

ผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3 จากสาหร่าย
ขนาดเล็ก

OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS
PRODUCTION FROM MICROALGAE

เกตุแก้ว ดิเรกศิลป์
เกื้อกานต์ พัฒนาพรหมชัย
ชญานิศ พงษ์ศิริชัยโรจน์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

ผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3 จากสาหร่าย
ขนาดเล็ก

OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS
PRODUCTION FROM MICROALGAE

เกตุแก้ว ดิเรกศิลป์
เกื้อกานต์ พัฒนาพรหมชัย
ชญานิศ พงษ์ศิริชัยโรจน์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS
PRODUCTION FROM MICROALGAE

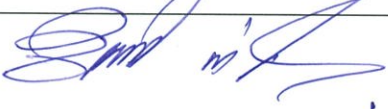


KETKAEW DIRAKSIL
GURKARN PATTANAPROMCHAI
CHAYANIT PHONGSIRICHAIROJNA

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

หัวข้อโครงการพิเศษ ผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3 จากสาหร่ายขนาดเล็ก
Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Production from
Microalgae

ชื่อนักศึกษา นางสาวเกตแก้ว ดิเรกศิลป์ รหัสนักศึกษา 55051236
นางสาวเกื้อกานต์ พัฒนาพรหมชัย รหัสนักศึกษา 55051237
นางสาวชญานิศ พงษ์ศิริชัยโรจน์ รหัสนักศึกษา 55051254
ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2558
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.วีณา ชูโชติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
(จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการ	
ผศ.วีณา ชูโชติ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3 จากสาหร่ายขนาดเล็ก Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Production from Microalgae			
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเกตต์แก้ว	ดิเรกศิลป์	รหัสนักศึกษา	55051236
	นางสาวเกื้อกานต์	พัฒนาพรหมชัย	รหัสนักศึกษา	55051237
	นางสาวชญานิศ	พงษ์ศิริชัยโรจน์	รหัสนักศึกษา	55051254
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
คณะ	วิทยาศาสตร์			
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)			
ปีการศึกษา	2558			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.วีณา ชูโชติ			

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3 ของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ พบว่าการเจริญเติบโตระดับพลาสม่าในระยะลอการิทึม (วันที่ 14-18 ของการทดลอง) สาหร่าย *Scenedesmus* sp. W มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.4597 ต่อวัน จากการคัดเลือกสาหร่าย 2 สายพันธุ์โดยใช้วิธีการสกัดไขมันที่ดีที่สุดคือ คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1:2 พบว่า *Chlorella* sp. VB 55 และ *Chlorella* sp. U มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงที่สุด เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตของ *Chlorella* sp. U มากกว่า *Chlorella* sp. VB55 คือ ร้อยละ 59.8533 ± 2.71 และปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้นและเถ้าของ *Chlorella* sp. VB55 มีปริมาณมากกว่า *Chlorella* sp. U คือ ร้อยละ 10.3367 ± 6.00 , 25.00 ± 0.00 , 5.37 ± 1.00 และ 6.14 ± 0.00 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3 ของ *Chlorella* sp. VB 55 และ *Chlorella* sp. U พบว่ามีปริมาณกรดแอลฟาไลโนเลนิก (ALA) 365.87 และ 1901.24 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ แต่ไม่พบกรดอีโคซาเพนตาอีโนอิก (EPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการผลิตไขมันโอเมก้า 6 (กรดไลโนเลอิก) และกรดไขมันโอเมก้า 9 (กรดโอเลอิก) ในสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด

คำสำคัญ : *Chlorella* sp., กรดไขมัน, โอเมก้า 3, การสกัดไขมัน

Title	Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Production from Microalgae			
Students	Miss Ketkaew	Diraksil	Student ID	55051236
	Miss Gurkarn	Pattajapromchai	Student ID	55051237
	Miss Chayanit	Phongsirichairoj	Student ID	55051254
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)			
Department	Biology			
Faculty	Science			
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)			
Academic Year	2015			
Advisor	Asst. Prof. Weena Choochote			

Abstract

Study on growth and omega-3 polyunsaturated fatty acid production of the 10 isolates shows that the highest specific growth rate strain in flask scale at logarithm phase (14-18 days of experiment) was *Scenedesmus* sp. W., $\mu = 0.4597 \text{ d}^{-1}$. The two selected strains were *Chlorella* sp. VB 55 and *Chlorella* sp. U which exhibited the highest total lipid production while using chloroform/methanol (1:2) as the extracting solvent. *Chlorella* sp. U contain more carbohydrate than *Chlorella* sp. VB55 which is $59.8533 \pm 2.71\%$ but *Chlorella* sp. VB55 contain more protein, lipid, moisture and ash than *Chlorella* sp. U which is $10.3367 \pm 6.00\%$, $25.00 \pm 0.00\%$, $5.37 \pm 1.00\%$ and $6.14 \pm 0.00\%$ respectively. The qualitative and quantitative analysis of omega-3 polyunsaturated fatty acids by gas chromatography shows that *Chlorella* sp. VB 55 and *Chlorella* sp. U contain alpha linolenic acid (ALA) 365.87 and 1901.24 mg./100g respectively. But eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were not detected. Omega-6 (Linoleic acid) and omega-9 (Oleic acid) was detected in both strains.

Keywords : *Chlorella* sp., Fatty acid, Omega-3, Lipid extraction

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ ได้จัดทำตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ซึ่งสำเร็จไปด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.วีณา ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ แนวคิด และให้ความรู้สำหรับการค้นคว้าและดำเนินงานวิจัย เพื่อให้โครงการพิเศษสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. จิตติ ท่าไว และ ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ ประธานกรรมการ และ กรรมการ ที่ได้ให้ความกรุณาในการให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือและ อุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการทดลองโครงการพิเศษนี้ สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและกำลังใจที่ดีเสมอมา รวมถึงเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เกตูแก้ว ดิเรกศิลป์
เกื้อกานต์ พัฒนาพรหมชัย
ชญานิศ พงษ์ศิริชัยโรจน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
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 สาหร่ายขนาดเล็ก.....	3
2.1.1 สาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlamydomonas</i> sp.	4
2.1.2 สาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp.	6
2.1.2 สาหร่ายขนาดเล็ก <i>Scenedesmus</i> sp.	8
2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว.....	10
2.2.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว โอเมก้า 9.....	10
2.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน.....	10
2.3.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3.....	10
2.3.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 6.....	12
2.4 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน.....	13
2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตกรดไขมันโอเมก้า 3.....	14
2.6 การแยกเชื้อบริสุทธิ์.....	15
2.6.1 การขจัดเชื้อในจานเพาะเชื้อ.....	15
2.6.2 การทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ.....	17
2.7 การเก็บเกี่ยวเซลล์.....	18
2.7.1 การหมุนเหวี่ยง.....	18
2.7.2 การกรอง.....	18
2.8 การสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก.....	19
2.8.1 การสกัดโดยวิธีเชิงกล.....	20
2.8.2 การสกัดโดยวิธีการทางเคมี.....	20
2.9 การศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนจากสาหร่ายขนาดเล็ก.....	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	26
3.1 สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก.....	26
3.1.1 สาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	26
3.1.2 สาหร่ายขนาดเล็กจากห้องปฏิบัติการ	26
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	26
3.3 สารเคมี.....	27
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	27
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	30
4.1 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก.....	30
4.2 การศึกษาระยะเวลาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก	30
4.3 การสกัดไขมันเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูงสุด	41
4.3.1 ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัดไขมัน	41
4.3.2 การวัดการเจริญและการเก็บเกี่ยวชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงใน ระดับถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร	42
4.4 การศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก	46
4.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55	47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	50
5.1 สรุปผลการวิจัย	50
5.2 ข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก.....	61
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	62
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	63
ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการทดลอง.....	70
ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	112

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์..... 31
4.2	ค่าพารามิเตอร์การดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ และ ปริมาณไขมันที่สกัดได้ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ 35
4.3	ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อ เมทานอล 1:1 และ 1:2 41
4.4	ค่าพารามิเตอร์ของค่าการดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโต จำเพาะก่อนวันที่การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ที่สามารถสะสมไขมัน มากที่สุด 44
4.5	องค์ประกอบภายในเซลล์ (ร้อยละของน้ำหนักชีวมวลแห้ง) ของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55..... 46
4.6	การวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันและปริมาณกรดไขมัน (ร้อยละของพื้นที่กราฟ) ของสาหร่าย ขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55 47
4.7	การวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันและปริมาณกรดไขมัน (ความเข้มข้นในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) ของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55..... 48
ค-1	รายชื่อสาหร่ายขนาดเล็กที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ..... 70
ค-2.1	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlamydomonas</i> sp. 71
ค-2.2	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. 03 72
ค-2.3	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. 05 73
ค-2.4	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. A 74
ค-2.5	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. G 75
ค-2.6	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. N..... 76
ค-2.7	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U..... 77
ค-2.8	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Scenedesmus</i> sp. C..... 78
ค-2.9	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Scenedesmus</i> sp. W..... 79
ค-2.10	ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. VB55..... 80
ค-2.11	สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสง) ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์..... 81
ค-2.12	สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญ (จำนวนเซลล์) ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์..... 82
ค-2.13	สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์..... 83
ค-3	ค่าพารามิเตอร์ของค่าการดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตรา การเจริญ จำเพาะในระยะลอการิทึมของสาหร่ายขนาดเล็ก 84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค-4.1 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1.....	95
ค-4.2 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2.....	95
ค-5.1 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U.....	96
ค-5.2 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. VB55.....	98
ค-5.3 สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55 ที่ทำการเพาะเลี้ยงระดับ 5 ลิตร	100
ค-6 ค่าพารามิเตอร์ของค่าการดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในระยะลอการิทึมของสาหร่ายขนาดเล็กของสาหร่ายที่สามารถสะสมไขมันมากที่สุด	101
ค-7.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	102
ค-7.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน	102
ค-7.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต.....	103
ค-7.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น	103
ค-7.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเถ้า	103
ง-1.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์.....	112
ง-1.2 ตาราง ANOVA ของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์.....	118
ง-2.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1	119
ง-2.2 ตาราง ANOVA ของปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1	120
ง-2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2.....	121
ง-2.4 ตาราง ANOVA ของปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2.....	122
ง-3.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55	123
ง-3.2 ตาราง ANOVA ของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55.....	124
ง-4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55.....	125
ง-4.2 ตาราง ANOVA ของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55.....	127

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	สาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlamydomonas</i> sp.....4
2.2	สาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp.6
2.3	สาหร่ายขนาดเล็ก <i>Scenedesmus</i> sp.8
2.4	โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 9 โอเลอิก (C18:1 ω9)..... 10
2.5	โครงสร้างของกรดไขมันสายยาว 12
2.6	โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 6 ไลโนเลอิก (C18:2 ω6)..... 12
2.7	กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน 13
2.8	อุปกรณ์และวิธีการซีดเชื้อแบบง่าย 16
2.9	การเชื่อมต่อใส่อาหารแข็งในงานเพาะเชื้อ..... 17
2.10	วิธีการซีดเชื้อบนอาหารแข็งในงานเพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์..... 17
2.11	การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารแข็ง 18
2.12	วิธีการกรองแบบแรงโน้มถ่วง 19
2.13	แผนภาพของอุปกรณ์การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลลูอิด 21
2.14	แผนภาพกลไกการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์..... 22
2.15	อุปกรณ์การสกัดแบบต่อเนื่อง 23
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์..... 38
4.2	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ 39
4.3	น้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์..... 40
4.4	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร..... 43
4.5	ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55 44
4.6	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55..... 45
4.7	น้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ <i>Chlorella</i> sp. U และ <i>Chlorella</i> sp. VB55..... 45
ข-1	แผนภาพแสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวนเซลล์..... 64
ค-3.1	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlamydomonas</i> sp. 85
ค-3.2	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. 03..... 86
ค-3.3	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. 05..... 87
ค-3.4	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. A..... 88
ค-3.5	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. G..... 89
ค-3.6	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. N..... 90
ค-3.7	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U 91
ค-3.8	อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Scenedesmus</i> sp. C 92

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ค-3.9 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Scenedesmus</i> sp. W	93
ค-3.10 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. VB55	94
ค-6.1 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. U	101
ค-6.2 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. VB55	102

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันมีการเพิ่มขึ้นของประชากรอย่างรวดเร็วเป็นผลทำให้เกิดการแข่งขันกันมากขึ้นจนละเลยการดูแลสุขภาพของตนเองและครอบครัว แต่ก็มีประชากรจำนวนไม่น้อยที่หันมาให้ความสนใจทางด้านสุขภาพ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นในอนาคต กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3 ที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทางเลือกหนึ่งที่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพในเรื่องของการพัฒนาของระบบสมองและการมองเห็น (Kim และคณะ, 2012¹) นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือด หัวใจ และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (Manikan และคณะ, 2015) กรดไขมันโอเมก้า 3 ที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (DHA) และกรดอีโคซาเพนตาอีโนอิก (EPA) (Gupta และคณะ, 2012)

แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาวโอเมก้า 3 ที่ใช้เป็นหลักในเชิงการค้า คือ ปลา โดยเฉพาะปลาทะเล แต่เนื่องจากปัจจุบันพบว่ามีความเสี่ยงและเป็นที่ทราบกันดี คือ ปัญหาการลดลงของปริมาณปลาที่จับได้ทั่วโลก ทำให้เกิดความเสี่ยงในการขาดแคลนปลาทะเล เนื่องจากการทำประมงตลอดทั้งปี (Ryckebosch และคณะ, 2012) นอกจากนี้มลพิษจากสิ่งแวดล้อมทางทะเลและความหลากหลายของสายพันธุ์ปลาทะเล ยังส่งผลต่อคุณภาพของกรดไขมันโอเมก้า 3 อีกด้วย (Gupta และคณะ, 2012) จากปัญหาดังกล่าว จึงต้องหาแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาวโอเมก้า 3 แหล่งใหม่ เพื่อตอบสนองความต้องการที่เพิ่มขึ้นของตลาด (Ryckebosch และคณะ, 2012) แหล่งทางเลือกของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาวโอเมก้า 3 ได้แก่ จุลินทรีย์ไขมันสูง (Oleaginous microorganism) เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก (Gupta และคณะ, 2012) ตัวเคย ปลาหมึก หรือ พืชที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรม โดยที่สาหร่ายขนาดเล็กอาจเป็นทางเลือกที่มีความหวังมากที่สุด (Ryckebosch และคณะ, 2012) เพราะสาหร่ายขนาดเล็กสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3 ได้ปริมาณมาก กรดไขมันที่ได้มีความเสถียรต่อกระบวนการออกซิเดชันสูง และสาหร่ายขนาดเล็กยังเป็นวัตถุดิบที่มีประโยชน์ที่สามารถนำมาใช้ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อธรรมชาติ (Kim และคณะ, 2012) กรดไขมันโอเมก้า 3 ถูกนำมาเติมลงในสูตรอาหารสำหรับทารกและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Li และคณะ, 2014) โครงการพิเศษนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาปริมาณผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3 จากสาหร่ายขนาดเล็กที่อาจใช้เป็นทางเลือกทดแทนน้ำมันจากปลาทะเล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3 ได้สูง
- 1.2.2 คัดเลือกวิธีการสกัดไขมันจากชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก
- 1.2.3 ศึกษาการเจริญและปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3 ของสายพันธุ์สาหร่ายที่คัดเลือกจำนวน 2 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร N-8

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากป่าชายเลนศูนย์ศึกษาระบบนิเวศและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรปราการ บ่อปลาคาร์พัมบ้านเพอร์เฟคเพลส สุขุมวิท 77 บ่อปลาหางนกยูงหมู่บ้านเพอร์เฟคเพลส สุขุมวิท 77 มาทำการคัดแยกและทำให้บริสุทธิ์จำนวน 9 สายพันธุ์ และสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก 1 สายพันธุ์ จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในอาหารสูตร N-8 เพื่อนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก คัดเลือกวิธีการสกัดไขมันจากชีวมวลที่ทำให้ได้ไขมันในปริมาณมาก และนำวิธีการสกัดไขมันที่ดีที่สุดมาใช้ คัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 2 สายพันธุ์ ที่พบปริมาณไขมันทั้งหมดมากที่สุด เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กในปริมาณมาก
- 1.4.2 ทราบถึงระยะเวลาการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์
- 1.4.3 ทราบปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3 ที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายขนาดเล็ก จัดเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีขนาดเล็กมาก มองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สาหร่ายมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อน ไม่มีราก ลำต้น ใบ และไม่มีระบบสืบพันธุ์แบบที่พบในพืชชั้นสูง โดยสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิต ที่เซลล์ทำหน้าที่เพื่อยังชีพและสืบพันธุ์ภายในเซลล์เดียวกัน สาหร่ายขนาดเล็กมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงโดยใช้สารสีคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) และมีการปลดปล่อยออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ามีสาหร่ายหลายชนิดที่สามารถเจริญได้ทั้งแบบออโตโทรฟ (สร้างอาหารเองได้โดยการสังเคราะห์แสง) และแบบเฮเทอโรโทรฟ (สร้างอาหารเองจากสารอนินทรีย์ไม่ได้ ต้องบริโภคสารอินทรีย์เข้าสู่เซลล์) หรือบางชนิดอาจดำรงชีวิตโดยแบบเฮเทอโรโทรฟเพียงอย่างเดียว (สรวิช, 2543)

ในธรรมชาติจะพบสาหร่ายได้ทั่วไป ทั้งในมหาสมุทร ทะเล ทะเลสาบน้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำจืด ธารน้ำ ลำธาร ในดินแฉะ บนหิน ตามเปลือกไม้ สาหร่ายพวกที่ล่องลอยอยู่ในน้ำเรียกว่า แพลงก์ตอน (Plankton) ซึ่งมักเป็นอาหารที่สำคัญของสัตว์น้ำอื่นๆ สาหร่ายจะพบอยู่ตามบริเวณที่มีแสง ความชื้น และอาหารเพียงพอ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)

สาหร่ายขนาดเล็กมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูงกว่าพืชอื่นๆ ซึ่งใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 183 กิกะตัน เพื่อผลิตชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก 100 กิกะตัน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจะช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศในอัตราที่เร็วกว่าการปลูกพืชบนดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Milano และคณะ, 2016)

การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายมีทั้งแบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหักของสาหร่ายออกเป็นท่อนๆ หรืออาจมีการสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ เรียกว่า ซูโอสปอร์ สำหรับสาหร่ายในน้ำ ส่วนพวกที่อยู่บนบกจะสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ เรียกว่า อะพลาโนสปอร์ (Aplanospore) อย่างไรก็ตาม อะพลาโนสปอร์บางชนิดสามารถพัฒนาเป็นซูโอสปอร์ได้ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะมีการผสมกันของเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า แกมีต (Gametes) จนได้ไซโกต (Zygote) ถ้าแกมีตนั้นเหมือนกันไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศ การผสมนั้นเรียกว่า ไอโซแกมีส (Isogamous) ถ้าแกมีตทั้งสองไม่เหมือนกัน คือมีขนาดต่างกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย การผสมนั้นเรียกว่า เฮเทอโรแกมีส (Heterogamous) ถ้าแกมีตมีความแตกต่างกัน คือ ไข่ (Ovum) มีขนาดใหญ่ไม่เคลื่อนที่และแกมีตเพศผู้ (Sperm) มีขนาดเล็กกว่าและเคลื่อนที่ได้ การผสมนั้นเรียก โอโอแกมีส (Oogamous) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)

2.1.1 สาหร่าย *Chlamydomonas* sp.

อนุกรมวิธาน (Lee, 2008)

Division Chlorophyta

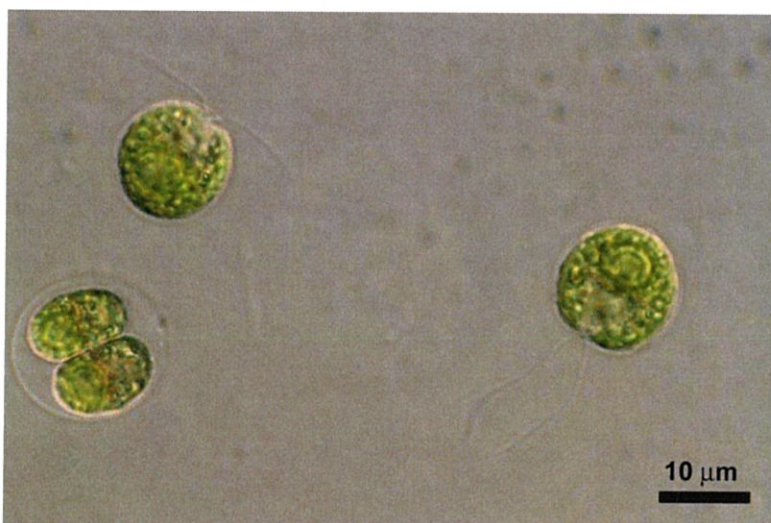
Class Chlorophyceae

Order Volvocales

Family Chlamydomonadaceae

Genus *Chlamydomonas*

Chlamydomonas sp. เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา 2 เส้น มีนิวเคลียส 1 อัน เป็นรูปถ้วย มีไพเรโนอยด์อยู่ตรงกลางคลอโรพลาสต์ อาจมีหรือไม่มีอายสปอตอยู่ด้านหน้าใน คลอโรพลาสต์ มีผนังเซลล์ล้อมรอบโพโรโทพลาสต์ หากเจริญบนดินหรือบนอาหารแข็งจะไม่เคลื่อนที่ แต่หากเจริญในที่ที่มีน้ำจะมีการสร้างเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำจืด และดินชื้นและที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเริ่มเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะพัก และมักจะสลัดแฟลกเจลลาทิ้ง จากนั้นโพโรโทพลาสต์จะแบ่งเซลล์ออกเป็น 2, 4, 8 หรือ 16 ในผนังเซลล์ของเซลล์แม่ (Lee, 2008)



รูปที่ 2.1 สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas* sp. (<http://ccala.butbn.cas.cz/en/chlamydomonasforbicularis-pringsheim>)

2.1.1.1 *Chlamydomonas acidophila*

เซลล์เป็นรูปร่างรีจนถึงรูปไข่ กว้าง 3-5 ไมโครเมตร ยาว 6-10 ไมโครเมตร ความยาวประมาณสองเท่าของความกว้าง คลอโรพลาสต์อยู่ด้านข้าง ล้อมรอบอย่างน้อยครึ่งเซลล์ ไพรีนอยด์อยู่ตรงกลางและด้านข้าง อายุสพอตอยู่ด้านหน้า (Negoro, 1944 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.1.2 *Chlamydomonas braunii*

เซลล์ส่วนใหญ่เป็นทรงรีจนถึงเกือบกลม กว้าง 14-26 ไมโครเมตร มีตุ่มเล็กๆแต่โดดเด่น คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย ไพรีนอยด์เป็นวงแหวนขนาดใหญ่ครึ่งวง อายุสพอตอยู่ด้านปลาย (Goroschankin, 1890 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.1.3 *Chlamydomonas ehrenbergii*

เซลล์รูปร่างเหมือนลูกแพร์ ฐานโค้งมน กว้าง 10-22 ไมโครเมตร ยาว 14-26 ไมโครเมตร บางครั้งพบว่าโพโรโทพลาสอยู่แยกจากผนังเซลล์ คลอโรพลาสต์รูปถ้วย มักมีลักษณะหนา ผิวไม่เรียบ อยู่ติดกับไพรีนอยด์ อายุสพอตอยู่ตรงกลางหรือด้านหน้า พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำหลายชนิด ส่วนใหญ่พบมากในบ่อน้ำที่อุดมด้วยสารอาหาร (Goroschankin, 1891 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.1.4 *Chlamydomonas snowiae*

เซลล์รูปร่างเหมือนลูกแพร์ หรือเป็นทรงกระบอกเล็กน้อย ฐานโค้งมน กว้าง 4-18 ไมโครเมตร ยาว 10-24 ไมโครเมตร ความยาวประมาณสองเท่าของความกว้างมีปุ่มรูปกรวยเล็กๆ คลอโรพลาสต์รูปถ้วย มีไพรีนอยด์อันใหญ่บริเวณฐาน มีอายุสพอต 1 หรือหลายอัน อยู่บริเวณตรงกลางหรือด้านหน้าของเซลล์ มักพบในดิน (Printz, 1914 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.1.5 *Chlamydomonas reinhardtii*

เซลล์กลมหรือเกือบกลม กว้าง 8-22 ไมโครเมตร ยาว 10-22 ไมโครเมตร ไม่มีปุ่มบริเวณด้านบนของเซลล์ คลอโรพลาสต์รูปถ้วยและมีไพรีนอยด์อันใหญ่อยู่ด้านในบริเวณฐาน อายุสพอตอยู่ตรงกลางหรือด้านหน้า สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้างซุโอสปอร์ สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้างแกมีตแบบไอโซแกมีส เป็นหนึ่งในสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุด พบได้ในแหล่งน้ำหลายชนิด (Dangeard, 1888 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.1.6 *Chlamydomonas debaryana*

เซลล์รูปร่างเกือบกลมจนถึงวงรี กว้าง 8-15 ไมโครเมตร ยาว 12-22 ไมโครเมตร ด้านยาวยาวกว่าด้านกว้าง 1.2-1.5 เท่า มีปุ่มขนาดใหญ่รูปกรวย คลอโรพลาสต์รูปถ้วย มีไพรีนอยด์ 1 อันขนาดใหญ่บริเวณฐาน อายุสพอตอยู่ตรงกลางหรือด้านหน้า (Gorozhankin, 1891 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.2 สาหร่าย *Chlorella* sp.

อนุกรมวิธาน (Lee, 2008)

Division Chlorophyta

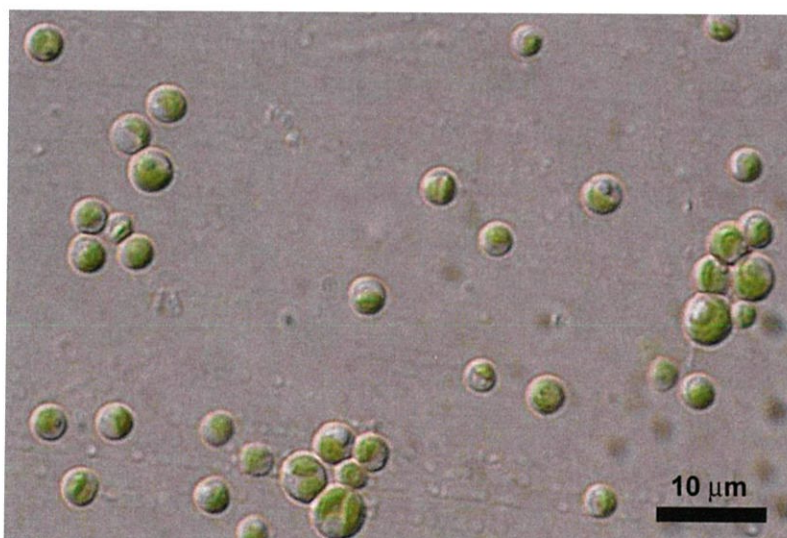
Class Chlorophyceae

Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

Chlorella sp. เป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างมีลักษณะกลมหรือรี คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นรูปถ้วยหรือเป็นแถบอยู่ข้างเซลล์ มีไพรีนอยด์ ผนังเซลล์บาง ซึ่งประกอบไปด้วยสารจำพวกสปอโรโพลีโนนิน (Sporopolennin) *Chlorella* sp. มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ที่มีจำนวน 4, 8 หรือ 16 เซลล์ สามารถพบสาหร่ายชนิดนี้ได้ใต้น้ำจืดและน้ำเค็มของประเทศไทย ซึ่งมีการดำรงชีวิตอยู่แบบอิสระแต่บางชนิดสามารถอยู่ในเนื้อเยื่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น โพรโตซัว ฟองน้ำ และไฮดรา (ลัดดา, 2544)



รูปที่ 2.2 สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. ([Http://ccala.butbn.cas.cz/en/chlorella-sp-2](http://ccala.butbn.cas.cz/en/chlorella-sp-2))

2.1.2.1 *Chlorella ellipsoidea*

เซลล์มีลักษณะสมมาตร รูปร่างกลม ความกว้าง 1.5-13 ไมโครเมตร ยาว 2-15 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์มีลักษณะเป็นรูปจานหรือเป็นแถบ เซลล์ที่มีอายุมากจะมีหลายกลีบ ขอบไม่เรียบ อาจมีลักษณะคล้ายลูกคลื่นหรือเป็นรอยตัด ไพรีนอยด์ประกอบด้วยเม็ดสีหลายชนิด ประกอบด้วยออสปอร์รูปวงรีจำนวน 2, 4, 8, 16 หรือ 32 ในแต่ละสปอร์แรงเจียม พบได้ทั่วไปในบ่อน้ำที่มีแพลงก์ตอน ทะเลสาบขนาดเล็ก หรือแหล่งน้ำอื่นๆที่มีดิน และผิวดิน (Gerneck, 1907 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.2.2 *Chlorella emersonii*

เซลล์กว้าง 3-17 ไมโครเมตร รูปร่างทรงกลมหรือรี อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม คลอโรพลาสต์มีลักษณะคล้ายแอ่งน้ำในเซลล์ระยะแรก จากนั้นจะมีลักษณะเป็นแถบ ไพรีนอยด์มีขนาดใหญ่ ล้อมรอบด้วยเม็ดสี 2-4 อัน ประกอบด้วยออสปอร์รูปวงรีจำนวน 2, 4 หรือ 8 ในแต่ละสปอร์แรงเจียม พบได้ทั่วไปบริเวณผิวดิน (Shihira และ Krauss, 1965 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.2.3 *Chlorella miniata*

เซลล์กว้าง 3-15 ไมโครเมตร รูปร่างทรงกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่เป็นกลุ่ม 2-4 เซลล์ คลอโรพลาสต์รูปถ้วย ไม่พบไพรีนอยด์ ประกอบด้วยออสปอร์จำนวน 16, 32 หรือ 64 ในแต่ละสปอร์แรงเจียม โดยจะปล่อยออกมาโดยการแตกหักของผนัง (Oltmanns, 1904 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.2.4 *Chlorella saccharophila*

เซลล์กว้าง 2-7 ไมโครเมตร เซลล์รูปทรงกระบอกหรือวงรี ยาว 3.5-10.2 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์คล้ายเป็นแอ่งน้ำ หรือเป็นแถบครึ่งหนึ่งของเซลล์และเปิดออกที่ด้านปลาย ไพรีนอยด์เห็นได้ไม่ชัดเจน ไม่พบเม็ดสี ประกอบด้วยออสปอร์รูปไข่จนถึงทรงรีจำนวน 4 หรือ 8 (2 หรือ 16 พบน้อย) ในแต่ละสปอร์แรงเจียม พบได้ทั่วไปบริเวณผิวดิน หรือแยกจากต้นไม้ (Migula, 1905 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.2.5 *Chlorella vulgaris*

เซลล์ มีลักษณะเป็นทรงกลมหรือเกือบกลม กว้าง 1.5-10 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์เป็นแถบกว้างหรือเป็นรูปถ้วย ไพรีนอยด์เป็นทรงกลมหรือรูปทรงรี มักล้อมรอบด้วยเม็ดแป้ง 2-4 อันประกอบด้วยออสปอร์ทรงกลมจำนวน 2, 4, 8 หรือ 16 ในแต่ละสปอร์แรงเจียม โดยจะปล่อยออกมาโดยการแตกหักของผนังเป็น 2-4 ส่วน พบได้ทั่วไป กระจายตามแหล่งที่มีแพลงก์ตอน และบริเวณผิวดิน มักพบในแหล่งที่มีมลพิษเล็กน้อยถึงปานกลาง (Beijerinck, 1890 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.3 สาหร่าย *Scenedesmus* sp.

อนุกรมวิธาน (Hassan และคณะ, 2012)

Division Chlorophyta

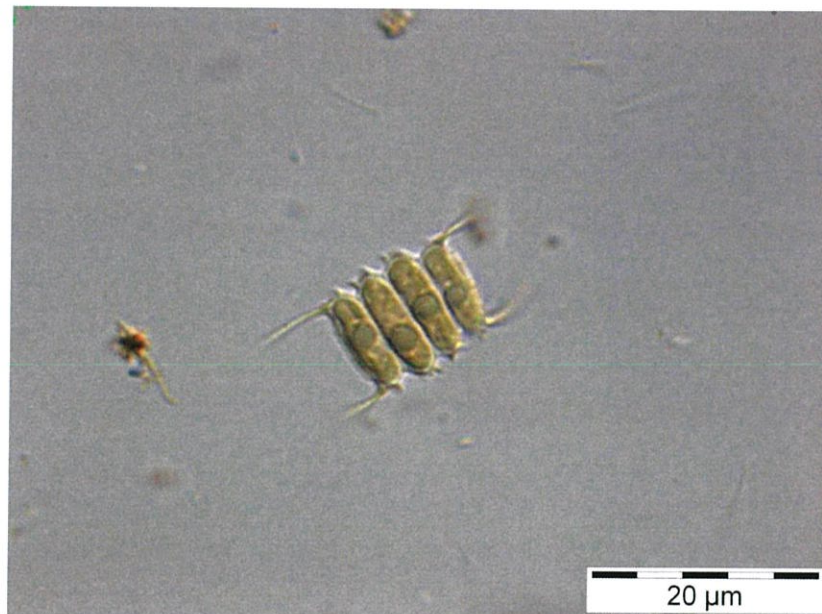
Class Chlorococcales

Order Chlorophyceae

Family Scenedesmasceae

Genus *Scenedesmus*

Scenedesmus sp. เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่พบได้ทั่วไป อยู่กันเป็นกลุ่มเซลล์ จำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นเป็นทวีคูณของ 2 จำนวนที่พบบ่อยที่สุดคือ 4 และ 8 ความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ส่วนใหญ่เกิดจากจำนวนและชนิดของหนาม และลักษณะของผนังเซลล์ แต่ละเซลล์จะมีคลอโรพลาสต์เป็นแผ่น 1 อัน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีมีได้หลากหลาย (Egan และ Trainor, 1989)



รูปที่ 2.3 สาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus* sp.

