# อิทธิพลร่วมกันของวิตามินไบโอตินและโคบาลามีนต่อชีวมวล อาหารสะสม (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน) และ คุณสมบัติไบโอดีเซลของสาหร่าย *Botryococcus braunii* KMITL 2

# Interaction of Biotin and Cobalamin on Biomass, Storage Products (Protein, Carbohydrate, Hydrocarbon Content) and Biodiesel Properties of *Botryococcus braunii* KMITL 2

**สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์[1*] จันทรา ดีมาก[1] และบุปผา จงพัฒน์[1]**
Suneerat Ruangsomboon[1*], Jantra Dimak[1] and Buppha Jongput[1]

## บทคัดย่อ

การศึกษาสัดส่วนของวิตามิน biotin (B) ต่อ cobalamin (C) ที่เหมาะสม และอิทธิพลร่วมกันของวิตามินทั้งสองชนิดต่อผลผลิตชีวมวล และอาหารสะสม (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน) ของสาหร่าย *Botryococcus braunii* KMITL 2 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรคลอเรลล่าปลอดเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ โดยผันแปร biotin ที่ 4 ระดับ 0, 1, 2 และ 3 µg/l (B0, B1, B2, B3) ร่วมกับ cobalamin 4 ระดับ 0, 2, 4 และ 6 µg/l (C0, C2, C4, C6) (แฟกทอเรียล 4x4) โดยมีชุดควบคุมคือชุดที่ไม่มีการเสริมวิตามิน ผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ชีวมวล โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไฮโดรคาร์บอนสูงที่สุด เท่ากับ 0.39±0.10 /d, 1.89±0.23 g/l, 23.29±1.15, 31.48±1.68 และ 62.17±1.31% ในชุดการทดลอง B1C0, B1C6, B3C6, B1C4 และ B3C0 ตามลำดับ โดยพบว่า biotin และ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่อ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไฮโดรคาร์บอน ของสาหร่าย น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายจากเกือบทุกชุดการทดลองมีค่าซีเทนผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด โดยอยู่ในช่วง 45.75-60.37 น้ำมันไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีที่สุดคือจากสาหร่ายในชุดการทดลอง B0C2 โดยมีค่า iodine value (IV) และ degree of unsaturation (DU) ต่ำที่สุด เท่ากับ 30.09 g $I_2$/100 g และ 32.78°C และค่า cetane สูงที่สุดคือ 60.37 จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามิน biotin ต่อ cobalamin ระดับที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย เป็นอีกทางเลือกที่ดีในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย และเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

**คำสำคัญ**: *Botryococcus braunii* KMITL 2 ไฮโดรคาร์บอน ไบโอติน โคบาลามีน ไบโอดีเซล

## Abstract

The optimal ratio of biotin (B) and cobalamin (C) and the interaction of both vitamins on the biomass and stored feed product content (protein, carbohydrate, hydrocarbon) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 in laboratory were investigated. The vitamins were supplied to the alga in axenic Chlorella medium in a factorial 4x4 experimental setup of combinations at the following concentrations of biotin: 0, 1, 2 and 3 µg/l (B0, B1, B2, B3) and cobalamin: 0, 2, 4 and 6 µg/l (C0, C2, C4, C6). The control group was not supplemented with any vitamins. Among the various vitamin ratios tested, B1C6 produced the highest biomass (1.89±0.23 g/l). The highest specific growth rate (0.39±0.10 /d), protein content (23.29±1.15 %), carbohydrate content (31.48±1.68%), and hydrocarbon content (62.17±1.31%) were produced by use of the supplements B1C0, B3C6, B1C4, and B3C0, respectively. The resulted indicated that biotin and cobalamin had synergistic effects on the specific growth rate, and the protein, carbohydrate and hydrocarbon contents of the KMITL 2 strain. The cetane values (45.75-60.37) of the alga from most treatments was higher than the standard. The alga that was cultivated in B0C2 treatment showed better biodiesel properties, with the lowest iodine values (30.09 g $I_2$/100) and degrees of unsaturation (32.78°C), and the highest cetane numbers (60.37). The results show that combinations of the optimized levels of biotin and cobalamin are promising medium supplements for this strain. They are able to increase the alga's specific growth rate and can facilitate its use as a feedstock in biodiesel production.

**Keywords**: *Botryococcus braunii* KMITL 2, hydrocarbon, biotin, cobalamin, biodiesel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: suneerat.ru@kmitl.ac.th

## คำนำ

ปัญหาพลังงานจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) ที่มีปริมาณจำกัด มีราคาที่สูงขึ้น และที่สำคัญคือมีผลต่อการสะสมของแก๊สเรือนกระจก (greenhouse gases) มากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาภาวะโลกร้อนและมีแนวโน้มทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ นักวิจัยจึงได้พยายามหาแหล่งพลังงานแหล่งใหม่เพื่อมาทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยต้องเป็นแหล่งพลังงานที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุดและสามารถผลิตได้รวดเร็ว ในช่วงแรกพืชบก เช่น สบู่ดำ ปาล์มน้ำมัน มันสำปะหลัง ฯลฯ ได้รับความนิยมมาก เพราะมีปริมาณน้ำมันมาก สกัดน้ำมันได้ง่าย แต่มีปัญหาตามมาคือพืชบางชนิดเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสำหรับมนุษย์ เมื่อนำไปเป็นวัตถุดิบผลิตพลังงานจึงส่งผลกระทบทำให้วัตถุดิบอาหารมนุษย์ขาดแคลนและมีราคาสูงขึ้น นอกจากนี้พืชเหล่านี้ยังต้องการพื้นดินที่อุดมสมบูรณ์จึงจะทำการเพาะปลูกได้ผลผลิตดีซึ่งทำให้เกิดปัญหาบุกรุกพื้นที่ป่าตามมา แนวทางแก้ไขในปัจจุบัน นักวิจัยได้เน้นวิจัยในแหล่งพลังงานแหล่งใหม่ที่ไม่ใช่วัตถุดิบอาหารมนุษย์ นั่นคือสาหร่ายโดยเฉพาะสาหร่ายขนาดเล็กซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มผลผลิตจนสามารถเก็บเกี่ยวได้ภายในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์ ไม่ต้องใช้พื้นดินที่อุดมสมบูรณ์และการเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ไม่จำเป็นต้องใช้น้ำที่สะอาดปลอดเชื้อ สามารถใช้น้ำทิ้งหรือแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์มาประยุกต์ใช้ในการผลิตสาหร่ายได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่สามารถใช้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกในอนาคต (Chisti, 2007)

สาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้ โดยพบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Botryococcus braunii* มีศักยภาพในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้ดี สาหร่ายชนิดนี้มีองค์ประกอบทางชีวเคมีหลัก ๆ คือคาร์โบไฮเดรต ไขมัน/ไฮโดรคาร์บอน และโปรตีน ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งไบโอเอทานอล ไบโอไฮโดรเจน ไบโอดีเซล และไบโอแก๊สได้ (Quinn et al., 2014; Farias Silva and Bertucco, 2016) โดยแหล่งพลังงานที่มีความต้องการใช้มากที่สุดคือไบโอดีเซล ซึ่ง *B. braunii* มีความเหมาะสมในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด เนื่องจากมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตไบโอดีเซลสูงที่สุด (Chisti, 2007) โดยพบว่าไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายชนิดนี้มีคุณสมบัติไบโอดีเซลที่ดี โดยเฉพาะค่า Iodine value และ cetane number ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดย European EN 14214 และ American ASTM D6751 (Ashokkumar et al., 2014; Nascimento et al., 2015) และนอกเหนือจากใช้สาหร่ายชนิดนี้เป็นแหล่งพลังงานแล้วยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ ปุ๋ยชีวภาพ ใช้ผลิตพอลิเมอร์ และใช้ในอุตสากรรมเครื่องสำอางได้อีกด้วย (Dufosse et al., 2005; Cabanelas et al., 2013) ซึ่งแสดงให้ทราบได้ว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ โดยการนำไปใช้ประโยชน์ด้านใดดีที่สุดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายนั้น ๆ ว่ามีชนิดใดเด่นที่สุดในการเพาะเลี้ยงครั้งนั้น ๆ

ถึงแม้ *B. braunii* จะได้รับการยอมรับว่าเป็นวัตถุดิบที่ดีที่สุดในกลุ่มสาหร่ายขนาดเล็กในการผลิตไบโอดีเซล แต่ปัญหาที่พบคือสาหร่ายชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตช้าเมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการหาวิธีเพาะเลี้ยงที่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มผลผลิตให้สาหร่ายนี้ โดยเฉพาะหากสามารถกระตุ้นให้เจริญเติบโตเร็วขึ้น ผลผลิตสูงขึ้นได้ด้วยสารอาหารหรืออาหารเสริม ย่อมทำให้มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้จริงในการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายปริมาณมากนอกห้องปฏิบัติการมากกว่าการใช้ปัจจัยทางกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ หรือพีเอช ในการกระตุ้น โดยนอกจากการเจริญเติบโตแล้วองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายขึ้นกับสารอาหาร ระยะเวลา และสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงด้วย (Dayananda et al., 2005; Ruangsomboon et al., 2017; 2018; Ruangsomboon, 2018)

สาหร่ายขนาดเล็กส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถผลิตวิตามินได้ด้วยตนเอง หรือผลิตได้แต่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต โดยทั่วไปวิตามินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้แก่ วิตามิน $B_1$, $B_7$ และ $B_{12}$ วิตามิน $B_1$ หรือ thiamine เป็นตัวกลางของกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์บอน ทำงานร่วมกับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Croft et al., 2006) วิตามิน $B_7$ หรือ biotin หรือ vitamin H ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ carboxylase และ acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมัน ซึ่งสาหร่ายทุกชนิดต้องการวิตามินนี้ในการช่วยสังเคราะห์กรดไขมันทางอ้อม ช่วยกระตุ้นให้สาหร่ายทุกชนิดเจริญเติบโตได้ดีขึ้น เซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น (Helliwell et al., 2011) วิตามิน $B_{12}$ หรือ cobalamin ช่วยในการขนส่งไนโตรเจนที่ละลายในน้ำเข้าสู่เซลล์สาหร่าย เป็นโคแฟกเตอร์ของการสังเคราะห์กรดอะมิโน DNA และกรดไขมัน ช่วยในการขนส่งคาร์บอน cobalamin เป็น tetrapyrole ที่มี cobalt เป็นองค์ประกอบจึงช่วยในการเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่าย (Croft et al., 2006)

จากการศึกษาขั้นต้นของ *B. braunii* พบว่าสามารถสร้างวิตามิน $B_1$, $B_7$, $B_{12}$ ได้ แต่ในปริมาณน้อย เมื่อเสริมวิตามินเหล่านี้ลงในอาหารพบว่าสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตชีวมวลได้ (Ruangsomboon et al., 2018) และเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าหากต้องการใช้สาหร่ายชนิดนี้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล biotin และ cobalamin ส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มของไขมัน ไฮโดรคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และผลผลิตชีวมวลได้ (Tanabe et al., 2014; Ruangsomboon et al., 2018) จึงควรมีการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของวิตามินทั้งสองชนิดนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* โดยนอกจากนี้ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติไบโอดีเซลของน้ำมันที่ผลิตได้จากสาหร่ายด้วย (Knothe, 2008) เพื่อพิจารณาความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงไบโอดีเซลต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบระดับที่เหมาะสมและอิทธิพลร่วมกันของวิตามิน biotin และ cobalamin ต่ออัตราการเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน และคุณสมบัติไบโอดีเซล ของสาหร่าย *B. braunii* KMITL2 เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสาหร่ายเพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานชีวภาพต่อไป

## วิธีการศึกษา

แยกสาหร่าย *B. braunii* สายพันธุ์ KMITL 2 จากอ่างเก็บน้ำคลองโบด ตำบลเขาพระ จังหวัดนครนายก ด้วยวิธี microcapillary pipetted ล้างเซลล์ด้วยอาหารสะอาดฆ่าเชื้ออย่างน้อย 12 รอบ และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร *Chlorella* medium ที่ปลอดเชื้อ (Vonshak and Maske, 1982) ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหาร lysogeny broth (LB), yeast-dextrose agar และ proteose peptone agar เมื่อพบว่าไม่มีการปนเปื้อนจึงทำการยืนยันชนิดสาหร่ายด้วยลักษณะทางกายภาพ (Philipose, 1967) และ 18S rDNA ซึ่งยืนยันว่าเป็น *B. braunii* จากนั้นขยาย *B. braunii* KMITL2 GenBank accession no. KX470608 ในห้องปฏิบัติการสำหรับเป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป โดยเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 25±1°C ให้แสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 60 µmol photons/$m^2$/s ให้อากาศต่อเนื่องผ่านตัวกรองแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงหัวเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองการใช้วิตามินของสาหร่ายต้องทำในอาหารและสภาวะปลอดเชื้อ เพราะส่งผลต่อปริมาณวิตามินที่มีในอาหาร โดยก่อนการนำหัวเชื้อไปทดลองผลของวิตามินต้องทำการทดสอบ และกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนโดยการเลี้ยงในอาหารที่ผสม penicillin, kanamycin และ neomycin ที่ 1, 25 และ 20 mg/ml ตามลำดับ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Helliwell et al., 2011) นำสาหร่ายมาทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ถ้าปลอดเชื้อแล้วจึงนำไปทดลองเรื่องความต้องการใช้วิตามินต่อไป โดยเพาะเลี้ยง *B. braunii* ในอาหาร *Chlorella* medium ผันแปรความเข้มข้นของวิตามิน ด้วยชุดการทดลองแฟกทอเรียล 4×4 โดยมี biotin (B) 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 3 µg/l และวิตามิน cobalamin (C) 4 ระดับ คือ 0, 2, 4 และ 6 µg/l ทุกชุดการทดลองทำการศึกษา 4 ซ้ำ เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์แก้วขนาด 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 24 วัน ในสภาวะปลอดเชื้อ ควบคุมแสง อากาศ และอุณหภูมิ เช่นเดียวกับการเตรียมหัวเชื้อ

วิเคราะห์ชีวมวลตามวิธีของ Becker (1994) ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีของ DuBois et al. (1956) สกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีดัดแปลงจาก Bligh and Dyer (1959) โดยใช้เฮกเซน และนำสารที่สกัดได้กรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ silica gel (Silica gel 60, 230-400 mesh, Merck) เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ก่อนถึงส่วนแคโรทีนซึ่งเป็นสีเหลือง และนำไประเหยแห้ง ชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณปริมาณไฮโดรคาร์บอน ทำการเปลี่ยนไฮโดรคาร์บอนเป็นไบโอดีเซลตามวิธีของ 965.49 AOAC official method (AOAC, 2005) และศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซล โดยวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Esters (FAME) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Agilent Technologies 6890 N, USA) พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID)

