



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดแยก *Botryococcus braunii* และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม
ในการผลิตไฮโดรคาร์บอน

Isolation of *Botryococcus braunii* and Optimization of Culture Conditions
for Hydrocarbon Production

نامผู้วิจัย นางสาวศิริพรรณ จันทน์น้ำท่วม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วิเชียร ขงมานิตชัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา ลีสู่, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยก *Botryococcus braunii* และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม
ในการผลิตไฮโดรคาร์บอน

Isolation of *Botryococcus braunii* and Optimization of
Culture Conditions for Hydrocarbon Production

โดย

นางสาวศิริพรรณ จันทน์น้ำท่วม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริพรรณ จันทน์น้ำท่วม 2557: การคัดแยก *Botryococcus braunii* และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรคาร์บอน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา
ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล,
Ph.D. 179 หน้า

ทำการคัดแยกสาหร่าย *Botryococcus braunii* จากแหล่งน้ำ 90 แหล่ง ทั่วทุกภาคของประเทศไทย สามารถแยกสาหร่ายได้ทั้งหมด 206 ไอโซเลต มี 102 ไอโซเลตที่ผลิตไฮโดรคาร์บอน ซึ่งไอโซเลต J4-1 มีการเจริญและผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงสุด จากนั้นศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว 8 สูตร พบว่าอาหาร AF-6 เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดที่สนับสนุนการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 โดยมีมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.324 กรัมต่อลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ 0.381 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณไฮโดรคาร์บอน 0.731 กรัมต่อลิตร ทำการออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยเทคนิค Plackett-Burman design มีปัจจัยที่นำมาศึกษา 7 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต ฟิเอช ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และความเข้มข้นของแสง พบว่าปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนมี 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต ฟิเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิธีพื้นผิวตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟิเอช 6.8 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้มวลเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุดเท่ากับ 5.74 กรัมต่อลิตร 13.51 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมในการวางแผนการทดลองแบบ CCD โดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนาย พบว่าค่าการเบี่ยงเบนของการผลิตมวลเซลล์ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 10.17 เปอร์เซ็นต์ 11.19 เปอร์เซ็นต์และ 1.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการออกแบบการทดลองในการศึกษาครั้งนี้มีประสิทธิภาพต่อปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

Siriphan Channamtum 2014: Isolation of *Botryococcus braunii* and Optimization of Culture Conditions for Hydrocarbon Production. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Ms. Duenrut Chonudomkul, Ph.D. 179 pages.

A total of 206 isolates of *Botryococcus braunii* were isolated from 90 water samples collected from all over Thailand. There were 102 isolates could produce hydrocarbons and isolate No. J4-1 exhibited the highest biomass and hydrocarbon production. Among 8 medium formula used for cultivation of green algae AF-6 medium supported better growth, chlorophyll and hydrocarbon production of *B. braunii* J4-1. This medium yielded $2.324 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of biomass, $0.381 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of chlorophyll and $0.731 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of hydrocarbon production. Screening of the culture variables including NaNO_3 , KH_2PO_4 , Fe-citrate, pH, NaHCO_3 , CO_2 and light intensity were carried out by using Plackett-Burman design. The results revealed that three variables i.e. Fe-citrate, pH and CO_2 significantly affected biomass, chlorophyll and hydrocarbon production. Central Composite Design (CCD) and response surface plots were used to find out the optimal value of these factors that contributed to maximum biomass, chlorophyll and hydrocarbon production. The optimum values of Fe-citrate $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.8 and CO_2 2.5 % (v/v) were the optimum condition to achieve maximum yield were $5.74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of biomass, $13.51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of chlorophyll and $1.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of hydrocarbon production. The validation of the optimal conditions by analysis of CCD, the validation experiments were performed comparing the experimental values with the predicted values. The results of the deviations for production of biomass, chlorophyll and hydrocarbon were 10.17 %, 11.19 % and 1.41 %, respectively. Therefore, it could be concluded that the experimental design in this study is effective for factors affecting on the biomass, chlorophyll and hydrocarbon production by *B. braunii* J4-1, which can be utilized in the development of technology for the production of biodiesel.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.วิเชียร ยงมานิตชัย กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลี้มทอง ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร. อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา ขอขอบคุณบุคลากรเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ขอขอบคุณเพื่อนพี่น้องภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน รวมถึงบุคคลที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์ความรู้เพิ่มเติมต่าง ๆ อีกทั้งยังคอยเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยในระหว่างการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อสมจิตร จันทรน้ำท่วม คุณแม่สุภี จันทรน้ำท่วม และญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้สนับสนุนทั้งทุนทรัพย์ และโอกาสในการศึกษาเรียนรู้รวมทั้งเป็นกำลังใจสำคัญให้แก่ผู้วิจัยในทุกเรื่องมาโดยตลอด ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่คุณอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนและให้ความรู้มาจนถึงปัจจุบัน