(http://www.planktonforum.eu/index.php?id=2&no_cache=1)

2.1.3.1 *Scenedesmus abundans*

เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม 2 หรือ 4 เซลล์ จัดเรียงเป็นเส้นตรงหรือแบบสลับกัน เซลล์กว้าง 4-6 ไมโครเมตร ยาว 11-15 ไมโครเมตร รูปทรงรีถึงเป็นทรงกระบอก ด้านปลายมีความโค้งมนและเรียวเล็กน้อย มักมีหนามหรือพินยื่นออกมาอยู่ในตำแหน่งลาดเอียงที่ขอบด้านปลายและตรงกลางเซลล์ และด้านในของแต่ละเซลล์ พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำและทะเลสาบ (Chodat, 1913 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.3.2 *Scenedesmus arcuatus*

เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม 4, 8 หรือ 16 เซลล์ ใน 2 แถว บางครั้งอาจจัดเป็น 3 แถว หรือเป็นเพียงเซลล์ด้านในที่ต่อกันมา เมื่อเซลล์เรียงตัวกันเป็น 2-3 แถว ทำให้เห็นช่องว่างชัดเจน หรือรูระหว่างด้านข้าง ล้อมรอบด้วยเมือกใส เซลล์กว้าง 3-9.5 ไมโครเมตร ยาว 7-18 ไมโครเมตร เซลล์เป็นรูปไข่หรือค่อนข้างเป็นทรงกระบอก โค้งมนเล็กน้อย ด้านนอกของเซลล์มักนูนออก พบได้ทั่วไปในแม่น้ำบริเวณน้ำนิ่ง บ่อน้ำ และทะเลสาบ (Lemmermann, 1899 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.3.3 *Scenedesmus armatus*

เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม 2 หรือ 4 จัดเรียงเป็นเส้นตรงหรือแบบสลับกัน เล็กน้อย กว้าง 3-8 ไมโครเมตร ยาว 7-17 ไมโครเมตร ลักษณะเป็นทรงกระบอกยาว หรือทรงกระบอกรี มีพินเล็กๆบริเวณเซลล์ด้านใน มีสันตามยาว หนามหลักชี้ออกด้านนอกเซลล์ ผนังเซลล์ด้านนอกตรงหรือนูนออกเล็กน้อย พบได้ตามแหล่งน้ำทั่วไปที่ค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ (Chodat, 1913 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.1.3.4 *Scenedesmus dimorphus*

เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม 2, 4 หรือ 8 จัดเรียงเป็นเส้นตรงหรือแบบสลับกัน อย่างชัดเจน จัดเรียงเป็น 1-2 แถว กว้าง 2-9.4 ไมโครเมตร ยาว 6-25 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เป็นรูปกระสวย เรียวและขยายออกเล็กน้อยที่ด้านปลาย เซลล์ด้านในตรง เซลล์ด้านหัวและท้ายโค้งออกเล็กน้อย พบได้ทั่วไปตามถ้ำน้ำแบบเปิดในฟาร์ม ทะเลสาบน้ำตื้น (Kützing, 1833 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

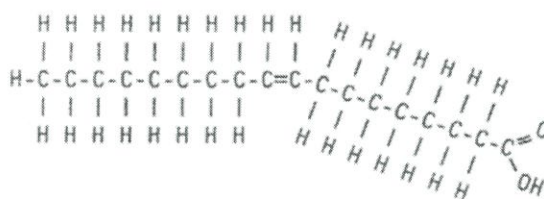
2.1.3.5 *Scenedesmus communis*

เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม 4, 8 เซลล์ จัดเรียงเป็นเส้นตรง กว้าง 3.5-6.6 ไมโครเมตร ยาว 9-17 ไมโครเมตร เซลล์ยึดออกแบบทรงกระบอก เซลล์ที่อยู่ด้านในมีปลายกลม มีหนามยื่นออกจากเซลล์หัวท้ายด้านปลาย โค้งเล็กน้อย ผนังด้านนอกสุดเกือบตรง มีเมือกใสหุ้มรอบๆ ผนังเซลล์เรียบ พบได้ทั่วไป เป็นหนึ่งในสปีชีส์ที่ถูกบันทึกไว้มากที่สุด (Hegewald, 1997 อ้างถึงใน John และคณะ, 2002)

2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว

2.2.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว โอเมก้า 9

กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid) มีความแตกต่างจากกรดไขมันประเภทอื่น ๆ ด้วยการมีพันธะคู่เพียง 1 พันธะ มีหลักฐานทางการแพทย์ที่สนับสนุนว่าการบริโภคอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว สามารถลดความดันโลหิต ช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด และยังมีหลายงานวิจัยที่รายงานว่าการบริโภคอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว ช่วยให้ระดับไขมัน Low-density lipoprotein cholesterol รวมถึงไตรเอซิลกลีเซอรอลในหลอดเลือดอยู่ในเกณฑ์ที่ดีขึ้น (Cheng และคณะ, 2016)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 9 โอเลอิก (C18:1 ω9)

([Http://omega3sealoiil.homestead.com/oleic.jpg](http://omega3sealoiil.homestead.com/oleic.jpg))

2.2.1.1 กรดโอเลอิก

กรดโอเลอิก เป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 จึงถูกจัดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวโอเมก้า 9 ที่เป็นที่นิยมใช้ทางการแพทย์ (Simonetti และคณะ, 2012)

กรดโอเลอิกมีประโยชน์ในการช่วยลดความเสี่ยงโรคหลอดเลือดหัวใจได้ถึงร้อยละ 20 ถึง 40 นอกจากนี้ยังสามารถช่วยลดปัจจัยเสี่ยงของโรคหลอดเลือดสมองตีบ อีกทั้งช่วยลดระดับไขมันในเลือด (Low-density lipoprotein cholesterol) (Huertas, 2010)

2.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

2.3.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3

กรดไขมันโอเมก้า 3 เป็นกรดไขมันเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่เป็นโมเลกุลของคาร์บอนสายยาว โอเมก้า (ω) คือ ตำแหน่งของพันธะคู่แรกที่นับจากปลายของสายคาร์บอนที่เป็นหมู่เมทิล จะเกิดพันธะคู่ที่อะตอมคาร์บอนลำดับที่ 3 เดลต้า (Δ) คือตำแหน่งของพันธะคู่แรก เมื่อนับจากปลายของสายคาร์บอนที่เป็นหมู่คาร์บอนิล โครงสร้างโมเลกุลของกรดไขมันจะมีอะตอมของคาร์บอนเป็นเลขคู่ (4 ถึง 24 อะตอม) และมีสภาพความไม่อิ่มตัวที่หลากหลาย (0 ถึง 6 พันธะคู่) (Gupta และคณะ, 2012)

2.3.1.1 กรดไลโนเลนิก (Linolenic acid; 18:3n-3 หรือ 3n-6)

กรดไลโนเลนิก (18:3n-3 หรือ 3n-6) เป็นกรดคาร์บอกซิลิกที่ประกอบด้วยคาร์บอน 18 อะตอม โดยมี 2 รูปแบบ คือ กรดแอลฟาไลโนเลนิก (ALA, 18:3n-3) และกรดแกมมาไลโนเลนิก (GLA, 18:3n-6) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง จึงต้องได้รับจากการรับประทานอาหาร โดย ALA มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นของกรดไขมันโอเมก้า 3 คือ EPA และ DHA โดย ALA มีส่วนช่วยในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยที่ไขมันในเลือดสูง ALA จะลดกระบวนการภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล คือ ภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไป ซึ่งหากร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง ก็จะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท ภาวะเสื่อมสภาพ และ แก่ก่อนวัย (Kim และคณะ, 2014)

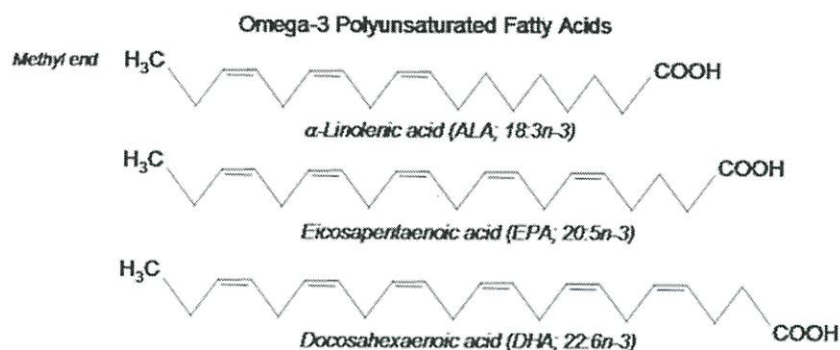
ALA ที่ใช้เป็นอาหารเสริมนั้น มีส่วนช่วยในการแสดงออกของ ฮีปโปแคมปัส ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสมองของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างความทรงจำระยะยาว ช่วยลดความเสียหายจากโรคหลอดเลือดสมองโดยตรง อีกทั้งป้องกันโรคทางระบบประสาทและสมอง (Blondeau, 2016)

2.3.1.2 กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก (Docosahexaenoic acid; DHA; 22;n3)

กรดกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก Docosa เป็นภาษากรีก แปลว่า 22 หมายถึงมีคาร์บอน 22 ตัว เรียงกันใน 1 โมเลกุลของกรดกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก Hexa แปลว่า 6 หมายถึงมีคาร์บอนไม่อิ่มตัว 6 คู่หรือมีพันธะคู่ 6 พันธะ DHA มีประโยชน์สำหรับร่างกาย เนื่องจากเป็นโครงสร้างของเยื่อสมองและประสาทซึ่งมีผลต่อสติปัญญา หากร่างกายขาด DHA จะทำให้เซลล์สมองและประสาทขาดประสิทธิภาพไปด้วย (พจน์ และคณะ, 2555)

2.3.1.3 กรดอีโคซาเพนตาอีโนอิก (Eicosapentanoic acid; EPA; 20;n3)

กรดอีโคซาเพนตาอีโนอิก Eicosa เป็นภาษากรีกแปลว่า 20 หมายถึงมีคาร์บอน 20 อะตอม เรียงกันใน 1 โมเลกุลของกรดอีโคซาเพนตาอีโนอิก Penta แปลว่า 5 หมายถึงมีคาร์บอน 5 คู่ที่ไม่อิ่มตัว คือมี พันธะคู่จับกัน 5 คู่ EPA ถูกใช้ในการสร้างพอสทาเกลนดินซึ่งทำให้เกิดเลือดไม่เกาะกัน และนำไปสร้างทรอมบอซินซึ่งมีผลต่อการเกาะกันของเกล็ดเลือดน้อยมาก ผลที่ได้คือ เกล็ดเลือดไม่แข็งตัวง่าย ช่วยในการลดอัตราการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและอัมพาต (พจน์ และคณะ, 2555)

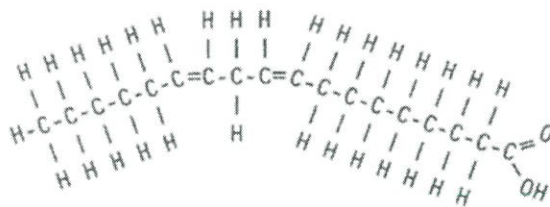


รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรดไขมันสายยาว ([Http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2077/omega-3-fatty-acid-กรดไขมันโอเมกา-3DHA](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2077/omega-3-fatty-acid-กรดไขมันโอเมกา-3DHA))

องค์การอนามัยโลก (WHO) แนะนำว่าประชากรทุกคนควรบริโภคปลาเป็นประจำ เพื่อให้ได้รับ EPA + DHA ในปริมาณ 200-500 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งจะช่วยในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองตีบ (Kris-Etherton, 2009)

2.3.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 6

กรดไขมันโอเมก้า 6 ที่พบมากที่สุดคือ กรดไลโนเลอิก เมื่อเราบริโภคอาหารที่มีกรดไขมัน โอเมก้า 6 กรดไขมันจะแทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดที่ไม่ปกติ และเพิ่มการอักเสบ (Asif, 2011)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 6 ไลโนเลอิก (C18:2 ω 6)

([Http://omega3sealoil.homestead.com/linoleic.jpg](http://omega3sealoil.homestead.com/linoleic.jpg))

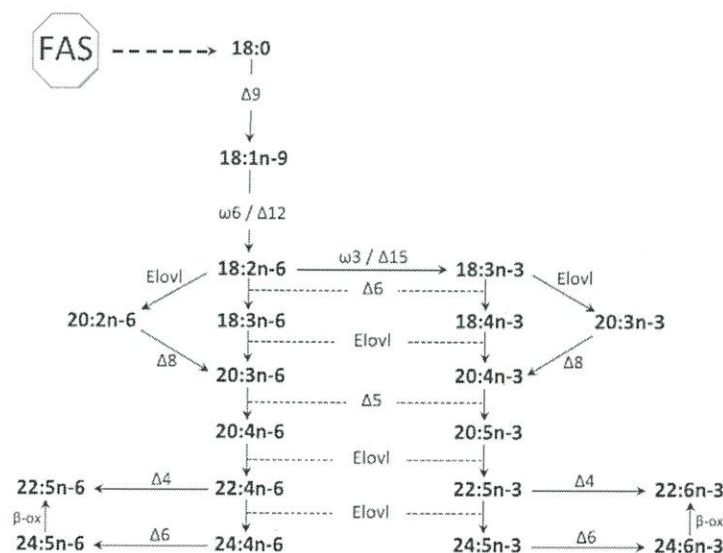
2.3.2.1 กรดไลโนเลอิก

กรดไลโนเลอิก เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง พันธะคู่อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 12 จัดเป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 กรดไลโนเลอิกเป็นกรดไขมันจำเป็นที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 6 ชนิดอื่นๆได้ นั่นคือ กรดอะราชิโดนิก (AA) ซึ่งกรดอะราชิโดนิกและ EPA ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของอีโคซานอยด์ อีโคซานอยด์เป็นสารตัวกลางและตัวควบคุมการอักเสบ (Baker และคณะ, 2012) โดย EPA ทำหน้าที่ชักนำให้ฟอสโฟไลเปสไปเปลี่ยนเป็นอีโคซานอยด์ทำให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนัง (Nicolaou, 2013)

2.4 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนนั้นสามารถเกิดได้ 2 วิธี คือ วิธีที่พบในแบคทีเรียหลายชนิด จะเกิดการสร้างพันธะคู่ระหว่างการสังเคราะห์กรดไขมัน บ้างพบในแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตในทะเล ซึ่งสามารถผลิต EPA ได้ และวิธีที่พบในพวักยูคาริโอตทั้งหมดและแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ดีซาทูเรสร่วมกับสถานะมีอากาศ ซึ่งกลไกพื้นฐานของเอนไซม์ดีซาทูเรสคือการย้ายอะตอมของไฮโดรเจน 2 อะตอม เพื่อให้คาร์บอนอะตอมเกิดพันธะคู่ สำหรับการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนต่อไป

จากรูปที่ 2.7 แสดงกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ซึ่งสารตั้งต้นของกระบวนการคือ กรดสเตียริก (C:18) เมื่อทำปฏิกิริยาเอนไซม์เดลต้า 9 ดีซาทูเรส จะเกิดพันธะคู่ 1 คู่ กลายเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid) คือ กรดไขมันโอเลอิก (C18:1n-9) จากนั้นกรดโอเลอิกจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โอเมก้า 6 ดีซาทูเรสต่อเกิดเป็นกรดไลโนเลอิก (LA, C18:2n-6) (สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องน้ำเงินจะใช้เอนไซม์เดลต้า 12 ดีซาทูเรส) จากนั้น LA จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์โอเมก้า 3 หรือเดลต้า 15 ดีซาทูเรสทำให้เกิดกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3 และ 6 คือกรดไลโนเลนิก (ALA, C18:3n-3) และกรดแกมมาไลโนเลนิก (C18:3 n-6) จากนั้น ALA จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เดลต้า 6 ดีซาทูเรสหรือเอนไซม์อีลองเกสและเดลต้า 8 ดีซาทูเรส กลายเป็น EPA (C20:5n-3) ต่อมาทำการสังเคราะห์ DHA (C22:6n-3) โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เดลต้า 4 ดีซาทูเรส เช่นเดียวกับกรดแกมมาไลโนเลนิกถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์แบบเดียวกันจนเกิดเป็นกรดโดโคซาเพนตาอีนอิก (C22:5n-6) (Castro และคณะ, 2016)



รูปที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Castro และคณะ, 2016)

2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิตกรดไขมันโอเมก้า 3

อุณหภูมิ ผลการศึกษาทำให้ทราบว่า ค่าอุณหภูมิแปรผกผันกับผลได้ DHA ทั้งหมดที่ได้รับจากการทดลองของ Gupta และคณะ (2012) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตจำพวก *Thraustochytrids* ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลเซลล์เดียว จัดอยู่ในดิวิชัน *Heterokontophyta* (Honda และคณะ, 1998) ด้วยการลดอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจาก 30 องศาเซลเซียส ลงมาเหลือ 20 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เกิดการผลิต DHA ที่สูงขึ้นถึงร้อยละ 52 ของกรดไขมันทั้งหมด แม้ว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ได้ชีวมวลปริมาณมากที่สุด แต่ทั้งนี้อุณหภูมิที่สูงและต่ำ ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานตามสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันด้วย

กระบวนการหมัก จากการทำการทดสอบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องและแบบกะเพื่อเปรียบเทียบผลของการสะสมไขมันของ Gupta และคณะ (2012) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Aurantiochytrium* sp. KRS101 ที่จัดอยู่ในดิวิชัน *Heterokontophyta* (Honda และคณะ, 1998) พบว่า กระบวนการหมักแบบกะ มีความสามารถในการผลิต DHA ถึงร้อยละ 40 ของกรดไขมันทั้งหมด

แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการสะสมไขมัน จากการทดลองของ Ganuza และคณะ (2008) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Shchizochytrium* sp. G13/2S ในอาหารที่มีส่วนประกอบของแอมโมเนียที่มีความเข้มข้น 300-400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกะ พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญสูงสุดในสภาวะไม่จำกัดแหล่งไนโตรเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกรเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของไนโตรเจนที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะการเพาะเลี้ยงที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน จากการสำรวจพบว่า การสะสมไขมันเป็นผลมาจากการจำกัดแหล่งไนโตรเจนในอาหารของกระบวนการเพาะเลี้ยง

จากการทดลองของ Patil และ Gogate (2015) ศึกษากรดอะมิโนที่นำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Shchizochytrium limacinum* SR21. พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีส่วนประกอบของกรดกลูตามิกสามารถส่งเสริมให้เกิดผลผลิตไขมันสูงสุด คือ ร้อยละ 19 รองลงมาคือ อาร์จินิน ส่งเสริมให้ได้ผลผลิตไขมันได้ร้อยละ 17-19 และไทโรซินได้ผลผลิตไขมันร้อยละ 16.3 และกรดอะมิโนที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อผลได้ชีวมวล ไขมัน และ DHA แตกต่างกัน

ปริมาณอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง จากการทดลองของ Gupta และคณะ (2012) พบว่า กระบวนการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันอิ่มตัวไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว เกิดขึ้นเมื่อมีการผลิตไขมันจากสาหร่ายที่เจริญได้ในสภาพที่มีแก๊สออกซิเจน ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบ มีผลต่อการละลายของแก๊สออกซิเจน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมาก (มากกว่า 40 มิลลิลิตร ในฟลาสก์

ขนาด 250 มิลลิลิตร) ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตรวดเร็ว แต่ทำให้ผลได้ DHA ต่ำ เป็นผลมาจากทฤษฎีพื้นผิว (Surface methodology)

แหล่งคาร์บอน จากการทดลองของ Yokochi และคณะ (1998) ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Schizochytrium limacinum* SR21. โดยการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้ พบว่าการใช้กลูโคส ฟรักโทส และกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน จะเกิดผลได้ DHA ร้อยละ 32.5, 30.9 และ 43.1 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ กรดโอเลอิกและน้ำมันจากเมล็ดของต้นแฟลคซ์ ได้ผลได้ DHA ร้อยละ 6.1 และ 6.8 ตามลำดับ จากการทดลองข้างต้นจึงสรุปได้ว่า แหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมให้เกิดผลได้ของ DHA ได้ดี

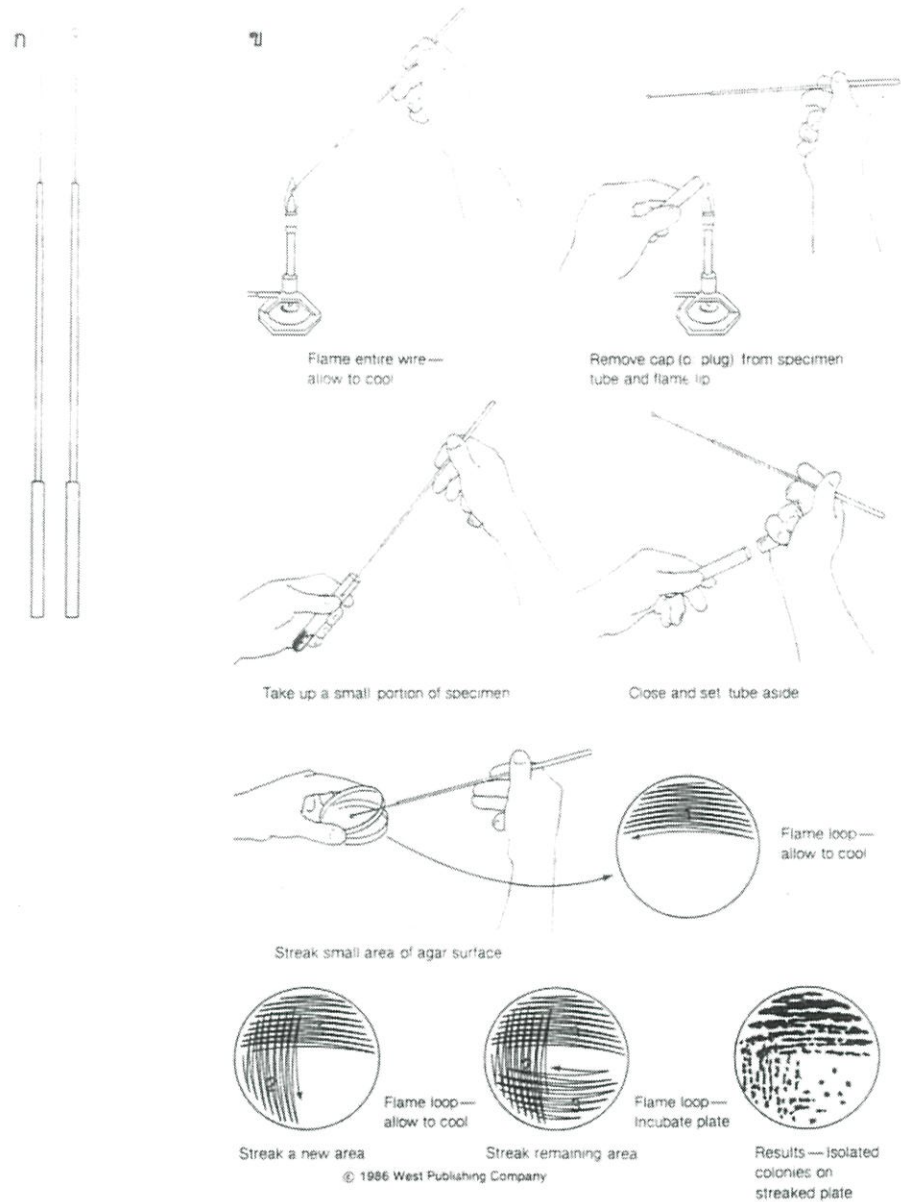
กรดอินทรีย์ จากการทดลองของ Patil และ Gogate (2015) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับวัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA) และสารตัวกลาง พบว่า กรดอินทรีย์แต่ละตัวมีผลต่อผลได้ของ DHA DPA และกรดพาล์มมิติก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Schizochytrium limacinum* SR21. ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกรดซิตริกจะทำให้เกิดผลได้ DHA สูงสุด คือ 1.89 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของโซเดียมไพรูเวท ซึ่งทำให้เกิดผลได้ไขมันสูงสุดคือ 14.75 กรัมต่อลิตร แต่ผลได้ของ DHA ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรดซิตริก

2.6 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

2.6.1 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak plate)

2.6.1.1 การขีดเชื้อแบบง่าย (Simple streak)

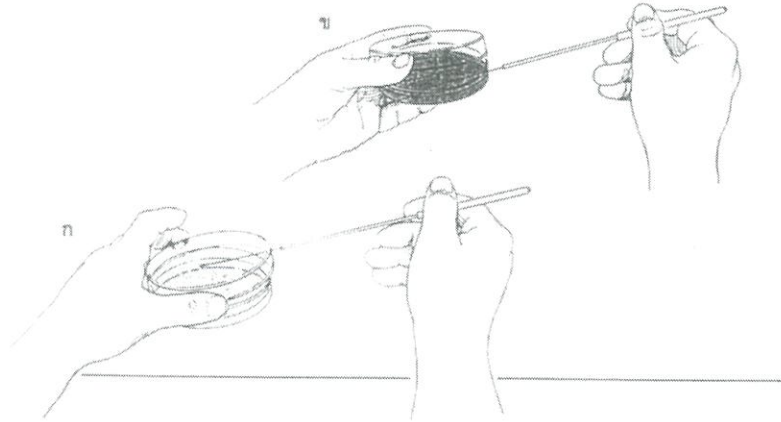
อุปกรณ์ที่ต้องใช้คือห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) เชื้อที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และตะเกียงแอลกอฮอล์ โดยนำห่วงเขี่ยเชื้อมาลนไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ และเชื้อที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำห่วงเขี่ยเชื้อมาขีดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจนจำนวนเซลล์เหลือน้อยลงจนแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ดังรูปที่ 2.8



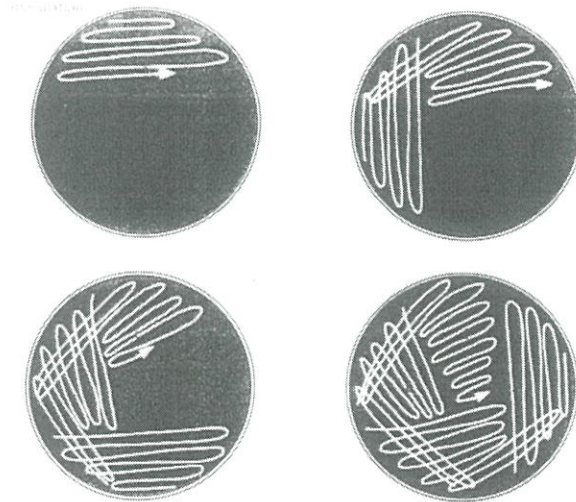
รูปที่ 2.8 อุปกรณ์และวิธีการขีดเชื้อแบบง่าย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)

2.6.1.2 การขีดเชื้อแบบตัดกัน (Cross streak)

โดยใช้ห่วงเชี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดงและรอให้เย็น แล้วแตะเชี่ยมาขีดบนอาหารวุ้นตามแนว 1-2 ประมาณ 3-4 เส้น จากนั้นเผาห่วงเชี่ยเชื้อจนร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่มีมากเกินไป และรอให้เย็น (หรืออาจแตะห่วงเชี่ยเชื้อที่ขอบวุ้นในงานบริเวณที่ไม่มีเชื้ออยู่เพื่อให้แน่ใจว่าห่วงเชี่ยเชื้อเย็นแล้ว) ขีดบนอาหารวุ้นตามแนว 2-3 โดยให้รอยขีดตัดผ่านตอนปลายของแนว 1-2 เล็กน้อย ทำนองเดียวกัน เผาห่วงเชี่ยเชื้อ และขีดตามแนว 3-4 และแนว 4-5 เชื้อจะจางลงในแนวขีดท้ายๆ และแยกแต่ละเซลล์ออกจากกันได้ ดังรูปที่ 2.9 และ 2.10



รูปที่ 2.9 การเขี่ยเชื้อใส่อาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)



รูปที่ 2.10 วิธีการขีดเชื้อบนอาหารแข็งในจานเพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์
(นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)

2.6.2 การทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (Spread plate)

อุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ แท่งแก้วรูปตัวแอล แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปิเปตต์ และจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนอื่นทำการหยดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร บนผิวหน้าอาหารวุ้น จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ฆ่าเชื้อโดยการจุ่มลงในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 แล้วเผาไฟ เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจาน จากนั้นนำจานที่มีเชื้อไปบ่มโดยกลับเอาก้นจานขึ้น จะได้โคโลนีที่ปรากฏบนผิวอาหาร ดังรูปที่

2.11



รูปที่ 2.11 การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารแข็ง (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)

2.7 การเก็บเกี่ยวเซลล์

การเก็บเกี่ยวเซลล์ควรเลือกวิธีที่เหมาะสมกับระดับการเลี้ยง แต่สำหรับการเก็บเกี่ยวเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กในระดับภาคอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ พบว่ามีปัญหาการเก็บเกี่ยวของสาหร่ายขนาดเล็ก (Christenson และ Sims, 2011) เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กที่เป็นเซลล์เดี่ยวมีขนาดเล็ก จึงต้องมีการหาวิธีที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งการเก็บเกี่ยวเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กนั้นสามารถทำได้ด้วยกันหลายวิธี

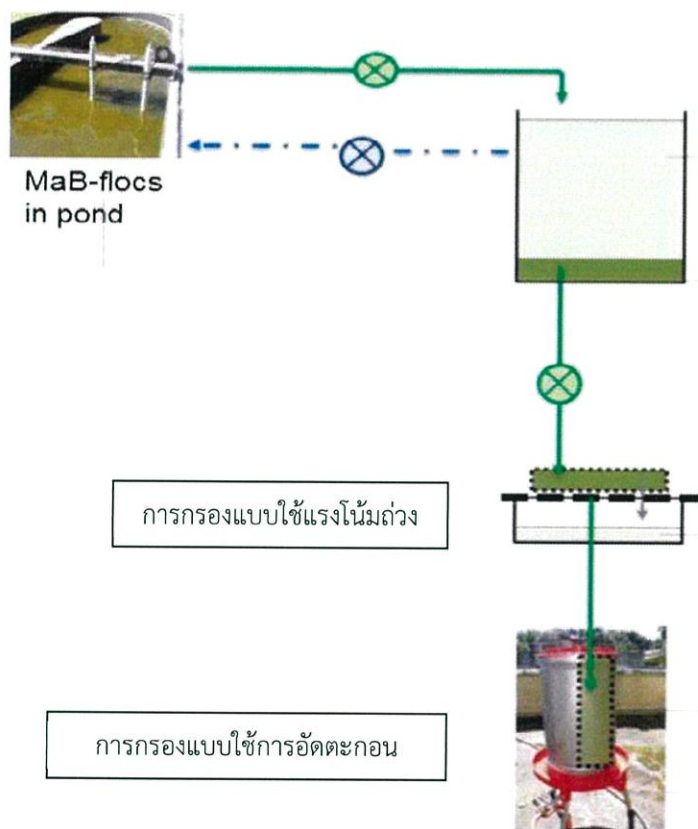
2.7.1 การหมุนเหวี่ยง

เป็นวิธีการหมุนเหวี่ยง (Centrifugation) โดยใช้แรงหนีศูนย์กลาง เพื่อเร่งให้เกิดการตกตะกอน การแยกชั้นจะขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค การตกตะกอนจะเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วรอบของการหมุนเหวี่ยง ข้อดีของวิธีการนี้คือ สามารถใช้กับสาหร่ายขนาดเล็กได้ทุกสายพันธุ์ (Gerardo และคณะ, 2015) ง่ายต่อการใช้งาน อีกทั้งเป็นวิธีการรวดเร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บเซลล์แบบอื่น ข้อเสียคือ การที่ใช้พลังงานสูง มีค่าใช้จ่ายที่สูง และการที่มีแรงเหวี่ยงมากสามารถทำให้โครงสร้างของเซลล์เสียหายได้ (Barros และคณะ, 2015)

2.7.2 การกรอง

การกรอง (Filtration) โดยการรีดตะกอนออกและหลังจากนั้นนำเข้าสู่ขั้นตอนการรวมตัวหรือตกตะกอนต่อไป การกรองเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับสาหร่ายขนาดเล็กที่มีเซลล์ขนาดใหญ่หรือสาหร่ายขนาดเล็กที่เป็นกลุ่มเซลล์ (Barros และคณะ, 2015) เช่น *Coelastrum proboscideum* และ *Spirulina platensis* (Mata และคณะ, 2010) การเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยวิธีการกรองนั้น โดยทำให้เซลล์มีความเข้มข้นเพื่อแยกส่วนใส่ออกและทำการเก็บเซลล์ จากนั้นใช้การกรองซึ่งตามรูปที่ 2.12 เป็นการกรองแบบใช้แรงโน้มถ่วงและใช้การอัดตะกอน อุปกรณ์การกรองนั้นมี

ด้วยกันหลายรูปแบบ อาทิ การกรองแบบนาโน การกรองแบบรีเวิร์สออสโมซิส การกรองแบบใช้เมมเบรน ซึ่งพบว่า การกรองแบบใช้เมมเบรนนั้นเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Gerardo และคณะ, 2015)



รูปที่ 2.12 วิธีการกรองแบบแรงโน้มถ่วง (Gerardo และคณะ, 2015)

2.8 การสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก

การสกัดไขมันจากสาหร่ายจะขึ้นอยู่กับกระบวนการปรับสภาพ และชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็ก ที่มีลักษณะทางกายภาพ ความเข้มข้น หรือการเป็นผง ระหว่างการสกัดนั้นชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็กจะผสมเข้ากับตัวทำละลาย ซึ่งการสกัดไขมันออกจากเซลล์นั้น จะได้ปริมาณไขมันทั้งหมดที่จะแยกออกจากเซลล์ ตัวทำละลาย และน้ำ โดยการสกัดไขมันนั้นต้องมีความจำเพาะเจาะจงเพื่อจะสกัดเฉพาะไขมันออกมา เพื่อไม่ให้ได้สารอื่นปนเปื้อน เช่น โปรตีน หรือ คาร์โบไฮเดรต อีกทั้งในส่วนขั้นตอนการแยกไขมันและการทำให้บริสุทธิ์ก็ควรเลือกวิธีที่เหมาะสม ควรเลือกการสกัดที่เป็นเอซิลกลีเซอรอลมากกว่าไขมันอื่นๆ เนื่องจากสามารถใช้เป็นไบโอดีเซลได้ง่ายกว่า (Halim และคณะ

2012) แต่สำหรับการสกัดไขมันจากสาหร่ายเพื่อใช้ทางด้านอาหารนิยมใช้วิธี การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลฟลูอิด เนื่องจากปลอดภัย และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่นั่นยังปราศจากปิโตรเลียม การสกัดไขมันแบ่งได้เป็น 2 วิธีหลักๆ คือ วิธีการเชิงกล (Mechanical method) และ วิธีการทางเคมี (Chemical method) วิธีการทางเคมี ได้แก่ การสกัดโดยใช้ของเหลวไอออนิก การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอล และการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย วิธีการเชิงกลได้แก่ การบีบน้ำมัน การใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัด และการใช้คลื่นอัลตราโซนิคช่วยในการสกัด (Mubarak และคณะ, 2015)

2.8.1 การสกัดโดยวิธีเชิงกล

2.8.1.1 การบีบอัด

วิธีนี้จะใช้แรงเชิงกลเพื่อให้เซลล์แตก และบีบอัดน้ำมันออกมาจากชีวมวลแห้ง สามารถสกัดน้ำมันออกมาได้ประมาณร้อยละ 75 แต่วิธีนี้ค่อนข้างใช้เวลานาน และต้องใช้ชีวมวลในปริมาณมาก (Harun และคณะ, 2010)

2.8.1.2 การใช้คลื่นอัลตราซาวนด์

เป็นการใช้คลื่นเสียงผ่านตัวกลางเพื่อทำลายผนังเซลล์ที่หนาของสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อให้ไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ออกมาได้ วิธีนี้สามารถช่วยเพิ่มปริมาณไขมันที่สกัดได้ (Pereira Neto และคณะ, 2013)