คำนวณและรายงานข้อมูลทุกค่าเป็นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่าย คำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, µ) ตามสูตรของ Garcia et al. (2005) ประเมินค่าคุณสมบัติไบโอดีเซลได้แก่ saponification value (SV), iodine value (IV), cetane number (CN), degree of unsaturation (DU), long-chain saturated factor (LCSF) และ cold filter plugging point (CFPP) ตามวิธีของ Francisco et al. (2010) และ Wu and Miao (2014) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างคู่ด้วยวิธี Tukey-Kramer HSD test และวิเคราะห์อิทธิพลร่วมกัน (interaction) ของวิตามินต่อค่าต่าง ๆ ของสาหร่ายที่ทำการศึกษา ด้วย Anova: Two factor with replication ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### ผลของวิตามินต่อชีวมวล อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของสาหร่าย

พบว่า biotin กับ cobalamin ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อชีวมวลของสาหร่าย *B. braunii* ($P=0.394$) โดยสาหร่ายทุกชุดการทดลองมีชีวมวลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น พบว่าที่สิ้นสุดการทดลองชุดการทดลองที่ได้รับ biotin สูงสุดคือ 3 µg/l (Figure 1D) สาหร่ายมีวัฏจักรชีวิตสั้นกว่าชุดการทดลองอื่น (Figure 1 A-C) โดยเข้าสู่วัฏจักรระยะการตาย (death phase) เร็วกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดการทดลองที่ได้รับ biotin สูงสุด มีชีวมวลต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น และชุดทดลองที่มีชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 1.89±0.23 g/l (Table 1) คือชุดที่ได้รับ biotin 1 µg/l ร่วมกับ cobalamin 6 µg/l (B1C6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | ห้ามลอกเลียนแบบโดยไม่ได้รับอนุญาต

โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดที่ไม่ได้รับวิตามิน โดยมีค่าสูงกว่าถึง 1.31 เท่า และได้ผลผลิตเท่ากับการเพาะเลี้ยงด้วยบ่อ raceway (Ashokkumar and Rengasamy, 2012) จากการที่สาหร่ายที่ได้รับ biotin สูงสุด กลับมีชีวมวลต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาจาก biotin ซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการสร้างกรดไขมัน (Helliwell et al., 2011) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าเมื่อมี biotin มากเกินไป จึงทำให้สาหร่ายเน้นการสะสมไขมันมากกว่าเน้นการนำพลังงานไปใช้ในการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์หรือเจริญเติบโต จึงได้ผลผลิตชีวมวลที่ต่ำลง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) ของสาหร่ายที่ได้รับ biotin 1 μg/l และไม่ได้รับ cobalamin (B1C0) มีค่าสูงที่สุด คือ 0.39±0.10 ต่อวัน (Table 1) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ ยกเว้นชุดทดลอง B0C0, B0C6, B2C0, B2C2, B2C4 และ B2C6 ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่มีความสอดคล้องกับผลผลิตชีวมวล แสดงให้เห็นว่าวิตามินมีการกระตุ้นให้สาหร่ายแบ่งเซลล์ได้เร็วในช่วงสั้น ๆ ในระยะการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) แต่วิตามินที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ไม่ส่งผลอย่างเด่นชัดต่อการเพิ่มชีวมวลที่สิ้นสุดการทดลอง โดยอาจเป็นการกระตุ้นให้แบ่งอย่างรวดเร็วในช่วงสั้น ๆ แล้วหยุดการกระตุ้น สาหร่ายจึงแบ่งเซลล์เร็วแต่มีผลผลิตชีวมวลที่ไม่สูง ซึ่งอาจเป็นเพราะวิตามินและสารอาหารของสาหร่ายในอาหารหมด จึงไม่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ต่อได้ และพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันของต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย (P=0.030)

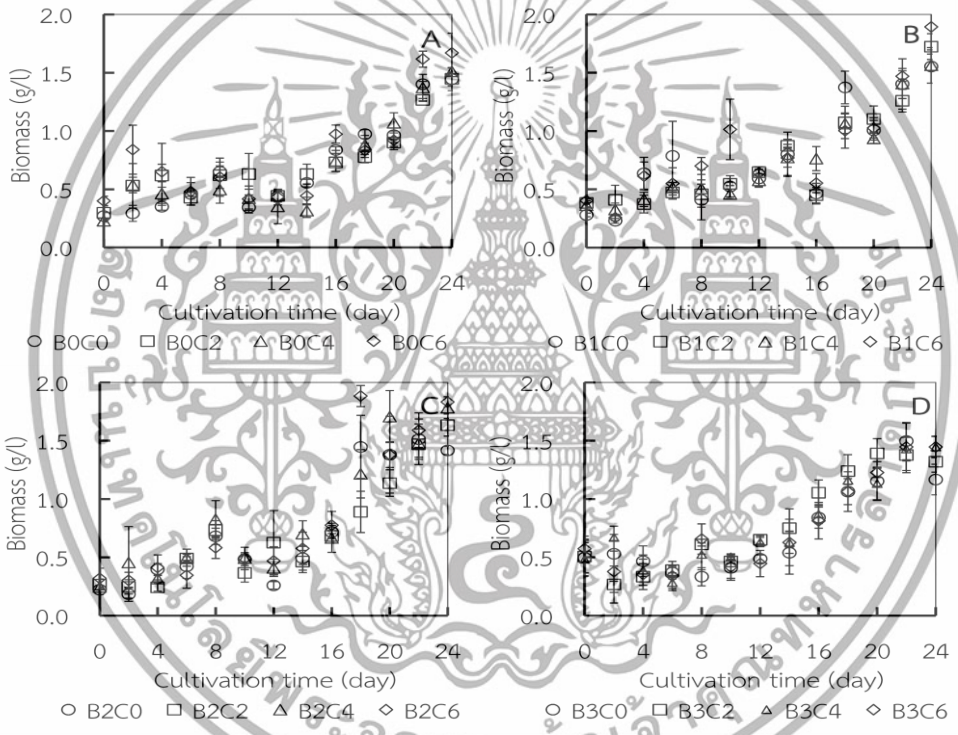


**Figure 1** Biomass (g/l) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 μg/l) and cobalamin (C 0-6 μg/l) concentrations. Values are means±SE (n=4).

