การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ประสิทธิภาพสูง

Isolation for high antioxidant activity content from algae

ผศ. ดร. ดวงกมล เรือนงาม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ประสิทธิภาพสูง

Isolation for high antioxidant activity content from algae

ผศ. ดร. ดวงกมล เรือนงาม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ประสิทธิภาพสูง

(ภาษาอังกฤษ) Isolation for high antioxidant activity content from algae

แหล่งทุนวิจัย งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2557
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาในการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 ตุลาคม 2557

หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. ดวงกมล เรือนงาม สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

Scenedesmus armatus เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีสำคัญในฐานะผู้ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและไบโอดีเซล งานวิจัยนี้เริ่มต้นด้วยการทดสอบอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมในระบบ 400 มิลลิลิตร ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ศึกษาได้แก่ BG11, N-8 และ BBM พบว่า BG11 สามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ความเข้มข้นเซลล์มากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ และอาหารชนิดนี้จะนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป ผลของความเข้มแสงพิจารณาในระบบ 400 มิลลิลิตร ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 ลักซ์ พบว่า 2,700 ลักซ์เพียงพอต่อการเลี้ยงสาหร่าย หัวพ่นอากาศที่แตกต่างกัน 5 แบบได้นำมาศึกษาและเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงแบบเขย่า (120 รอบต่อนาที 400 มิลลิลิตร) หัวพ่นอากาศที่พิจารณาได้แก่ ท่อยางซิลิโคนตรง ท่อยางซิลิโคนดัดวงกลมเจาะรู ซิลิโคน 3 ทางเจาะรู หัวทรายทรงกลม และหัวทรายทรงกระบอก ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายพิจารณาจากปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ ปริมาณเซลล์มีชีวิตวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และ น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าหัวทรายทรงกลมสามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ปริมาณมากที่สุดคือ 6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 3.34 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร นอกจากนี้ได้ศึกษาในระบบขนาดใหญ่ด้วยคือ 4,000 มิลลิลิตร พบว่าหัวพ่นอากาศแบบซิลิโคน 3 ทางเจาะรูให้ความเข้มข้นของเซลล์มากที่สุด คือปริมาณ 8.7×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ บี เบตาแคโรทีน และ ไลโคปีน วัดค่าโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และสารสกัดที่ได้สามารถเจือจางสีของสารละลาย DPPH ได้ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 7,000 มิลลิลิตร ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่ายประมาณเท่ากับ 9.5106 กรัม

คำสำคัญ: *Scenedesmus armatus* สารต้านอนุมูลอิสระ หัวพ่นอากาศ

Research Title: Isolation for high antioxidant activity content from algae

Researcher: Assist. Prof. Dr. Duangkamol Ruen-ngam

Faculty: Science Department: Biology

ABSTRACT

Scenedesmus armatus is an important green microalgae in term of biodiesel and antioxidant producer. This research started with preliminary tested for optimum medium in 400 ml cultivation system with light intensity of 3,400 lux. The investigated mediums were BG11, N-8 and BBM. Among the different medium, cells grown in BG11 medium showed the highest cell concentration compared with the others and then was further used in the next step. Effect of light intensity has been further investigated at 2,700 and 3,400 lux in 400 ml system. The result showed that 2,700 lux was enough for algae cultivation. The aeration system with five different air-sparger types (silicone straight tube, invented circular silicone tube with ream, invented three-way silicone tube with ream, spherical sand stones air nozzle and cylindrical sand stones air nozzle) was then investigated and compared with traditional shaker (120 rpm with medium size 400 ml) in this study. The results of each condition were demonstrated in terms of cell concentration, viable cell absorbance at wavelength of 560 nm and cell dried weight. The cultivation with the spherical sand stones air nozzle as sparger revealed the highest amount of algae cells with a maximum of cell concentration at $6x10^6$ cells per milliliter and 3.34 gram of cell dried weight per liter. The large scale cultivation of 4,000 ml was also studied in this research. The invented three-way silicone tube with ream showed the highest amount of cell concentration of $8.7x10^6$ cells per milliliter and 5 gram per liter. Amount of antioxidant such as chlorophylls a, b, β-carotene and lycopene concentration were measured by spectrophotometer and such compounds can reuce the DPPH color. Broth around 7,000 milliliter can achieve the dried algae around 9.5106 grams.

Keywords: *Scenedesmus armatus Antioxidant* Sparger

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อให้สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระให้ได้ปริมาณมากและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด ผู้ทำงานวิจัยขอขอบพระคุณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์หัวเชื้อสาหร่ายเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยงบวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะวิทยาศาสตร์ งานวิจัยนี้ได้ดำเนินงานให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ.2555-2559) ด้านความเข้มแข็งทางภาคการเกษตร ความมั่นคงของอาหารและพลังงาน และสอดคล้องกับหัวข้อการวิจัยของ สจล. ในการวิจัยด้านเกษตรและอาหาร งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานทางสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และเป็นองค์ความรู้ที่มีประโยชน์ซึ่งสามารถต่อยอดในเชิงพาณิชย์ได้

ผศ. ดร. ดวงกมล เรือนงาม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญรูป ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ความหมายของสาหร่ายสีเขียว (Algae) 4
2.2 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) 5
2.3 *Scenedesmus armatus* 5
2.4 การเลี้ยงสาหร่าย 6
2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย 6
2.4.1.1 ปัจจัยทางกายภาพ 6
2.4.1.2 ปัจจัยทางเคมี 6
2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย 8
2.5 การสกัดสาร 8
2.6 สารสำคัญในสาหร่าย 8
2.7 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ 9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 36
3.1 หัวเชื้อ 36
3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ 36
3.3 แผนผังการทดลอง 38

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 การติดตั้งระบบการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 39
3.5 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ผล 39
3.5.1 การถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* 39
3.5.2 การขยายจำนวนเซลล์สาหร่าย 40
3.5.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม 40
3.5.4 การเลี้ยงในสภาวะเขย่า (ดั้งเดิม) 41
3.5.5 การเลี้ยงด้วยหัวพ่นอากาศ 41
3.5.6 การเลี้ยงด้วยความเข้มแสงต่างๆ 42
3.5.7 การเลี้ยงเซลล์ในระบบขยาย 42
3.5.8 การเลี้ยงเซลล์ในระบบขยาย 43
3.5.8.1 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 43
3.5.8.2 วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์ Haemacytometer 43
3.5.8.3 วิธีการวัดความหนาแน่นโดยอาศัยแสง (Optical Density; OD) 44
3.5.9 การเก็บสาหร่ายแห้ง 45
3.5.10 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 45
3.5.11 การตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ 45
บทที่ 4 ผลการวิจัย 46
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อ จาก 2 แหล่ง 46
4.2 ผลของสารอาหาร 46
4.3 การเลี้ยงสาหร่ายในระบบขนาด 800 มิลลิลิตร 47
4.4 ผลของความเข้มแสง 48
4.5 การเลี้ยงสาหร่ายในระบบ 5,000 มิลลิลตร 50
4.6 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 68
4.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 68
4.8 ปริมาณสาหร่าย 70

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 71
เอกสารอ้างอิง 72
ภาคผนวก 76
ภาคผนวก ก 76
ภาคผนวก ข 77
ภาคผนวก ค 79
ภาคผนวก ง 83
ภาคผนวก จ 89
ภาคผนวก ฉ 90
ภาคผนวก ช 96
ภาคผนวก ซ 98

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว 10

2.2 แสดงตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารต่างๆ จากสาหร่ายสีเขียว 21

3.1 ตัวแปรที่ทำการทดลองทั้งหมด 38

4.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และ อัตราการเพิ่มของเซลล์ (P) ในระบบ 800 มิลลิลิตร 59

4.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสาหร่ายทีสกัดด้วยวิธีการเขย่า และด้วยชุด soxhlet 68

4.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีการเขย่า และชุด soxhlet 69

4.4 ปริมาณสาหร่ายแห้งที่ได้จากงานวิจัย 70

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ *Scenedesmus armatus* 6
2.2 สาหร่ายที่มีการนำมาทำผลิตภัณฑ์อาหารเสร....8
3.1 แผนผังการทดลอง 38
3.2 เทคนิคการ Cross streak บนจานอาหารแข็ง BG11....39
3.3 เทคนิคการ Simple streak บนหลอดอาหารเอียง BG11เพื่อเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์.... 39
3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยปั๊มอัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ ในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ BG11 N-8 และ BBM 41
3.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยเครื่องเขย่าในอาหารเหลว BG11 เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง 41
3.6 สายยางให้อากาศแบบต่างๆ ได้แก่ สายยางปกติ แบบหัวทรายทรงกระบอก แบบหัวทรายทรงกลม แบบวงกลมเจาะรู แบบ 3 ทางเจาะรู.... 42
3.7 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดพลาสติกขนาดใหญ่ ระบบขนาด 5,000 มิลลิลิตร.... 43
3.8 พื้นที่ตารางสำหรับการนับเซลล์สาหร่าย 44
3.9 เครื่อง Spectrophotometer 44
4.1 สาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์....46
4.2 น้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ 51
4.3 ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ....52
4.4 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ53
4.5 เซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร (a) BG11 (b) N-8 และ (c) BBM.... 54
4.6 น้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ และการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า).... 55
4.7 ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว Scenedesmus armartus ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ และการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า).... 57
4.8 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ และการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า) 58

4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศโดยใช้สายยางปกติ ณ ความเข้มแสงแตกต่างกัน 60
4.10 ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศโดยใช้สายยางปกติ ณ ความเข้มแสงแตกต่างกัน 62
4.11 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศโดยใช้สายยางปกติ ณ ความเข้มแสงแตกต่างกัน 63
4.12 น้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ ในระบบ 5,000 มิลลิลิตร 64
4.13 ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว Scenedesmus armartus ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ ในระบบ 5,000 มิลลิลิตร 66
4.14 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ ในระบบ 5,000 มิลลิลิตร 67
4.15 สีของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานหลังทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH 0.35 mM 69

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากในปัจจุบันการทำงานมีภาวะการแข่งขันสูงจึงเป็นผลทำให้เกิดความเครียดซึ่งส่งผลให้สมดุลภายในร่างกายเปลี่ยนรวมทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) สารดังกล่าวเป็นสารที่ไม่เสถียรจึงเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่และทำลายเซลล์ดีของร่างกาย ตัวอย่างสารอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกายได้แก่ hydroxyl radical, superoxide, peroxyl, alkoxyl และ oxides ของ nitrogen เป็นต้น หากมีสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ในปริมาณมากเกินสารต้านอนุมูลอิสระจะส่งผลให้เกิดโรคในมนุษย์หลายโรค เช่น โรคกลัวความสูง โรคหลอดเลือดสมอง โรคมะเร็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ไธออล กรดแอสคอร์บิก โพลีฟีนอล แอสตาแซนทิน ลูทีน กลูตาไธโอน วิตามินซี แคโรทีนอย และ วิตามินอี เป็นต้น ดังนั้นปัจจุบันมนุษย์หันมาบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระเป็นอาหารเสริมโดยคาดหวังว่าสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะช่วยรักษาสุขภาพและป้องกันการเกิดดังกล่าว อย่างไรก็ตามปริมาณที่รับประทานได้นั้นต้องอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังมีส่วนเสริมในผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องสำอางได้อีกด้วย

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สาหร่ายหลายสายพันธุ์ที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ *Chlorella vulgaris* (Kwang และคณะ 2010) *Haematococcus pluvialis* (Ruen-ngam และคณะ 2011 Zou และคณะ 2013) *Scenedesmus* sp. (Macias-Sánchez และคณะ 2010 Guedes และคณะ 2013 Aburai และคณะ 2015) *Scenedesmus* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่พบมากในประเทศไทย อยู่ในอาณาจักร Plantae ดิวิชัน Chlorophyta คลาส Chlorophyceae ออร์เดอร์ Chlorococcales แฟมิลี Scenedesmaceae และอยู่ในจีนัส *Scenedesmus* พบในแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหล ดำรงชีวิตได้ทั้งแบบล่องลอยเป็นอิสระและแบบยึดเกาะ ส่วนมากมักพบเซลล์อยู่รวมกัน 2-32 เซลล์ มีลักษณะโค้ง รูปไข่ หรือทรงกระบอก เรียงตัวเป็น 1 หรือ 2 แถว โดยใช้ด้านข้างของเซลล์เชื่อมกัน ผนังเซลล์เรียบหรือเป็นเม็ดเล็กๆ ติดอยู่ด้านข้าง อาจพบหรือไม่พบลักษณะที่เป็นสัน เป็นฟันหรือหนามเล็กๆ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีคุณสมบัติเรื่องการปกป้องเซลล์จากการสูญเสียน้ำ ทนต่อสภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อมได้ดี และมีความสามารถในการฟื้นสภาพของเซลล์สูง สาหร่ายชนิดนี้มีคุณประโยชน์มากมาย อันได้แก่ ใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมของมนุษย์เป็นอาหารสัตว์ ใช้ทำปุ๋ย และ ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้ประโยชน์ที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันคือสามารถผลิตสารที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ ได้แก่ สาร Antioxidant ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ ด้วยประโยชน์ที่ได้กล่าวมานี้จึงมีนักวิจัยจำนวนไม่น้อยทำการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* สายพันธุ์ *armatus* ในสูตรอาหารและสภาวะที่แตกต่างกันเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ให้ได้ปริมาณมากที่สุดและเร็วที่สุด

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้นมีหลากหลายปัจจัย ได้แก่ รูปการเพาะเลี้ยง สารอาหาร pH อากาศ แสง อุณหภูมิ และ CO_2 ยกตัวอย่าง เช่น การศึกษาของ Arumugam และคณะ (2013) ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบการเจริญของชีวมวลสาหร่าย *Scenedesmus* sp. จากผลการทดลองพบว่าไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ชีวมวลเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือยูเรีย ซึ่งเป็นของเสียสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ได้ หรือในงานวิจัยของ Li Xin และคณะ (2010) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด พบว่าการใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายสีเขียวในปริมาณสูงที่สุด นอกจากปัจจัยทางด้านสารอาหารแล้ว Xin และคณะ (2010) ยังได้ศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. LX1 ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 10-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและไขมันคือ 20 องศาเซลเซียส ส่วนในการทดลองของ Shih-Hsin Ho และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาปัจจัยของแสงที่ส่งผลต่อการผลิตลูทีนของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* FSP-3 โดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ต่างๆ ได้แก่ TS5, T8, หลอด helix ที่มีความเข้มแสงตั้งแต่ 30-600 μmol photon/m^3/s และพบว่าการใช้หลอดไฟ LED สีขาวทำให้สาหร่ายผลิตลูทีนได้ดีกว่าการใช้หลอดไฟ LED สีอื่น ได้แก่ สีแดง สีฟ้า และสีเขียว อีกตัวอย่างการศึกษาของ Hanaa H. และคณะ (2013) ได้ทำการผสม CO_2 เข้ากับอากาศในปริมาณต่างๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* โดยพบว่าสาหร่ายมีการสะสมไขมัน 38% เมื่อให้ CO_2 12% และสะสมไขมัน 28% และเสริมด้วย Fe^{3+} ปริมาณ 10 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในอาหาร

จากข้อมูลข้างต้นสาหร่าย *Scenedesmus* sp. มีประโยชน์มากมายและสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตให้ได้ตามที่ต้องการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายตั้งแต่ขั้นสกรีนเพื่อคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ไปจนถึงขั้นสกัดสารที่ได้จากสาหร่าย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาหาวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ให้ผลผลิตในรูปแบบของสารต้านอนุมูลอิสระ

1.2.2 ศึกษาสภาวะในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

1.2.3 ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เชื้อที่ได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณบึงพระราม จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

- การคัดเลือกสายพันธุ์ทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BG11

- กระบวนการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อขยายสายพันธุ์สาหร่ายบริสุทธิ์ดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบตั้งเดิม (เขย่า) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และระบบขวดโหล ขนาด

5,000 มิลลิลิตร และแบบระบบให้อากาศด้วยหัวพ่นอากาศแบบต่างๆ ที่ประดิษฐ์ขึ้น เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายพันธุ์ดังกล่าว

- สภาวะที่ใช้ในการการเลี้ยงได้แก่ ประเภทอาหาร จะทดสอบในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ BG11 N8 และ BBM แสงที่ใช้ในการเลี้ยงจะทดสอบใน 2 ความเข้มแสง ได้แก่ 2,700 และ 3,400 ลักซ์ ทั้งหมดดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

- เก็บสาหร่ายแห้งในรูปผงด้วยการนำสาหร่ายสดผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer)

- สกัดสารต้านอนุมูลอิสระ จากสาหร่ายแห้งด้วยเอทานอลด้วยวิธีแช่และ soxhlet

- ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. เพื่อให้ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณมากและมีประสิทธิภาพ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายขนาดต่อไป

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตสาหร่ายหรือการเลี้ยงสาหร่ายมีลักษณะคล้ายคลึงกับการเลี้ยงพืชชั้นสูง ต้องมีการจัดสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และที่สำคัญต้องมีการระวังการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นที่อาจจะเจริญไปพร้อมๆ กับสาหร่าย ซึ่งจะคอยแย่งอาหารหรืออาจผลิตสารที่ไปทำลายการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ ดังนั้นทุกขั้นตอนต้องดำเนินการภายใต้สภาวะ aseptic technique ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ได้แก่ สารอาหาร pH อุณหภูมิ แสง และ อากาศ เนื่องจากยังไม่สามารถเลี้ยงสาหร่ายในระบบใหญ่ได้ในทันทีช่วงเริ่มต้นจึงต้องดำเนินการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ขวดรูปชมพู่จากนั้นจึงขยายขนาดเพิ่มขึ้นจนมีขนาดใหญ่ และในปัจจุบันมีนักวิจัยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้ถังปฏิกรณ์หลายรูปแบบได้แก่ ถังแบบคอลัมน์ และแบบอากาศยก (airlift contactor) ซึ่งระบบหลังสุดนี้มีการออกแบบเพื่อให้มีการหมุนเวียนของออกซิเจนในระบบที่ดีเพื่อให้สาหร่ายได้รับออกซิเจนรวมทั้งสารอาหารอย่างทั่วถึง (ดวงกมล เรือนงาม 2550 กีรติ อิสระพายัพ 2555) การทบทวนหางานวิจัยที่เกี่ยวข้องในอดีตจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ดังนั้นในบทนี้จะกล่าวถึงข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 ความหมายของสาหร่ายสีเขียว (Algae)

สาหร่าย (algae) เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบิเวณน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม จึงพบได้ทั้งคู คลอง หนอง บึง ทะเลสาบ แม่น้ำ และมหาสมุทร นอกจากนี้ยังสามารถพบสาหร่ายในสภาพแวดล้อมอื่นๆ อีก เช่น ดิน หิมะ น้ำพุร้อน และสาหร่ายที่ใช้ชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในลักษณะความสัมพันธ์แบบพึ่งพา เช่น ไลเคน (lichen) (สรวิศ 2543) สาหร่ายมีการดำรงชีวิตอยู่ได้หลายรูปแบบ เช่น แพลงก์ตอน (Plankton) ล่องลอยอยู่ในมวลน้ำเรียกว่าเป็นแพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) และดำรงชีวิตแบบยึดติดกับพื้นทะเลหรือวัสดุอื่นๆ เช่น กลุ่มสาหร่ายหลายเซลล์ที่เรียกว่าสาหร่ายทะเล (seaweeds) สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารเองได้ด้วยตนเองด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไปสังเกตได้จากมีลักษณะสีต่างซึ่งมีองค์ประกอบของสารสีที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

สาหร่ายมีขนาดเล็กตั้งแต่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนกระทั่งถึงขนาดใหญ่มีความยาวหลายเมตร การจัดรูปร่างของสาหร่ายมีตั้งแต่ลักษณะง่ายๆ ไปจนถึงซับซ้อน เช่น สาหร่ายเซลล์เดียว หลายเซลล์ กลุ่มเซลล์หรือโคโลนี อาจเป็นเส้นสายที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง ซึ่งมีทั้งสามารถเคลื่อนที่ได้ และเคลื่อนที่ไม่ได้ เป็นทัลลัสที่คล้ายราก และคล้ายใบพืชชั้นสูงแต่ไม่มีระบบท่อลำเลียงเหมือนพืช จากการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายมีความก้ำกึ่งระหว่างแบคทีเรียกับพืช คือ มีโครงสร้างของเซลล์ และการ

ดำรงชีวิตสูงกว่าแบคทีเรียแต่ต่ำกว่าพืชโดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียวซึ่งมีวิวัฒนาการร่วมกับพืช (Mauseth, 1991, ยุวดี 2548)

2.2 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta)

สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) มีลักษณะเป็นสีเขียวเนื่องจากภายในคลอโรพลาสต์มีสารสีพวกคลอโรฟิลล์เอและบีเป็นจำนวนมาก ทำให้บดบังสารสีอื่นๆ สีเขียวจึงเด่นชัดมากกว่าสารสีอื่น ซึ่งสารสีเหล่านี้มีบทบาทในการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย นอกจากนี้ยังพบสารแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์อีกหลายชนิดซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าในคลอโรพลาสต์มีการสะสมแป้งในรูปของไพรีนอยด์อยู่ด้วย โดยทั่วไปจะพบสารสีเขียวได้ทั้งแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็มโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณน้ำกร่อยเป็นแหล่งที่มีสาหร่ายหลากหลายสายพันธุ์ แต่ส่วนโดยรวมแล้วจะพบสาหร่ายสีเขียวในแหล่งน้ำจืดซึ่งมากถึงร้อยละ 90 ส่วนอีกร้อยละ 10 พบในทะเล สามารถเจริญได้ทั้งน้ำตื้นและน้ำลึกที่แสงแดดส่องถึง มีความหลากหลายมากที่สุดทั้งรูปร่าง แหล่งที่พบ และวัฏจักรชีวิต มีทั้งสาหร่ายสีเขียวที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือรวมกันเป็นกลุ่มเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ อาจจะเป็นเส้นสายหรือเป็นเซลล์ที่เป็นแผ่น ท่อ สายแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง เป็นต้น (Curtis และคณะ 1994, ยุวดี 2530)

2.3 *Scenedesmus armatus*

เมื่อจัดจำแนกสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) พบว่า *Scenedesmus armatus* จัดอยู่ใน

Kingdom Plantae
Division Chlorophyta
Class Chlorophyceae
Order Chlorococcales
Family Scenedesmaceae
Genus *Scenedesmus*
Species *Scenedesmus armatus*

Scenedesmus armatus เป็นสาหร่ายสีเขียวที่อยู่กันหลายเซลล์ ประกอบด้วย 4 เซลล์หรือมากกว่านั้น เป็นที่รู้จักกันในอีกชื่อว่า *Desmodesmus armatus* เซลล์แต่ละเซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเซลล์ต่อเซลล์ตามความยาว และโคโลนีนั้นไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Non-motile) เป็นสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างได้ดี และง่ายต่อการนำมาเพาะเลี้ยง เป็นสายพันธุ์ที่ดีเยี่ยมเหมาะแก่การเริ่มงานวิจัยและผู้ที่สนใจการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในปัจจุบันได้นำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล (Hanaa, 2012) สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ใช้ผลิตอาหารสัตว์ ใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมของมนุษย์ ใช้ทำปุ๋ย ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย *Scenedesmus* sp. ปกติจะเป็นตัวบ่งชี้สภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบสารอาหารและสารพิษที่เกิดจากมนุษย์ในการใช้แหล่งน้ำ *Scenedesmus sp.* เป็นสาหร่ายที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันใน

ฐานนะที่เป็นแหล่งของรงควัตถุ อันได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และลูทีน เพื่อเพิ่มปริมาณของรงควัตถุดังกล่าวจึงต้องทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

รูปที่ 2.1 ภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ *Scenedesmus armatus* (ที่มา : http://www.sbs.utexas.eduuteximagesalgae2551%20Scenedesmus%20armatus%202.jpg)

2.4 การเลี้ยงสาหร่าย

การผลิตสาหร่ายหรือการเลี้ยงสาหร่ายมีลักษณะคล้ายกับการเลี้ยงพืชชั้นสูง ต้องมีการจัดสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ได้แก่ pH อุณหภูมิ แสง สารอาหาร และอากาศ ช่วงเริ่มต้นในการเลี้ยงสาหร่ายจะดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ขวดรูปชมพู่จากนั้นจึงขยายขนาดเพิ่มขึ้นจนมีขนาดใหญ่ และในปัจจุบันมีนักวิจัยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้ถังปฏิกรณ์หลายรูปแบบได้แก่ ถังแบบคอลัมน์และแบบอากาศยก (airlift contactor) ซึ่งระบบหลังสุดนี้มีการออกแบบเพื่อให้มีการหมุนเวียนของออกซิเจนในระบบที่ดีเพื่อให้สาหร่ายได้รับออกซิเจนรวมทั้งสารอาหารอย่างทั่วถึง (ดวงกมล เรือนงาม 2550 กีรติ อิสระพายัพ 2555) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.4.1.1 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ แสงสว่าง ควรใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ในการให้แสงแก่สาหร่ายเพราะมีอุณหภูมิในการให้แสงน้อยกว่าหลอดไฟประเภทอื่นๆ นอกจากยังมีปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนที่ละลาย และ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

2.4.1.2 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย ซึ่งขึ้นอยู่กับสารอาหารที่เลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายแต่ละชนิด ธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ซึ่งธาตุอาหารหลักเป็นสารเคมีที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต อย่างเช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แคลเซียม โซเดียม โพแทสเซียม คลอรีน และแมกนีเซียม เป็นต้น ส่วนธาตุอาหารรองเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการในปริมาณที่น้อย หรือสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ สารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์จะได้แก่ เหล็ก โบรอน แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โมลิบดินัม ซิลิกา เป็นต้น และสารอินทรีย์ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เกลือ อินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ และกลุ่มอาหารเสริม หากสาหร่ายขาดธาตุอาหารจะเกิดลักษณะที่สังเกตได้ อันได้แก่

ปริมาณสารสีที่ใช้สำหรับสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้เซลล์มีสีที่จางลง เซลล์จะมีการสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ เช่น การสะสมแป้งและน้ำมัน เซลล์มีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนลดลง เนื่องจากเซลล์มีการสะสมแป้งและไขมันเพิ่มขึ้น

2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย

J.F. Sanchez และคณะ ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตและปริมาณลูทีน ของ *Scenedesmus almeriensis* ซึ่งได้นำเสนอข้อมูลคุณลักษณะของสาหร่ายที่อุดมไปด้วยลูทีนเป็นครั้งแรก ซึ่ง *Scenedesmus almeriensis* เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากเรือนกระจกของเกษตรกร วัตถุประสงค์หลัก คือ การกำหนดสภาวะที่เหมาสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กนี้ และปัจจัยที่อาจเพิ่มปริมาณลูทีนได้ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดดำเนินครั้งแรกในการเพาะเลี้ยงแบบ batch ดังนั้น อิทธิพลของสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ, pH , culture medium , รังสีภายนอก และ ความเค็ม มีการดำเนินการอย่างต่อเนื่องภายใตข้อจำกัดที่ว่าอัตราการเจือจางเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของสาหร่าย ความสัมพันธ์ระหว่างรังสีและอุณหภูมิถูกศึกษาโดยวิธีวิเคราะห์การตอบสนองต่อพื้นผิว และสภาวะที่เหมาะสมของรังสีและอุณหภูมิ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอาหารที่เสนอโดย Mann JE และ Myers J ชื่อเรื่อง On pigments, growth and photosynthesis of Phaeodactylum tricornutum ในวารสาร J Phycol 4 ปี 1968 หน้า 349–55 เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของสายพันธุ์นี้และการเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารช่วงเริ่มต้นไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยง pH ที่เหมาะสมพบว่าเป็น 8.0 พิจารณาจากอุณหภูมิที่สายพันธุ์นี้เติบโตได้ดีในช่วง 30-40°C

Zbigniew Tukaj และคณะได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเม็ดสีและศึกษาวงจรเซลล์จากกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armatus* โดยในงานวิจัยนี้ศึกษา cell cycle และรูปแบบของรงควัตถุ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ของสาหร่าย จากช่วงที่ให้แสงในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ซึ่งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในการทดลองนี้ ได้คัดแยกจาก phytoplankton ที่พบทางตอนใต้ของทะเลบาลติก และเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal Bold medium (BBM) โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Batch

Lu Chen และคณะได้ศึกษาสภาวะและวิธีการต่างๆ ที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่เพาะเลี้ยงในระบบบ่อเปิด พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวตะกอนเซลล์ได้ถึง 97.4% หลังจากที่ปรับ pH เป็น 11.5 แล้วทิ้งไว้ 10 นาที โดยไม่ต้องเพิ่มสารรวมตะกอน สารรวมตะกอนชนิด $FeCl_3$ และไคโตซาน (Chitosan) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของตะกอนที่ดีในปริมาณ 0.15 และ 0.08 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยไม่ต้องปรับค่า pH ในการเพาะเลี้ยง เมื่อมีการปรับ pH เป็น 6 และเติมสารส้ม 0.1 กรัม/ลิตร พบว่าประสิทธิภาพของการเก็บเกี่ยวตะกอนเพิ่มขึ้นจาก 49.74% เป็น 90.63% และสังเกตได้ว่าหลังจากที่เพิ่ม $A_{l2}(SO_4)_3$ ปริมาณ 0.1 กรัม/ลิตร ตามด้วยการปรับ pH ประสิทธิภาพของการเก็บเกี่ยวตะกอนจะเพิ่มขึ้นจาก 68.18% เป็น 92.84% ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ที่เหมาะสมที่สุด

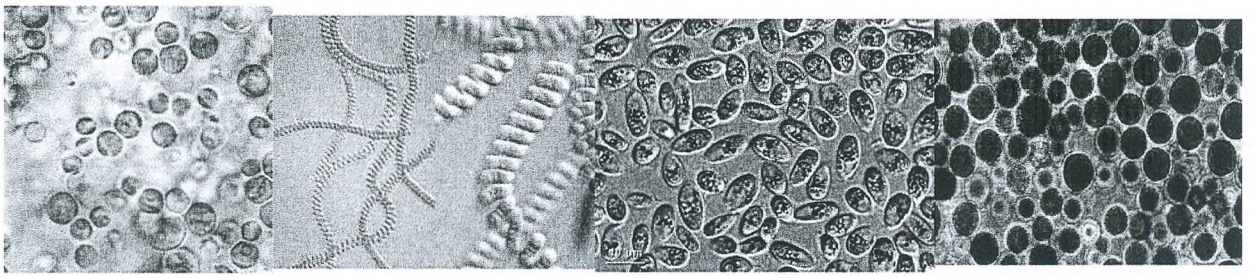
นอกจากนี้ยังมียังมีงานวิจัยอื่นๆ อีกดังแสดงในตารางที่ 2.2

2.5 การสกัดสาร

การสกัดสารสำคัญทางชีวภาพจากวัตถุดิบทางธรรมชาติและสาหร่ายมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีดั้งเดิมด้วยวิธีการสกัดด้วยชุด soxhlet การแช่หรือเขย่าด้วยสารอินทรีย์ การสกัดด้วยคลื่นเสียงช่วยในการสกัด การสกัดด้วยน้ำที่สภาวะกึ่งวิกฤติ การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยวดยิ่ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมียังมีงานวิจัยอื่นๆ อีกดังแสดงในตารางที่ 2.2 วิธีการสกัดที่ให้ได้ปริมาณสารที่ต้องการในปริมาณมากที่สุดถือว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ต้องการสกัดนั้น