2.8.1.3 การใช้คลื่นไมโครเวฟ

ไมโครเวฟเป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่ความถี่ตั้งแต่ 0.3-300 กิกะเฮิรตซ์ ทำให้เกิดความร้อนได้เมื่อผ่านโมเลกุลที่มีขั้ว เช่น น้ำที่อยู่ในชีวมวล จึงทำให้เกิดความร้อนและสามารถเจาะผ่านผนังเซลล์ได้ (Iqbal และ Theegala, 2013)

2.8.2 การสกัดโดยวิธีการทางเคมี

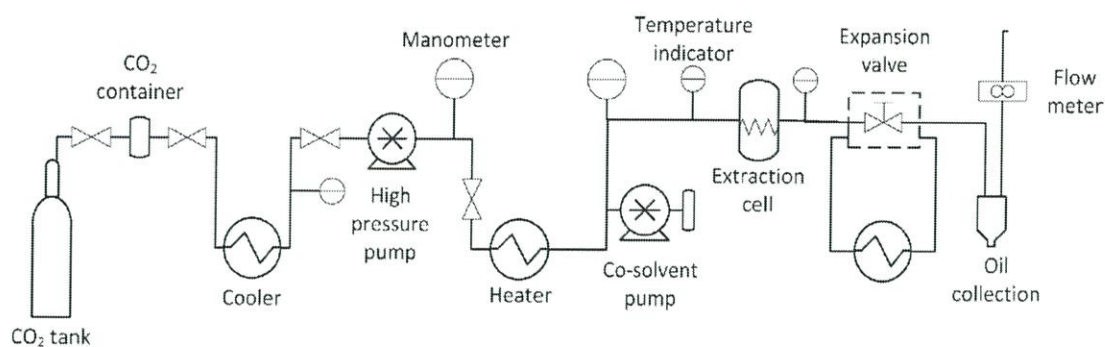
2.8.2.1 การสกัดโดยใช้ของเหลวไอออนิก

การใช้ของเหลวไอออนิกเป็นตัวทำละลายเหมาะกับการสกัดไขมันจากสาหร่ายเนื่องจากเป็นสารที่มีคุณสมบัติไม่ระเหย มีเสถียรภาพทางความร้อน และมีความยืดหยุ่นในการสังเคราะห์ (Kim และคณะ, 2012^b)

2.8.2.2 การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลฟลูอิด

การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลฟลูอิดจะใช้แก๊สและความดันเพื่อดึงไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก (Kligerman และ Bouwer, 2015) ได้รับการออกแบบโดยเฉพาะเพื่อใช้งานเกี่ยวกับการสกัดไขมันสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลฟลูอิด (รูปที่ 2.13) เป็นการสกัดที่มีความเหมาะสมต่อการสกัดผลผลิตที่เป็นกรดไขมัน โอเมก้า 3 และโอเมก้า 6 ซึ่งการสกัดด้วยวิธีนี้จะเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารละลายอินทรีย์ อีกทั้งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สามารถกำจัดได้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งการใช้การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลฟลูอิดนี้มีข้อดีในแง่สำหรับความปลอดภัยสำหรับใช้งานทางด้านอาหารกว่าวิธีการอื่น (Solana และคณะ, 2014) เนื่องจากสารละลายอินทรีย์

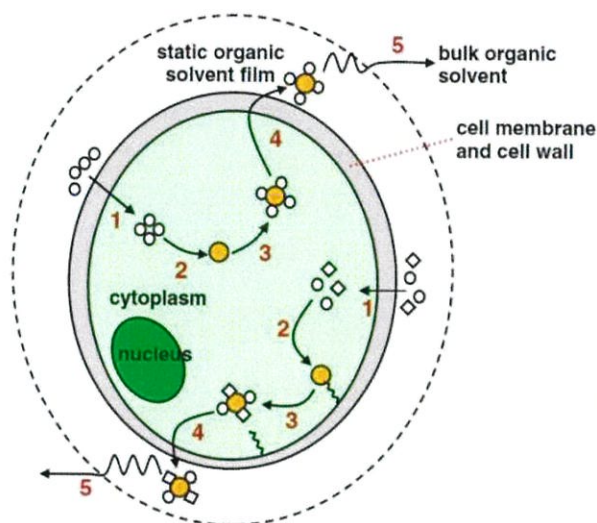
นั้นไม่สามารถแยกออกได้หมด ข้อเสีย คือ กระบวนการนี้มีค่าใช้จ่ายที่สูงทั้งเครื่องมือตลอดจนการดำเนินการ (Halim และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.13 แผนภาพของอุปกรณ์การสกัดแบบซูเปอร์คริติคอลฟลูอิด (Solana และคณะ, 2014)

2.8.2.3 การสกัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์

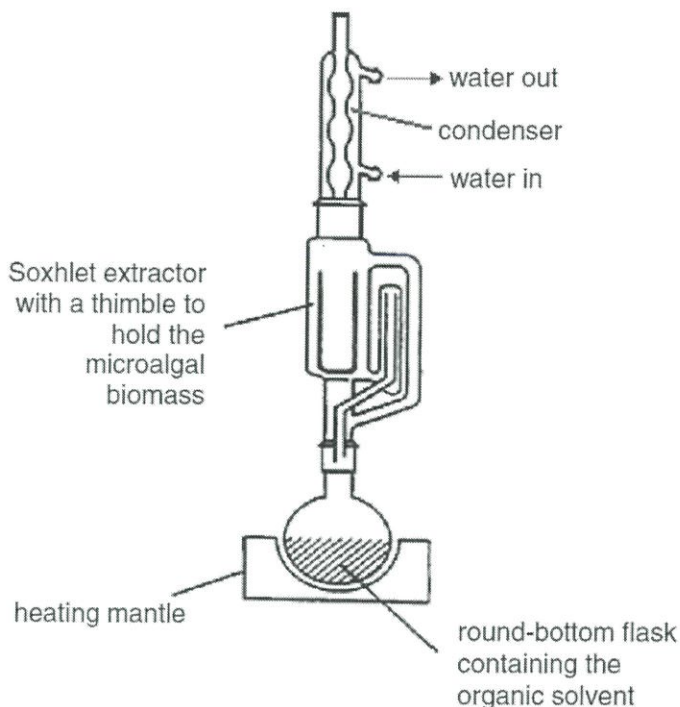
หลักการพื้นฐานของสารสกัดอินทรีย์ในการสกัดไขมันในสหายขนาดเล็ก จะใช้คุณสมบัติพื้นฐานซึ่งละลายได้ในตัวทำละลาย โดยใช้ความสัมพันธ์ภายในโมเลกุลของกรดไขมัน สายยาวที่ไม่ชอบน้ำที่มีแรงดึงดูดแวนเดอร์วาลส์กับเม็ดไขมันในไซโทพลาสซึม (Halim และคณะ, 2012) การสกัดไขมันด้วยวิธีพื้นฐาน ข้อดี คือ กระบวนการที่ไม่ยุ่งยาก แต่มีข้อจำกัดด้านระยะเวลา การสกัดที่นาน ได้ผลผลิตต่ำ (Prommuak และคณะ, 2012) ซึ่งกระบวนการสกัดจะแสดงในรูปที่ 2.14 ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน เมื่อเซลล์สหายขนาดเล็กนั้นมีการสัมผัสกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน หรือ คลอโรฟอร์ม ตัวทำละลายจะแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ (ขั้นที่ 1) จากนั้นจะทำปฏิกิริยากับไขมันที่เป็นกลางโดยอาศัยแรงแวนเดอร์วาลส์ (ขั้นที่ 2) ซึ่งไขมันและตัวทำละลายจะจับกันเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (ขั้นที่ 3) โดยสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้จะอาศัยความต่างระหว่างความเข้มข้นนี้ผ่านออกมาทางเยื่อหุ้มเซลล์ (ขั้นที่ 4) และสารประกอบเชิงซ้อนของไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์นี้จะอยู่ล้อมรอบเซลล์เป็นลักษณะชั้นฟิล์มบนผนังเซลล์ (Halim และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.14 แผนภาพกลไกการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Halim และคณะ, 2012)

ส่วนใหญ่ระดับห้องปฏิบัติการนิยมใช้การเพาะเลี้ยงแบบ Batch ซึ่งมีข้อจำกัดต่างๆ อาทิ การถ่ายโอนมวลสารของไขมัน ซึ่งการจะชนะข้อจำกัดนี้ได้ จึงต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก แต่เนื่องด้วยค่าใช้จ่ายที่สูงจึงไม่เหมาะสม จึงอาศัยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extraction) ซึ่งจะเป็นการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งอุปกรณ์จะแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน โดยส่วนแรกจะเป็นฟลาสก์แบบก้นกลมที่มีการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องที่จะทำหน้าที่ในการจัดเก็บสารสกัดตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนที่สองคือ ส่วนที่จะทำการเก็บชีวมวลที่เข้มข้นหรือชีวมวลแห้ง และส่วนสุดท้าย คอนเดนเซอร์ที่ให้น้ำหล่อเย็นเข้า และมีที่ระบายน้ำออก โดยสารสกัด ตัวทำละลายอินทรีย์จะสัมผัสกับชีวมวลสำหรับขนาดเล็กและจะทำการสกัดไขมันออกมา โดยจะมีปลอกที่ป้องกันไม่ให้ชีวมวลสำหรับไหลไปตามตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อตัวทำละลายอินทรีย์อยู่ในระดับกัลกน้ำแล้วนั้นจะกลับเข้าสู่ฟลาสก์แบบก้นกลมอีกครั้งหนึ่ง ขณะที่สกัดไขมันนั้น ไขมันจะอยู่ในฟลาสก์แบบก้นกลม แม้วิธีนี้จะมีข้อดีในการหลีกเลี่ยงการใช้ปริมาณสารตัวทำละลายอินทรีย์จำนวนมาก แต่มีข้อเสียในการใช้พลังงานที่สูง (Halim และคณะ, 2012)

ไขมันที่จะทำการสกัดนั้นจะขึ้นกับสัดส่วนการมีไขมันและไม่มีไขมันของไขมัน ทำให้ต้องเลือกสารสกัดที่มีความจำเพาะกับตัวอย่าง (Ramluckan และคณะ, 2014) สารสกัดตัวทำละลายที่ผสมที่นิยมใช้ในการสกัดไขมันจากสาหร่าย เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ (ผสมกับเมทานอลหรือเอทานอล) และ คลอโรฟอร์ม (ผสมกับเมทานอลหรือเอทานอล) ผลของเมทานอลที่แตกต่างกันพบว่าหากใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงหรือเมทานอลจะให้ไขมันในปริมาณสูง (Hidalgo และคณะ, 2015)



รูปที่ 2.15 อุปกรณ์การสกัดแบบต่อเนื่อง (Halim และคณะ, 2012)

Ryckebosch และคณะ (2012) รายงานผลของการสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก 5 ชนิด ได้แก่ *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis salina*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* และ *Scenedesmus obliquus* ด้วยสารละลาย ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่า การใช้สารผสมของเมทานอลและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 ทำให้ได้ปริมาณไขมันทั้งหมดสูงที่สุด โดยสูงกว่าวิธีของ Folch และคณะ (1956) ที่ใช้สารผสมของเมทานอลและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:2 และวิธีของ Bligh และ Dyer (1959) ที่ใช้สารผสมของเมทานอลและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 2:1 รวมกับน้ำ และยังให้ความเห็นว่าวิธีของ Bligh และ Dyer (1959) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายนั้น เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมสำหรับการสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กเนื่องจากวิธีของ Bligh และ Dyer เหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 2-10 แต่ในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กนั้นมีไขมันในปริมาณสูงกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำให้ค่าที่ได้นั้นอาจน้อยกว่าความเป็นจริง

2.9 การศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มดั่งเชิงซ้อนจากสาหร่ายขนาดเล็ก

Abomohra และคณะ (2016) รายงานปริมาณกรดไขมันที่สกัดได้จาก *Scenedesmus obliquus* พบว่ามีปริมาณกรดไขมันทั้งโอเมก้า 3 ได้แก่ กรดสเตียริโดนิก และกรดไลโนเลนิก กรดไขมันโอเมก้า 6 ได้แก่ กรดไลโนเลอิก และกรดแกมมาไลโนเลอิก และ กรดไขมันโอเมก้า 9 ได้แก่ กรดอีไลดิก และกรดโอเลอิก นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้น้ำร้อนช่วยในการสกัดสามารถช่วยเพิ่มปริมาณผลได้ของกรดไขมันอีกด้วย

Sahu และคณะ (2013) รายงานว่าการใช้กรดไขมันเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยใช้ความจำเพาะของปริมาณกรดไขมันที่พบในสาหร่ายแต่ละชนิด ซึ่งจากการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็ก 12 สายพันธุ์ ทำให้พบว่าปริมาณกรดไขมันโอเมก้า 3 ของ *Chlorella* sp. ที่พบมี 2 ชนิด คือ ALA และ DHA ปริมาณ ALA ร้อยละ 0.36 ± 0.05 และ DHA ปริมาณ 3.24 ± 0.12 แต่ไม่พบ EPA

Suh และคณะ (2015) รายงานว่าเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 20 สายพันธุ์ในประเทศเกาหลีใต้ พบว่า *Chlorella ellipsoidea* มีปริมาณ ALA ร้อยละ 0.5 ปริมาณผลรวมของ EPA และ DHA ร้อยละ 37.7 และ *Chlamydomonas* sp. มีปริมาณ ALA ร้อยละ 26.7 ปริมาณผลรวมของ EPA และ DHA เท่ากับ 22.9 และจัดให้สาหร่าย *C. ellipsoidea* เป็นหนึ่งในกลุ่มของสาหร่ายที่มีปริมาณ EPA สูง

Zhukova และ Aizdaicher (1995) รายงานว่ากรดไขมันแต่ละชนิดของสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก 15 สายพันธุ์ โดยสาหร่ายขนาดเล็กในคลาส Chlorophyceae 2 สายพันธุ์ คือ *Dunaliella* sp. และ *Chlorella* sp. โดยสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด อุดมไปด้วยกรด ALA โดย *Dunaliella* sp. พบปริมาณ ALA ร้อยละ 36.9-42.6 และ *Chlorella* sp. พบ ALA ร้อยละ 22.3 ของชีวมวลแห้งทั้งหมด ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า 3

Vidyashankar และคณะ (2015) รายงานลักษณะของกรดไขมันและสารไฮโดรคาร์บอนของสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดย *Scenedesmus* sp. ทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำจืดนั้นพบปริมาณกรดไขมันไลโนเลนิก ซึ่ง *Scenedesmus* sp. K พบปริมาณของกรดไขมันไลโนเลนิกมากที่สุด ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 39.04 ของปริมาณสารเมทิลเอสเทอร์ของไขมัน

Guedes และคณะ (2011) รายงานว่าองค์ประกอบของกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กและไซยาโนแบคทีเรียที่พบทั่วไป ประกอบด้วยกรดอีโคซาเพนตาอีโนอิกและกรดอัลฟาไลโปอิก ซึ่งมีความสำคัญในอาหาร โดยศึกษาสาหร่ายขนาดเล็ก 13 สายพันธุ์ และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 14 สายพันธุ์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* พบกรดอีโคซาเพนตาอีโนอิกและกรดอัลฟาไลโปอิกปริมาณ 0.009 ± 0.001 และ 0.504 ± 0.121 มิลลิกรัมของกรดไขมันทั้งหมดต่อลิตร ตามลำดับ *Scenedesmus quadricauda* พบกรดอัลฟาไลโปอิกปริมาณ 0.403 ± 0.101 มิลลิกรัมของกรดไขมันทั้งหมดต่อลิตร

Yongmanitchai และ Ward (1991) รายงานการคัดแยกสาหร่ายที่เป็นพลังงานทางเลือกของกรดอีโคซาเพนตาอีโนอิก พบปริมาณกรดอีโคซาเพนตาอีโนอิกสูงสุดที่ผลิตโดย *Chlorella minutissima* UTEX 2341 และ *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 มีปริมาณร้อยละ 31.8 และ 30.5 ของไขมันทั้งหมดตามลำดับ

Brown และคณะ (1997) รายงานถึงคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายขนาดเล็กสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายขนาดเล็ก 40 ชนิด พบว่าสาหร่ายในกลุ่ม Chlorophytes ได้แก่ *Chlorella* sp. และ *Dunaliella tertiolecta* มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน คือ ARA EPA และ DHA ปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 0.2 ของกรดไขมันทั้งหมด

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

3.1.1 สาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

- 3.1.1.1 *Chlorella* sp. 03 เก็บตัวอย่างวันที่ 8 สิงหาคม 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.2 *Chlorella* sp. 05 เก็บตัวอย่างวันที่ 15 สิงหาคม 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.3 *Chlorella* sp. A เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.4 *Chlorella* sp. G เก็บตัวอย่างวันที่ 26 ตุลาคม 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.5 *Chlorella* sp. N เก็บตัวอย่างวันที่ 27 ตุลาคม 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.6 *Chlorella* sp. U เก็บตัวอย่างวันที่ 1 พฤศจิกายน 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.7 *Chlamydomonas* sp. เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 4 ตุลาคม 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.8 *Scenedesmus* sp. C เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2558 (ภาคผนวก ค)
- 3.1.1.9 *Scenedesmus* sp. W เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 11 ตุลาคม 2558 (ภาคผนวก ค)

3.1.2 สาหร่ายขนาดเล็กจากห้องปฏิบัติการ

- 3.1.2.1 *Chlorella* sp. VB 55 (ภาคผนวก ค)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright field microscope); Olympus; CH30
- 3.2.2 เครื่องกลั่นระเหยสารสูญญากาศ (Rotary evaporator); Heidolph; Hei-vap
- 3.2.3 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography); Agilent; 6890N
- 3.2.4 เครื่องเขย่า (Orbital shaker); Gallenkamp
- 3.2.5 เครื่องชั่ง (Balance); Adventurer; Ohaus
- 3.2.6 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry); Heto; Lyolab 3000
- 3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge); Hermle labnet; Z388K
- 3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงขนาดเล็ก (Microcentrifuge); Eppendorf; 5415R
- 3.2.9 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture); Scientific Industries; Vortex-genie
- 3.2.10 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH Meter); Ultrabasic; UB-10 Deluxe kit
- 3.2.11 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow); Maxel technology; Cleanline BS-120
- 3.2.12 ตู้เย็นเก็บตัวอย่างสาหร่าย (Refrigerator); Sanyo; SR-F616NC MS
- 3.2.13 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven); WTB Binder; DE53

- 3.2.14 เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven); Samsung; M1913
- 3.2.15 หม้อนึ่งอัตโนมัติความดันไอน้ำแรงสูง (Autoclave); Tomy high pressure steam sterilizer; es -315
- 3.2.16 สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer); Neubauer improved bright line
- 3.2.17 เครื่องย่อย; Kjeldatherm; Gerhardt
- 3.2.18 เครื่องกลั่น; Vapodest 45s; Gerhardt
- 3.2.19 เครื่องแก้วต่างๆ

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 อาหารสูตร N-8 : สูตรอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก)
- 3.3.2 อาหารสูตร N-8 : สูตรอาหารเหลว (ภาคผนวก ก)
- 3.3.3 เมทานอล ของบริษัท Univar (Analytical reagent)
- 3.3.4 คลอโรฟอร์ม ของบริษัท BDH Prolabo chemicals (Analytical reagent)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.4.1 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำต่างๆ ทั้งแหล่งน้ำจืด และน้ำกร่อย นำมาเติมอาหารเหลวสูตร N-8 ในปริมาณเล็กน้อยและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน นำมาคัดแยกโดยการ Spread plate และบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยมีการให้แสงอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อสาหร่ายขึ้นเป็นโคโลนีแล้วจึงนำมา Steak plate 2-3 รอบ เพื่อให้ได้โคโลนีที่บริสุทธิ์ และนำไปศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ และชนิดของสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า จากนั้นนำสาหร่ายที่คัดแยกได้ถ่ายลงหลอดอาหารเลี้ยง และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2 การศึกษาระยะเวลาเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก

นำเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กที่ผ่านการคัดแยกให้บริสุทธิ์จากธรรมชาติมา 3-4 ลูบ ใส่ลงในอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องภายใต้การให้แสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ในสภาวะการเขย่าที่อัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7-10 วัน หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Johan และคณะ, 2013) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3-0.5

ขั้นตอนที่ 2 การวัดการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติและได้รับจากห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาการเจริญ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเติมหัวเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรทั้งหมด ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที และให้แสงฟลูออเรสเซนซ์อย่าง

ต่อเนื้อที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ จากนั้นวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยการนับเซลล์ด้วยสไลด์สำหรับนับเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำหนักร้อยละของเซลล์แห้ง ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 16-24 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จนสิ้นสุดระยะลอการิทึม (Logarithmic phase)

3.4.3 การสกัดไขมันเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูงสุด

3.4.3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กขนาด

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ 9 สายพันธุ์และได้รับจากห้องปฏิบัติการ 1 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร N-8 ปริมาตร 5 ลิตร ในถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร ที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในสภาวะการให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ และให้แสงฟลูออเรสเซนต์อย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะลอการิทึมประมาณวันที่ 14-18 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญเติบโตของแต่ละสายพันธุ์ และเก็บเกี่ยวชีวมวลโดยการปั่นเหวี่ยง เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ (Krzeminska และคณะ, 2015) จากนั้นนำชีวมวลที่ได้ไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.4.3.2 เปรียบเทียบวิธีการสกัดไขมัน

นำชีวมวลแห้งที่ได้จากการทำแห้งแบบเยือกแข็งของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ มาสกัดหาปริมาณไขมันทั้งหมดโดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้สารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 ตามวิธีของ Ryckebosch และคณะ (2012) และ 1:2 ตามวิธีของ Bligh และ Dyer (1959) (ภาคผนวก ข-2) จากนั้นนำไขมันที่ได้มาชั่งน้ำหนัก นำวิธีที่การสกัดไขมันที่ดีที่สุดมาใช้คัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็ก

3.4.3.3 การคำนวณหาผลได้ของไขมันที่สกัด (Hidalgo และคณะ, 2015)

$$\text{ผลได้ของไขมันที่สกัด (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมันที่ชั่งได้หลังทำการสกัด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)}} \times 100$$

3.4.3.4 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงสุด

เปรียบเทียบปริมาณไขมันทั้งหมดที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก ทำการคัดเลือก 2 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ที่มีปริมาณไขมันทั้งหมดมากที่สุด

3.4.4 การวัดการเจริญและการเก็บเกี่ยวชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงในระดับถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร

เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดเลือก 2 ชนิด เพื่อศึกษาการเจริญ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ปริมาตร 5 ลิตร ในถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร ที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในสภาวะการให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ และให้แสงฟลูออเรสเซนต์อย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ จากนั้นวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยการนับเซลล์ด้วยสไลด์สำหรับนับเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และหาปริมาณน้ำหนักร้อยละของเซลล์แห้ง ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 16-24 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จนสิ้นสุดระยะลอการิทึม (Logarithmic phase)

เซลล์แห้ง ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 16-24 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จนสิ้นสุดระยะลอกการิทึม และทำการเก็บเกี่ยวชีวมวลที่จนถึงช่วงปลายของระยะลอกการิทึม (ภาคผนวก ค-5.4) เก็บเกี่ยวชีวมวลโดยการปั่นเหวี่ยง เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ (Krzeminska และคณะ, 2015) จากนั้นนำชีวมวลที่ได้ไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.4.5 การศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์สำหรับขนาดเล็ก

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น และเถ้า (Jazrawi และคณะ, 2015) โพรตีน (Macró และคณะ, 2002) ไขมัน (Ryckebosch และคณะ, 2012) และคาร์โบไฮเดรต (NRC, 1993) ของสำหรับขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (ภาคผนวก ข-2)

3.4.6 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน (AOAC, 2012) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography : Agilent; 6890N) (ภาคผนวก ข-3)

3.4.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistics เวอร์ชัน 20 และวิเคราะห์ความต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

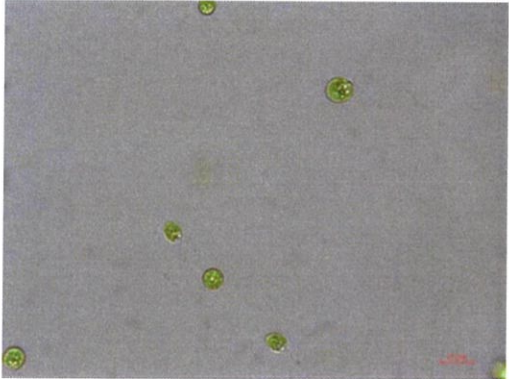
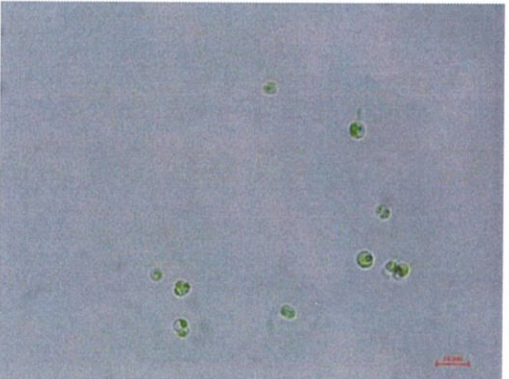
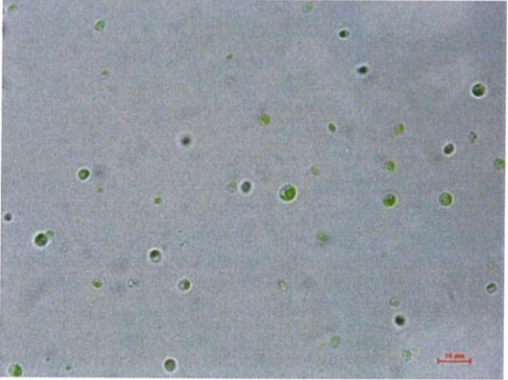
4.1 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

จากการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำต่างๆตามธรรมชาติด้วยวิธี Spread plate ในอาหารสูตร N-8 และแยกโคโลนีของสาหร่ายด้วยวิธี Streak plate จนสาหร่ายบริสุทธิ์ พบว่าสาหร่ายที่ทำการคัดแยกได้ มี 9 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1) คือ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. 03, *Chlorella* sp. 05, *Chlorella* sp. A, *Chlorella* sp. G, *Chlorella* sp. N, *Chlorella* sp. U, *Scenedesmus* sp. C, *Scenedesmus* sp. W และสาหร่าย 1 สายพันธุ์ จากห้องปฏิบัติการสาหร่าย คือ *Chlorella* sp. VB55 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Mandotra และคณะ (2014) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus abundans* เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่มีคุณภาพสูง รายงานว่าสามารถแยกเชื้อ *Scenedesmus abundans* ได้จากแหล่งน้ำจืดธรรมชาติที่ทะเลสาบดล เมืองเดลี และการศึกษาของ Sahu และคณะ (2013) รายงานว่าการใช้กรดไขมันเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยใช้ความจำเพาะของปริมาณกรดไขมันที่พบในสาหร่ายแต่ละชนิด ซึ่งจากการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็ก 12 สายพันธุ์ พบว่า *Chlorella* sp. และ *Spirulina platensis* สามารถแยกได้จากน้ำกร่อย ซึ่งเหมือนกับการทดลองนี้ ที่สามารถแยก *Chlorella* sp. 5 สายพันธุ์ได้จากน้ำกร่อยเช่นกัน

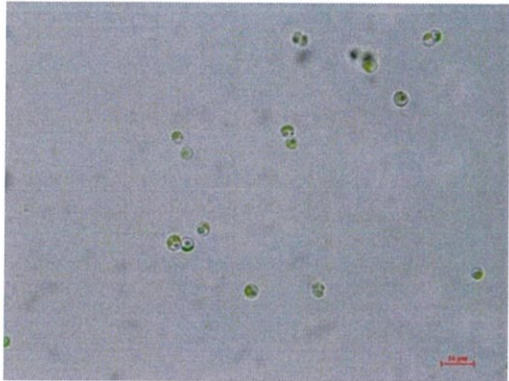
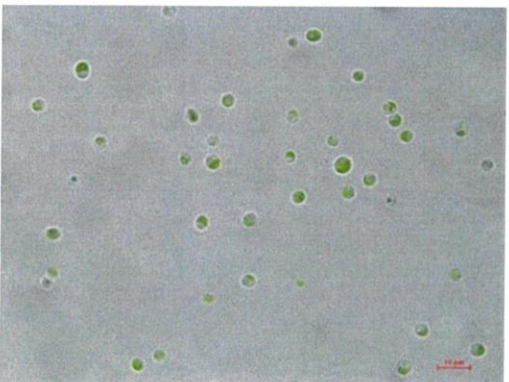
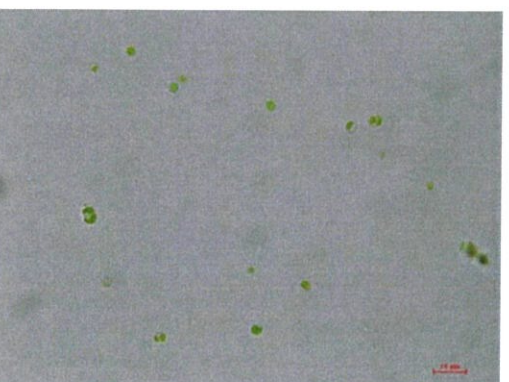
4.2 การศึกษาระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

นำสาหร่ายขนาดเล็กที่ทำการคัดแยกได้ 10 สายพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N-8 ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะการให้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และให้อากาศต่อเนื่องเป็นเวลา 24 วัน เก็บเกี่ยวตัวอย่างทุก 2 วัน นำมาวัดการเจริญของสาหร่ายโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร การนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์สำหรับนับเซลล์ และการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จนกระทั่งการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ และหาอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. W มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.4597 ต่อวัน รองลงมาคือ *Scenedesmus* sp. C, *Chlorella* sp. 03, *Chlorella* sp. U, *Chlorella* sp. VB55, *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. A, *Chlorella* sp. N, *Chlorella* sp. 05 และ *Chlorella* sp. G ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.4337, 0.3189, 0.2632, 0.2485, 0.2419, 0.2122, 0.2038, 0.173 และ 0.166 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

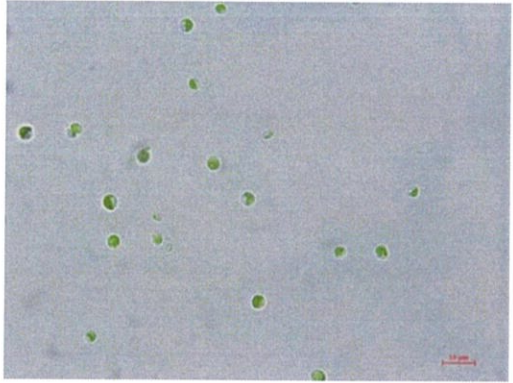
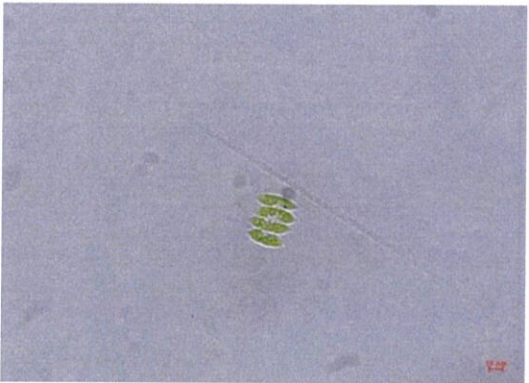
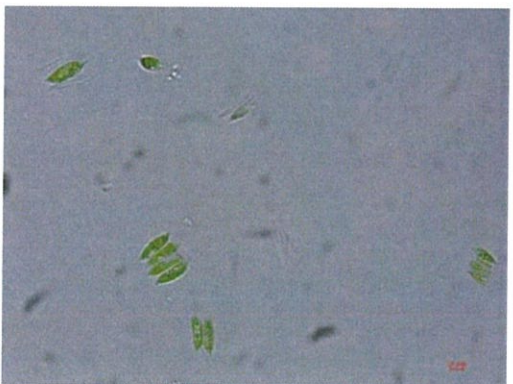
ตารางที่ 4.1 การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์สาหร่าย	วันก่อน เข้าสู่ระยะ คงที่	อัตราการ เจริญ จำเพาะ	เซลล์ที่กำลังขยายรวม 1,000 เท่า
<i>Chlamydomonas</i> sp.	18	0.2419	
<i>Chlorella</i> sp. 03	14	0.3189	
<i>Chlorella</i> sp. 05	16	0.173	

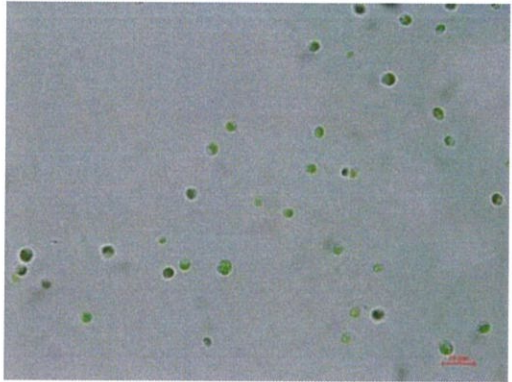
ตารางที่ 4.1 การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์สาหร่าย	วันก่อน เข้าสู่ระยะ คงที่	อัตราการ เจริญ จำเพาะ	เซลล์ที่กำลังขยายรวม 1,000 เท่า
<i>Chlorella</i> sp. A	18	0.2122	
<i>Chlorella</i> sp. G	18	0.166	
<i>Chlorella</i> sp. N	16	0.2038	

ตารางที่ 4.1 การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์สาหร่าย	วันก่อนเข้าสู่ระยะคงที่	อัตราการเจริญจำเพาะ	เซลล์ที่กำลังขยายรวม 1,000 เท่า
<i>Chlorella</i> sp. U	18	0.2632	
<i>Scenedesmus</i> sp. C	16	0.4347	
<i>Scenedesmus</i> sp. W	18	0.4597	

ตารางที่ 4.1 การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์สาหร่าย	วันก่อน เข้าสู่ระยะ คงที่	อัตราการ เจริญ จำเพาะ	เซลล์ที่กำลังขยายรวม 1,000 เท่า
<i>Chlorella</i> sp. VB55	16	0.2485	

ตารางที่ 4.2 ค่าพารามิเตอร์การดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ และปริมาณไขมันที่สกัดได้ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