ปริมาณโปรตีนที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในเกือบทุกชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง (Figure 2B-D) ยกเว้นชุดการทดลองที่ได้รับเฉพาะ cobalamin แต่ไม่ได้รับ biotin (Figure 2A) ซึ่งมีปริมาณโปรตีนลดลงตลอดการทดลอง โดยพบว่าที่สิ้นสุดการทดลอง ปริมาณโปรตีนในชุดที่ได้รับ biotin 3 μg/l ร่วมกับ cobalamin 6 μg/l (B3C6) มีค่าสูงที่สุด คือ 23.29±1.15% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ ยกเว้นชุด B0C6, B1C4, B1C6, B2C2, B2C4 และ B2C6 และพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันของต่อปริมาณโปรตีนของสาหร่าย (P=0.000) พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้มีปริมาณโปรตีนที่สิ้นสุดการทดลองซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน อยู่ในช่วง 15.91-23.29% ซึ่งต่ำกว่าปริมาณโปรตีนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเพียง 2 วัน ซึ่งมีโปรตีนอยู่ในช่วง 19.18-42.89% หากพิจารณาการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ แม้การเพาะเลี้ยงช่วงต้นมีโปรตีนสูงสุด แต่มีชีวมวลต่ำกว่าที่สิ้นสุดการทดลองมาก ดังนั้นการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจนสิ้นสุดการทดลองไปใช้ประโยชน์ย่อมได้ผลผลิตโปรตีนสูงกว่า (protein yield) โดยพบว่าปริมาณโปรตีนมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ cobalamin เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะ cobalamin มีหน้าที่ช่วยในการสร้างกรดอะมิโนนั่นเอง (Croft et al., 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

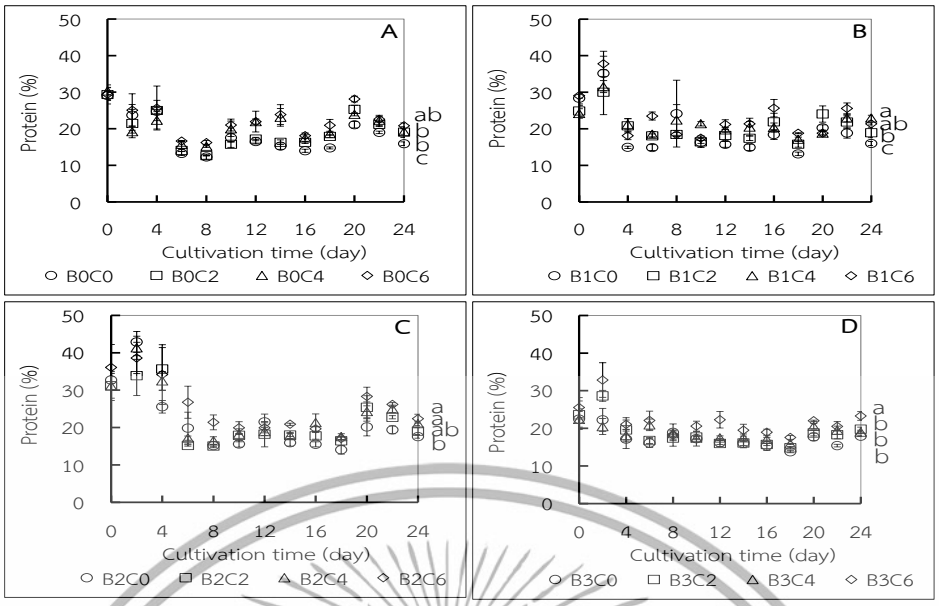


**Figure 2** Protein (%) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 µg/l) and cobalamin (C 0-6 µg/l) concentrations. Different small letters on the lines indicate significant difference at 95 % confidence level (compare fig 2. A-D). Values are means±SE (n=4).

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายมีแนวโน้มลดลงในช่วง 4 วัน แรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นจนถึงประมาณวันที่ 12-16 ของการเพาะเลี้ยง และลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง (Figure 3A-D) ที่สิ้นสุดการทดลองปริมาณคาร์โบไฮเดรตในชุดที่ได้รับ biotin 1 µg/l ร่วมกับ cobalamin 4 µg/l (B1C4) มีค่าสูงที่สุด คือ 31.48±1.68% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลอง B3C4 โดยพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย (P=0.008) หากพิจารณาจากปริมาณคาร์โบไฮเดรต พบว่าสามารถนำสาหร่ายชนิดนี้ไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลได้เช่นกัน โดยในช่วงการเพาะเลี้ยงที่พบว่าคาร์โบไฮเดรตมีปริมาณสูงคือการเพาะเลี้ยงประมาณ 12-16 วัน แต่เมื่อพิจารณาผลผลิตคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate yield) ซึ่งต้องพิจารณาร่วมกับชีวมวล พบได้ว่าที่สิ้นสุดการทดลองให้ผลผลิตคาร์โบไฮเดรตสูงกว่า

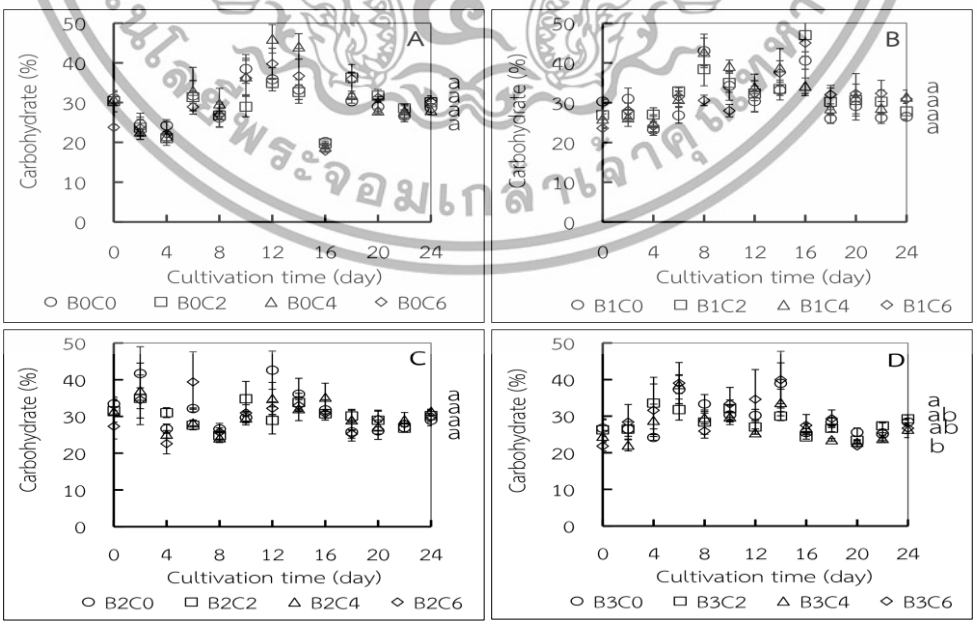


**Figure 3** Carbohydrate (%) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 µg/l) and cobalamin (C 0-6 µg/l) concentrations. Different small letters on the lines indicate significant difference at 95 % confidence level (compare fig 3. A-D). Values are means±SE (n=4).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ผลของวิตามินต่อปริมาณไฮโดรคาร์บอน ผลผลิตไฮโดรคาร์บอน และกำลังผลิตไฮโดรคาร์บอน ของสาหร่าย**

ที่สิ้นสุดการทดลองสาหร่ายที่ได้รับ biotin 3 µg/l ไม่ได้รับ cobalamin (B3C0) มีปริมาณไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon content) สูงที่สุด คือ 62.17±1.31% ส่วนชุดการทดลองที่มีค่าผลผลิตไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon yield) และกำลังผลิตไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon productivity) สูงที่สุดคือชุดที่ได้รับ biotin 2 µg/l ร่วมกับ cobalamin 6 µg/l (B2C6) และชุดที่ได้รับ biotin 2 µg/l ร่วมกับ cobalamin 2 µg/l (B2C2) โดยมีค่าเท่ากับ 0.90±0.06 g/l และ 160.20±19.42 mg/l/d ตามลำดับ (Table 1) โดยพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย (P=0.030) แต่ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อผลผลิตไฮโดรคาร์บอน (P=0.198) และกำลังผลิตไฮโดรคาร์บอน (P=0.241)