ท้ายที่สุดนี้ ผู้วิจัยหวังว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้คงมีประโยชน์ต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องตลอดจนผู้ที่สนใจไม่มากนักน้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้วิจัยขออภัยเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ศิริพรรณ จันทรน้ำท่วม

มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	45
อุปกรณ์	45
วิธีการ	47
ผลและวิจารณ์	56
สรุปและข้อเสนอแนะ	141
สรุป	141
ข้อเสนอแนะ	143
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	144
ภาคผนวก	163
ภาคผนวก ก สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย	164
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์การเจริญ	171
ภาคผนวก ค สารไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์	174
ภาคผนวก ง โครมาโทแกรมการแยกสารไฮโดรคาร์บอน	
ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	176
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	179

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบแหล่งที่มาของไบโอดีเซลในสหรัฐอเมริกา	6
2	แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสายพันธุ์ต่าง ๆ ในรูปน้ำหนักแห้ง (%)	7
3	ปริมาณน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด	8
4	การแพร่กระจายของสาหร่าย <i>B. braunii</i> ในทวีปต่าง ๆ	11
5	ลักษณะเฉพาะของสาหร่าย <i>B. braunii</i> แต่ละ race	13
6	โครงสร้างไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย <i>B. braunii</i> race B	18
7	แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง	35
8	ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัย โดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง	36
9	ค่าของ code level ใน Central Composite Design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย	40
10	ระดับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ <i>B. braunii</i> โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design	49
11	การจัดการทดลอง Plackett and Burman design ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรอง จำนวน 7 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ <i>B. braunii</i>	50
12	การกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธี Central Composite Design	52
13	แบบการทดลองในการศึกษาการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย <i>B. braunii</i> โดยใช้ Central Composite Design	53
14	แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำในจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย	57
15	แสดงค่าทางกายภาพบางประการของตัวอย่างน้ำและการสำรวจสาหร่าย <i>B. braunii</i> ในแหล่งน้ำต่าง ๆ	72
16	แสดงช่วงของค่าทางกายภาพจากตัวอย่างน้ำที่พบสาหร่าย <i>B. braunii</i>	80
17	การเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ <i>B. braunii</i> ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ	82
18	การเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย <i>B. braunii</i> ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ	91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1	101
20	แสดงค่าการเจริญ และปริมาณไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1 จากการจัดการทดลองแบบ Plackett and Burman design	105
21	การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1	107
22	การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1	108
23	การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1	108
24	แสดงค่าการเจริญ และปริมาณไฮโดรคาร์บอน ของ <i>B. braunii</i> J4-1 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD	110
25	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA ^b) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณต่อการเจริญของ <i>B. braunii</i> J4-1	111
26	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA ^b) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ของ <i>B. braunii</i> J4-1	111
27	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA ^b) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ <i>B. braunii</i> J4-1	112
28	การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ	113
29	ผลการวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนกับค่าทำนายของเชื้อสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1 ในแต่ละการทดลอง	123
30	ช่วงที่เหมาะสมของปัจจัยที่ศึกษาสำหรับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน	140
31	การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสำหรับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ <i>B. braunii</i> J4-1	140