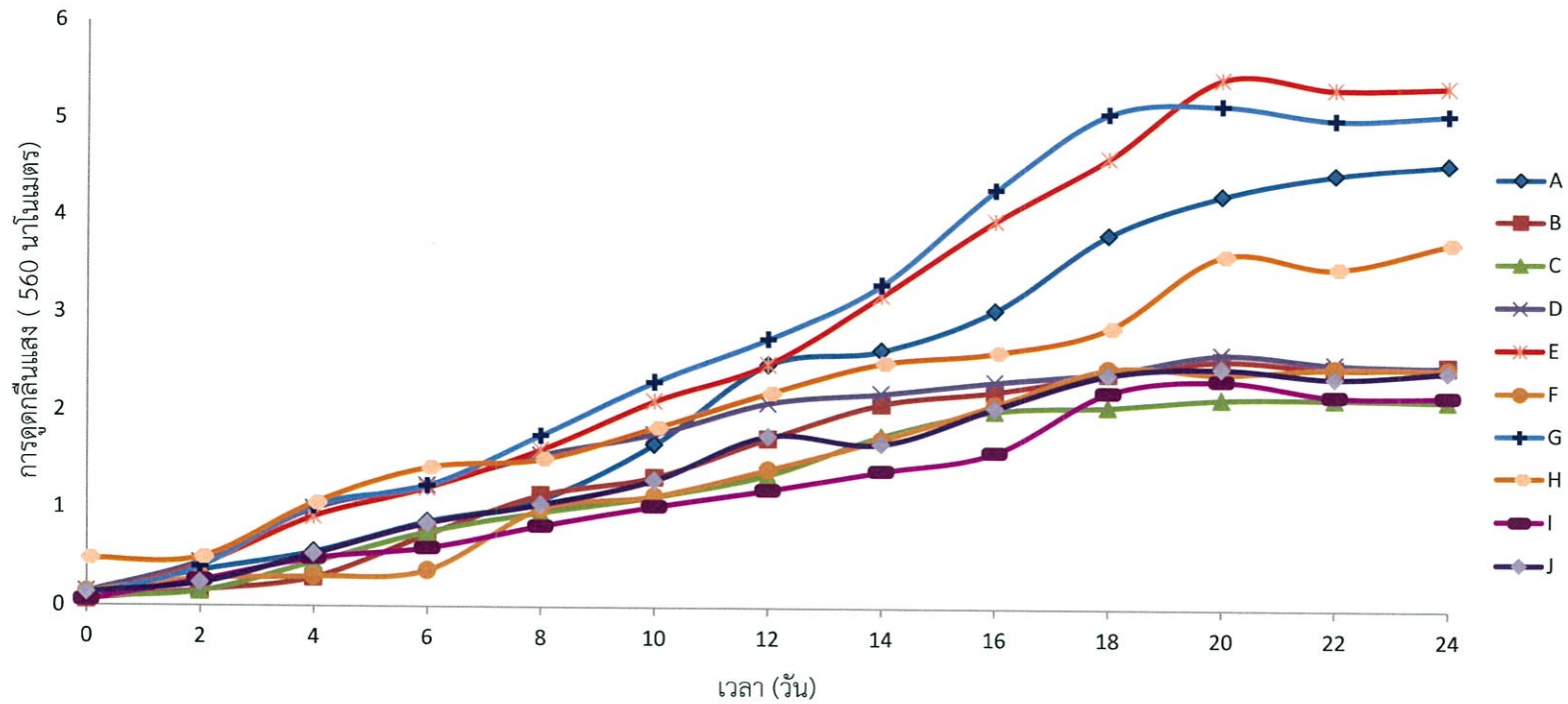
สายพันธุ์สาหร่าย	ก่อนวันที่ เข้าสู่ระยะ คงที่	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)	จำนวนเซลล์×10 ⁸ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะ (ต่อวัน)	ปริมาณไขมัน (กรัมต่อกรัมของ ชีวมวลแห้ง)
<i>Chlamydomonas</i> sp.	18	3.8387±0.54 ^b	2.9467±0.67 ^d	1.4400±0.05 ^c	0.2419	0.0750±0.03 ^d
<i>Chlorella</i> sp. 03	14	2.0987±0.17 ^d	1.4833±0.05 ^f	0.8900±0.05 ^d	0.3189	0.1000±0.00 ^{cd}
<i>Chlorella</i> sp. 05	16	2.0317±0.06 ^d	4.0600±0.05 ^c	1.0067±0.01 ^{cd}	0.1730	0.1250±0.03 ^{bc}
<i>Chlorella</i> sp. A	18	2.4373±0.09 ^{cd}	1.9467±0.05 ^e	0.8667±0.09 ^d	0.2122	0.1000±0.05 ^{ab}
<i>Chlorella</i> sp. G	18	4.6427±0.16 ^a	6.3367±0.32 ^b	1.1667±0.10 ^{cd}	0.1660	0.1000±0.03 ^{cd}
<i>Chlorella</i> sp. N	16	2.0987±0.12 ^d	1.9867±0.13 ^e	2.6067±0.21 ^a	0.2038	0.1250±0.00 ^{bc}
<i>Chlorella</i> sp. U	18	2.7080±0.37 ^c	2.2267±0.16 ^e	1.5367±0.47 ^{bc}	0.2632	0.2250±0.03 ^a
<i>Scenedesmus</i> sp. C	16	1.6010±0.02 ^e	0.2387±0.00 ^s	2.8133±0.11 ^a	0.4347	0.1500±0.03 ^b
<i>Scenedesmus</i> sp. W	18	2.4093±0.15 ^{cd}	0.4727±0.20 ^a	1.9867±0.71 ^b	0.4597	0.1500±0.00 ^b
<i>Chlorella</i> sp. VB55	16	4.3023±0.08 ^a	8.5733±0.16 ^a	1.1667±0.15 ^{cd}	0.2485	0.2500±0.00 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

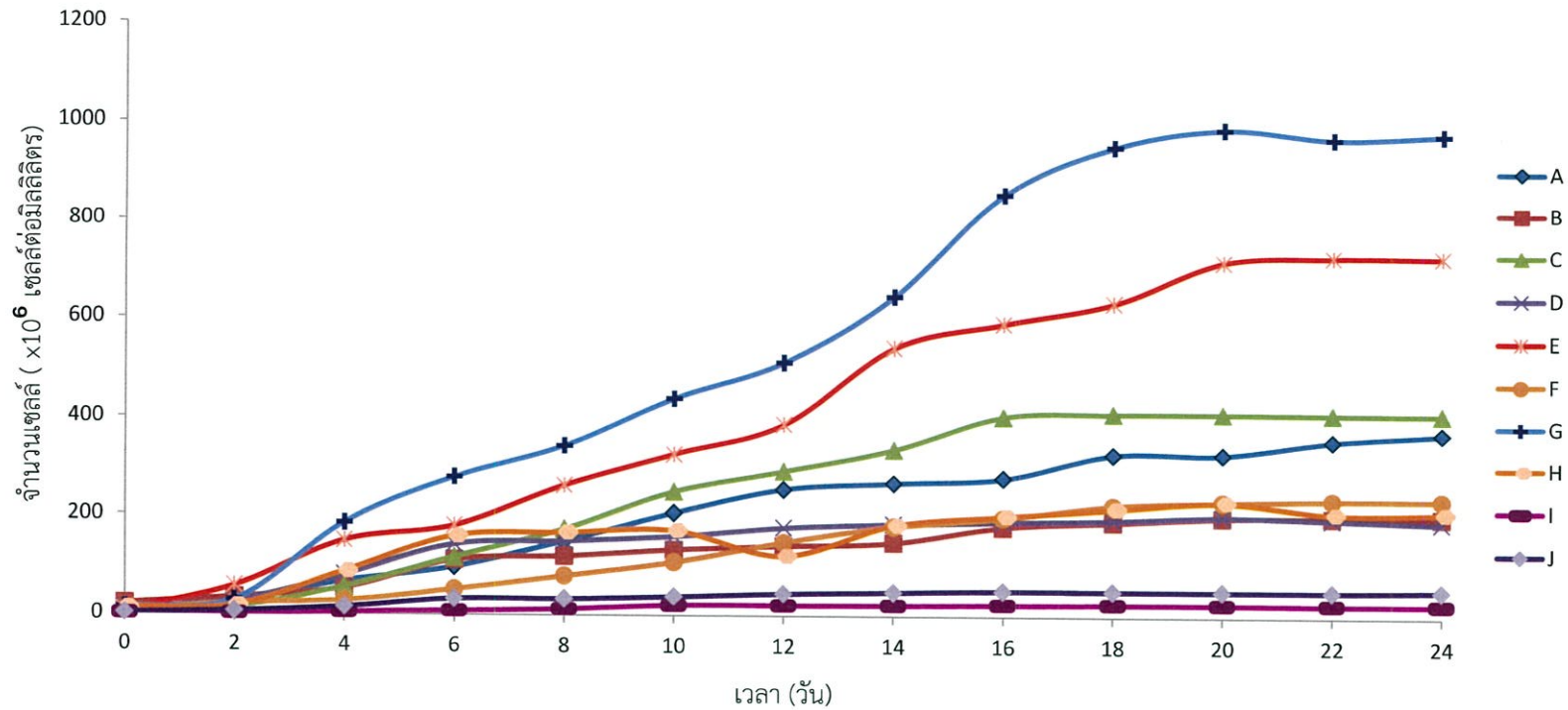
Scenedesmus sp. C อัตราการเจริญก่อนเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 1.6010 ± 0.02 จำนวนเซลล์เท่ากับ $0.2387 \pm 0.00 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.8133 ± 0.11 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.4347 ต่อวัน (ตารางที่ 4.2, รูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3)

Scenedesmus sp. W อัตราการเจริญก่อนเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 2.4093 ± 0.15 จำนวนเซลล์เท่ากับ $0.4727 \pm 0.20 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.9867 ± 0.71 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.4597 ต่อวัน (ตารางที่ 4.2, รูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3)

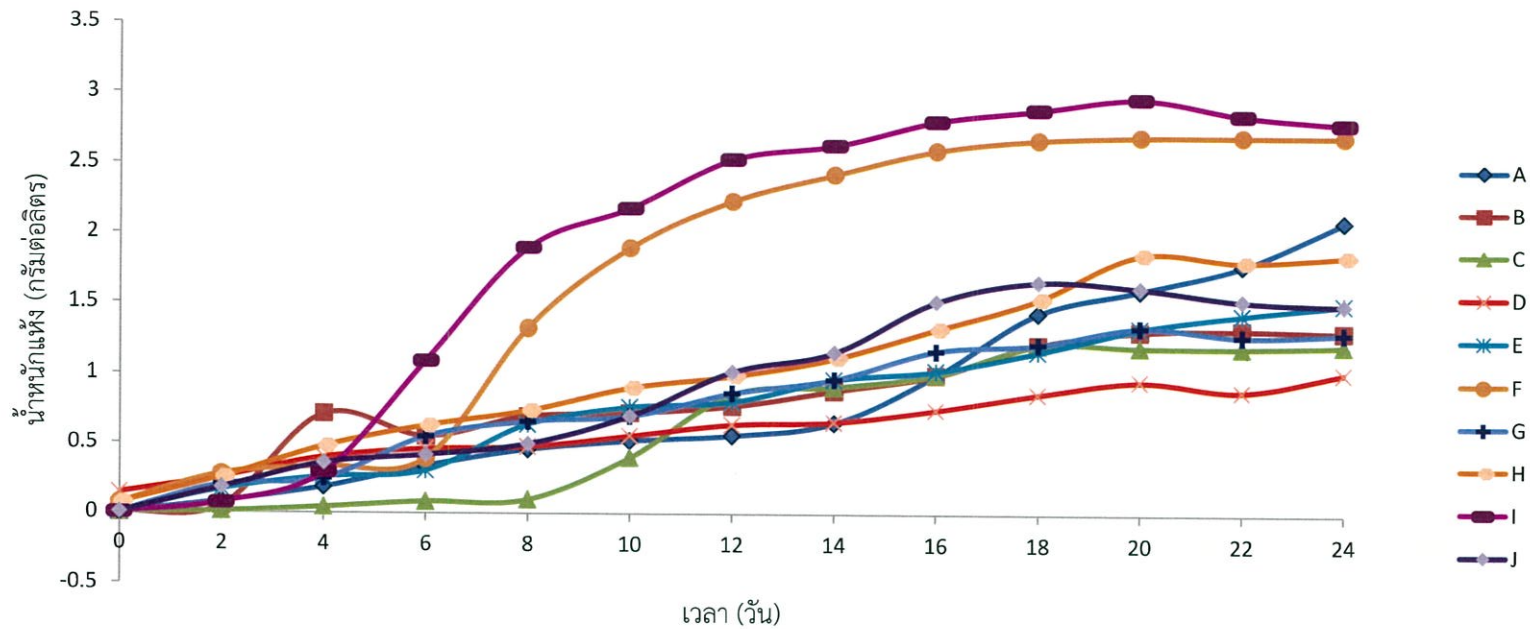
จากการทดลองพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือ *Scenedesmus* sp. W ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 0.4597 ต่อวัน ซึ่งมีผลคล้ายกับการทดลองของ Ma และคณะ (2012) ที่ศึกษาการเจริญ การใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส และการสะสมไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กน้ำจืด *Scenedesmus* sp. LX1 โดยทำการเพาะเลี้ยงในน้ำเสีย พบว่ามีการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 0.440 ต่อวัน และชีวมวลแห้งมีปริมาณ 0.38 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าการทดลองในครั้งนี้ ที่มีปริมาณชีวมวลแห้ง 1.9867 ± 0.71 กรัมต่อลิตร อีกทั้งการทดลองของ Ong และคณะ (2010) ศึกษาการทนความร้อนของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. เพื่อนำไปประยุกต์เลี้ยงแบบกลางแจ้ง โดยทำการเลี้ยงเปรียบเทียบสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. สายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 20, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า *Chlorella* sp. สายพันธุ์ปกติมีการเจริญเติบโต 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 ต่อวัน ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิห้อง พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ในช่วง 0.1660 จนถึง 0.3189 ต่อวัน แต่เนื่องจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. W และ *Scenedesmus* sp. C มีปริมาณไขมันน้อย สาหร่าย *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 ซึ่งมีผลปริมาณไขมันมากที่สุด คือ 0.0450 ± 0.01^c และ 0.0433 ± 0.01^c ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) จึงเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ A คือ *Chlamydomonas* sp., B คือ *Chlorella* sp. 03, C คือ *Chlorella* sp. 05, D คือ *Chlorella* sp. A, E คือ *Chlorella* sp. G, F คือ *Chlorella* sp. N, G คือ *Chlorella* sp. VB55, H คือ *Chlorella* sp. U, I คือ *Scenedesmus* sp. C และ J คือ *Scenedesmus* sp. W



รูปที่ 4.2 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กรายชนิด 10 สายพันธุ์ A คือ *Chlamydomonas* sp., B คือ *Chlorella* sp. 03, C คือ *Chlorella* sp. 05, D คือ *Chlorella* sp. A, E คือ *Chlorella* sp. G, F คือ *Chlorella* sp. N, G คือ *Chlorella* sp. VB55, H คือ *Chlorella* sp. U, I คือ *Scenedesmus* sp. C และ J คือ *Scenedesmus* sp. W



รูปที่ 4.3 น้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็กรายชนิด 10 สายพันธุ์ A คือ *Chlamydomonas* sp., B คือ *Chlorella* sp. 03, C คือ *Chlorella* sp. 05, D คือ *Chlorella* sp. A, E คือ *Chlorella* sp. G, F คือ *Chlorella* sp. N, G คือ *Chlorella* sp. VB55, H คือ *Chlorella* sp. U, I คือ *Scenedesmus* sp. C และ J คือ *Scenedesmus* sp. W.

4.3 การสกัดไขมันเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูงสุด

4.3.1 ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัดไขมัน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร N-8 ปริมาตร 5 ลิตร ในถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร และเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณไขมันในวันที่ 14-18 ของการทดลอง ได้ผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วน คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1 และ 1:2

ลำดับ ที่	สายพันธุ์	ร้อยละของปริมาณไขมันต่อน้ำหนักแห้ง	
		คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1	คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2
1	<i>Chlamydomonas</i> sp.	7.50±2.50 ^d	7.50±2.50 ^f
2	<i>Chlorella</i> sp. 03	10.00±0.00 ^{cd}	9.17±1.44 ^{ef}
3	<i>Chlorella</i> sp. 05	12.50±2.50 ^{bc}	11.67±2.89 ^{cde}
4	<i>Chlorella</i> sp. A	10.00±0.50 ^{ab}	10.83±3.82 ^{def}
5	<i>Chlorella</i> sp. G	10.00±2.50 ^{cd}	10.00±2.50 ^{ef}
6	<i>Chlorella</i> sp. N	12.50±0.00 ^{bc}	12.50±0.00 ^{cd}
7	<i>Chlorella</i> sp. U	22.50±2.50 ^a	20.83±1.44 ^b
8	<i>Scenedesmus</i> sp. C	15.00±2.50 ^b	14.17±1.44 ^{cd}
9	<i>Scenedesmus</i> sp. W	15.00±0.00 ^b	15.00±0.00 ^c
10	<i>Chlorella</i> sp. VB55	25.00±0.00 ^a	25.00±0.00 ^a

จากการศึกษาปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 ชนิด พบว่าผล ปริมาณไขมันทั้งหมดที่ได้จากการสกัดโดยใช้คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 มีค่าไม่ต่างกัน ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Ryckebosch และคณะ (2011) ที่รายงานว่า การสกัดโดยใช้ คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 ทำให้ได้ปริมาณไขมันทั้งหมดสูงกว่า แต่เนื่องด้วยการใช้ สารสกัดในอัตราส่วน 1:2 มีค่าใช้จ่ายที่ถูกลงกว่า ดังนั้นหากทำการสกัดครั้งต่อไปจึงควรเลือกการสกัด ด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1:2 เหตุที่เลือกใช้คลอโรฟอร์มและเมทานอลเป็นสาร สกัด เนื่องจากการใช้สารสกัดอินทรีย์ในการสกัดไขมันนั้น ใช้หลักที่ว่าตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายใน ตัวทำละลายที่มีขั้ว แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว และตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัว

ทำละลายที่ไม่มีขี้ การสกัดไขมันซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขี้จึงใช้สารอินทรีย์ที่ไม่มีขี้ เช่น คลอโรฟอร์ม หรือ เฮกเซน ซึ่งการเพิ่มผลผลิตจากการสกัดไขมัน ควรใช้สารสกัดอินทรีย์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปร่วมกัน โดยเป็นสารที่มีขี้และไม่มีขี้ เช่น คลอโรฟอร์มกับเมทานอล (Bahadar และ Khan, 2013) จึงเลือก ผลอัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2 มาใช้ในการคัดเลือกสาหร่าย 2 สายพันธุ์ที่มีปริมาณไขมัน สูงที่สุด คือ *Chlorella* sp. VB55 และ *Chlorella* sp. U มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.3.2 การวัดการเจริญและการเก็บเกี่ยวชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงใน ระดับถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร

เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ จากข้อ 4.3.1 คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 ในอาหารเหลวสูตร N-8 ในขวดขนาด 6 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะการให้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และให้อากาศต่อเนื่องเป็นเวลา 24 วัน (รูปที่ 4.4) เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน นำมาวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร การนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์สำหรับนับเซลล์ การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จนกระทั่งการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ หาอัตราการเจริญจำเพาะ และหา ปริมาณไขมันที่สกัดได้ ดังนี้ (ตารางที่ 4.2)

Chlorella sp. U อัตราการเจริญก่อนเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 2.6106 ± 0.04 จำนวนเซลล์เท่ากับ $2.0800 \pm 0.10 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.3400 ± 0.10 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.3150 ต่อวัน มีปริมาณไขมันเท่ากับ 0.2250 ± 0.025 กรัมต่อกรัมเซลล์ ของชีวมวลแห้ง (ตารางที่ 4.4, รูปที่ 4.5, 4.6 และ 4.7)

Chlorella sp. VB55 อัตราการเจริญก่อนเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 5.2370 ± 0.05 จำนวนเซลล์เท่ากับ $9.8533 \pm 0.12 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.5000 ± 0.18 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.5545 ต่อวัน มีปริมาณไขมันเท่ากับ 0.2500 ± 0.00 กรัมต่อกรัมเซลล์ของชีวมวลแห้ง (ตารางที่ 4.4, รูปที่ 4.5, 4.6 และ 4.7)

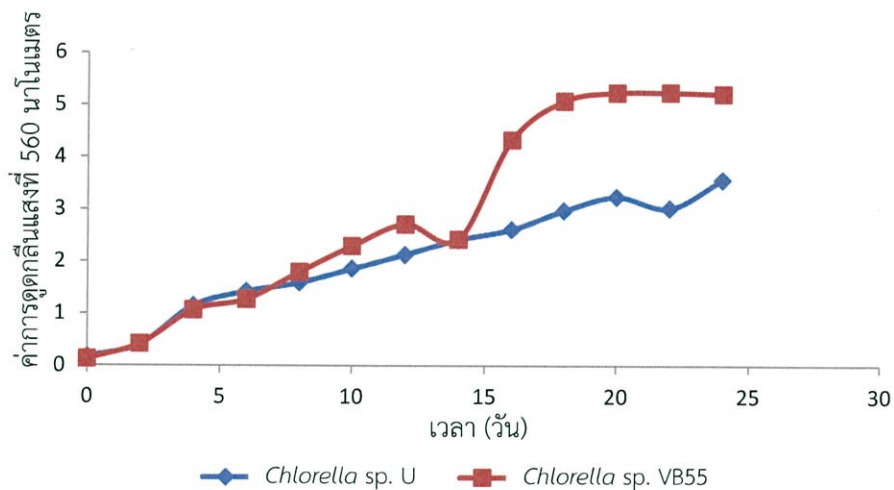


รูปที่ 4.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังพลาสติกขนาด 6 ลิตร

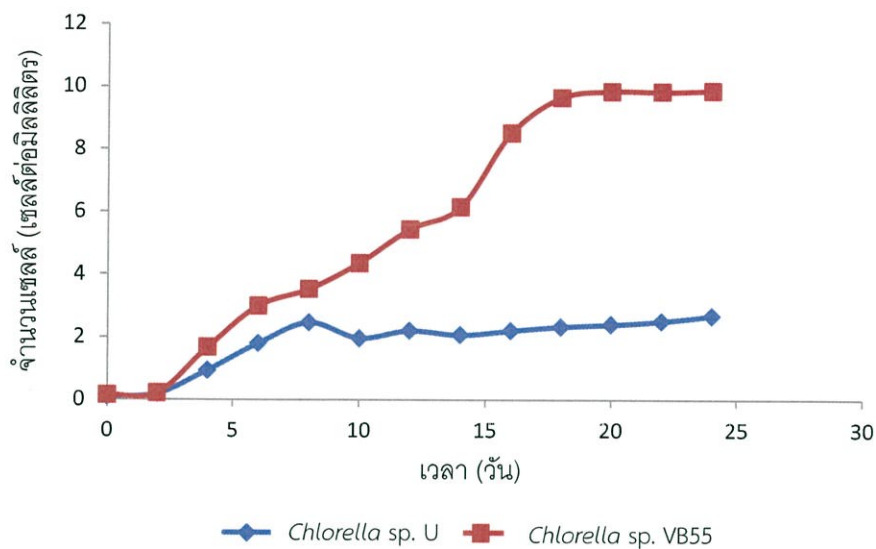
จากการทดลองนี้ปริมาณไขมันของ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 มีปริมาณไขมันเท่ากับ 0.2250 ± 0.25 และ 0.2500 ± 0.00 กรัมต่อกรัมเซลล์ของชีวมวลแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าการทดลองของ Wang และคณะ (2012) ที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella kessleri* แบบเฮทเทอโรโทรฟิก คือ เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าและปราศจากการให้แสง โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 14 วัน สาหร่ายมีการเจริญเติบโตจากใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเริ่มต้น คือ กลูโคส 100 มิลลิโมลต่อลิตร และโพแทสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า *Chlorella kessleri* มีปริมาณไขมันเท่ากับ 1.71 ± 0.07 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองของ Ong และคณะ (2010) ได้ศึกษา *Chlorella* sp. สายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไป โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีผล ปริมาณไขมันร้อยละ 12.3 ± 0.5 , 12.5 ± 0.7 , 14.7 ± 1.7 และ 14.1 ± 0.6 ตามลำดับ ซึ่งเป็นการทดลอง ที่มีปริมาณไขมันมากกว่า เช่นเดียวกับการทดลองของ Sahu (2013) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรซารุค มีปริมาณไขมันเท่ากับ 14.05 ± 0.14 ของน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 4.4 ค่าพารามิเตอร์ของค่าการดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะก่อนวันที่การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ที่สามารถสะสมไขมันมากที่สุด

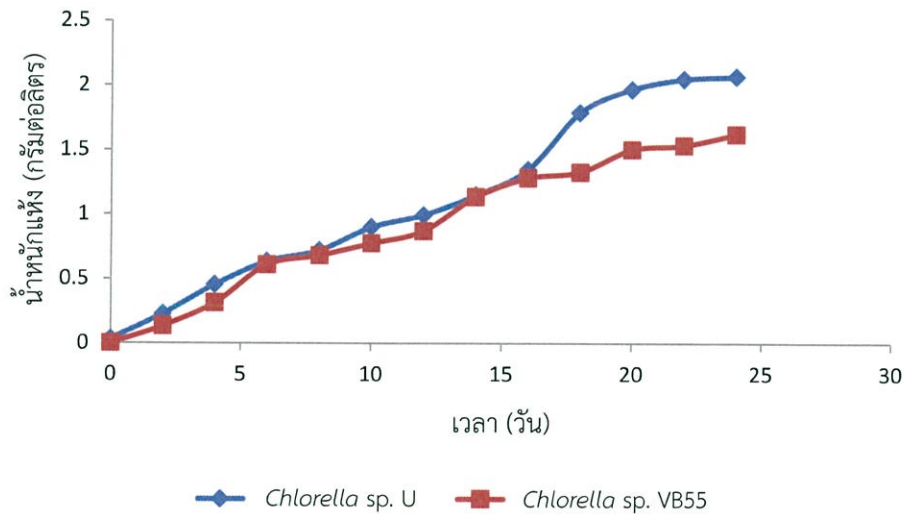
สายพันธุ์สาหร่าย	ก่อนวันที่เข้าสู่ระยะคงที่	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)	จำนวนเซลล์×10 ⁸ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อวัน)
<i>Chlorella</i> sp. U	18	2.6106±0.04	2.0800±0.10	1.3400±0.10	0.3150
<i>Chlorella</i> sp. VB55	16	5.2370±0.05	9.8533±0.18	1.5000±0.18	0.5545



รูปที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55



รูปที่ 4.6 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55



รูปที่ 4.7 น้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55

4.4 การศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบภายในเซลล์ (ร้อยละของน้ำหนักชีวมวลแห้ง) ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55

สายพันธุ์สาหร่าย	องค์ประกอบภายในเซลล์ (ร้อยละของน้ำหนักชีวมวลแห้ง)				
	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	ความชื้น	เถ้า
<i>Chlorella</i> sp. U	9.4067 ±0.17	22.50 ±3.00	59.8533 ±2.71	2.82 ±0.00	5.42 ±0.00
<i>Chlorella</i> sp. VB55	10.3367 ±0.06	25.00 ±0.00	53.2500 ±0.12	5.37 ±1.00	6.14 ±0.00

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 พบว่าปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้าของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. VB มากกว่า *Chlorella* sp. U คือ ร้อยละ 10.3367±0.06, 25.00±0.00, 5.37±1.00 และ 6.14±0.00 ของชีวมวลแห้งตามลำดับ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตของ *Chlorella* sp. U มากกว่า *Chlorella* sp. VB55 คือร้อยละ 59.8533±2.71 ของชีวมวลแห้ง ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้าของ Jazrawi และคณะ (2015) ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในอาหารเหลวที่ใช้อุณหภูมิสูงเพื่อให้เกิดการผลิตโปรตีนในปริมาณที่สูง รายงานว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ *Chlorella vulgaris* มีความชื้นร้อยละ 5.2 ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง พบปริมาณเถ้า ร้อยละ 6.0 ของน้ำหนักชีวมวลแห้งและเมื่อทดสอบทางชีวเคมีพบว่าปริมาณไขมันร้อยละ 4 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 25 และโปรตีนร้อยละ 60 ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองครั้งนี้พบว่า ปริมาณไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U พบในปริมาณที่มากกว่า และปริมาณความชื้น เถ้า และไขมันของ *Chlorella* sp. VB55 พบในปริมาณที่มากกว่า และจากการทดลองก่อนหน้าของ Dragone และคณะ (2011) ศึกษาการจำกัดสารอาหารเพื่อให้เกิดการสะสม แป้งในสาหร่ายขนาดเล็กเพิ่มมากขึ้น ทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* (P12) แบบกะ โดยใช้ ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 51.07±0.7 ของน้ำหนักชีวมวลแห้ง ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้โพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นหากต้องการการสะสมแป้งที่สูงควรใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบโดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

4.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55

จากการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันและปริมาณกรดไขมัน (ร้อยละของพื้นที่กราฟ) ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 แสดงดังตารางที่ 4.6

และจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันโอเมก้า 3, 6 และ 9 (ความเข้มข้นในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. U มีกรดไขมันโอเมก้า 3 คือกรดแอลฟาไลโนเลนิก (Alpha linolenic acid, C18:3n3) กรดไขมันโอเมก้า 6 คือกรดไลโนเลอิก (Cis-9,12-linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันโอเมก้า 9 คือ กรดโอเลอิก (cis-9 Oleic acid) ปริมาณร้อยละ 1.90124, 2.97949 และ 0.16174 ตามลำดับ เช่นเดียวกับสาหร่าย *Chlorella* sp. VB55 แต่ปริมาณร้อยละแตกต่างกัน คือ 0.36587, 3.98230 0.53568 ตามลำดับ (ตาราง 4.7)

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน (ร้อยละของพื้นที่กราฟ) ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55

กรดไขมัน	สูตรเคมี	ร้อยละของพื้นที่กราฟ	
		<i>Chlorella</i> sp. U	<i>Chlorella</i> sp. VB55
กรดบิวทริก	C4:0	0.00000	0.00000
กรดคาโปรอิก	C6:0	0.53657	0.27295
กรดคาไพโรลิก	C8:0	0.36132	0.42413
กรดคาพริก	C10:0	0.00000	0.00000
กรดอันดีคาโนอิก	C11:0	0.00000	0.00000
กรดลอริก	C12:0	0.14045	0.12871
กรดไตรเดคาโนอิก	C13:0	0.00000	0.00000
กรดไมริสติก	C14:0	0.57032	0.00000
กรดไมริสโตเลอิก	C14:1	0.00000	1.03116
กรดเพนทาเดคาโนอิก	C15:0	0.35404	0.25004
กรดเพนทาเดคาโนอิก ชนิดซิส	C15:1	0.00000	0.00000
กรดปาล์มิติก	C16:0	46.31338	48.95763
กรดปาล์มิตอเลอิก	C16:1	1.81542	1.28116
กรดเฮปทาเดคาโนอิก	C17:0	0.28956	0.36618
กรดเฮปตะเดคาโนอิก ชนิดซิส	C17:1	0.00000	0.00000
กรดสเตริริก	C18:0	1.07761	1.42371
กรดอิลัยอิก ชนิดทรานส์	C18:1n9t	0.00000	0.00000
กรดโอเลอิก ชนิดซิส	C18:1n9c	1.54061	4.98026
กรดไลโนไลดิก ชนิดทรานส์	C18:2n6t	0.00000	0.00000

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน (ร้อยละของพื้นที่กราฟ) ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 (ต่อ)

กรดไขมัน	สูตรเคมี	ร้อยละของพื้นที่กราฟ	
		<i>Chlorella</i> sp. U	<i>Chlorella</i> sp. VB55
กรดไลโนเลอิก ชนิดซิส	C18:2n6c	28.38843	37.03569
กรดไลโนเลนิก	C18:3n3	18.12252	3.40404
กรดโอเมก้าไลโนเลนิก	C18:3n6	0.00000	0.00000
กรดอะราซดิก	C20:0	0.19350	0.14615
กรดอีโคซีโนอิก	C20:1n11	0.00000	0.00000
กรดอีโคซาไดอีนอิก	C20:2	0.00000	0.00000
กรดอีโคซาไตรอีนอิก	C20:3n3	0.00000	0.00000
กรดโดโฮโมแกรมม่าไลโนเลนิก	C20:3n6	0.00000	0.00000
กรดอาราซิดนิก	C20:4n6	0.00000	0.00000
กรดอีโคซาเพนตาอีนอิก	C20:5n3	0.00000	0.00000
กรดเอนอีโคซานอิก	C21:0	0.00000	0.00000
กรดปีฮีนิก	C22:0	0.00000	0.00000
กรดอีรูจิก	C22:1n9	0.00000	0.00000
กรดโดโคซาเตตระอีนอิก	C22:2	0.00000	0.00000
กรดโดโคซาเฮกซาอีนอิก	C22:6n3	0.00000	0.00000
กรดไตรโคซานอิก	C23:0	0.00000	0.00000
กรดลิกโนเซอร์ริก	C24:0	0.29629	0.29818
กรดเนอร์วอนิก	C24:1	0.00000	0.00000

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน (ความเข้มข้นในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55

ชนิดกรดไขมัน	ปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมัน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	
	<i>Chlorella</i> sp. U	<i>Chlorella</i> sp. VB55
กรดไขมันโอเมก้า 3 กรดแอลฟาไลโนเลนิก (C18:3n3)	1901.24	365.87
กรดไขมันโอเมก้า 6 กรดไลโนเลอิก (C18:2n6)	2979.49	3982.30
กรดไขมันโอเมก้า 9 กรดโอเลอิก (C18:1n9c)	161.74	535.68

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจากการทดลองก่อนหน้านี้ของ Vidyashankar และคณะ (2015) ศึกษาชนิดกรดไขมันและสารไฮโดรคาร์บอนของสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียวเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานชีวภาพ ซึ่งมีความแตกต่างจากการทดลองในครั้ง ซึ่งพบว่า *Chlorella vulgaris* V มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว ขนาดเซลล์ 4.02 ± 0.33 ไมโครเมตร ที่มีคลอโรพลาสต์รูปถ้วย เมื่อทำการสกัดไขมันด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 นำไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามีปริมาณกรดโอเลอิกร้อยละ 46.22 ของสัดส่วนสารเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน แต่ไม่พบ กรดปาล์มิโตเลอิก กรดไลโนเลอิก และกรดแอลฟาไลโนเลนิก ซึ่งแตกต่างจากการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งพบกรดไลโนเลอิก กรดแอลฟาไลโนเลนิก และกรดโอเลอิก ทั้งสายพันธุ์ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB5

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. 03, *Chlorella* sp. 05, *Chlorella* sp. A, *Chlorella* sp. G, *Chlorella* sp. N, *Chlorella* sp. U, *Scenedesmus* sp. C, *Scenedesmus* sp. W และได้รับจากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา 1 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. VB55

5.1.2 การศึกษาการเจริญของสาหร่าย 10 สายพันธุ์ พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. W มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด *Scenedesmus* sp. C, *Chlorella* sp. 03, *Chlorella* sp. U, *Chlorella* sp. VB55, *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. A, *Chlorella* sp. N, *Chlorella* sp. 05 และ *Chlorella* sp. G มีการเจริญรองลงมาตามลำดับ

5.1.3 การศึกษาวิธีการสกัดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 10 สายพันธุ์ พบว่าอัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อ เมทานอล 1:1 และ 1:2 ให้ผลไม่ต่างกัน จึงเลือกใช้ผลของการสกัดในอัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2 มาทำการคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันทั้งหมดสูงที่สุด คือ *Chlorella* sp. VB55 และ *Chlorella* sp. U ซึ่งมีปริมาณไขมันทั้งหมด 0.2500 และ 0.2250 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม ตามลำดับ

5.1.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U นั้นพบปริมาณที่มากกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. VB55 คือ ร้อยละ 59.8533 ± 2.71 และปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้นและเถ้าของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. VB55 พบในปริมาณที่มากกว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U คือ ร้อยละ 10.3367 ± 6.00 , 25.00 ± 0.00 , 5.37 ± 1.00 และ 6.14 ± 0.00 ตามลำดับ

5.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดไขมันด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. U มีปริมาณกรดไขมันโอเมก้า 3 คือ กรดแอลฟาไลโนเลอิก (C18:3n3) มากกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. VB55 คือ 1901.24 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม แต่สาหร่าย *Chlorella* sp. VB55 มีปริมาณกรดไขมันโอเมก้า 6 คือ กรดไลโนเลอิก (C18:2n6) และกรดไขมันโอเมก้า 9 คือ กรดโอเลอิก (C18:1n9) มากกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. U คือ 3982.30 และ 535.68 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กนั้น เมื่อแยกไขมันออกจากตัวทำละลายด้วยเครื่องสุญญากาศ ควรนำตัวทำละลายนั้นกลับมาใช้ใหม่ เนื่องจากการลดต้นทุนในการสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก

5.2.2 ในการสกัดไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กนั้น ควรใช้วิธีสกัดที่สามารถนำไปใช้ในทางอาหารได้อย่างปลอดภัย เช่น การใช้คลื่นอัลตราโซนิก

5.2.3 สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงควรใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำผลผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า 3 เช่น การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟ การใช้อุณหภูมิต่ำ

เอกสารอ้างอิง

- นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2554. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เบญจพร สุขอุ้ม, เสาวลักษณ์ อาดำ และ เจ็ะนูรีดา เวะลง. 2555. “การศึกษาการเจริญองค์ประกอบของเซลล์และการผลิตกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก.” โครงการพิเศษ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- พจน์ ศรีบุญลือ, พัชรี บุญศิริ, ขวามาศ พินิจสุนทร และเปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์. 2555. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 6. ขอนแก่น : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ยุวดี พีรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาสะบุตร. 2549. คู่มือปฏิบัติการสาหร่าย. พิมพ์ครั้งที่ 5. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สรวิช เผ่าทองสุข. 2543. สาหร่าย. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อุทิศ เชื้อบัณฑิต และสุนนทิพย์ บุญนาค. 2556. “ผลของเบนซีนต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสไปรูไลนา.” Graduate research conference Khon kean university 2013.
- Abomohra, A.E., Jin, W. and El-Sheekh, M. 2016. “Enhancement of lipid extraction for Improved biodiesel recovery from the biodiesel promising microalgae *Scenedesmus obliquus*.” *Energy Conversion and Management*. 108 : 23-29.
- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19th ed. Maryland : AOAC International
- Asif, M. 2011. “Health effects of omega-3,6,9 fatty acids : *Perilla frutescens* is a good example of plant oils.” *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 11 : 51-59.
- Bahadar, A. and Khan, M.B. 2013. “Progress in energy from microalgae : a review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 27 : 128-148.
- Baker, K.R., Matthan, N.R., Lichtenstein, A.H., Niu, J., Guermazi, A., Roemer, F., Grainger A., Nevitt, M.C., Clancy, M., Lewis, C.E., Torner, J.C. and Felson, D.T. 2012. “Association of plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids with synovitis in the knee: the MOST study.” *Osteoarthritis and Cartilage*. 20 : 382-387.

