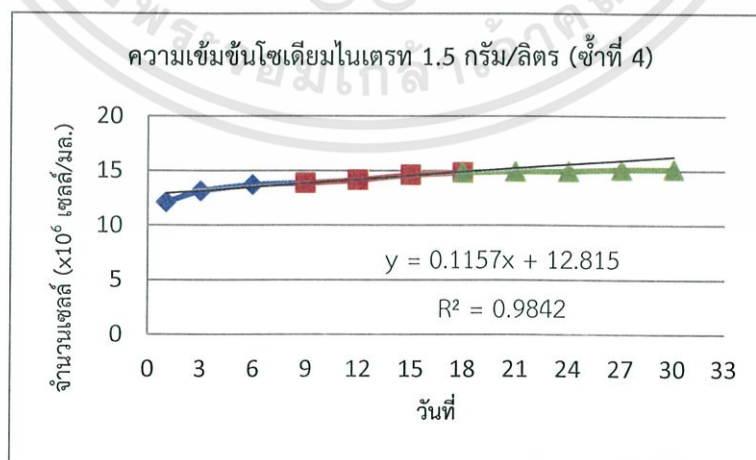
รูปที่ ข.2 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)



รูปที่ ข.3 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

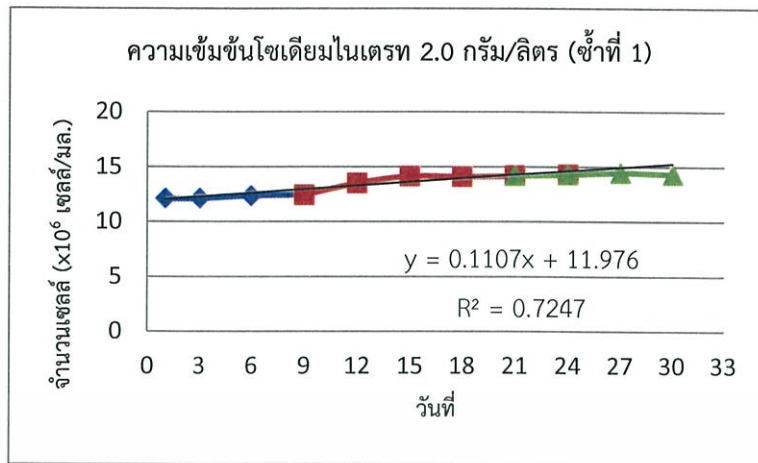


รูปที่ ข.4 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

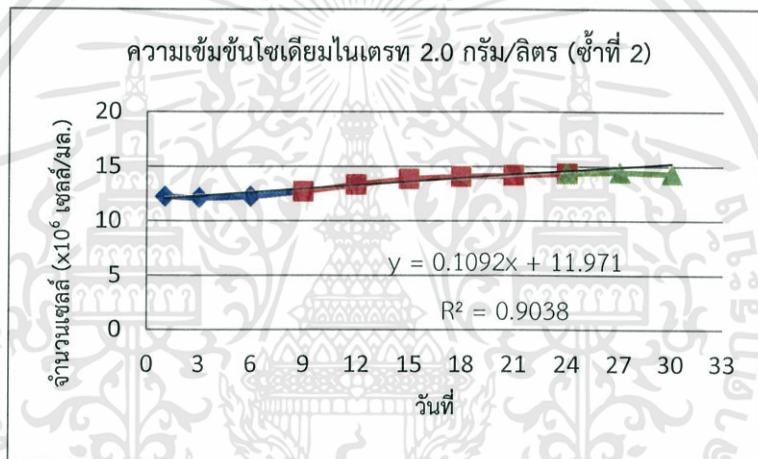


รูปที่ ข.5 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

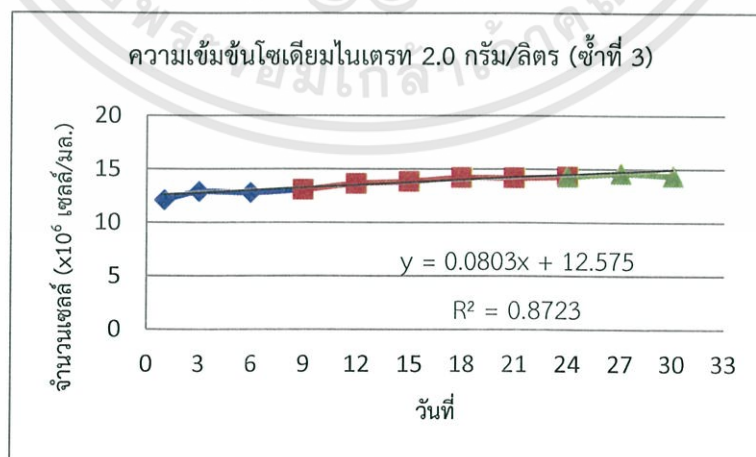
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.6 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

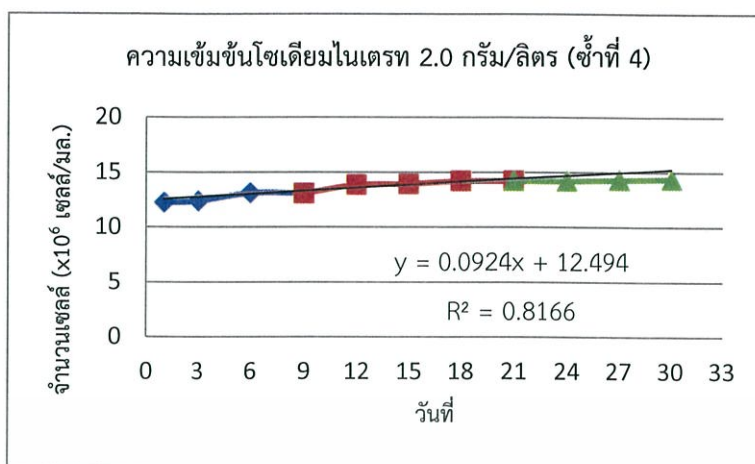


รูปที่ ข.7 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

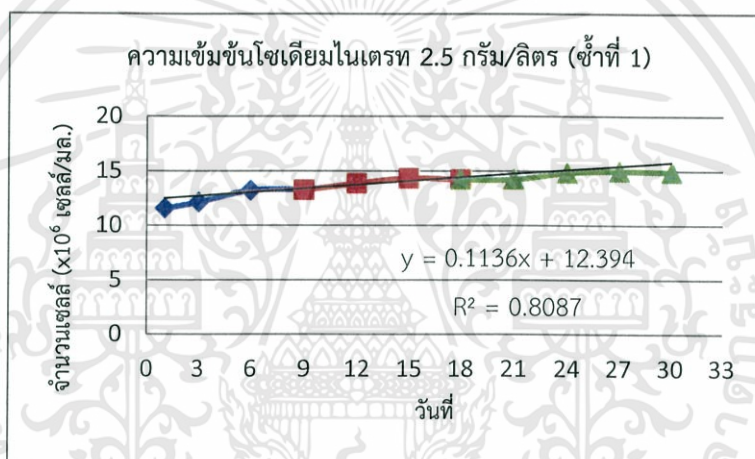


รูปที่ ข.8 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

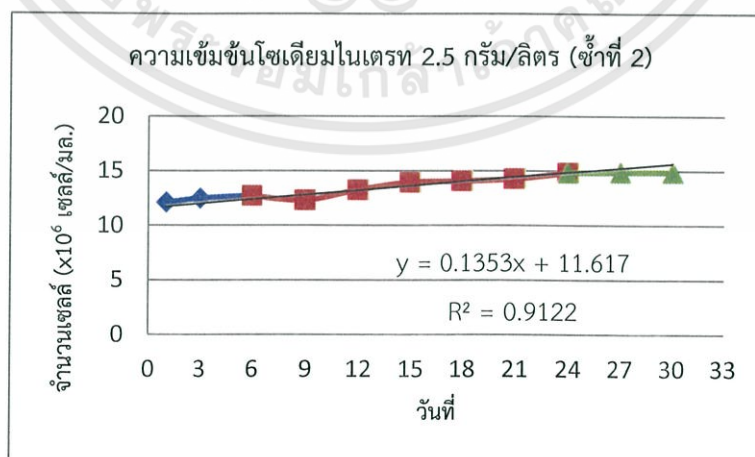
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.9 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

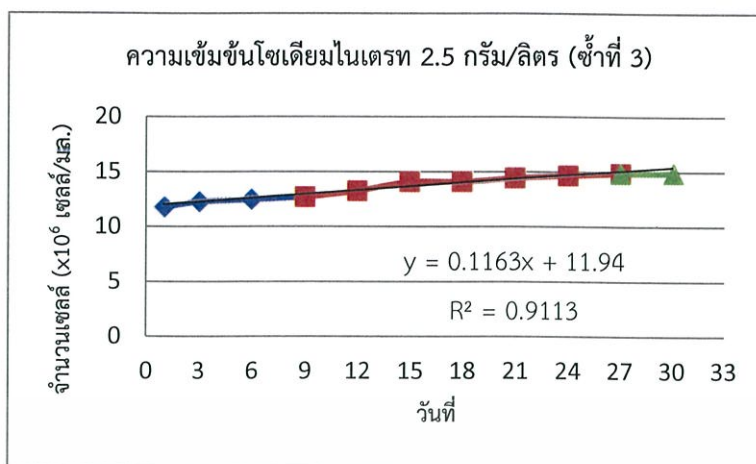


รูปที่ ข.10 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

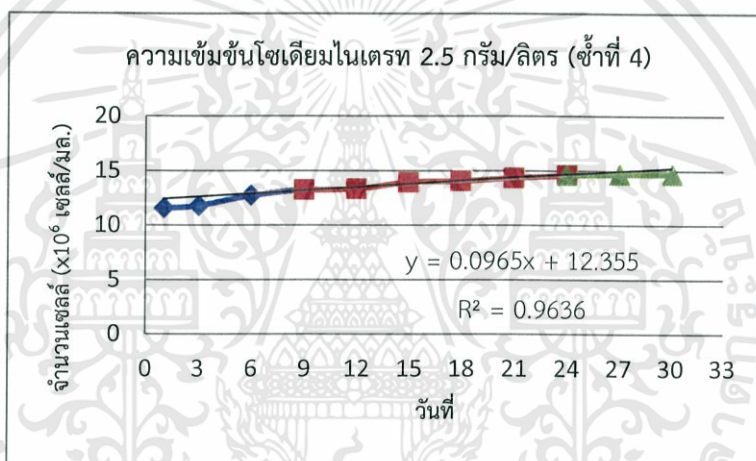


รูปที่ ข.11 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

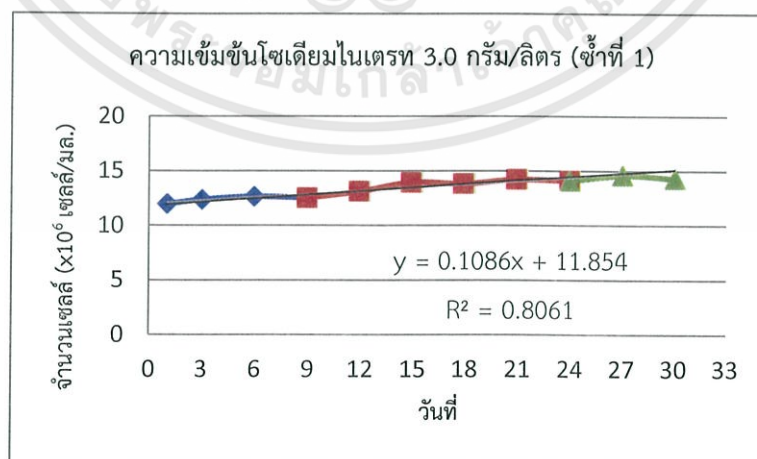
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.12 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

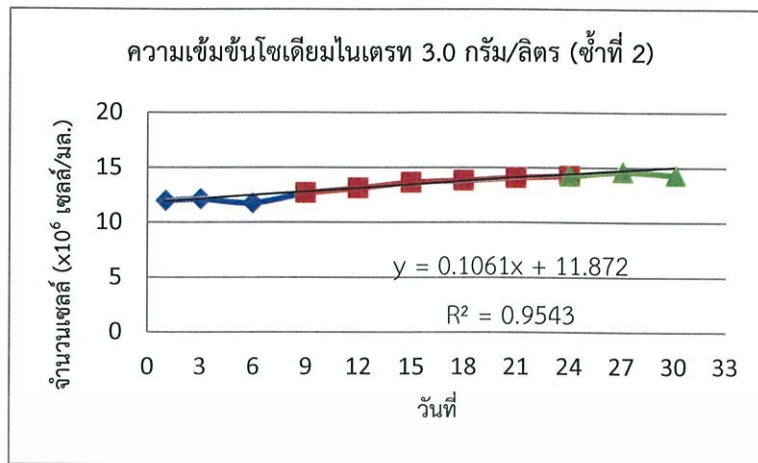


รูปที่ ข.13 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

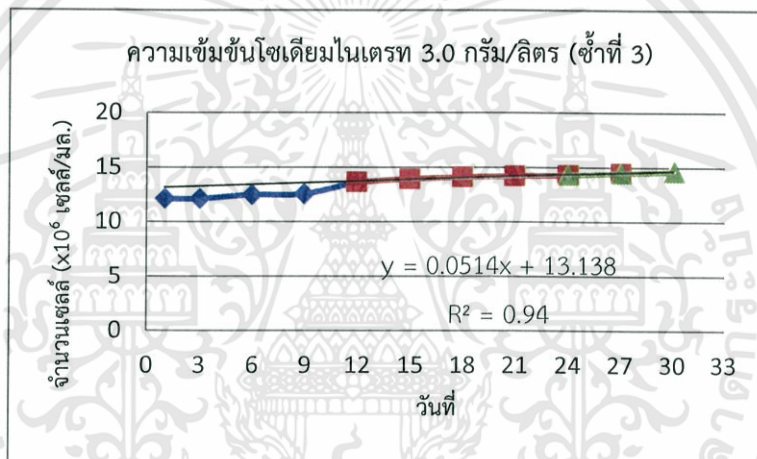


รูปที่ ข.14 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

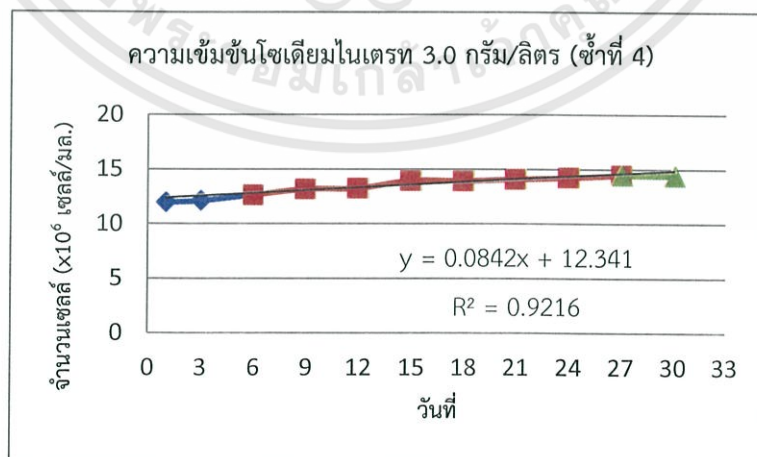
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.15 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