2.6 สารสำคัญในสาหร่าย

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ประเภทอาหารเสริมที่เกิดจากสาหร่ายมีมากมาย เนื่องจากสาหร่ายหลายชนิดสามารถนำพลังงานแสงอาทิตย์ซึ่งผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตสารชีวภาพมากระตุ้นให้ผลิตสารบางอย่างที่มีมูลค่าทางการค้า เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน รงควัตถุ (pigments) หรือสารเคมีอื่นๆ นอกจากนี้ได้ผลผลิตมวลชีวภาพของจุลสาหร่ายต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าการปลูกพืชทั่วไป (สรวิศ เผ่าทองศุข 2543) ตัวอย่างเช่น สาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella*) สไปรูลินา (*Spirulina*) ดูนาลิเอลลา (*Dunalliella*) และ ฮีมาโตคอกคัส (*Haematococcus pluvialis*) ในขั้น cyst cell ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ในสไปลูลินา พบกรดไขมัน สารสีแคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโปรตีนจำพวกไฟโคไซยานิน ในดูนาลิเอลลา พบสารเบตาแคโรทีน กลีเซอรอล โปรตีน ในฮีมาโตคอกคัสจะพบสารแอสตาแซนทินซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าวิตามินอีหลายร้อยเท่า เป็นต้น (Plaza และคณะ 2010, Ruen-ngam และคณะ 2011, Ruen-ngam และคณะ 2012) นอกจากนี้นักวิจัยในปัจจุบันพยายามหาสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างงานวิจัยที่ได้สำรวจโดยใช้ขอบเขตเกี่ยวกับสาหร่ายที่สามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระแสดงดังตารางที่2.2



Chlorell *Spirulina* *Dunalliella* *Haematococcus*

รูปที่ 2.2 สาหร่ายที่มีการนำมาทำผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

2.7 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้คือ ความสามารถในการจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดจาก 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) DPPH คืออนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเลคตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังสมการเมื่ออนุมูลอิสระได้รับอะตอมไฮโดเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

ดังนั้นความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดยในการทดสอบนี้จะให้ DPPH (มีสีม่วงเข้ม) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนดอาจประมาณ 30 นาที ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (Brand-Williams และคณะ 1995, Kuda และคณะ 2006)

ตารางที่ 2.1 แสดงปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
1. Wu Yin-Hu และคณะ 2012	Column air-lift photobioreactors ขนาด 80 L	อาหาร BG11 100% โดยใช้ $NaNO_3$ 1.5 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน และ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 40 mg/L เป็นแหล่งฟอสฟอรัส	เติมอากาศโดยใช้ bubbling อัดอากาศผ่าน spargers ด้านล่างเครื่อง photobioreactors ในอัตรา 10-15 ลิตร/นาที	- ให้แสงสว่างภายนอกด้วยหลอด Fluorescent 4 หลอด ทางด้านขวาและซ้าย ความเข้มแสง 1,900-2,000 LX - dark ratio 14:10	- อุณหภูมิ 30-35 °C	การให้อาหารสูตรจำกัดฟอสฟอรัสทำให้มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของการผลิตชีวมวลฟอสฟอรัสถึง 160 กรัมชีวมวล/กรัมฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นเกือบ 6 เท่าของการให้สารอาหาร

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
2. Lu Chen และคณะ 2013	ระบบบ่อเปิดขนาดใหญ่ประมาณ 2.5 m^3	Basal Bold's medium (BBM)	-	แสงธรรมชาติ	- ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 M และกรดไฮโดรคลอริก 1 N ปรับ pH ช่วง 7.5-12.5 - ทดลองใช้สารช่วยตกตะกอน 6 ชนิด ได้แก่ ไคโตซาน, PAM, สารส้ม, $Al_2(SO_4)_3$, $Ca(OH)_2$, $FeCl_3$ - ความเข้มข้นของชีวมวลสาหร่ายที่ส่งผลต่อการตกตะกอน ใช้ที่ 0.23, 0.41, 0.53, 0.66 g/L - เวลาในการตกตะกอน ได้แก่ 2, 5, 10, 30, 60, 120 นาที	- ได้ตะกอนเซลล์มากที่สุด 97.4% เมื่อปรับ pH เป็น 11.5 ใช้เวลาตกตะกอน 10 นาที โดยไม่ต้องเติมสารช่วยตกตะกอน - $FeCl_3$ และไคโตซานมีประสิทธิภาพในการช่วยตกตะกอน 0.15 g/L และ 0.08 g/L ตามลำดับ โดยไม่ต้องปรับ pH ให้เป็นกรด - ตะกอนจะเพิ่มจาก 49.74% เป็น 90.63% เมื่อปรับ pH เป็น 6 และเพิ่มสารส้ม 0.1 g/L - ตะกอนจะเพิ่มจาก 68.18% เป็น 92.84% หลังจากเติม $Al_2(SO_4)_3$ 0.1 g/L แล้วปรับ pH เป็นกรด

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
3. Muthu Arumugam และคณะ 2013	ฟลาสก์ Erlenmeyer ขนาด 1,000 ml เติมอาหารปริมาณ 300 ml	ดินสกัดที่มีการปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสม โดยใช้ 6 แหล่ง ได้แก่ Potassium nitrate, Sodium nitrate, Urea, Calcium nitrate, ammonium nitrate, ammonium chloride ที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 15, 20 mM	-	Light-dark cycle 14:10	- เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิห้อง - ขวดเพาะเลี้ยงจะถูกเขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้งเพื่อหลีกเลี่ยงการเกาะติดพื้นผิวขวด - ระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่มีการเติม CO_2 จากภายนอก	- มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เมื่อสาหร่ายมีความเข้มข้นต่ำกว่า 5 และ 10 mM - Nitrate เป็นรูปแบบที่ต้องการในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและ Potassium 0.32 g/L, Sodium nitrates 0.28 g/L ทำให้ชีวมวลของ *Scenedesmus* เจริญได้ดี - Urea 0.25 g/L ทำให้ชีวมวลเจริญเกือบเท่าการใช้ nitrate ทำให้ประหยัดสำหรับการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
4. Li Xin และคณะ 2010	ฟลาสก์ ขนาด 250 ml เติมอาหารปริมาณ 100 ml (ใช้หัวเชื้อ 1 ml)	อาหาร BG11 ที่ปรับสูตรโดยใช้ NO_3-N และ PO_4-P เป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0 mg L^{-1} และความเข้มข้นของแหล่งฟอสฟอรัสที่ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg L^{-1}	-	- Light/dark ratio 14:10 - ความเข้มแสง 55-60 µmol photon•m^{-2} s^{-1}	- อุณหภูมิ 25 °C	- การเจริญเติบโตของ *Scenedesmus* sp. LX1 เป็นไปตามรูปแบบสมการ Monod - ในสภาวะจำกัดไนโตรเจน 2.5 mg L^{-1} หรือฟอสฟอรัส 0.1 mg L^{-1} สามารถสะสมไขมันได้สูง 30% และ 53% ของชีวมวลสาหร่ายตามลำดับ

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
5. Li Xin และคณะ 2010	ฟลาสก์ ขนาด 250 ml เติมอาหารปริมาณ 100 ml	ปรับปรุงจากสูตรอาหาร BG11 50% โดยปรับ TN 15 mg L^{-1} และ TP 1.3 mg L^{-1} (จำลองความเข้มข้นตามไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งที่สอง) เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ $NaNO_3$, NH_4Cl, Urea ใช้ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (9.6 mg L^{-1}) เป็นแหล่งฟอสฟอรัส นอกนั้นสารอาหารอื่นเหมือนกับ BG11 50%		- Light/dark ratio 14:10 - ความเข้มแสง 25 µmol photon$\cdot m^{-2} s^{-1}$	- อุณหภูมิ 25 °C - เปรียบเทียบค่า pH เริ่มต้น โดยปรับให้เป็น 3.9, 5.3, 6.0, 7.3, 8.4, 10.3 โดยใช้สารละลาย HCl 0.1 M หรือสารละลาย NaOH 0.1 M	- การใช้ Ammonium เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายสูงสุดแต่มีการใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสค่อนข้างต่ำ คือ 31.1% และ 76.4% ตามลำดับ - Nitrate หรือ Urea เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีและใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ไนโตรเจน 90% และฟอสฟอรัสเกือบ 100%)

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
6. Zbigniew Tukaj และคณะ 2003	การเพาะเลี้ยงแบบ batch	สูตร Basal Bold medium (BBM)	ให้อากาศด้วยอากาศจากบรรยากาศที่อุดมด้วยคาร์บอนได ออกไซด์ (2%) อากาศนี้ได้รับการฆ่าเชื้อผ่านตัวกรอง (Sartorius 2000; 0.2 ไมโครเมตร PTFE)	ให้แสง 14 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 10 ชั่วโมง ด้วยหลอดไฟสีขาว Philips TLD 36W/94	-	- มีการผลิตออกซิเจนวัดโดย Clark-type electrode สูงสุดที่ 12 ชั่วโมงแล้วค่อยๆ ลดลงไปยังจุดสิ้นสุดของวัฏจักรของเซลล์ - ปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากที่เริ่มให้แสงซึ่งสูงสุดในชั่วโมงที่สาม หลังจากนั้นก็ลดลงจนถึงสิ้นสุดวัฏจักรของเซลล์ - แคโรทีนอยด์ที่มากที่สุดคือลูทีน รองลงมาคือ α-carotene,β-carotene, loroxanthin, violoxanthin, neoxanthin , zeaxanthin และ antheraxanthin

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
7. Li Xin และคณะ 2010	ฟลาสก์ Erlenmeyer ขนาด 500 ml เติมอาหารปริมาณ 200 ml	50% BG11 medium	-	ความเข้มแสง 55-60 μmol photon/m^2/s อัตราการให้แสงและไม่ให้แสงคือ 14 ชั่วโมงต่อ 10 ชั่วโมง	- ควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 10, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส - ความชื้นสัมพัทธ์ 75 %	*Scenedesmus* sp. LX1 สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่ 10-30 องศาเซลเซียส และพลังงานกระตุ้นการเจริญเติบโตเท่ากับ 49.3 กิโลจูล/โมล อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและไขมันคือ 20 องศาเซลเซียส และหลังจาก 15 วันของการเพาะเลี้ยงแบบ batch ได้ผลผลิตชีวมวล 313.3 กรัม ไขมัน 112 กรัม และ TAGs 14.7 กรัม

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
8. Shih-Hsin Ho และคณะ 2014	photo-bioreactor (PBR)	Detmer's Medium (DM)	อัตราการกวน 300 rpm	หลอดไฟfluorescent ที่แตกต่างกัน ได้แก่ TL5, T8, และหลอด helix ที่ความเข้มแสงตั้งแต่ 30-600 μmol photon/m^2/s	30 องศาเซลเซียส และ pH 6.0	ในการศึกษานี้ ได้นำปัจจัยลักษณะของแสงมาทดสอบอิทธิพลการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตลูทีนของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* FSP-3 ผลการทดลองได้อธิบายว่าการใช้หลอดไฟ LED สีขาว ให้ผลผลิตลูทีนได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดไฟ LED สีอื่นๆ (สีแดง, สีฟ้าและสีเขียว)

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
9. Shih-Hsin Ho และคณะ 2012	photobioreactor	Detmer's Medium (DM) ประกอบด้วย (g L^{-1}) $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 1.00; KH_2PO_4, 0.26; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.55; KCl, 0.25; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02; EDTA•2Na, 0.2; H_3BO_3, 0.0029; $ZnCl_2$ 1.1 $x10^{-4}$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1.81x 10^{-3}; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 1.8 $x10^{-5}$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 8.0x 10^{-5}	กวนที่ 300 rpm	14W TL5 tungsten filament lamps; Philips Co., Taipei, Taiwan	28 °C, pH 6.2, Serving as the sole carbon source, 2.5%CO_2 with 0.4 vvm	งานนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตไขมัน / คาร์โบไฮเดรตของ *Scenedesmus obliquus* CNW-N มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยการให้ความเข้มของแสงที่เหมาะสม (เช่น 420 µmol m^{-2} s^{-1}) และงดการให้ไนโตรเจน ความยาวนานของการงดให้ไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสำคัญต่อการสะสมของไขมัน/คาร์โบไฮเดรต อัตราการใช้ CO_2 สูงสุดและผลผลิตของชีวมวล ไขมันและคาร์โบไฮเดรตที่ได้รับเป็น 1420.6, 840.6, 140.4 และ 383.4 mgL^{-1} d^{-1} ตามลำดับ องค์ประกอบหลักของคาร์โบไฮเดรตและไขมัน คือ น้ำตาลกลูโคสและกรดโอเลอิค ซึ่งเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซล และไบโอเอททานอล

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
10. Hanaa H. El Baky และคณะ 2012	เพาะเลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 4L	N-9 (Borowitzka, 1988) เสริมด้วย Fe^{3+} at 0.0, 2.5, 5, 10 และ 20 mg/L (FeCl3)	ผสม CO_2 เข้ากับอากาศแวดล้อมที่ระดับ 0.3%, 3.0%, 9.0% และ 12% ตามลำดับ	10 หลอดfluorescent (Toshiba FL 40T8D/36) (ประมาณ 200 $\mu Em^{-2}s^{-1}$)	pH 7.0	การสะสมของไขมันเป็น 38% และ 28% ใน *Scenedesmus obliquus* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ให้ CO_2 12% หรือเสริมด้วย 10 mg $Fe^{3+/}$/L ตามลำดับ ไบโอดีเซลที่ผลิตจาก *Scenedesmus obliquus* มีปริมาณ C16:0 และ C18:1 สูง และมีปริมาณของ PUFA (C18:2, C18:3) methyl esters ต่ำ ไบโอดีเซลที่ได้ได้รับการยอมรับในค่าที่ต่ำมากของ IV, AV, PV, ความหนาแน่น, ความหนืด และ ความมั่นคงสูงต่อการ oxidative ดังนั้นไขมันดิบที่ได้รับจาก *Scenedesmus obliquus* อาจจะเป็นวัตถุดิบที่มีแนวโน้มสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

ผู้แต่ง	สภาวะที่เพาะเลี้ยง					ผลการทดลอง
	ลักษณะการเพาะเลี้ยง	สารอาหาร	ลักษณะการให้อากาศ	ลักษณะการให้แสง	ปัจจัยอื่น	
11. Liang Wang และคณะ 2013	ภายในห้องปฏิบัติ-การใช้ glass columns ภายนอกห้องปฏิบัติการณ์ใช้ glass panel photobioreactors โดยมีอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิและให้ CO_2	BG-11 medium	ให้ฟองอากาศที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 2%	แสงภายในห้องปฏิบัติการณ์และการให้แสงกลางแจ้งตามสภาพแวดล้อมแสงแดดธรรมชาติ	25 ± 2°C	ด้วยการควบคุมการให้ไนโตรเจน และความเข้มแสงสูงตลอดจนความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้นต่ำ แสดงให้เห็นว่าผลิตผลที่สูงที่สุดของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เป็น 0.2 และ 0.7 g L^{-1} d^{-1} ตามลำดับ อาจจะให้รับในช่วงเริ่มต้นของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ในขณะที่อัตราการผลิตไขมันสูงสุดอยู่ที่ 0.17 g L^{-1} d^{-1} จะเกิดขึ้นในรอบวันที่ 4 หรือ 6 ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 2.2 แสดงตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารต่างๆ จากสาหร่ายสีเขียว

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
1. M.D. Macias – Shachez และคณะ	*Dunaliella salina*	- Carotenoids - Chlorophyll a	วิธี Supercritical fluid extraction (SFE) โดยบรรจุตัวอย่างสาหร่าย 0.1 กรัมที่ผ่านการ homogenize แล้ว เพื่อรักษาความหนาแน่นให้คงที่ ซึ่งจะใช้ในทุกการทดลอง จากนั้นที่บรรจุตัวอย่างจะถูกนำเข้าไปในเครื่องสกัดและใช้เวลา 15 นาที ในการไปถึงอุณหภูมิที่ต้องการ เครื่องสกัดจะได้รับแรงดันจากการปั๊ม CO_2 หลังจากนั้น micrometric valve จะถูกเปิดออกและคงอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของทุกการทดลองคือ 4.5 mmol/min และใช้เวลาในการสกัด 180 นาที หลังกระบวนการสกัด ตัวทำละลายจะถูกเอาออกด้วยไนโตรเจนที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์จากการสกัดถูกละลายในเมทานอล 5 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปราศจากแสง จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์	ความเข้มข้นสุดท้ายของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตรจากตัวอย่าง	-	งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการสกัด 2 วิธี คือ SFE และ UAE โดยการสกัดแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์จาก *Dunaliella salina* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธี SFE และ UAE สามารถเปรียบเทียบกันได้เมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย กระบวนการ SFE สามารถพบแคโรทีนอยด์ได้มากกว่าเทคนิคทั่วไป เนื่องจากว่าวิธีนี้จะได้อัตราส่วนของแคโรทีนอยด์ต่อคลอโรฟิลล์สูงกว่า

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
			วิธี Ultrasound assisted extraction (UAE) โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอล และ DMF ขั้นตอนแรก นำตัวอย่าง 0.105 กรัม ของสาหร่ายแห้งที่ถูกผสมในตัวทำละลาย 5 มล. นำตัวอย่างไป sonicated เป็นเวลา 3 นาที ในเครื่องอัลตราซาวด์และเก็บ 24 ชม. ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงและกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ปราศจากแสง			

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
2.A.Catarina Guedes และคณะ	*Scenedesmus obliquus*	- Carotenoids - Chlorophyll a , b และ c	<u>วิธี SFE</u> ใช้ CO_2 ในทุกการทดลอง CO_2 จะถูกปั๊มภายใต้ความดันและอุณหภูมิที่ต้องการ ที่อัตราการไหล 2 กรัมต่อนาที ตัวถูกละลายจะถูกเก็บไว้ในหลอดรูปตัว U และปริมาณของตัวถูกละลายจะประเมินโดย gravimetry เมื่อสิ้นสุดในแต่ละการทดลอง สารที่เหลืออยู่ในท่อจะล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นฉีดเอทานอลผ่านเข้ารูนำสารตัวอย่างสารที่สกัดได้ทุกตัวจะเก็บภายใต้ไนโตรเจน ที่ 20 องศาเซลเซียส ปราศจากแสง	ชั่งน้ำหนักสารสกัดและละลายใน 90 % (ปริ - มาตร/ปริมาตร) อะซิโตน วิ - เคราะห์ผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง	-	การทดลองศึกษาอิทธิพลของความดัน อุณหภูมิ อัตราการไหลของคาร์บอนไดออกไซด์ และตัวทำละลายร่วมที่มีขั้วจากปริมาณของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์ในการสกัดแบบ SFE จากสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* พบว่าสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์มากคือที่ความดัน 250 บาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเมื่อใช้คาร์บอนไดออก-ไซด์อย่างเดียว ปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยด้วยความดัน แต่จะลดลงด้วยอุณหภูมิและอัตราการไหลของ CO_2 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอสูงสุดคือ 4.3 กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อนาที ในกรณีที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม ปริมาณคลอโรฟิลล์จะเพิ่มขึ้นทั้งหมด ยกเว้นคลอโรฟิลล์ซี

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
3. M.D. Macias – Shachez และคณะ	*Scenedesmus almeriensis*	- Lutein - β - carotene	<u>วิธี SFE</u> โดยใช้ตัวทำละลายคาร์บอนไดออกไซด์ ในการสกัดแต่ละรอบจะใช้ตัวอย่าง 38 กรัม (ประกอบด้วยชีวมวลและ alumina ผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน) จากนั้น CO_2 เริ่มไหลที่ 1 กรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ต้องการ ใช้เวลาในการสกัด 5 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะละลายด้วยอะซิโตนและเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ปราศจากแสงก่อนจะนำไปวิเคราะห์ต่อ	วิเคราะห์โดย HPLC	- ความดัน 200-600 บาร์ - อุณหภูมิ 32-60 องศาเซลเซียส	การทดลองได้ศึกษาอิทธิพลของความดันและอุณหภูมิในการสกัดลูทีนและเบต้าแคโรทีน จาก freeze-dried powder ของสาหร่าย *Scenedesmus almeriensis* โดยวิธี SFE พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือที่ความดัน 400 บาร์ และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งในการสกัดพบปริมาณเบต้าแคโรทีนมากที่สุด สกัดได้มากถึงร้อยละ 50 ของสาหร่ายที่ศึกษา

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
4. Victor Abrahamsson และ คณะ	*Scenedesmus* sp.	- Astaxanthin - β–carotene - Lutein - Neoxanthin - violaxanthin - zeaxanthin	<u>วิธี SFE</u> - แคโรทีนอยด์จากสาหร่ายถูกสกัดโดยใช้ SFE - ระบบประกอบด้วย Syringe–pump ISCO 260D ใช้ในการสูบ CO_2 เหลว, Waters 515 HPLC–pump ใช้สูบเอทานอล, HP 5896 gas–chromatography ใช้เป็นเตาอบ, Tescom 26–1700 back–pressure regulator (BPR) และ Eltherm ELTC/3 thermoregulator ใช้ในการทำความร้อนใน BPR และในหลอดเก็บ - ปั๊มที่ใช้สูบ CO_2 เหลว ทำความเย็นด้วยเครื่องหล่อเย็น Neslab RTE7 - สาหร่ายแช่แข็ง *Scenedesmus* sp. ถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวก่อน	<u>วิธีโครมาโตกราฟี</u> ใช้ Thar Investigator semi–preparatine SFC การสกัดแคโรทีนอยด์ใช้ 2 คอลัมน์ในชุด SunFire C18 ตามด้วยคอลัมน์ viridis SFC silica 2-ethylpyridine โดยใช้ CO_2 เหลว และเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ เพื่อแยกแคโรทีนอยด์ในสาร-	- วิธี SFE ที่ความดัน 300 บาร์ อุณหภูมิ 60^0C - วิธีโครมาโตกรา- ฟีที่ความดัน 120 บาร์ อุณหภูมิ 32^0C	- วิธีการโครมาโตกราฟีแบบใหม่สำหรับการแยกแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายโดยใช้ SFC ได้รับการพัฒนาและตรวจสอบ โดยการใช้คอลัมน์ 2 ตัวในชุด C18 และคอลัมน์ 2–EP ซึ่งสามารถแยกส่วนผสมมาตรฐานของ astaxanthin, β–carotene, canthaxah-thin, echinenone, lutein, neoxanthin, violaxanthin และ zeaxanthin ในเวลาน้อยกว่า 10 นาที - Astaxanthin, β–carotene, lutein, neoxanthin, violaxanthin และ zeaxanthin ถูกแยกเมื่อปรับวิธีการในระบบ SFE และนำไปใช้กับตัวอย่างจริงที่ได้จากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. - ถูกตั้งข้อสังเกตว่าอุณหภูมิมีผลกระทบสำคัญในการคัดเลือกของการแยก

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
			นำมาสกัด - ชั่งสาหร่าย 1 กรัม และทำการสกัดแคโรทีนอยด์โดยใช้ระบบที่สร้างขึ้นคือ SFE - สาหร่ายถูกสกัดด้วย CO_2 (ความหนาแน่น 830 g/l) โดยมีหรือไม่มีเอทานอล 10% เป็นตัวทำละลายร่วม ที่ความดัน 300 บาร์ อุณหภูมิ 60^0 C อัตราการไหล 2 มล./นาที ใช้เวลาสกัด 60 นาที ความดันและอุณหภูมินี้เป็นสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับ SFE ของ *Scenedesmus almeriensis* - สารสกัดที่ได้จะถูกเก็บในภาชนะป้องกันแสงและวางไว้บนน้ำแข็ง - เอทานอลจะถูกเติมลงในสารสกัดสุดท้าย 10 มล.	สกัด จะไล่ระดับการใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วมเริ่มต้น 10% และเพิ่มถึง 17% ในช่วง 8 นาที ต่อมาเพิ่มถึง 25% ในช่วง 2 นาที และเก็บไว้ 5 นาที ใช้ back-pressure 120 บาร์ อุณหภูมิ 32^0C อัตราการไหล 5 มล./นาที ปริมาณการฉีด 50 ลิตร แต่ละ peak วัดความยาวคลื่นที่สามารถดูดซึมได้สูงสุด		- การพัฒนาวิธีการโครมาโตกราฟีที่ใช้กับ CO_2 และเมทานอลโดยเฉพาะ เป็นทางเลือกที่ยั่งยืนสำหรับ HPLC ในการแยกคอลัมน์ C18 หรือ C30 โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
5. Hong-Wei Yen และคณะ	*Scenedesmus* sp.	Lutein	<u>วิธี SFE</u> - การทดลองดำเนินในแบบ Speed SFE model 7070 ซึ่งมีการติดตั้งปั๊มสูบ CO_2, Oven extractor และ Wet gas meter - ใช้ชีวมวลแห้ง 1 กรัม แล้วปั่น (homogenized) เพื่อรักษาความหนาแน่นให้คงที่ จากนั้นนำสารสกัด ใส่ลงใน Oven extractor เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันและอุณหภูมิที่กำหนด เมื่อเกิดความสมดุล ตัวควบคุมอุณหภูมิจะถูกเปิด (170^0c) จนกระทั่งอัตราการไหลคงที่ที่ 750–800 มล./นาที การสกัดจะทำในเวลา 1 ชั่วโมง - สารสกัดถูกเก็บไว้ในหลอดแก้วที่มีเมทานอลเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสูญเสียจากการไหลของ CO_2 - หลังจากขั้นตอนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ ตัวทำละลายจะถูกกำจัดด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50^0C	ใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ผลวิธีการสกัดสารอินทรีย์ธรรมดาจะใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสำหรับใช้ในการเปรียบเทียบกับอัตราผลผลิตของปริมาณลูทีนที่ได้รับโดยวิธีการ SFE ของเหลวจากการเพาะเลี้ยง 5 มล. จากถังหมักถูกถ่ายโอนไปยังหลอดรูป	-	- การประยุกต์ใช้ SFE ในการสกัดลูทีน เป็นกระบวนการสีเขียวที่ลดค่าใช้จ่ายในการซื้อตัวทำละลาย - การเพิ่มอุณหภูมิและความดันจะช่วยเพิ่มผลผลิตของลูทีน แต่อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น สังเกตจากการวิเคราะห์ HPLC - เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดลูทีนจากผงเซลล์แห้งของสาหร่าย *Scenedesmus* - อัตราผลผลิตของลูทีนที่ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือ การทำ SFE 76.7% (ความดัน 400 บาร์, อุณหภูมิ 70^0C และใช้เอทานอล (30 mol(%) เป็นตัวทำละลายร่วม) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยเมทานอลแบบเดิม

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
			- สารสกัดที่เหลือถูกละลายในเมทานอล (30 มล.) สำหรับวิเคราะห์ HPLC ในภายหลัง	กรวย 15 มล. นำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมเมทานอล 5 มล. เพื่อสกัดลูทีน นำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยง 8,000รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4^{0}C วิเคราะห์ ลูทีน ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ N50DS ที่อุณหภูมิห้อง 27 ± 1^{0}C คอ- ลัมน์จะถูกนำกลับมาในช่วง 6 นาที ก่อนจะมีการฉีดตัวอย่างใหม่ที่อัตราการไหล 1 มล./นาที ใช้ UV detector 450 นา		

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
				โนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่นของแสง (OD 560 nm) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) เป็น DCW (g/L) = 0.8939 × OD_{560} − 0.0351		

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
6. Ming-Chang Chan และคณะ	*Scenedesmus obliquus* CNW-N	Lutein	<u>การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์</u> - ในการทดสอบชุดแรกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 7 ตัวคือ acetone, petroleumether, n-hexane, diethyl ether, chloroform, dichoromethane, methanol - อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผสมตัวอย่างเป็น 2:1 (v/v) - ปั่นเหวี่ยง 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2-3 นาที เก็บส่วนใส - ในการทดสอบครั้งที่ 2 เป็นการทดสอบ 2 ตัวทำละลาย 2 ตัวที่ดีที่สุด เช่น dichloromethane และ diethyl ether ถูกนำมาใช้สำหรับหลายการทดสอบการสกัด สุดท้ายตัวทำละลายที่ดีที่สุด (เช่น diethyl ether) ถูกนำมาใช้เพื่อให้ได้ปริมาณลูทีนสูงสุด - หาปริมาณลูทีนที่สกัดได้โดยใช้ HPLC	<u>วิธีโครมาโตกราฟี</u> - การแยกใช้คอลัมน์ YMC Carotenoid RP-30 - ใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ตัว ประกอบด้วย 1. ddH_2O 3% ในเมทานอลที่มีแอมโม- เนียมอะซิเตท 0.05 M 2. TBME (tert-butyl methyl ether) 100% ทั้ง 2 เฟสมี BHT 0.1% (w/v) และ triethylamine (TEA) 0.05% - สารสกัดลูทีนจะถูกชะที่อัตราการ		- งานนี้นำไปสู่การปรับปรุงลูทีนที่มีประสิทธิภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย - วิธีการสกัดแบบเดิมได้รับการปรับปรุงให้เข้ากับการสกัดแอโรทีนอยด์โดยใช้อีเทอร์ (diethyl ether) เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด - วิธีการหยุดชะงักเซลล์โดย bead-beater มีประสิทธิภาพในการรักษาลูทีนสูงกว่าวิธีอื่น 5 เท่า - ในการเพิ่ม BHT 0.01% ทำให้ลูทีนกว่า 90% สามารถเก็บได้ประมาณ 80 วัน ที่อุณหภูมิ $4^{0}C$ - ลูทีนจะสลายตัวได้เร็วขึ้นในที่ที่มีแสงและการมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นสามารถลดการสลายตัวได้

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
				ไหล 1 มล./นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220-750 nm ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดคือ 450 nm <u>วิเคราะห์ทางสถิติ</u> -ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ทางเดียว ANOVA)ตัวแปรการวิเคราะห์คือการหยุดชะงักของเซลล์, ความเข้มข้นของ KOH และเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา		

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
7. Lingzhao Wang และคณะ	*Haematococcus pluvialis*	Astaxanthin	วิธี SFE ในงานนี้ 240 กรัมของตัวอย่างที่มีน้ำหนักถูกต้องและใส่ลงใน extractor vessel ขนาด 1 L เวลาสกัดรวมถูกกำหนดเป็น 3.5 ชั่วโมงโดยระยะเวลาการสกัดเริ่มต้นแบบคงที่เป็นเวลา 1 ชั่วโมงตามด้วยการสกัดแบบไดนามิกเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง อัตราการไหลของ supercritical carbon dioxide ถูกกำหนดให้เป็น 10 ลิตร / ชั่วโมง เอทานอลได้รับเลือกเป็น co-solvent และอัตราการไหลของ co-solvent ในระหว่างการสกัดแบบไดนามิกเป็น 2 ลิตร / ชั่วโมง ผลกระทบของปริมาณเอทานอล (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, และ 3.5 มิลลิลิตร / กรัมตัวอย่าง), ความดัน และอุณหภูมิ ที่มีต่อผลผลิตของ astaxanthin จาก *H. pluvialis* ได้รับการตรวจสอบ ตามการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด สารสกัดที่เตรียมภายใต้สภาวะของ	เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดของเหลว supercritical จำนวนทั้งหมดของ astaxanthin ใน *H. pluvialis* ถูกกำหนดโดยใช้แบบธรรมดา Soxhlet apparatus ที่ 0.5 กรัมของสาหร่าย *H. pluvialis* ถูกสกัดด้วย 250 มล ของ acetone ใช้ Soxhlet apparatus 6 ชั่วโมงจนสีของตัวทำละลายควบแน่นที่ด้านบนของตัวเครื่องได้ชัดสารสกัดถูก saponificated และวิเคราะห์ด้วย HPLC ประสิทธิภาพการสกัดถูกกำหนด	- ความดัน 30, 35, 40, 45, และ 50MPa - อุณหภูมิ (35, 45, 55, 65, และ 75 ° C)	สกัด astaxanthin จาก *H. pluvialis* โดยวิธี SFE สารสกัดไว้ต่อสิ่งกระตุ้นจากออกซิเจนและแสงสว่าง การเติมสารสกัดในน้ำมันดอกทานตะวันที่ทำ มีผลอย่างนัยสำคัญ (P <0.05) ในการเพิ่มขึ้นของเสถียรภาพการออกซิเดชันของตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำ และยับยั้งผลกระทบของการเกิด peroxide ในสารสกัดที่สูงขึ้น ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นอย่างมีนัยสำคัญ (P <0.05) ความต้านทานต่อการเกิดออกซิเดชันที่อุณหภูมิขณะทอดที่ 180 ° C และการปรับปรุงการเติมสารสกัดในน้ำมันดอกทานตะวันที่ไม่สามารถมีประสิทธิภาพป้องกันการเกิดออกซิเดชันของตัวอย่าง เมื่อเกิดออกซิเดชั่น ผลในการทำงานนี้มีประโยชน์สำหรับการใช้ประโยชน์ที่กว้างขวาง