- Barros, I.A., Gonçalves, L.A., Simões, M. and Pires, C.M. J. 2015. "Harvesting techniques applied to microalgae : a review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 41 : 1489-1500.
- Beijerinck, M.W. 1890. "Culturversuche mit zoochlorellen, lichenengonidien und anderen niederen algen." *Botanische Zeitung*. 47: 725-739. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. "A rapid method for total lipid extraction and purification." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 : 911-917.
- Blondeau, T. 2016. "The nutraceutical potential of omega-3 alpha-linolenic acid in reducing the consequences of stroke." *Biochimie*. 120 : 49-55.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. and Dunstan, G.A. 1997. "Nutritional properties of microalgae for mariculture." *Aquaculture* 151. 315-331
- Casto, T.F.C., Tocher, D.R. and Monroig, O. 2016. "Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates : insights into the evolution and elovl gene repertoire." *Progress in Lipid Reserch*. 62 : 25-40.
- Chodat, R. 1913. **Monographies d'algues en Culture Pure. Materiaux Pour la Flore Cryptogamique Suisse**. Berne : K.J. Wyss. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Cheng, P., Wang, J and Shao, W. 2016. "Monounsaturated fatty acid intake and stroke risk : a meta-analysis of prospective cohort studies." *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 25 (6) : 1326-1334.
- Christenson, L. and Sims, R. 2011. "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and bioproducts." *Biotechnology Advances*. 29 : 686-702.
- Dangeard, P.A. 1888. "Recherches sur les algues inférieures." *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, série 7*. 7 : 105-175. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A. and Teixeira, J.A. 2011. "Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae." *Applied Energy*. 88 : 3331-3335.

- Egan, P.F. and Trainor, F.R. 1989. "The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae)." *Journal of Phycology*. 25 (1) : 65-70.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. 1956. "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *Biological Chemistry*. 226 : 497-509.
- Ganuza, E., Anderson, A.J. and Ratledge, C. 2008. "High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system." *Biotechnology Letters*. 30 (9) : 1559-1564.
- Gerardo, L.M., Hende, V.D.S., Vervaeren, H., Coward, T. and Skill, C.S. 2015. "Harvesting of microalgae within a biorefinery approach : a review of the developments and case studies from pilot-plants." *Algal Research*. 11 : 248-262.
- Gerneck, R. 1907. Zur kenntnis der niederen chlorophyceen. *Beihefte zum botanischen centralblatt* 21 (Abt. 2) : 221-290. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Goroschankin, I.N. 1891. "Beiträge zur kenntnis der morphologie und systematik der chlamydomonaden. II. *Chlamydomonas reinhardi* dang. und seine Verwandten." *Bulletin de la société impériale de mouscou, nouvelle série*. 5 : 101-142. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Goroschankin, J.N. 1890. "Beiträge zur kenntnis der morphologie und systematik der chlamydomonaden. I. *Ch. braunii* Gorosh." *Bulletin de la société impériale des naturalistes de moscou, nouvelle série*. 4 : 498-520 Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Barbosa, C.R., Pereira, R.D. and Malcata, F.X. 2011. "Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses." *Food Research International*. 44 : 2721-2729.

- Gupta, A., Barrow, C.J. and Puri, M. 2012. "Omega-3 biotechnology : Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils." *Journal of the Biotechnology Advances*. 30 : 1733–1745.
- Halim, R., Danquah, M.K. and Webley, P.A. 2012. "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production : a review." *Biotechnology Advances*. 30 (3) : 709-32.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K. and Webley, P.A. 2010. "Oil extraction from microalgae for biodiesel production." *Journal of the Bioresource Technology*. 102 : 178–185.
- Harun, R., Danquah, M.K. and Forde, G.M. 2010. "Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85 (2) : 199-203.
- Hassan, F.M., Hadi. R.A., Kassim, T.I. and Hassany, J.S. 2012. "Systematic study of epiphytic algal after restoration of Al-Hawizah marshes, southern of Iraq." *International Journal of Aquatic Science*. 3 (1) : 37-57.
- Hegewald, E. 1997. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. *Algae (The korean journal of phycology)*. 12 (4) : 235-246. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. Cambridge : Cambridge University Press.
- Hidalgo, P., Ciudad, G. and Navia, R. 2015. "Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production." *Bioresource Technology*. 201 : 360-364.
- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M. and Higashihara, T. 1998. "*Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific ocean." *Mycological Research*. 102 (4) : 439–448.
- Huertas, E.L. 2010. "Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. a review of intervention studies." *Pharmacological Research*. 61 (3) : 200-207.
- Iqbal, J. and Theegala, C. 2013. "Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent." *Algal Research*. 2 (1) : 34–42.

- Jazrawi, C., Biller, P., He, Y., Montoya, A., Ross, A.B. a., Maschmeyer, T. and Haynes, B.S. 2015. "Two-stage hydrothermal liquefaction of a high-protein microalga." *Algal Research*. 88 : 15-22.
- Johan, F., Maatjafri, M.Z., Lim, H.S. and Kim, C.K. 2013. "Preliminary study : spectral reflectance properties of microalgae in freshwater." *Proceeding of the 2013 IEEE International Conference on Space Science and Communication*. 337-340.
- Kim, K., Kim, E.J., Ryu, B.G., Park, S., Choi, Y.E. and Yang, J.W. 2012^a. "A novel fed-batch process based on the biology of *Aurantiochytrium* sp. KSR101 for the production of biodiesel and docosahexaenoic acid." *Bioresource Technology*. 135 : 269-274.
- Kim, K.B. NAM, Y.A. Kim, H.S. Hayes, A.W. and Lee, B.M. 2014. " α -Linolenic acid : nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation." *Food and chemical toxicology*. 70 : 163-178.
- Kim, Y.H., Choi, Y.K., Park, J., Lee, S., Yang, Y.H., Kim, H.J., Park, T.J., Hwan, K.Y. and Lee, S.H. 2012^b. "Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass." *Bioresource Technology*. 109 : 312-315.
- Kligerman, D.C. and Bouwer, E.J. 2015. "Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil : a review." *Journal of the Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 52 : 1834–1846.
- Krzemińska, I., Nawrocka, A., Piasecka, A., Jagielski, P. and Tys, J. 2015. "Cultivation of *Chlorella protothecoides* in photobioreactors: The combined impact of photoperiod and CO₂ concentration." *Engineering in Life Sciences*. 15 (5) : 533–541.
- Kützing, F.T. 1833. "Synopsis diatomearum oder Versuch einer systematischen Zusammenstellung der Diatomeen." *Linnaea*. 8 : 529-620. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. Cambridge : Cambridge University Press.
- Lee, R. 2008. *Phycology*. 4th ed. Cambridge : United Kingdom at the University Press.

- Lemmermann, E. 1899. "Ergebnisse einer reise nach dem Pacific." *Abhandlungen herausgegeben vom naturwissenschaftlichen zu bremen.* 16 : 313-398. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J. editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles.** Cambridge : Cambridge University Press.
- Li, J., Lui, R., Chang, G., Li, X., Chang, M., Liu, Y., Jin, Q. and Wang, X. 2014. "A strategy for the highly efficient production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 using glucose and glycerol as the mixed carbon sources." *Bioresource Technology.* 77 : 51-57.
- Ma, H.F., Li, X., Hu, H.Y., Yu, Y. and Wu, Y.H. 2012. "Growth, removal of nitrogen and phosphorus, and lipid accumulation property of *Scenedesmus* sp. LX1 in aquaculture wastewater." *Huan Jing Ke Xue.* 33 (6) : 1891-6.
- Maio, H., Sun, L., Tian, Q., Wang, S. and Wang, J. 2012. "Study on the effect of monochromatic light on the growth of the red tide diatom *Skeletonema costatum*." *Optics and Photonics Journal.* 2 : 152-156.
- Mandalam, R.K. and Palsson, B.O. 1998. "Elemental balancing of biomass and bedium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures." *Biotechnology and Bioengineering.* 9 (5) : 605-611.
- Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R. and Ramteke, P.W. 2014. "Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: A potential feedstock for high quality biodiesel production." *Bioresource Technology.* 156 : 42-47.
- Manikan, V., Kalil, M.S. and Hamid, A.A. 2015. "Response surface optimization of culture medium for enhanced docosahexaenoic acid production by a walasian thraustochytrid." *Journal of the Scientific Report.* 27 (5) : 8611.
- Marcó, A., Rubio, R., Compañó, R. and Casals, I. 2002. "Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed." *Talanta.* 57 : 1019-1026.
- Mata, M.T., Martins, A.A. and Caetano, S.N. 2010. "Microalgae for biodiesel production and other applications : a review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14 : 217-232.
- Migula, W. 1905. *Kryptogamen-flora von deutschland, deutsch-österreich und der schweiz. band II. algen. 1. teil. cyanophyceae, diatomaceae, chlorophyceae.* Berlin : H. Bergmühler. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and

- Brook, A.J., editor. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. Cambridge : Cambridge University Press.
- Milano, j., Ong, H.C., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Lam, M.K., Loh, P.K. and Vellayan, V. 2016. "Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 58 : 180–197.
- Mubarak, M., Shaija, A. and Suchithra, T.V. 2015. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research*. 7 : 117-123.
- Negoro, K. 1944. "Untersuchungen über die vegetation der mineralogen azidotrophen gewässer Japans." *Scientific reports tokyo bunrika daigaku*. 6(101) : 231-374. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. *The Freshwater Algal flora of the British Isles*. Cambridge : Cambridge University Press.
- Nicolaou, A. 2013. "Eicosanoids in skin inflammation." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 88 (1) : 131-138.
- NRC (National Research Council). 1993. *Nutrient Requirement of Fish*. Washington, D.C : National Academy Press.
- Oltmanns, F. 1904. *Morphologie und biologie der algen*. Jena : Nabu press. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. Cambridge : Cambridge University Press.
- Ong, S.C., Kao, C.Y., Chiu, S.Y., Tsai, M.T. and Lin, C.S. 2010. "Characterization of the thermal-tolerant mutants of *Chlorella* sp. with high growth rate and application in outdoor photobioreactor cultivation." *Bioresource Technology*. 101 : 2880-2883.
- Patil, K.P. and Gogate, P.R. 2015. "Improved synthesis of docosahexaenoic acid (DHA) using *Schizochytrium limacinum* SR21 and sustainable media." *Chemical Engineering Journal*. 268 : 187-196.
- Pereira Neto, A.M., Sotana de Souza, R.A., Leon-Nino, A.D., D'arc Aparecida da Costa, J., Sbroliini Tiburcio, R., Nunes, T.A., Sellare de Mello, T.C., Kanemoto, F.T., Prado Saldanha-Corrêa, F.M. and Flores Ganesella, S.M. 2013. "Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method." *Renewable Energy*. 55 : 525-531.

- Printz, H. 1914. Kristianiatraktens protococcoideer. skrifter utgit av videnskapsselskapet i kristiania, matematisk-naturvidenskabelig klasse. 1913 (6) : 1-121. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Prommuak, C., Pavasant, P., Quitain, A.T., Goto, M. and Shotipruk, A. 2012. "Microalgal lipid extraction and evaluation of single-step biodiesel production." *Engineering Journal*. 16 (5) : 157-166.
- Ramluckan, K., Moodleya, K.G. and Bux, F. 2014. "An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method." *Fuel*. 116 : 103-108.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K. and Foubert, I. 2012. "Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae." *Journal of the American Oil Chemists' society*. 89 : 189-198.
- Sahu, A. Pancha, I. Jain, D. Pa;jwal, C. Gosh, T. Patidar, S. Bhattacharya, S. and Mishra, S. 2013. "Fatty acids as biomarkers of microalgae." *Phytochemistry*. 89 : 53-58.
- Seo, Y.H. Cho, Ch. Lee, J.Y. and Han, J.I. 2014. "Enhancement of growth and lipid production from microalgae using fluorescent paint under the solar radiation." *Bioresource Technology*. 173 : 193-197.
- Shihira, I. and Krauss, R.W. 1965. **Chlorella : physiology and taxonomy of forty-one isolates**. Maryland : University of Maryland, College park. Cited in John, D.M. Whitton, B.A. and Brook, A.J., editor. 2002. **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. Cambridge : Cambridge University Press.
- Simonetti, S., Ulacco, S., Brizuela, G. และ Juan, A. 2012 "Computational study of cis-oleic acid adsorption on Ni (1 1 1) surface." *Applied Surface Science*. 258 : 5903-5908.
- Solana, M., Rizza, C.R. and Bertucco, A. 2014. "Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*." *The Journal of Supercritical Fluids*. 92 : 311-318.

- Suh, S.S., Kim, S.J., Hwang, J., Park, M., Lee, T.K., Kil, E.J. and Lee, S. 2015. "Fatty acid methyl ester profiles and nutritive values of 20 marine microalgae in Korea." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 8 (3) : 191-196.
- Vidyashankar, S., Venugopal, S.S., Swarnalatha V.G., Kavitha, D.M., Chauhan, S.V., Ravi, R., Bansal, K.A., Singh, R., Pande, A., Ravishankar, A.G. and Sarada, R. 2015. "Characterization of fatty acids and hydrocarbons of chlorophycean microalgae towards their use as biofuel source." *Biomass and Bioenergy*. 77 : 75-91.
- Wang, Y., Chen, T. and Qin, S. 2012. "Differential fatty acid profiles of *Chlorella kessleri* grown with organic materials." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 88 (4) : 651-657.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. and Nakahara, T. 1998. "Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49 : 72-76.
- Yongmanitchai, W. and Ward, O.P. 1991. "Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid." *Phytochemistry*. 9 (30) : 2963-2967.
- Zhukova, N.V. and Aizdaicher, N.A. 1995. "Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae." *Phytochemistry*. 39 : 351-356.
- [Online]. Available : <http://ccala.butbn.cas.cz/en/chlamydomonasforbicularis-pring-sheim>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 พ.ค. 59.
- [Online]. Available : <http://ccala.butbn.cas.cz/en/chlorella-sp-2>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 พ.ค. 59.
- [Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2077/omega-3-fatty-acid-กรดไขมันโอเมกา-3DHA>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 พ.ค. 59.
- [Online]. Available : <http://omega3sealil.homestead.com/oleic.jpg>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 พ.ค. 59.
- [Online]. Available : http://www.planktonforum.eu/index.php?id=2&no_cache=1. เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 พ.ค. 59.
- [Online]. Available : <http://omega3sealil.homestead.com/linoleic.jpg>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 พ.ค. 59.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารสูตร N-8 สูตรอาหารเหลว (Mandalam และ Palsson, 1998)

โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	1,000	มิลลิกรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	740	มิลลิกรัมต่อลิตร
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	260	มิลลิกรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	13	มิลลิกรัมต่อลิตร
เหล็กอีดีเอต (Fe EDTA)	10	มิลลิกรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	50	มิลลิกรัมต่อลิตร
Trace element	1	มิลลิลิตรต่อลิตร

Trace element

อะลูมิเนียมซัลเฟต ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$)	3.58	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์ ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	12.98	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1.83	กรัมต่อลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.2	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 6.8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร N-8 สูตรอาหารแข็ง

อาหารเหลว N-8	1,000	มิลลิลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

ข-1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมไขมันสูงที่สุด

ข-1.1 การวัดการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

(1) การวัดการดูดกลืนแสง

1. วัดความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (อุทิต และ สุมนทิพย์, 2556)

2. บันทึกผลและนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

(2) การนับจำนวนเซลล์

วิธีการ (ยูวตี และ ฉมาภรณ์, 2549)

1. หยดตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กในช่องใส่ตัวอย่างของสไลด์สำหรับนับเซลล์ (Hemocytometer) และปิดด้วยกระจกสไลด์ (จะต้องเป็นกระจกสไลด์ชุดเดียวกับสไลด์นับเซลล์ เนื่องจากน้ำหนักของกระจกสไลด์ไม่เท่ากับกระจกสไลด์ธรรมดา อาจทำให้ความลึกคลาดเคลื่อน)

2. นำสไลด์ที่หยดตัวอย่างแล้วไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ออฟเฟกต์ที่กำลังขยายต่ำสุด

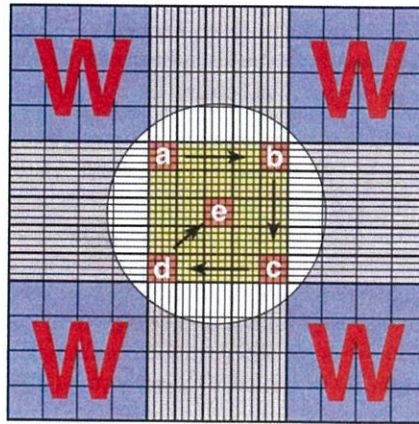
3. ทำการนับเซลล์

4. บันทึกผลและนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ข้อเสนอแนะการนับเซลล์ (เบญจพร และคณะ, 2555) การนับจำนวนเซลล์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. การนับเซลล์ภายในบริเวณช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ทั้งสี่ช่อง (W ทั้ง 4 ช่อง) และนำค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ไปคูณด้วย $\frac{1}{4} \times 10^4$ จะได้ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. การนับเซลล์ภายในช่องสี่เหลี่ยมเล็กภายในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ เป็นจำนวน 5 ช่องเล็ก (a, b, c, d และ e) จากนั้นนำจำนวนเซลล์ที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ยของเซลล์เหลือเพียง 1 ช่องเล็ก จากนั้นนำไปคูณด้วย $\frac{1}{4} \times 10^6$ จะได้ปริมาณของเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ข-1 แผนภาพแสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวนเซลล์

ที่มา <https://quizlet.com/95500469/hematology-math-equations-and-blood-ranges-flash-cards>.

(3) การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Seo และคณะ, 2014)

1. นำตัวอย่างอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กรายขนาดปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
2. นำเซลล์ที่ตกตะกอนมาล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งและเทส่วนใสทิ้ง
3. นำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์แห้ง
4. เมื่อเซลล์แห้งนำไปเก็บในเดซิเคเตอร์จนเย็นหรือน้ำหนักเซลล์คงที่
5. นำเซลล์ที่ได้ไปชั่งที่เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง บันทึกผลและนำผลน้ำหนักที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์น้ำหนักแห้งกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

(4) การหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Maio และคณะ, 2012)

คำนวณได้จากจำนวนเซลล์ในระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล โดยใช้สูตรการหาอัตราการเจริญจำเพาะ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) = $\frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$ เมื่อ N_1 และ N_2 คือ จำนวนเซลล์ในวันที่ t_1 และ t_2 ตามลำดับ

ข-2 การศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์

(1) การวิเคราะห์โปรตีน (Macró และคณะ, 2002)

1. เตรียมตัวอย่างสำหรับขนาดเล็ก 1 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย
2. เติมสารผสมของโพแทสเซียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 98 และคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาณ 10 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ
4. นำหลอดย่อยที่เตรียมใส่ในเครื่องย่อย ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที จนสารละลายเป็นสีเขียวใส
5. นำหลอดย่อยออกมาตั้งพักจนเย็น
6. เตรียมสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร พร้อมหยุดเมทิลเรด 1-2 หยด
7. บรรจุหลอดย่อยและขวดรูปชมพู่บนแท่นของเครื่องกลั่น เปิดเครื่องกลั่น เครื่องกลั่น จะทำการเติมน้ำและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 30 และ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ
8. เมื่อกลั่นเสร็จนำหลอดย่อยและขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น
9. นำของเหลวที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ไปทำการไทเทรตกับสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนของเหลวเปลี่ยนเป็นสีชมพูใส

วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 0.014}{D} \times 100$$

$$\text{ร้อยละโปรตีน} = \text{ร้อยละไนโตรเจน} \times 6.25$$

A = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ไทเทรตกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ไทเทรตกับแบลงค์ (Blank)

C = ความเข้มข้นของสารละลายซัลฟูริก

D = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

(2) การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Ryckebosch และคณะ, 2012)

1. เตรียมสารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอลอัตราส่วน 1:1
2. นำชีวมวลแห้งที่ได้จากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มาผสมกับสารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล และเติมน้ำ โดยผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex) เป็นเวลา 30 วินาที
3. จากนั้นเติมสารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายอีกครั้ง
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ถ่ายส่วนที่เป็นชั้นของตัวทำละลายไปยังอีกหลอดหนึ่ง
6. ทำการสกัดของแข็งที่เหลืออยู่อีกครั้งด้วยสารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล
7. นำสารละลายที่สกัดได้มารวมกัน

8. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C
9. ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
10. นำไขมันที่ได้มาชั่งน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\text{ผลได้ของไขมันที่สกัด (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมันที่ชั่งได้หลังทำการสกัด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)}} \times 100$$

(3) การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรต (NRC, 1993)

$$\text{ร้อยละคาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\text{ร้อยละของเถ้า} + \text{ร้อยละของความชื้น} + \text{ร้อยละของโปรตีน} + \text{ร้อยละของไขมัน})$$

(4) การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (Jazrawi และคณะ, 2015)

1. เตรียมถ้วยอะลูมิเนียมฝาปิด (Moisture can) โดยทำการอบและทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนัก (W_1)
2. ชั่งตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กประมาณ 3 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม จากนั้นนำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (W_2)

วิธีการคำนวณ

$$\text{ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมฝาปิดรวมกับน้ำหนักสาหร่ายหลังอบ (W2)} - \text{น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมฝาปิด (W1)}}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง (3 กรัม)}}$$

(กรัมต่อกรัม)

(5) การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Jazrawi และคณะ, 2015)

1. เตรียมครุชชีเบล โดยทำการอบและทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนัก (W_1)
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ใส่ในครุชชีเบล นำไปเผาที่ตู้เผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (W_2)

วิธีการคำนวณ

$$\text{เถ้า (กรัมต่อกรัม)} = \frac{\text{น้ำหนักครุชชีเบลรวมกับน้ำหนักสาหร่ายหลังอบ (W2)} - \text{น้ำหนักครุชชีเบล (W1)}}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง (3 กรัม)}}$$

ข-3 การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันทั้งหมดในเซลล์สำหรับขนาดเล็กด้วยโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส

วิธีการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โอเมก้า 3, 6, 9 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (AOAC, 2012)

ตอนที่ 1 การเตรียมสารละลาย

- เอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร)
- โทลูอีน (เกรดนาโน)
- คลอโรฟอร์ม
- โซเดียมซัลเฟต (ปราศจากน้ำ)
- โบรอนไตรฟลูออไรด์ (ร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) เตรียมโดยใช้ละลายสาร BF_3 ความเข้มข้นร้อยละ 14 ทำในตู้ดูดควัน
 - ไดเอทิลอีเทอร์ และสารผสมของปิโตรเลียมอีเทอร์
 - สารมาตรฐานภายในของไตรกลีเซอไรด์ ($\text{C}_{11:0}$; ไตรอันตาคาโนอิน) เตรียมโดย ชั่ง $\text{C}_{11:0}$; ไตรอันตาคาโนอิน 2.5 กรัม ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร เต็ม คลอโรฟอร์มประมาณ 400 มิลลิลิตร และผสมจนละลาย จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม จนถึงปริมาตร 500 มิลลิลิตร กลับขวดขึ้นลงอย่างน้อย 10 ครั้ง สารมาตรฐานภายในของไตรกลีเซอไรด์จะคงเสถียรภาพได้ถึง 1 เดือน เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส)
 - สารละลายมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAMES) การเตรียมสารผสมของสารมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ทำได้โดยเปิดขวดแก้วขนาดเล็กที่บรรจุสารแล้วถ่ายใส่ขวดแก้วใหม่ขนาด 3 แดรม (dram) จากนั้นล้างขวดเดิมด้วยเฮกเซนเพื่อให้แน่ใจว่าสารทั้งหมดถูกนำออกมาจากขวดแล้วนำสารที่ล้างใส่ขวดแก้ว 3 แดรม (dram) จากนั้นเจือจางด้วยเฮกเซนประมาณ 3 มิลลิลิตร
 - สารละลายมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน $\text{C}_{11:0}$; อันตาคาโนอิก เมทิลเอสเทอร์ในเฮกเซน เตรียมได้โดยเปิดขวดแก้วอย่างระมัดระวังและถ่ายสารไปยังขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เจือจางปริมาตรด้วยเฮกเซน สารละลายมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน $\text{C}_{11:0}$ จะคงเสถียรภาพได้ถึง 1 อาทิตย์ เมื่อเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส
 - สารละลายมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันแต่ละชนิด ได้แก่ $\text{C}_{4:0}$ -เตตราโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{6:0}$ -เฮกซาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{8:0}$ -ออกตาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{10:0}$ -ดีคาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{12:0}$ -โดดิกาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{13:0}$ -ไตรดิกาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{14:0}$ -เตตราดิกาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{14:1}$ -9-เตตราดิกาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{15:0}$ -เพนตาดีคาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{15:1}$ -10-เพนตาดีคาโนอิก เมทิลเอสเทอร์, $\text{C}_{16:0}$ -10-เฮกซาดีคาโนอิก เมทิลเอสเทอร์,

C_{16:1}-9-เฮกซาดีคานอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{17:0}-เฮปตาดีคานอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{17:1}-10-เฮปตาดีคานอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{18:0}-ออกตาดีคานอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{18:1}-9-เพนตาดีคานอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{18:2}-9,12-ออกตาดีคาไดอินอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{18:3}-9,12,15-ออกตาดีคาไตรอินอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{20:0}-อีโคซานอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{20:1}-8-อีโคซีนอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{20:2}-11,14-อีโคซาไดอินอิก เมทิลเอสเทอร์, C_{20:3}-11,14,17-อีโคซาไตรอินอิก เมทิลเอสเทอร์ และ C_{22:0}-โดโคซานอิก เมทิลเอสเทอร์ เตรียมได้โดยเปิดขวดแก้วแต่ละขวดอย่างระมัดระวังและถ่ายสารไปยังขวดแก้วใหม่ขนาด 3 dram จากนั้นล้างขวดเดิมด้วยเฮกเซนเพื่อให้แน่ใจว่าสารทั้งหมดถูกนำออกมาจากขวดแล้วนำสารที่ล้างใส่ขวดแก้ว 3 dram เติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน C_{11:0} 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยเฮกเซนให้ได้ปริมาตรทั้งหมดประมาณ 3 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันแต่ละชนิด จะคงเสถียรภาพได้ถึง 1 อาทิตย์ เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส)

ตอนที่ 2 การเตรียมตัวอย่าง

ขั้นตอนการสกัด (Extraction)

- เติมสารละลายมาตรฐานไดเอทิลอีเทอร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่า 2 นาที
- เทส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
- เติมสารปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่า 2 นาที
- เทส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ใบเดิม
- จากนั้นทำการสกัดด้วยสารละลายมาตรฐานเมทิลอีเทอร์และปิโตรเลียมอีเทอร์ซ้ำอีกครั้ง
- จากนั้นนำสารที่สกัดได้ไประเหยบนอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 80±5 องศาเซลเซียส จนแห้ง
- จากนั้นนำส่วนที่เหลือที่ได้จากขั้นตอนการสกัดไขมันนี้ ไปวิเคราะห์ต่อไปในขั้นตอนเมทิลเลชัน (Methylation)

ขั้นตอนเมทิลเลชัน (Methylation)

- ดูดส่วนที่เป็นไขมันประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
- จากนั้นเติมสารประกอบโบรอนไตรฟลูออไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และโทลูอีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมซัลเฟต และนำไปเขย่า 1 นาที โดยใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex)

- ตั้งไว้ให้สารเกิดการแยกชั้น ทำการเก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่ลงในขวดแก้วเก็บสารขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมซัลเฟตบรรจุอยู่ภายใน จากนั้นเขย่าแล้วดูส่วนที่เป็นกรดไขมันเก็บลงในขวดแก้วเก็บสารขนาด 2 มิลลิลิตร
- จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

สภาวะของโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas chromatography condition)

โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส	Agilent 6890 N (Agilent technology, USA) Serial No.US10406046
คอลัมน์	คอลัมน์แคปิลารี่หือ Supelco (SPT TM -2560) ความยาว 100 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางด้านใน 0.25 มิลลิเมตร หนา 0.2 ไมโครเมตร
อุณหภูมิ (Temperature program)	ขณะฉีด : 250 องศาเซลเซียส ตุ้บ : เริ่มต้นที่ 140 องศาเซลเซียส คงไว้ 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 250 องศาเซลเซียส และคงไว้ 17 นาที
วิธีการฉีด (Injection mode)	วิธี : ฉีดแยก (Split) ปริมาณตัวอย่าง : 1 ไมโครลิตร อัตราการฉีด : 100:1
แก๊สพา (Carrier gas)	ไฮโดรเจน ความเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวอย่างมาตรฐาน (Calibration standard)	Supelco TM 37 Component FAME Mix

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ค-1 รายชื่อสาหร่ายขนาดเล็กที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ

ลำดับ	สายพันธุ์สาหร่าย	แหล่งที่พบ	วันที่เก็บตัวอย่างน้ำ
1	<i>Chlamydomonas</i> sp.	จากบ่อปลาหางนกยูงหมู่บ้านเพอร์เฟคเพลส สุขุมวิท 77	04/10/58
2	<i>Chlorella</i> sp. 03	จากป่าชายเลนศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี	08/08/58
3	<i>Chlorella</i> sp. 05	ป่าชายเลนศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี	18/08/58
4	<i>Chlorella</i> sp. A	จากบ่อปลาคราฟหมู่บ้านเพอร์เฟคเพลส สุขุมวิท 77	25/10/58
5	<i>Chlorella</i> sp. G	จากป่าชายเลน จังหวัดสมุทรปราการ	26/10/58
6	<i>Chlorella</i> sp. N	จากป่าชายเลนศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี	27/10/58
7	<i>Chlorella</i> sp. U	ป่าชายเลนศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี	01/11/58
8	<i>Scenedesmus</i> sp. C	บ่อปลาหางนกยูงหมู่บ้านเพอร์เฟคเพลส สุขุมวิท 77	11/11/58
9	<i>Scenedesmus</i> sp. W	บ่อปลาหางนกยูงหมู่บ้านเพอร์เฟคเพลส สุขุมวิท 77	05/11/58
10	<i>Chlorella</i> sp. VB55	จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	-

ตารางที่ ค-2 ผลการศึกษาระยะเวลาเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

ตารางที่ ค-2.1 ระยะเวลาเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas* sp.