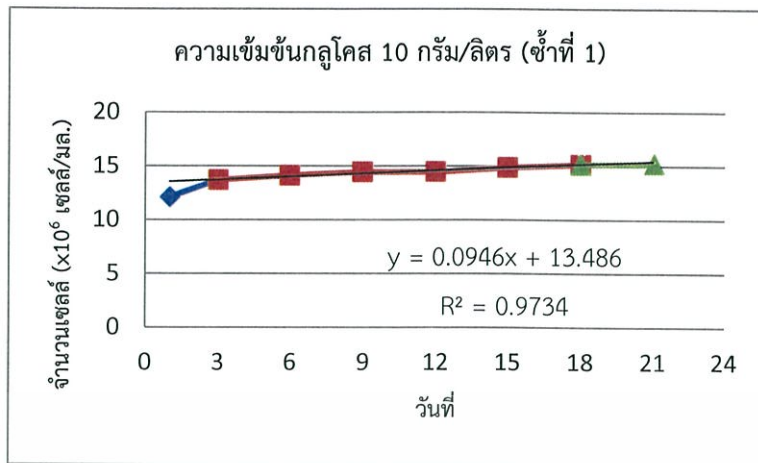


รูปที่ ข.16 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

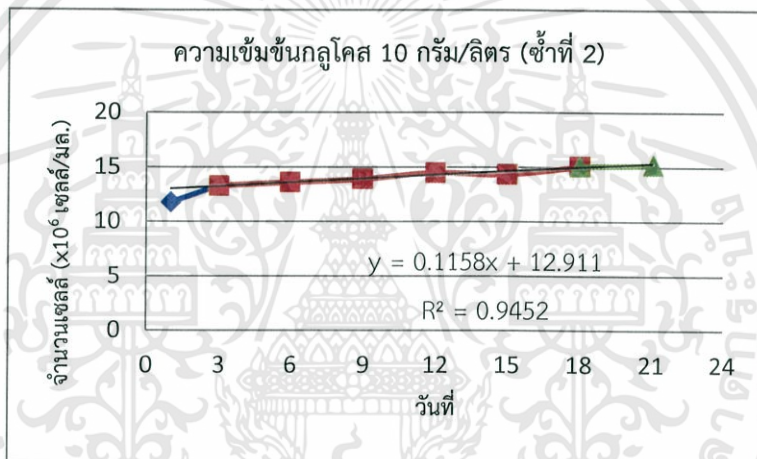


รูปที่ ข.17 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) ความเข้มข้น 3.0 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

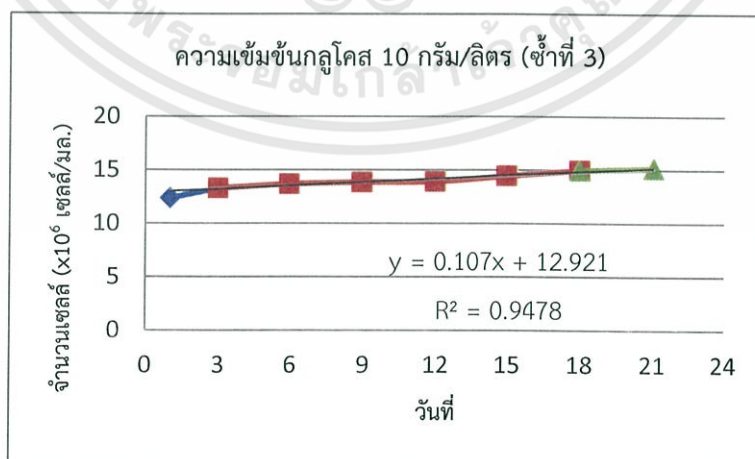
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.18 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

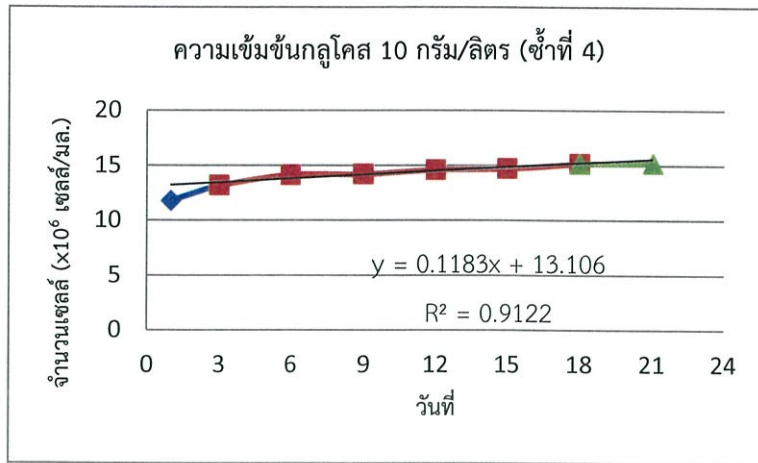


รูปที่ ข.19 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

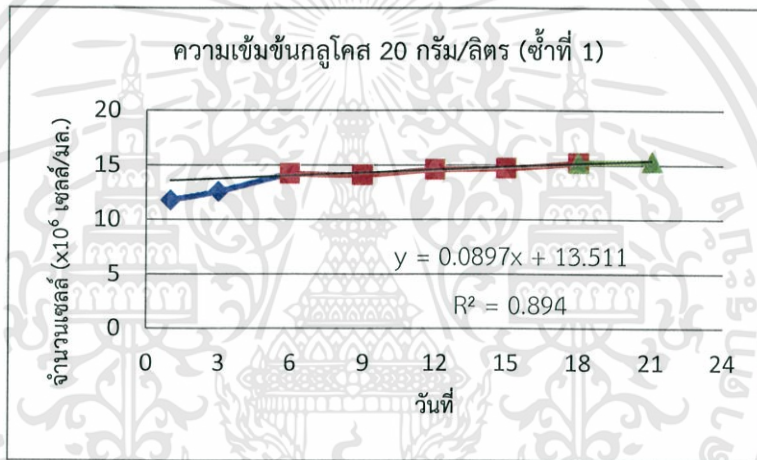


รูปที่ ข.20 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

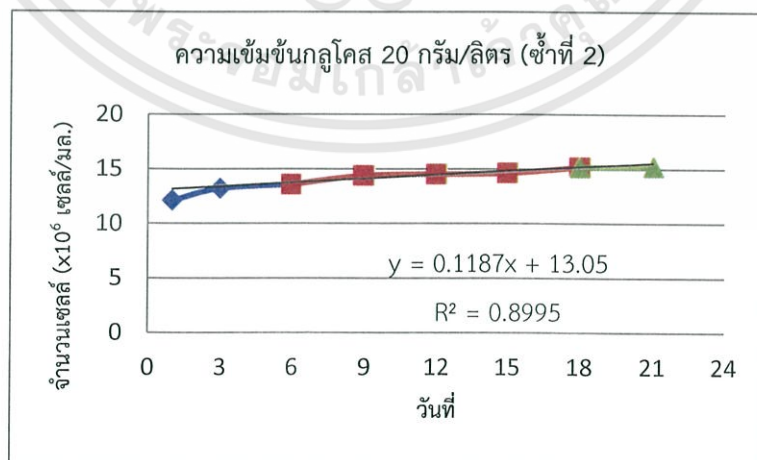
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.21 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

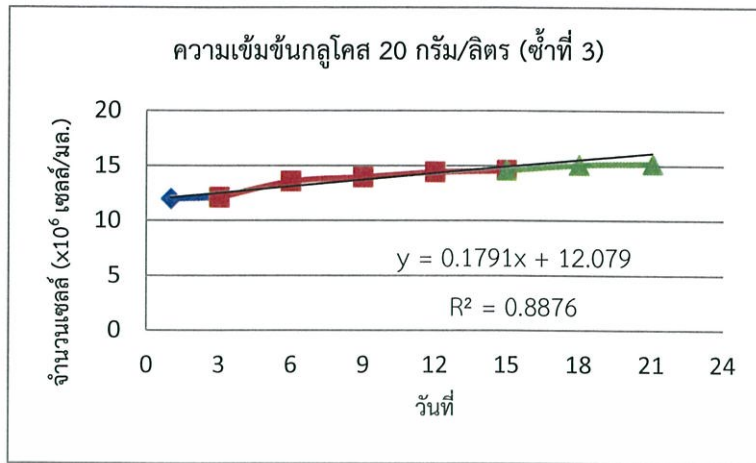


รูปที่ ข.22 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

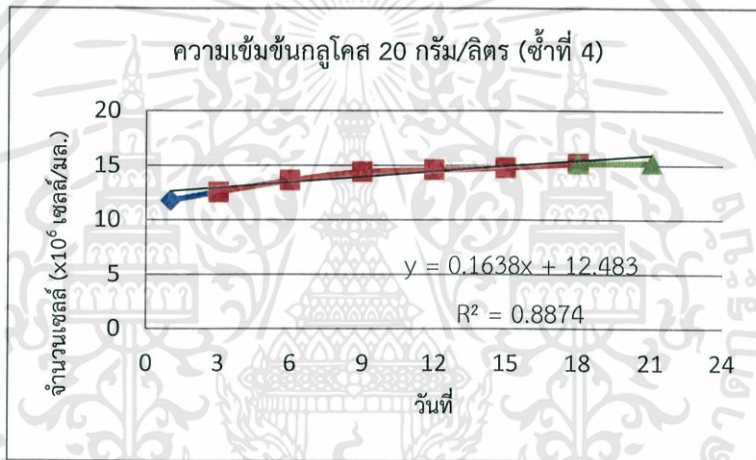


รูปที่ ข.23 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

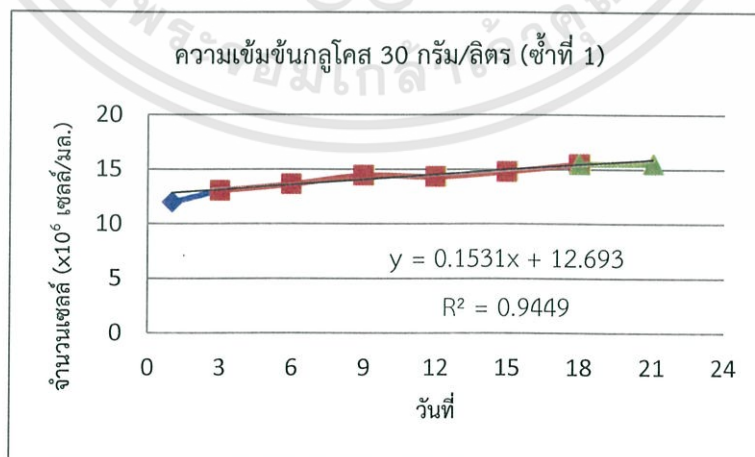
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.24 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

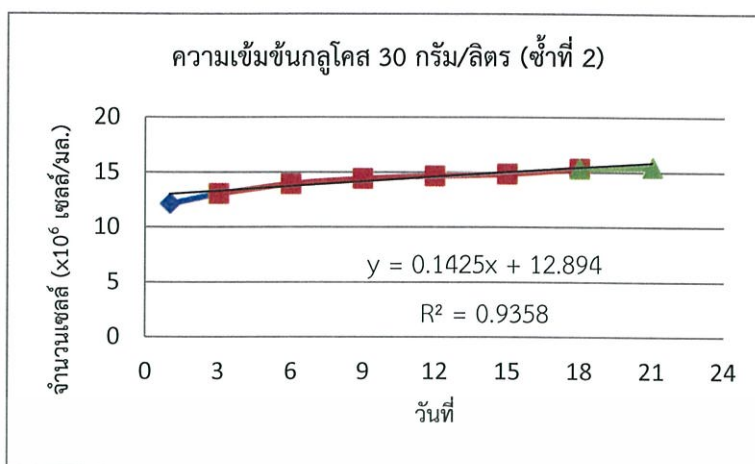


รูปที่ ข.25 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

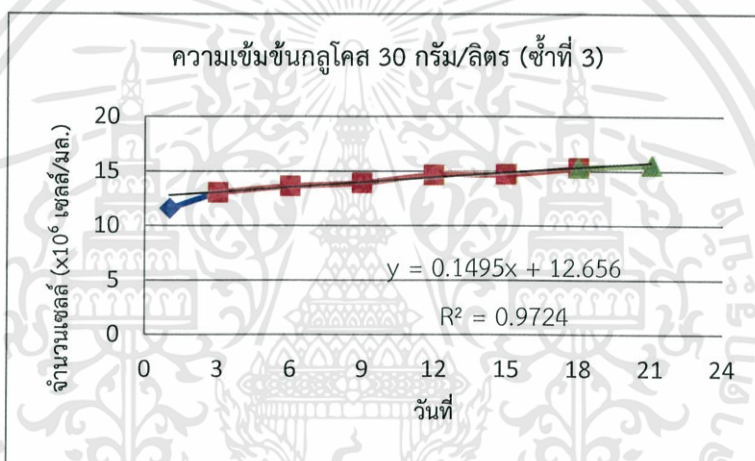


รูปที่ ข.26 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

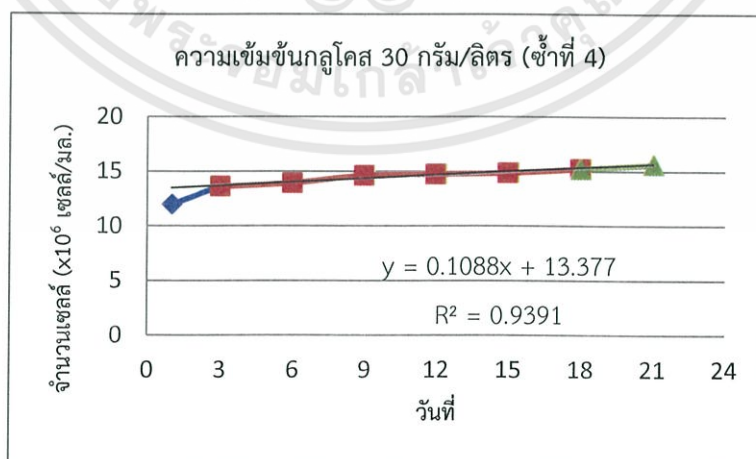
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.27 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