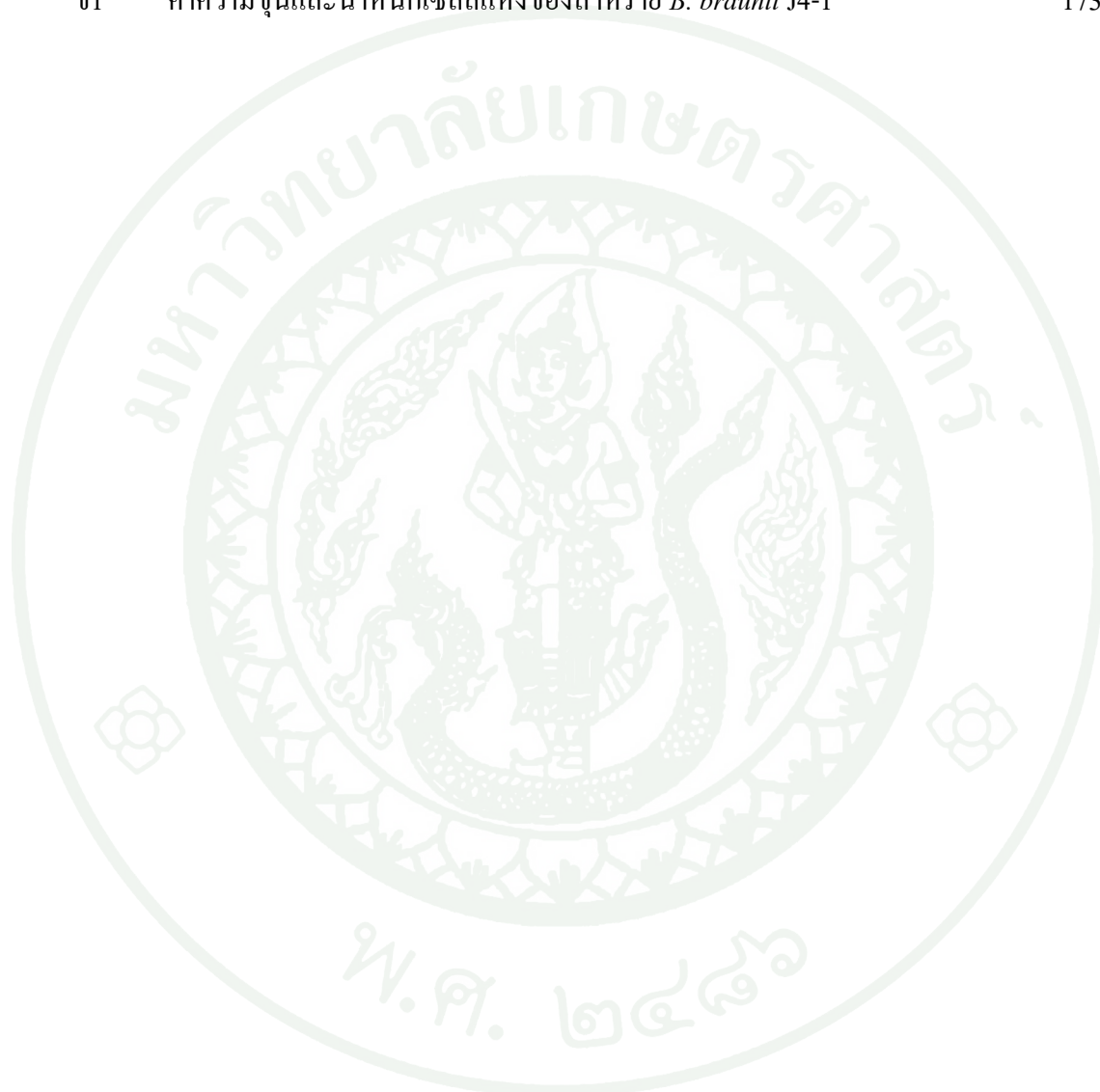
สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

ข1 ค่าความชุ่มและน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

173



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์	5
2	การจัดจำแนก <i>Botryococcus</i>	9
3	โครงสร้างของเซลล์ <i>B. braunii</i>	10
4	ชนิดของไฮโดรคาร์บอนที่พบในสาหร่าย <i>B. braunii</i> 3 race	14
5	กลไกการสังเคราะห์ไบโไพโรออคอกกินและสควาลีนโดย <i>B. braunii</i> race B	17
6	ลักษณะของ ether lipids ที่ผลิตโดยสาหร่าย <i>B. braunii</i> race A	21
7	ลักษณะของ ether lipids ที่ผลิตโดยสาหร่าย <i>B. braunii</i> race B	22
8	ลักษณะของ ether lipids ที่ผลิตโดยสาหร่าย <i>B. braunii</i> race L	23
9	โมเดลแสดงการกระจายของปัจจัย	37
10	Central Composite Design (CCD)	39
11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสาหร่าย <i>B. braunii</i> จากแหล่งน้ำต่างๆ	81
12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>B. braunii</i> J4-1 เมื่อย้อมด้วยสี Nile red	96
13	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด ภายใต้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมึดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็น เวลา 30 วัน	100
14	ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิต ไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมึดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน	102
15	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>B. braunii</i> J4-1 ในอาหาร AF-6 โดยการจัดการทดลอง แบบ Plackett and Burman design ในสภาวะสิ่งทดลอง 8 สภาวะ ภายใต้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมึดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็น เวลา 32 วัน	104
16	Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน	117
17	Scatterplot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย	119
18	กราฟระหว่างค่าความคลาดเคลื่อนกับอันดับของข้อมูล	121
19	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนาย	124