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.141	0.121	0.156	0.139	6.00×10^6	4.75×10^6	5.75×10^6	0.55×10^7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.318	0.338	0.423	0.359	2.45×10^7	2.70×10^7	3.00×10^7	2.72×10^7	0.0800	0.0800	0.0800	0.0800
4	0.569	0.595	0.508	0.557	5.83×10^7	7.88×10^7	6.50×10^7	6.73×10^7	0.1200	0.2400	0.2000	0.1860
6	0.790	0.928	0.884	0.867	8.85×10^7	1.11×10^8	9.05×10^7	9.65×10^7	0.3600	0.3600	0.3000	0.3400
8	1.032	1.290	0.967	1.094	1.44×10^8	1.61×10^8	1.40×10^8	1.48×10^8	0.4000	0.5800	0.4100	0.4600
10	1.644	1.674	1.692	1.670	2.20×10^8	1.96×10^8	2.02×10^8	2.06×10^8	0.4200	0.6000	0.5500	0.5230
12	2.555	2.535	2.402	2.497	2.35×10^8	2.78×10^8	2.52×10^8	2.55×10^8	0.4600	0.6200	0.6000	0.5600
14	2.550	2.904	2.484	2.646	2.82×10^8	2.64×10^8	2.58×10^8	2.68×10^8	0.5600	0.7600	0.6500	0.6560
16	2.982	3.120	3.080	3.060	2.49×10^8	3.03×10^8	2.84×10^8	2.79×10^8	0.9400	1.0600	1.0000	1.0000
18	3.339	3.773	4.404	3.838	2.71×10^8	3.43×10^8	3.70×10^8	3.28×10^8	1.4800	1.3800	1.4600	1.4400
20	4.256	4.080	4.420	4.252	2.60×10^8	3.75×10^8	3.52×10^8	3.29×10^8	1.5800	1.5600	1.6600	1.6000
22	4.608	4.243	4.580	4.477	2.70×10^8	4.09×10^8	3.92×10^8	3.57×10^8	1.8000	1.7000	1.8400	1.7800
24	4.674	4.444	4.648	4.588	3.15×10^8	4.03×10^8	3.73×10^8	3.64×10^8	2.2200	1.7800	2.300	2.1000

ตารางที่ ค-2.2 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. 03

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.064	0.063	0.065	0.064	1.80×10^7	2.33×10^7	2.00×10^7	0.20×10^8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.128	0.202	0.156	0.162	3.00×10^7	3.40×10^7	3.10×10^7	0.31×10^8	0.0400	0.0600	0.0600	0.0533
4	0.254	0.342	0.289	0.295	5.40×10^7	5.70×10^7	5.00×10^7	0.53×10^8	0.3000	0.3200	0.2800	0.3000
6	0.521	0.844	0.840	0.735	1.01×10^8	1.15×10^8	1.16×10^8	1.11×10^8	0.5600	0.5800	0.5200	0.5533
8	1.122	1.203	1.096	1.140	1.12×10^8	1.28×10^8	1.18×10^8	1.19×10^8	0.6400	0.7600	0.7000	0.7000
10	1.349	1.447	1.201	1.332	1.32×10^8	1.35×10^8	1.30×10^8	1.32×10^8	0.6800	0.7800	0.7200	0.7267
12	1.647	1.722	1.844	1.738	1.38×10^8	1.41×10^8	1.44×10^8	1.41×10^8	0.7200	0.8000	0.8000	0.7733
14	1.994	2.002	2.300	2.099	1.44×10^8	1.53×10^8	1.48×10^8	1.48×10^8	0.8800	0.9400	0.8400	0.8867
16	2.023	2.108	2.380	2.230	1.82×10^8	1.76×10^8	1.83×10^8	1.80×10^8	1.0200	0.9800	1.0000	1.0000
18	2.472	2.342	2.446	2.420	1.94×10^8	1.88×10^8	1.91×10^8	1.91×10^8	1.2400	1.2000	1.2200	1.2200
20	2.542	2.550	2.584	2.559	2.02×10^8	2.02×10^8	1.97×10^8	2.00×10^8	1.3400	1.3200	1.2800	1.3133
22	2.464	2.484	2.500	2.483	2.03×10^8	2.00×10^8	2.01×10^8	2.01×10^8	1.3400	1.3400	1.3000	1.3267
24	2.502	2.546	2.484	2.511	2.02×10^8	2.01×10^8	2.00×10^8	2.01×10^8	1.3200	1.3400	1.2800	1.3133

ตารางที่ ค-2.3 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. 05

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.079	0.101	0.089	0.089	1.10×10^7	1.35×10^7	1.23×10^7	0.12×10^8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.101	0.244	0.108	0.151	1.40×10^7	1.55×10^7	1.43×10^7	0.14×10^8	0.0200	0.0200	0.0200	0.0200
4	0.402	0.562	0.384	0.449	5.80×10^7	6.10×10^7	4.90×10^7	0.56×10^8	0.0400	0.0400	0.0600	0.0467
6	0.741	0.844	0.700	0.762	1.02×10^8	1.38×10^8	1.08×10^8	1.16×10^8	0.0800	0.0800	0.0800	0.0800
8	0.989	1.000	0.899	0.963	1.89×10^8	1.51×10^8	1.80×10^8	1.73×10^8	0.1000	0.0800	0.1000	0.0933
10	1.021	1.248	1.120	1.130	2.44×10^8	2.84×10^8	2.20×10^8	2.49×10^8	0.4000	0.4000	0.4000	0.4000
12	1.402	1.586	1.442	1.357	2.84×10^8	3.10×10^8	2.82×10^8	2.92×10^8	0.8400	0.9400	0.8000	0.8600
14	1.580	1.888	1.846	1.771	3.23×10^8	3.48×10^8	3.39×10^8	3.37×10^8	0.9400	0.9800	0.9800	0.9667
16	1.989	2.006	2.100	2.032	4.00×10^8	4.10×10^8	4.08×10^8	4.06×10^8	1.0000	1.0200	1.0000	1.0067
18	2.010	2.111	2.118	2.080	4.12×10^8	4.15×10^8	4.12×10^8	4.13×10^8	1.2000	1.2400	1.2000	1.2133
20	2.124	2.220	2.146	2.163	4.14×10^8	4.15×10^8	4.12×10^8	4.14×10^8	1.2000	1.2000	1.2000	1.2000
22	2.120	2.242	2.146	2.170	4.11×10^8	4.15×10^8	4.13×10^8	4.13×10^8	1.1800	1.2000	1.1800	1.1687
24	2.118	2.200	2.140	2.153	4.10×10^8	4.16×10^8	4.12×10^8	4.13×10^8	1.2000	1.2400	1.2000	1.2133

ตารางที่ ค-2.4 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. A

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.155	0.143	0.135	0.144	9.50×10^6	8.50×10^6	9.00×10^6	0.09×10^8	0.1800	0.1000	0.1400	0.1400
2	0.430	0.487	0.425	0.447	2.88×10^7	2.48×10^7	2.50×10^7	0.26×10^8	0.4000	0.1400	0.2300	0.2570
4	0.958	1.084	0.943	0.995	7.60×10^7	8.93×10^7	7.53×10^7	0.80×10^8	0.4600	0.3600	0.3900	0.4030
6	1.278	1.251	1.261	1.263	1.63×10^8	1.26×10^8	1.38×10^8	1.42×10^8	0.5200	0.4200	0.4500	0.4630
8	1.569	1.545	1.555	1.556	1.64×10^8	1.31×10^8	1.53×10^8	1.49×10^8	0.5200	0.4400	0.4800	0.4800
10	1.809	1.746	1.782	1.779	1.73×10^8	1.49×10^8	1.56×10^8	1.59×10^8	0.6200	0.5000	0.5600	0.5600
12	2.072	2.124	2.110	2.102	1.79×10^8	1.79×10^8	1.75×10^8	1.77×10^8	0.7400	0.5000	0.6800	0.6400
14	2.142	2.265	2.215	2.207	1.90×10^8	1.79×10^8	1.87×10^8	1.85×10^8	0.7600	0.5200	0.7000	0.6600
16	2.390	2.303	2.298	2.330	1.96×10^8	1.80×10^8	1.96×10^8	1.91×10^8	0.8400	0.6400	0.7800	0.7530
18	2.538	2.358	2.416	2.437	1.97×10^8	1.89×10^8	1.98×10^8	1.95×10^8	0.9400	0.7600	0.9000	0.8670
20	2.856	2.478	2.526	2.620	2.10×10^8	1.94×10^8	2.03×10^8	2.02×10^8	0.9800	0.9400	0.9600	0.9600
22	3.056	2.037	2.500	2.531	2.66×10^8	1.52×10^8	1.73×10^8	1.97×10^8	1.2000	0.9600	0.9400	1.0333
24	2.896	2.304	2.300	2.500	1.91×10^8	1.82×10^8	1.99×10^8	1.90×10^8	1.3400	0.8600	0.8600	1.0200

ตารางที่ ค-2.5 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. G

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.081	0.089	0.084	0.085	4.00×10^6	6.25×10^6	6.00×10^6	0.05×10^8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.429	0.409	0.412	0.416	5.98×10^7	5.28×10^7	5.83×10^7	0.57×10^8	0.1000	0.2200	0.1800	0.1670
4	0.974	0.872	0.906	0.917	1.62×10^8	1.37×10^8	1.48×10^8	1.49×10^8	0.3000	0.2600	0.2200	0.2600
6	1.212	1.242	1.190	1.214	1.77×10^8	1.95×10^8	1.66×10^8	1.79×10^8	0.3400	0.3000	0.2800	0.3060
8	1.605	1.626	1.600	1.610	2.53×10^8	2.84×10^8	2.50×10^8	2.62×10^8	0.6800	0.6000	0.6400	0.6400
10	2.156	2.196	2.008	2.120	3.40×10^8	3.42×10^8	2.98×10^8	3.27×10^8	0.7400	0.8000	0.7600	0.6760
12	2.586	2.442	2.214	2.504	3.59×10^8	4.22×10^8	3.84×10^8	3.89×10^8	0.7800	0.8400	0.8000	0.8070
14	3.178	3.360	3.100	3.213	5.28×10^8	5.86×10^8	5.21×10^8	5.45×10^8	0.8800	1.1400	0.8800	0.9670
16	3.920	4.080	3.946	3.982	5.35×10^8	6.48×10^8	6.00×10^8	5.94×10^8	0.9000	1.1800	1.0200	1.0300
18	4.590	4.824	4.514	4.643	6.12×10^8	6.71×10^8	6.18×10^8	6.37×10^8	1.1400	1.2800	1.0800	1.1670
20	5/370	5.750	5.248	5.456	7.25×10^8	7.10×10^8	7.26×10^8	7.20×10^8	1.3000	1.4800	1.2200	1.3330
22	5.320	5.450	5.321	5.363	7.50×10^8	7.13×10^8	7.30×10^8	7.31×10^8	1.4600	1.5800	1.2600	1.4333
24	5.380	5.300	5.480	5.386	7.48×10^8	7.14×10^8	7.30×10^8	7.39×10^8	1.5800	1.6600	1.2800	1.5070

ตารางที่ ค-2.6 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. N

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.140	0.142	0.148	0.143	4.00×10^6	4.00×10^6	4.00×10^6	0.40×10^7	0.1000	0.1000	0.0000	0.0670
2	0.319	0.295	0.223	0.279	2.48×10^7	2.12×10^7	1.80×10^7	2.13×10^7	0.3600	0.2800	0.2000	0.2800
4	0.313	0.304	0.297	0.305	3.05×10^7	2.90×10^7	2.40×10^7	2.79×10^7	0.4200	0.3000	0.2800	0.3333
6	0.405	0.381	0.332	0.372	5.48×10^7	5.23×10^7	4.78×10^7	5.16×10^7	0.4200	0.4200	0.3400	0.3933
8	1.131	0.994	0.869	0.998	8.78×10^7	7.93×10^7	7.20×10^7	7.97×10^7	1.5600	1.3400	1.0800	1.3260
10	1.152	1.047	1.210	1.136	1.10×10^8	9.73×10^7	1.17×10^8	1.08×10^8	2.0200	1.8800	1.8000	1.9000
12	1.590	1.367	1.299	1.418	1.69×10^8	1.52×10^8	1.24×10^8	1.48×10^8	2.7000	2.0400	1.9800	2.2400
14	1.855	1.792	1.546	1.731	1.95×10^8	1.80×10^8	1.67×10^8	1.81×10^8	2.7200	2.5400	2.0400	2.4333
16	2.220	2.090	1.986	2.099	2.14×10^8	1.92×10^8	1.90×10^8	1.99×10^8	2.8400	2.5600	2.4200	2.6067
18	2.240	2.282	2.200	2.473	2.34×10^8	2.18×10^8	2.20×10^8	2.24×10^8	2.8660	2.6000	2.5800	2.6800
20	2.590	2.390	2.312	2.431	2.46×10^8	2.24×10^8	2.28×10^8	2.33×10^8	2.8800	2.6000	2.6400	2.7067
22	2.580	2.467	2.416	2.488	2.49×10^8	2.30×10^8	2.30×10^8	2.36×10^8	2.8800	2.6600	2.6000	2.7133
24	2.500	2.480	2.460	2.480	2.50×10^8	2.30×10^8	2.25×10^8	2.35×10^8	2.8800	2.5500	2.7000	2.7133

ตารางที่ ค-2.7 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.153	0.128	0.147	0.161	9.00×10^6	7.50×10^6	8.00×10^6	0.11×10^8	0.1000	0.0400	0.0600	0.0670
2	0.414	0.397	0.399	0.500	1.98×10^7	1.42×10^7	1.65×10^7	0.17×10^8	0.3600	0.1800	0.2400	0.2600
4	1.090	1.018	1.061	1.056	9.20×10^8	8.30×10^7	8.70×10^7	0.87×10^8	0.5200	0.4400	0.4800	0.4800
6	1.461	1.380	1.423	1.421	1.74×10^8	1.38×10^8	1.64×10^8	1.59×10^8	0.7600	0.5000	0.6400	0.6300
8	1.542	1.470	1.521	1.511	1.89×10^8	1.41×10^8	1.69×10^8	1.66×10^8	0.9800	0.5200	0.7200	0.7400
10	1.896	1.800	1.836	1.844	1.97×10^8	1.54×10^8	1.63×10^8	1.71×10^8	1.020	0.7200	0.9800	0.9060
12	2.046	2.376	2.203	2.208	2.05×10^8	1.69×10^8	1.93×10^8	1.89×10^8	1.0800	0.8800	1.0200	0.9930
14	2.550	2.508	2.492	2.518	2.18×10^8	1.75×10^8	1.64×10^8	1.83×10^8	1.2400	1.0000	1.1200	1.1200
16	2.744	2.535	2.611	2.630	2.24×10^8	1.82×10^8	2.03×10^8	2.02×10^8	1.5400	1.0800	1.3600	1.3260
18	2.946	2.821	2.897	2.888	2.40×10^8	2.11×10^8	2.18×10^8	2.18×10^8	2.0800	1.2200	1.3000	1.5333
20	3.744	3.512	3.629	3.628	2.43×10^8	2.20×10^8	2.34×10^8	2.31×10^8	2.1200	1.4800	2.0000	1.8600
22	3.996	4.239	2.280	3.505	2.19×10^7	2.03×10^8	2.05×10^8	2.09×10^8	1.6800	1.7600	2.0000	1.8100
24	4.250	4.590	2.464	3.768	1.14×10^8	1.30×10^8	1.22×10^8	1.22×10^8	1.9800	1.6400	1.9400	1.8533

ตารางที่ ค-2.8 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus* sp. C

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.034	0.079	0.065	0.059	2.50×10^5	7.5×10^5	5.00×10^5	0.05×10^7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.255	0.277	0.261	0.264	5.00×10^5	1.00×10^6	7.50×10^5	0.08×10^7	0.0000	0.0200	0.0200	0.0133
4	0.478	0.510	0.483	0.490	4.00×10^6	6.50×10^6	6.5×10^6	0.57×10^7	0.8600	0.2800	0.3400	0.4933
6	0.603	0.598	0.596	0.599	8.25×10^6	8.25×10^6	8.25×10^6	0.83×10^7	1.1200	1.1600	1.0000	1.0933
8	0.804	0.846	0.834	0.828	1.20×10^7	1.35×10^7	1.30×10^7	1.28×10^7	1.9200	1.8800	1.9000	1.9000
10	1.023	1.035	1.032	1.030	2.03×10^7	2.18×10^7	2.18×10^7	2.13×10^7	2.2000	2.1600	2.2000	2.1866
12	1.230	1.185	1.194	1.203	2.13×10^7	2.18×10^7	2.18×10^7	2.16×10^7	2.4400	2.5200	2.6600	2.5400
14	1.410	1.430	1.422	1.420	2.13×10^7	2.38×10^7	2.23×10^7	2.25×10^7	2.6000	2.6600	2.6600	2.6400
16	1.623	1.578	1.602	1.601	2.40×10^7	2.38×10^7	2.38×10^7	2.39×10^7	2.9400	2.7800	2.7200	2.8133
18	2.088	2.611	1.988	2.229	2.70×10^7	2.55×10^7	2.48×10^7	2.58×10^7	3.0200	2.8600	2.8000	2.8933
20	2.430	2.376	2.252	2.353	2.70×10^7	2.55×10^7	2.48×10^7	2.58×10^7	3.0600	3.0000	2.8600	2.9733
22	3.136	2.394	1.070	2.200	3.30×10^7	2.45×10^7	1.75×10^7	2.50×10^7	2.9100	2.8700	2.8000	2.8600
24	3.200	2.040	1.360	2.200	3.30×10^7	2.42×10^7	1.84×10^7	2.52×10^7	3.0000	2.8000	2.6000	2.8000

ตารางที่ ค-2.9 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus* sp. W

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.135	0.134	0.135	0.135	2.50×10^5	5.00×10^5	5.00×10^5	0.04×10^7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.231	0.243	0.236	0.237	4.75×10^6	5.75×10^6	5.00×10^6	0.52×10^7	0.1600	0.2000	0.1600	0.1800
4	0.531	0.544	0.534	0.536	1.50×10^7	1.58×10^7	1.50×10^7	1.53×10^7	0.3200	0.4000	0.3400	0.3600
6	0.868	0.832	0.853	0.851	2.95×10^7	3.55×10^7	3.30×10^7	3.27×10^7	0.3600	0.4800	0.3800	0.4200
8	1.065	1.026	1.043	1.045	3.30×10^7	3.38×10^7	3.30×10^7	3.33×10^7	0.4200	0.5600	0.5200	0.5000
10	1.248	1.305	1.346	1.300	3.60×10^7	4.12×10^7	3.90×10^7	3.88×10^7	0.700	0.6800	0.6800	0.7000
12	1.795	1.720	1.772	1.762	4.38×10^7	4.88×10^7	4.28×10^7	4.51×10^7	0.9400	1.1600	0.9600	1.0200
14	1.668	1.698	1.687	1.684	4.50×10^7	5.55×10^7	4.53×10^7	4.86×10^7	1.1400	1.2000	1.1200	1.1600
16	2.064	2.046	2.078	2.063	4.80×10^7	5.85×10^7	5.03×10^7	5.23×10^7	1.3600	1.7600	1.5200	1.5166
18	2.238	2.520	2.470	2.409	4.80×10^7	5.85×10^7	5.08×10^7	5.24×10^7	1.5200	1.8000	1.6400	1.6600
20	2.406	2.550	2.480	2.479	4.80×10^7	5.85×10^7	5.08×10^7	5.24×10^7	1.6200	1.9600	1.3800	1.6533
22	2.504	2.565	2.089	2.386	4.38×10^7	6.13×10^7	5.20×10^7	5.23×10^7	1.5600	1.5400	1.5000	1.5300
24	3.050	3.004	1.311	2.455	6.30×10^7	4.90×10^7	5.00×10^7	5.40×10^7	1.5200	1.6200	1.3600	1.5000

ตารางที่ ค-2.10 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella sp.* VB55

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.091	0.101	0.098	0.097	1.10×10^7	1.30×10^7	1.20×10^7	0.12×10^8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.419	0.375	0.410	0.401	2.80×10^7	2.60×10^7	2.80×10^7	0.28×10^8	0.1800	0.1800	0.2400	0.2000
4	1.062	0.958	1.052	1.024	1.88×10^8	1.76×10^8	1.86×10^8	1.84×10^8	0.2400	0.2400	0.2800	0.2533
6	1.308	1.188	1.201	1.232	3.33×10^8	2.06×10^8	2.95×10^8	2.78×10^8	0.6000	0.5000	0.5400	0.5500
8	1.770	1.758	1.748	1.759	3.49×10^8	3.42×10^8	3.38×10^8	3.43×10^8	0.6400	0.6800	0.6800	0.6667
10	2.296	2.348	2.300	2.315	4.25×10^8	4.76×10^8	4.22×10^8	4.41×10^8	0.6600	0.7400	0.7200	0.7067
12	2.778	2.742	2.759	2.760	4.92×10^8	5.67×10^8	4.85×10^8	5.15×10^8	1.0000	0.7800	0.8400	0.8733
14	3.241	3.430	3.288	3.320	6.57×10^8	6.36×10^8	6.50×10^8	6.48×10^8	1.1200	0.8200	0.9800	0.9733
16	4.392	4.280	4.235	4.302	8.48×10^8	8.76×10^8	8.48×10^8	8.58×10^8	1.3000	1.0000	1.2000	1.1700
18	5.175	5.022	5.092	5.096	9.61×10^8	9.43×10^8	9.63×10^8	9.59×10^8	1.3600	1.0600	1.2600	1.1667
20	5.208	5.156	5.197	5.187	9.86×10^8	9.69×10^8	9.97×10^8	9.93×10^8	1.4400	1.3900	1.1800	1.3367
22	5.025	5.013	5.013	5.046	9.56×10^8	9.81×10^8	9.85×10^8	9.74×10^8	1.0800	1.4200	1.3400	1.2800
24	5.176	5.076	5.076	5.098	9.72×10^8	9.90×10^8	9.84×10^8	9.82×10^8	1.3800	1.2200	1.2800	1.2933

ตารางที่ ค-2.11 สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสง) ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์ เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)									
	<i>Chlamydomonas</i> <i>sp.</i>	03	05	A	G	N	U	W	C	VB55
0	0.139	0.064	0.089	0.144	0.0846	0.143	0.161	0.135	0.059	0.097
2	0.359	0.162	0.151	0.447	0.416	0.279	0.500	0.237	0.264	0.401
4	0.557	0.295	0.449	0.995	0.917	0.305	1.056	0.536	0.490	1.024
6	0.867	0.735	0.762	1.263	1.214	0.372	1.421	0.851	0.599	1.232
8	1.094	1.140	0.963	1.556	1.610	0.998	1.511	1.045	0.828	1.759
10	1.670	1.332	1.130	1.779	2.120	1.136	1.844	1.300	1.030	2.315
12	2.497	1.738	1.357	2.102	2.504	1.418	2.208	1.762	1.203	2.760
14	2.646	2.099	1.771	2.207	3.213	1.731	2.518	1.684	1.420	3.320
16	3.060	2.230	2.032	2.330	3.982	2.099	2.630	2.063	1.601	4.302
18	3.838	2.420	2.080	2.437	4.643	2.473	2.888	2.409	2.229	5.096
20	4.252	2.559	2.163	2.620	5.456	2.431	3.628	2.479	2.353	5.187
22	4.477	2.483	2.170	2.531	5.363	2.488	3.505	2.386	2.200	5.046
24	4.588	2.511	2.153	2.500	5.386	2.488	3.768	2.455	2.200	5.098

ตารางที่ ค-2.12 สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญ (จำนวนเซลล์) ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์ เวลา	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)									
	<i>Chlamydomonas</i> sp.	03	05	A	G	N	U	W	C	VB55
0	5.50×10^6	2.04×10^7	1.23×10^7	9.00×10^6	5.42×10^6	4.00×10^6	1.12×10^7	4.20×10^5	5.00×10^5	1.20×10^7
2	2.72×10^7	3.17×10^7	1.46×10^7	2.60×10^7	5.69×10^7	2.13×10^7	1.68×10^7	5.17×10^6	7.50×10^5	2.80×10^7
4	6.73×10^7	5.37×10^7	5.60×10^7	8.00×10^7	1.49×10^8	2.79×10^7	8.73×10^7	1.53×10^7	5.67×10^6	1.84×10^8
6	9.65×10^7	1.11×10^8	1.16×10^8	1.42×10^8	1.79×10^8	5.16×10^7	1.59×10^8	3.27×10^7	8.25×10^6	2.78×10^8
8	1.48×10^8	1.19×10^8	1.73×10^8	1.49×10^8	2.62×10^8	7.97×10^7	1.66×10^8	3.33×10^7	1.28×10^7	3.43×10^8
10	2.06×10^8	1.32×10^8	2.49×10^8	1.59×10^8	3.27×10^8	1.08×10^8	1.71×10^8	3.88×10^7	2.13×10^7	4.41×10^8
12	2.55×10^8	1.41×10^8	2.92×10^8	1.77×10^8	3.89×10^8	1.48×10^8	1.21×10^8	4.51×10^7	2.16×10^7	5.15×10^8
14	2.68×10^8	1.48×10^8	3.37×10^8	1.85×10^8	5.45×10^8	1.81×10^8	1.83×10^8	4.86×10^7	2.25×10^7	6.48×10^8
16	2.79×10^8	1.80×10^8	4.06×10^8	1.91×10^8	5.94×10^8	1.99×10^8	2.02×10^8	5.23×10^7	2.39×10^7	8.58×10^8
18	3.28×10^8	1.91×10^8	4.13×10^8	1.95×10^8	6.37×10^8	2.24×10^8	2.18×10^8	5.24×10^7	2.58×10^7	9.59×10^8
20	3.29×10^8	2.00×10^8	4.14×10^8	2.02×10^8	7.20×10^8	2.33×10^8	2.31×10^8	5.24×10^7	2.58×10^7	9.93×10^8
22	3.57×10^8	2.01×10^8	4.13×10^8	1.97×10^8	7.31×10^8	2.36×10^8	2.09×10^8	5.23×10^7	2.50×10^7	9.74×10^8
24	9.82×10^8	1.90×10^8	1.22×10^8	1.90×10^8	7.39×10^8	2.36×10^8	1.22×10^8	2.01×10^8	2.50×10^7	9.82×10^8

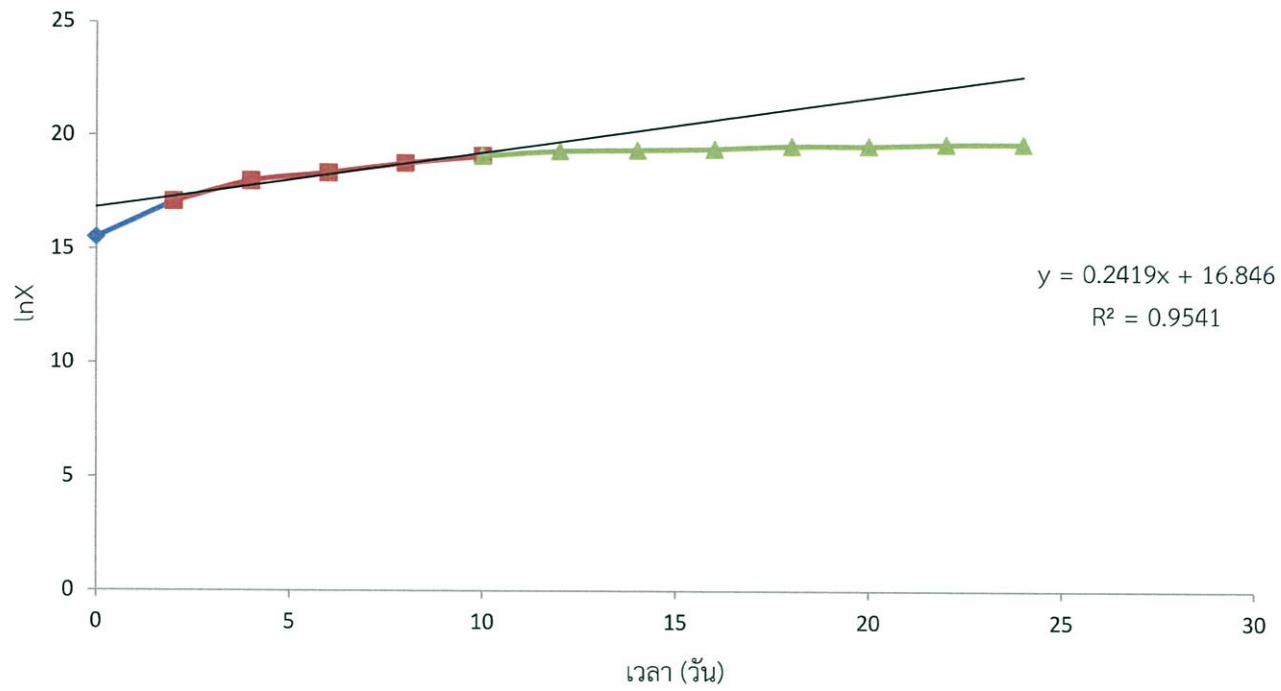
ตารางที่ ค-2.13 สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญ (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์ เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)									
	<i>Chlamydomonas sp.</i>	03	05	A	G	N	U	W	C	VB55
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.1400	0.0000	0.0670	0.0670	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0800	0.0533	0.0200	0.2570	0.1670	0.2800	0.2600	0.1800	0.0133	0.2000
4	0.1860	0.3000	0.0467	0.4030	0.2600	0.3333	0.4800	0.3600	0.4933	0.2533
6	0.3400	0.5533	0.0800	0.4630	0.3060	0.3933	0.6300	0.4200	1.0933	0.5500
8	0.4600	0.7000	0.0933	0.4800	0.6400	1.3260	0.7400	0.5000	1.9000	0.6600
10	0.5230	0.7267	0.4000	0.5600	0.6760	1.9000	0.9060	0.7000	2.1866	0.7067
12	0.5600	0.7733	0.8600	0.6400	0.8070	2.2400	0.9930	1.0200	2.5400	0.8700
14	0.6560	0.8867	0.9667	0.6600	0.9670	2.4333	1.1200	1.1600	2.6400	0.9733
16	1.0000	1.0000	1.0067	0.7530	1.0300	2.6070	1.326	1.5200	2.8133	1.1700
18	1.4400	1.2200	1.2133	0.8670	1.1670	2.6800	1.5433	1.6600	2.8933	1.2200
20	1.6030	1.3133	1.2000	0.9600	1.3330	2.7067	1.8600	1.6200	2.9733	1.3367
22	1.7800	1.3267	1.1867	1.0333	1.4333	2.7133	1.8100	1.5300	2.8600	1.2800
24	2.1000	1.3133	1.2133	1.0200	1.5070	2.7120	1.8533	1.5000	2.8600	1.2933

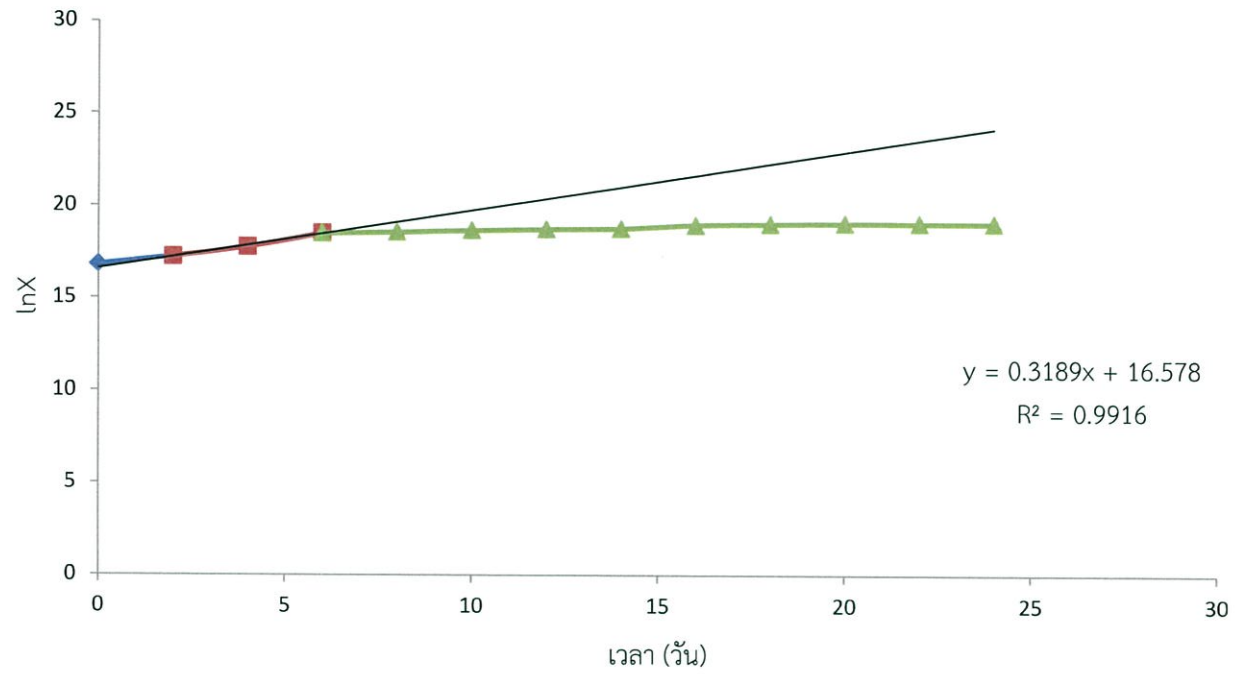
ตารางที่ ค-3 ค่าพารามิเตอร์ของค่าการดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ อัตราการเจริญจำเพาะในระยะลอการิทึมของสาหร่ายขนาดเล็ก

สายพันธุ์สาหร่าย	ก่อนวันที่เข้าสู่ระยะคงที่	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
<i>Chlamydomonas</i> sp.	18	3.838	3.28×10^8	1.4400	0.2419
<i>Chlorella</i> sp. 03	14	2.099	1.48×10^8	0.8900	0.3189
<i>Chlorella</i> sp. 05	16	2.032	4.06×10^8	1.0060	0.1730
<i>Chlorella</i> sp. A	18	2.437	1.95×10^8	0.8670	0.2122
<i>Chlorella</i> sp. G	18	4.643	6.37×10^8	1.1670	0.1660
<i>Chlorella</i> sp. N	16	2.099	1.99×10^8	2.6070	0.2038
<i>Chlorella</i> sp. U	18	2.888	2.18×10^8	1.5400	0.2632
<i>Scenedesmus</i> sp. C	16	1.601	2.39×10^7	2.8133	0.4347
<i>Scenedesmus</i> sp. W	18	2.409	5.24×10^7	1.6600	0.4597
<i>Chlorella</i> sp. VB55	16	4.302	8.58×10^8	1.1700	0.2485

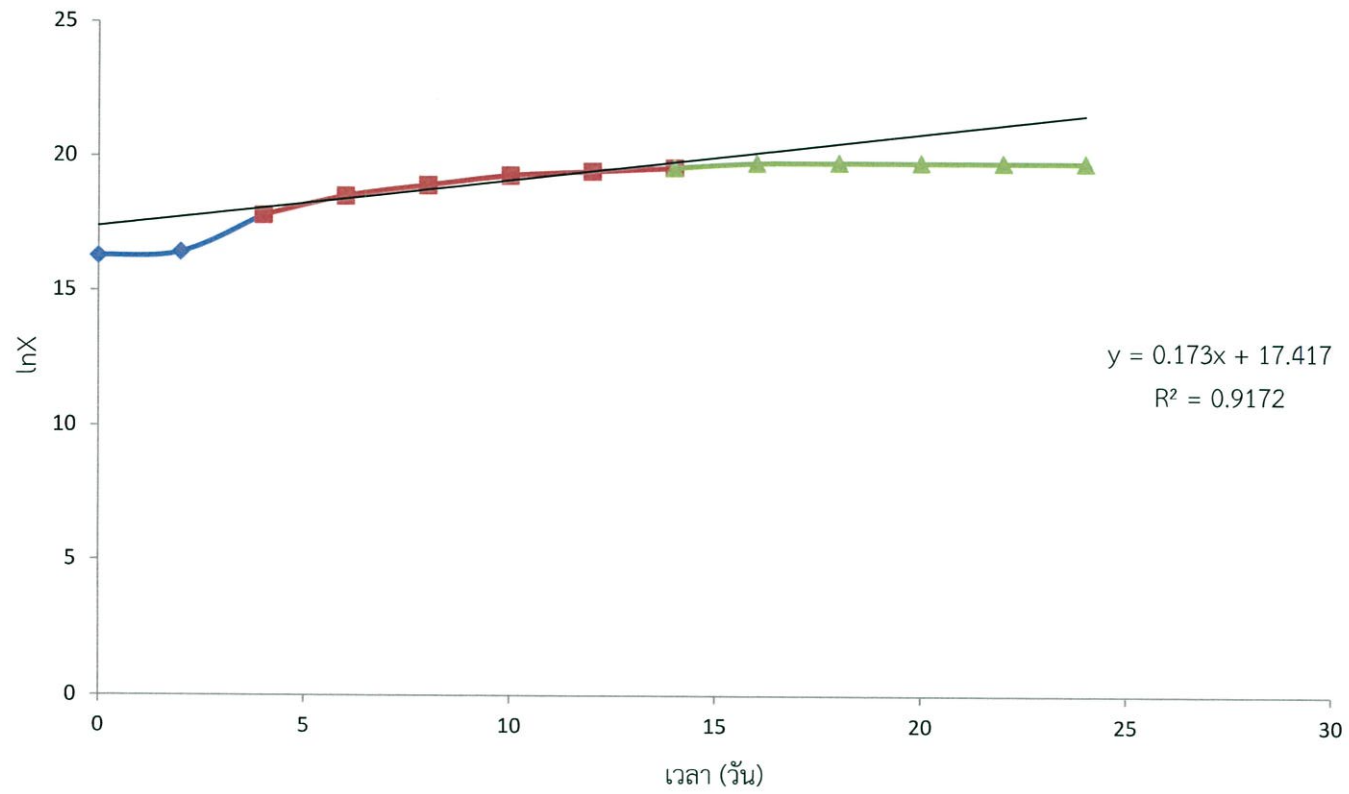
กราฟแสดงอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์



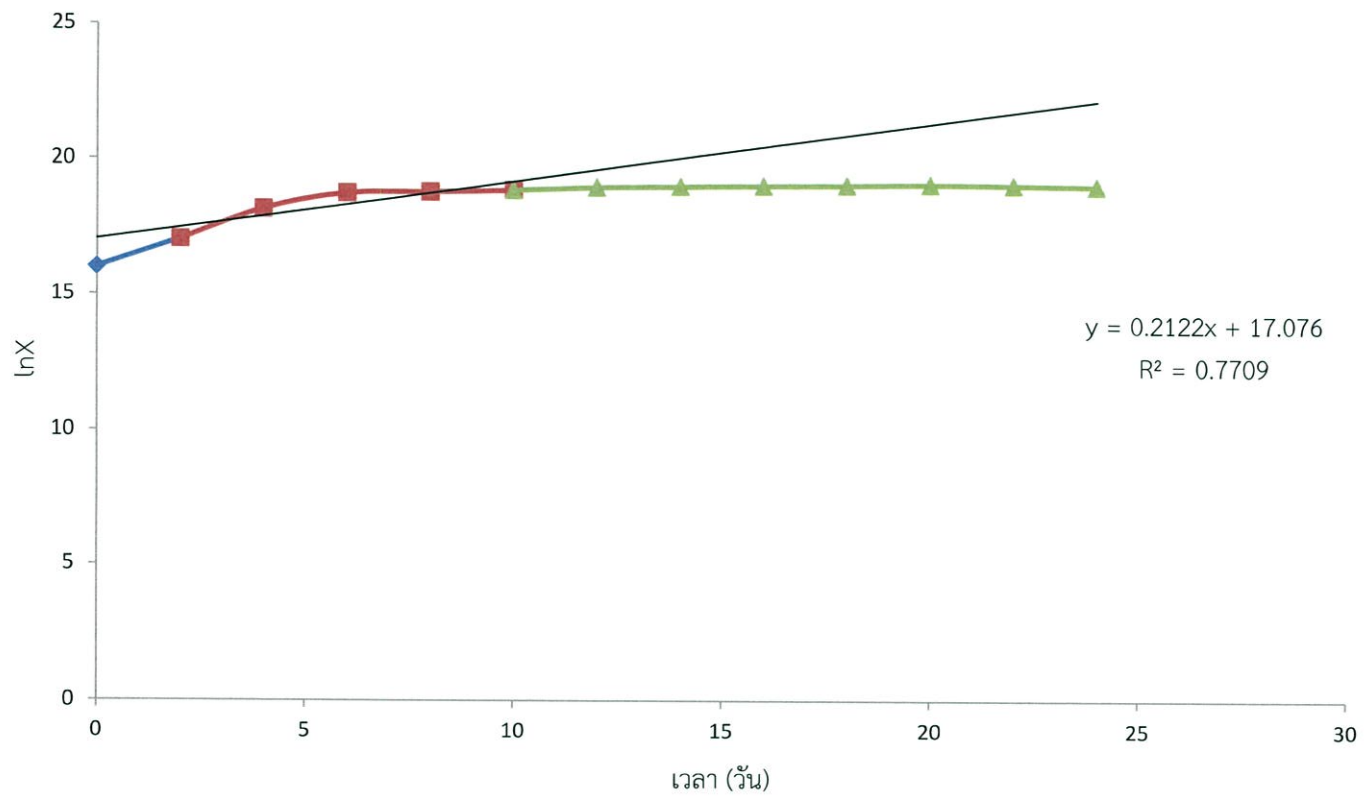
รูปที่ ค-3.1 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlamydomonas* sp.