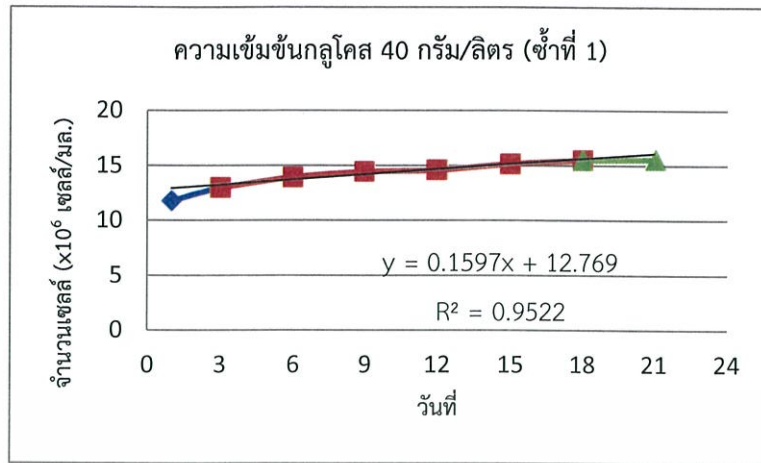


รูปที่ ข.28 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

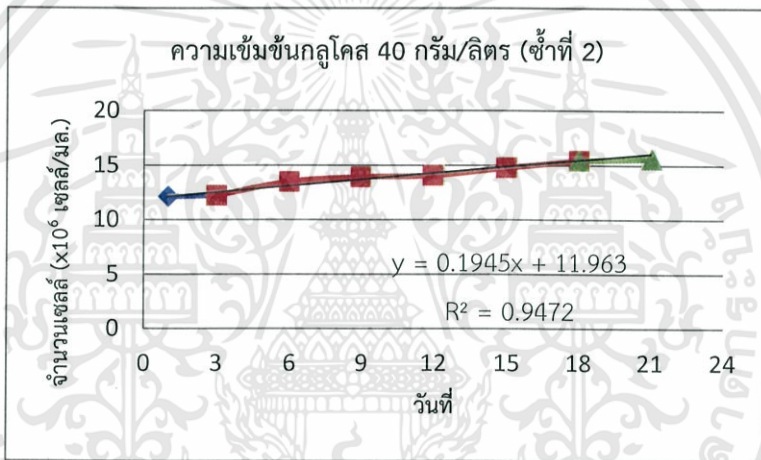


รูปที่ ข.29 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

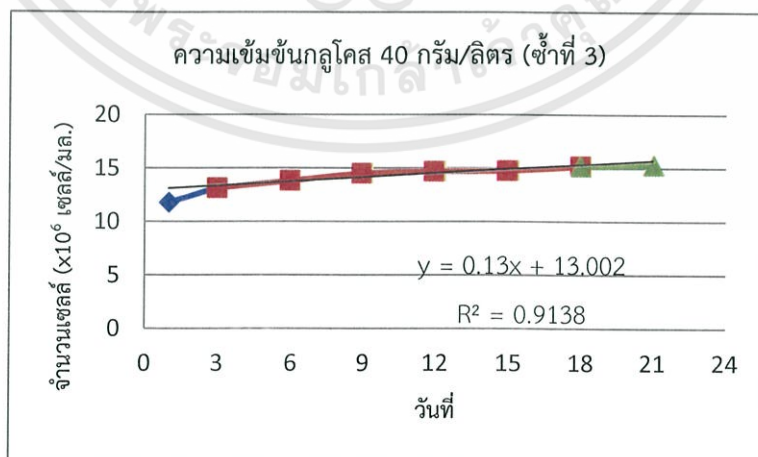
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.30 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

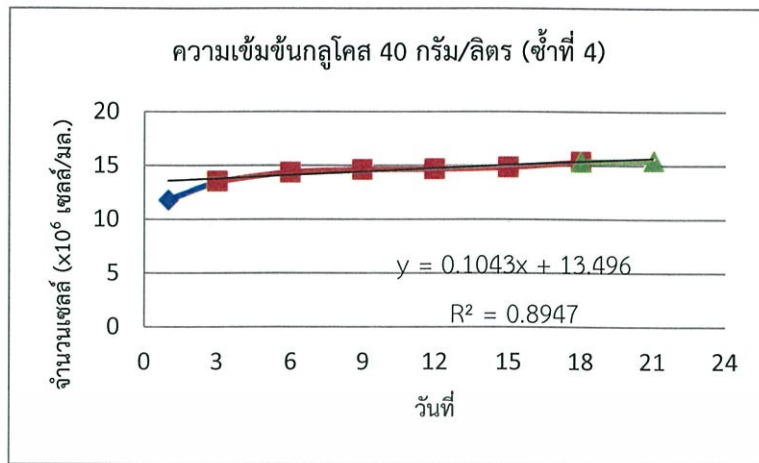


รูปที่ ข.31 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

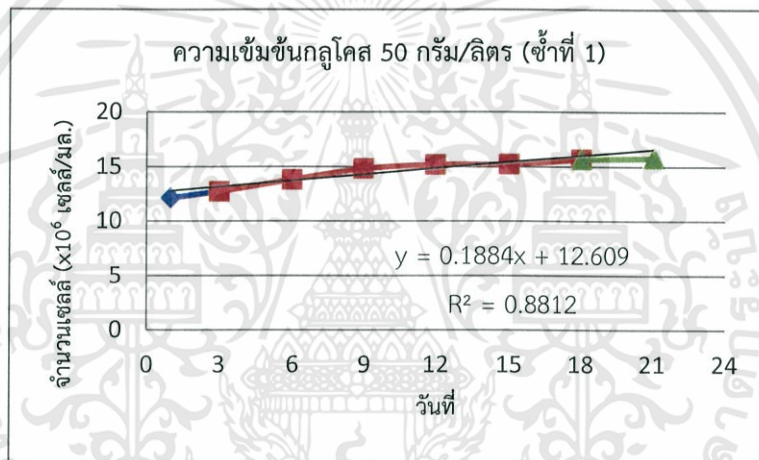


รูปที่ ข.32 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)

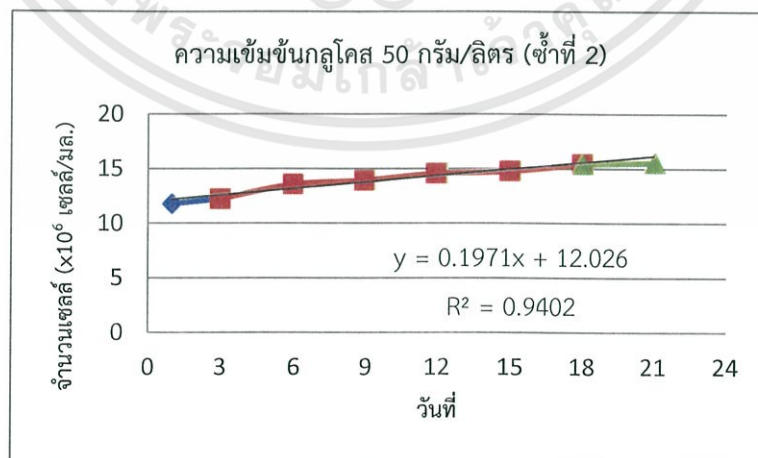
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.33 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

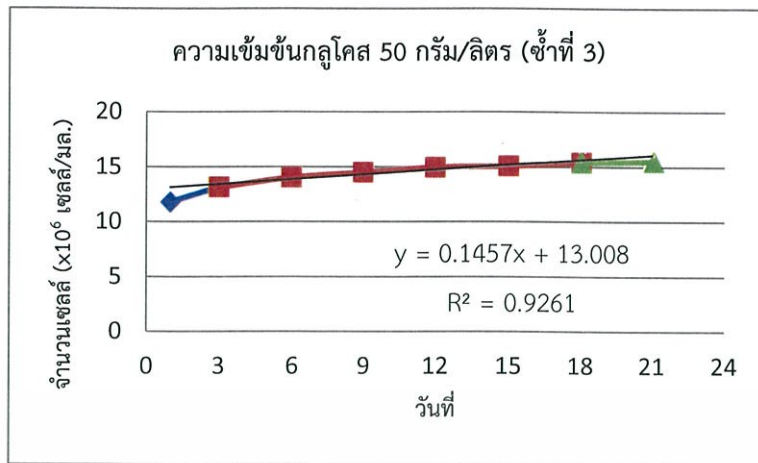


รูปที่ ข.34 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 1)

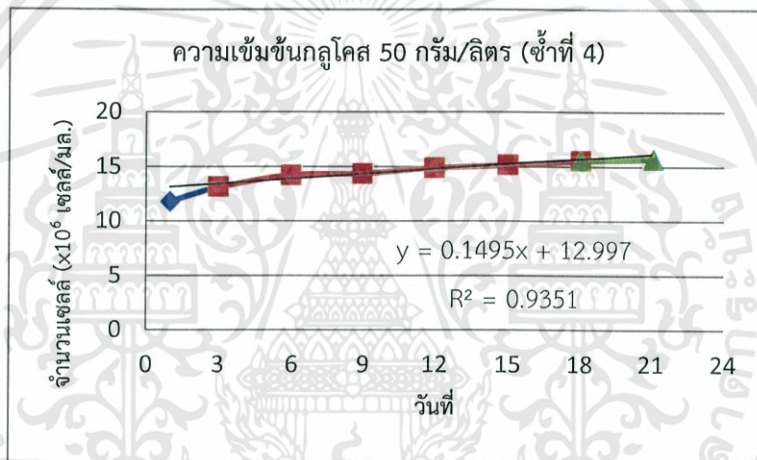


รูปที่ ข.35 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



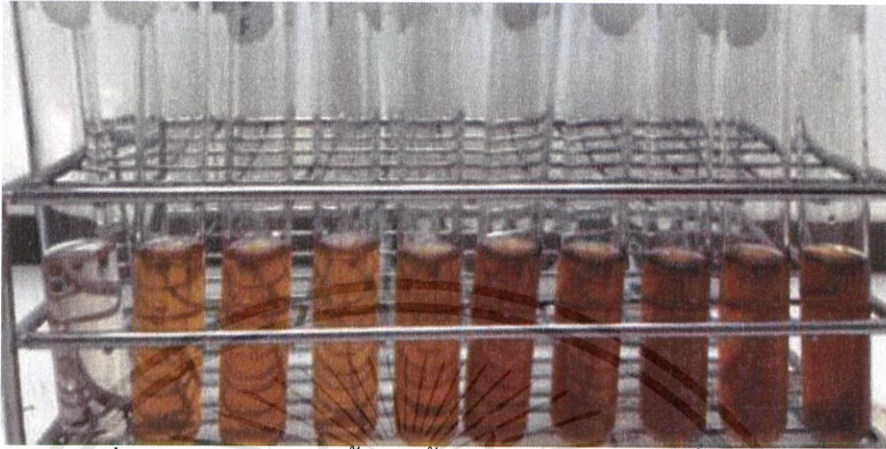
รูปที่ ข.36 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 3)



รูปที่ ข.37 กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu_{max}$ ) ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร (ซ้ำที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-Sulfuric method)

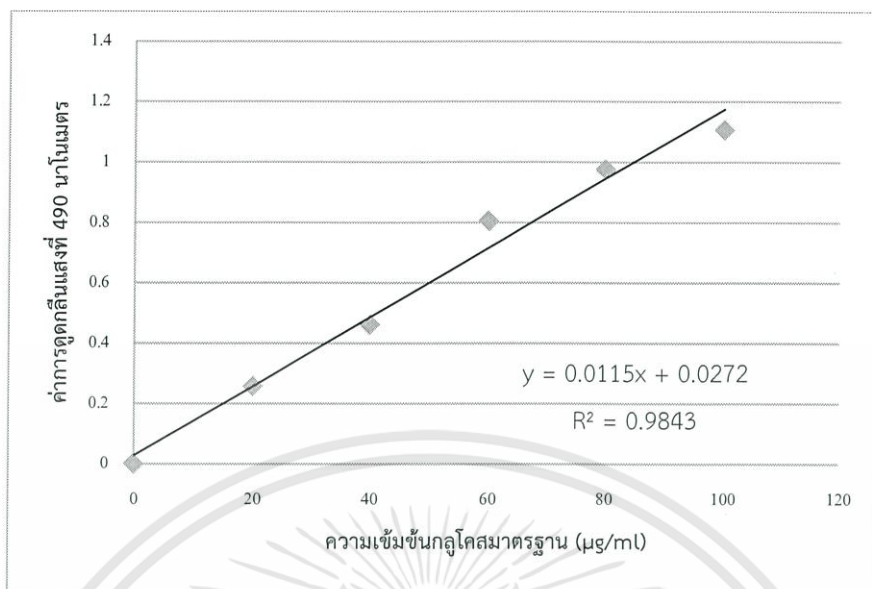


รูปที่ ข.38 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย

ตารางที่ ข.4 แสดงความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0
20	0.258
40	0.461
60	0.805
80	0.975
100	1.108

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.39 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลจากวิธีฟินอล-ซัลไฟวริก

จากสมการ  $y = ax + b$  ..... (ข.1)

โดยที่  $y$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

$x$  คือ ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

แทนค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรของสารตัวอย่างที่วัดได้ลงในสมการ เพื่อหาค่า  $x$  ตัวอย่างการคำนวณ

สารตัวอย่างมีค่าการดูดกลืนแสง 102.800

แทนค่าในสมการ  $y = 0.0115x + 0.0272$

$$x = (102.800 - 0.0272)/0.0115$$

$$x = 8936.7652 \text{ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร}$$

เปลี่ยนหน่วยจาก ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร)

$$= \frac{8936.7652 \text{ } \mu\text{g}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ } \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 8.936 \text{ g/L}$$

ดังนั้น สารตัวอย่างมีความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 8.936 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 ค่าการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีความเข้มข้นกลูโคสต่างกัน

วันที่	อาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร									
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	เจือจาง (เท่า)	ค่า OD ที่ได้	ความเข้มข้นน้ำตาล (ไม่โครกรัม/มล.)	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ลิตร)		
1	0.167	0.169	0.178	0.171	600	102.800	8936.7652	8.9368		
3	0.140	0.120	0.120	0.127	600	76.000	6606.3304	6.6063		
6	0.174	0.166	0.141	0.160	400	64.133	5574.4464	5.5744		
9	0.152	0.146	0.094	0.131	400	52.267	4542.5623	4.5426		
12	0.198	0.261	0.196	0.218	300	65.500	5693.2870	5.6933		
15	0.298	0.44	0.32	0.353	300	105.800	9197.6348	9.1976		
18	0.187	0.185	0.167	0.180	200	35.933	3122.2725	3.1223		
21	0.156	0.156	0.165	0.159	200	31.800	2762.8522	2.7629		
วันที่	อาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 20 กรัม/ลิตร									
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย	เจือจาง (เท่า)	ค่า OD ที่ได้	ความเข้มข้นน้ำตาล (ไม่โครกรัม/มล.)	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ลิตร)		
1	0.345	0.304	0.456	0.368	600	221.000	19215.0261	19.2150		
3	0.265	0.265	0.232	0.254	600	152.400	13249.8087	13.2498		
6	0.456	0.455	0.457	0.456	400	182.400	15858.5043	15.8585		
9	0.387	0.295	0.407	0.363	400	145.200	12623.7217	12.6237		
12	0.461	0.43	0.459	0.450	300	135.000	11736.7652	11.7368		
15	0.623	0.634	0.651	0.636	300	190.800	16588.9391	16.5889		