ทั้ง biotin และ cobalamin มีหน้าที่ช่วยในการสังเคราะห์กรดไขมัน โดย biotin จะมีหน้าที่ตรงมากกว่า cobalamin โดยช่วยในการทำงานของ acetyl coenzyme A (CoA) (Croft et al., 2006; Helliwell et al., 2011) และจากผลการทดลองนี้พบว่าสาหร่ายมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ biotin เพิ่มขึ้น และสูงที่สุดเมื่อได้รับ biotin สูงที่สุด โดยไม่ต้องมี cobalamin

**Table 1** Biomass, specific growth rate (µ), hydrocarbon content, hydrocarbon yield and hydrocarbon productivity of *B. braunii* KMITL 2 cultivated under different biotin (B 0-3 µg/l) and cobalamin (C 0-6 µg/l) concentrations.

| Treatments | Biomass (g/l) | µ (/day) | Hydrocarbon content (%) | Hydrocarbon yield (g/l) | Hydrocarbon productivity (mg/l/d) |
|---|---|---|---|---|---|
| B0C0 | 1.44±0.10$^{abc}$ | 0.21±0.01$^{abcd}$ | 37.18±1.04$^{abc}$ | 0.54±0.06$^{ab}$ | 77.22±9.35$^{ab}$ |
| B0C2 | 1.45±0.06$^{abc}$ | 0.12±0.02$^{a}$ | 31.77±1.35$^{a}$ | 0.46±0.06$^{a}$ | 38.95±8.22$^{a}$ |
| B0C4 | 1.51±0.04$^{abcd}$ | 0.13±0.02$^{ab}$ | 33.96±1.16$^{ab}$ | 0.51±0.05$^{a}$ | 46.27±11.52$^{a}$ |
| B0C6 | 1.67±0.17$^{bcd}$ | 0.20±0.03$^{abcd}$ | 41.29±1.07$^{abc}$ | 0.69±0.09$^{abc}$ | 81.56±7.93$^{ab}$ |
| B1C0 | 1.55±0.14$^{abcd}$ | 0.39±0.10$^{d}$ | 36.15±1.53$^{abc}$ | 0.55±0.04$^{ab}$ | 148.38±51.87$^{ab}$ |
| B1C2 | 1.72±0.11$^{bcd}$ | 0.12±0.02$^{ab}$ | 40.04±1.69$^{a}$ | 0.69±0.09$^{a}$ | 47.17±6.84$^{a}$ |
| B1C4 | 1.56±0.15$^{abcd}$ | 0.17±0.02$^{abc}$ | 50.65±2.22$^{ab}$ | 0.77±0.06$^{a}$ | 85.49±14.30$^{a}$ |
| B1C6 | 1.89±0.23$^{d}$ | 0.17±0.02$^{abc}$ | 39.38±0.79$^{abc}$ | 0.76±0.11$^{abc}$ | 69.43±13.20$^{ab}$ |
| B2C0 | 1.42±0.03$^{abc}$ | 0.34±0.03$^{cd}$ | 44.14±0.52$^{abc}$ | 0.63±0.03$^{abc}$ | 150.89±16.40$^{b}$ |
| B2C2 | 1.63±0.09$^{bcd}$ | 0.31±0.03$^{bcd}$ | 50.58±0.57$^{cd}$ | 0.82±0.03$^{bc}$ | 160.20±19.42$^{b}$ |
| B2C4 | 1.78±0.04$^{cd}$ | 0.23±0.04$^{abcd}$ | 48.78±0.69$^{bcd}$ | 0.87±0.03$^{c}$ | 115.24±27.53$^{ab}$ |
| B2C6 | 1.83±0.04$^{cd}$ | 0.22±0.07$^{abcd}$ | 48.97±0.67$^{bcd}$ | 0.90±0.06$^{c}$ | 112.92±39.72$^{ab}$ |
| B3C0 | 1.17±0.13$^{a}$ | 0.19±0.02$^{abc}$ | 62.17±1.31$^{d}$ | 0.72±0.04$^{abc}$ | 116.45±16.36$^{ab}$ |
| B3C2 | 1.32±0.09$^{ab}$ | 0.14±0.01$^{ab}$ | 49.34±0.74$^{bcd}$ | 0.65±0.07$^{abc}$ | 66.32±2.67$^{a}$ |
| B3C4 | 1.45±0.09$^{abc}$ | 0.12±0.00$^{a}$ | 47.08±0.55$^{abcd}$ | 0.68±0.04$^{abc}$ | 55.94±2.39$^{a}$ |
| B3C6 | 1.45±0.09$^{abc}$ | 0.19±0.03$^{abc}$ | 52.67±0.21$^{cd}$ | 0.76±0.03$^{abc}$ | 100.38±16.19$^{ab}$ |

Mean±SE (n=4) with the different superscript in column are significantly different (P<0.05).

มีรายงานว่าการเสริม cobalamin ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไขมันของสาหร่ายสายพันธุ์ *B. braunii* BOT-22 ซึ่งมีไขมัน 42% (Tanabe et al., 2014) ซึ่งต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า cobalamin ที่เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มทำให้ผลผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้น และยังมีอิทธิพลต่อไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* KMITL 2 ด้วย และผลจากการศึกษานี้พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ KMITL 2 มีไฮโดรคาร์บอนสูงกว่าสายพันธุ์ BOT-22 ผลจากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในทุกชุดการทดลองของการเพาะเลี้ยง *B. braunii* KMITL 2 สาหร่ายมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบมากที่สุดรองลงมาคือคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาในฐานะของการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ สาหร่ายนี้จึงมีความเหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด รองลงมาคือไบโอเอทานอล และไบโอแก๊สเป็นลำดับสุดท้าย ดังนั้นการทดลองนี้จึงนำสาหร่ายนี้ไปเป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซลและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้ต่อไป

**ผลของวิตามินต่อกรดไขมันและคุณสมบัติทางไบโอดีเซลของน้ำมันที่ผลิตจากสาหร่าย**

การศึกษาค่ากรดไขมันที่ประกอบในน้ำมันไบโอดีเซลของสาหร่าย พบว่าชนิดกรดไขมันที่พบสูงคือ C16:0 หรือ palmitic acid รองลงมาคือ C18:2n6c หรือ linoleic acid (Table 2) ซึ่งคล้ายกับองค์ประกอบไขมันของพืชชั้นสูงที่ใช้เป็นวัตถุดิบผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเช่นกัน คือมี C16 และ C18 เป็นองค์ประกอบหลัก (Ramos et al., 2009) เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไม่อิ่มตัวพบว่าสอดคล้องกับ ค่า SV, DU และ LCSF (Table 3) นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณ C18:3n3 รวมกับ C18:3n6 ไม่เกิน 12% (ยกเว้น B3C6 มี 12.9%) และสาหร่ายในทุกชุดการทดลองมีกรดไขมันซึ่งมีพันธะคู่ ≥ 4 ไม่เกิน 1% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำมันดีเซลของ European standard (EN 14214) (Bacha et al., 2007)

**Table 2** Fatty acid profiles of *B. braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 µg/l) and cobalamin (C 0-6 µg/l) concentrations.