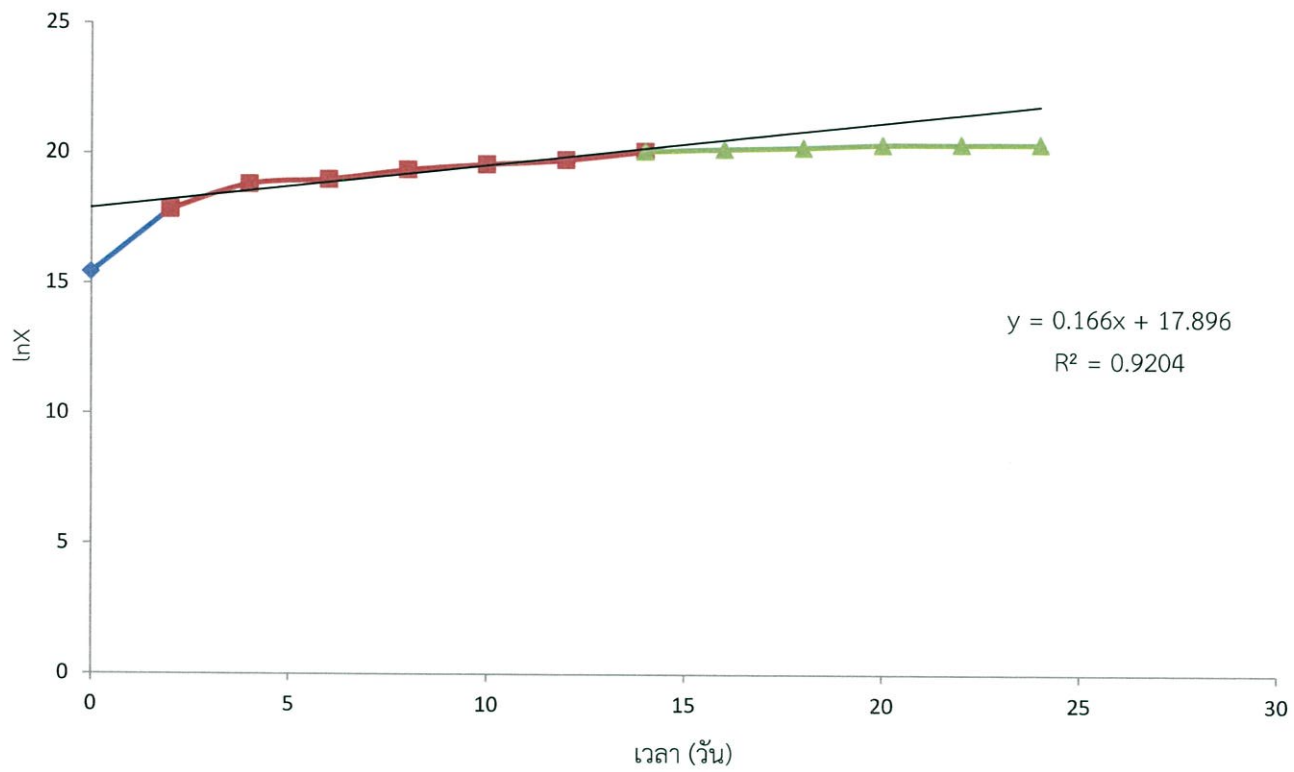
รูปที่ ค-3.2 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. 03



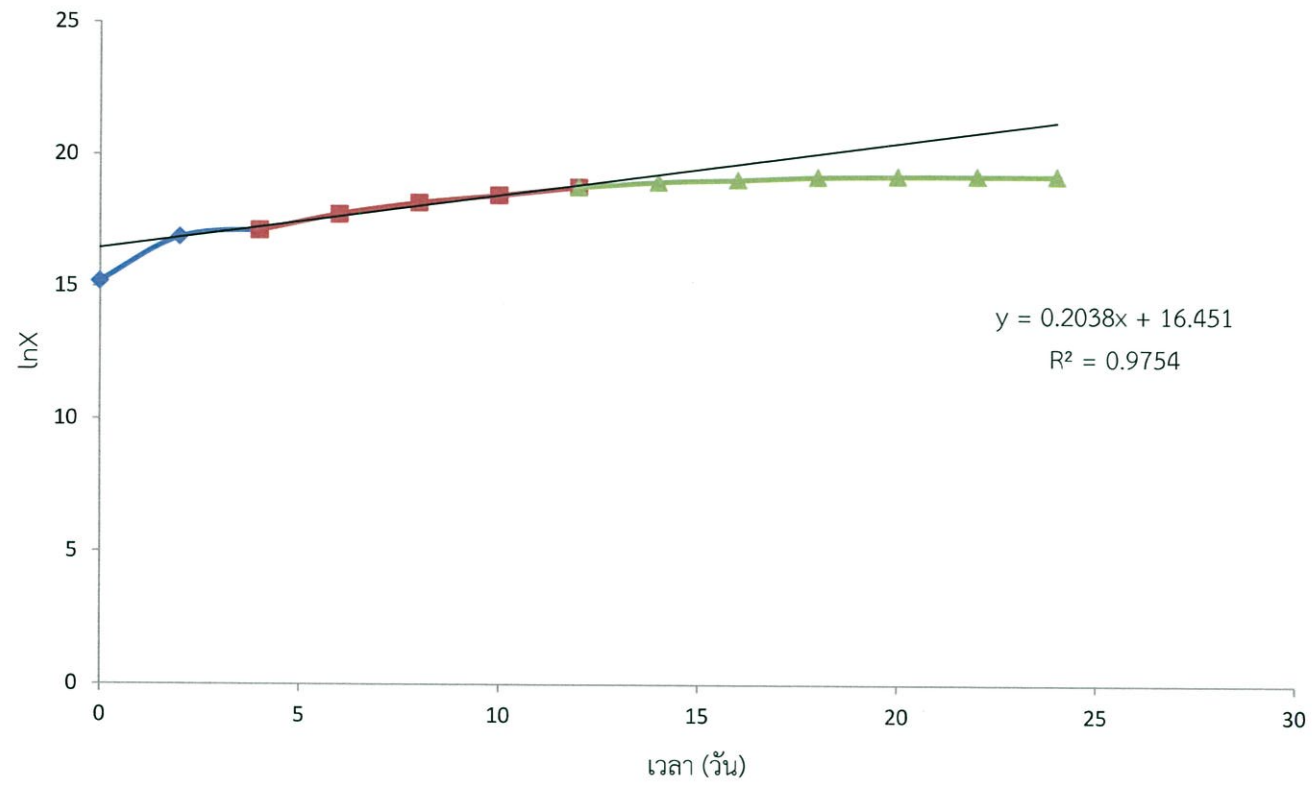
รูปที่ ค-3.3 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. 05



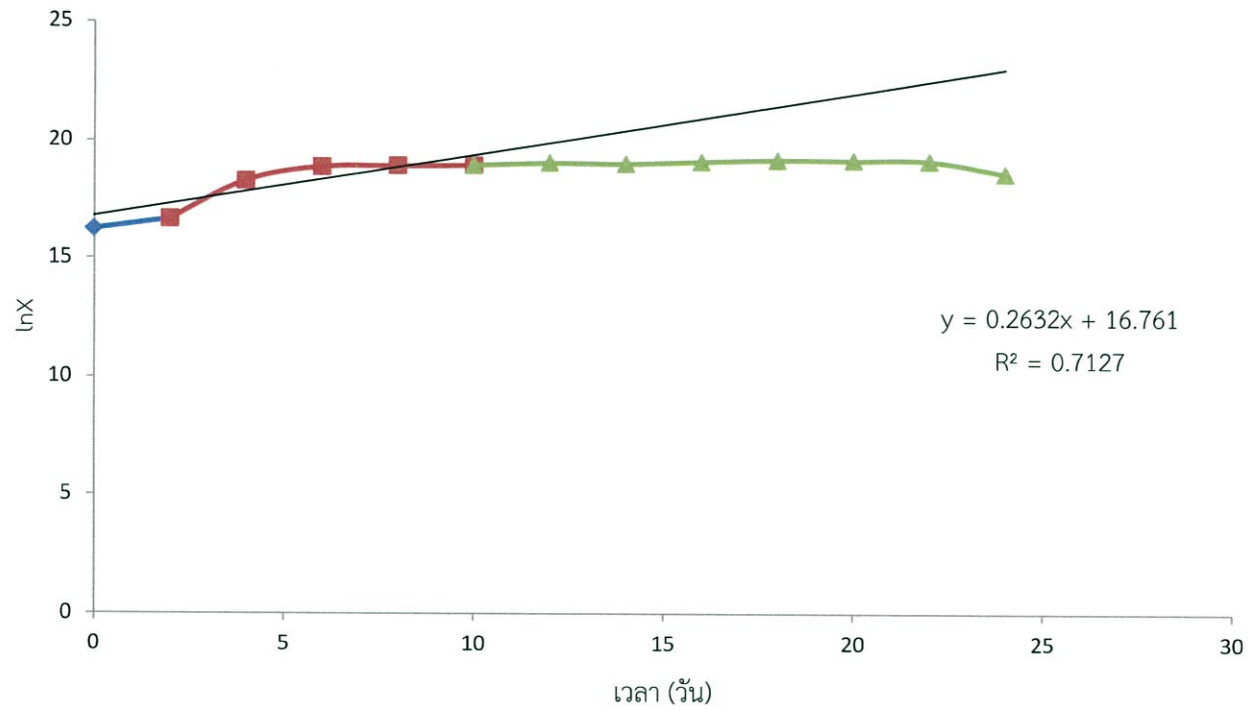
รูปที่ ค-3.4 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. A



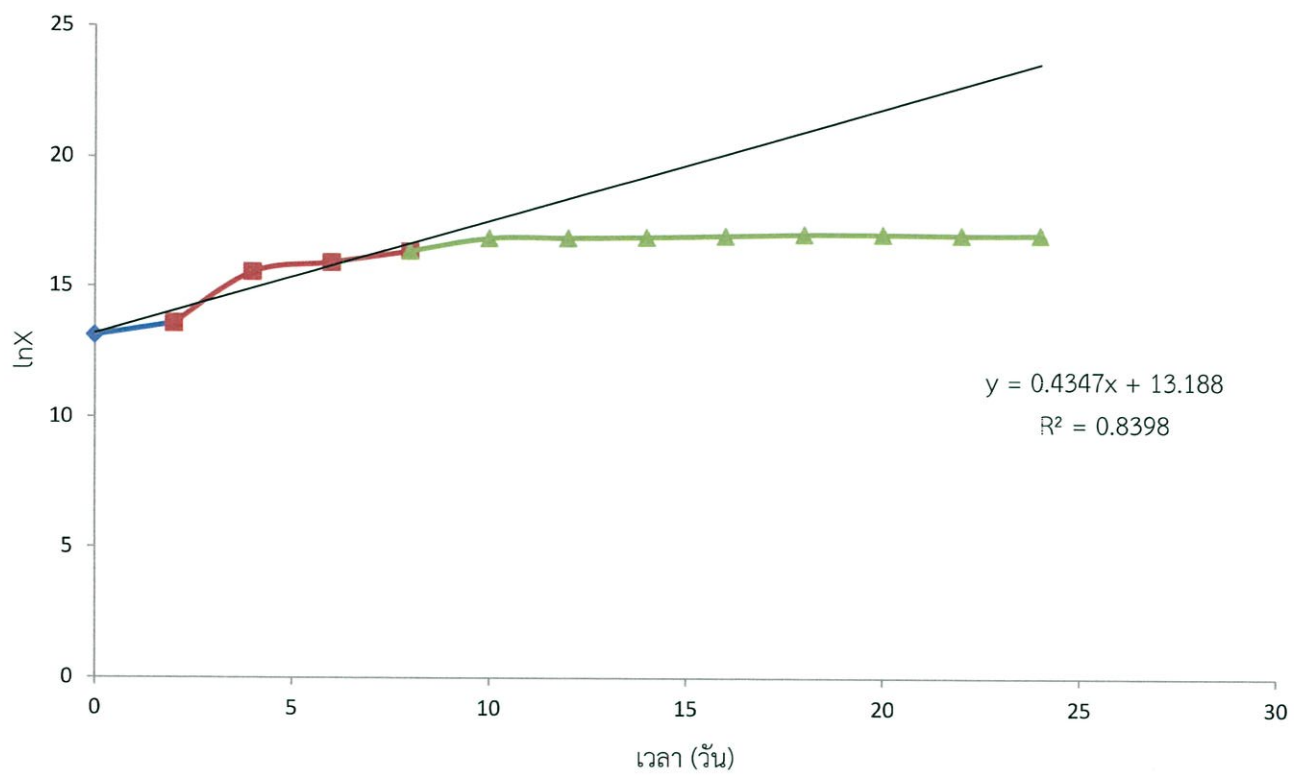
รูปที่ ค-3.5 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. G



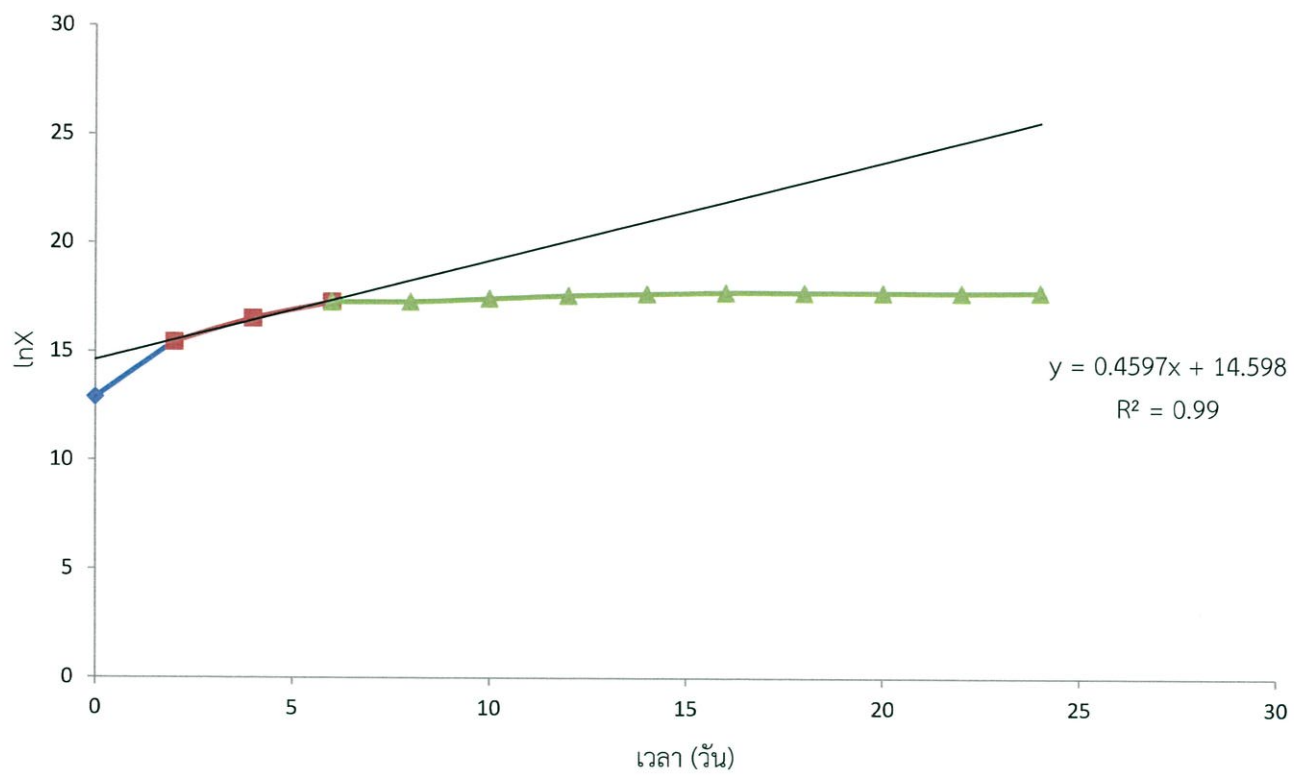
รูปที่ ค-3.6 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella sp. N*



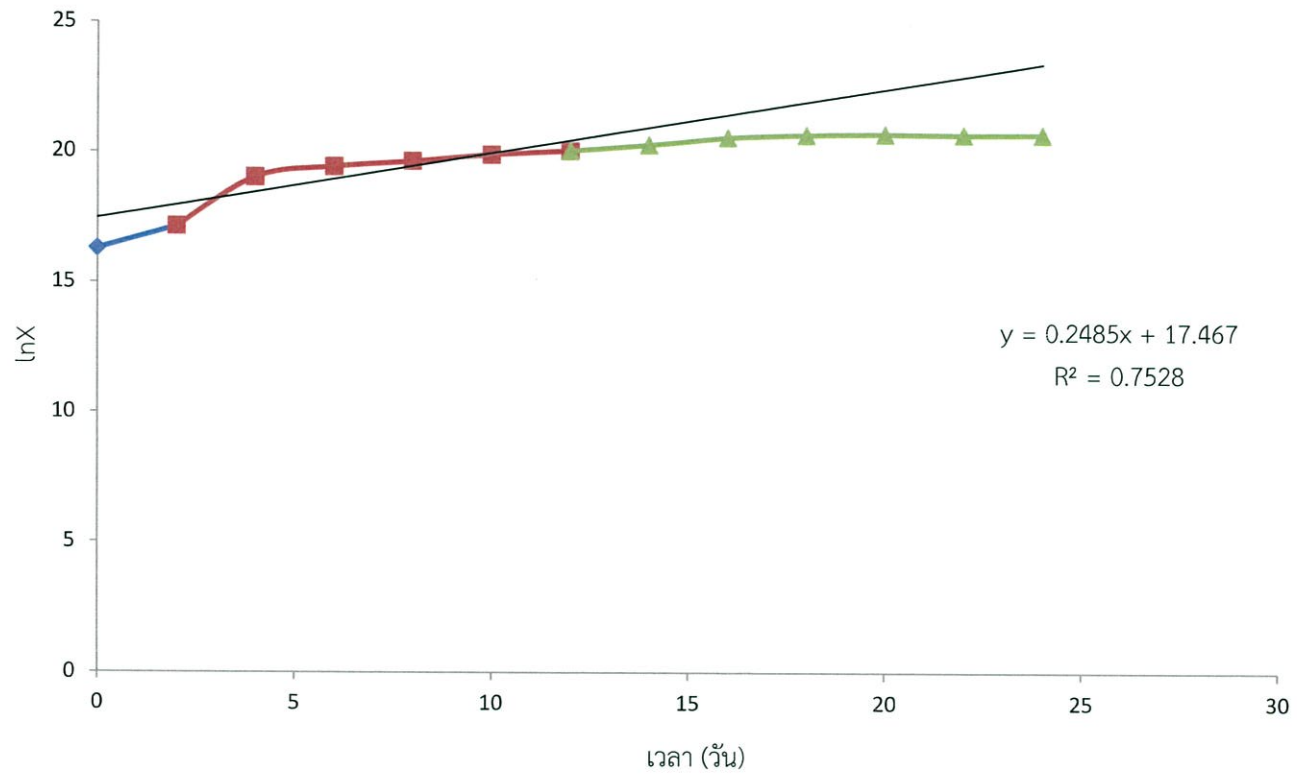
รูปที่ ค-3.7 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U



รูปที่ ค-3.8 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus sp. C*



รูปที่ ค-3.9 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus* sp. W



รูปที่ ค-3.10 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. VB55

ตารางที่ ค-4 ตารางแสดงผลปริมาณไขมันที่สกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

ตารางที่ ค-4.1 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วน
คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณไขมัน (กรัมต่อกรัมของชีวมวลแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
<i>Chlamydomonas</i> sp.	0.050	0.075	0.100	0.075
<i>Chlorella</i> sp. 03	0.100	0.100	0.100	0.100
<i>Chlorella</i> sp. 05	0.100	0.125	0.150	0.125
<i>Chlorella</i> sp. A	0.100	0.050	0.150	0.100
<i>Chlorella</i> sp. G	0.125	0.075	0.100	0.100
<i>Chlorella</i> sp. N	0.125	0.125	0.125	0.125
<i>Chlorella</i> sp. U	0.200	0.225	0.250	0.225
<i>Scenedesmus</i> sp. C	0.150	0.175	0.125	0.150
<i>Scenedesmus</i> sp. W	0.150	0.150	0.150	0.150
<i>Chlorella</i> sp. VB55	0.250	0.250	0.250	0.250

ตารางที่ ค-4.2 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วน
คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณไขมัน (กรัมต่อกรัมของชีวมวลแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
<i>Chlamydomonas</i> sp.	0.100	0.075	0.050	0.075
<i>Chlorella</i> sp. 03	0.100	0.100	0.075	0.092
<i>Chlorella</i> sp. 05	0.100	0.100	0.150	0.117
<i>Chlorella</i> sp. A	0.100	0.075	0.150	0.092
<i>Chlorella</i> sp. G	0.125	0.075	0.100	0.100
<i>Chlorella</i> sp. N	0.125	0.125	0.125	0.125
<i>Chlorella</i> sp. U	0.200	0.225	0.200	0.217
<i>Scenedesmus</i> sp. C	0.150	0.150	0.125	0.142
<i>Scenedesmus</i> sp. W	0.150	0.150	0.150	0.150
<i>Chlorella</i> sp. VB55	0.250	0.250	0.250	0.250

ตารางที่ ค-5 ผลการศึกษาระยะเวลาเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 ที่ทำการเพาะเลี้ยง
ระดับ 5 ลิตร

ตารางที่ ค-5.1 ระยะเวลาเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. U

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.202	0.154	0.160	0.172	9.02×10^6	8.05×10^6	9.00×10^6	0.09×10^8	0.0200	0.0400	0.0400	0.0333
2	0.400	0.408	0.400	0.403	2.00×10^7	1.89×10^7	1.80×10^7	0.19×10^8	0.2200	0.2000	0.2600	0.2267
4	1.120	1.135	1.189	1.148	9.80×10^7	9.00×10^7	9.20×10^7	0.93×10^8	0.4800	0.4000	0.4800	0.4533
6	1.400	1.412	1.450	1.421	2.00×10^8	1.50×10^8	1.90×10^8	1.80×10^8	0.6800	0.6000	0.6200	0.6333
8	1.645	1.599	1.520	1.588	2.20×10^8	1.80×10^8	2.00×10^8	2.00×10^8	0.7600	0.7000	0.7000	0.7200
10	1.946	1.820	1.800	1.855	2.00×10^8	2.00×10^8	1.90×10^8	1.96×10^8	0.9600	0.8400	0.9000	0.9000
12	2.100	2.080	2.200	2.127	2.40×10^8	2.20×10^8	2.00×10^8	2.20×10^8	1.0000	0.9800	1.0000	0.9933
14	2.450	2.500	2.404	2.451	2.00×10^8	2.20×10^8	2.00×10^8	2.07×10^8	1.2000	1.0400	1.2000	1.1467
16	2.652	2.580	2.600	2.611	2.20×10^8	2.20×10^8	2.20×10^8	2.20×10^8	1.4000	1.2200	1.4200	1.3467

ตารางที่ ค-5.1 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella sp.* U (ต่อ)

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
18	2.944	2.995	2.990	2.976	2.40×10^8	2.40×10^8	2.20×10^8	2.33×10^8	1.8600	1.8000	1.7000	1.7867
20	3.200	3.431	3.086	3.239	2.40×10^8	2.40×10^8	2.40×10^8	2.40×10^8	2.0000	1.8000	2.1000	1.9667
22	3.490	4.040	3.022	3.517	2.50×10^8	3.00×10^8	2.00×10^8	2.50×10^8	2.0220	2.1200	2.0000	2.0473
24	3.400	4.102	3.201	3.568	2.80×10^8	3.00×10^8	2.20×10^8	2.67×10^8	2.1000	2.1000	2.0000	2.0667

ตารางที่ ค-5.2 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. VB55

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.100	0.154	0.129	0.128	1.40×10^7	1.50×10^7	1.30×10^7	0.14×10^8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.380	0.444	0.420	0.415	2.00×10^7	2.20×10^7	2.20×10^7	0.21×10^8	0.1000	0.1000	0.2000	0.1333
4	1.100	1.020	1.080	1.067	1.40×10^8	1.60×10^8	2.00×10^8	1.67×10^8	0.3600	0.2800	0.3000	0.3133
6	1.389	1.212	1.200	1.270	3.56×10^8	2.42×10^8	3.00×10^8	2.99×10^8	0.6000	0.6200	0.6000	0.6067
8	1.809	1.800	1.780	1.796	3.80×10^8	3.20×10^8	3.60×10^8	3.53×10^8	0.6200	0.7000	0.7200	0.6800
10	2.156	2.304	2.404	2.288	4.45×10^8	4.00×10^8	4.60×10^8	4.35×10^8	0.8200	0.7600	0.7400	0.7733
12	2.689	2.700	2.732	2.707	4.92×10^8	5.40×10^8	5.52×10^8	5.44×10^8	1.0200	0.9800	0.9000	0.8700
14	3.403	3.478	3.396	3.426	5.34×10^8	6.60×10^8	6.50×10^8	6.15×10^8	1.2000	1.2000	1.0000	1.1333
16	4.376	4.200	4.417	4.331	8.20×10^8	8.55×10^8	8.80×10^8	8.52×10^8	1.4200	1.2200	1.2000	1.2800
18	5.004	5.126	5.110	5.080	9.60×10^8	9.60×10^8	9.75×10^8	9.65×10^8	1.4600	1.2600	1.2600	1.3267
20	5.222	5.200	5.289	5.237	9.80×10^8	9.77×10^8	9.99×10^8	9.85×10^8	1.5600	1.6400	1.3000	1.5000

ตารางที่ ค-5.2 ระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. VB55 (ต่อ)

เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)				จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
22	5.118	5.280	5.321	5.240	9.80×10^8	9.80×10^8	9.90×10^8	9.83×10^8	1.6000	1.6000	1.4000	1.5333
24	5.156	5.200	5.287	5.214	9.90×10^8	9.90×10^8	9.72×10^8	9.87×10^8	1.6200	1.6000	1.6400	1.6200

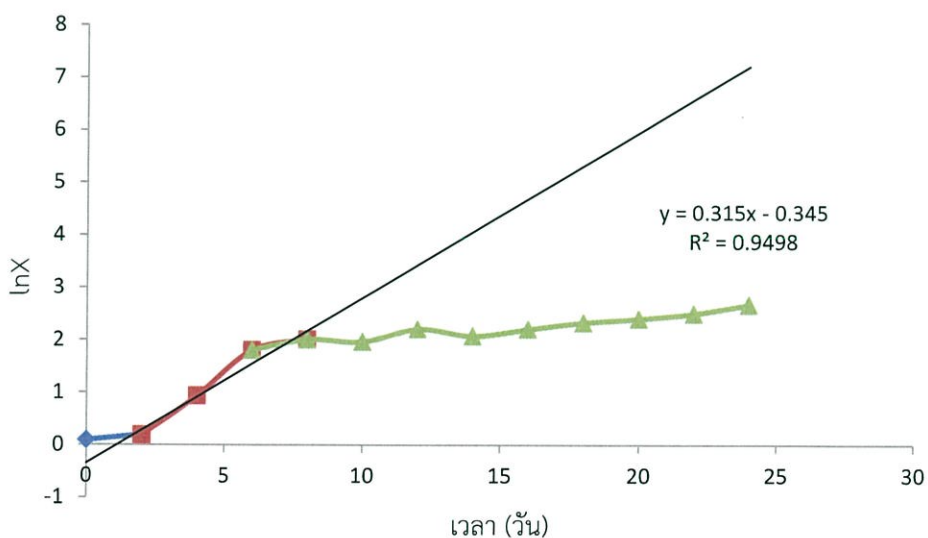
ตารางที่ ค-5.3 สรุปผลการศึกษาระยะการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55 ที่ทำการเพาะเลี้ยงระดับ 5 ลิตร

สายพันธุ์ เวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)		จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	<i>Chlorella</i> sp. U	<i>Chlorella</i> sp . VB55	<i>Chlorella</i> sp. U	<i>Chlorella</i> sp. VB55	<i>Chlorella</i> sp. U	<i>Chlorella</i> sp . VB55
0	0.172	0.128	0.09×10^8	0.14×10^8	0.0333	0.0000
2	0.403	0.415	0.19×10^8	0.21×10^8	0.2267	0.2000
4	1.148	1.067	0.93×10^8	1.67×10^8	0.4533	0.2500
6	1.421	1.270	1.80×10^8	2.99×10^8	0.6333	0.5500
8	1.588	1.796	2.00×10^8	3.53×10^8	0.7200	0.6600
10	1.855	2.288	1.96×10^8	4.35×10^8	0.9000	0.7000
12	2.127	2.707	2.20×10^8	5.44×10^8	0.9933	0.8700
14	2.451	3.426	2.07×10^8	6.15×10^8	1.1467	0.9700
16	2.611	4.331	2.20×10^8	8.52×10^8	1.3467	1.1700
18	2.976	5.080	2.33×10^8	9.65×10^8	1.7867	1.2200
20	3.239	5.237	2.40×10^8	9.85×10^8	1.9667	1.3400
22	3.517	5.240	2.50×10^8	9.83×10^8	2.0473	1.5333
24	3.568	5.214	2.67×10^8	9.87×10^8	2.0667	1.6200

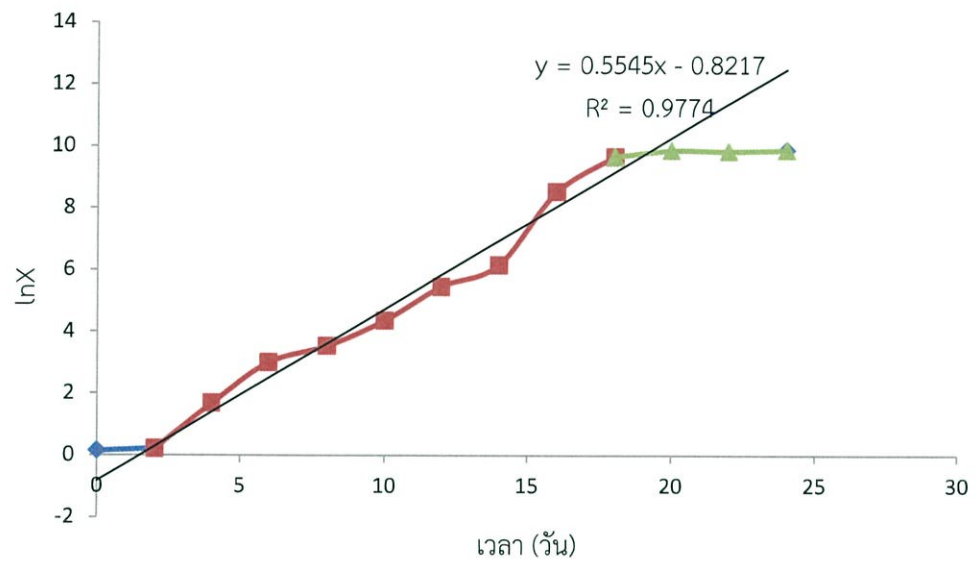
ตารางที่ ค-6 ค่าพารามิเตอร์ของค่าการดูดกลืนแสง จำนวนเซลล์ น้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโต จำเพาะในระยะเวลาการที่มของสาหร่ายขนาดเล็กของการสาหร่ายที่สามารถสะสมไขมันมากที่สุด