18	0.631	0.622	0.602	0.618	200	123.667	10751.2580	10.7513
21	0.198	0.205	0.212	0.205	200	41.000	3562.8522	3.5629
วันที่	อาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัม/ลิตร							
	ข้อที่ 1	ข้อที่ 2	ข้อที่ 3	เฉลี่ย	เจือจาง (เท่า)	ค่า OD ที่ได้	ความเข้มข้นน้ำตาล (ไม่โครกรม/มล.)	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ลิตร)
1	0.510	0.521	0.511	0.514	600	308.400	26815.0261	26.8150
3	0.432	0.477	0.438	0.449	600	269.400	23423.7217	23.4237
6	0.654	0.654	0.729	0.679	400	271.600	23615.0261	23.6150
9	0.493	0.494	0.671	0.553	400	221.067	19220.8232	19.2208
12	0.928	0.927	0.815	0.890	300	267.000	23215.0261	23.2150
15	0.905	0.905	1.064	0.958	300	287.400	24988.9391	24.9889
18	0.543	0.412	0.391	0.449	200	89.733	7800.5333	7.8005
21	0.334	0.402	0.502	0.413	200	82.533	7174.4464	7.1744
วันที่	อาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 40 กรัม/ลิตร							
	ข้อที่ 1	ข้อที่ 2	ข้อที่ 3	เฉลี่ย	เจือจาง (เท่า)	ค่า OD ที่ได้	ความเข้มข้นน้ำตาล (ไม่โครกรม/มล.)	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ลิตร)
1	0.783	0.73	0.783	0.765	600	459.200	39928.0696	39.9281
3	0.604	0.587	0.609	0.600	600	360.000	31301.9826	31.3020
6	1.122	1.043	1.122	1.096	400	438.267	38107.7797	38.1078
9	0.821	0.809	0.692	0.774	400	309.600	26919.3739	26.9194
12	1.045	1.042	1.032	1.040	300	311.900	27119.3739	27.1194
15	1.346	1.464	1.345	1.385	300	415.500	36128.0696	36.1281


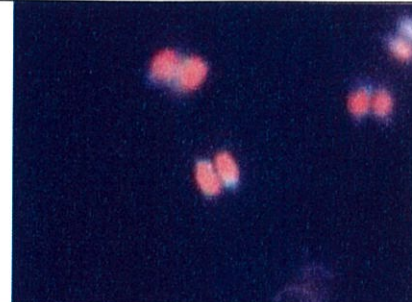
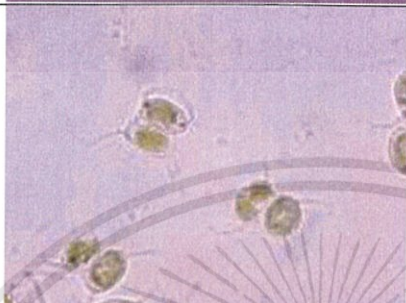







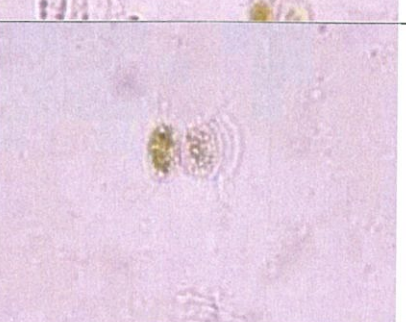

วัน	0.345	0.531	0.345	0.407	200	81.400	7075.8957	7.0759
21	0.512	0.524	0.498	0.511	200	102.267	8890.3884	8.8904
วันที่	อาหาร BG-11 ที่มีวิตามินซี 50 กรัม/ลิตร							
	ซัฟที่ 1	ซัฟที่ 2	ซัฟที่ 3	เฉลี่ย	เงืงจาง (เพำ)	ค่า OD ที่ได้	ความเข้มซันน้าตาล (ไมโครกรัม/มล.)	ความเข้มซันน้าตาล (กรัม/ลิตร)
1	0.986	0.985	0.879	0.950	600	570.000	49562.8522	49.5629
3	0.732	0.705	0.698	0.712	600	427.000	37128.0696	37.1281
6	1.435	1.482	1.367	1.428	400	571.200	49667.2000	49.6672
9	1.201	1.13	1.201	1.177	400	470.933	40948.3594	40.9484
12	1.298	1.278	1.342	1.306	300	391.800	34067.2000	34.0672
15	1.865	1.987	1.674	1.842	300	552.600	48049.8087	48.0498
18	0.986	0.612	0.731	0.776	200	155.267	13499.0841	13.4991
21	0.985	0.785	0.763	0.844	200	168.867	14681.6928	14.6817

#### ข-4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red method)

ตารางที่ ข.6 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับ *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)


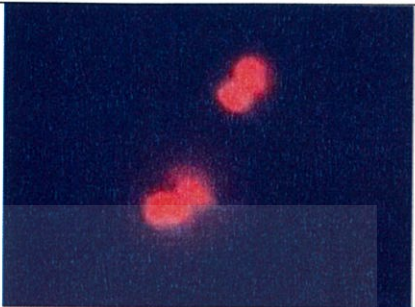

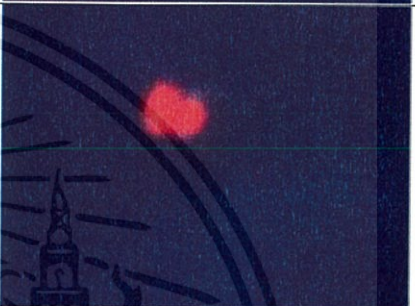






วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
1		
3		
6		
9		
12		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้









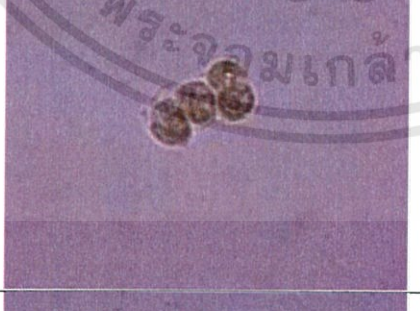



15		
18		
21		
24		
27		
30		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับ *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.0 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)










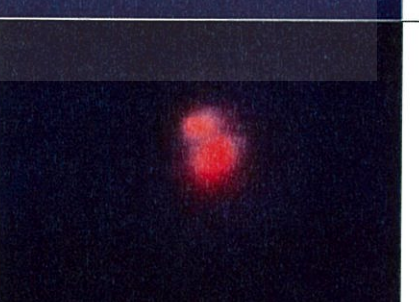
วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
1		
3		
6		
9		
12		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

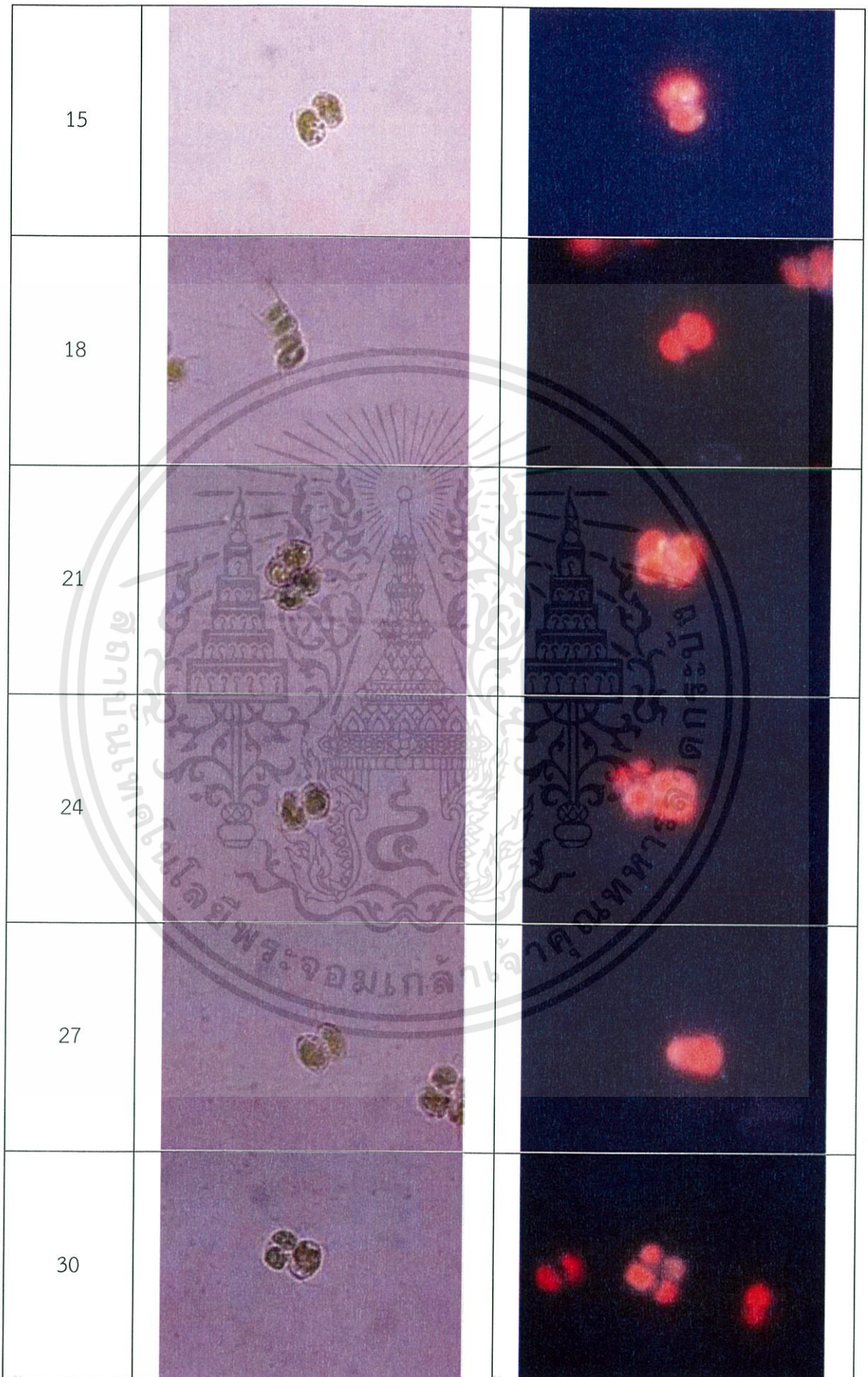
15		
18		
21		
24		
27		
30		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับยี่ห้อ *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)

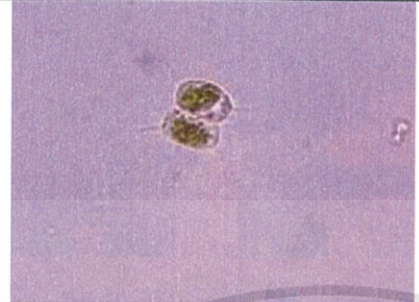







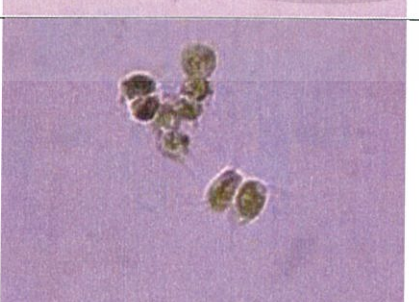

วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
1		
3		
6		
9		
12		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



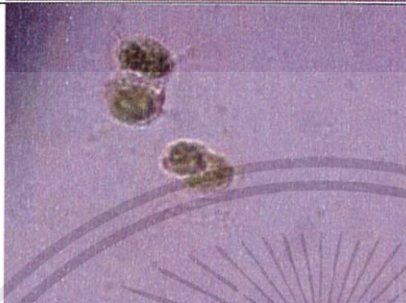



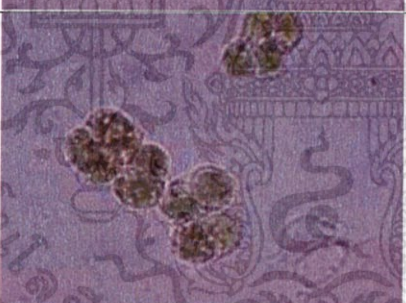




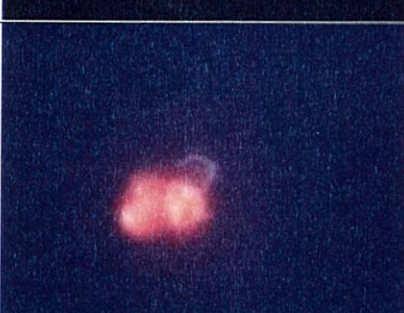


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับ *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท 3.0 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)


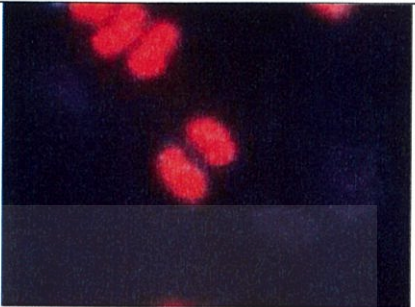




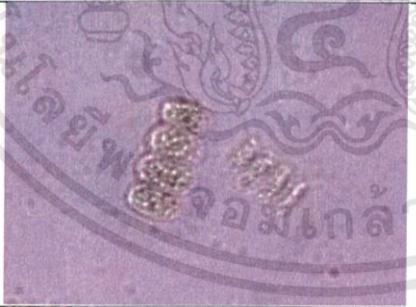
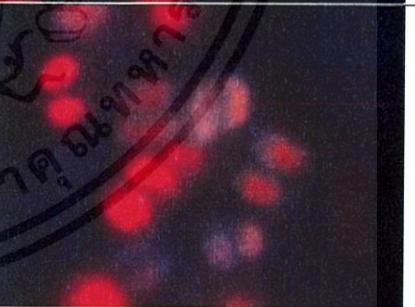


วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
1		
3		
6		
9		
12		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15		
18		
21		
24		
27		
30		

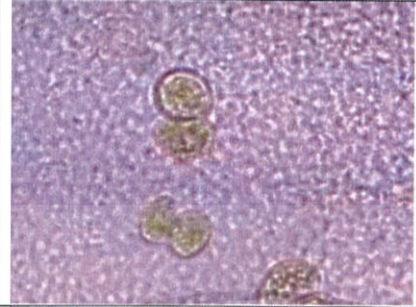
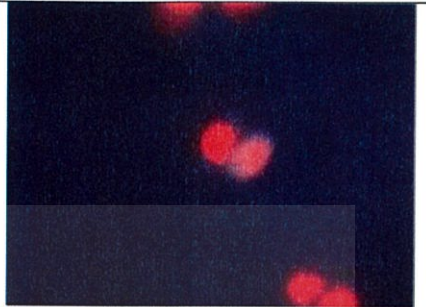

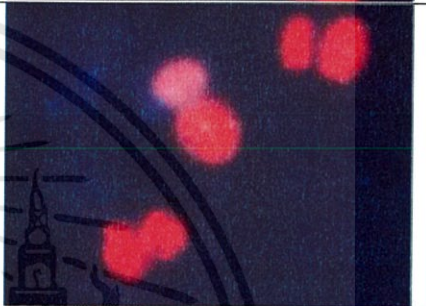



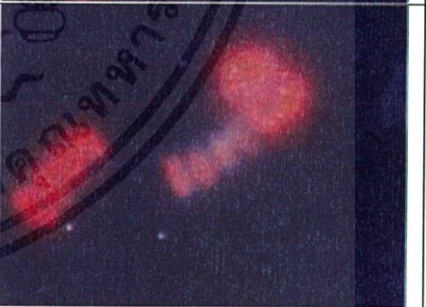

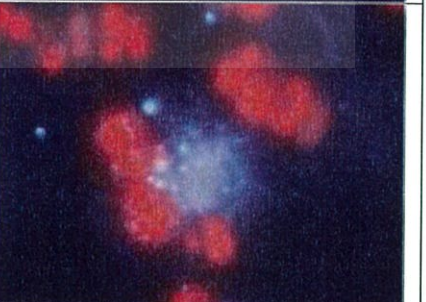
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับยัย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)

วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
3		
6		
9		
12		
15		


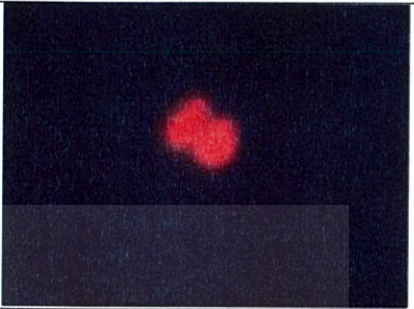

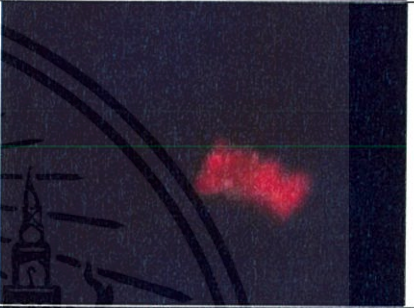




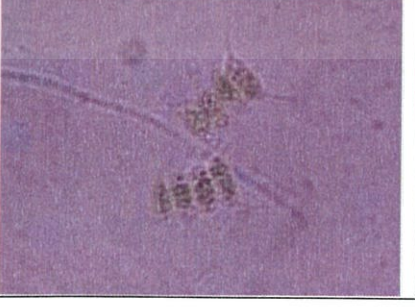

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.11 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับ *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นกลูโคส 20 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)

วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
3		
6		
9		
12		
15		


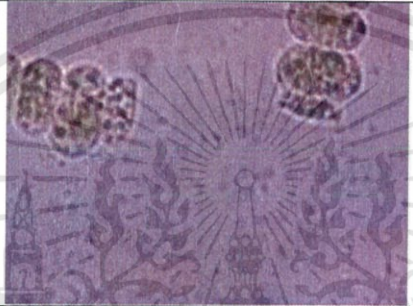
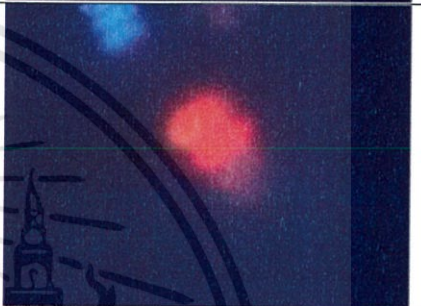
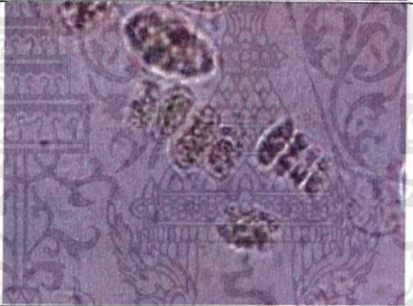
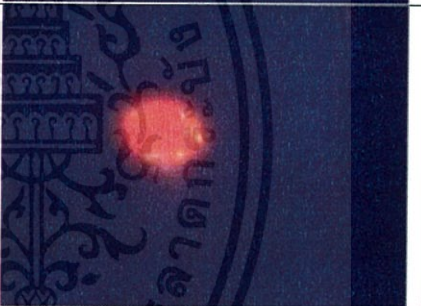




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับ *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)

วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
3		
6		
9		
12		
15		



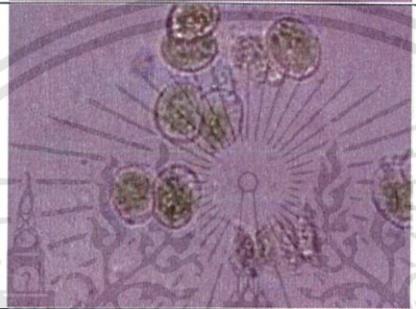
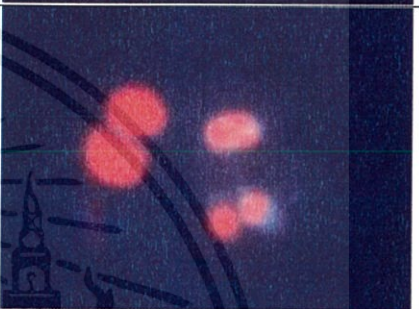

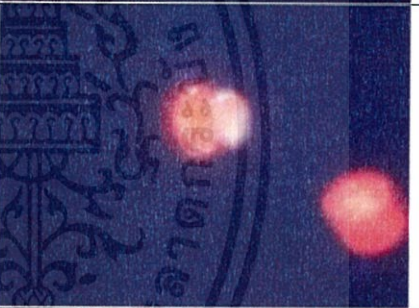
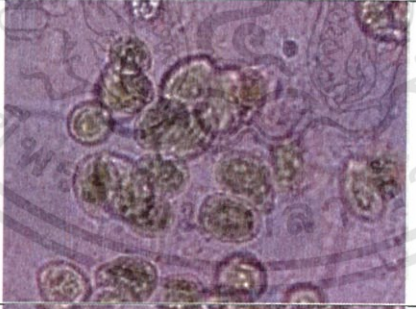

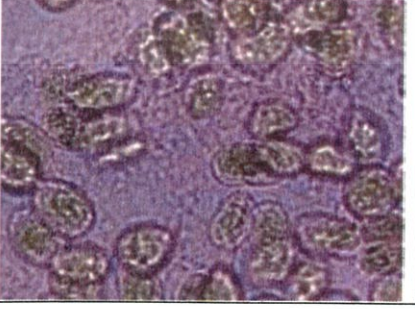

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.13 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสำหรับ *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นกลูโคส 40 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)

วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
3		
6		
9		
12		
15		

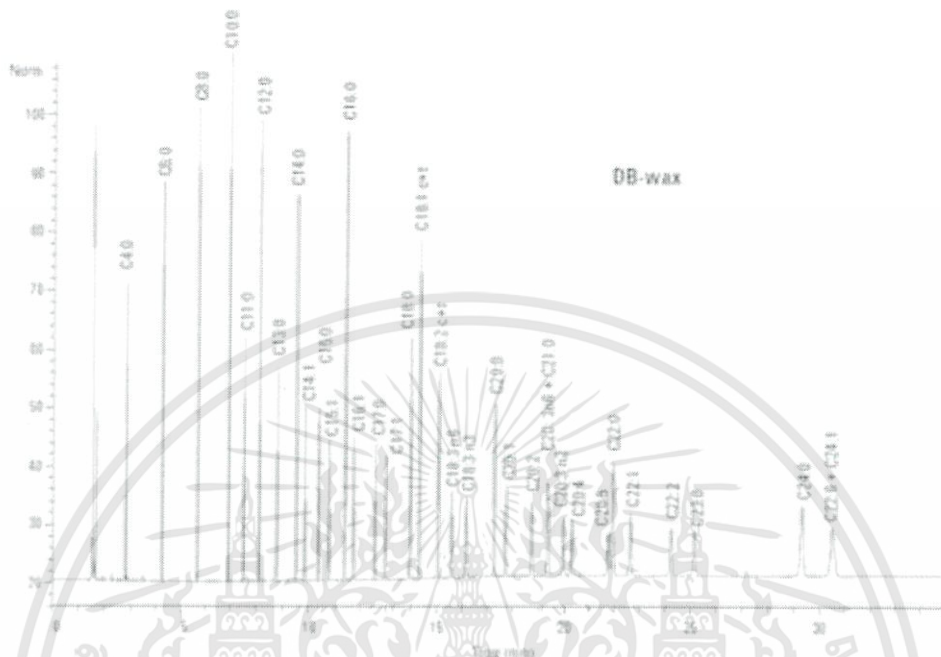
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.14 ผลวิเคราะห์ปริมาณไขมันสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มี  
ความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัม/ลิตร ด้วยวิธีไนล์เรด (Nile red)

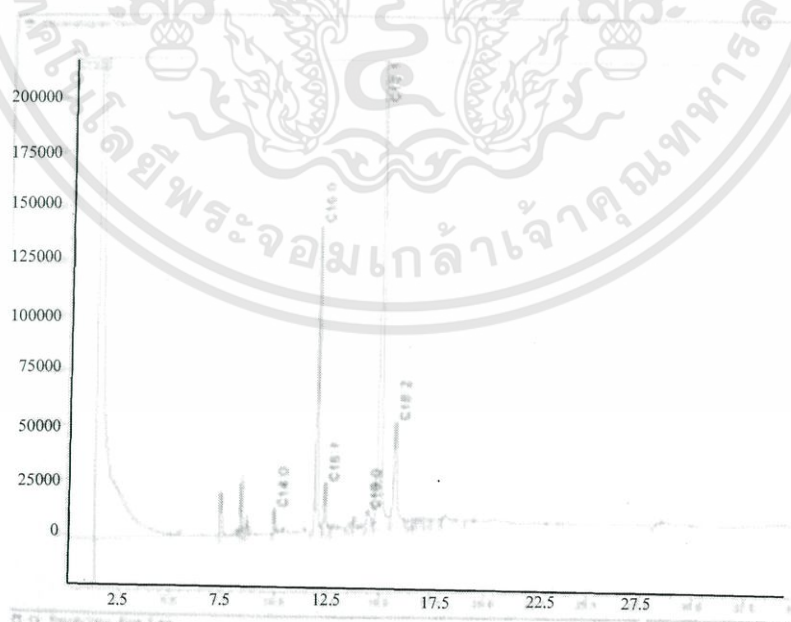
วันที่	Bright field (100X)	fluorescent Nile red (100X)
3		
6		
9		
12		
15		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ข-5 การวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)



รูปที่ ข.40 กราฟมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (37-component FAMES standard mixture) ที่วิเคราะห์โดย GC-FID โดยใช้คอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m) (ที่มา: David และคณะ, 2005)

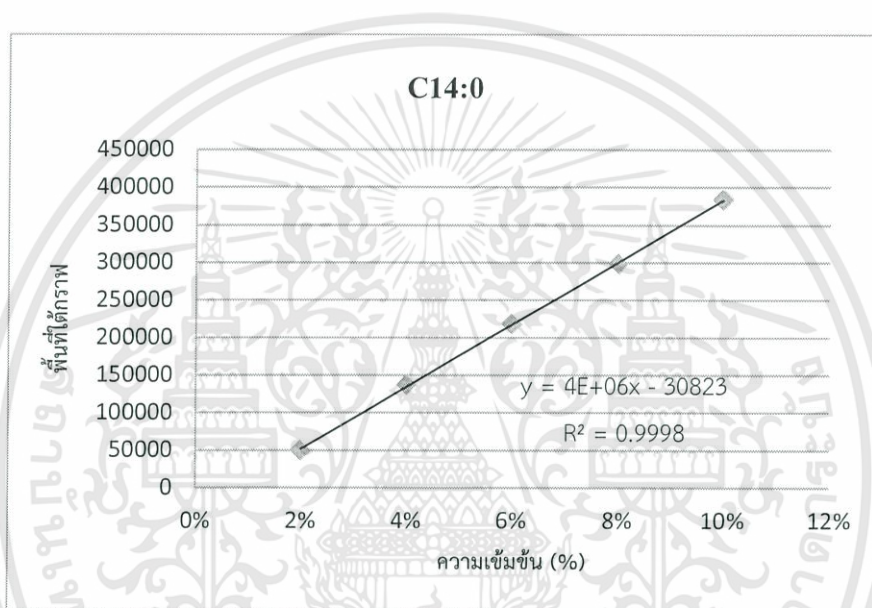


รูปที่ ข.41 ตัวอย่างกราฟกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1) ที่วิเคราะห์โดย GC-FID โดยใช้คอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.15 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Myristic acid (C14:0) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)	Retention Time (นาที)
2%	50240	9.927
4%	137283	9.865
6%	218806	9.871
8%	298492	9.864
10%	383922	9.856

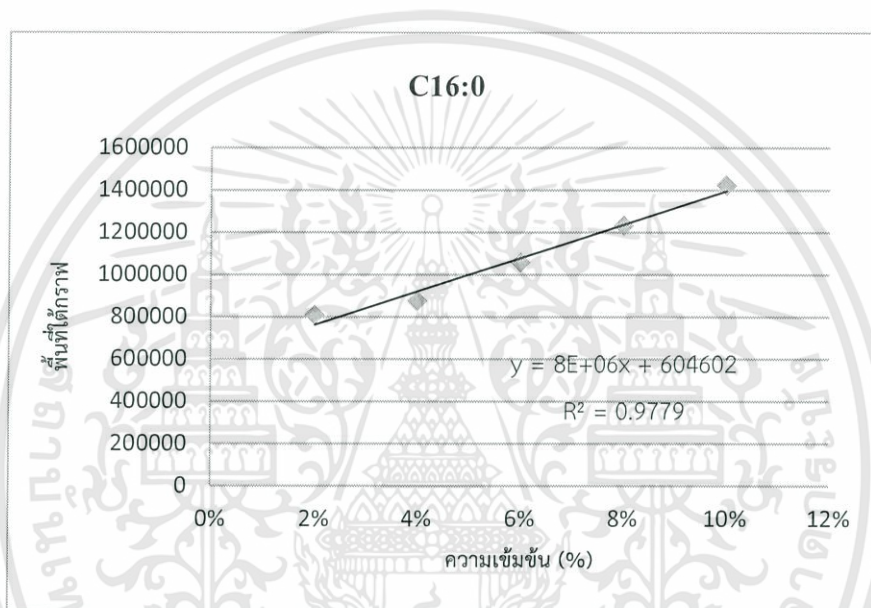


รูปที่ ข.42 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Myristic acid (C14:0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.16 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitic acid (C16:0) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)	Retention Time (นาที)
2%	810444	11.878
4%	875218	11.839
6%	1057799	11.835
8%	1232003	11.841
10%	1424303	11.840