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
			co-solvent 2.3 มิลลิลิตร / กรัมของตัวอย่าง ความดัน 43.5 MPa อุณหภูมิ 65 ° C ถูกเก็บในขวดสีน้ำตาลสำหรับการทดลองต่อไป	โดยผลผลิตของ astaxanthin ซึ่งถูกกำหนดเป็นอัตราส่วนของปริมาณ astaxanthin ในปริมาณจากสารสกัดทั้งหมดในสาร		ของ *H. pluvialis* นอกจากนี้ astaxanthin เตรียมจากสารสกัดจะต้องบริสุทธิ์ในการใช้งาน

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
8. Bing-Chung Liau และคณะ	Microalgae	Carotenoids	<u>การสกัดแบบ Soxhlet</u> สาหร่ายที่ผ่านการ Freeze-dried (10.0 กรัม) ถูกโหลดลงใน 250 ml reflux type Soxhlet system และ สกัด 16 ชั่วโมงโดยใช้ 300 ml โดยใช้ตัวทำละลายตัวสามที่แตกต่างกัน พวกเขาใช้ n-hexane,ethanol and dichloromethane ตามลำดับ หลังจากการสกัด สารสกัดทั้งหมดถูกทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศและตกตะกอนเพื่อให้ได้สารสกัด ตัวอย่างที่สกัดได้ถูกเก็บไว้ที่ 253K จนกว่าจะการวิเคราะห์ <u>วิธี SFE</u> อัตราการไหลของก๊าซ supercritical CO_2 ถูกรักษาไว้ที่อัตราการไหลคงที่ของ 10 และ 20 มิลลิลิตร / นาที co-solvent (ethanol or dichloromethane) ถูกเพิ่มเข้าไปใน $SCCO_2$ โดย LC pump	วิเคราะห์ด้วย HPLC อัตราการไหลของตัวชะคงที่ที่ 0.8 มิลลิลิตร / นาที ปริมาณการฉีดคือ 20μL และความยาวคลื่นการตรวจสอบและคอลัมน์อุณหภูมิถูกกำหนดให้ 450nm ที่ 303 K กำหนด elution ด้วยการ linear gradient ให้เหมาะสมดังนี้ : 0min, 10% A, 90% B, 0% *C;* 5min, 4% A, 81% B, 15% C; 25 min, 4% A, 81% B, 15% C; 55 min, 4% A, 31% B, 65% C ตามมาด้วย	-	Co-solvent ที่ดัดแปลงตัวทำละลาย $SCCO_2$ carotenoids และไขมัน จากสาหร่ายแสดงให้เห็นว่านอกเหนือจากการ co-solvents ที่เป็นสิ่งที่สำคัญในการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการสกัดของ carotenoids และไขมัน กระบวนการตกตะกอน $SCCO_2$ anti-solvent เป็นวิธีที่เป็นไปได้และรวดเร็วในการชำระล้าง carotenoids จากส่วนของ normal phase column chromatography (LC) ภายในไม่กี่นาที ในที่สุดความบริสุทธิ์ของ 93.8% Zeaxanthin ที่ถูกแยกออกมาจาก HPLC column chromatography ฤทธิ์ทางชีวภาพในการทดสอบในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมใน phagocytic activity ใน RAW 264.7 macrophages มีการควบคุมในเชิงบวกโดย ultrasonic water extract of the $SCCO_2$ ที่สกัดจาก *N.oculata.*

ผู้แต่ง	การสกัดสารจากสาหร่ายสีเขียว					ผลการทดลอง
	สาหร่ายสีเขียว	สารสกัด	วิธีการสกัด	การวิเคราะห์ผล	สภาวะที่ใช้สกัด	
			โดยเติมอย่างต่อเนื่อง ในตอนท้ายของการทดลอง ใช้ตัวทำละลายในการล้างสารสกัดออกจากเส้นท่อและผสมกับสารสกัด จากกนั้นตัวทำละลายจะถูกกำจัดออกโดยใช้เครื่อง vacuum rotary evaporator เพื่อให้ได้ตัวอย่าง ตัวอย่างถูกชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ที่ 253K ก่อนที่จะวิเคราะห์ <u>วิธี Ultrasonic</u> ตัวอย่างของเหลว 5 กรัมของผงสกัด $SCCO_2$ ถูกสกัดใน 50 มล. ของน้ำกลั่นที่ได้จากการใช้อุปกรณ์ ultrasonic กวนที่ (40 kHz ถึง 300 W) ดำเนินการกระบวนการที่ 308K มีความคล้ายคลึงกับ Chen et al. [14] เวลาการสกัดคือ 30 นาที หลังจากการสกัด สารละลายถูกกรองผ่านตัวกรอง 0.45 µm ด้วย syringe filter แล้วทำการ freeze-dried เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ตัวอย่าง	ช่วงเวลาคงที่ 10 นาที ระบุสารได้รับการยืนยันโดยเปรียบเทียบเวลากับ HPLC ด้วยมาตรฐาน การวิเคราะห์ ค่าสัม-ประสิทธิ์การถดถอย (R^2) ของ carotenoids ทั้งหมดมากกว่า 0.99		

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 หัวเชื้อ

3.1.1 หัวเชื้อ *Scenedesmus armatus* ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ สาขาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 เชื้อจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณบึงพระราม จังหวัดพระนครศรีอยุธยา แสดงภาพแหล่งน้ำในภาคผนวก ก

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (Super Clean, 120BS, Thailand)

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

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (WTB binder, ED53, Germany)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND, GF-800, Japan)

เครื่องเขย่า (Shaker)

เครื่องผสมสาร (Vortex) (VORTEX-Genie2, G560E, USA)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (HERMLE, Z326K, Germany)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10S UV-VIS, USA)

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

เครื่องปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 58W แรงลม 70 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.028 Mpa (Yamano, AP-40, China)

เครื่องปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 47W แรงลม 70/40 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.038/0.044 Mpa (Atman, HP-8000)

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus, CH30, Japan)

สไลด์นับเซลล์ ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

เดซิกเคเตอร์ (Desiccator)

คิวเวต (Cuvette) ขนาด 1 มิลลิลิตร

เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

กระบอกตวง (Graduated cylinder)

ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

ไมโครปิเปต (Micropipette)

ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ขนาด 0.8-1.2 ลิตร

สายยางขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร

หัวทรายทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร ยาว 2.5 เซนติเมตร

หัวทรายทรงกลม เส้นรอบวง 10 เซนติเมตร

ตัวต่อสายยางแบบ 3 ทาง และ 4 ทาง

ตัวต่อปรับปริมาณอากาศ

ท่อ PVC ขนาดต่างๆ และข้อต่อท่อ PVC

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ฟรีซดราย, freeze dry)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10S UV-VIS, USA)

เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer) (Heto, Lyolab 3000, Denmark)

เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (HERMLE, Z36HK, Germany) พร้อมขวดปั่นเหวี่ยง ขนาด 250 มิลลิลิตร

ตู้เย็นแช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (SANYO, Japan)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND, GF-800, Japan)

เครื่อง microplate reader (MF A062780, Labsystems, model)

สารเคมีที่ใช้

สำหรับเตรียมอาหาร BG11 (Blue-Green medium) (ภาคผนวก ข)

$NaNO_3$ K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ Citric acid Ferric ammonium citrate EDTA disodium magnesium salt Na_2CO_3 Trace element Agar (สำหรับเตรียมอาหารแข็ง) น้ำกลั่น

สำหรับเตรียมอาหาร N-8 medium (ภาคผนวก ข)

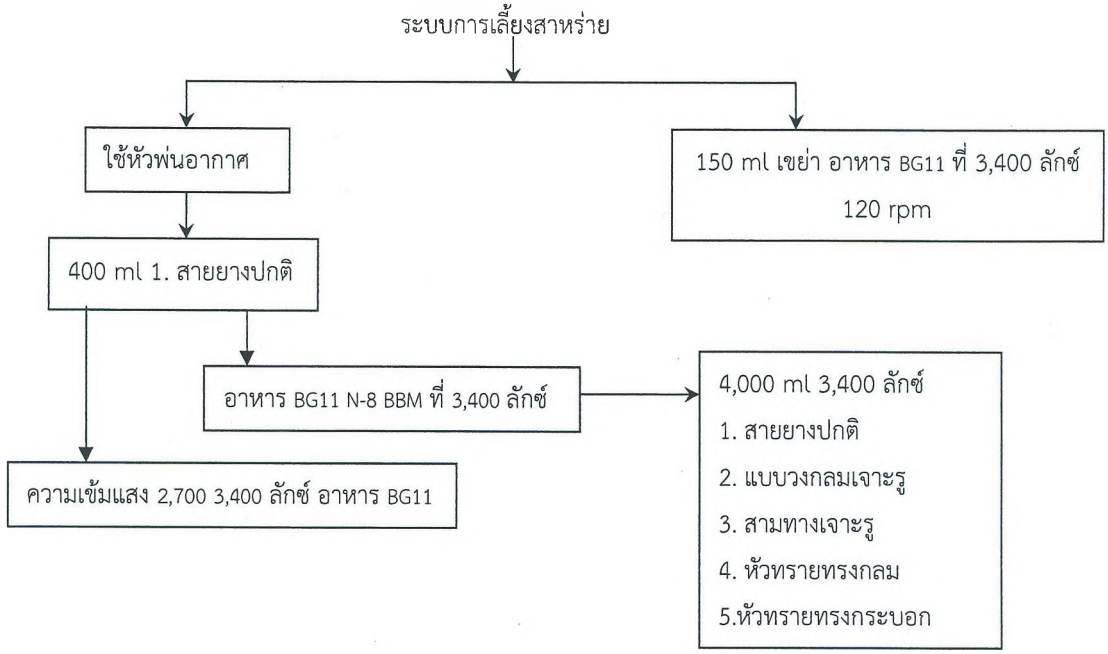
Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) Monopotassium phosphate (KH_2PO_4) Potassium nitrate (KNO_3) Ferric Ethylenediaminetetraacetic Acid (FeEDTA) Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 18H_2O$) Calcium chloride ($CaCl_2$) Trace element น้ำกลั่น

สำหรับเตรียมอาหาร BBM (Bold's Basal Medium) (ภาคผนวก ข)

$NaNO_3$ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ K_2HPO_4 KH_2PO_4 NaCl Trace element น้ำกลั่น

3.3 แผนผังการทดลอง

การทดลองทั้งหมดแสดงดังแผนผังในรูปที่ 3.1 และตัวแปรทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการทดลอง

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรที่ทำการทดลองทั้งหมด

ตัวแปร	ขนาดระบบ (ml)	ปริมาตรอาหาร (ml)	อัตราเร็วลม (ml/min)	ความเข้มแสง (lux)	สูตรอาหาร	ประเภทหัวพ่นอากาศ
ลักษณะการเลี้ยง *แบบเขย่า (ตั้งเดิม)*	250	150	- (เขย่า 120 rpm)	3,400	BG11	-
แบบระบบให้อากาศ						
ประเภทสูตรอาหาร	800	400	150	3,400	BG11, N-8, BBM	สายยางปกติ
ความเข้มแสง	800	400	80	2,700 และ 3,400	BG11	สายยางปกติ
ประภทหัวพ่นอากาศในระบบเล็ก	800	400	80	3,400	BG11	1. สายยางปกติ 2. แบบวงกลมเจาะรู 3. สามทางเจาะรู 4. หัวทรายทรงกลม 5.หัวทรายทรงกระบอก
ประภทหัวพ่นอากาศในระบบขยายขนาด	5,000	4,000	1,500	3,400	BG11	1. สายยางปกติ 2. แบบวงกลมเจาะรู 3. สามทางเจาะรู 4. หัวทรายทรงกลม 5.หัวทรายทรงกระบอก

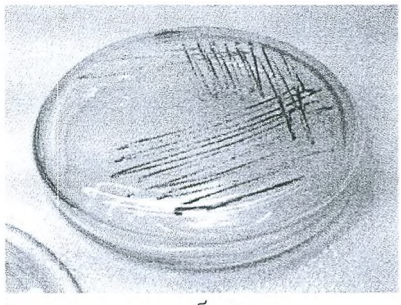
3.4 การติดตั้งระบบการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ในการเลี้ยงสาหร่ายดำเนินการเลี้ยงในระบบ 2 ระบบคือ ระบบแบบเขย่า และระบบแบบให้อากาศด้วยหัวพ่นต่างๆ ระบบทั้ง 2 มีการคลุมด้วยผ้าดำเพื่อป้องกันแสงรบกวนจากภายนอก ระบบให้อากาศมีการหัวพ่นอากาศออกเป็นหลายหัว แต่ต้องมีการทดลองเบื้องต้นเพื่อให้แน่ใจว่าอากาศสามารถไหลออกได้ทุกหัวพ่นอากาศ รูปแสดงการติดตั้งระบบการเลี้ยงสาหร่ายแสดงในภาคผนวก ค

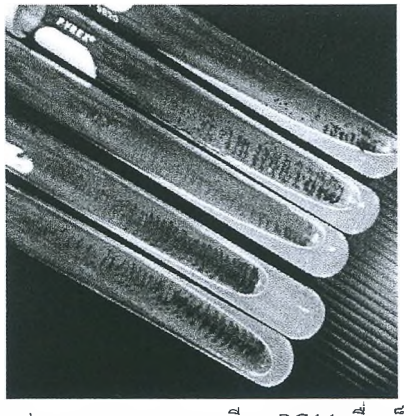
3.5 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ผล

3.5.1 การถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

นำฟลาสก์บรรจุเชื้อ *Scenedesmus armatus* มาทำการคัดเลือกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนจานอาหารแข็ง BG11 ใช้เทคนิค Cross streak ดังรูปที่ 3.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,700-1,800 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีจากอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเอียง (BG11) ดังรูปที่ 3.3 เพื่อเก็บไว้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง รูปขั้นตอนการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์แสดงในภาคผนวก ง



รูปที่ 3.2 เทคนิคการ Cross streak บนจานอาหารแข็ง BG11



รูปที่ 3.3 เทคนิคการ Simple streak บนหลอดอาหารเอียง BG11เพื่อเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์

3.5.2 การขยายจำนวนเซลล์สาหร่าย

หลังจากได้เชื้อที่บริสุทธิ์ในขั้นตอนที่ 3.5.1 แล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายโดยทำการเลี้ยงในระบบที่ใหญ่ขึ้นคือ เลี้ยงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อสาหร่ายที่เจริญเติบโตขึ้น ดังแสดงวิธีการการเก็บผลและวัดผลการทดลองในภาคผนวก จ

3.5.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอัดอากาศ โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารทั้ง 3 สูตร ได้แก่ BG11, N-8 medium และ BBM (สูตรอาหารแสดงในภาคผนวก ข) ในระบบขนาด 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (25^{o}C) ภายใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ แสดงดังรูปที่ 3.4 ทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป โดยการเก็บผลและการวัดผลแสดงดังรูปในภาคผนวก จ

การเตรียมอาหาร

1) การเตรียมอาหารสูตร BG-11

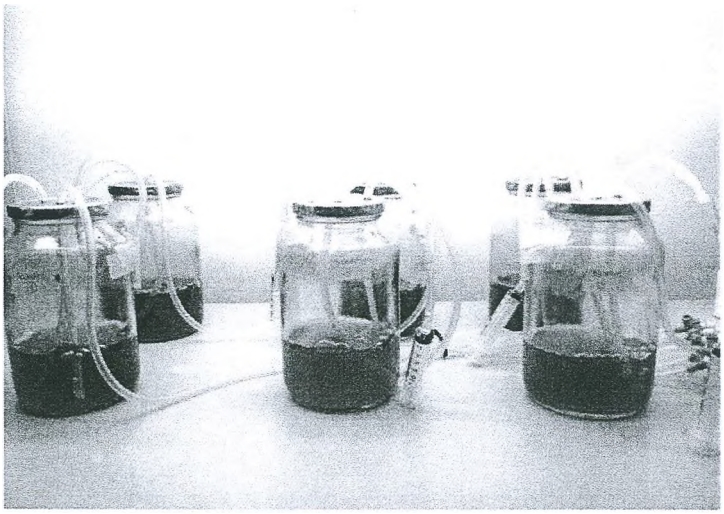
ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BG-11 โดยเติมธาตุอาหารตามสูตรอาหารดังกล่าวลงในน้ำกลั่น (ถ้าเป็นอาหารแข็งต้องเติม Agar ลงไปด้วย) ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) การเตรียมอาหารสูตร N-8 medium

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร N-8 medium โดยเติมธาตุอาหารตามสูตรอาหารดังกล่าวลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3) การเตรียมอาหารสูตร BBM

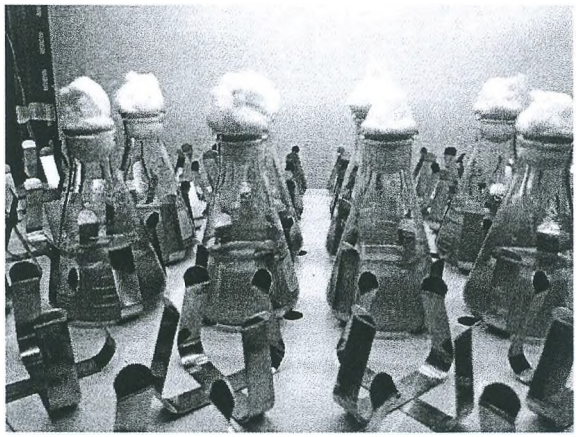
ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ใช้อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร BBM โดยเติมธาตุอาหารตามสูตรอาหารดังกล่าวลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



รูปที่ 3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยปั๊มอัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ ในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ BG11 N-8 และ BBM

3.5.4 การเลี้ยงในสภาวะเขย่า (ตั้งเดิม)

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 1. โดยใช้เครื่องเขย่าแบบตั้งเดิม (Shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ แสดงดังรูป 3.5 และทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน



รูปที่ 3.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยเครื่องเขย่าในอาหารเหลว BG11 เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

3.5.5 การเลี้ยงด้วยหัวพ่นอากาศ

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบต่างๆ ที่ประดิษฐ์ขึ้น ได้แก่ สายยางปกติ แบบวงกลมเจาะรู (จำนวน 4 รู แต่ละรูห่างกัน 1 เซนติเมตร สายยางยาว 11 ซม.) แบบสามทางเจาะรู (สายยางยาวด้านละ 2.5 ซม. สายยางแนวนอนเจาะรูด้านละ 1 รู แนวตั้งเจาะ 2 รู ด้านตรงข้ามกัน ปิดปลายสายยางทั้ง 3 ด้านด้วยการลนไฟ) แบบหัวทรายทรงกระบอก (ขนาด

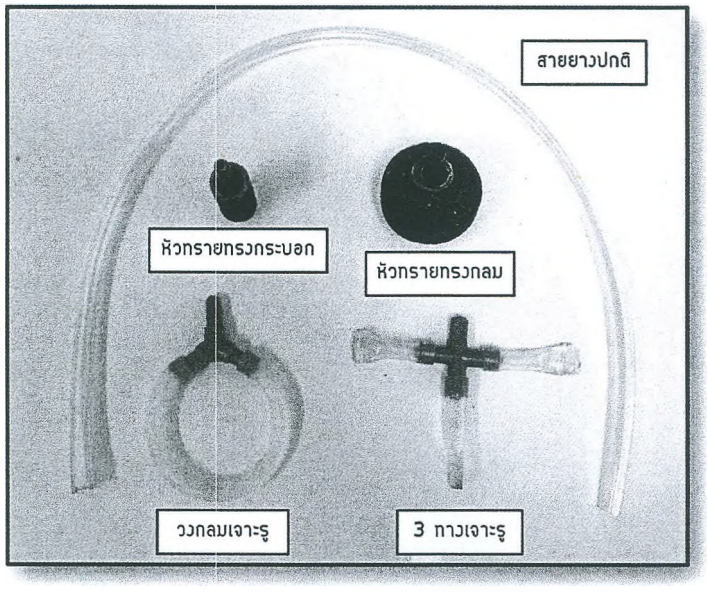
เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ยาว 2.5 ซม.) และแบบหัวทรายทรงกลม (ขนาดเส้นรอบวง 10 ซม.) แสดงรูปหัวพ่นอากาศแบบต่างๆ ในรูปที่ 3.6 ในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากหัวข้อ 3.5.3 ในระบบขนาด 400 และ 4,000 มิลลิลิตร ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

3.5.6 การเลี้ยงด้วยความเข้มแสงต่างๆ

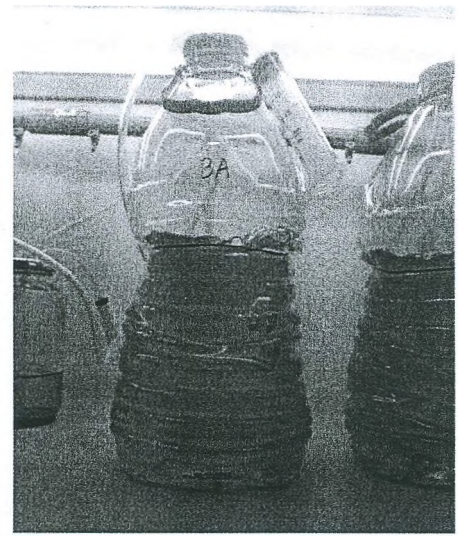
การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ ในอาหารสูตร BG11 ในระบบขนาด 400 มิลลิลิตร ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง ที่ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 ลักซ์ ทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

3.5.7 การเลี้ยงเซลล์ในระบบขยาย

การเลี้ยงในระบบขยายขนาดต้องมีการถ่ายเชื้อจากระบบการเลี้ยงแบบเขย่าในห้องปฏิบัติการ (ขนาด 250 มิลลิลิตร) ไปสู่ระบบขนาดใหญ่โดยต้องมีความเข้มข้นของเซลล์ในระบบใหม่อยู่ในช่วง 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การถ่ายเชื้อต้องทำแบบปลอดเชื้อ (aseptic technique) ระบบขยายขนาดสำหรับงานวิจัยนี้ได้ใช้ระบบที่ประดิษฐ์ขึ้นโดยใช้ขวดพลาสติกขนาด 5,000 มิลลิลิตร โดยมีอาหารปริมาณ 4,000 มิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 สายยางให้อากาศแบบต่างๆ ได้แก่ สายยางปกติ แบบหัวทรายทรงกระบอก แบบหัวทรายทรงกลม แบบวงกลมเจาะรู แบบ 3 ทางเจาะรู



รูปที่ 3.7 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดพลาสติกขนาดใหญ่ ระบบขนาด 5,000 มิลลิลิตร

3.5.8 การวัดการเจริญของเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus*

ตรวจวัดการเจริญเติบโตและนับจำนวนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* มีหลายวิธี ได้แก่ ใช้สไลด์ Haemacytometer วัดค่า OD และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟการเจริญเติบโตของสาหร่าย จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* รายละเอียดของแต่ละวิธีแสดงได้ดังต่อไปนี้

3.5.8.1 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนใสทิ้ง ทำเช่นเดียวกันแต่เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรแทนทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์ นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง การชั่งน้ำหนักทุกครั้งชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (กรัม/ลิตร) จากผลที่ได้นำไปหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ โดยใช้สูตร

$$\mu_{max} = \frac{lnx_2 - lnx_2}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ x คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาการเลี้ยงที่ 1 และ 2 (g/L)

และค่าอัตราการเพิ่มของเซลล์ (Biomass productivity, P) ดังสูตร

$$P\ (\text{มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง/ลิตร. วัน}) = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}_x - \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}_1}{t_x - t}$$

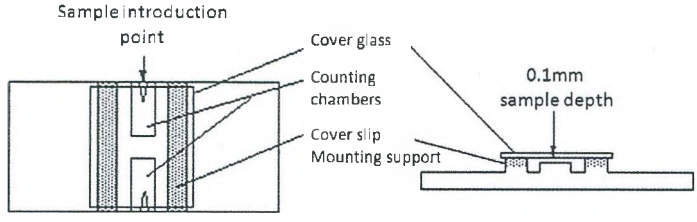
เมื่อ t_x คือ เวลาสุดท้าย และ t_1 คือเวลาเริ่มต้น

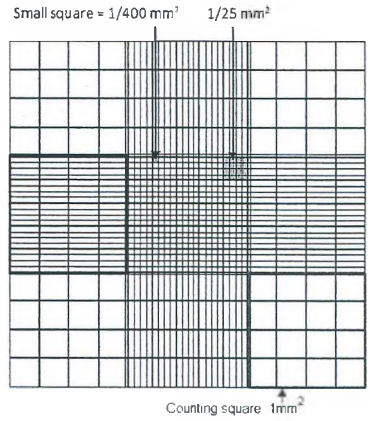
3.5.8.2 วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์ Haemacytometer

หยดตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการนับจำนวนลงไป 1 หยด ในช่องใส่ตัวอย่าง (load port) ของสไลด์ Haemacytometer ที่มีกระจกปิดสไลด์ปิดอยู่ ตัวอย่างสาหร่ายจะกระจายไปทั่ว

ตารางสี่เหลี่ยม ในรูปที่ 3.7 วางสไลด์ Haemacytometer บนแท่นกล้องจุลทรรศน์ ปรับกล้องและเริ่มดูจากกำลังขยายจากต่ำไปสูง นับเซลล์สาหร่ายบนช่องสี่เหลี่ยมตรงกลาง (25 ช่องใหญ่ ภายในมีตารางขนาดเล็ก 16 ช่อง) วิธีนี้เหมาะสำหรับสาหร่ายที่เป็นพวกเซลล์เดียวที่มีขนาดเล็ก และไม่สามารถนับพวกที่อยู่เป็นโคโลนีได้ ในการนับเซลล์ถ้าจำนวนเซลล์หนาแน่นมาก อาจสุ่มนับ 5 ช่อง แต่ผลที่ได้ต้องคูณ 5 หรือ สุ่มนับ 10 ช่อง ผลที่ได้ต้องคูณ 2.5 ถ้าเซลล์สาหร่ายทับเส้นให้เลือกนับแบบใดแบบหนึ่งต่อไปนี้

- ทับเส้นแนวบน และเส้นแนวขวาให้นับ (ซ้าย-ล่าง ไม่นับ) หรือ
- ทับเส้นแนวล่าง และเส้นแนวซ้ายให้นับ (ขวา-บน ไม่นับ)





รูปที่ 3.8 พื้นที่ตารางสำหรับการนับเซลล์สาหร่าย

(ที่มา : http://dtc.pima.edu/blc/181/Lessons/L4/4step4/4step4page7a.htm)

การคำนวณปริมาณสาหร่ายจากสูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์สาหร่าย/มิลลิลิตร} = \frac{C \times D \times 1000}{A \times d \times F}$$

เมื่อ C = จำนวนสาหร่ายที่นับได้

A = พื้นที่ของ grids เท่ากับ 0.04 มิลลิเมตร^2

d = ความลึกของพื้นที่ที่นับ เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร

F = จำนวนช่องหรือตารางที่นับ

D = ค่าการเจือจาง

3.5.8.3 วิธีการวัดความหนาแน่นโดยอาศัยแสง (Optical Density; OD)

นำตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการหาความหนาแน่นใส่ในคิวเวต แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร บันทึกค่า OD ที่วัดได้

รูปที่ 3.9 เครื่อง Spectrophotometer

3.5.9 การเก็บสาหร่ายแห้ง

นำอาหารที่มีสาหร่ายแขวนลอยอยู่ไปเซนตริฟิวส์เพื่อกำจัดน้ำออกให้เก็บเฉพาะส่วนที่เซลล์สาหร่ายที่ตกอยู่บริเวณก้นหลอดเซนตริฟิวส์ ซึ่งขั้นตอนวิธีการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายแสดงดังภาคผนวก ฉ จากนั้นนำเข้าเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer) ซึ่งขั้นตอนวิธีการทำแห้งแสดงดังภาคผนวก ช เพื่อกำจัดน้ำออกในระดับเซลล์แล้วเก็บสาหร่ายแห้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4°C เพื่อรอการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและทำการวิเคราะห์ฤทธิ์สารสกัดด้วยวิธี soxhlet และการเขย่าต่อไป

3.5.10 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระอันได้แก่ เบตาแคโรทีน และลิโคปีน หาได้จากการใช้การดูดกลืนแสง ของสารสกัด นำสาหร่ายแห้งที่ได้จากหัวข้อ 3.5.5 มาสกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธีการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราส่วนสาหร่ายต่อเอทานอลเป็น 1:134 (g/ml) และด้วยวิธีการสกัดด้วยชุด soxhlet โดยใช้ ethanol ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ที่พิจารณาและคำนวณปริมาณแต่ละองค์ประกอบดังสมการ (Nagata และ Yamashita, 1992);

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) = $0.999A_{663}$ - $0.0989A_{645}$

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) = $-0.328A_{663}$ + $1.77A_{645}$

ปริมาณเบตาแคโรทีน (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) = $0.216A_{663}$ – $1.22A_{645}$ - $0.034A_{505}$ + $0.452A_{453}$

ปริมาณลิโคปีน (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) = $(-0.0458A_{663})$+ $0.204A_{645}$ + $0.372A_{505}$ – $0.0806A_{453}$

3.5.11 การตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระจะใช้วิธี DPPH assay หรือความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของอนุภาคของสาร DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยจะไปเจือจางสีของสาร DPPH ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.35 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล 95% ในที่มืด นำสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร (เข้มข้น 0.35 mM) เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที วัดการดูดกลืนสีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (MF A062780, Labsystems, model) จากนั้นคำนวณฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

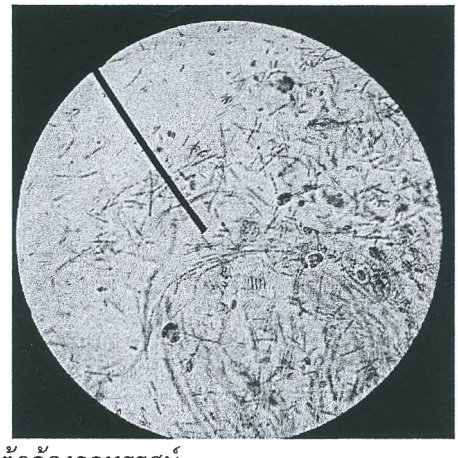
$$\text{ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ } (\%) = \left(\frac{1 - A_e}{A_o}\right) \times 100$$

เมื่อ A_o คือค่าการดูดสีของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง A_e คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อสารละลาย DPPH ถูกเจือจางสีด้วยตัวอย่างสารสกัด

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อ จาก 2 แหล่ง

การเลี้ยงเชื้อที่มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้ทำการต่อเชื้อและสกรีนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง เนื่องจากตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติมีสาหร่ายหลายพันธุ์ ได้แก่ ไดอะตอม แต่มีสาหร่ายพันธุ์ *Scenedesmus armatus* ไม่มาก แสดงดังรูปถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังรูปที่ 4.1 และรูปเพิ่มเติมใน ภาคผนวก ง ดังนั้นในส่วนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจึงใช้สาหร่ายจากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นเชื้อที่ค่อนข้างบริสุทธิ์และมีปริมาณสาหร่าย *Scenedesmus armatus* มากกว่า