| FA | B0C0 | B0C2 | B0C4 | B0C6 | B1C0 | B1C2 | B1C4 | B1C6 | B2C0 | B2C2 | B2C4 | B2C6 | B3C0 | B3C2 | B3C4 | B3C6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C4:0 | 0.8 | 1.0 | 1.3 | 1.0 | 2.2 | 0.1 | 0.9 | 0.4 | 0.5 | 0.7 | 0.4 | 0.6 | 0.4 | 0.5 | 0.1 | 0.1 |
| C6:0 | 1.8 | 1.8 | 1.0 | 1.8 | 1.7 | 0.3 | 0.9 | 0.9 | 2.0 | 1.8 | 1.5 | 1.2 | 3.0 | 1.1 | 0.9 | 0.3 |
| C8:0 | 5.1 | 5.6 | 5.3 | 5.0 | 21.6 | 9.7 | 5.9 | 8.3 | 4.5 | 3.7 | 4.5 | 2.6 | 10.6 | 13.8 | 2.4 | 1.3 |
| C10:0 | 13.2 | 16.9 | 14.0 | 13.0 | 4.5 | 3.9 | 4.1 | 4.3 | 0.0 | 1.0 | 0.0 | 0.6 | 3.4 | 15.7 | 1.7 | 1.0 |
| C11:0 | 6.6 | 12.0 | 7.1 | 9.8 | 6.4 | 4.8 | 1.8 | 0.0 | 1.1 | 1.8 | 1.3 | 1.3 | 1.9 | 6.9 | 0.5 | 0.7 |
| C12:0 | 8.9 | 12.1 | 4.3 | 10.0 | 6.9 | 4.5 | 8.1 | 8.1 | 7.4 | 7.6 | 7.0 | 4.2 | 8.9 | 6.3 | 3.5 | 5.5 |
| C13:0 | 6.9 | 4.0 | 5.3 | 3.9 | 3.0 | 2.2 | 1.9 | 1.9 | 0.7 | 0.0 | 0.8 | 0.3 | 1.4 | 2.8 | 5.8 | 7.9 |
| C14:0 | 2.2 | 1.9 | 0.8 | 1.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.8 | 0.8 | 1.6 | 1.3 | 1.2 | 0.9 | 0.3 | 0.5 | 1.0 |
| C14:1 | 1.0 | 1.5 | 0.9 | 0.9 | 0.5 | 0.6 | 0.3 | 0.4 | 0.0 | 0.6 | 0.7 | 0.9 | 0.6 | 0.5 | 0.9 | 0.7 |
| C15:0 | 1.2 | 1.5 | 0.7 | 1.6 | 0.2 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.9 | 0.4 | 1.3 | 1.2 |
| C15:1 | 0.6 | 1.1 | 0.3 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.4 | 0.1 | 0.5 | 0.2 |
| C16:0 | 14.7 | 11.7 | 14.0 | 12.4 | 14.2 | 18.6 | 22.8 | 18.8 | 27.4 | 26.3 | 26.1 | 23.1 | 22.8 | 15.8 | 21.5 | 18.8 |
| C16:1 | 2.3 | 2.0 | 2.2 | 2.3 | 3.0 | 3.0 | 0.1 | 2.2 | 1.7 | 1.8 | 2.4 | 4.1 | 3.5 | 1.9 | 3.8 | 3.7 |
| C17:0 | 2.5 | 2.5 | 3.5 | 3.4 | 2.8 | 2.5 | 2.8 | 3.2 | 8.2 | 10.6 | 11.5 | 12.3 | 3.9 | 2.4 | 5.0 | 3.8 |
| C17:1 | 2.8 | 3.2 | 4.8 | 4.5 | 3.8 | 5.9 | 5.4 | 5.9 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.5 | 3.0 | 4.2 | 6.0 | 7.0 |
| C18:0 | 1.3 | 1.4 | 0.6 | 0.9 | 1.6 | 0.5 | 0.4 | 4.7 | 3.9 | 4.0 | 3.6 | 5.6 | 1.6 | 0.7 | 0.9 | 0.4 |
| C18:1n9t | 1.0 | 1.6 | 2.9 | 2.7 | 2.0 | 4.6 | 9.3 | 3.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.3 | 0.9 | 2.1 | 3.5 |
| C18:1n9c | 6.2 | 5.0 | 6.6 | 5.8 | 2.4 | 0.0 | 0.0 | 4.7 | 11.1 | 10.8 | 10.8 | 10.2 | 2.3 | 6.9 | 11.2 | 5.2 |
| C18:2n6t | 0.3 | 0.2 | 0.3 | 10.7 | 4.5 | 9.7 | 11.3 | 5.1 | 0.0 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 7.9 | 0.0 | 0.0 | 4.7 |
| C18:2n6c | 9.4 | 6.9 | 11.3 | 2.1 | 9.3 | 13.1 | 10.9 | 12.7 | 17.9 | 18.1 | 16.1 | 18.4 | 12.1 | 11.7 | 18.0 | 18.5 |
| C18:3n3 | 4.2 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.5 | 7.7 | 6.6 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.2 | 0.3 | 9.0 |
| C18:3n6 | 1.7 | 1.4 | 2.2 | 6.3 | 1.8 | 2.9 | 2.4 | 2.8 | 3.4 | 2.4 | 3.0 | 3.3 | 2.0 | 1.6 | 3.5 | 4.0 |
| C20:0 | 4.2 | 3.6 | 6.1 | 0.3 | 5.1 | 0.0 | 0.0 | 7.0 | 8.7 | 6.3 | 7.4 | 8.3 | 4.5 | 4.0 | 7.8 | 0.0 |
| C20:1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.3 | 0.2 | 0.5 | 0.6 |
| C20:2 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.1 | 0.2 | 0.1 |
| C20:3n3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 |
| C20:3n6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 |
| C20:4n6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| C:20:5n3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.1 |
| C21:0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.3 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 |
| C22:0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| C22:1n9 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 |
| C22:2 | 0.4 | 0.2 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.3 |
| C22:6n3 | 0.0 | 0.1 | 0.6 | 0.1 | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 |
| C23:0 | 0.3 | 0.1 | 0.4 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.4 | 0.1 | 0.1 | 0.0 |
| C24:0 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.1 | 0.4 | 0.2 | 0.5 | 0.2 |
| C24:1 | 0.2 | 0.0 | 0.6 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| SFA | 69.7 | 76.2 | 66.2 | 64.3 | 71.7 | 50.4 | 29.8 | 60.7 | 65.3 | 65.8 | 65.6 | 61.7 | 65.1 | 71.1 | 52.6 | 42.3 |
| UFA | 30.3 | 23.8 | 33.8 | 35.7 | 28.3 | 49.6 | 70.2 | 39.3 | 34.7 | 34.2 | 34.4 | 38.3 | 34.9 | 28.9 | 47.4 | 57.7 |
| MUFA | 14.4 | 14.7 | 18.6 | 16.6 | 12.4 | 14.9 | 38.6 | 18.1 | 13.2 | 13.5 | 14.7 | 16.4 | 11.7 | 14.6 | 25.0 | 20.9 |
| PUFA | 16.0 | 9.0 | 15.2 | 19.1 | 16.0 | 34.7 | 31.6 | 21.2 | 21.5 | 20.6 | 19.7 | 21.8 | 23.3 | 14.3 | 22.3 | 36.8 |

FA = Fatty acid, SFA= Saturated fatty acid, UFA= Unsaturated fatty acid, MUFA= Monounsaturated fatty acid, PUFA= Polyunsaturated fatty acid.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 3** Biodiesel properties of *B. braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 µg/l) and cobalamin (C 0-6 µg/l) concentrations.