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และพีเอชต่อการเจริญ	127
21	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญ	128
22	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของพีเอชและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญ	129
23	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และพีเอชต่อการผลิตคลอโรฟิลล์	132
24	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตคลอโรฟิลล์	133
25	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของพีเอชและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตคลอโรฟิลล์	134
26	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และพีเอชต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน	137
27	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน	138
28	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของพีเอชและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน	139

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ข1	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์กับน้ำหนักรีดเซลล์แห้งของ <i>B. braunii</i> J4-1	173
ค1	สูตรโครงสร้างของสารไฮโดรคาร์บอน $C_{34}H_{58}$	175
ง1	โครมาโทแกรมการแยกสารไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	177
ง2	โครมาโทแกรมการแยกสารไฮโดรคาร์บอนของ <i>B. braunii</i> J4-1 ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	178

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	=	Degree Celsius
CDW	=	Cell dry weight
cm	=	Centimeter
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
g	=	Gram
kg	=	Kilogram
L	=	Liter
%	=	Percent
μm	=	Micrometer
m	=	Meter
mg	=	Milligram
ms	=	Milli siemens
MJ	=	Megajoules
OD	=	Optical density
Pas	=	Pascal second
RNA	=	Ribonucleic acid
w/w	=	Weight per weight
v/v	=	Volume per vol

การคัดแยก *Botryococcus braunii* และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตไฮโดรคาร์บอน

Isolation of *Botryococcus braunii* and Optimization of Culture Conditions for Hydrocarbon Production

คำนำ

ในสถานการณ์ปัจจุบันทั่วโลกได้เผชิญหน้ากับวิกฤตพลังงานอันเนื่องมาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรที่จำกัดและอาจหมดสิ้นได้ ในขณะนี้ได้ยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่าการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลอย่างต่อเนื่องไม่มีความยั่งยืนเนื่องจากปริมาณที่ลดลงและก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่ทั่วโลกยังคงมีความต้องการพลังงานเพิ่มขึ้น พร้อมทั้งปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ตามมา ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้นักวิทยาศาสตร์และผู้เชี่ยวชาญทางด้านเทคโนโลยีมีความพยายามที่จะทำการศึกษาเพื่อนำเอาพลังงานจากแหล่งอื่นมาใช้เป็นพลังงานทดแทน (Chisti *et al.*, 2007) ไบโอดีเซลจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์เห็นว่าเป็นพลังงานทดแทนที่เหมาะสม ที่จะนำมาทดแทนดีเซลได้ นอกจากนั้นยังช่วยบรรเทาภาวะโลกร้อนหรือภาวะเรือนกระจกเนื่องจากการเผาไหม้ไม่มีการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่บรรยากาศ (Lang *et al.*, 2001; Antolin *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2004) ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพโดยทั่วไปประกอบด้วยเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ที่ได้มาจากไขมันสัตว์ น้ำมันจากพืช หรือจากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) โครงสร้างทั่วไปของไขมันประกอบด้วยไตรเอสเทอร์ของกรดไขมันและโมเลกุลของกลีเซอรอล โดยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะแทนที่กลีเซอรอลด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล จากกระบวนการผลิตจะได้เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันคือไบโอดีเซล และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by product) การผลิตไบโอดีเซลโดยผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นกระบวนการที่ไม่ซับซ้อนมาก อีกทั้งการเพิ่มขึ้นของราคาน้ำมันปิโตรเลียมและความต้องการลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก ไบโอดีเซลจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นแหล่งพลังงานทดแทน (Demirbas, 2010; Chen, 2011; Yusuf, 2007) การผลิตไบโอดีเซลส่วนใหญ่จะใช้น้ำมันจากพืชแต่การผลิตให้ได้ปริมาณมากนั้นต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่และใช้ระยะเวลานานในการเพาะปลูก จึงเป็นข้อจำกัดในการผลิต ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการแสวงหาแหล่งวัตถุดิบทางเลือกอื่นที่ไม่ใช่พืชอาหารมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลด้วยเหตุนี้สาหร่ายขนาดเล็กจึงได้รับความสนใจมากขึ้น และเชื่อว่ามีศักยภาพสูงสำหรับการผลิต