รูปที่ 4.1 สาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 ผลของสารอาหาร

การทดสองเริ่มต้นด้วยการทำเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วเก็บเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเอียงจากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงอาหารเหลวที่มีขนาดใหญ่ต่อไป ในการศึกษาเรื่องปัจจัยของอาหารที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ดำเนินการในระบบให้อากาศด้วยหัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติเป็นเวลา 27 วัน จำนวนครั้งที่เก็บตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 14 ครั้ง สูตรอาหารทั้ง 3 สูตรที่นำมาพิจารณา ได้แก่ BG11 N-8 และ BBM ได้ผลการทดลองอันได้แก่ วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง การเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์และวัดค่าการดูดกลืนแสง แสดงดังตารางที่ 4.1 ในภาคผนวก ซ ได้กราฟการเจริญเติบโตระหว่างระยะเวลาการเจริญ (แกน X) และการเจริญเติบโตของเซลล์ (แกน Y) ดัง รูปที่ 4.2 – 4.4 จากรูปที่ 4.2 เป็นกราฟการรายงานผลในรูปน้ำหนักแห้งซึ่งเป็นวิธีที่ใช้รายงานผลการเจริญเติบโตที่ใช้โดยทั่วไปในการเลี้ยงสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก จากรูปพบว่าในอาหาร BG11 นั้นน้ำหนักมีการตกลงอย่างเห็นได้ชัดในการวัดผลครั้งที่ 3 (วันที่ 5) ครั้งที่ 12-13 (วันที่ 23-25) ส่วนในอาหาร N-8 นั้นน้ำหนักมีการเพิ่มขึ้นสูงมากในการวัดผลครั้งที่ 6 (วันที่ 11) และลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดในการวัดผลครั้งที่ 13-14 (วันที่ 25-27) ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM มีค่ามากที่สุด จากรูปไม่เห็นความแตกต่างของอาหารแต่ละประเภทอย่างเห็น

ได้ชัด ผลการนับจำนวนเซลล์ในรูปที่ 4.2 จากรูปพบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในครั้งที่ 1-6 (ช่วงวันที่ 1-11) มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่การนับเซลล์ในครั้งที่ 7 (วันที่ 13) เป็นต้นไปนั้นจำนวนเซลล์ในอาหาร N-8 มีการเจริญสูงกว่า BG11 และ BBM ในช่วงการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 8-10 (ช่วงวันที่ 15-19) อาหาร BG11 มีจำนวนเซลล์น้อยกว่าใน BBM แต่หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ในอาหาร BG11 ก็เพิ่มจำนวนขึ้นมากจนเกือบเทียบเท่ากับอาหาร N-8 แต่เมื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 14 ครั้ง (27 วัน) พบว่าจำนวนเซลล์ในอาหาร N-8 มีค่ามากที่สุด อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วนการวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร แสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าการวัดค่าการดูดกลืนแสงในครั้งที่ 1-8 (ช่วงวันที่ 1-15) ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารทั้ง 3 สูตรนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่การวัดค่าการดูดกลืนแสงในครั้ง 12 (วันที่ 23) เป็นต้นไปเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน BBM มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าอาหาร BG11 และ N-8 อย่างเห็นได้ชัด ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ N-8 นั้นยังไม่มีความแตกต่างกันตั้งแต่การวัดผลครั้งที่ 1-11 (ช่วงวันที่ 1-21) โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 มีกราฟการเจริญสูงว่าอาหาร N-8 ในการวัดผลครั้งที่ 12 (วันที่ 23) เป็นต้นไป โดยรวมแล้วพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่เพาะเลี้ยงในอาหาร N8 มีค่ามากที่สุด

จากการพิจารณาผลการทดลองโดยพิจารณาจากตัวแปร 3 ค่า พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างของผลการทดลองอย่างเห็นได้ชัด แต่เนื่องจากเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เจริญในอาหาร BG11 นั้นมีลักษณะตัวใหญ่กว่าที่เลี้ยงในอาหาร N-8 และ BBM ดังรูปที่ 4.5 ดังนั้นจึงใช้ BG11 ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.3 การเลี้ยงสาหร่ายในระบบขนาด 800 มิลลิลิตร

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในระบบขนาดเล็ก (800 มิลลิลิตร) ได้ดำเนินการในอาหารสูตร BG11 โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบต่างๆ ที่ประดิษฐ์ขึ้น ได้แก่ สายยางปกติ แบบวงกลมเจาะรู แบบสามทางเจาะรู แบบหัวทรายทรงกระบอก และแบบหัวทรายทรงกลม ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2 (ภาคผนวก ซ) นำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟการเจริญเติบโตได้ดังรูปที่ 4.6-4.8 ในรูปที่ 4.6 ซึ่งเป็นผลการวัดผลการเจริญด้วยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยที่ แกน X คือระยะเวลาการเจริญ และแกน Y คือค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่วงแรก คือ ครั้งที่ 1-2 (วันที่ 1-4) ให้ผลไม่แตกต่างกันจะเริ่มแตกต่างกันที่ครั้งที่ 3 (วันที่ 7) และครั้งที่ 4-6 (วันที่ 10-16) หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกัน แต่การนับเซลล์ในครั้งที่ 7-12 (วันที่ 19-34) นั้นหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงกว่าหัวพ่นอากาศแบบอื่นอย่างเห็นได้ชัด และในการทดลองครั้งที่ 13 (วันที่ 37) เป็นต้นไป หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากแนวโน้มของกราฟจะเห็นว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตในหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและทรงกระบอกได้ดีกว่าหัวพ่นแบบอื่นๆ อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายในระบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกไม่แตกต่าง

กัน ซึ่งยืนยันได้จากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะได้ผลดังตารางที่ 4.1 พบว่าได้ค่าเท่ากัน ในขณะที่หัวพ่นอากาศแบบวงกลมเจาะรู สามทางเจาะรู สายยางปกติ และระบบการเขย่าแบบดั้งเดิมมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยลงตามลำดับ นอกจากนี้อัตราการเพิ่มของเซลล์ในระบบพ่นอากาศโดยหัวทรายทรงกลมและทรงกระบอกยังมีประมาณมากที่สุดเป็นสองอันดับแรกเมื่อเทียบกับระบบให้อากาศแบบอื่นๆ และระบบการเลี้ยงแบบเขย่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้น้อยที่สุดเนื่องมาจากว่าการเพาะเลี้ยงแบบเขย่านั้นไม่มีการให้อากาศลงไปในฟลาสก์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยตรง สาหร่ายเจริญเติบโตได้โดยใช้เพียงแค่อากาศจากภายนอกที่ซึมผ่านสำลีลงไปในฟลาสก์เท่านั้นและการเขย่าถึงแม้จะช่วยให้สาหร่ายสามารถใช้อากาศได้ดียิ่งขึ้น แต่การเขย่าทำให้เกิดการวนของน้ำในลักษณะวอร์เท็กซ์ (Vortex) ทำให้สาหร่ายได้รับอากาศน้อยกว่าการพ่นอากาศลงไปในขวดเพาะเลี้ยงโดยตรงซึ่งโดยมากใช้วิธีนี้เป็นวิธีอ้างอิงในการออกแบบระบบการเลี้ยงเซลล์แบบต้องการอากาศ รูปที่ 4.6 เป็นการแสดงการวัดผลด้วยการนับจำนวนเซลล์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่วงแรก คือ ครั้งที่ 1-2 (วันที่ 1-4) ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนการนับเซลล์ในครั้งที่ 3-6 (วันที่ 7-16) นั้นหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกัน แต่การนับเซลล์ในครั้งที่ 7 (วันที่ 19) เป็นต้นไปหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงกว่าหัวพ่นอากาศแบบอื่นอย่างเห็นได้ชัด โดยรวมแล้วพบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงสุดเมื่อเทียบกับหัวพ่นอากาศแบบอื่นๆ ส่วนในรูปที่ 11 ซึ่งเป็นการวัดผลการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร แสดงกราฟการเจริญระหว่างระยะเวลาการเจริญ (แกน X) และจำนวนเซลล์ (แกน Y) พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่วงแรก คือ ครั้งที่ 1-2 (วันที่ 1-4) ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนการนับเซลล์ในครั้งที่ 3-5 (วันที่ 7-13) นั้นหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกัน แต่การนับเซลล์ในครั้งที่ 6 (วันที่ 16) เป็นต้นไป พบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงกว่าหัวพ่นอากาศแบบอื่นอย่างเห็นได้ชัดเช่นเดียวกับในรูปที่ 4.6

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าหัวพ่นอากาศที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Scenedesmus armatus *ในระบบขนาด 800 มิลลิตร คือหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม ซึ่งสาเหตุที่หัวพ่นอากาศแบบนี้ทำให้มีการเจริญสูงสุดนั้นน่าจะเป็นเพราะหัวทรายนั้นมีรูพรุนเล็กๆ จำนวนมาก ทำให้ฟองอากาศที่ออกมามีขนาดเล็กและมีปริมาณมาก ซึ่งจะให้ทำอากาศกระจายอย่างทั่วเต็มขวดทดลอง และสาหร่ายได้รับอากาศอย่างทั่วถึงกว่าหัวพ่นของอากาศลักษณะอื่นที่ฟองอากาศมีขนาดใหญ่และกระจายอากาศได้ไม่ทั่วถึง อย่างไรก็ตามหัวทรายมีข้อเสียคือเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายเพราะการฆ่าเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้ทำได้ยาก*

4.4 ผลของความเข้มแสง

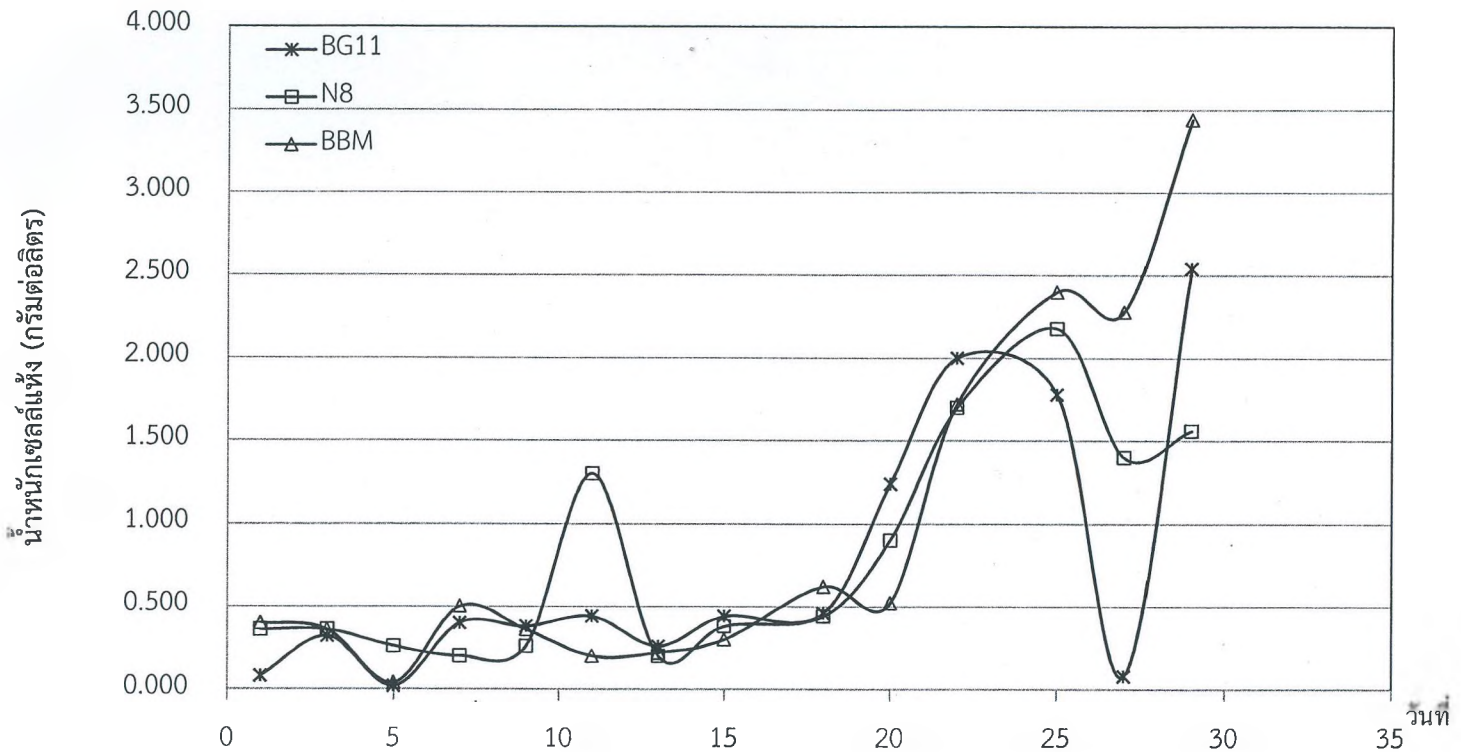
สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดโฟโตออโตโทรปซึ่งสามารถสังเคราะห์พลังงานโดยใช้แสง รวมถึงสามารถเปลี่ยนสารอาหารมาเป็นพลังงานเคมีได้ และปริมาณแสงที่ใช้อาจส่งผลต่อการเจริญมากหรือน้อยช้าหรือเร็วได้ จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ปริมาณ

ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 ลักซ์ โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดโหล ปริมาตรอาหาร 400 มิลลิลิตร ด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ ปริมาณอากาศ 80 มิลลิลิตร/นาที ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลา 43 วัน รวมทั้งสิ้น 15 ครั้ง วัดการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสง และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2 (ภาคผนวก ซ) ซึ่งแสดงปริมาณแสงที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus armatus* โดยการเพาะเลี้ยงด้วยปั๊มอัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติไปสร้างกราฟการเจริญดังรูปที่ 4.6 – 4.8 และรูปที่ 4.9 – 4.11 (แสดงเฉพาะผลของความเข้มแสง)โดยระยะเวลาการเจริญเป็นแกน X และจำนวนเซลล์เป็นแกน Y พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในครั้งที่ 3 (วันที่ 7) ของการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 2,700 ลักซ์ มีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 3,400 ลักซ์อย่างชัดเจน แต่นอกจากนั้นจนถึงการนับจำนวนเซลล์ในครั้งที่ 8 (วันที่ 22) มีค่าใกล้เคียงกันมาตลอด จำนวนเซลล์จะเริ่มแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่การนับเซลล์ครั้งที่ 9 (วันที่ 25) โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 2,700 ลักซ์ มีจำนวนเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อย่างเห็นได้ชัดแต่เมื่อทดลองเลี้ยงเกินกว่า 34 วัน ในขณะที่ช่วงต้นของการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน หลังจากการวัดผลครั้งที่ 10 (วันที่ 28) ของการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ กลับมีค่าลดลงเรื่อยๆ คาดว่ามีสาเหตุมาจากการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ใช้หลอดไฟ 3 หลอด ซึ่งทำให้เกิดความร้อนและมีอุณหภูมิสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 2,700 ลักซ์ ที่ใช้หลอดไฟ 2 หลอด ทำให้เกิดความร้อนและอุณหภูมิต่ำกว่า ซึ่งเมื่อทำการวัดอุณหภูมิโดยใช้เทอโมมิเตอร์พบว่าในการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 2,700 ลักซ์ มีอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส แต่การเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ มีอุณหภูมิสูงกว่าคือ 31-33 องศาเซลเซียส หรืออาจจะเกิดจากสาเหตุที่ว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ นั้นมีปริมาณแสงที่จ้ามากเกินไป ซึ่งจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าความเข้มแสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ถ้าความเข้มของแสงสูง เช่น การเพาะเลี้ยงในที่มีแสงแดดจ้า ความสามารถในการรับพลังงานแสงของสาหร่ายจะลดลง และความลึกของภาชนะเพาะเลี้ยงมีผลต่อความสามารถในการรับพลังงานแสงของสาหร่าย ปริมาณแสงที่ส่องผ่านจะลดลงตามความลึกของภาชนะเพาะเลี้ยง นั่นคือจะมีความลึกที่ระดับหนึ่งซึ่งทำให้สาหร่ายใช้พลังงานแสงได้ดีที่สุด ซึ่งจาก 2 สาเหตุดังกล่าวทำให้สาหร่าย *Scenedesmus armatus* เจริญเติบโตได้น้อยเมื่ออยู่ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ในขณะที่การทดลองของ Yin-Hu และคณะ (2012) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวทั่วๆ ไปโดยใช้ไฟเพียงแค่ 1,900-2,000 ลักซ์ เท่านั้น แต่ในการทดลองของผู้วิจัยใช้ไฟ 2,700 และ 3,400 ลักซ์ เนื่องจากเป็นปริมาณแสงที่ได้จากหลอดไฟ 2 และ 3 ดวง ตามลำดับ ซึ่งง่ายต่อการติดตั้งระบบการเพาะเลี้ยง แล้วจึงใช้เครื่องมือในการวัดปริมาณแสงวัดปริมาณแสงที่ได้จากหลอดไฟดังกล่าว อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลที่ได้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่าความเข้มแสงที่ 3,400 ลักซ์ มีค่าสูงกว่า 2,700 ลักซ์ซึ่งจะแสดงค่าในหัวข้อถัดไป

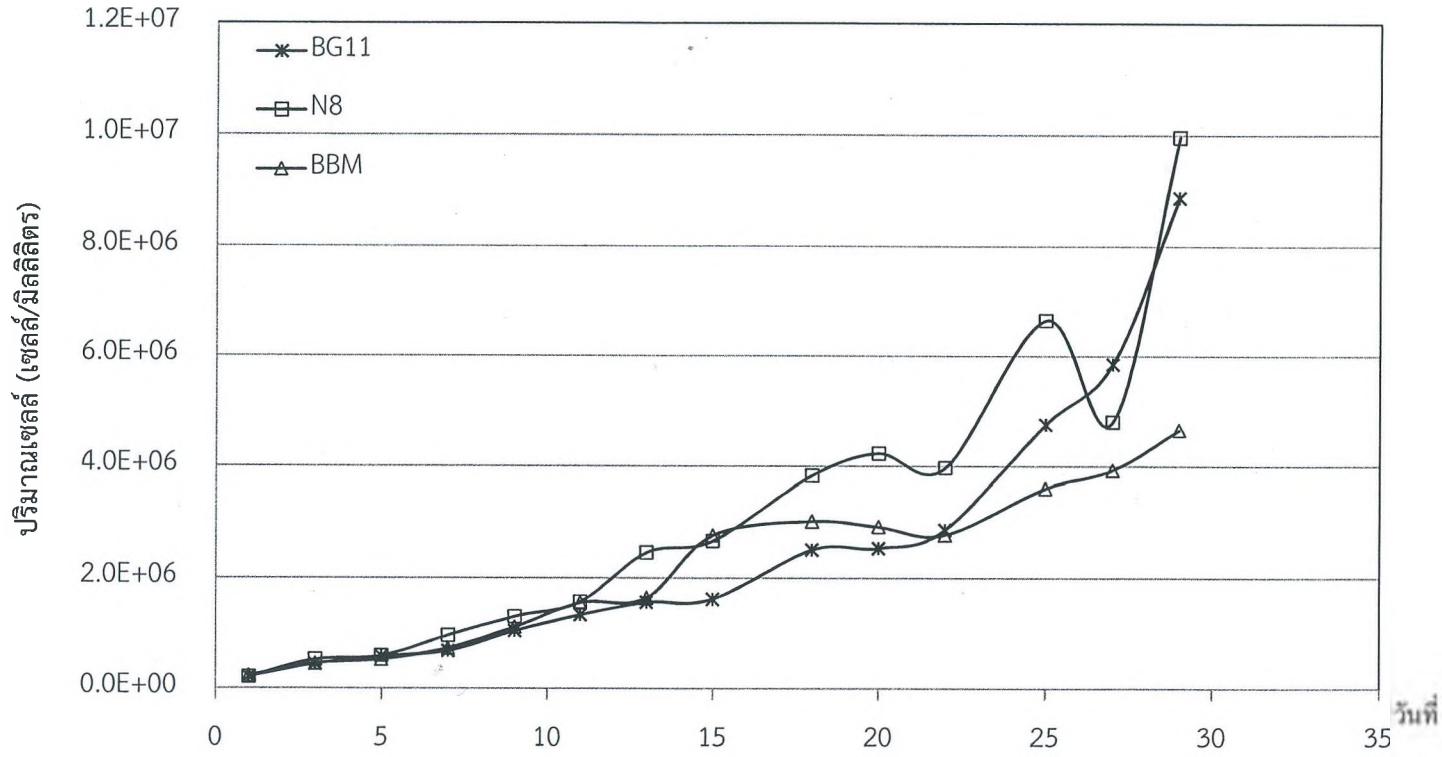
4.5 การเลี้ยงสาหร่ายในระบบ 5,000 มิลลิลตร

เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ปริมาณมากขึ้นจึงขยายขนาดในระบบที่ใหญ่ขึ้น โดยระบบที่ใช้เป็นระบบที่ดัดแปลงจากวัสดุเหลือใช้ได้แก่ขวดน้ำพลาสติกมาเป็นถังหมักที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบต่างๆ ได้แก่ สายยางปกติ แบบวงกลมเจาะรู แบบสามทางเจาะรู แบบหัวทรายทรงกระบอก และแบบหัวทรายทรงกลม ปริมาณอากาศ 1,500 มิลลิลิตร/นาที ที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ ได้ผลการเจริญเติบโตในรูปแบบต่างๆ กราฟการเจริญเติบโตทั้ง 3 แบบ แสดงรูปที่ 4.12 – 4.14 พบว่าที่ 1-9 (วันที่ 1-9) มีน้ำหนักเซลล์แห้งและค่า OD ใกล้เคียงกันมาก จะเริ่มแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่การวัดค่าครั้งที่ 11 (วันที่ 11) โดยพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของการเพาะเลี้ยงด้วยปั๊มอัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยปั๊มอัดโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน ส่วนการวัดผลการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ ในรูปที่ 4.13 พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในครั้งที่ 5 (วันที่ 5) ของการเพาะเลี้ยงด้วยปั๊มอัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยปั๊มอัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบอื่นๆ แต่ผลในวันที่ 8-10 นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน จำนวนเซลล์จะเริ่มแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในลักษณะเดียวกันอีกครั้งตั้งแต่การนับเซลล์ครั้งที่ 11 (วันที่ 11) โดยรวมแล้วหัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีความแตกต่างจากหัวพ่นอากาศประเภทอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด

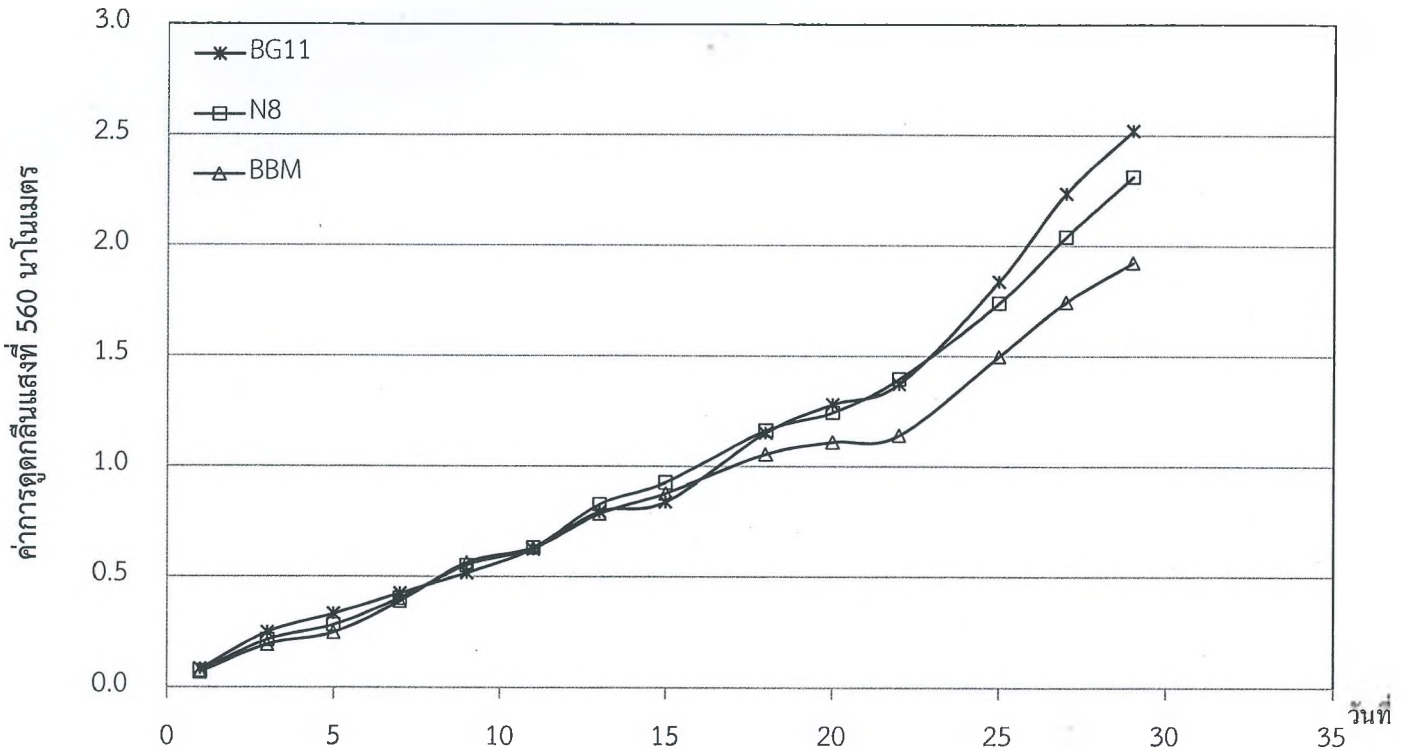
สาเหตุที่หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีนั้นอาจจะเป็นเพราะว่าหัวพ่นอากาศมีรูถึง 4 รู โดยแต่ละรูอยู่ในระดับแตกต่างกันและอยู่ตรงข้ามกันจึงทำให้อากาศถูกปล่อยออกมาทุกทิศทาง สาหร่ายจึงได้รับอากาศอย่างทั่วถึง นอกจากนี้ความกว้างของสายยางซิลิโคนจากฝั่งซ้ายและขวาครอบคลุมพื้นที่ภายในขวดเพาะเลี้ยงได้ทั่วถึง แต่ในการทดลองขนาดเล็กที่ใช้ปริมาตรอาหาร 400 มิลลิลิตร ที่พบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีประสิทธิภาพดีที่สุดนั้นอาจเนื่องมาจากว่าหัวทรายทรงกลมพอนำมาใช้เพาะเลี้ยงในขวดโหลใหญ่แล้วมีขนาดเล็กเกินไป ถึงแม้ว่าฟองอากาศจะมีขนาดเล็กและมีปริมาณมากแต่ไม่สามารถกระจายไปได้ทั่วถึงเท่าหัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรู อย่างไรก็ตามเมื่อข้อมูลเหล่านี้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (แสดงในตารางที่ 4.1) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของหัวทรายทรงกระบอกมากกว่าแบบสามทางเจาะรูและหัวทรายทรงกลมตามลำดับและไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนการใช้หัวทรายทรงกลมและทรงกระบอกในการเลี้ยงในระบบขนาด 5,000 มิลลิลิตร เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์สาหร่ายแต่จะทำให้ปลอดเชื้อได้ยาก ดังนั้นการใช้หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูจึงเป็นทางเลือกที่ดีและเหมาะสมในการพัฒนาระบบการเลี้ยงแบบขยายขนาดต่อไป



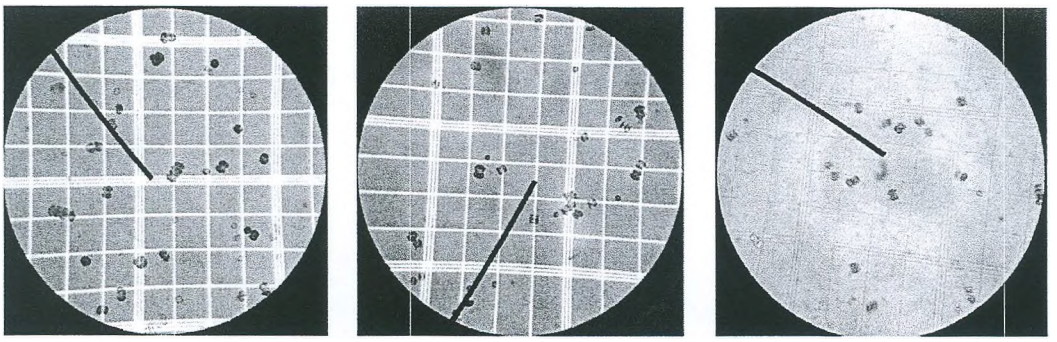
รูปที่ 4.2 น้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ



รูปที่ 4.3 ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ

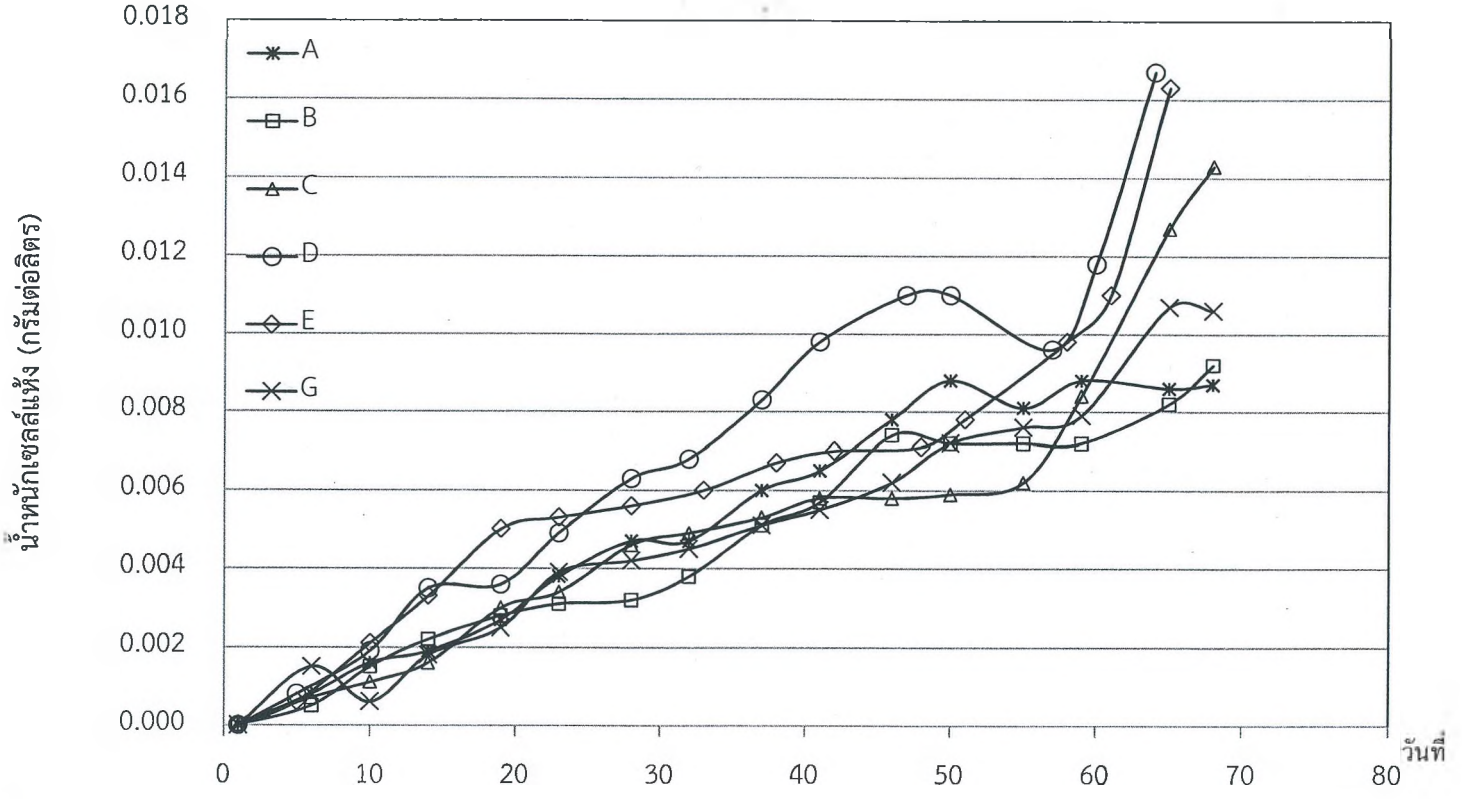


รูปที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ



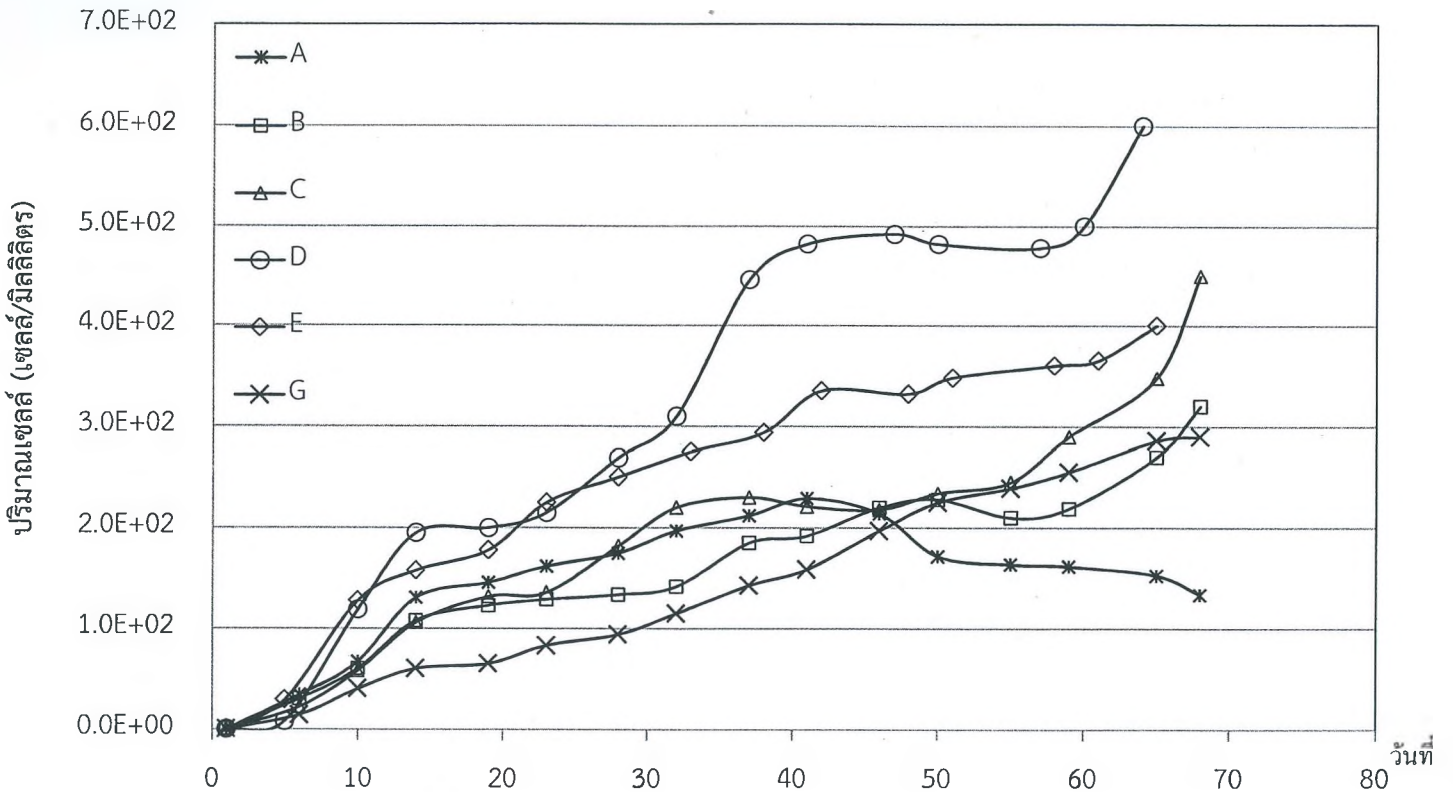
(a) BG11 (b) N-8 (c) BBM

รูปที่ 4.5 เซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร (a) BG11 (b) N-8 และ (c) BBM

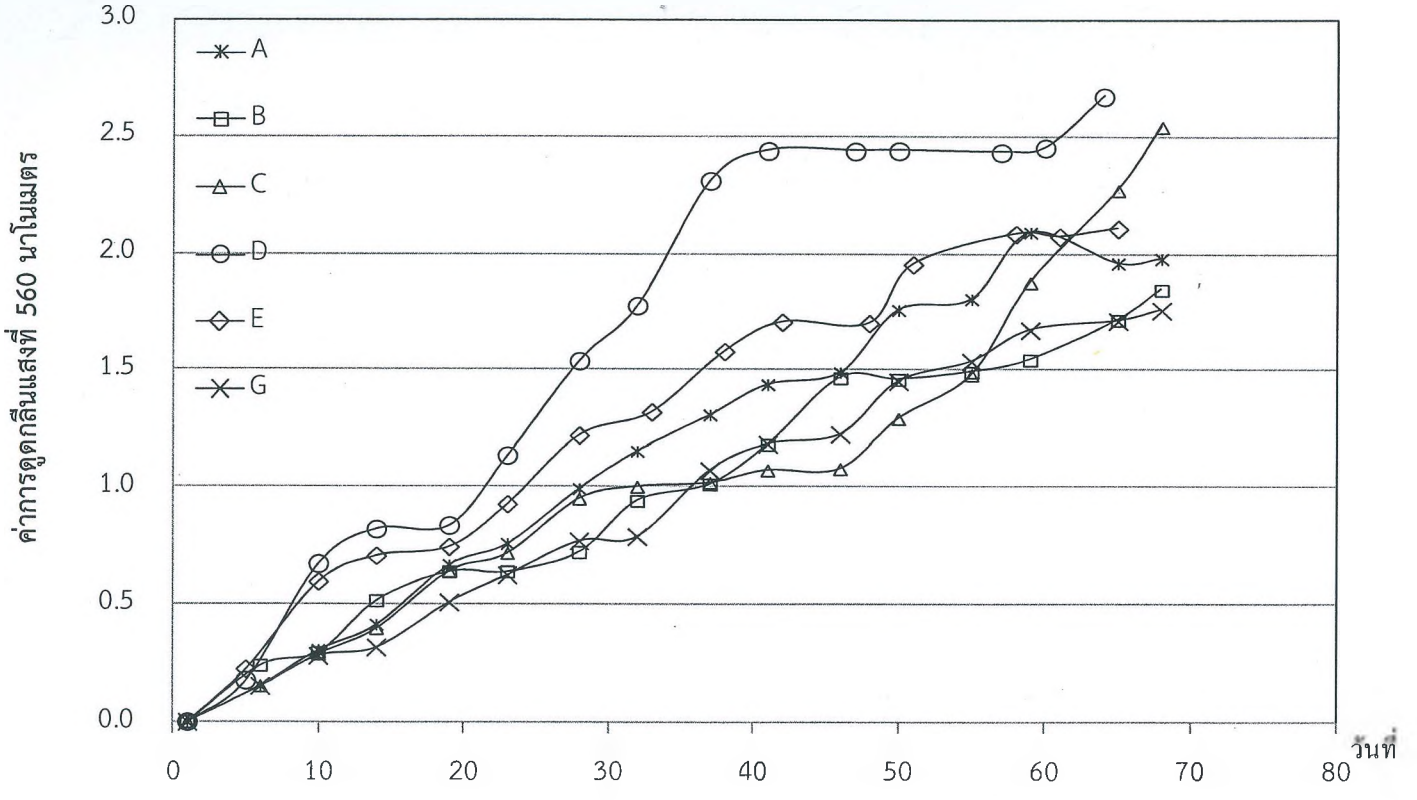


รูปที่ 4.6 น้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ และการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า)

สัญลักษณ์	ขนาดระบบ (มิลลิลิตร)	ประเภทอุปกรณ์ให้อากาศ	ความเข้มแสง (ลักซ์)
A	800	สายยางปกติ	3,400
B	800	หัวพ่นอากาศแบบวงกลมเจาะรู	3,400
C	800	หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรู	3,400
D	800	หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม	3,400
E	800	หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกระบอก	3,400
G	800	เขย่าที่อัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที	3,400
L	800	สายยางปกติ	2,700



รูปที่ 4.7 ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว Scenedesmus armartus ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ และการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า)



รูปที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ และการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า)

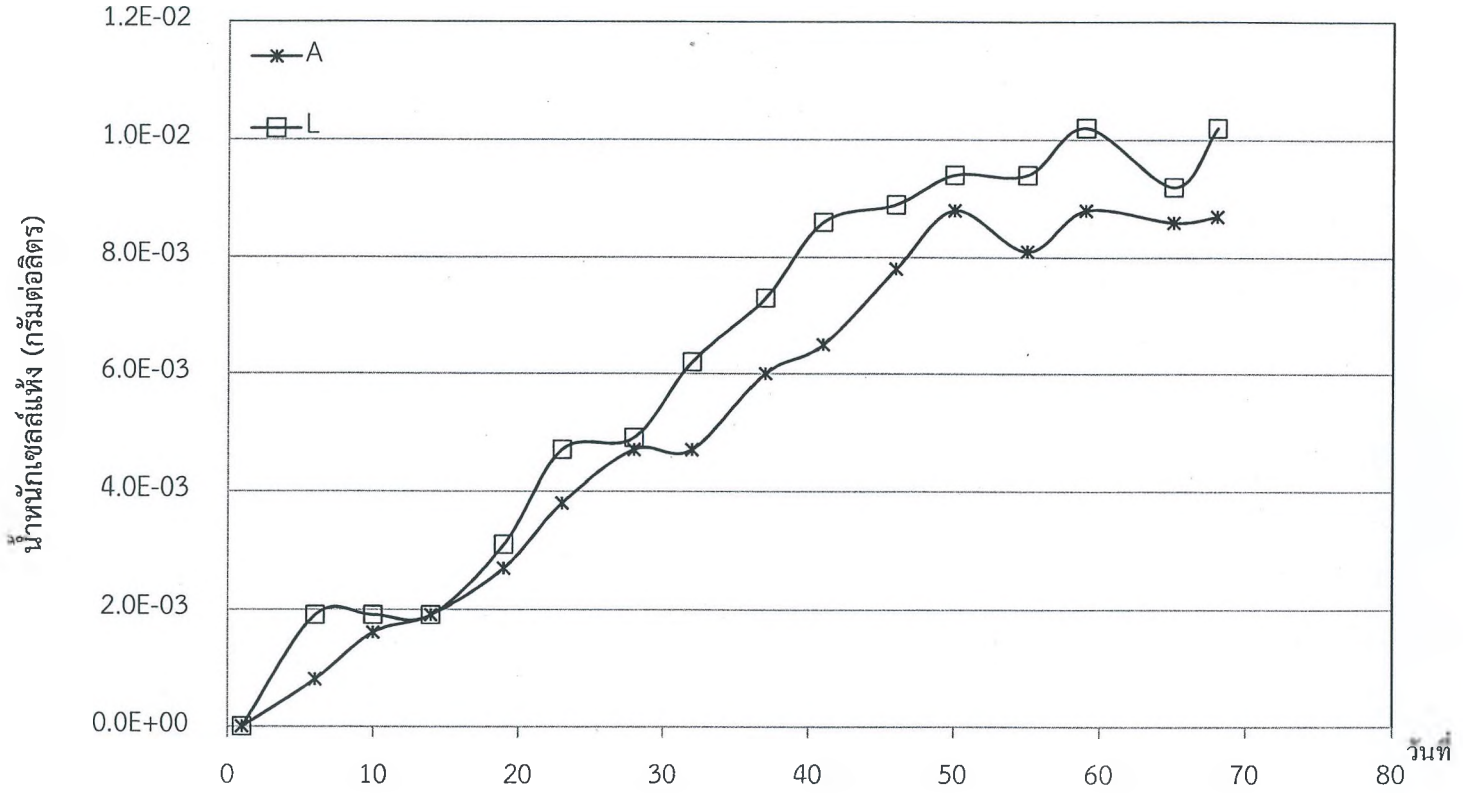
ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และ อัตราการเพิ่มของเซลล์ (P) ในระบบ 800 มิลลิลิตร

สภาวะ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, μ^A (กรัมน้ำหนักแห้ง/ลิตร.วัน)	อัตราการเพิ่มของเซลล์ (P)[B] (มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง/ลิตร.วัน)
A	0.0599	0.1629
B	0.0695	0.1486
C	0.0653	0.1484
D	0.0731	0.2344
E	0.0731	0.1848
G	0.0313	0.1208
L	0.0317	0.1566

หมายเหตุ

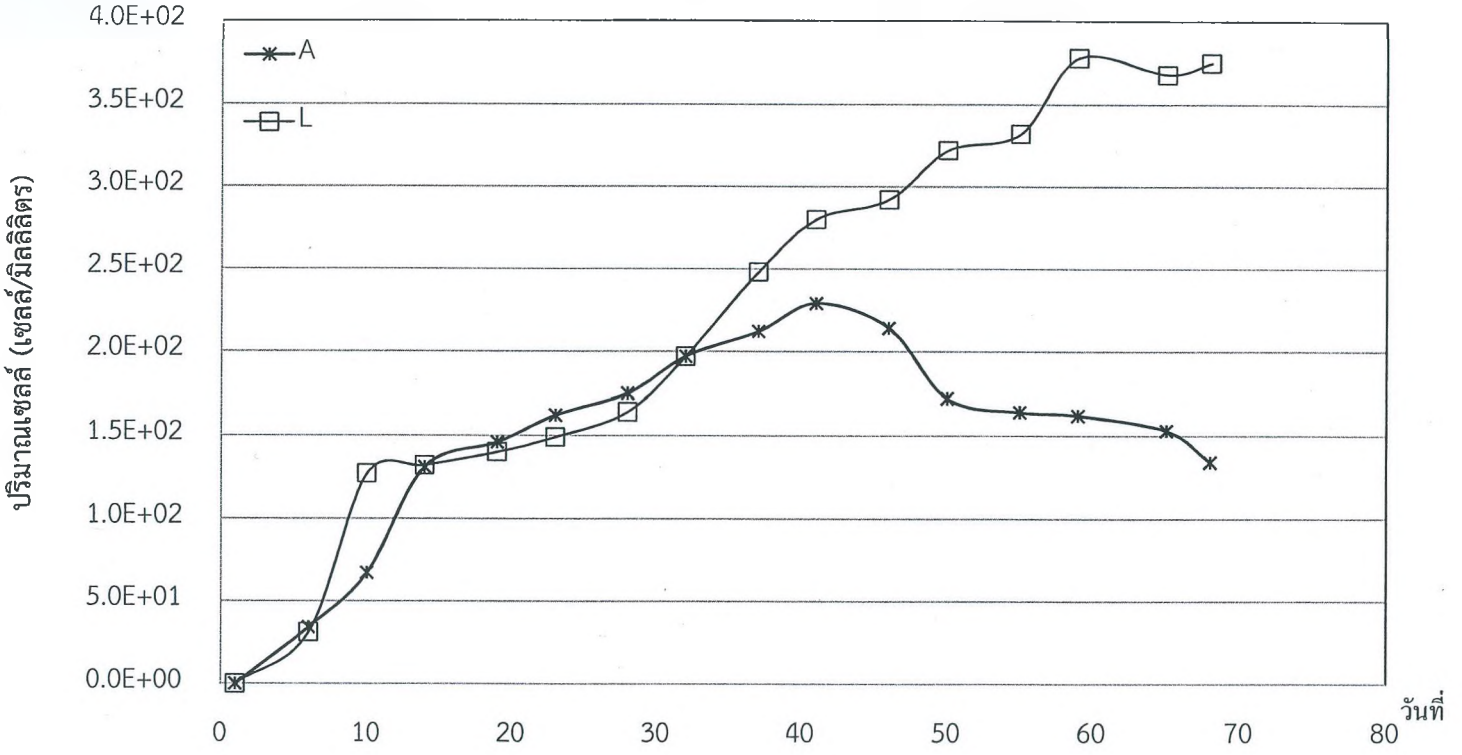
[A]specific Growth Rate, μ

[B]Biomass Productivity, P

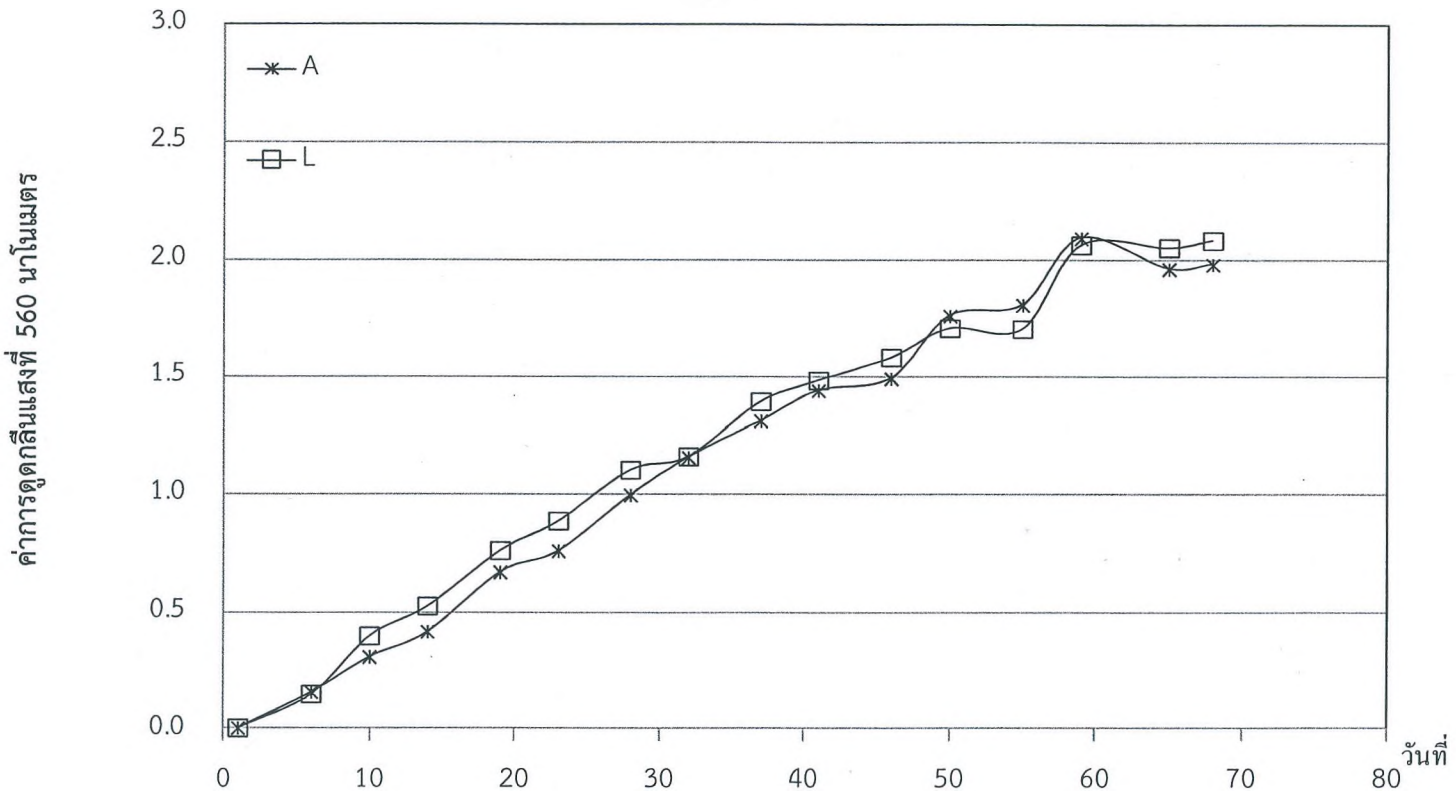


รูปที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศโดยใช้สายยางปกติ ณ ความเข้มแสงแตกต่างกัน

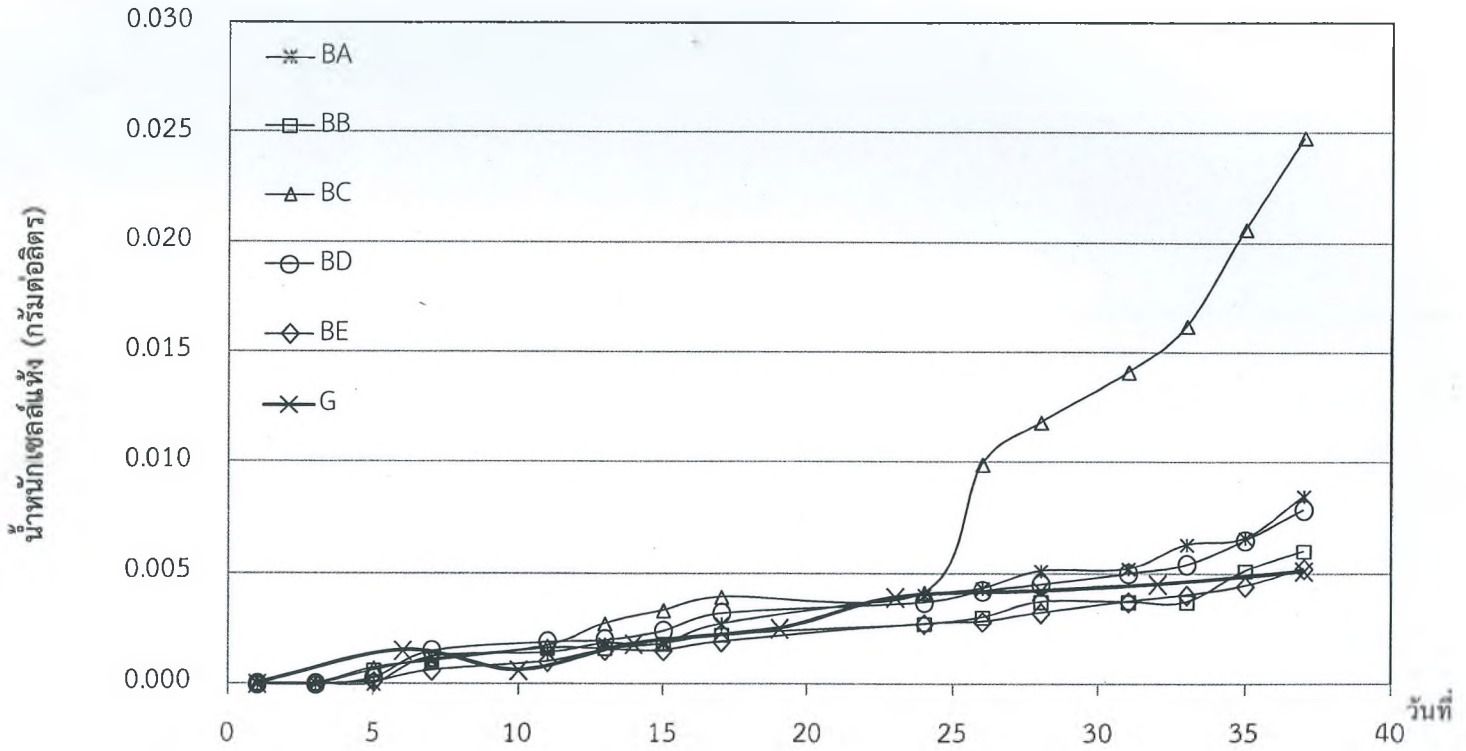
สัญลักษณ์	ขนาดระบบ (มิลลิลิตร)	ประเภทอุปกรณ์ให้อากาศ	ความเข้มแสง (ลักซ์)
A	800	สายยางปกติ	3,400
L	800	สายยางปกติ	2,700



รูปที่ 4.10 ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศโดยใช้สายยางปกติ ณ ความเข้มแสงแตกต่างกัน

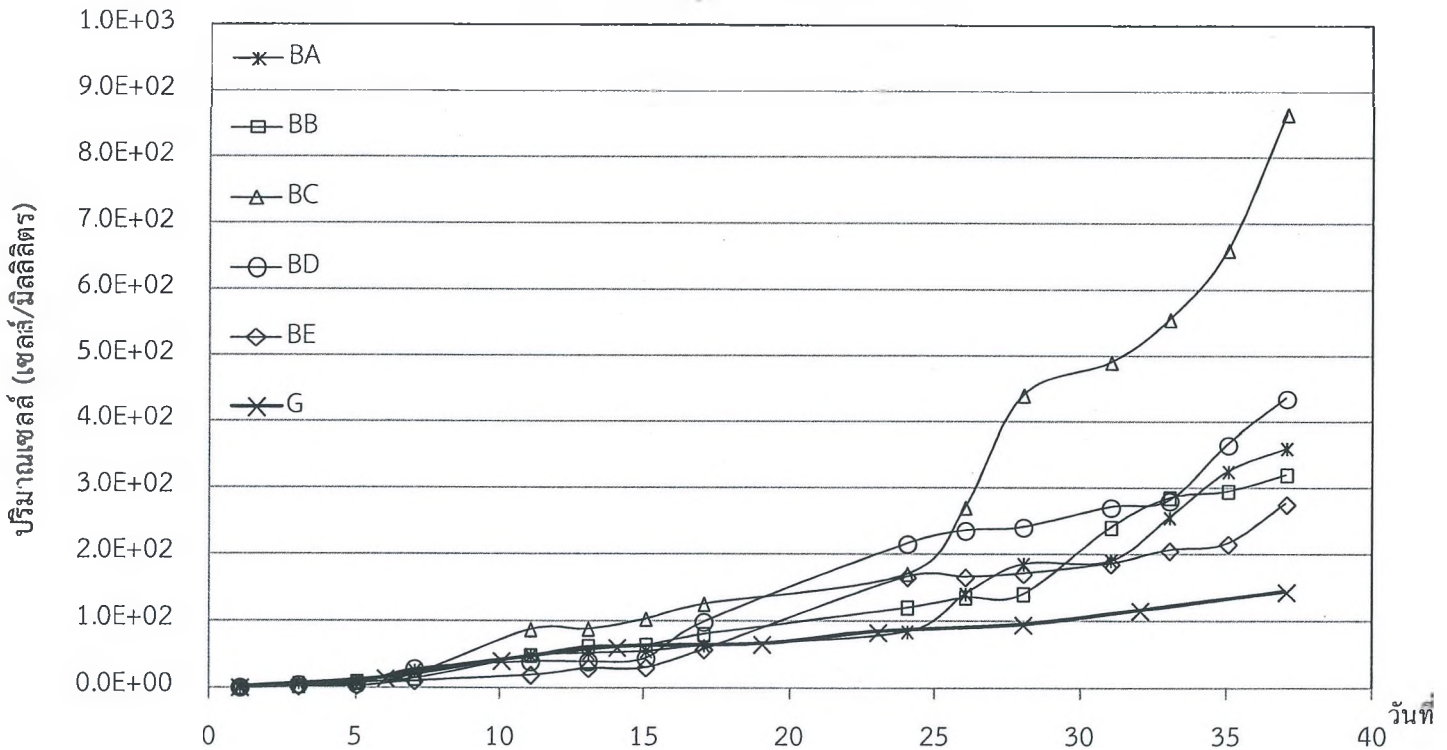


รูปที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศโดยใช้สายยางปกติ ณ ความเข้มแสงแตกต่างกัน

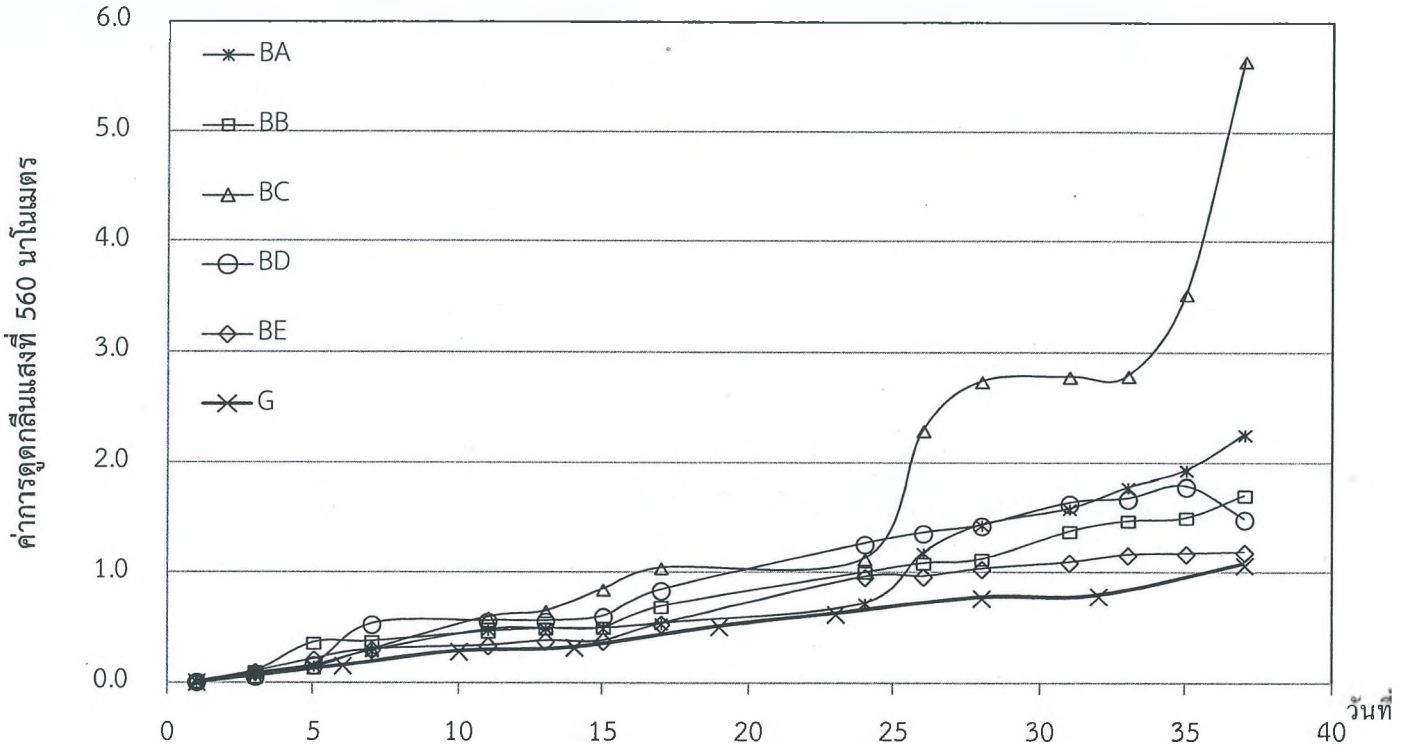


รูปที่ 4.12 น้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ ในระบบ 5,000 มิลลิลิตร

สัญลักษณ์	ขนาดระบบ (มิลลิลิตร)	ประเภทอุปกรณ์ให้อากาศ	ความเข้มแสง (ลักซ์)
BA	5000	สายยางปกติ	3,400
BB	5000	หัวพ่นอากาศแบบวงกลมเจาะรู	3,400
BC	5000	หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรู	3,400
BD	5000	หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม	3,400
BE	5000	หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกระบอก	3,400
G	5000	เขย่าที่อัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที	3,400



รูปที่ 4.13 ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว Scenedesmus armartus ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ ในระบบ 5,000 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหัวให้อากาศแบบต่างๆ ในระบบ 5,000 มิลลิลิตร