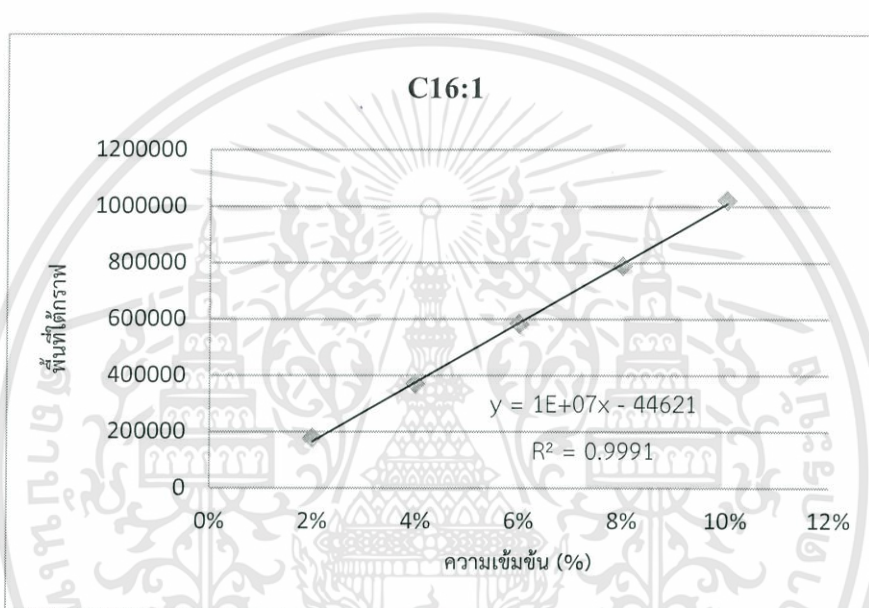


รูปที่ ข.43 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitic acid (C16:0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.17 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitoleic acid (C16:1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)	Retention Time (นาที)
2%	176607	12.329
4%	370039	12.277
6%	582457	12.280
8%	789155	12.274
10%	1021255	12.266

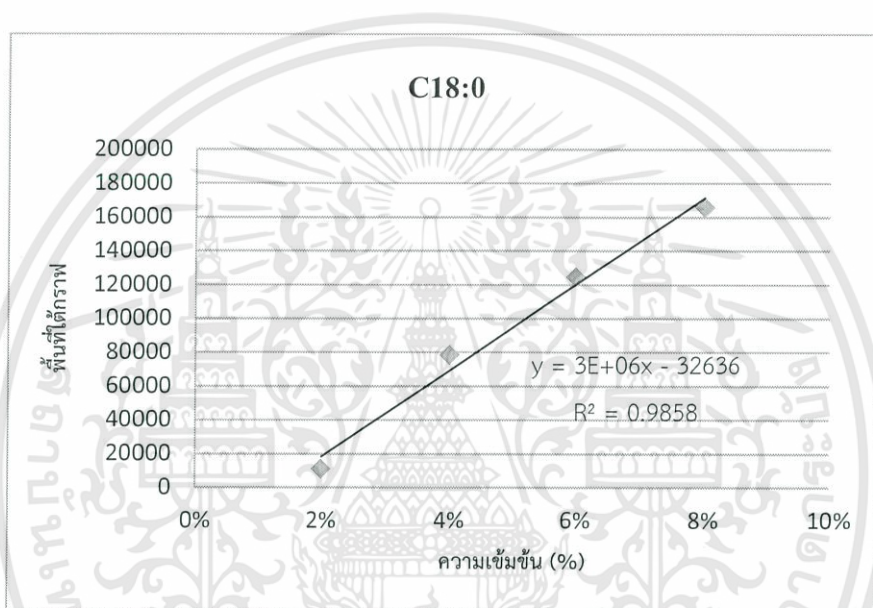


รูปที่ ข.44 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Palmitoleic acid (C16:1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.18 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Stearic acid (C18:0) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)	Retention Time (นาที)
2%	10983	14.366
4%	78557	14.337
6%	124594	14.346
8%	165795	14.382
10%	122047	14.379

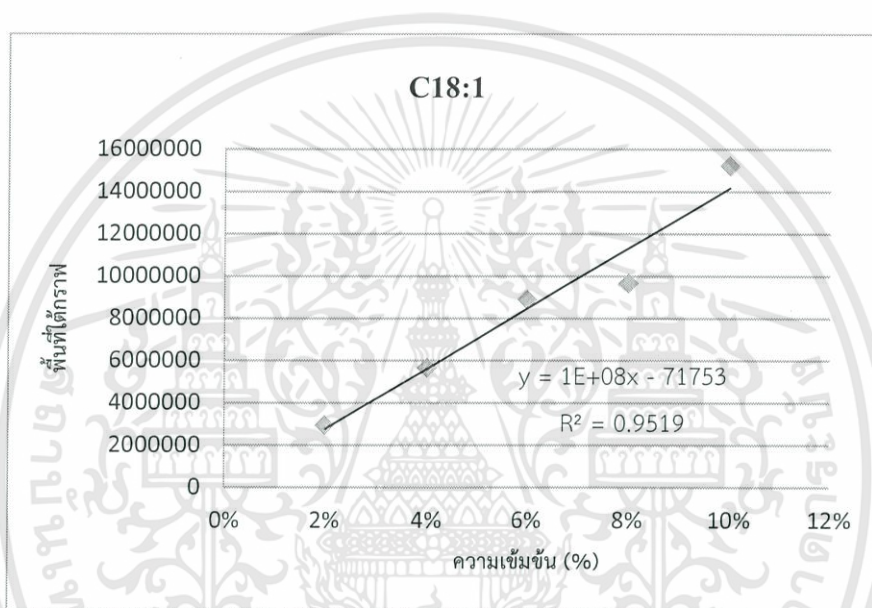


รูปที่ ข.45 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Stearic acid (C18:0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.19 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Oleic acid (C18:1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)	Retention Time (นาที)
2%	2960164	14.901
4%	5658775	14.951
6%	8899471	15.024
8%	9648043	15.011
10%	15210904	15.139

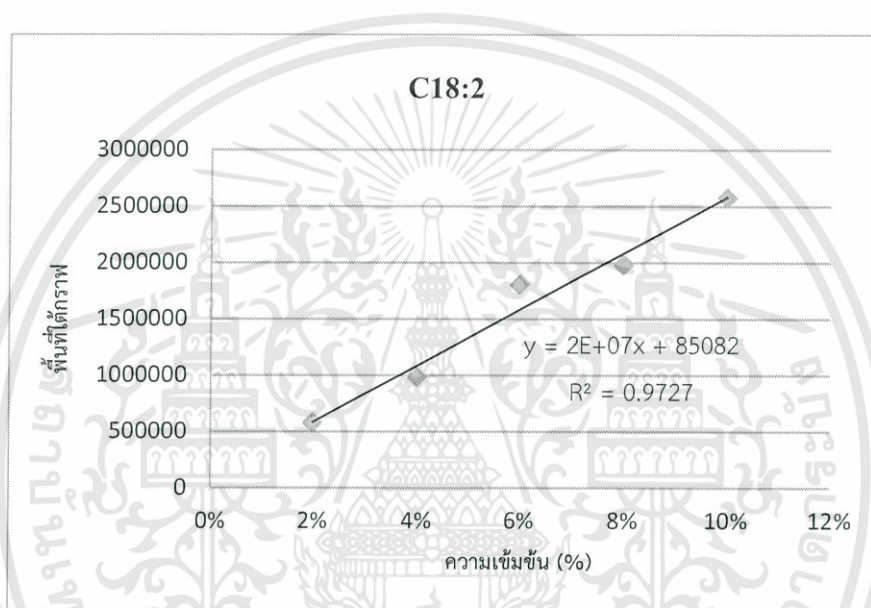


รูปที่ ข.46 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Oleic acid (C18:1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.20 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของ Linoleic acid (C18:2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% v/v)	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)	Retention Time (นาที)
2%	575477	15.642
4%	983964	15.604
6%	1805966	15.630
8%	1980452	15.657
10%	2576075	15.667



รูปที่ ข.47 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของ Linoleic acid (C18:2)

ตารางที่ ข.21 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) ที่ได้จากสาหร่าย

ชนิดกรดไขมัน	พื้นที่ใต้กราฟ (Area)	Retention Time (นาที)
Myristic acid (C14:0)	25050	9.915
Palmitic acid (C16:0)	1324068	11.861
Palmitoleic acid (C16:1)	6689	12.282
Stearic acid (C18:0)	127762	14.399
Oleic acid (C18:1)	1353949	14.857
Linoleic acid (C18:2)	315502	15.653

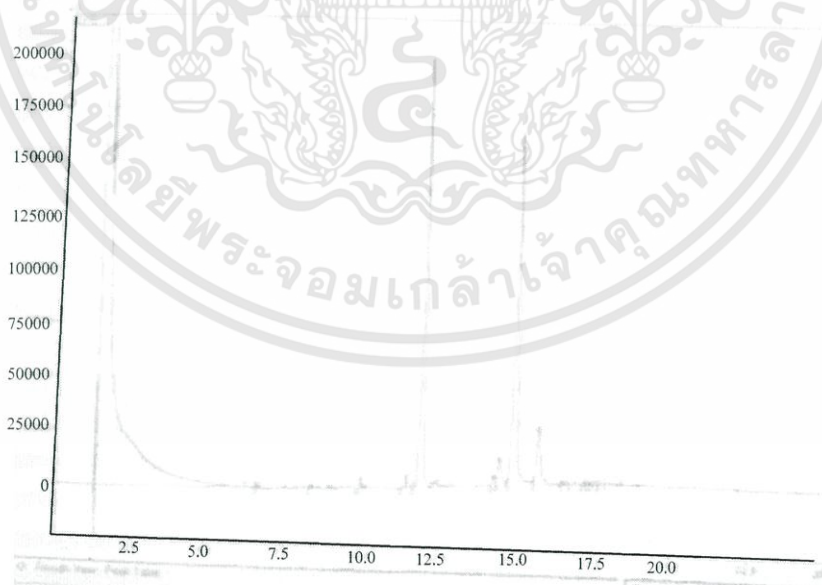
การคำนวณปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ (y) (วรรณิ ปะกังกร, 2542)

$$\%y = 100 \times \frac{A_y}{\sum A_y} \dots\dots\dots (ข.2)$$

%y = ปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิด (%)

$A_y$  = พื้นที่ของกรดไขมันแต่ละชนิด

$\sum A_y$  = พื้นที่รวมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างที่วิเคราะห์



รูปที่ ข.48 กราฟเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) จากน้ำมันสาหร่าย ที่วิเคราะห์โดย GC-FID โดยใช้คอลัมน์ DB-Wax (30 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้น โยเคียมไม่แตกต่างกัน

Oneway

Descriptives									
อัตราการใช้ยาเฉพาะ									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
1.5 g/L	4	.134025	.0180141	.0090071	.105360	.162690	.1157	.1542	
2.0 g/L	4	.098150	.0145062	.0072531	.075067	.121233	.0803	.1107	
2.5 g/L	4	.115425	.0158878	.0079439	.090144	.140706	.0965	.1353	
3.0 g/L	4	.087575	.0264905	.0132453	.045423	.129727	.0514	.1086	
Total	16	.108794	.0250916	.0062729	.095423	.122164	.0514	.1542	

ANOVA					
อัตราการใช้ปุ๋ย					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	3	.002	4.456	.025
Within Groups	.004	12	.000		
Total	.009	15			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

อัตราการใช้ปุ๋ย					
ความเข้มข้น	N	1	2	Subset for alpha = 0.05	
Duncan <sup>a</sup>	4	.087575			
3.0 g/L	4	.098150			
2.0 g/L	4	.115425			.115425
2.5 g/L	4				.134025
1.5 g/L	4				.198
Sig.		.075			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ ค.2 ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่ต่างกัน

Oneway

Descriptives									
อัตราการเจริญจำเพาะ									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
10 g/L	4	.108925	.0107093	.0053547	.091884	.125966	.0946	.1183	
20 g/L	4	.137825	.0410695	.0205347	.072474	.203176	.0897	.1791	
30 g/L	4	.138475	.0202669	.0101335	.106226	.170724	.1088	.1531	
40 g/L	4	.147125	.0388577	.0194289	.085294	.208956	.1043	.1945	
50 g/L	4	.170175	.0263539	.0131770	.128240	.212110	.1457	.1971	
Total	20	.140505	.0332302	.0074305	.124953	.156057	.0897	.1971	

ANOVA					
อัตราการใช้ปุ๋ย					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.008	4	.002	2.188	.120
Within Groups	.013	15	.001		
Total	.021	19			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

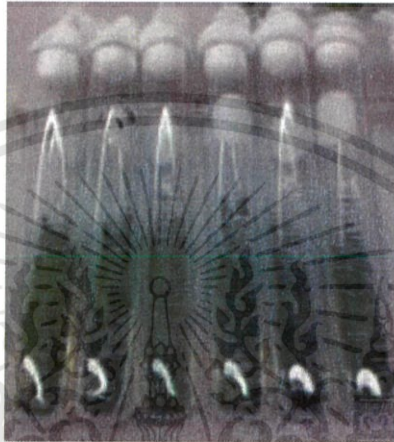
อัตราการใช้ปุ๋ย					
		N	Subset for alpha = 0.05		
ความเข้มข้น			1	2	
10 g/L		4	.108925		
20 g/L		4	.137825		.137825
30 g/L		4	.138475		.138475
40 g/L		4	.147125		.147125
50 g/L		4			.170175
Sig.			.114		.176

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

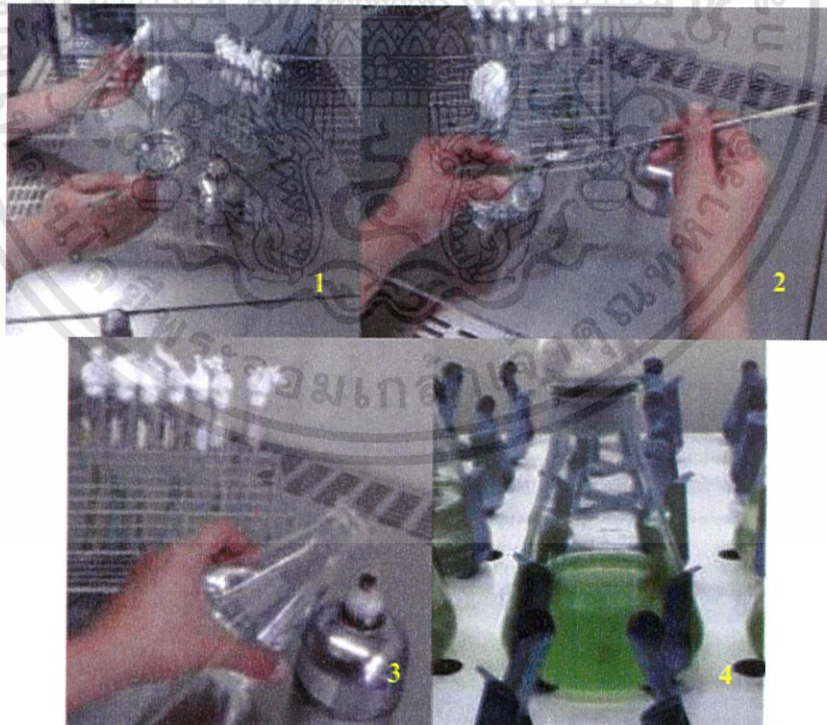
## ภาคผนวก ง

### รูปการปฏิบัติงาน

ง-1 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับการทดลอง



รูปที่ ง.1 หัวเชื้อบริสุทธิ์ *Scenedesmus armatus* ในหลอดอาหารเอียง BG-11



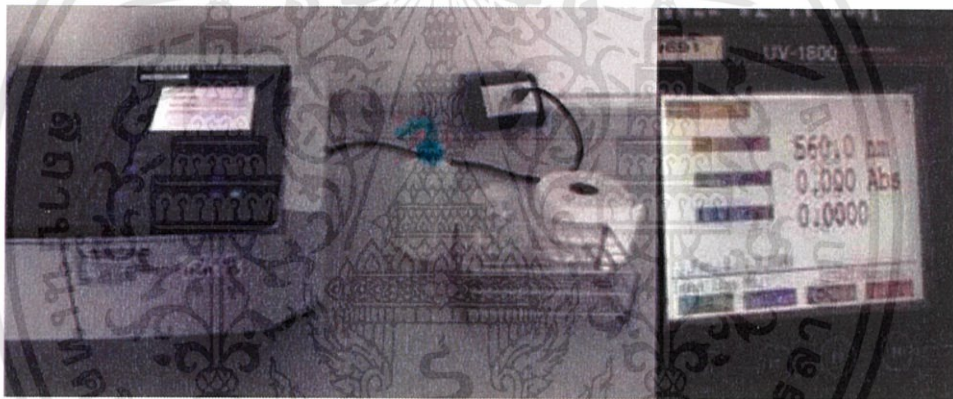
รูปที่ ง.2 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ 1. เมาลุปจนร้อนแดง 2. เขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียง BG-11  
3. ลนไฟบริเวณปากพลาสติกให้ร้อนและใส่เชื้อลงในพลาสติกอาหาร BG-11 และ 4. เพาะเลี้ยงในสถานะ  
เขย่าจนมีจำนวนเซลล์ตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ง-2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของสาหร่าย