ไบโอดีเซล ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กมีข้อได้เปรียบคือ ต้องการพื้นที่ในการตั้งโรงเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กมีข้อได้เปรียบคือ ต้องการพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย มีการเจริญเร็วและไม่ขึ้นกับฤดูกาล นอกจากนั้นในระดับการผลิตขนาดใหญ่ยังสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารแบบง่าย ๆ ได้ (Wofit *et al.*, 1985; Sawayama *et al.*, 1995b) สาหร่ายยังสามารถปรับความแตกต่างตามสภาวะการเจริญเติบโตนอกจากนี้ประโยชน์อย่างมากต่อสิ่งแวดล้อมโดยช่วยลดภาวะเรือนกระจกหรือภาวะโลกร้อนจากการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์แล้วเปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ จากนั้นปล่อยออกซิเจนออกสู่บรรยากาศ (Sung *et al.*, 1999; Yu and Chen, 2005; Kojima and Zhang, 1999) การผลิตไบโอดีเซลต้องการสาหร่ายขนาดเล็กที่ผลิตน้ำมันสูงซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์สาหร่าย บางชนิดมีการสะสมน้ำมันในเซลล์สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Sploaore *et al.*, 2006) สาหร่ายขนาดเล็กจำนวนมากมีความแตกต่างกันในการผลิตไขมัน ไฮโดรคาร์บอน และองค์ประกอบน้ำมันอื่น ๆ โดยเฉพาะไตรกลีเซอไรด์ที่ไม่มีหัว ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดในการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยนำสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิตน้ำมันได้ในปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่นมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล (Danielo, 2005)

สาหร่าย *Botryococcus braunii* เป็นสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว มีคุณลักษณะสามารถสร้างไฮโดรคาร์บอนได้ โดยไฮโดรคาร์บอนจะประกอบด้วยโมเลกุลของคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบเพียงเท่านั้น (Brown and Knights, 1969) และไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ โดยไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* มีโครงสร้างคล้ายกับน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งมีค่าเทียบเท่ากับน้ำมันปิโตรเลียม เพราะฉะนั้นจึงสามารถนำมาใช้ได้โดยตรงหรือผสมกับน้ำมันดีเซลได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และยังช่วยลดกระบวนการคมนาคมของน้ำมันเชื้อเพลิงจากเทคนิคกระบวนการทำน้ำมันปิโตรเลียมแบบดั้งเดิม (Hillen *et al.*, 1982; Kitazato *et al.*, 1989) สาหร่าย *B. braunii* สามารถสังเคราะห์และสะสมไฮโดรคาร์บอนได้ในปริมาณสูงอยู่ในช่วงระหว่าง 15 - 76 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Metzger *et al.*, 1985; Sawayama *et al.*, 1994) จึงมีการนำสาหร่ายชนิดนี้มาศึกษาเพื่อประโยชน์ในการผลิตน้ำมันดีเซลชีวภาพและยังเป็นการนำทรัพยากรชีวภาพมาใช้ให้เป็นประโยชน์ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะคัดแยกสาหร่าย *B. braunii* และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรคาร์บอนในปริมาณสูง รวมถึงทำการศึกษาลักษณะที่เหมาะสม (optimization) ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนโดยการวางแผนการทดลองทางสถิติ ซึ่งการปรับสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตไฮโดรคาร์บอน และสามารถนำไปปรับใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมในอนาคตได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่สามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ในปริมาณสูง
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่คัดเลือกได้



การตรวจเอกสาร

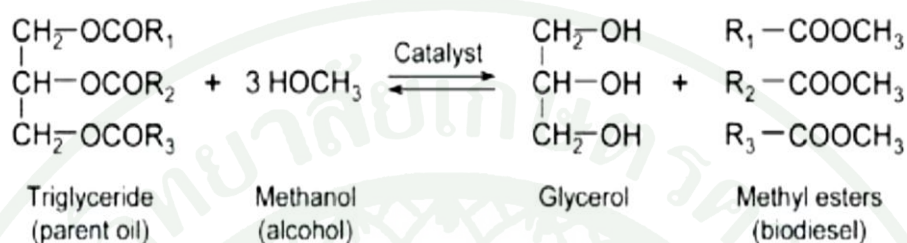
การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก

1. เชื้อเพลิงชีวภาพไบโอดีเซล

จากสถานการณ์ความไม่แน่นอนของราคาและปริมาณของน้ำมันดิบรวมทั้งปัญหาภาวะโลกร้อน ทำให้ประเทศต่าง ๆ มีความตื่นตัวในเรื่องของพลังงาน โดยเร่งให้ศึกษาวิจัยเพื่อหาแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม อาทิเช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานชีวมวล และแก๊สชีวภาพ เป็นต้น ที่ได้รับความสนใจมากในขณะนี้เห็นจะเป็นไบโอดีเซลหรือดีเซลชีวภาพ (bio-diesel) ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกที่มีคุณสมบัติในการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลและไม่มีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศ จึงเป็นเชื้อเพลิงที่ดีในการช่วยบรรเทาภาวะโลกร้อน (Lang *et al.*, 2001; Antolin *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามราคาของไบโอดีเซลในปัจจุบันยังคงสูงอันเนื่องมาจากราคาของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต รัฐบาลของประเทศต่าง ๆ จึงมีนโยบายส่งเสริมการปลูกพืชน้ำมันเพื่อลดต้นทุนของวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล แต่การปลูกพืชน้ำมันนั้นต้องการพื้นที่เพาะปลูกเป็นจำนวนมาก ด้วยเหตุนี้นักวิจัยของหลาย ๆ ประเทศจึงได้ให้ความสนใจไปที่การใช้ไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กมากขึ้นทั้งนี้เพราะข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กคือ ต้องการพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย เจริญเร็วและไม่ขึ้นกับฤดูกาล นอกจากนั้นยังสามารถเลี้ยงในอาหารแบบง่าย ๆ ในระดับการผลิตขนาดใหญ่ได้ (Woft *et al.*, 1985; Sawayama *et al.*, 1995b) ในการผลิตไบโอดีเซลต้องการสาหร่ายที่ผลิตน้ำมันในปริมาณสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ผลิตชนิดที่แตกต่างกันของไขมัน ไฮโดรคาร์บอน และน้ำมันเชิงซ้อนอื่น ๆ (Banerjee *et al.*, 2002; Metzger and Largeau, 2005; Guschina and Harwood, 2006) การใช้สาหร่ายขนาดเล็กมาผลิตไบโอดีเซลทำได้โดยการนำไขมันหรือน้ำมันในเซลล์มาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) แล้วใช้โดยตรงหรือผสมกับน้ำมันดีเซล (Sheehan *et al.*, 1998; Scragg *et al.*, 2003)

ไบโอดีเซล หมายถึงเชื้อเพลิงชีวภาพ จัดเป็นสารเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ที่ผลิตจากไขมันสัตว์ น้ำมันจากพืช น้ำมันจากของเสียจากการประกอบอาหาร หรือน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก นำมาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล และมีตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟูริก ภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูงเพื่อเปลี่ยนไขมันให้เป็นไบโอดีเซลชนิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน หรือเอทิลเอสเทอร์

ของกรดไขมัน ขึ้นอยู่กับประเภทของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการผลิต นอกจากนั้นยังมีการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน จะได้เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันคือไบโอดีเซล และกลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by product) แสดงดังภาพที่ 1 (Demirbas and Demirbas, 2011; Yusuf, 2007)



ภาพที่ 1 กระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: Yusuf (2007)