| Treatments | SV (mg KOH/g) | IV (g $I_2$/100 g) | CN | DU (wt.%) | LCSF (wt.%) | CFPP (°C) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B0C0 | 240.21 | 45.50 | 57.42 | 46.31 | 6.32 | 3.37 |
| B0C2 | 251.06 | 30.09 | 60.37 | 32.78 | 5.67 | 1.35 |
| B0C4 | 235.32 | 43.47 | 58.41 | 49.00 | 11.08 | 18.33 |
| B0C6 | 243.04 | 53.18 | 55.20 | 54.78 | 2.03 | -10.10 |
| B1C0 | 257.87 | 40.61 | 57.11 | 44.29 | 7.32 | 6.51 |
| B1C2 | 225.07 | 82.08 | 49.62 | 84.37 | 2.48 | -8.67 |
| B1C4 | 223.60 | 97.88 | 45.75 | 101.75 | 0.63 | -14.51 |
| B1C6 | 222.39 | 55.19 | 56.77 | 60.41 | 11.57 | 19.88 |
| B2C0 | 214.76 | 51.45 | 58.60 | 56.20 | 13.36 | 25.50 |
| B2C2 | 216.09 | 49.55 | 58.92 | 54.81 | 11.32 | 19.08 |
| B2C4 | 219.38 | 45.95 | 59.46 | 50.05 | 12.76 | 23.62 |
| B2C6 | 209.06 | 55.21 | 58.33 | 60.12 | 13.60 | 26.26 |
| B3C0 | 233.18 | 52.82 | 56.24 | 58.18 | 8.49 | 10.19 |
| B3C2 | 249.37 | 39.64 | 58.08 | 43.19 | 6.41 | 3.67 |
| B3C4 | 208.99 | 63.95 | 56.11 | 69.67 | 11.43 | 19.43 |
| B3C6 | 208.91 | 93.47 | 48.59 | 94.41 | 2.52 | -8.58 |

จากการนำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้ไปผลิตเป็นไบโอดีเซล และศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันดังกล่าว พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายทุกชุดการทดลองมีค่าซีเทน (Cetane number, CN) อยู่ในช่วง 45.75-60.37 (Table 3) ค่า CN เป็นค่าที่ต้องพิจารณาเป็นอันดับแรกในการผลิตน้ำมัน โดยเป็นค่าที่แสดงคุณสมบัติการจุดติด การเผาไหม้ของน้ำมัน หากมีค่า CN สูง คือมีการจุดติดที่ดี คือจุดติดแล้วคงอยู่ได้ระยะเวลานาน จึงให้พลังงานได้นานกว่า มากกว่า เครื่องยนต์จึงทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเต็มที่มากกว่า โดยค่า CN ของน้ำมันไบโอดีเซลที่กำหนดไว้ตามมาตรฐานคือต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 47 หรือ 51 ตามมาตรฐานของ ASTM D6751 (2012) และ Fuel Standard (Biodiesel) Determination (2003) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าน้ำมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากการศึกษานี้มีค่า CN อยู่ในช่วง 45.75-60.37 ซึ่งในเกือบทุกชุดการทดลองมีค่า CN สูงกว่ามาตรฐานทั้งสองเกณฑ์ ยกเว้นชุดทดลอง B1C2 และ B3C6 ที่ผ่านเพียงเกณฑ์ของ ASTM D6751 และ B1C4 ที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้งสองเกณฑ์ ซึ่งหากต้องการนำสาหร่ายในชุดการทดลองเหล่านี้ไปผลิตไบโอดีเซล จำเป็นต้องมีขั้นตอนการลดชนิดกรดไขมันที่มีพันธะคู่ลงอีก เพื่อเพิ่มค่า CN ของน้ำมันให้สูงขึ้นให้ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ค่า CN ของ *B. braunii* สายพันธุ์อื่นที่เคยมีรายงานไว้ เช่น มีค่าเท่ากับ 52.67 (Nascimento et al., 2015) และ 55.4 (Ashokkumar et al., 2014) และสูงกว่า *Chlorella sosokiniana* and *C. vulgaris* ซึ่งมีค่าซีเทน 42.40 และ 40.24 (Sergeeva et al., 2017)

ค่า Saponification value (SV) เป็นค่าที่แสดงถึงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (ความยาวของพันธะ) ของกรดไขมันทั้งหมดที่ประกอบอยู่ในน้ำมัน หากค่า SV สูงแสดงว่ามีกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีส่วนประกอบของ triglycerides อยู่มาก เหมาะสมในการทำเครื่องสำอาง สบู่ หรือแชมพู มากกว่าทำน้ำมันไบโอดีเซล เพราะเมื่อนำมาผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจะทำให้มีผลผลิตน้ำมันต่ำ ดังนั้นค่า SV ที่ต่ำจึงส่งผลดีต่อน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งปกติแล้วน้ำมันไบโอดีเซล B100 และ B10 มีค่า SV เท่ากับ 244 และ 218 mg KOH/g (US Department of Energy, 2004) น้ำมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในการทดลองนี้มีค่า SV อยู่ในช่วง 208.91-257.87 mg KOH/g

ค่า Iodine value (IV) เป็นค่าที่ระบุถึงปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมดในไบโอดีเซล ซึ่งหากมีค่า IV ที่สูง ย่อมทำให้น้ำมันไม่คงตัว ซึ่งเกณฑ์มาตรฐานที่ยุโรปกำหนดไว้คือค่า IV ต้องไม่เกิน 120 g $I_2$/100 g โดยค่า IV ของน้ำมันที่ผลิตได้จากทุกชุดการทดลองนี้มีค่าอยู่ในช่วง 30.09-97.88 g $I_2$/100 g ซึ่งผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด และใกล้เคียงกับค่า IV ของสาหร่ายหลายชนิดที่มีรายงานไว้ในงานวิจัยของ Francisco et al. (2010)

ค่า Degree of unsaturation (DU) เป็นค่าที่แสดงถึงความคงตัวของน้ำมันไบโอดีเซล หรือระยะเวลาที่สามารถเก็บน้ำมันไว้ได้ หากสาหร่ายมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะคู่มากจะทำให้มีค่า DU สูง โดยค่า DU ที่ต่ำ หมายถึงน้ำมันไบโอดีเซลนั้นมีค่าความคงตัวที่ดี เก็บรักษาได้นานกว่าค่า DU ที่สูง โดยค่า DU ของน้ำมันจากสาหร่ายของการทดลองนี้มีค่าอยู่ในช่วง 32.78-101.75% โดยชุดการทดลอง B0C2 คือชุดที่มีค่า DU ต่ำที่สุด โดยมีรายงานค่า DU ของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดเล็กชนิดอื่นไว้ด้วยเช่นกัน เช่น DU ของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* และ *Chlorella pyrenoidosa* ซึ่งอยู่ในช่วง 76.53–132.08% (Wu and Miao, 2014)