4.6 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

การวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึง เฉพาะคลอโรฟิลล์ เอ บี เบตาแคโรทีน และไลโคปีน การวัดปริมาณสารต้านอนมูลอิสระดังกล่าวสามารถทำได้ด้วยการสกัดสารที่ต้องการวัดออกมาจากสาหร่ายก่อนแล้วจึงทดสอบปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งสามารถสกัดสารได้ 2 วิธี ซึ่งวิธีการสกัดที่แตกต่างกันก็ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าการสกัดด้วยชุด soxhlet สามารถสกัดได้สารต้านอนุมูลอิสระปริมาณมากกว่าวิธีการเขย่า อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยได้แก่ ปริมาณตัวทำละลาย และความร้อนที่ใช้ในการสกัด อย่างไรก็ตามสาหร่ายที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดควรมีปริมาณมากเพียงพอเพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบได้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสาหร่ายทีสกัดด้วยวิธีการเขย่า และด้วยชุด soxhlet

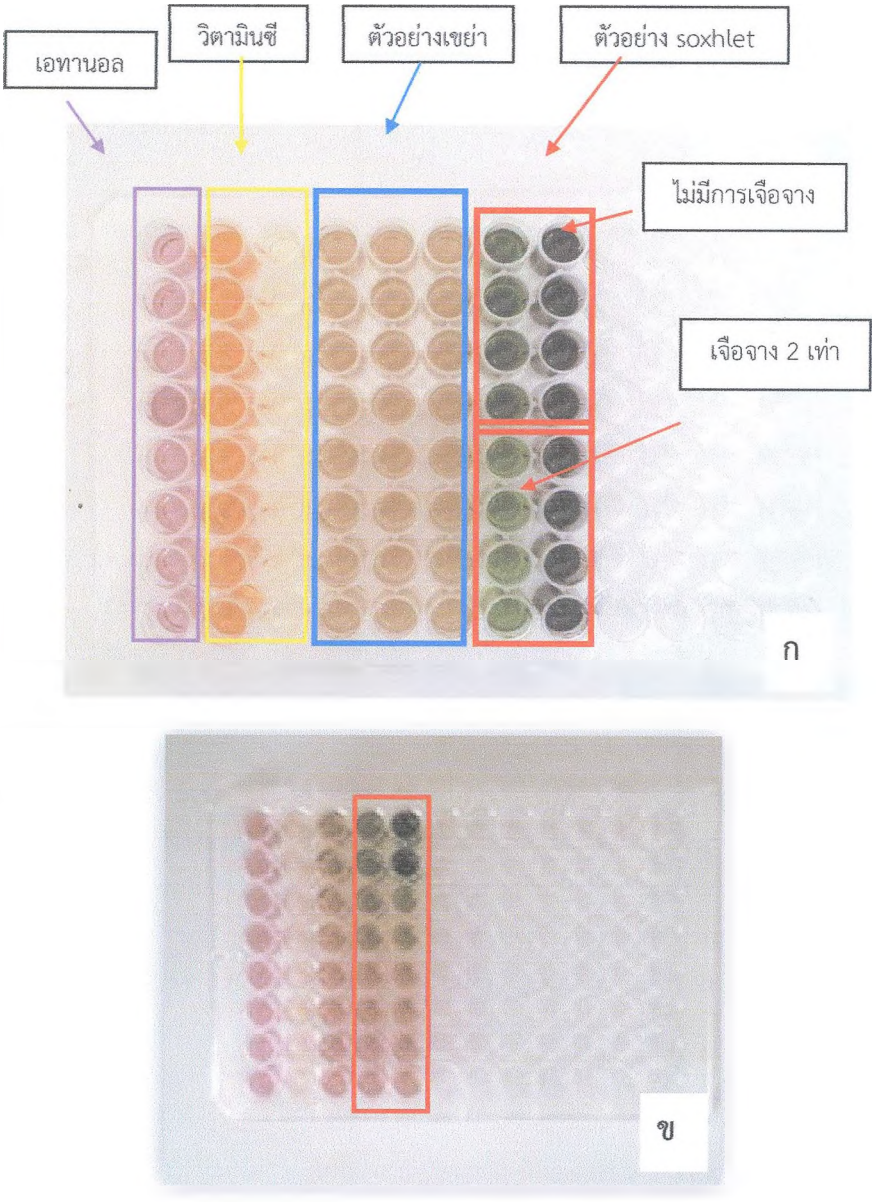
สารต้านอนุมูลอิสระ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	
	สกัดด้วยการเขย่า	สกัดด้วยชุด soxhlet
คลอโรฟิลล์ เอ	1.46	28.61
คลอโรฟิลล์ บี	0.58	11.02
เบตาแคโรทีน	0.80	8.24
ไลโคปีน	0.02	7.08

4.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

วิธีการสกัดมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้ดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อก่อนหน้าแล้ว ซึ่งพบว่าวิธีการสกัดด้วยชุด soxhlet ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด อย่างไรก็ตามปริมาณสารที่สกัดได้ไม่ได้ยืนยันถึงคุณภาพของสารสกัดซึ่งอาจถูกจำกัดด้วยความร้อน และแสง ดังนั้นจึงมีการทดสอบเพิ่มเติมในเรื่องของฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.15 พบว่าการสกัดสารต้าอนุมูลอิสระจากสาหร่ายด้วยวิธีการเขย่าสามารถสกัดสารที่มีคุณภาพที่ดีกว่า หรือกล่าวคือสามารถจางสี DPPH จากสีม่วงเข้มเป็นสีที่จางกว่าได้ และใกล้เคียงกับสารมาตรฐานซึ่งในที่นี้คือวิตามินซี

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีการเขย่า และชุด soxhlet

สารต้านอนุมูลอิสระ	ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (%)
สารสกัดจากสาหร่าย (วิธีการเขย่า)	85.33
สารสกัดจากสาหร่าย (ชุด soxhlet)	25.72
วิตามินซี (ความเข้มข้น 1 g/100 ml))	135.33



Blank วิตามินซี ตัวอย่าง 1 สกัดด้วยการเขย่า ตัวอย่าง 2 สกัดด้วยวิธี soxhlet

รูปที่ 4.15 สีของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานหลังทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH 0.35 mM แล้ว

4.8 ปริมาณสาหร่าย

จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ปริมาตรทั้งหมด 7,000 มิลลิลิตร ได้น้ำหนักเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ผ่านการทำ Freeze drying ตามภาคผนวก ฉ เท่ากับ 9.5106 กรัม

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสาหร่ายแห้งที่ได้จากงานวิจัย

ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ (มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)
7,000	9.5106

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Scenedesmus armatus เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 สูตร (BG11 N8 และ BBM) พบว่าไม่แตกต่างกันแต่ BG11 ให้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าสูตรอาหารอื่นๆ ความเข้มแสงที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดำเนินการเปรียบเทียบที่ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 ลักซ์ พบว่าการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ความเข้มแสงนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากเมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ 3,400 ลักซ์ ชนิดของหัวพ่นอากาศรูปแบบต่างๆ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยดำเนินการทดสอบที่มีปริมาตรอาหาร 400 มิลลิลิตร ปริมาณอากาศ 80 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ พบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีอัตราการการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ในขณะที่ระบบเพาะเลี้ยงปริมาตรอาหาร 4,000 มิลลิลิตร ปริมาณอากาศ 1,500 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าหัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ทั้งสองระบบมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าระบบการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดหัวพ่นอากาศมีความสัมพันธ์กับขนาดระบบที่ใช้เลี้ยง จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ในสภาวะที่ดีที่สุดปริมาตรอาหาร 7,000 มิลลิลิตร ได้เซลล์สาหร่าย *Scenedesmus armatus* ที่ผ่านการทำ Freeze drying มีน้ำหนักเท่ากับ 9.5106 กรัม

ข้อเสนอแนะ

1 วัสดุขวดที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยเครื่องปั๊มอากาศนั้น สามารถใช้ได้ทั้งวัสดุประเภท พลาสติก หรือแก้ว แต่วัสดุประเภทแก้วจะมีอายุการใช้งานนานกว่า และฆ่าเชื้อได้ง่ายกว่าแต่จะมีราคาสูงที่กว่าวัสดุประเภทพลาสติก

2. จากผลการทดลองหัวพ่นอากาศลักษณะต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงที่ปริมาตรอาหาร 400 มิลลิลิตร จะเห็นว่าหัวทรายทรงกลมมีประสิทธิภาพในการเจริญของสาหร่ายได้ดีที่สุด แต่จากการทดลอง หัวพ่นอากาศลักษณะนี้ให้ประสิทธิภาพที่ดีแต่ยากต่อการฆ่าเชื้อเป็นอย่างมาก เนื่องจากว่าหัวพ่นอากาศที่เป็นลักษณะหัวทรายจะไม่สามารถนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องออโตเครปได้ ดังนั้นจึงต้องฆ่าเชื้อด้วยการแช่น้ำยาฆ่าเชื้อ และควรล้างน้ำยาฆ่าเชื้อออกให้หมดจึงจะสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นหัวพ่นอากาศแบบสามทางก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่แนะนำ เนื่องจากง่ายต่อการฆ่าเชื้อ และมีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีขนาดใหญ่

3. ควรเลี้ยงในระบบขยายขนาดที่มากกว่า 4,000 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณสาหร่ายได้มากยิ่งขึ้น และ

4. ควรมีการทำการทดลองซ้ำเพื่อให้ได้ค่าการเจริญเติบโตที่แน่นอนและใช้เป็นฐานข้อมูลในการเลี้ยงครั้งต่อๆ ไป

เอกสารอ้างอิง

1. กีรติ อิสระพายัพ 2555 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกเชิงแสงแบบแผ่นเรียบขนาดใหญ่ เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เวเจทเททีฟความหนาแน่นสูงของฮีมาโทคอคคัส พลูเวียลิส วิทยานิพนธ์ในหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต ภาควิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข 2543 สาหร่าย ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย เอกสารเผยแพร่ชุดโครงการ "อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ" สกว. ชุดที่ 2 ISBN 974-346-878-1
3. ดวงกมล เรือนงาม 2550 อุทกพลศาสตร์และการถ่ายเทมวลในถังสัมผัสแบบอากาศยกชนิดไหลวนภายในด้วยตัวกระจายอากาศรูปวงแหวนในน้ำเค็ม วิทยานิพนธ์ในหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. พงศ์ธร เครือวณิชธรรม 2550 ความหลากหลายของสายพันธุ์สาหร่ายเขียวที่ผลิตสารสีแคโรทีนอยด์จากน้ำตกกระทิงและน้ำตกป่าละอู วิทยานิพนธ์ในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
5. ยุวดี พีรพรพิศาล 2548 สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของไทย พิมพ์ครั้งที่ 1 เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6. ยุวดี พีรพรพิศาล 2549 สาหร่ายวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 2 เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
7. Antonio Box, Antoni Sureda, Jorge Terrados, Antoni Pons, Salud Deudero, 2008. Antioxidant response and caulerpenyne production of the alienCaulerpa taxifolia (Vahl) epiphytized by the invasive algaeLophocladia lallemandii(Montagne), Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 364, 24–2.
8. Bing-Chung Liau, Chun-Ting Shen, Fong-Ping Liang, Siang-En Hong, Shih-Lan Hsu, Ting-Ting Jong and Chieh-Ming Chang, J. 2010. "Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity." The Journal of Supercritical Fluids 55: 169-175.
9. Campanella L., Martini E., Tomassetti M., 2005. Antioxidant capacity of the algae using a biosensor method, Talanta 66, 902–911.
10. Catarina Guedes, A., Maria Gião, S., Ana Matias, A., Ana Nunes, V.M., Manuela Pintado, E., Catarina Duarte, M.M. and Xavier Malcata, F. 2013. "Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing." Journal of Food Engineering 116: 478-482.

11. Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant, *Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis*, Separation Science and Technology 46 (2011) 1-7

12. Duangkamol Ruen-ngam, Artiwan Shotipruk, Prasert Pavasant, Siti Machmudah, and Motonobu Goto, Selective Extraction of Lutein from Alcohol-treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical Carbon Dioxide, Chemical Engineering & Technology 35 (2012) 255-260

13. Felix Nwosu, Jennifer Morris, Victoria A. Lund, Derek Stewart, Heather A. Ross, Gordon J. McDougall, 2011. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae, Food Chemistry 126, 1006–1012.

14. Hanaa, H., Abd El Baky, Gamal, S., El-Baroty, Abderrahim Bouaid, Mercedes Martinez and José Aracil. 2012. "Enhancement of lipid accumulation in Scenedesmus obliquus by Optimizing CO2 and Fe3+ levels for biodiesel production." Bioresource Technology 119: 429-432.

15. Hong-Wei Yen, Wei-Cheng Chiang and Cheng-Hsiung Sun. 2012. "Supercritical fluid extraction of lutein from Scenedesmus cultured in an autotrophical photobioreactor." Bioresource Technology 43: 53-57.

16. I.-Chuan Sheih, Tung-Kung Wu., Fang Tony J., 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems, Bioresource Technology 100, 3419–3425.

17. Jiang-Gong Liu, Chien-Wei Hou, Shin-Yi Lee, Yaju Chuang, Chih-Cheng Lin, 2011. Antioxidant effects and UVB protective activity ofSpirulina(Arthrospira platensis) products fermented with lactic acid bacteria, Process Biochemistry 46, 1405–1410.

18. Li Xin, Hu Hong-ying, Gan Ke and Sun Ying-xue. 2010. "Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp." Bioresource Technology 101: 5494-5500.

19. Li Xin, Hu Hong-ying, Gan Ke and Yang Jia. 2010. "Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources." Bioresource Technology 36: 379-381.

20. Liang Wang, Yunguang Li, Milton Sommerfeld and Qiang Hu. 2013. "A flexible culture process for production of the green microalga Scenedesmus dimorphus rich in protein, carbohydrate or lipid." Bioresource Technology 129: 289-295.

21. Lingzhao Wang, Bao Yang, Binlun Yan and Xingcun Yao. 2012. "Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil." Innovative Food Science and Emerging Technologies 13: 120-127.

22. Lu chen, Cunwen Wang, Weiguo Wang and Jiang Wei. 2013. "Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. Cultivated in an open-pond system." Bioresource Technology 133: 9-15.

23. Macías-Sánchez, M.D., Fernandez-Sevilla, J.M., Acién Fernández, F.G., Cerón García, M.C. and Molina Grima, E. 2010. "Supercritical fluid extraction of carotenoids from Scenedesmus almeriensis." Food Chemistry 123: 928-935.

24. Macías-Sáncheza, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. and Montero, O. 2009. "Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from Dunaliella salina." Talanta 77: 947-952.

25. Ming-Chang Chan, Shih-Hsin Hoa, Duu-Jong Lee, Chun-Yen Chen, Chieh-Chen Huangd and Jo-Shu Chang. 2013. "Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N." Biochemical Engineering Journal 78: 24-31.

26. Muthu Arumugama, Ankur Agarwal, Mahesh Chandra Arya and Zakwan Ahmed. 2013 "Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae Scenedesmus bijugatus." Bioresource Technology 131: 246-249.

27. Nagata, M. and I. Yamashita. 1992. Simple method for simulta neous determination of chlorophyll and Carotenoids in tomato fruit. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology 39: 925-928.

28. Onofrejová L., Vašíčková J., Klejdus B., Stratil P., Mišurcová L., Kráčmar S., Kopecký J., Vacek J. 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51, 464–470.

29. Plaza M., Santoyo S., Jaime L., García-Blairsy G. 2010. Screening for bioactive compounds from algae: Short communication, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51, 450-455.

30. Ratih Pangestuti, Se-Kwon Kim, 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae, Journal of Functional Foods 3, 255–266.

31. Sa´nchez, J.F., Ferna´ndez, J.M., Acie´n, F.G., Rueda, A., Pe´rez-Parra, J. and Molina, E. 2008. "Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*." Process Biochemistry 43: 398-405.

32. Shih-Hsin Ho, Chun-Yen Chen and Jo-Shu Chang. 2012. "Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N." Bioresource Technology 113: 244-252.

33. Shih-Hsin Ho, Ming-Chang Chan, Chen-Chun Liu, Chun-Yen Chen, Wen-Lung Lee, Duu-Jong Lee and Jo-Shu Chang. 2014. "Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus FSP-3 using light-related strategies." Bioresource Technology 152: 275-282.

34. Takashi Kuda, Tomoko Hishi, Sayuri Maekawa, 2006. Antioxidant properties of dried product of "haba-nori", an edible brown alga, *Petalonia binghamiae* (J. Agaradh) Vinogradova, Food Chemistry 98, 545-550.

35. Victor Abrahamsson, Irene Rodriguez-Meizoso and Charlotta Turner. 2012. "Determination of carotenoids in microalgae using supercritical fluid extraction and chromatography." Journal of Chromatography A 1250: 63-68.

36. Wu Yin-Hua, Yu Yin, Li Xin, Hu Hong-Ying and Su Zhen-Feng. 2012. "Biomass production of a Scenedesmus sp. under phosphorous-starvation cultivation condition." Bioresource Technology 112: 192-198.

37. Zbigniew Tukaj, Krystyna Matusiak-Mikulin, Justyna Lewandowska and Janusz Szurkowski. 2003. "Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga Scenedesmus armatus." Plant Physiology and Biochemistry 41: 337-344.

38. Scenedesmus armatus [online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Scenedesmus

39. Scenedesmus armatus [online]. Available: http://www.algaedepot.org/algae-reference/algae-

ภาคผนวก ก

แหล่งน้ำแหล่งที่ 2 จากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณบึงพระราม จังหวัดพระนครศรีอยุธยา จะแบ่งได้อีกเป็น 2 บริเวณ 1. บริเวณฝั่งขวาของสิ่งก่อสร้างที่ยื่นลงไปในบึง 2. บริเวณฝั่งขวาของสิ่งก่อสร้างที่ยื่นลงไปในบึง

1. บริเวณฝั่งขวาของสิ่งก่อสร้างที่ยื่นลงไปในบึง

2. บริเวณฝั่งขวาของสิ่งก่อสร้างที่ยื่นลงไปในบึง

ภาคผนวก ข

สูตรอาหาร BG-11

สารเคมี	ความเข้มข้น(g/l)
$NaNO_3$	1.5
K_2HPO_4	0.04
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036
Citric acid	0.006
Ferric Ammonium Citrate	0.006
EDTA disodium magnesium salt	0.01
Na_2CO_3	0.02
Trace element	1 ml
- H_3BO_3	0.715
- $MnCl_3 \cdot 4H_2O$	0.4525
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0555
- $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0975
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	3.95
- $CO(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	2.45

สูตรอาหาร N-8 medium (ขจรเกียรติ์, 2550)

สารเคมี	ความเข้มข้น(g/l)
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.26
KH_2PO_4	0.74
KNO_3	0.01
FeEDTA	0.01
$MgSO_4 \cdot 18H_2O$	0.05
$CaCl_2$	1.0
Trace element	1 ml
- $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	3.58
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	12.98
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.83
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3.20

สูตรอาหาร BBM (Bold's Basal Medium) (ขจรเกียรติ์, 2550)

สารเคมี	ความเข้มข้น(g/l)
$NaNO_3$	0.25
$CaCl_2.2H_2O$	0.025
$MgSO_4.7H_2O$	0.075
K_2HPO_4	0.075
KH_2PO_4	0.175
NaCl	0.025
Trace element	1 ml
- EDTA stock[1]	1 ml
- H-Fe stock[2]	1 ml
- Boron stock[3]	1 ml
- H-H5 stock[4]	1 ml

หมายเหตุ [1]EDTA 5 g , KOH 3.1 g เติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml

[2]H-Fe stock: $FeSO_4.7H_2O$ 0.498 g ละลายใน 0.1% H_2SO_4 100 ml

[3]Boron stock: H_3BO_3 1.142 gเติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml

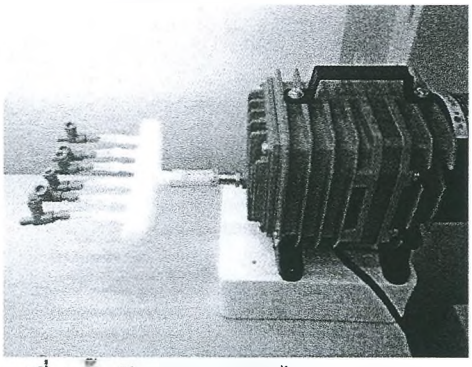
[4]H-H5 stock ประกอบด้วยส่วนประกอบ 5 ชนิด

- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.882 g
- MoO_3 0.071 g
- $Co(NO_3)_2 \cdot 7H2O$ 0.049 g
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.144 g
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.157 g

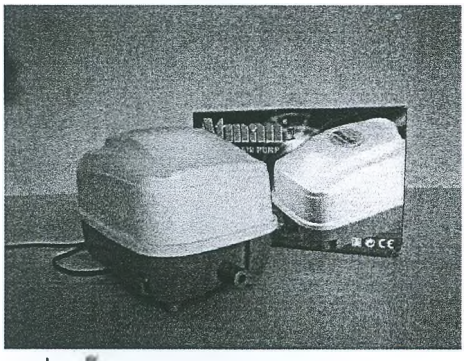
นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายใน 0.1% H_2SO_4 100 ml

ภาคผนวก ค

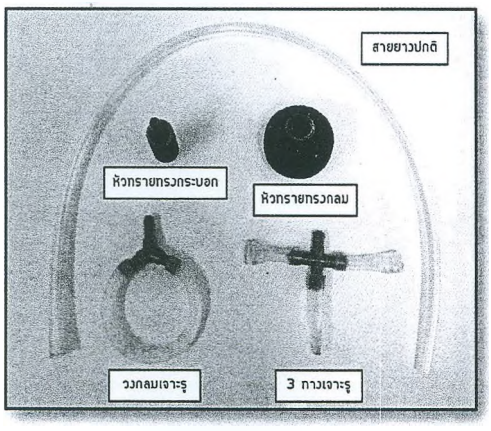
การติดตั้งระบบเพาะเลี้ยงสาหร่าย



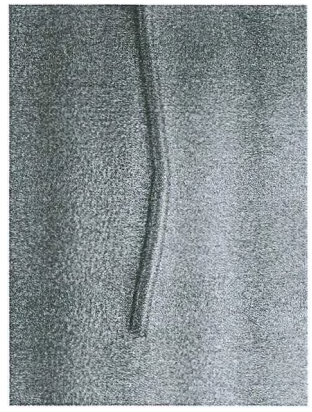
รูปที่ 1 ปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 58W แรงลม 70 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.028 Mpa (Yamano, AP-40, China)



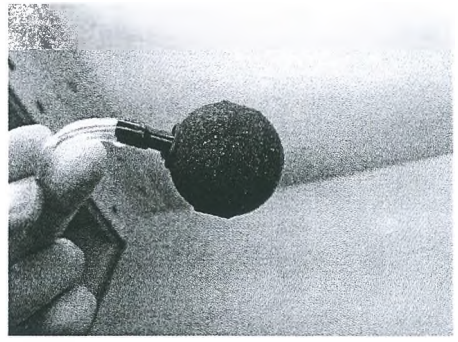
รูปที่ 2 ปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 47W แรงลม 70/40 ลิตร/นาที แรงดันลม 0.038/0.044 Mpa (Atman, HP-8000)



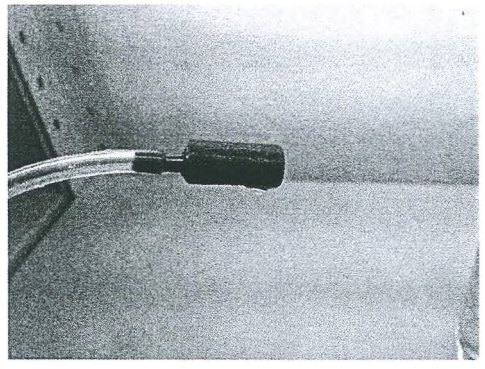
รูปที่ 3 หัวปล่อยอากาศแบบต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง



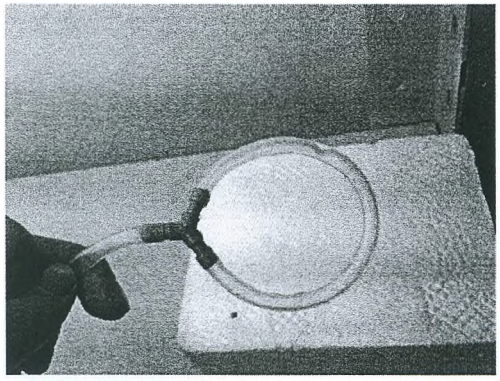
รูปที่ 4 หัวปล่อยอากาศแบบสายยางปกติ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร



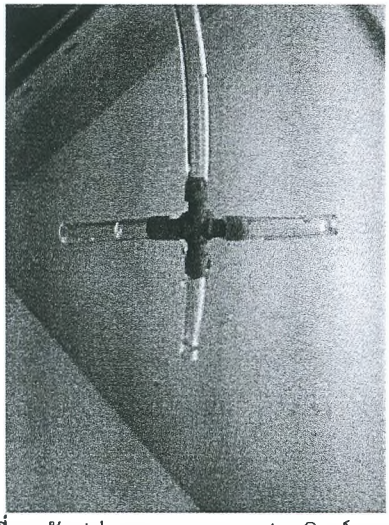
รูปที่ 5 หัวปล่อยอากาศแบบหัวทรายทรงกลม ขนาดเส้นรอบวง 10 เซนติเมตร



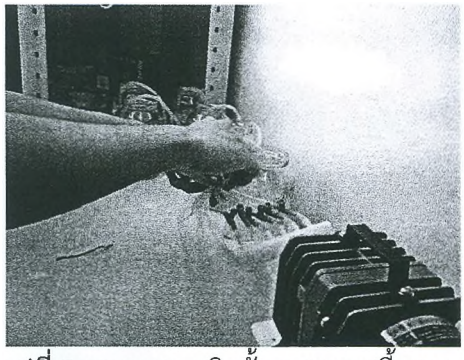
รูปที่ 6 หัวปล่อยอากาศแบบหัวทรายทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร ยาว 2.5 เซนติเมตร



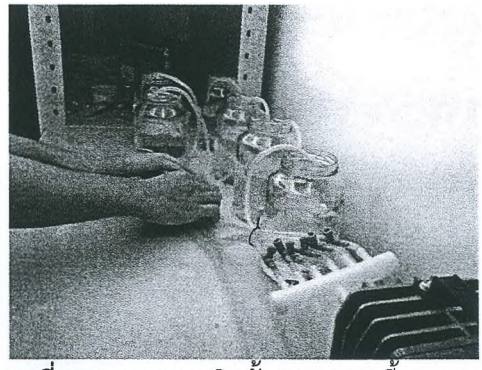
รูปที่ 6 หัวปล่อยอากาศแบบประดิษฐ์ (วงกลมเจาะรู)



รูปที่ 7 หัวปล่อยอากาศแบบประดิษฐ์ (สามทางเจาะรู)

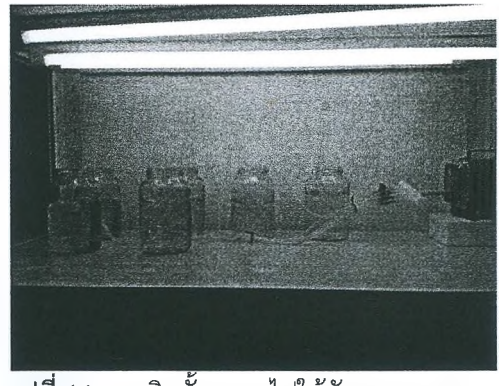


รูปที่ 8 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศรูปแบบต่างๆ

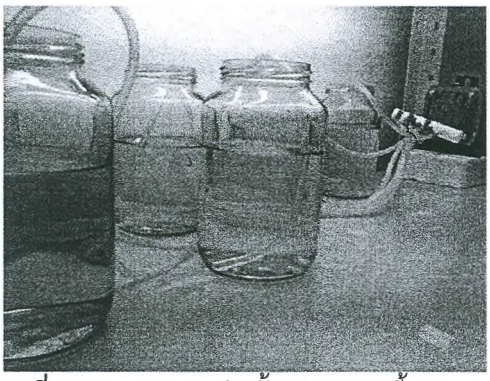


รูปที่ 9 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศรูปแบบต่างๆ

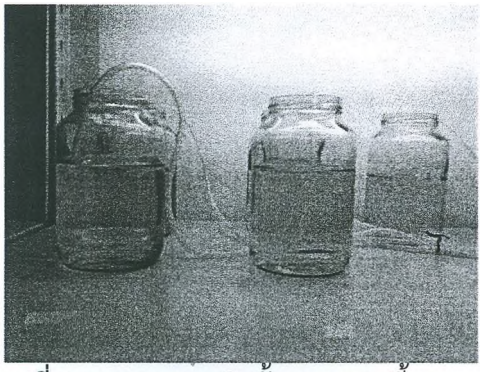
รูปที่ 10 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศรูปแบบต่างๆ



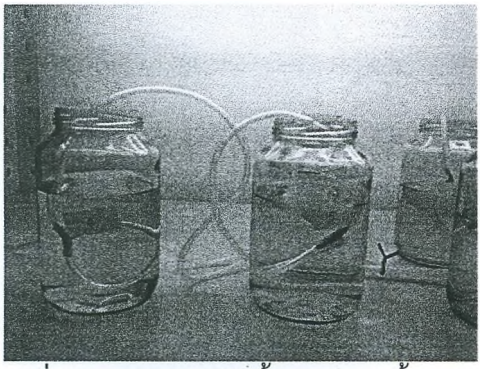
รูปที่ 11 การติดตั้งหลอดไฟให้กับระบบการเพาะเลี้ยง



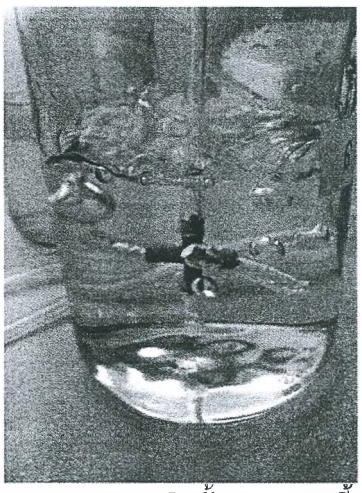
รูปที่ 12 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศแบบสายยางปกติ



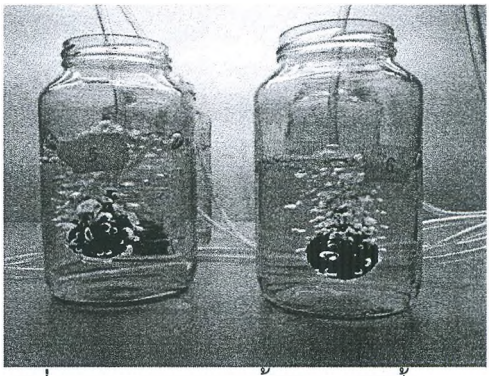
รูปที่ 13 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศแบบสายยางปกติ



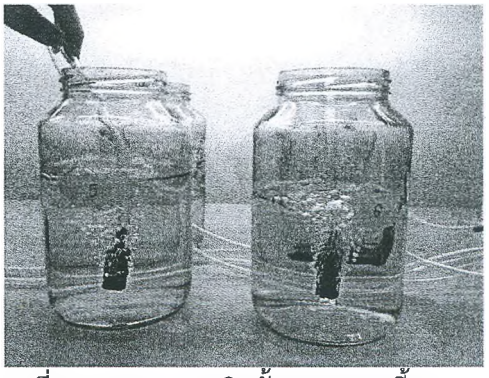
รูปที่ 14 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศแบบประดิษฐ์ (วงกลมเจาะรู)



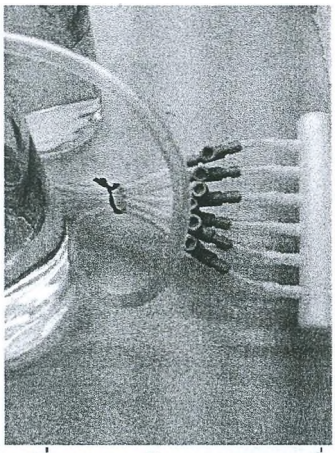
รูปที่ 15 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศแบบประดิษฐ์ (สามทางเจาะรู)