สายพันธุ์สาหร่าย	ก่อนวันที่เข้าสู่ระยะคงที่	ค่าการดูดกลืนแสง (560 นาโนเมตร)	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อวัน)
<i>Chlorella sp. U</i>	18	2.888	2.18×10^8	1.5400	0.3150
<i>Chlorella sp. VB55</i>	16	4.302	8.58×10^8	1.1700	0.5545

กราฟแสดงอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ที่สามารถสะสมไขมันมากที่สุด



รูปที่ ค-6.1 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella sp. U*



รูปที่ ค-6.2 อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. VB55

ตารางที่ ค-7 องค์ประกอบภายในเซลล์

ตารางที่ ค-7.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

สายพันธุ์	ร้อยละโปรตีน			
	1	2	3	เฉลี่ย
<i>Chlorella</i> sp. U	9.23	9.42	9.57	9.41
<i>Chlorella</i> sp. VB55	10.28	10.34	10.39	10.34

ตารางที่ ค-7.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

สายพันธุ์	ไขมัน (กรัมต่อกรัมเซลล์ของชีวมวลแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
<i>Chlorella</i> sp. U	0.200	0.225	0.250	0.225
<i>Chlorella</i> sp. VB55	0.250	0.250	0.250	0.250

ตารางที่ ค-7.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

สายพันธุ์	ร้อยละของคาร์โบไฮเดรต			
	1	2	3	เฉลี่ย
<i>Chlorella</i> sp. U	62.79	59.32	57.45	59.85
<i>Chlorella</i> sp. VB55	53.29	53.11	53.35	53.25

ตารางที่ ค-7.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

สายพันธุ์	ความชื้น (กรัมต่อกรัมเซลล์ของชีวมวลแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
<i>Chlorella</i> sp. U	0.0273	0.0286	0.0288	0.0282
<i>Chlorella</i> sp. VB55	0.0523	0.0545	0.0514	0.0527

ตารางที่ ค-7.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

สายพันธุ์	เถ้า (กรัมต่อกรัมเซลล์ของชีวมวลแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
<i>Chlorella</i> sp. U	0.0525	0.0590	0.0510	0.0542
<i>Chlorella</i> sp. VB55	0.0620	0.0610	0.0612	0.0614



บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

สาขากรุงเทพฯ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
 Bangkok Branch 50 Phaholyothin Rd. Ladd Yao Bangkok Bangkok 10900 Thailand
 Tel: (662) 561 4387-8 (662) 940 6881-3 Ext: 104, 219 Fax: (662) 579 4895 (662) 940 6881-3 Ext: 209
 http://www.centralabthai.com

Central Lab
 One Stop Laboratory

วันที่ออก : 13 มิถุนายน 2559

เลขที่รายงาน : TRBK59/19684

หน้า : 1 / 2

ใบรายงานผลการทดสอบ

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
รายละเอียดตัวอย่าง	U (U) - สหรัยขนาดเด็ก
รหัสตัวอย่าง	BK59/11483-001
ลักษณะและสภาพตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง : สหรัยขนาดเด็ก ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก (ถุงซิปล็อค), จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 17 กรัม. อุณหภูมิ : อุณหภูมิห้อง, สภาพตัวอย่างปกติ
วันที่รับตัวอย่าง	02 มิถุนายน 2559
วันที่ทดสอบ	03 มิถุนายน 2559 - 11 มิถุนายน 2559

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Omega-3				
Omega-3	1901.24	mg/100g	-	In-house method TE-CH-208 based on AOAC (2012) 996.06
alpha-Linolenic acid (C18:3n3)	1901.24	mg/100g	-	
cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid (C20:3n3)	Not Detected	mg/100g	10	
4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	Not Detected	mg/100g	10	
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)	Not Detected	mg/100g	10	
Omega-6				
Cis-9,12-Linoleic acid (C18:2n6)	2979.49	mg/100g	-	In-house method TE-CH-208 based on AOAC (2012) 996.06
gamma-Linolenic acid (C18:3n6)	Not Detected	mg/100g	10	
Cis-8,11,17-Eicosatrienoic acid (20:3n6)	Not Detected	mg/100g	10	
Arachidonic acid (20:4n6)	Not Detected	mg/100g	10	
Omega-6	2979.49	mg/100g	-	
Omega-9				
cis-9-Oleic acid (C18:1n9c)	161.74	mg/100g	-	In-house method TE-CH-208 based on AOAC (2012) 996.06

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น

รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำสำเนาเฉพาะเพียงบางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นทำทั้งฉบับ
 FM-QP-24-01-001-R02(21/08/51)P1/2



บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

สาขากรุงเทพฯ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
 Bangkok Branch 50 Phaholyothin Rd. Ladd Yao, Jitujok Bangkok 10900 Thailand
 Tel. (662) 561-4387-8 (662) 940-6881-3 Ext. 164, 218 Fax: (662) 579-4895 (662) 940-6881-3 Ext. 209
 http://www.centralabthai.com

Central Lab
 (Thailand) Co. Ltd.

วันที่ออก : 13 มิถุนายน 2559

เลขที่รายงาน : TRBK59/19684

หน้า : 2 / 2

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Erucic acid (C24:1n9)	Not Detected	mg/100g	10	
Nervonic acid (C24:1n9)	Not Detected	mg/100g	10	
Omega-9	161.74	mg/100g	-	

อนุมัติผลโดย

 (นวนนวัน ศรีเรือง)

ลงนามแทนผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการ
 CERASIA กรุงเทพมหานคร

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น

รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำซ้ำเฉพาะเพียงบางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นทำทั้งฉบับ
 FM-QP-24-01-001-R02(21/08/51)P2/2



บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

สาขากรุงเทพฯ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงสามยุคฯ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
 Bangkok Branch 50 Phaholyothin Rd. Ladsao, Jatujak Bangkok 10900 Thailand
 Tel. (662) 661-4387-8. (662) 940-8881-3 Ext. 164, 218 Fax: (662) 679-4895. (662) 940-8881-3 Ext. 209
 http://www.centralabthai.com

Central Lab
 02-661-4387

วันที่ออก : 13 มิถุนายน 2559

เลขที่รายงาน : TRBK59/19685

หน้า : 1 / 2

ใบรายงานผลการทดสอบ

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
รายละเอียดตัวอย่าง	VB55 - สาหร่ายขนาดเล็ก
รหัสตัวอย่าง	BK59/11483-002
ลักษณะและสภาพตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง : สาหร่ายขนาดเล็ก ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก (ถุงzip), จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 17 กรัม. อุณหภูมิ : อุณหภูมิห้อง, สภาพตัวอย่างปกติ
วันที่รับตัวอย่าง	02 มิถุนายน 2559
วันที่ทดสอบ	03 มิถุนายน 2559 - 11 มิถุนายน 2559

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Omega-3				
Omega-3	365.87	mg/100g	-	In-house method TE-CH-208 based on AOAC (2012) 996.06
alpha-Linolenic acid (C18:3n3)	365.87	mg/100g	-	
cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid (C20:3n3)	Not Detected	mg/100g	10	
4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid(C22:6n3)	Not Detected	mg/100g	10	
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid(C20:5n3)	Not Detected	mg/100g	10	
Omega-6				
Cis-9,12-Linoleic acid (C18:2n6)	3982.30	mg/100g	-	In-house method TE-CH-208 based on AOAC (2012) 996.06
gamma-Linolenic acid (C18:3n6)	Not Detected	mg/100g	10	
Cis-8,11,17-Eicosatrienoic acid (20:3n6)	Not Detected	mg/100g	10	
Arachidonic acid (20:4n6)	Not Detected	mg/100g	10	
Omega-6	3982.30	mg/100g	-	
Omega-9				
cis-9-Oleic acid (C18:1n9c)	535.68	mg/100g	-	In-house method TE-CH-208 based on AOAC (2012) 996.06

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น

รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำซ้ำและเผยแพร่บางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นที่ทั้งฉบับ
 FM-QP-24-01-001-R02(21/08/51)P1/2



บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

สาขากรุงเทพฯ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
 Bangkok Branch 50 Phaholyothin Rd. Ladd Yao, Jitujak, Bangkok 10900 Thailand
 Tel: (662) 561-4387-8 (662) 940-6881-3 Ext. 164, 218 Fax: (662) 579-4895 (662) 940-6881-3 Ext. 209
 http://www.centralabthai.com

Central Lab
 01-021-1111-1111

วันที่ออก : 13 มิถุนายน 2559

เลขที่รายงาน : TRBK59/19685

หน้า : 2 / 2

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Erucic acid (C24:1n9)	Not Detected	mg/100g	10	
Nervonic acid (C24:1n9)	Not Detected	mg/100g	10	
Omega-9	535.68	mg/100g	-	

อนุมัติผลโดย

 (นายณัฐพงศ์ ศรีเรือง)

ลงนามแทนผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการ
 CER สาขากรุงเทพฯ

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น

รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำสำเนาเฉพาะเพียงบางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นทำทั้งฉบับ
 FM-QP-24-01-001-R02(21/08/51)P2/2

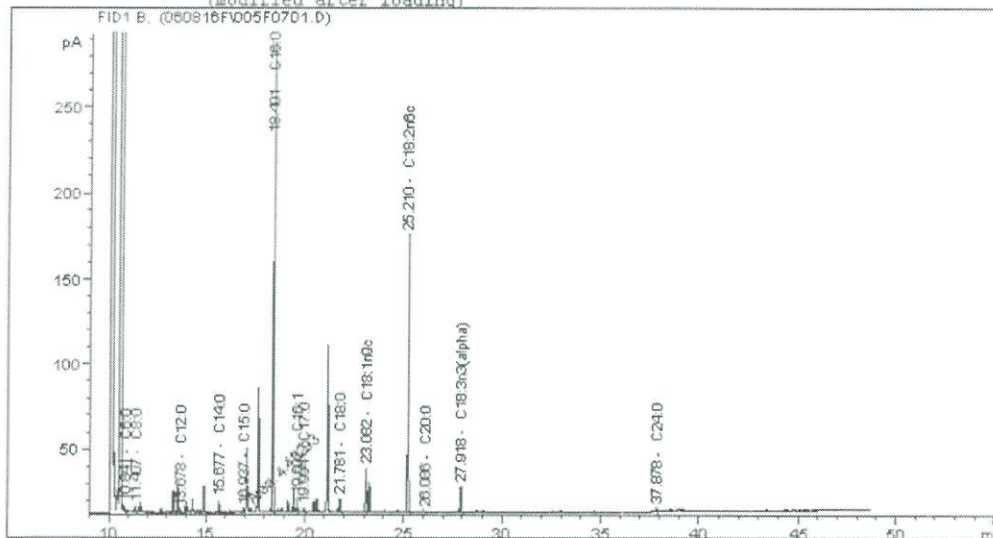
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\060816F\005F0701.D

Sample Name: 59/11483-002

```

=====
Injection Date : 6/8/2016 9:28:17 PM          Seq. Line : 7
Sample Name    : 59/11483-002                 Location  : Vial 5
Acq. Operator  : Kobbkun Kasemsamran          Inj      : 1
Acq. Instrument: GCI-02                       Inj Volume: 1 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\SAT UN.M\SAT CT.M
Last changed   : 6/8/2016 10:56:33 AM by Kobbkun Kasemsamran
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\SAT UN.M\060816F.M
Last changed   : 6/9/2016 8:01:36 PM by Kobbkun Kasemsamran
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Simal
Calib. Data Modified : 6/9/2016 6:12:54 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	10.498		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	10.841	VP	0.0363	4.83903	0.27295	C6:0
3	11.407	BP	0.0335	7.51928	0.42413	C8:0
4	12.294		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	12.922		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	13.676	VV	0.0412	2.28192	0.12871	C12:0
7	14.608		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	15.677	VE	0.0403	18.28122	1.03116	C14:0
9	16.841		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	16.937	FM	0.0437	4.43293	0.25004	C15:0
11	18.255		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1
12	18.401	BE	0.0488	867.95929	48.95763	C16:0
13	19.602	BE	0.0475	22.71345	1.28116	C16:1

GCI-02 6/9/2016 8:08:25 PM Kobbkun Kasemsamran

Page 1 of 2

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\060816F\005F0701.D

Sample Name: 59/11483-002

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
14	19.994	VP	0.0478	6.49196	0.36618	C17:0
15	21.340		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1
16	21.781	VB	0.0514	25.24067	1.42371	C18:0
17	22.676		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9t
18	23.082	VV	0.0546	88.29403	4.98026	C18:1n9c
19	24.148		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6t
20	25.210	EB	0.0633	656.59790	37.03569	C18:2n6c
21	26.086	BP	0.0672	2.59112	0.14615	C20:0
22	26.944		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6 (gamma)
23	27.678		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	27.918	EV	0.0656	60.34952	3.40404	C18:3n3 (alpha)
25	28.684		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	30.244		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	31.526		0.0000	0.00000	0.00000	C22:0
28	32.294		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n6
29	33.318		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	33.467		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	33.961		0.0000	0.00000	0.00000	C20:4n6
32	34.632		0.0000	0.00000	0.00000	C23:0
33	36.317		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	37.692		0.0000	0.00000	0.00000	C20:5n3 (EPA)
35	37.878	BV	0.0620	5.28630	0.29818	C24:0
36	39.354		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1
37	44.694		0.0000	0.00000	0.00000	C22:6n3 (DHA)

Totals : 1772.87862

Results obtained with enhanced integrator!
 2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
 Warning : Calibrated compound(s) not found

 *** End of Report ***

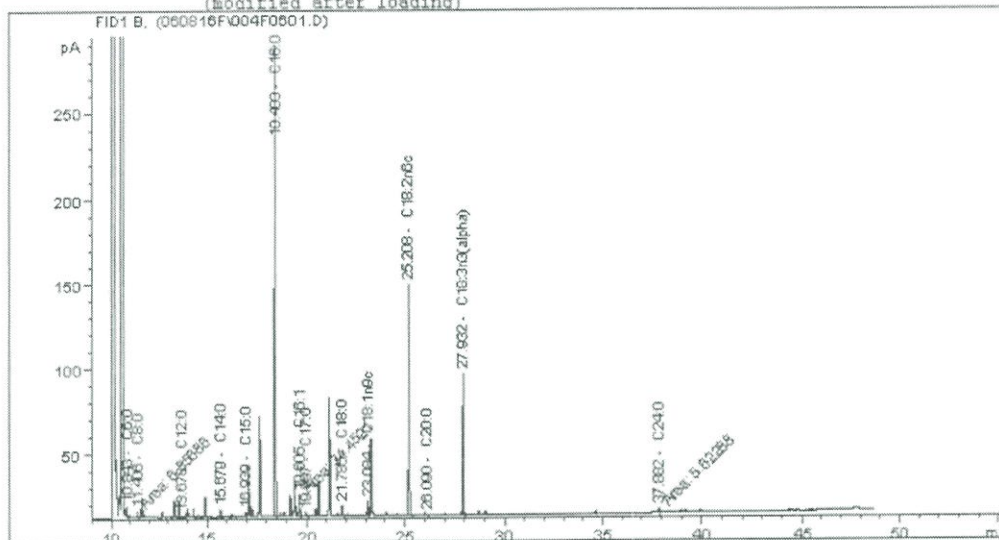
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\060816F\004F0601.D

Sample Name: 59/11483-001

```

=====
Injection Date : 6/8/2016 8:31:50 PM          Seq. Line :    6
Sample Name    : 59/11483-001                 Location  : Vial 4
Acq. Operator  : Kobbkun Kasemsamran          Inj      :    1
Acq. Instrument: GCI-02                       Inj Volume: 1 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\SAT UN.M\SAT CT.M
Last changed   : 6/8/2016 10:56:33 AM by Kobbkun Kasemsamran
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\SAT UN.M\060816F.M
Last changed   : 6/9/2016 8:01:36 PM by Kobbkun Kasemsamran
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 6/9/2016 6:12:54 PM
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	10.498		0.0000	0.00000	0.00000	C4:0
2	10.843	VP	0.0364	10.18280	0.53657	C6:0
3	11.406	FM	0.0353	6.85686	0.36132	C8:0
4	12.294		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
5	12.922		0.0000	0.00000	0.00000	C11:0
6	13.678	VV	0.0402	2.66530	0.14045	C12:0
7	14.608		0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
8	15.679	VP	0.0422	10.82321	0.57032	C14:0
9	16.841		0.0000	0.00000	0.00000	C14:1
10	16.939	PV	0.0437	6.71885	0.35404	C15:0
11	18.255		0.0000	0.00000	0.00000	C15:1
12	18.403	BE	0.0493	878.91144	46.31338	C16:0
13	19.605	HM	0.0500	34.45206	1.81542	C16:1

GCI-02 6/9/2016 8:04:26 PM Kobbkun Kasemsamran

Page 1 of 2

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\060816F\004F0601.D

Sample Name: 59/11483-001

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
14	19.997	VV	0.0515	5.49509	0.28956	C17:0
15	21.340		0.0000	0.00000	0.00000	C17:1
16	21.785	BE	0.0504	20.45027	1.07761	C18:0
17	22.676		0.0000	0.00000	0.00000	C18:1n9c
18	23.084	VP	0.0550	29.23693	1.54061	C18:1n9c
19	24.148		0.0000	0.00000	0.00000	C18:2n6c
20	25.208	BE	0.0623	538.74097	28.38843	C18:2n6c
21	26.090	BE	0.0716	3.67206	0.19350	C20:0
22	26.944		0.0000	0.00000	0.00000	C18:3n6 (gamma)
23	27.678		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1n11
24	27.932	BV	0.0644	343.91986	18.12252	C18:3n3(alpha)
25	28.684		0.0000	0.00000	0.00000	C21:0
26	30.244		0.0000	0.00000	0.00000	C20:2
27	31.526		0.0000	0.00000	0.00000	C22:0
28	32.294		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n6
29	33.318		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1n9
30	33.467		0.0000	0.00000	0.00000	C20:3n3
31	33.961		0.0000	0.00000	0.00000	C20:4n6
32	34.632		0.0000	0.00000	0.00000	C23:0
33	36.317		0.0000	0.00000	0.00000	C22:2
34	37.692		0.0000	0.00000	0.00000	C20:5n3(EPA)
35	37.882	MF	0.0640	5.62288	0.29629	C24:0
36	39.354		0.0000	0.00000	0.00000	C24:1
37	44.694		0.0000	0.00000	0.00000	C22:6n3(DHA)

Totals : 1897.74860

Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found*****
*** End of Report ***

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์คือ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. 03, *Chlorella* sp. 05, *Chlorella* sp. A, *Chlorella* sp. G, *Chlorella* sp. N, *Chlorella* sp. U, *Scenedesmus* sp. C, *Scenedesmus* sp. W และ *Chlorella* sp. VB55

ตารางที่ ง-1.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

(A) = ค่าการดูดกลืนแสง (B) = จำนวนเซลล์ (C) = น้ำหนักแห้ง

Descriptive

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
A	<i>Chlamydomonas</i> sp.	3	3.83867	0.535528	.309187	2.50834	5.16899	3.339	4.404
	<i>Chlorella</i> sp. 03	3	2.09867	0.174406	.100693	1.66542	2.53191	1.994	2.300

ตารางที่ ง-1.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ (ต่อ)

Descriptive

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	2.03167	0.059786	0.034517	1.88315	2.18018	1.989	2.100
<i>Chlorella</i> sp. A	3	2.43733	0.091877	0.053045	2.20910	2.66557	2.358	2.538
<i>Chlorella</i> sp. G	3	4.64267	0.161571	0.093283	4.24130	5.04403	4.514	4.824
<i>Chlorella</i> sp. N	3	2.09867	0.117240	0.067689	1.80743	2.38991	1.986	2.220
<i>Chlorella</i> sp. U	3	2.70800	0.370604	0.213968	1.78737	3.62863	2.281	2.946
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3	1.60100	0.022517	0.013000	1.54507	1.65693	1.578	1.623
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3	2.40933	1.50470	0.086874	2.03554	2.78312	2.238	2.520
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	4.30233	0.080848	0.046677	4.10150	4.50317	4.235	4.392
Total	30	2.81683	1.036744	.0189283	2.42971	3.20396	1.578	4.824
B <i>Chlamydomonas</i> sp.	3	2.94667	0.667258	0.385242	1.28911	4.60423	2.430	3.700

ตารางที่ ง-1.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ (ต่อ)

Descriptive

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>Chlorella</i> sp 03	3	1.48333	0.045092	0.026034	1.37132	1.59535	1.440	1.530
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	4.06000	0.052915	0.030551	3.92855	4.19145	4.000	4.100
<i>Chlorella</i> sp. A	3	1.94667	0.049329	0.028480	1.82413	2.06921	1.890	1.980
<i>Chlorella</i> sp. G	3	6.33667	0.324705	0.187469	5.53005	7.14328	6.120	6.710
<i>Chlorella</i> sp. N	3	1.98667	0.133167	0.076884	1.65586	2.31747	1.900	2.140
<i>Chlorella</i> sp. U	3	2.22667	0.155349	0.089691	1.84076	2.61258	2.100	2.400
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3	0.23867	0.001155	0.000667	0.23580	0.24154	0.238	0.240
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3	0.47267	0.194567	0.112333	-0.01066	0.95600	0.248	0.585
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	8.57333	0.161658	0.093333	8.17175	8.97491	8.480	8.760
Total	30	3.02713	2.548916	0.465366	2.07535	3.97891	0.238	8.760
C <i>Chlamydomonas</i> sp.	3	1.440000	0.0529150	0.0305505	1.308552	1.571448	1.3800	1.4800
<i>Chlorella</i> sp. 03	3	0.890000	0.0500000	0.0288675	0.765793	1.014207	0.8400	0.9400
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	1.006667	0.0057735	0.0033333	0.992324	1.021009	1.0000	1.0100
<i>Chlorella</i> sp. A	3	0.866667	0.0945163	0.0545690	0.631875	1.101458	0.7600	0.9400

ตารางที่ ง-1.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ (ต่อ)

Descriptive

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>Chlorella</i> sp. G	3	1.166667	0.1026320	0.0592546	0.911715	1.421619	1.0800	1.2800
<i>Chlorella</i> sp. N	3	2.606667	0.2138535	0.1234684	2.075425	3.137908	2.4200	2.8400
<i>Chlorella</i> sp. U	3	1.536667	0.4726874	0.2729062	0.362446	2.710887	1.2200	2.0800
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3	2.813333	0.1137248	0.0656591	2.530825	3.095841	2.7200	2.9400
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3	1.986667	0.7069182	0.4081394	0.230585	3.742749	1.5200	2.8000
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	1.166667	0.1527525	0.0881917	0.787208	1.546125	1.0000	1.3000
Total	30	1.548000	0.7163432	0.1307858	1.280513	1.815487	0.7600	2.9400

ค่าการดูดกลืนแสง

Duncan

ชุด	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3	1.60100				
<i>Chlorella</i> sp. 05	3		2.03167			
<i>Chlorella</i> sp. 03	3		2.09867			
<i>Chlorella</i> sp. N	3		2.09867			
<i>Scenedesmus</i> sp.W	3		2.40933	2.40933		
<i>Chlorella</i> sp. A	3		2.43733	2.43733		
<i>Chlorella</i> sp. U	3			2.70800		
<i>Chlamydomonas</i> sp.	3				3.83867	
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3					4.30233
<i>Chlorella</i> sp. G	3					4.64267
Sig		1.000	0.066	0.150	1.000	0.087

จำนวนเซลล์

Duncan

ชุด	N	Supset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3	0.23867						
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3	0.47267						
<i>Chlorella</i> sp. 03	3		1.48333					
<i>Chlorella</i> sp. A	3			1.94667				
<i>Chlorella</i> sp. N	3			1.98667				
<i>Chlorella</i> sp. U	3			2.22667				
<i>Chlamydomonas</i> sp.	3				2.94667			
<i>Chlorella</i> sp. 05	3					4.0600		
<i>Chlorella</i> sp. G	3						6.33667	
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3							8.57333
Sig		0.279	1.00	0.222	1.000	1.000	1.000	1.000

น้ำหนักรเซลล์แห้ง

Duncan

ชุด	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Chlorella</i> sp. A	3	0.866667			
<i>Chlorella</i> sp. 03	3	0.890000			
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	1.006667	1.006667		
<i>Chlorella</i> sp. G	3	1.166667	1.166667		
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	1.166667	1.666667		
<i>Chlamydomonas</i> sp.	3		1.440000		
<i>Chlorella</i> sp. U	3		1.536667	1.536667	
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3			1.986667	
<i>Chlorella</i> sp. N	3				2.606667
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3				2.813333
Sig		0.265	0.055	0.070	0.390

ตารางที่ ง-1.2 ตาราง ANOVA ของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

(A) = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (B) = จำนวนเซลล์ (C) = น้ำหนักแห้ง

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
A	Between Groups	30.098	9	3.344	62.380	0.000
	Within Groups	1.072	20	0.054		
	Total	31.170	29			
B	Between Groups	187.085	9	20.787	313.158	0.000
	Within Groups	1.328	20	0.066		
	Total	188.412	29			
C	Between Groups	13.221	9	1.469	17.700	0.000
	Within Groups	1.660	20	0.083		
	Total	14.881	29			

ตารางที่ ง-2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปริมาณไขมันที่ทำการสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์

ตารางที่ ง-2.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1

Descriptive

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>Chlamydomonas</i> sp.	3	0.075000	0.0250000	0.0144338	0.012897	0.137103	0.0500	0.1000
<i>Chlorella</i> sp. 03	3	0.100000	0E-7	0E-7	0.100000	0.100000	0.1000	0.1000
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	0.125000	0.0250000	0.0144338	0.062897	0.187103	0.1000	0.1500
<i>Chlorella</i> sp. A	3	0.100000	0.0500000	0.0288675	-0.04207	0.224207	0.0500	0.1500
<i>Chlorella</i> sp. G	3	0.100000	0.0250000	0.0144338	0.037897	0.162103	0.0750	0.1250
<i>Chlorella</i> sp. N	3	0.125000	0E-7	0E-7	0.125000	0.125000	0.1250	0.1250
<i>Chlorella</i> sp. U	3	0.225000	0.0250000	0.0144338	0.162897	0.287103	0.2000	0.2500
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3	0.150000	0.0250000	0.0144338	0.087897	0.212103	0.1250	0.1750
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3	0.150000	0E-7	0E-7	0.150000	0.150000	0.1500	0.1500
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	0.250000	0E-7	0E-7	0.250000	0.250000	0.2500	0.2500
Total	30	0.140000	0.0582059	0.0106269	0.118266	0.161734	0.0500	0.2500

หมายเหตุ : 0E-7 หมายถึง 0.000

Duncan

ชุด	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>Chlamydomonas</i> sp.	3	0.075000			
<i>Chlorella</i> sp. 03	3	0.100000	0.100000		
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	0.100000	0.100000		
<i>Chlorella</i> sp. A	3	0.100000	0.100000		
<i>Chlorella</i> sp. G	3		0.125000	0.125000	
<i>Chlorella</i> sp. N	3		0.125000	0.125000	
<i>Chlorella</i> sp. U	3			0.150000	
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3			0.150000	
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3				0.225000
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3				0.225000
Sig		0.250	0.260	0.250	0.211

ตารางที่ ง-2.2 ตาราง ANOVA ของปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้
อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:1

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.087	9	0.10	17.185	0.000
Within Groups	0.011	20	0.001		
Total	0.098	29			

ตารางที่ ง-2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					<i>Chlamydomonas</i> sp.	3		
<i>Chlorella</i> sp. 03	3	0.091667	0.0144338	0.0083333	0.055811	0.127522	0.0750	0.1000
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	0.116667	0.0288675	0.0166667	0.044956	0.188378	0.1000	0.1500
<i>Chlorella</i> sp. A	3	0.108333	0.0381881	0.0220479	0.013469	0.203189	0.0750	0.1500
<i>Chlorella</i> sp. G	3	0.100000	0.0250000	0.0144338	0.037897	0.162103	0.0750	0.1250
<i>Chlorella</i> sp. N	3	0.125000	0E-7	0E-7	0.125000	0.125000	0.1250	0.1250
<i>Chlorella</i> sp. U	3	0.208333	0.0144338	0.0083333	0.172478	0.244189	0.2000	0.2250
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3	0.141667	0.0144338	0.0083333	0.105811	0.177522	0.1250	0.1500
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3	0.150000	0E-7	0E-7	0.150000	0.150000	0.1500	0.1500
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	0.250000	0E-7	0E-7	0.250000	0.250000	0.2500	0.2500
Total	30	0.136667	0.055164	0.0100811	0.116049	0.157285	0.0500	0.2500

หมายเหตุ : 0e-7 หมายถึง 0.000

Duncan

ชุด	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
<i>Chlamydomonas</i> sp.	3	0.075000					
<i>Chlorella</i> sp. 03	3	0.091667	0.091667				
<i>Chlorella</i> sp. 05	3	0.100000	0.100000				
<i>Chlorella</i> sp. A	3	0.108333	0.108333	0.108333			
<i>Chlorella</i> sp. G	3		0.116667	0.116667	0.116667		
<i>Chlorella</i> sp. N	3		0.125000	0.125000	0.125000		
<i>Chlorella</i> sp. U	3			0.141667	0.141667		
<i>Scenedesmus</i> sp. C	3				0.150000		
<i>Scenedesmus</i> sp. W	3					0.208333	
<i>Chlorella</i> sp. VB55	3						0.250000
Sig		0.080	0.086	0.080	0.080	1.000	1.000

ตารางที่ ง-2.4 ตาราง ANOVA ของปริมาณไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก 10 สายพันธุ์ โดยใช้ อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 1:2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.080	9	0.09	21.356	0.000
Within Groups	0.008	20	0.000		
Total	0.088	29			

ตารางที่ ง-3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55

ตารางที่ ง-3.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์

(A) = ค่าการดูดกลืนแสง (B) = จำนวนเซลล์ (C) = น้ำหนักแห้ง

Descriptive

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
A	<i>Chlorella</i> sp. U	3	2.61067	0.037166	0.021458	2.51834	2.70299	2.580	2.652
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	5.23700	0.046357	0.026764	5.12184	5.35216	5.200	5.289
	Total	6	3.92383	1.438993	0.587466	2.41370	5.43396	2.580	5.289
B	<i>Chlorella</i> sp. U	3	2.0800	0.10392	0.06000	1.8218	2.3382	2.02	2.20
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	9.8533	0.11930	0.06888	9.5570	10.1497	9.77	9.99
	Total	6	5.9667	4.25881	1.73865	1.4973	104360	2.02	9.99
C	<i>Chlorella</i> sp. U	3	1.340000	0.1039230	0.0600000	1.081841	1.598159	1.2200	1.4000
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	1.500000	0.1777639	0.1026320	1.058410	1.941590	1.3000	1.6400
	Total	6	1.420000	0.1569714	0.0640833	1.255269	1.584731	1.2200	1.6400

ตารางที่ ง-3.2 ตาราง ANOVA ของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์

(A) = ค่าการดูดกลืนแสง (B) = จำนวนเซลล์ (C) = น้ำหนักแห้ง

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
A	Between Groups	10.346	1	10.346	5861.452	0.000
	Within Groups	0.007	4	0.002		
	Total	10.345	5			
B	Between Groups	90.637	1	90.637	7241.310	0.000
	Within Groups	0.050	4	0.013		
	Total	90.687	5			
C	Between Groups	0.038	1	0.038	1.811	0.250
	Within Groups	0.085	4	0.021		
	Total	0.123	5			

ตารางที่ ง-4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. U และ *Chlorella* sp. VB55

ตารางที่ ง-4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์

(D) = ปริมาณโปรตีน (E) = ปริมาณไขมัน (F) = ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (G) = ปริมาณความชื้น (H) = ปริมาณเถ้า

Descriptive

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
D	<i>Chlorella</i> sp. U	3	9.4067	0.17039	0.09838	8.9834	9.8299	9.23	9.57
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	10.3367	0.05508	0.03180	10.1999	10.4734	10.28	10.39
	Total	6	9.8717	0.52182	0.21303	9.3240	10.4193	9.23	10.39
E	<i>Chlorella</i> sp. U	3	0.225000	0.0250000	0.0144338	0.162897	0.287103	0.2000	0.2500
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	0.250000	0.0000000	0.0000000	0.250000	0.250000	0.2500	0.2500
	Total	6	0.237500	0.0209165	0.0085391	0.215549	0.259451	0.2000	0.2500
F	<i>Chlorella</i> sp. U	3	0.028233	0.0008145	0.0004702	0.026210	0.030257	0.0273	0.0288
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	0.052733	0.0015948	0.0009207	0.048772	0.056695	0.0514	0.0545

ตารางที่ ง-4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติขององค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์ (ต่อ)

Descriptive

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
	Total	6	0.040483	0.0134669	0.0054978	0.026351	0.054616	0.0273	0.0545
G	<i>Chlorella</i> sp. U	3	0.054167	0.0042525	0.0024525	0.043603	0.064730	0.0510	0.0590
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	0.061400	0.0005292	0.0003055	0.060086	0.062714	0.0610	0.0620
	Total	6	0.057783	0.0048002	0.0019597	0.052746	0.062821	0.0510	0.0620
H	<i>Chlorella</i> sp. U	3	59.853333	2.7096556	1.5644202	53.122176	66.584491	57.4500	62.7900
	<i>Chlorella</i> sp. VB55	3	53.250000	0.1249000	0.0721110	52.939731	53.560269	53.1100	53.3500
	Total	6	56.551667	4.0030409	1.634246	52.350733	60.752600	53.1100	62.7900

ตารางที่ ง-4.2 ตาราง ANOVA ของการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 2 สายพันธุ์

(D) = ปริมาณโปรตีน (E) = ปริมาณไขมัน (F) = ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

(G) = ปริมาณความชื้น (H) = ปริมาณเถ้า

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
D	Between Groups	1.297	1	1.297	80.916	0.000
	Within Groups	0.064	4	0.016		
	Total	1.361	5			
E	Between Groups	0.001	1	0.001	3.000	1.58
	Within Groups	0.001	4	0.000		
	Total	0.002	5			
F	Between Groups	0.001	1	0.001	5561.564	0.000
	Within Groups	0.000	4	0.000		
	Total	0.001	5			
G	Between Groups	0.000	1	0.000	8.548	0.043
	Within Groups	0.000	4	0.000		
	Total	0.000	5			
H	Between Groups	65.406	1	65.406	17.779	0.014
	Within Groups	14.716	4	3.679		
	Total	80.122	5			