อีกสองปัจจัยที่แสดงคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซลคือค่ากรดไขมันอิ่มตัวสายยาว long chain saturated factor (LCSF) และค่าการอุดตัน Cold filter plugging point (CFPP) ซึ่งทั้งสองค่าเป็นค่าที่แสดงความสามารถในการไหลหรือการฉีดของน้ำมันไบโอดีเซลในเครื่องยนต์ที่อุณหภูมิต่ำ ค่า LCSF และ CFPP ที่ต่ำ แสดงว่าน้ำมันมีการไหล สูบฉีดได้ดี หากมีค่า LCSF และ CFPP ที่สูง ย่อมหมายถึงน้ำมันไบโอดีเซลนั้นจะตกตะกอนและอุดตันไส้กรองของเครื่องยนต์ได้ง่ายที่อุณหภูมิต่ำ ย่อมทำให้น้ำมันมีคุณภาพต่ำไปด้วย (Mittelbach and Remschmidt, 2004) ซึ่งผลจากการทดลองนี้พบว่าน้ำมันของสาหร่ายจากชุดการทดลอง B1C4 มีค่า LCSF และ CFPP ที่ดีที่สุดคือ 0.63% และ -14.51°C และในหลายชุดการทดลองมีค่า CFPP สูงเกินกว่า 20°C ซึ่งหากจะมีการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลจริงจะไม่เหมาะสมกับประเทศในเขตเมืองหนาว ต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติก่อนนำไปใช้จริง โดยเมื่อพิจารณาเทียบกับสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิดอื่นพบมีรายงานไว้ว่าค่า LCSF ของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* และ *Chlorella pyrenoidosa* ซึ่งอยู่ในช่วง 3.01-5.73% (Wu and Miao, 2014)

## สรุปผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* KMITL 2 โดยเสริมด้วยวิตามิน biotin (B) และ cobalamin (C) ที่เหมาะสมส่งผลให้มีผลผลิตชีวมวลสูงสุดคือ 1.89±0.23 g/l ในชุดการทดลอง B1C6 ส่วนชุดการทดลอง B3C0 ให้ปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุดคือ 62.17±1.31% และพบว่า biotin และ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไฮโดรคาร์บอน ของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ น้ำมันไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีที่สุดคือจากสาหร่ายในชุดการทดลอง B0C2 โดยมีค่า IV และ DU ต่ำที่สุด เท่ากับ 30.09 g $I_2$/100 g และ 32.78°C และค่า cetane สูงที่สุดคือ 60.37 แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามิน biotin และ cobalamin เป็นอีกทางเลือกที่ดีในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับได้รับทุนสนับสนุนจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2561-01-04-004)

## เอกสารอ้างอิง

AOAC Official Method 965.49. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Gaithersburg: AOAC International, Gaithersburg.

Ashokkumar, V., and Rengasamy, R. 2012. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. *Bioresource Technology* 104: 394-399.

Ashokkumar, V., Agila, E., Sivakumar, P., Salam, Z., Rengasamy R., and Ani, F. N. 2014. Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy Conversion and Management* 88: 936-946.

ASTM D6751. 2012. Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Middle Distillate Fuels. https://www.dieselnet.com/tech/fuel_biodiesel_std.php. (5 November 2019).

Bacha, J., Freel, J., Gibbs, A., Gibbs, L., Hemighaus, G., Hoekman, K., Horn, J., Gibbs, A., Ingham, M., Jossens, L., et al. 2007. *Diesel Fuels Technical Review*. San Ramon, CA: Chevron Corporation. 116 p.

Becker, E. W. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Great Britain: Cambridge University Press.

Bligh, E. G., and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.

Cabanelas, I. T. D., Arbib, Z., Chinalia, F. A., Souza, C. O., Perales, J. A., Almeida, P. F., Druzian J. I., and Nascimento, I. A. 2013. From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy* 109: 283-290.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.

Croft, M. T., Warren, M. J., and Smith, A. G. 2006. Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell* 5: 1175-1183.

Dayananda, C., Sarada, R., Bhattacharya, S., and Ravishankar, G. A. 2005. Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry* 40: 3125-3131.

DuBois, D. M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., and Pavishankar, G. A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or and industrial reality?. *Trends in Food Science and Technology* 16: 389-406.

Farias Silva, C. E., and Bertucco, A. 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry* 51: 1833-1842.

Francisco, E. C., Neves, D. B., Lopes, E. J., and Franco, T. T. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85: 395-403.

Fuel Standard (Biodiesel) Determination. 2003. Approved Under section 21 of the Fuel Quality Standard Act 2002 by the Australian Minister for the Environment and Heritage. https://www.comlaw.gov.au/Details/F2006B01373. (5 November 2019).

Garcia, M. C. C., Sanchez, M. A., Fernandez, S. J. M., Molina, G. E., and Garcia, C. F. 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry* 40: 297-305.

Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E., and Smith, A. G. 2011. Insights into the evolution of vitamin $B_{12}$ auxotrophy from sequenced algal genomes. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2921-2933.

Knothe, G. 2008. "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels* 22: 1358-1364.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement which the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Mittelbach, M., and Remschmidt, C. 2004. *Biodiesel: The Comprehensive Handbook*. Vienna, Austria: Boersedruck Ges. M.B.H.

Nascimento, I. A., Cabanelas, I. T. D., Santos, J. N., Nascimento, M. A., Sousa, L., and Sasone, G. 2015. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: effects of $CO_2$-supplementation and nutrient levels in cultures. *Algal Research* 8: 53-60.

Philipose, M. T. 1967. *Chlorococcales*. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research.

Quinn, J. C., Hanif, A., Sharvelle, S., and Bradley, T. H. 2014. Microalgae to biofuels: Life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae. *Bioresource Technology* 171: 37-43.

Ramos, M. J., Fernandez, C. M., Casas, A., and Rodriguez, L. A. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology* 100:261-268.

Ruangsomboon, S. 2018. Hydrocarbon production and biodiesel properties of a green microalga *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated outdoor in open pond and closed photobioreactor. *Chiang Mai Journal of Science* 45(2): 668-679.

Ruangsomboon, S., Prachom, N., and Sornchai, P. 2017. Enhanced growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* KMITL 2 by optimum carbon dioxide concentration and concentration-dependent effects on its biochemical composition and biodiesel properties. *Bioresource Technology* 244: 1358-1366.

Ruangsomboon, S., Sornchai, P., and Prachom, N. 2018. Enhanced hydrocarbon production and improved biodiesel qualities of *Botryococcus braunii* KMITL 5 by vitamins thiamine, biotin and cobalamin supplementation. *Algal Research* 29: 159-169.

Sergeeva, Y. E., Mostova, E. B., Gorin, K. V., Komova, A. V., Konova, I. A., Pojidaev, V. M., Gotovtsev, P. M., Vasilov, R. G., and Sineoky, S. P. 2017. Calculation of biodiesel fuel characteristics based on the fatty acid composition of the lipids of some biotechnologically important microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 53: 807-813.

Tanabe, Y., Loki, M., and Watanabe, M. M. 2014. The fast-growing strain of hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii*, BOT-22, is a vitamin $B_{12}$ autotroph. *Journal of Applied Phycology* 126:9-13.

US Department of Energy. 2004. *Biodiesel: Handling and use guidelines*. Energy Efficiency and Renewable Energy, United States Department of Energy.

Vonshak, A., and Maske, H. 1982. Algae: growth techniques and biomass production. In *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis,* J. Coombs, and D. O. Hall, eds. pp. 66-77. Oxford: Pergamon Press.

Wu, H., and Miao, X. 2014. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource Technology* 170: 421-427.

*วันรับบทความ (Received date) : 12 พ.ย. 62*

*วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 20 ม.ค. 63*

*วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้