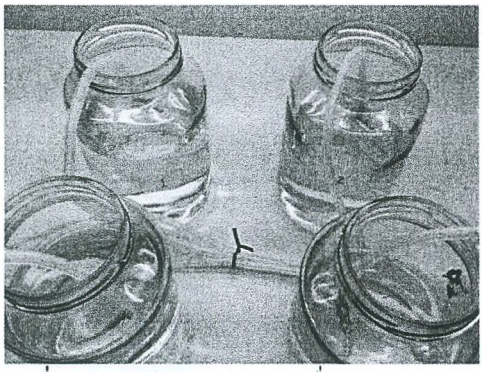
รูปที่ 16 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศแบบหัวทรายทรงกลม



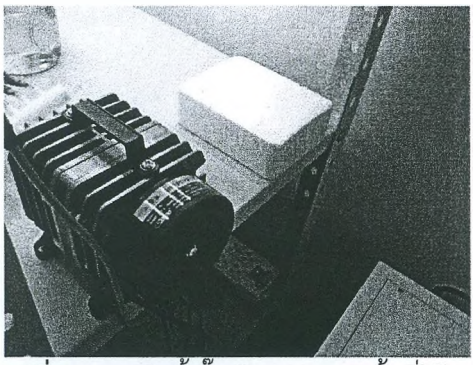
รูปที่ 17 การทดสอบติดตั้งระบบการเลี้ยงแบบให้อากาศโดยใช้หัวปล่อยอากาศแบบหัวทรายทรงกระบอก



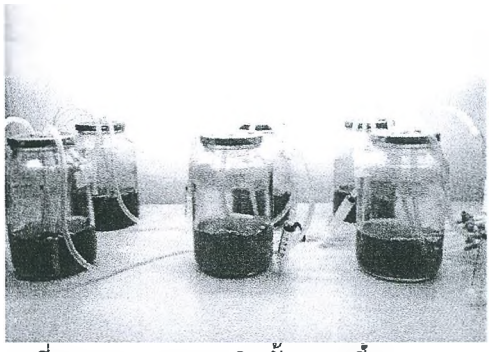
รูปที่ 18 การมัดรวมสายยางเพื่อความสะดวกในการทำงาน



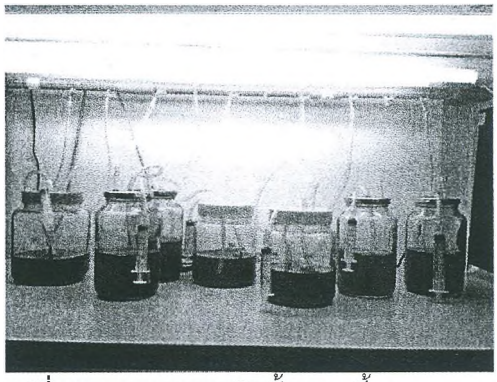
รูปที่ 19 การมัดรวมสายยางเพื่อความสะดวกในการทำงาน



รูปที่ 20 การติดตั้งปั๊มอัดอากาศบนชั้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ



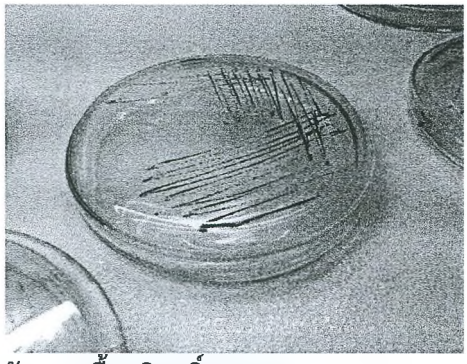
รูปที่ 21 ภาพรวมการติดตั้งเพาะเลี้ยงสาหร่าย



รูปที่ 22 ภาพรวมการติดตั้งเพาะเลี้ยงสาหร่าย

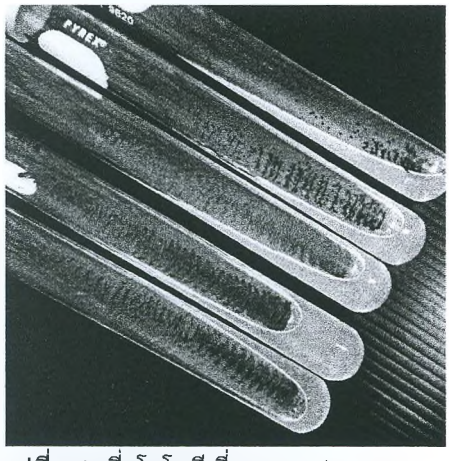
ภาคผนวก ง

การคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และถ่ายเชื้อ

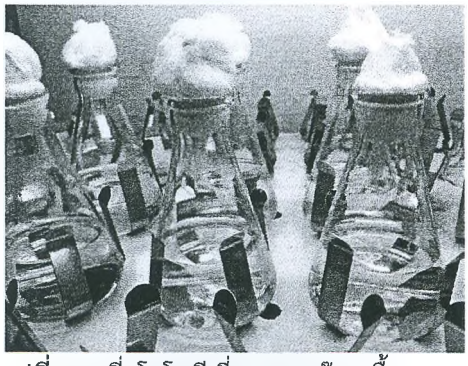


คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากจุฬา

รูปที่ 23 นำเชื้อที่ได้มา cross streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ในอาหารแข็ง BG1



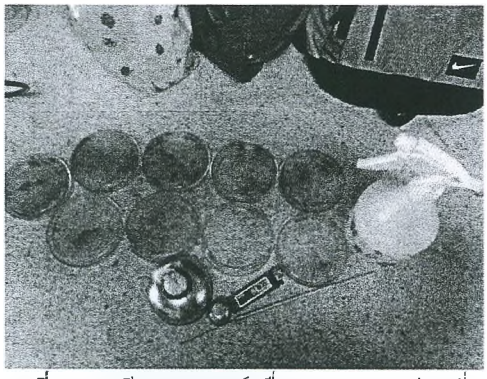
รูปที่ 24 เขี่ยโคโลนีเดี่ยวจาก Plate มาลงสแลนท์ ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บเป็นสต๊อก



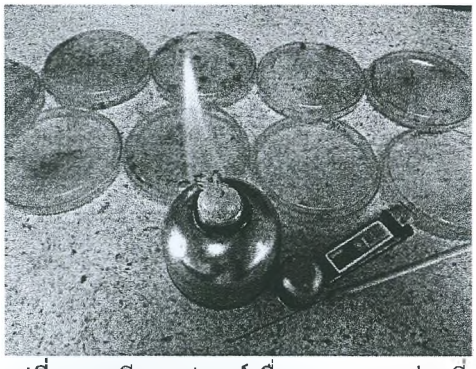
รูปที่ 25 เขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากสต๊อกเชื้อสาหร่าย 1 loop ลงใน flask อาหารเหลว BG11

รูปที่ 26 สาหร่ายบริสุทธิ์เจริญเติบโตในอาหารเหลว BG11

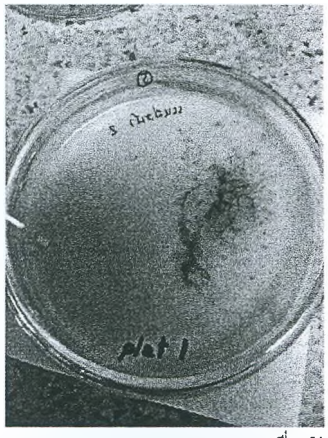
คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากแหล่งน้ำ 1 และ 2
(อ้างอิงตำแหน่งของแหล่งน้ำตาม ภาคผนวก ก)



รูปที่ 27 เตรียมอุปกรณ์เพื่อตรวจดูสาหร่ายที่ต้องการคัดแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

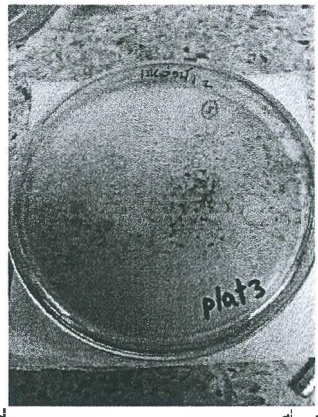


รูปที่ 28 เตรียมอุปกรณ์เพื่อตรวจดูสาหร่ายที่ต้องการคัดแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 29 การ spread plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ (แหล่งน้ำ 2 จานที่ 1)

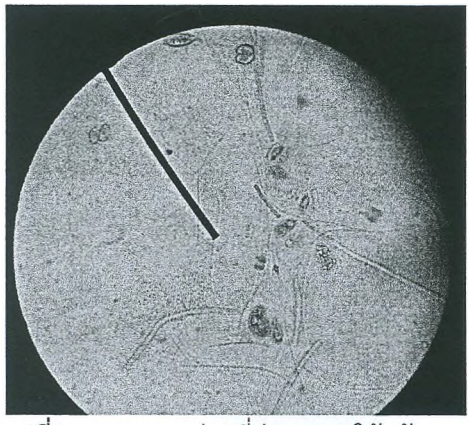
รูปที่ 30 การ spread plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ (แหล่งน้ำ 2 จานที่ 2)



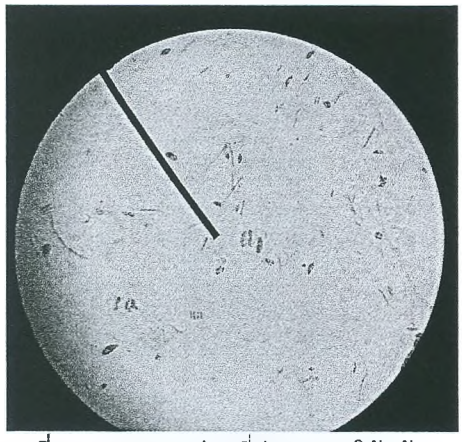
รูปที่ 31 การ spread plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ (แหล่งน้ำ 2 จานที่ 3)

รูปที่ 32 การ spread plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ (แหล่งน้ำ 2 จานที่ 5)

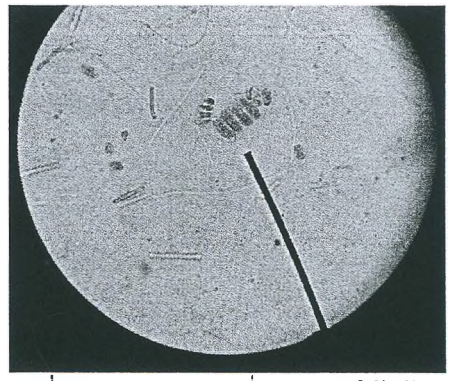
รูปที่ 33 การ spread plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ (แหล่งน้ำ 1 จานที่ 1)



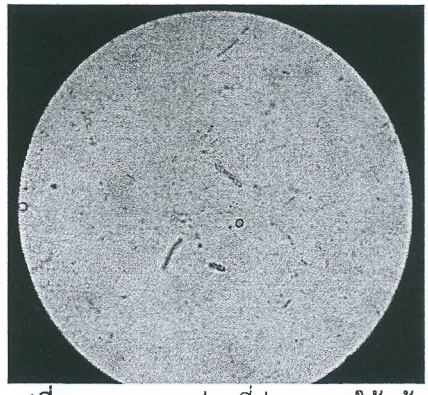
รูปที่ 34 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 1)



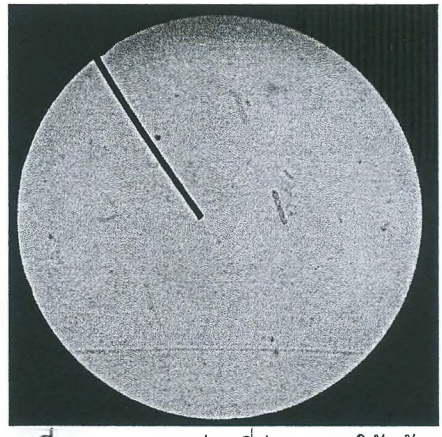
รูปที่ 35 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 1)



รูปที่ 36 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 1)

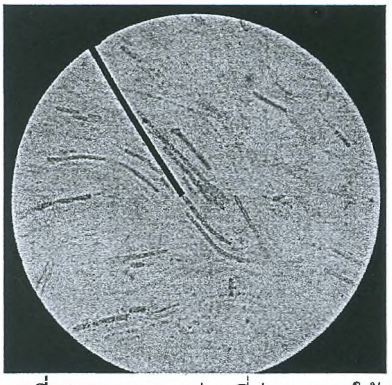


รูปที่ 37 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์
(แหล่งน้ำ 2)

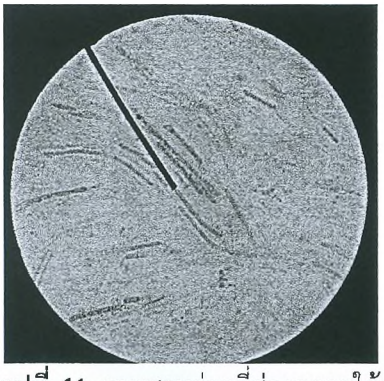


รูปที่ 38 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)

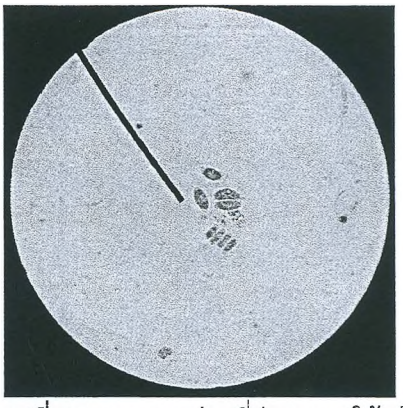
รูปที่ 39 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



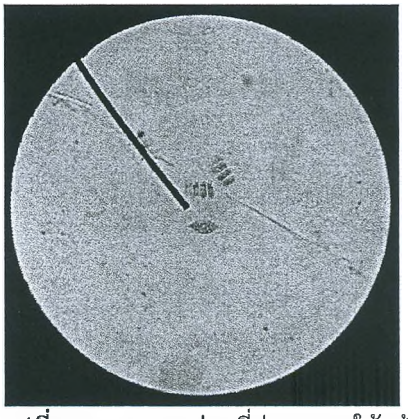
รูปที่ 40 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



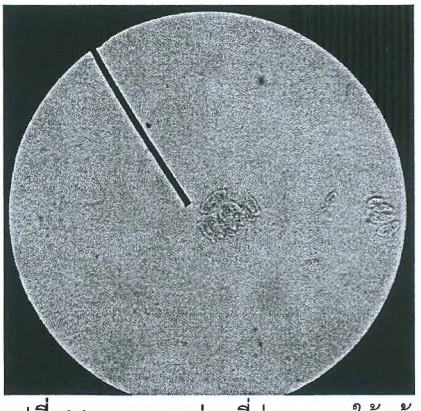
รูปที่ 41 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



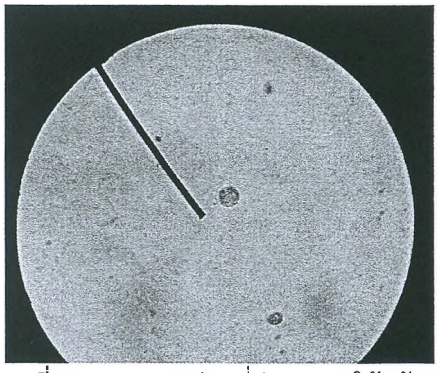
รูปที่ 42 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



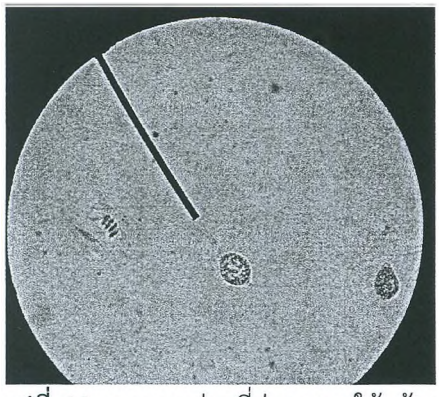
รูปที่ 43 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



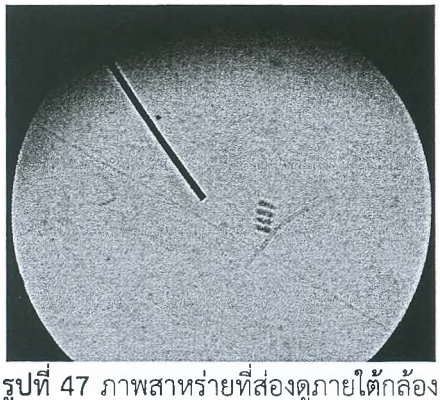
รูปที่ 44 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



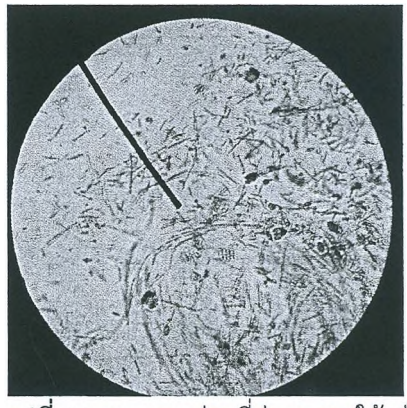
รูปที่ 45 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



รูปที่ 46 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)



รูปที่ 47 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)

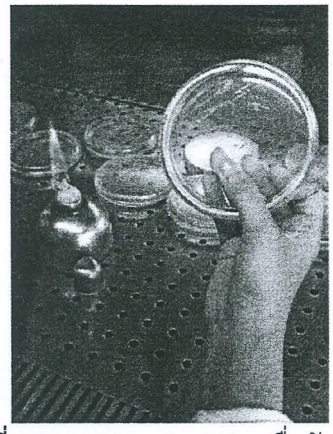


รูปที่ 48 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)

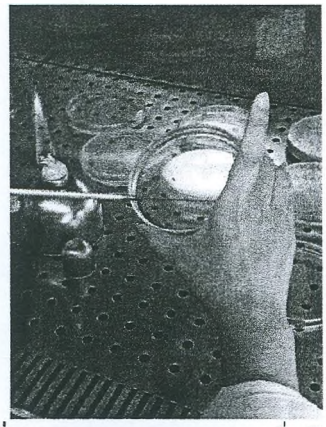
รูปที่ 49 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)

รูปที่ 50 ภาพสาหร่ายที่ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แหล่งน้ำ 2)

รูปที่ 51 การ Streak plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ



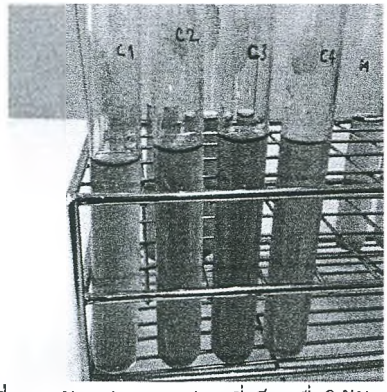
รูปที่ 52 การ Streak plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ



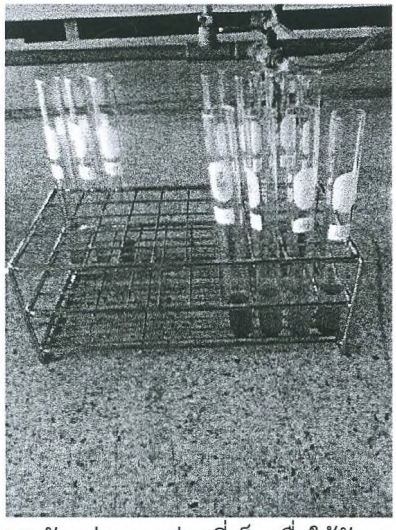
รูปที่ 53 การ Streak plate เพื่อคัดแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการ

ภาคผนวก จ

<u>การเก็บผลและวัดผลการทดลอง</u>



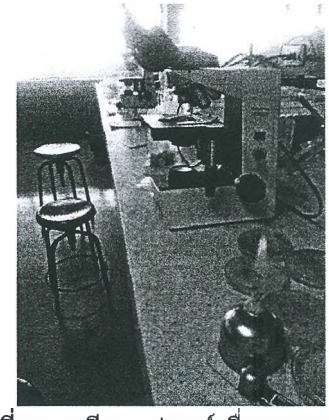
รูปที่ 54 ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บเพื่อใช้วัดผลการเจริญเติบโต



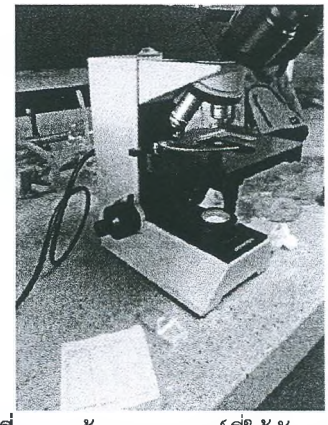
รูปที่ 55 ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บเพื่อใช้วัดผลการเจริญเติบโต

รูปที่ 56 การวัดผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการนับเซลล์ด้วยสไลด์ Haemacytometer

รูปที่ 57 การวัดผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการนับเซลล์ด้วยสไลด์ Haemacytometer



รูปที่ 58 เตรียมอุปกรณ์เพื่อตรวจดูสาหร่ายที่ต้องการคัดแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 59 กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้นับเซลล์และตรวจดูสาหร่ายที่ต้องการคัดแยกให้บริสุทธิ์

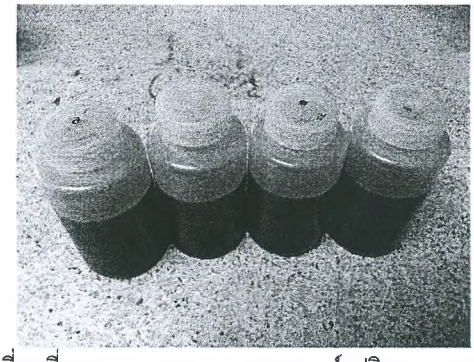
ภาคผนวก ฉ

<u>การเตรียมต้วอย่างสาหร่ายเพื่อการทำแห้ง</u>

1. นำขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาด 6 ลิตรที่มีเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ให้เซลล์ตกตะกอนเป็นเวลา 1 คืน
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสทิ้งบางส่วน จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเซลล์จำนวนมาก

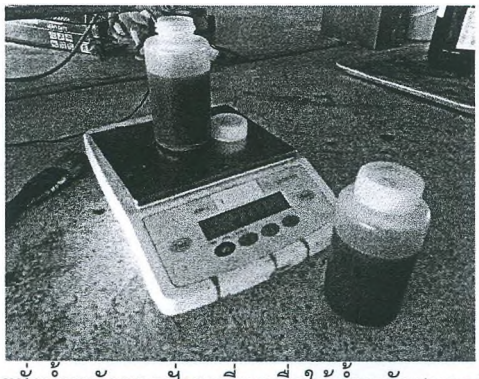
รูปที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากการเทส่วนใสทิ้ง ซึ่งจะมีเซลล์ตกตะกอนอยู่มาก

3. ใช้กระบอกตัวในการตวงอาหารเหลวที่มีเซลล์ใส่ลงในขวดปั่นเหวี่ยง ขวดละ 200 มิลลิลิตร



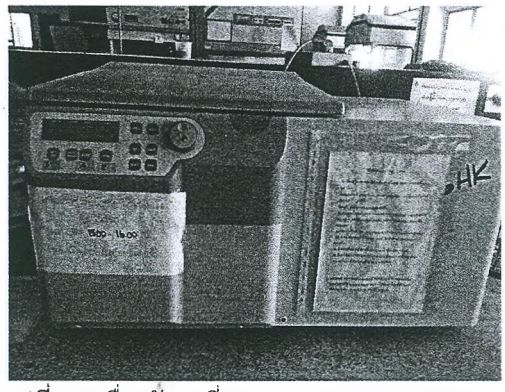
รูปที่ 2 ขวดปั่นเหวี่ยงที่บรรจุอาหารเหลวและเซลล์ ปริมาตรขวดละ 200 มิลลิลิตร

4. นำขวดปั่นเหวี่ยงที่มีอาหารเหลวและเซลล์ไปชั่งน้ำหนักเพื่อปรับน้ำหนักให้สมดุลกันด้วยเครื่องชั่ง



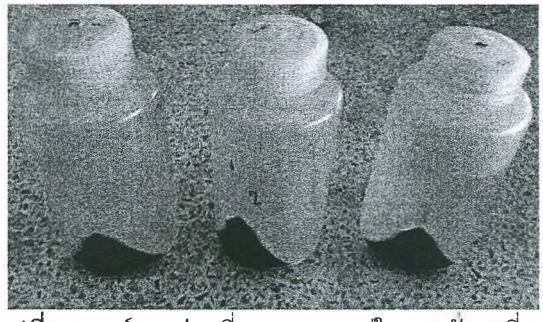
รูปที่ 3 การชั่งน้ำหนักขวดปั่นเหวี่ยงเพื่อให้น้ำหนักสมดุลกันทุกขวด

5. นำขวดปั่นเหวี่ยงที่น้ำหนักสมดุลกันแล้วไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) โดยใช้ความเร็วรอบ 7,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส



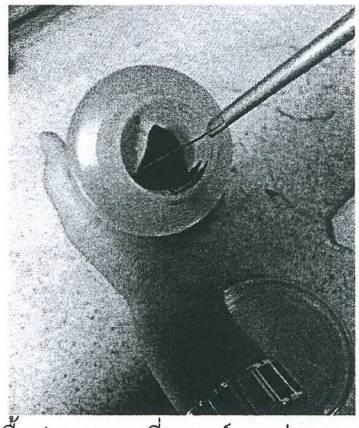
รูปที่ 4 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)

6. เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือเซลล์สาหร่ายตกตะกอนอยู่ในขวดปั่นเหวี่ยง ดังรูปที่ 10

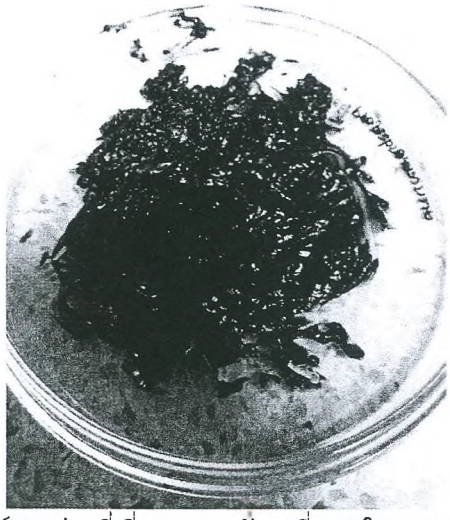


รูปที่ 5 เซลล์สาหร่ายที่ตกตะกอนอยู่ในขวดปั่นเหวี่ยง

7. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลมเขี่ยเซลล์สาหร่ายใส่ลงในจานแก้วเพาะเชื้อ



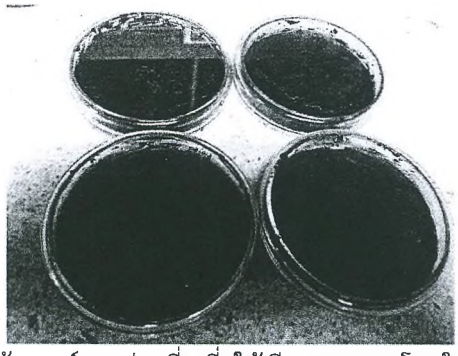
รูปที่ 6 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลมเขี่ยเซลล์สาหร่ายออกจากขวดปั่นเหวี่ยง



รูปที่ 7 เซลล์สาหร่ายที่เขี่ยจากขวดปั่นเหวี่ยงลงในจานแก้วเพาะเชื้อ

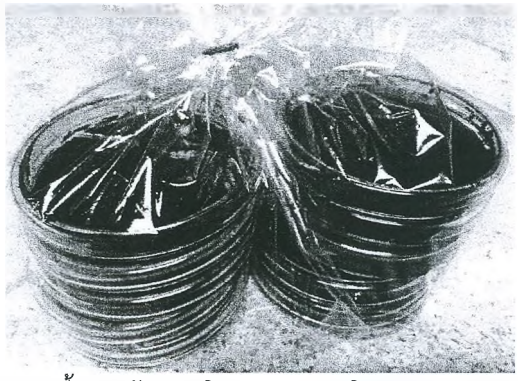
8. ใช้ช้อนตักสารเกลี่ยเซลล์สาหร่ายในจานแก้วเพาะเชื้อให้ผิวหน้าเรียบและบาง ดังรูปที่ 13-14

รูปที่ 8 ผิวหน้าเซลล์สาหร่ายที่เกลี่ยให้เรียบและบางโดยใช้ช้อนตักสาร



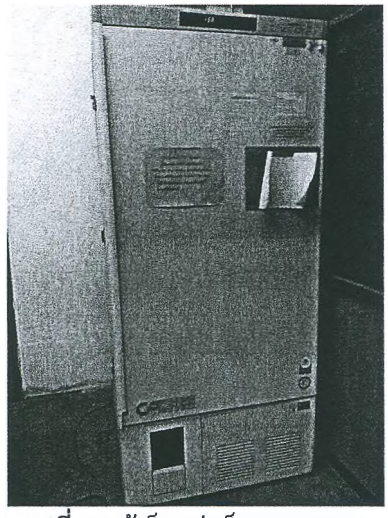
รูปที่ 9 ผิวหน้าเซลล์สาหร่ายที่เกลี่ยให้เรียบและบางโดยใช้ช้อนตักสาร

9. ปิดฝาจานแก้วเพาะเชื้อแล้วนำจานแก้วเพาะเชื้อใส่ลงในถุงพลาสติกใส มัดปากถุงหลวมๆ ด้วยยางรัดของ ดังรูปที่ 15

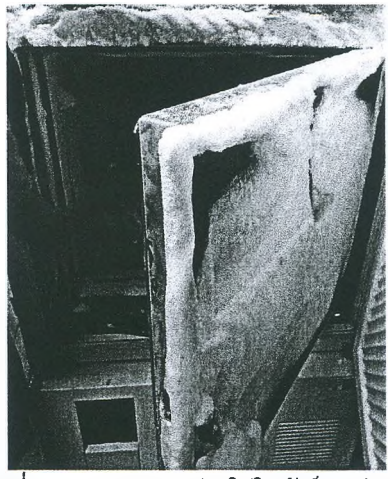


รูปที่ 10 นำจานแก้วเพาะเชื้อวางซ้อนกันในถุงพลาสติกใส มัดปากถุงหลวมๆ ด้วยยางรัดของ

10. นำถุงพลาสติกที่มีจานแก้วเพาะเชื้อไปใส่ตู้แช่แข็งเป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



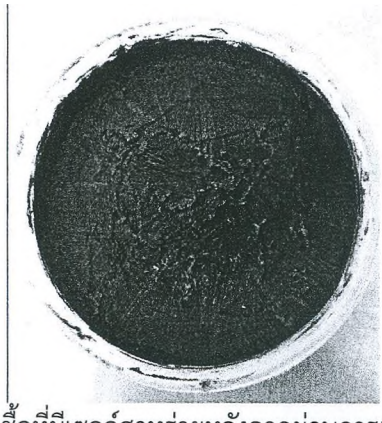
รูปที่ 11 ตู้เย็นแช่แข็ง (Freezer)



รูปที่ 12 การนำตัวอย่างใส่ในตู้เย็นแช่แข็ง

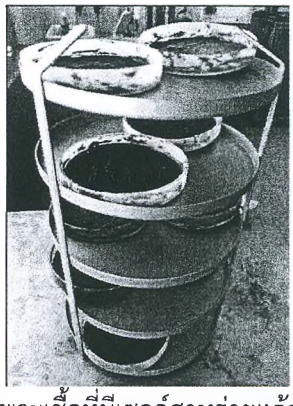
11. เปิดเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ เตรียมการเครื่องให้พร้อมทำงาน

12. นำจานบรรจุเซลล์สาหร่ายออกมาจากตู้เย็นแช่แข็งจะพบว่าเซลล์จะแข็งและมีรอยแตกดังรูปที่ 18