รูปที่ ง.3 การนับจำนวนเซลล์ โดยใช้สไลด์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)



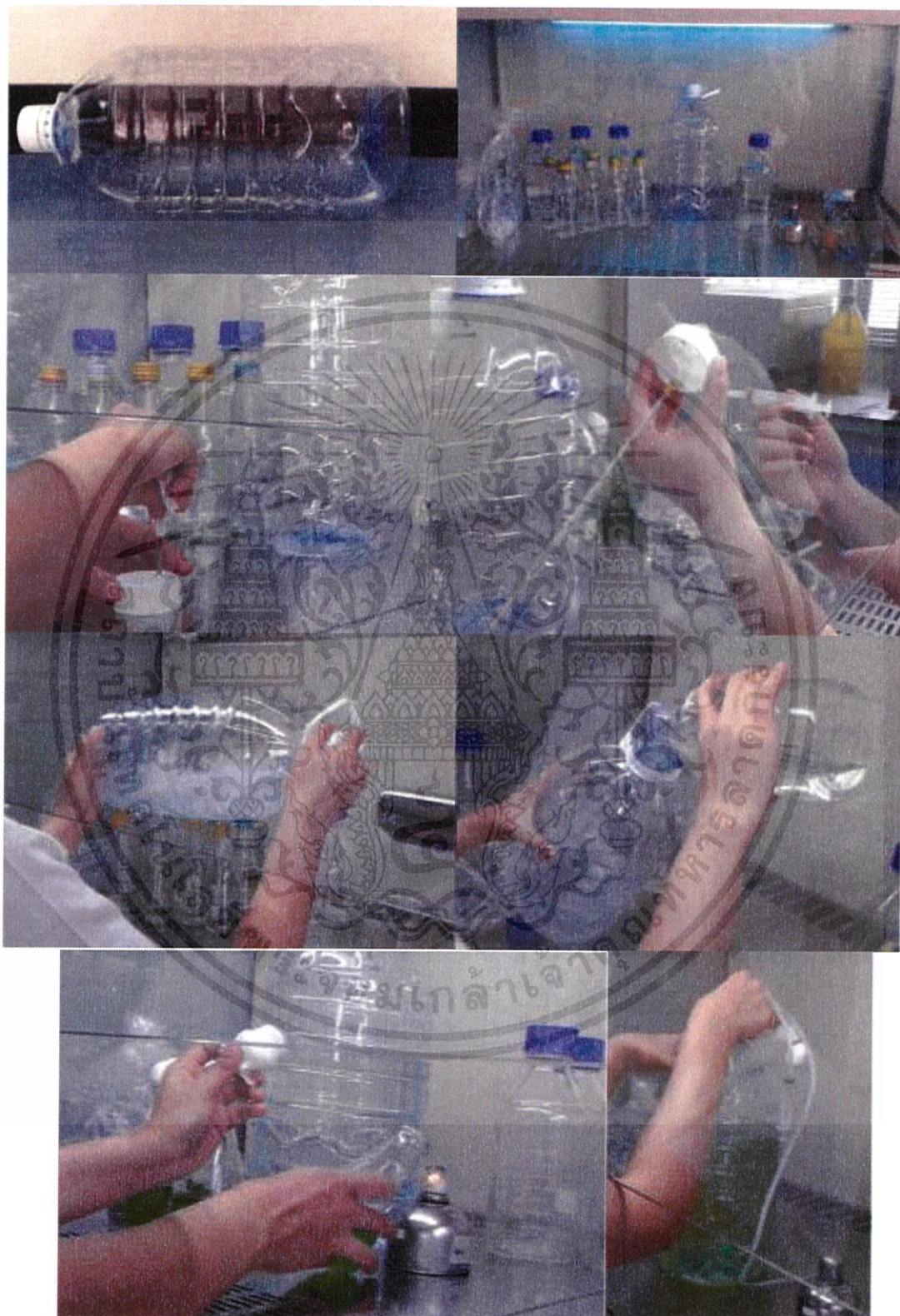
รูปที่ ง.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD)



รูปที่ ง.5 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง-3 การฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.6 แสดงขั้นตอนการฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

1. เติมแอลกอฮอล์ 95% ลงในขวดที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยง เขย่าอย่างแรงให้ทั่วขวด และแช่ทิ้งไว้ มั่นหมุนขวดเพื่อให้แอลกอฮอล์ทั่วขวด เป็นการฆ่าเชื้อโรคภายในขวดก่อนจะ นำไปใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อไป
2. นำอุปกรณ์ที่ต้องใช้เข้าสู่ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) เปิด UV เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อ
3. ใช้ตะปูลนไฟให้ร้อนแดง เจาะบริเวณฝาขวดที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย เพื่อต่อสายยางต่างๆ
4. ต่อสายยางเข้ากับปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับเก็บตัวอย่าง ต่อสายยางให้อากาศเข้ากับหัวพ่นอากาศ และต่อสายยางเพื่อระบายอากาศออกจากขวด
5. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในขวด และเขย่าให้ทั่วขวด เพื่อล้างแอลกอฮอล์ 95% ออกให้หมด
6. เติมอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายลงในขวด ปริมาณอาหาร 3600 มิลลิลิตร
7. เติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ ร้อยละ 10 ของปริมาณอาหาร ลงในขวดอาหาร
8. ปิดฝาขวดที่ต่อเข้ากับสายยางต่างๆ ปิดให้สนิท
9. เพาะเลี้ยงภายใต้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 3$  องศาเซลเซียส) อัตราการให้อากาศ 1,500 มิลลิลิตร/นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### ง-4 การสกัดน้ำมันจากสาหร่าย



รูปที่ ง.7 แสดงการสกัดไขมันจากสาหร่าย มีวิธีการดังนี้คือ ชั่งน้ำหนักเซลล์สาหร่ายแห้ง ผสมกับ คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 22.72:45.45 มิลลิลิตร นำไป sonicated เป็นเวลา 25 นาที ผสมบนเครื่องคนสาร (magnetic stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.5 นำกากที่กรองได้ไปสกัดซ้ำอีกครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง กลั่นระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตัวอย่างไขมัน แห้งและเก็บไว้ที่รานเอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

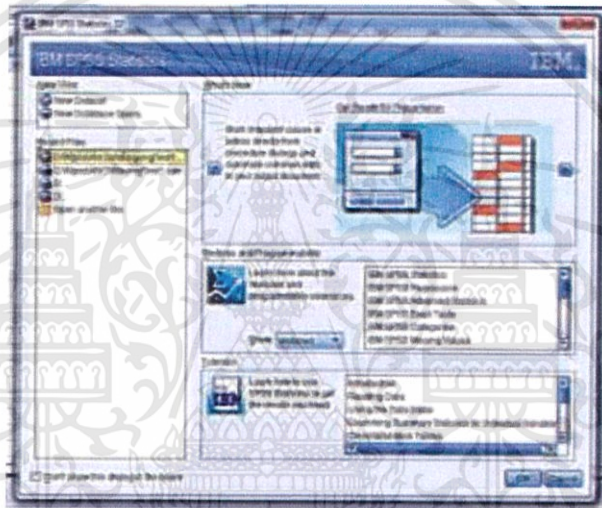
## ภาคผนวก จ

### วิธีใช้โปรแกรมและเครื่องมือ

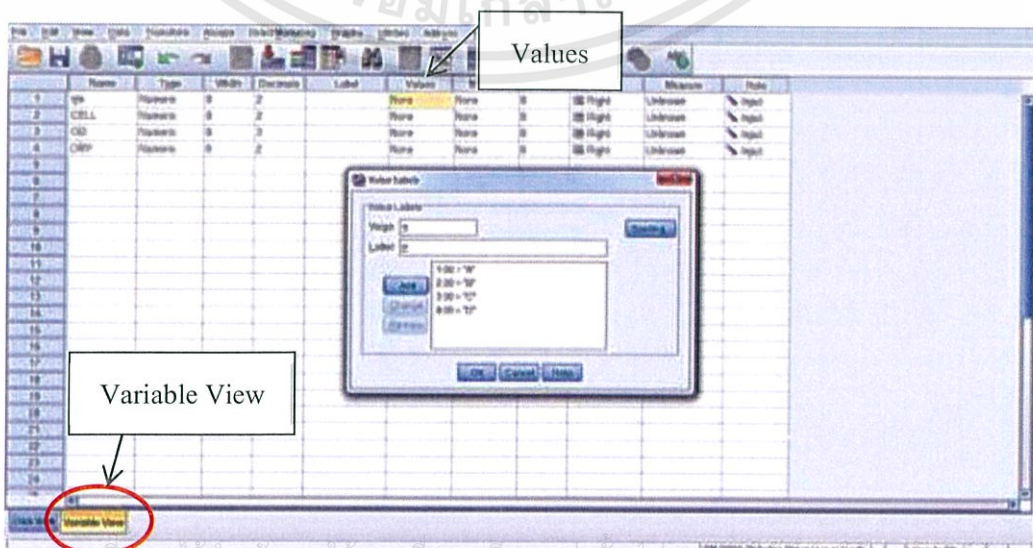
#### จ-1 วิธีการใช้งานโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 มีวิธีการใช้งานดังนี้คือ

1. เปิดโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 ขึ้นมาจะปรากฏหน้าต่างที่สามารถเลือกเปิดข้อมูลที่เคยวิเคราะห์ขึ้นมาได้ หากไม่ต้องการเปิด ให้กด “Cancel”

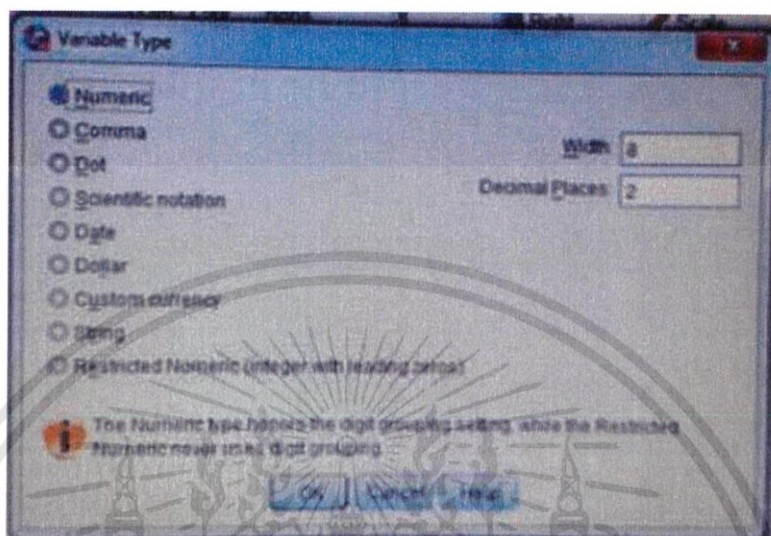


2. กดเลือก “Variable View” เพื่อกำหนดตัวแปรต่างๆ ในช่อง “Name” ให้กำหนดตัวแปรที่ต้องการ และกำหนดค่าตัวแปรในช่อง “Values” จะปรากฏ “Value Labels” ให้กำหนดค่าตัวแปร จากนั้นกด “OK”

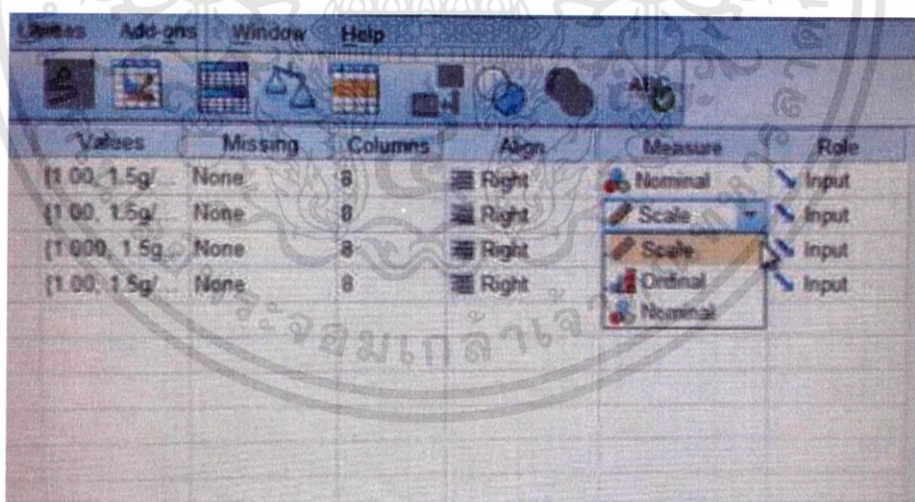


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปเผยแพร่หรือขึ้นต้นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ในช่อง “Type” เป็นการกำหนดชนิดของข้อมูล จะปรากฏหน้าต่าง “Variable Type” ในกรณีนี้ใช้เป็นตัวเลข กดเลือก “Numeric” ด้านขวามือจะช่องให้กำหนดจำนวนตัวเลขหน้าจุดทศนิยม (Width) และจำนวนตัวเลขหลังจุดทศนิยม (Decimal Places) จากนั้นกด “OK”