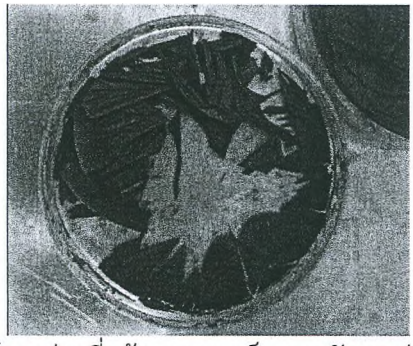
รูปที่ 13 จานแก้วเพาะเชื้อที่มีเซลล์สาหร่ายหลังจากผ่านการแช่ในตู้เย็นแช่แข็ง 1 คืน

13. เปิดฝาจานแก้วเพาะเชื้อแล้ววางลงในชั้นวางตัวอย่าง ชั้นละ 2-3 จาน

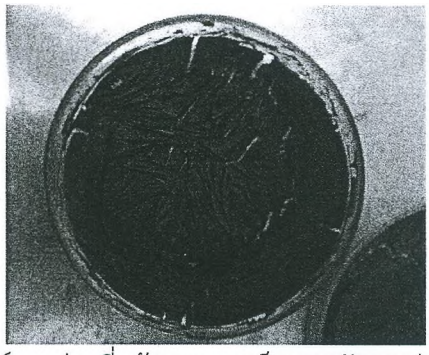


รูปที่ 14 เปิดฝาจานแก้วเพาะเชื้อที่มีเซลล์สาหร่ายแล้ววางลงบนชั้นวางตัวอย่าง

14. ปล่อยให้เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศทำงานจนกระทั่งเซลล์สาหร่ายแห้ง ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของเซลล์จะแตกเป็นผง
15. ปิดปั๊มอัดอากาศก่อนแล้วจึงปิดเครื่องทำแห้ง
16. นำเซลล์สาหร่ายที่แห้งแล้วออกมาจากเครื่องทำแห้ง จะได้เซลล์ดังรูปที่ 20-21



รูปที่ 15เซลล์สาหร่ายที่แห้งและแตกเป็นผงหลังจากผ่านการทำแห้ง



รูปที่ 16 เซลล์สาหร่ายที่แห้งและแตกเป็นผงหลังจากผ่านการทำแห้ง

17. นำเซลล์สาหร่ายที่ได้ไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

18. เก็บเซลล์สาหร่ายไว้ในถุงซิปล็อค เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข้อเสนอแนะ

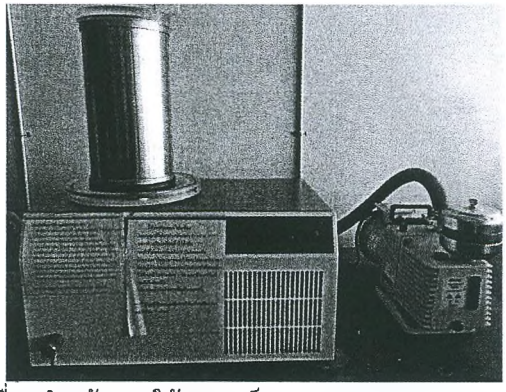
1. ควรเช็ดน้ำภายในเครื่อง Freeze dryer ให้แห้งสนิท

2. ควรเปิดเครื่อง Freeze dryer ก่อนเริ่มใช้งานเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้เครื่อง Freeze dryer ทำความเย็นก่อน มิเช่นนั้นจะทำให้เกิดการละลายได้ และทำให้ไม่ได้เป็นผง

3. การหยิบ/จับสิ่งของที่ผ่านการแช่จากตู้แช่แข็ง (Freezer) ควรทำด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากมีความเย็นสูงอาจทำให้ได้รับบาดเจ็บจากน้ำแข็ง

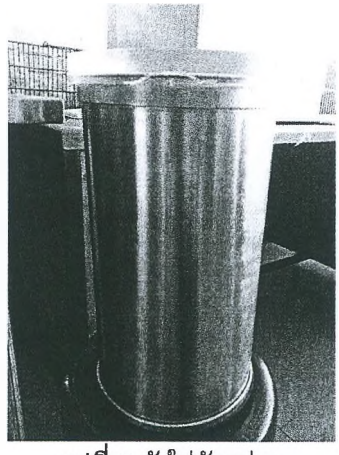
ภาคผนวก ช

วิธีการใช้เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer)



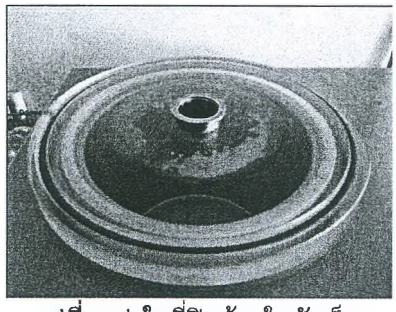
รูปที่ 1 เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer)

1. หมุนเปิดวาล์วกลมด้านหน้าเครื่องเพื่อปล่อยน้ำที่ขังอยู่ด้านในเครื่องออกให้หมด
2. ยกถังใส่ตัวอย่างที่อยู่ด้านบนเครื่องออกก่อน



รูปที่ 2 ถังใส่ตัวอย่าง

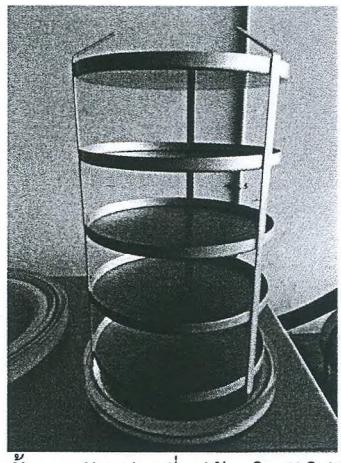
3. เปิดฝาใสที่ปิดด้านในถังเย็นออก ใช้ผ้าเช็ดด้านในเครื่องให้แห้งอย่าให้มีน้ำขังเปียกอยู่ หมุนปิดวาล์วกลมด้านหน้าเครื่องให้สนิท



รูปที่ 3 ฝาใสที่ปิดด้านในถังเย็น

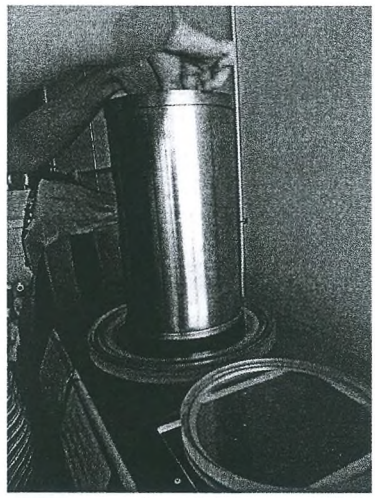
4. เปิดปุ่มเปิดเครื่องซึ่งอยู่บริเวณด้านหลังเครื่องฝั่งขวามือด้านล่าง

5. ปล่อยให้เครื่องทำความเย็นประมาณ 15-30 นาที หรือจนกว่าจะมีไอน้ำและน้ำแข็งเกาะด้านในเครื่อง โดยไม่ต้องเปิดปั๊มอัดอากาศ
6. เมื่อเครื่องเย็นพร้อมใช้งาน ให้นำชั้นวางออกมาจากเครื่องทำแห้งแล้ววางตัวอย่างลงไป



รูปที่ 4 ชั้นวางตัวอย่างที่อยู่ด้านในถังใส่ตัวอย่าง

7. นำชั้นวางตัวอย่างใส่ลงในถังใส่ตัวอย่าง ยกถังวางบนเครื่องทำแห้งแล้วจึงปิดฝาให้สนิท



รูปที่ 5 การใส่ชั้นวางตัวอย่างลงในถังใส่ตัวอย่างแล้วจึงค่อยปิดฝาให้สนิท

8. เปิดปั๊มอัดอากาศ
9. ปล่อยให้เครื่องทำงานจนตัวอย่างแห้งสนิทกลายเป็นผง
10. ปิดปั๊มอัดอากาศแล้วจึงปิดเครื่องทำแห้ง
11. นำตัวอย่างออกจากเครื่องได้

ภาคผนวก ซ

ตาราง 1 น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry weight) ปริมาณเซลล์ และค่า OD ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ

ครั้งที่	BG11			N8			BBM		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD
1	0.0800	210,000	0.083	0.3600	210,000	0.074	0.4000	230,000	0.068
2	0.3200	440,000	0.248	0.3600	520,000	0.214	0.3600	450,000	0.193
3	0.0200	580,000	0.331	0.2600	590,000	0.281	0.0400	520,000	0.247
4	0.4000	680,000	0.423	0.2000	960,000	0.402	0.5000	730,000	0.388
5	0.3800	1,040,000	0.515	0.2600	1,300,000	0.550	0.3600	1,110,000	0.562
6	0.4400	1,330,000	0.623	1.3000	1,570,000	0.631	0.2000	1,550,000	0.630
7	0.2600	1,560,000	0.794	0.2000	2,450,000	0.828	0.2200	1,640,000	0.784
8	0.4400	1,620,000	0.839	0.3800	2,660,000	0.927	0.3000	2,760,000	0.878
9	0.4600	2,500,000	1.151	0.4400	3,830,000	1.161	0.6200	3,010,000	1.055
10	1.2400	2,530,000	1.279	0.9000	4,230,000	1.243	0.5200	2,910,000	1.109
11	2.0000	2,860,000	1.372	1.7000	3,970,000	1.395	1.7200	2,770,000	1.139
12	1.7800	4,750,000	1.838	2.1800	6,650,000	1.740	2.4000	3,600,000	1.498
13	0.0800	5,850,000	2.236	1.4000	4,800,000	2.039	2.2800	3,930,000	1.744

14	2.5400	8,880,000	2.521	1.5600	9,960,000	2.312	3.4400	4,650,000	1.924

ตาราง 2 น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry weight) ปริมาณเซลล์ และค่า OD ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus armartus* ที่เพาะเลี้ยงในระบบต่างๆ

ครั้งที่	A			B			C			D		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD
1	0.0000	0	0.006	0.0000	0	0.006	0.0000	0	0.006	0.0000	0	0.006
2	0.0008	34	0.160	0.0005	30	0.245	0.0007	22	0.159	0.0008	8	0.182
3	0.0016	67	0.310	0.0015	60	0.300	0.0011	58	0.293	0.0019	119	0.676
4	0.0019	131	0.418	0.0022	108	0.518	0.0016	106	0.402	0.0035	195	0.823
5	0.0027	146	0.670	0.0028	123	0.641	0.0030	132	0.643	0.0036	200	0.838
6	0.0038	162	0.760	0.0031	129	0.641	0.0034	136	0.720	0.0049	215	1.138
7	0.0047	175	0.995	0.0032	134	0.724	0.0046	182	0.952	0.0063	269	1.541
8	0.0047	197	1.156	0.0038	142	0.943	0.0049	220	1.004	0.0068	310	1.779
9	0.0060	212	1.311	0.0051	185	1.014	0.0053	230	1.021	0.0083	446	2.311
10	0.0065	229	1.440	0.0057	192	1.184	0.0058	221	1.074	0.0098	482	2.438
11	0.0078	214	1.492	0.0074	220	1.468	0.0058	218	1.080	0.0110	492	2.437
12	0.0088	172	1.761	0.0072	228	1.462	0.0059	234	1.295	0.0110	482	2.439
13	0.0081	164	1.808	0.0072	210	1.494	0.0062	245	1.482	0.0096	478	2.432
14	0.0088	162	2.092	0.0072	219	1.547	0.0084	290	1.878	0.0118	500	2.452
15	0.0086	153	1.962	0.0082	270	1.718	0.0127	348	2.271	0.0167	600	2.671
16	0.0087	134	1.981	0.0092	320	1.848	0.0143	450	2.542	0.0000	0	0.000

ครั้งที่	E			G			L		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่า OD
1	0.0000	0	0.006	0.0000	0	0.006	0.0000	0	0.006
2	0.0006	29	0.230	0.0015	14	0.158	0.0019	31	0.151
3	0.0021	128	0.599	0.0006	40	0.286	0.0019	127	0.400
4	0.0033	158	0.709	0.0018	60	0.322	0.0019	132	0.527
5	0.0050	178	0.747	0.0025	65	0.511	0.0031	140	0.761
6	0.0053	225	0.929	0.0039	83	0.627	0.0047	149	0.886
7	0.0056	250	1.223	0.0042	94	0.771	0.0049	164	1.103
8	0.0060	275	1.323	0.0045	115	0.790	0.0062	197	1.160
9	0.0067	294	1.582	0.0051	143	1.073	0.0073	248	1.394
10	0.0070	335	1.709	0.0055	159	1.186	0.0086	280	1.484
11	0.0071	332	1.704	0.0062	197	1.228	0.0089	292	1.582
12	0.0078	348	1.956	0.0072	225	1.454	0.0094	322	1.708
13	0.0098	360	2.085	0.0076	239	1.540	0.0094	332	1.705

14	0.0110	365	2.074	0.0079	255	1.675	0.0102	378	2.063
15	0.0163	400	2.108	0.0107	286	1.715	0.0092	368	2.052
16	0.0000	0	0.000	0.0106	290	1.761	0.0102	375	2.083

สัญลักษณ์	ขนาดระบบ (มิลลิลิตร)	ประเภทอุปกรณ์ให้อากาศ	ความเข้มแสง (ลักซ์)
A	800	สายยางปกติ	3,400
B	800	หัวพ่นอากาศแบบวงกลมเจาะรู	3,400
C	800	หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรู	3,400
D	800	หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม	3,400
E	800	หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกระบอก	3,400
G	800	เขย่าที่อัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที	3,400
L	800	สายยางปกติ	2,700

งานวิจัยนี้ได้เคยนำเสนอนำไปเสนอผลงานทางวิชาการ ได้แก่

1. แสดงโปสเตอร์ในงานวันวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2557

   ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. แสดงโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ

   ครั้งที่ 7

Abstract Book
NCAP 2015

การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 7

The 7th National Conference on Algae and Plankton

สาหร่ายและแพลงก์ตอน :
เพื่อสิ่งแวดล้อมที่ดีและเศรษฐกิจที่มั่นคง

Algae and Plankton : For Good Environments and Sustainable Economy

25-27 มีนาคม 2558 ณ โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพมหานคร

25-27 March 2015 At Narai Hotel, Bangkok

ผลของหัวพ่นอากาศชนิดต่างๆ ในการการเลี้ยง *Scenedesmus armatus* ในระบบที่ประดิษฐ์ขึ้น

ดวงกมล เรือนงาม[1*] และวีนา ชูโชติ[1]

[1]ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สจล
[*]Email: krduangk@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

Scenedesmus armatus เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีสำคัญในฐานะผู้ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและไบโอดีเซล งานวิจัยนี้เริ่มต้นด้วยการทดสอบอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมในระบบ 400 มิลลิลิตร ความเข้มแสง 3,400 ลักซ์ อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ศึกษาได้แก่ BG11, N-8 และ BBM พบว่า BG11 สามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ความเข้มข้นเซลล์มากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ และอาหารชนิดนี้จะนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป ผลของความเข้มแสงพิจารณาในระบบ 400 มิลลิลิตร ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 ลักซ์ พบว่า 2,700 ลักซ์ เพียงพอต่อการเลี้ยงสาหร่าย หัวพ่นอากาศที่แตกต่างกัน 5 แบบได้นำมาศึกษาและเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงแบบเขย่า (120 รอบต่อนาที 400 มิลลิลิตร) หัวพ่นอากาศที่พิจารณาได้แก่ ท่อยางซิลิโคนตรง, ท่อยางซิลิโคนดัดวงกลมเจาะรู, ซิลิโคน 3 ทางเจาะรู, หัวทรายทรงกลม และหัวทรายทรงกระบอก ผลจะพิจารณาถึงปริมาณความเข้มข้นของเซลล์, ปริมาณเซลล์มีชีวิตวัดที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าหัวทรายทรงกลมสามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ปริมาณมากที่สุดคือ 6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 3.34 กรัมเซลล์แห้งต่อลิตร นอกจากนี้ได้ศึกษาในระบบขนาดใหญ่ด้วยคือ 4,000 มิลลิลิตร พบว่าหัวพ่นอากาศแบบซิลิโคน 3 ทางเจาะรูให้ความเข้มข้นของเซลล์มากที่สุด คือปริมาณ 8.7×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: *Scenedesmus armatus*, สีเขียว, หัวพ่นอากาศ

Effect of different sparger types on *Scenedesmus armatus* cultivation in invented system

Duangkamol Ruen-ngam[1*] and Weena Choochote[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technogy Lakrabang KMITL
*Email: krduangk@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

Scenedesmus armatus is an important green microalgae in term of biodiesel and antioxidant producer. This research started with preliminary tested for optimum medium in 400 ml cultivation system with light intensity of 3,400 lux. The investigated mediums were BG11, N-8 and BBM. Among the different medium, cells grown in BG11 medium showed the highest cell concentration compared with the others and then was further used in the next step. Effect of light intensity has been further investigated at 2,700 and 3,400 lux in 400 ml system. The result showed that 2,700 lux was enough for algae cultivation. The aeration system with five different air-sparger types (silicone straight tube, invented circular silicone tube with ream, invented three-way silicone tube with ream, spherical sand stones air nozzle and cylindrical sand stones air nozzle) was then investigated and compared with traditional shaker (120 rpm with medium size 400 ml) in this study. The results of each condition were demonstrated in terms of cell concentration, viable cell absorbance at wavelength of 560 nm and cell dried weight. The cultivation with the spherical sand stones air nozzle as sparger revealed the highest amount of algae cells with a maximum of cell concentration at $6x10^6$ cells per milliliter and 3.34 gram of cell dried weight per liter. The large scale cultivation of 4,000 ml was also studied in this research. The invented three-way silicone tube with ream showed the highest amount of cell concentration of $8.7x10^6$ cells per milliliter and 5 gram per liter.

Keywords: *Scenedesmus armatus*, green algae, sparger

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล (ไทย) ดร. ดวงกมล เรือนงาม

(อังกฤษ) Dr. Duangkamol Ruen-ngam

เพศ หญิง อายุ 34 ปี สถานภาพ สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตรจารย์

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	ภาควิชาชีวเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จบปี พ.ศ. 2547
ปริญญาโท	ภาควิชาวิศกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จบปี พ.ศ. 2550
ปริญญาเอก	ภาควิชาวิศกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จบปี พ.ศ. 2553

สถานที่ทำงาน ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง

จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรณีย์ 10520

โทรศัพท์ 02-329-8400-11 ต่อ 6262 โทรสาร 02-329-8412

โทรศัพท์มือถือ 089-130-9398 email: modeliebe@gmail.com,

duangkamol.ru@kmitl.ac.th

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

1. กระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายและพืช
2. กระบวนการภายใต้สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ยวดยิ่ง
3. กระบวนการภายใต้สภาวะน้ำกึ่งวิกฤต
4. การออกแบบระบบถังปฏิกรณ์ทางชีภาพ
5. การสังเคราะห์ตัวเร่งปฏิกิริยา

ทุนการศึกษาที่เคยได้รับ

2550 - 2553 ทุนผู้ช่วยนักวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้องานวิจัย:Investigation the effect of salinity on hydrodynamics performance in airlift bioreactor

แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต

2552 - 2553 ทุนนักวิจัยแลกเปลี่ยน

ศูนย์วิจัยไฟฟ้าชีวภาพ ภาควิชาเคมีประยุกต์และชีวเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยคุมาโมโต่ะ เมืองคุมาโมโต่ะ ประเทศญี่ปุ่น

หัวข้องานวิจัย: Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*

แหล่งทุนวิจัย: ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่น 10 จาก สกว.

2553 - 2554 นักวิจัยหลังปริญญาเอก

ศูนย์วิจัยไฟฟ้าชีวภาพ ภาควิชาเคมีประยุกต์และชีวเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยคุมาโมโต่ะ เมืองคุมาโมโต่ะ ประเทศญี่ปุ่น

แหล่งทุนวิจัย: มหาวิทยาลัยคุมาโมโต่ะ

2555 มกราคม 9 – 10 Science Camp @Science Park ค่ายโครงงานจุฬาภรณ์ รุ่น 2-1 ปี 2555

เป็นผู้บรรยายร่วมกับ รศ. ดร. อาทิวรรณ โชติพฤกษ์ ภายใต้หัวข้อ “การสืบค้นข้อมูล”

ทุนและงานวิจัยที่เคยได้รับ

1. ทุนพัฒนาพัฒนากลุ่มและเครือข่ายวิจัย

ชื่อโครงการ	“การผลิตสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบทางเวชสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว และการพัฒนากระบวนการสกัดสารแกมมาออไรซานอลจากรำข้าวไร่”
คณะผู้ดำเนินการ	ดร.ดวงกมล เรือนงาม (ผู้อำนวยการโครงการ) และคณาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ สจล.
แหล่งทุน	กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีงบประมาณ	2556

2. ทุนงบประมาณรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ สจล.

ชื่อโครงการ	“การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่มีฤทธิ์ชีวภาพและการประเมินปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวไทย”
คณะผู้ดำเนินการ	ดร.ดวงกมล เรือนงาม (นักวิจัยร่วม) และคณาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ สจล.
แหล่งทุน	ทุนงบประมาณรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ สจล.

ปีงบประมาณ 2556

ปีที่แล้วเสร็จ 2557

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ

1. **Duangkamol Ruen-ngam**, Porntip Wongsuchoto, Apiradee Limpanuphap, Tawatchai Charinpanitkul, Prasert Pavasant, *Influence of salinity on bubble size distribution and gas–liquid mass transfer in airlift contactors*, **Chemical Engineering Journal** 141 (2008) 222–232 **(Impact factor = 3.461)**
2. **Duangkamol Ruen-ngam**, Doungmanee Rungsuk, Ronbanchob Apiratikuland Prasert Pavasant, *Zeoliete Formation from Coal Fly Ash and its Adsorption Potential*, **Journal of the Air & Waste Management association** 59 (2009) 1140-7 **(Impact factor = 1.517)**
3. **Duangkamol Ruen-ngam**, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant, *Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis*, **Separation Science and Technology** 46(2011) 1-7 **(Impact factor = 1.088)**
4. **Duangkamol Ruen-ngam**, Artiwan Shotipruk, Prasert Pavasant, Siti Machmudah, and Motonobu Goto, Selective Extraction of Lutein from Alcohol-treated *Chlorella vulgaris* by Supercritical Carbon Dioxide, **Chemical Engineering & Technology** 35 (2012) 255-260**(Impact factor = 1.598)**
5. **Duangkamol Ruen-ngam**, Armando T. Quitain, Mitsuru Sasaki, and Motonobu Goto. Hydrothermal Hydrolysis of Hesperidin Into More Valuable Compounds Under Supercritical Carbon Dioxide Condition, **Industrial & Engineering Chemistry Reseach** 51 (2012) 13545-13551. **(Impact factor = 2.237)**
6. **Duangkamol Ruen-ngam**, Armando T. Quitain, Masahiro Tanaka, Mitsuru Sasaki,and Motonobu Goto. Reaction Kinetics of Hydrothermal Hydrolysis of Hesperidin Into More Valuable Compounds Under Supercritical Carbon Dioxide Conditions, **Journal of Supercritical fluid** 66 (2012) 215-220. **(Impact factor = 2.860)**

การนำเสนอผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ

1. **Duangkamol Ruen-ngam**, Apiradee Limpanuphap, Porntip Wongsuchoto and Prasert Pavasant, *Influence of Salinity on Gas-Liquid Mass Transfer in Airlift Contactors with Annulus Sparger*, **The 13rd Regional Symposium on Chemical Engineering, RSCE**, Nanyang, Singapore, 3-5 December 2006 (Oral presentation)
2. **Duangkamol Ruen-ngam**, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant, *Alternative Extraction Method of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis*, **International COE Forum on Pulsed Power Engineering and young Researcher Training Camp**, Kumamoto, Japan, 14-16 September 2009 (Short Oral presentation+Poster presentation)
3. **Duangkamol Ruen-ngam**, Siti Machmudah, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant, *Solubility Consideration in Extraction of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis using Supercritical Carbon dioxide*, **International Conference on Supergreen Fluid (Supergreen 2009)**, Sendai, Japan, 15-17 October 2009 (Poster presentation)
4. **Duangkamol Ruen-ngam**, Siti Machmudah, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant. *Solubility Consideration in Extraction of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis using Supercritical carbon dioxide*, **Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC'09)**, Kobe, Japan, 24-28 November 2009 (Oral presentation)
5. **Duangkamol Ruen-ngam**, Siti Machmudah, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant. *Solubility Consideration in Extraction of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis using Supercritical carbon dioxide*, **The 22nd International Symposium on Chemical Engineering**, Daejeon, Korea, 4-6 December 2009 (Oral presentation)
6. **Duangkamol Ruen-ngam**, Siti Machmudah, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant, *Value Compounds Extraction from modified Chlorella vulgaris by Supercritical carbon dioxide*, **The 5th International Symposium on Application of Supercritical Fluids in Green Chemistry and Material Science**, Taipei, Taiwan, 7-10 March, 2010 (Oral presentation) **(Best Presentation Award)**

7. **Duangkamol Ruen-ngam**, Siti Machmudah, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Artiwan Shotipruk and Prasert Pavasant, *Selective Extraction of Lutein from Chlorella vulgaris with Supercritical carbon dioxide*, Society Chemical Engineering Japan, **The Society of Chemical Engineers, Japan, SCEJ 75th Annual meeting**, Kagoshima, Japan, 19-23 March 2010 (Oral presentation)
8. **Duangkamol Ruen-ngam**, Motonobu Goto, Artiwan Shotipruk, and Prasert Pavasant, *Dynamic Method for the determination of solubility of astaxanthin during the high pressure extraction from Haematococcus pluvialis using supercritical carbon dioxide*, **RGJ-Ph.D. Congress XI, Chonburi**, Thailand, 1-3 April 2010 (Poster Presentation, Proceeding paper)
9. **Duangkamol Ruen-ngam**, Motonobu Goto, Artiwan Shotipruk, and Prasert Pavasant, *Soluility of Lutein from Alcohol Modified Chlorella vulgaris in Supercritical Carbon dioxide*, **2011 Annual Meeting of Separation Technology (分離技術会 年会2011, Bunringijutsukai_nenkai 2011)**, Tokyo, Japan, 3-5 June 2011 (Oral Presentation, Proceeding paper)
10. **Duangkamol Ruen-ngam**, Motonobu Goto, Artiwan Shotipruk, and Prasert Pavasant, *Supercritical CO_2 Extraction of Lutein from Chlorella vulgaris with Pretreatment alcohol*, **2011 Annual Meeting of Separation Technology (分離技術会 年会2011, Bunringijutsukai_nenkai 2011)**, Tokyo, Japan, 3-5 June 2011 (Poster Presentation, Proceeding paper)
11. **Duangkamol Ruen-ngam**, Armando T. Quitain, Mitsuru Sasaki, Motonobu Goto, *Controlled Hydrothermal Hydrolysis of Hesperidin to Hesperetin-β-Glucoside Catalyzed by Supercritical Carbon Dioxide*, **Super Green 2011, The 7th International Conference on Supercritical Fluids,** Beijing, China, 26-29 August 2011 (Oral presentation)
12. **Duangkamol Ruen-ngam**, Artiwan Shotipruk, Motonobu Goto, and Prasert Pavasant, *Solubility of Astaxanthin in Supercritical Carbon Dioxide and Extraction Efficiency of Astaxanthin Extraction from H. pluvialis*, **13th European Meeting on Supercritical Fluids**, The Hague, Netherland, 9-13 October 2011 (Poster presentation, Proceeding paper)

13. **Duangkamol Ruen-ngam**, Armando T. Quitain, Mitsuru Sasaki and Motonobu Goto, *Optimization of Hydrothermal Hydrolysis of Hesperidin with Supercritical Carbon Dioxide*, **ICSST11, The 9th International Conference on Separation Science and Technology**, Jeju, Korea, 3-5 November 2011 (Poster presentation, Proceeding paper)
14. **Duangkamol Ruen-ngam***, Chitti Tawai, Supakit Chaiteerapatarapong, *HPLC condition for analysis of gamma oryzanol in upland rice bran crude oil*, **1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCT Symposium on Agricultural and Food Chemistry**, Bangkok, Thailand, 4-5 March 2014 (Poster presentation)
15. **Duangkamol Ruen-Ngam***, Chitti Thawai, Raumjit Nokkoul, and Sujitra Sukonthamut, *Gamma-Oryzanol Extraction from Upland Rice Bran*, **ICABB, International Conference on Advance in Bioscience and Bioengineering**, Sydney, Australia, 27-28 May 2014 (Oral presentation) IJBB, International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, ISSN 2010-3638, vol. 4, No. 4, July 2014, pp. 252-255.
16. **Duangkamol Ruen-ngam***, Pongsiri Jaruyanon, *Hydrogen Production from Water Hyacinth under Hydrothermal Treatment: Experimental Section*, **STISWB VI 2014, The 6th International Conference on Science, Technology and Innovation for Sustainable Well-Being**, Siem Reap, Kingdom of Cambodia, 28-30 August 2014 (Oral presentation)
17. Kittisak Khuwaranyu* and **Duangkamol Ruen-ngam**, *Survey Research on the Use of Energy Saving Household Equipment and Home Appliances in Nakhon Pathom Province*, **STISWB VI 2014, The 6th International Conference on Science, Technology and Innovation for Sustainable Well-Being**, Siem Reap, Kingdom of Cambodia, 28-30 August 2014. (Oral presentation) (Proceeding)
18. **Duangkamol Ruen-ngam***, *Effects of Drying conditions on Amount of Gac Antioxidant Compounds and Its Activities*, **ISBB 2014, The 12th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology**, Chumphon Province, Thailand, 11-13 December 2014. (Poster presentation) (Proceeding)
19. Vanapron Sae-ang, Chitti Tawai, **Duangkamol Ruen-ngam***, *Microwave Pretreatment for Lipase Retardation in Rice Bran*, **ISBB 2014, The 12th International Symposium on**

Biocontrol and Biotechnology, Chumphon Province, Thailand, 11-13 December 2014. (Proceeding)

20. Supakit Chaiteerapatarapong, Chitti Tawai, **Duangkamol Ruen-ngam*,** Alternative Extraction Methods for Oil with High Antioxidant Activity from Upland Rice Bran, **ISBB 2014, The 12th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology**, Chumphon Province, Thailand, 11-13 December 2014. (Proceeding)
21. **ดวงกมล เรือนงาม**, *"การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ"*, **วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง** ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 เดือนกรกฎาคม – ธันวาคม 2557.
22. Vanapron Sae-ang, Chitti Tawai, Raumjit Nokkoul, **Duangkamol Ruen-ngam***, *Antioxidant Determination of Nang Dam Upland Rice Bran Oil by DPPH Assay*, **ISAT2015, The 2nd International Symposium on Agricultural Technology**, Pattaya, Thailand, 1-3 July 2015. (Proceeding)
23. Duangkamol Ruen-ngam, Pongsiri Jaruyanon, Water hyacinth Conversion under supercritical water in continuous pilot plant, ISSF 2015, 11th International Symposium on Supercritical Fluids Incorporating with Supergreen 2015, October 11-14, 2015, Seoul, Republic of Korea.
24. Vanapron Sae-ang, Chitti Tawai, Raumjit Nokkoul, Duangkamol Ruen-ngam, *Evaluation of antioxidant activity of Khem-ngen rice bran oil By ABTS •+ Assay Measurement*, TSB 2015, The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok, Thailand, 17-20 November 2015. (Proceeding)

การนำเสนอในระดับชาติ

1. **Duangkamol Ruen-ngam**, Apiradee Limpanuphap, Porntip Wongsuchoto and Prasert Pavasant*, *Bubble size distribution and mass transfer in airlift Contactors Operated with Saline,* **The 1st KU-Kamphaensaen Conferences 2004**, Nakhon Pathom, Thailand, 7-9 December 2004 (Oral presentation)
2. **ดวงกมล เรือนงาม*** และวีนา ชูโชติ ผลของหัวพ่นอากาศชนิดต่างๆ ในการการเลี้ยง *Scenedesmus armatus* ในระบบที่ประดิษฐ์ขึ้น (Poster presentation)