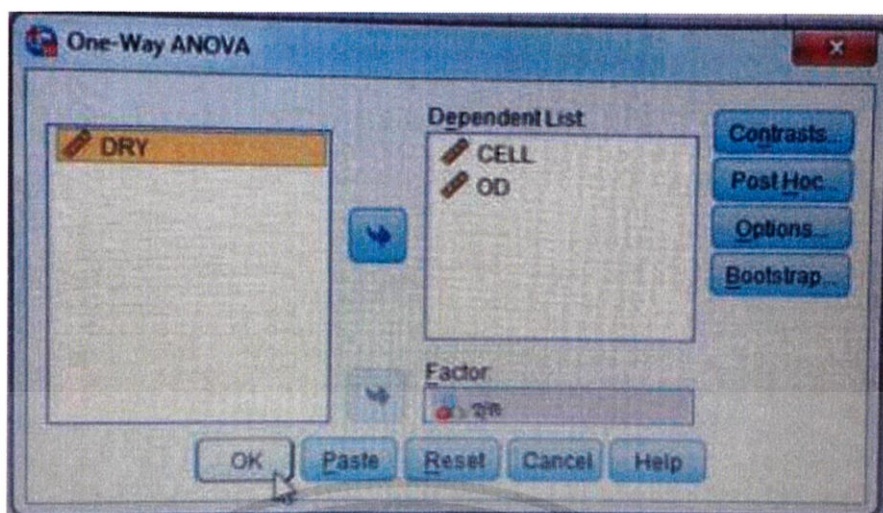
4. เลือกประเภทของข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์ ประกอบด้วย Scale, Ordinal และ Nominal กดเลือก “Scale” สำหรับข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์



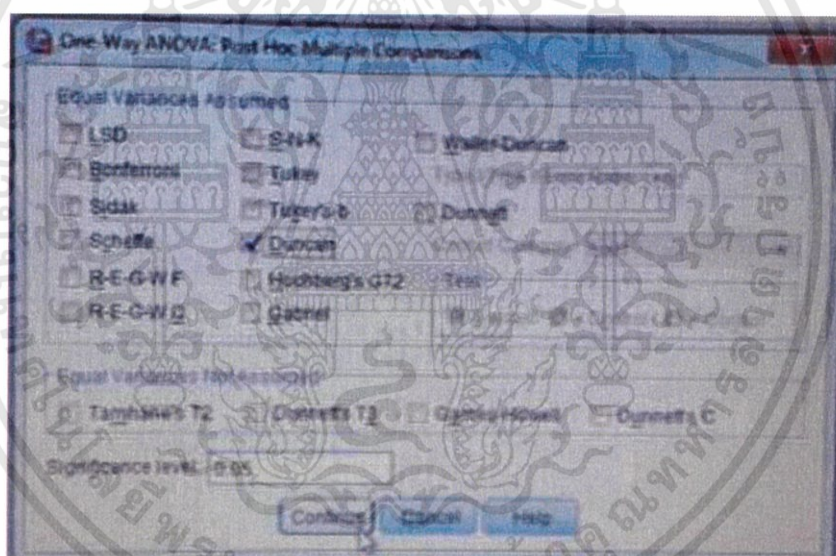
5. กด “Data View” เพื่อใส่ข้อมูลที่ได้จากการทดลองตามตัวแปรที่กำหนดไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



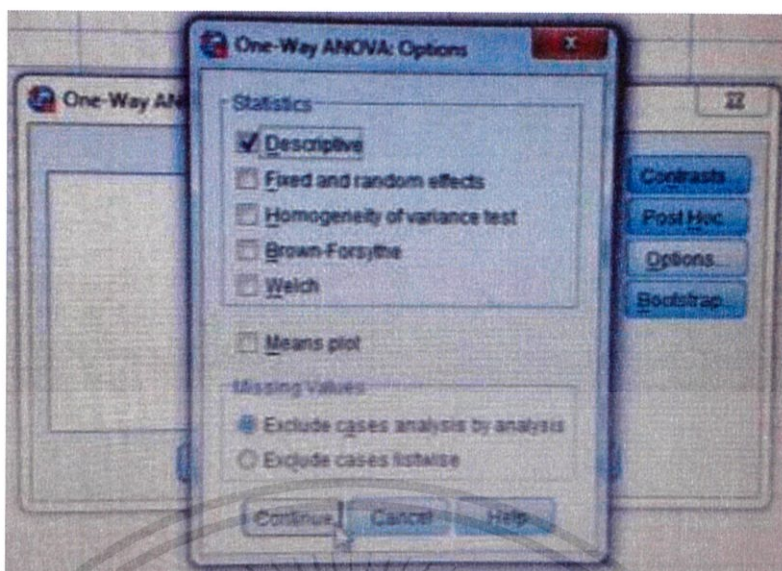


8. กดเลือก “Post Hoc” เมื่อต้องการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่ต่างกัน จากนั้นเลือก “Duncan” และกด “Continue”



9. กดเลือก “Options” เมื่อต้องการค่าทางสถิติของกลุ่มตัวอย่าง กดเลือก “Descriptive” และกด “Continue”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



10. กด “OK” เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูล



11. จะปรากฏหน้าต่างแสดงข้อมูลต่างๆ ดังนี้

11.1 ตารางค่าสถิติต่างๆ ภายใต้อันหนึ่ง Oneway, STATISTICS DESCRIPTIVE ของ Output แสดงดังรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Descriptives

	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
CELL								
A	8	1968750.000	1409675.115	499395.4164	790232.1115	3147267.888	150000.00	4.13E+8
B	8	2093750.000	1557140.803	546784.6435	736127.8156	3331372.164	150000.00	4.35E+8
C	8	2371250.000	2009366.905	710418.4821	691377.2285	4051122.771	150000.00	5.46E+8
D	8	2402500.000	2216353.890	783245.8791	550417.7993	4254592.201	150000.00	5.99E+8
E	8	2770000.000	2842047.471	863392.3955	726401.4030	4611588.567	150000.00	6.51E+8
Total	40	2309250.000	1884280.878	297930.9623	1706627.707	2911672.293	150000.00	6.51E+8
OD								
A	8	1.03675	.794213	.290797	.37477	1.70273	.049	2.023
B	8	1.09425	.829610	.293311	.42068	1.76782	.050	2.095
C	8	1.19783	.920128	.325314	.42638	1.96687	.049	2.323
D	8	1.21750	.938124	.331872	.43321	2.00179	.051	2.419
E	8	1.26475	1.045784	.369741	.39045	2.13905	.050	2.512
Total	40	1.18250	.866074	.136938	.68559	1.43956	.049	2.512
DRY								
A	8	.9375	.58294	.20610	.4581	1.4249	.20	1.80
B	8	.9813	.59398	.20879	.4952	1.4773	.30	1.70
C	8	1.4000	1.01630	.35931	.5584	2.2496	.30	2.85
D	8	1.4500	1.14143	.40358	.4967	2.4043	.20	2.95
E	8	1.4563	1.19864	.42378	.4542	2.4583	.15	3.15
Total	40	1.2450	.82810	.14643	.9488	1.5410	.15	3.15

### 11.2 ตาราง ANOVA ภายใต้ Oneway, ANOVA ของ Output แสดงดังรูป

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CELL	Between Groups	3.333E+12	4	8.333E+11	.216	.928
	Within Groups	1.351E+14	35	3.861E+12		
	Total	1.385E+14	39			
OD	Between Groups	.277	4	.069	.084	.987
	Within Groups	28.976	35	.828		
	Total	29.253	39			
DRY	Between Groups	2.198	4	.550	.616	.654
	Within Groups	31.251	35	.893		
	Total	33.449	39			

11.3 ตารางผล multiple comparison ภายใต้ Oneway, Post Hoc Tests ของ Output แสดงดังรูป ซึ่งจากตัวอย่างนี้ มีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างเพียงแบบเดียว คือ Duncan ซึ่งหากผลจากตาราง ANOVA มีค่าเฉลี่ยของกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig > 0.05) จะไม่นำผลที่ได้จาก Post Hoc Tests ไปนำเสนอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Post Hoc Tests**

**Homogeneous Subsets**

CELL

Duncan<sup>a</sup>

ชุด	N	Subset for alpha = 0.05
		1
A	8	1968750.000
B	8	2033750.000
C	8	2371250.000
D	8	2402500.000
E	8	2770000.000
Sig.		.475

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

OD

Duncan<sup>a</sup>

ชุด	N	Subset for alpha = 0.05
		1
A	8	1.03875
B	8	1.09425
C	8	1.19763
D	8	1.21750
E	8	1.26475
Sig.		.663

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

DRY

Duncan<sup>a</sup>

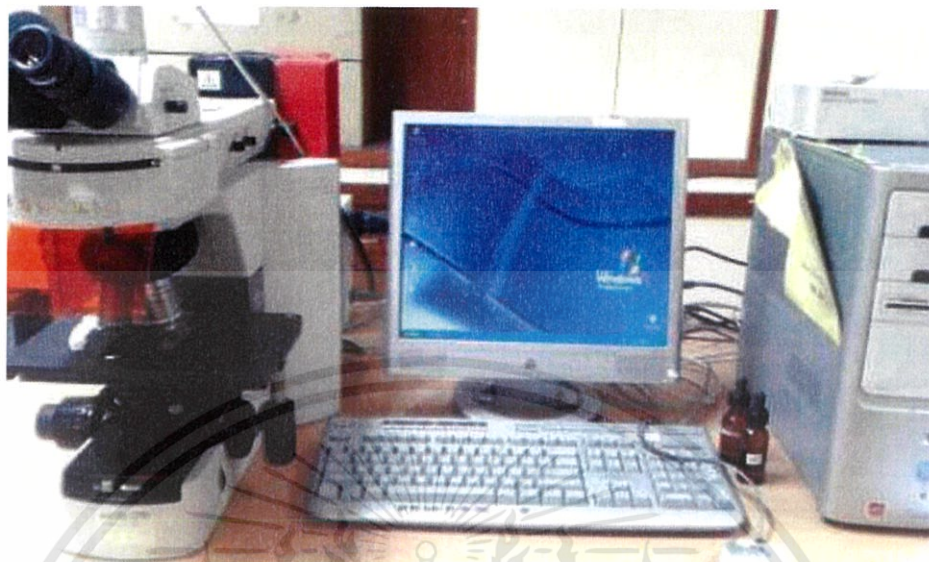
ชุด	N	Subset for alpha = 0.05
		1
A	8	.9375
B	8	.9813
C	8	1.4000
D	8	1.4500
E	8	1.4563
Sig.		.337

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## จ-2 วิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์ Nikon 80i แบบ fluorescence microscope



1. เปิดสวิตซ์ไฟฟ้าที่ต่อเข้ากับอุปกรณ์ต่างๆ ของกล้อง
2. เปิดสวิตซ์ (POWER) ที่เครื่อง Nikon จากนั้นกดเปิด LAMP READY โดยกดที่ IGNITION จะปรากฏไฟสีส้มขึ้นมา



3. กดปุ่ม POWER ที่เครื่อง Nikon DIGITAL SIGHT DS-U1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. เปิดสวิตช์ที่ตัวกล้องจุลทรรศน์ Nikon 80i และเปิดเครื่องคอมพิวเตอร์



#### 5. การใช้งานกล้องจุลทรรศน์

5.1 เตรียมสไลด์ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ (เซลล์สำหรับที่ย้อมด้วยสีไนล์เรด)

5.2 วางสไลด์ลงบนแท่นวางสไลด์ เปิดแสงไฟและตรวจดูโดยเริ่มจากกำลังขยายต่ำสุด (10X) ปรับภาพหยาบ (coarse focus) ให้มองเห็นตัวเซลล์ และปรับภาพให้ชัดขึ้นด้วยการปรับภาพละเอียด (fine focusing knob) จากนั้นเปลี่ยนเลนส์ใกล้วัตถุให้มีกำลังขยายเพิ่มขึ้น หากต้องการส่องดูด้วยกำลังขยาย 100X ต้องหยดน้ำมันด้วยทุกครั้ง

5.3 แสงของกล้องจุลทรรศน์ Nikon 80i ประกอบไปด้วย

แสงที่ 1 คือ แสงไฟธรรมดา (Bright field)

แสงที่ 2 คือ แสงสีเขียว (Green fluorescence)

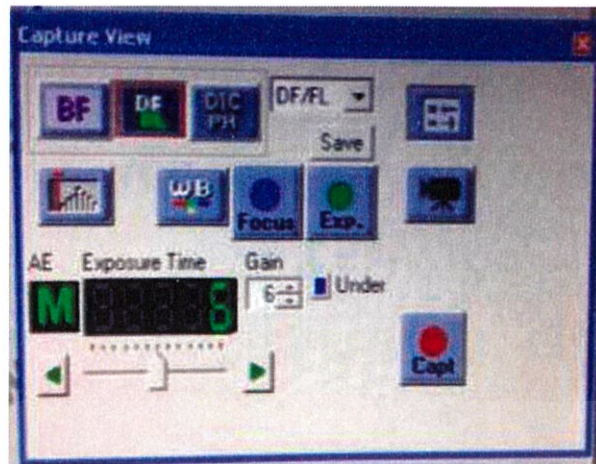
แสงที่ 3 คือ แสงยูวี (UV fluorescence)

แสงที่ 4 คือ แสงสีแดง (Red fluorescence)

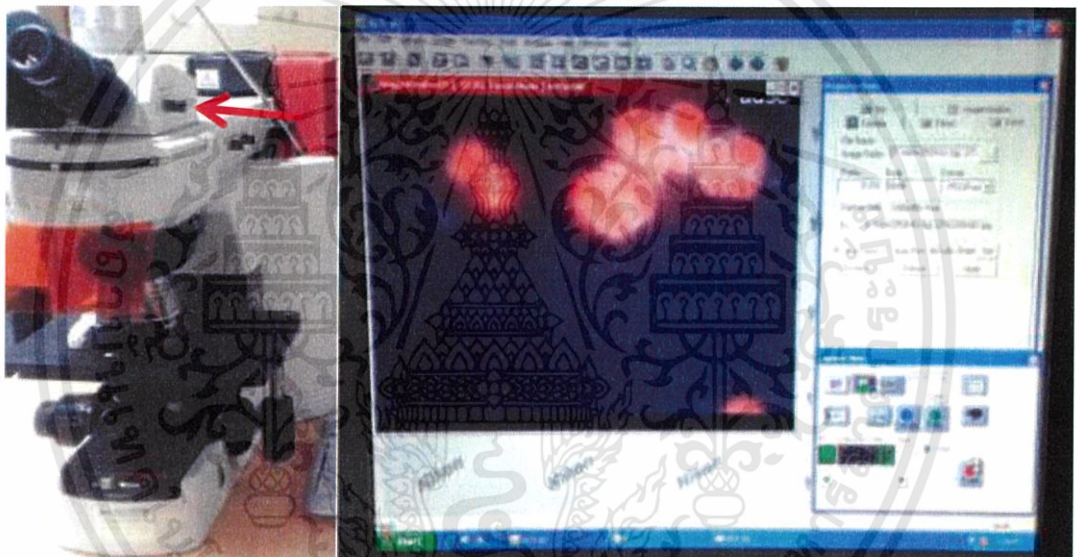
หมายเหตุ : แสงที่ 2-4 จะต้องใช้ในที่มีดเท่านั้น ปิดแสงไฟจากแสงที่ 1 ด้วย

#### 6. การใช้โปรแกรมถ่ายภาพ ACT-2U

6.1 เปิดโปรแกรม ACT-2U ขึ้นมา จะปรากฏหน้าต่างดังรูป



6.4 เมื่อต้องการถ่ายภาพให้ให้ตรงตรง “BINO” ออกมา และกดคำว่า “Capt”



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้