2. ศักยภาพของสาหร่ายขนาดเล็กต่อการผลิตไบโอดีเซล

ปัจจุบันการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลในทางอุตสาหกรรมนั้นผลิตมาจากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์เป็นส่วนใหญ่ ส่วนการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กที่ผ่านมานั้นนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางค์ (Belarbi *et al.*, 2000) จากข้อจำกัดในพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกพืชน้ำมันทำให้นักวิจัยมุ่งความสนใจไปที่สาหร่ายขนาดเล็กซึ่งมีข้อได้เปรียบในเรื่องของพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง จากข้อมูลการวิจัยถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ปริมาณร้อยละ 50 ของน้ำมันดีเซลที่ใช้ในระบบขนส่งของสหรัฐอเมริกาต้องการพื้นที่ในการเลี้ยงสาหร่ายเพียงร้อยละ 1 ถึง 3 ของพื้นที่ทั้งหมดที่ใช้ในการปลูกพืชน้ำมัน ดังตารางที่ 1 (Chisti, 2007) สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดมีการสะสมน้ำมันในเซลล์สูงถึงร้อยละ 80 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Matting, 1996; Spolaore *et al.*, 2006) โดยน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กมีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันพืชคือมีส่วนประกอบเป็นไตรกลีเซอไรด์ซึ่งมีจำนวนคาร์บอนอยู่ระหว่าง 12 - 22 อะตอมต่อโมเลกุล (Chelf, 1990; Ratledge, 1991) สาหร่ายขนาดเล็กที่มีรายงานการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตน้ำมันหรือลิวิด เช่น *Neochloris oleoabundans*, *Scenedesmus dimorphus*, *Euglena gracilis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Botryococcus braunii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Spirulina sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบแหล่งที่มาของไบโอดีเซลในสหรัฐอเมริกา (Chisti, 2007)

แหล่งของน้ำมัน	ผลผลิตน้ำมัน (ลิตร/เฮกตาร์)	พื้นที่ที่ต้องการ (ล้านเฮกตาร์) ¹	ร้อยละของพื้นที่การเพาะปลูก ในสหรัฐอเมริกา ¹
สบู่ดำ	1,892	140	77
มะพร้าว	2,689	99	54
ปาล์มน้ำมัน	5,950	45	24
สาหร่ายขนาดเล็ก ²	136,900	2	1.1
สาหร่ายขนาดเล็ก ³	58,700	4.5	2.5

¹ เพื่อใช้ในระบบขนส่งครั้งหนึ่งสำหรับเชื้อเพลิงที่ต้องการใช้ทั้งหมดในสหรัฐอเมริกา

² สาหร่ายมีน้ำมันร้อยละ 70 ของน้ำหนักเซลล์ (จากการทดลองในการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง)

³ สาหร่ายมีน้ำมันร้อยละ 30 ของน้ำหนักเซลล์ (จากการทดลองในการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง)

3. น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oil)

สาหร่ายขนาดเล็กมีลิพิดและกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของเยื่อเซลล์เมมเบรน บางชนิดมีน้ำมัน (bio-oil) เป็นอาหารสะสมเก็บไว้ในที่เยื่อหุ้มเซลล์ ไดอะตอม และไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) มีการสะสมลิพิดสูงมากกว่าร้อยละ 30 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และบางสายพันธุ์สะสมน้ำมันไว้มากกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Danielo, 2005) สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีการสะสมลิพิดต่างกัน เช่น *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina* sp., *Euglena gracilis* และ *Spirulina maxima* มีการสะสมลิพิดร้อยละ 16 - 40, 14 - 22, 11 - 21, 14 - 20 และ 6 - 7 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ดังตารางที่ 2 (Becker, 1994) Miao et al. (2004) รายงานว่าน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides*, *Microcystis aeruginosa* มีค่า saturated fraction ของ alkane ที่เหมือนกันกับน้ำมันดีเซล นอกจากนั้นยังมีปริมาณออกซิเจนต่ำ และมีค่าความร้อนสูงที่ 29 MJ/kg ความหนาแน่นที่ 1.16 kg/l และค่าความหนืดเท่ากับ 0.10 Pas

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสายพันธุ์ต่าง ๆ ในรูปน้ำหนักแห้ง (%)

สายพันธุ์ของสาหร่าย	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	กรดนิวคลีอิก
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 - 56	10 - 17	12 - 14	3 - 6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8 - 18	21 - 52	16 - 40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 - 58	17 - 12	14 - 22	4 - 5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra</i> sp.	6 - 20	33 - 64	11 - 21	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39 - 61	14 - 18	14 - 20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28 - 45	25 - 33	22 - 38	1 - 2
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28 - 39	40 - 57	9 - 14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46 - 63	8 - 14	4 - 9	2 - 5
<i>Spirulina maxima</i>	60 - 71	13 - 16	6 - 7	3 - 4.5
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrical</i>	43 - 56	25 - 30	4 - 7	-

ที่มา: Becker (1994)

สาหร่ายขนาดเล็กที่มีรายงานการวิจัยว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งน้ำมันมีหลายชนิด ทั้งสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเล โดยสาหร่ายขนาดเล็กสะสมลิพิดและกรดไขมันอิสระที่เซลล์ เมมเบรนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสะสม ปริมาณลิพิดที่พบในสาหร่ายชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด

สาหร่ายขนาดเล็ก	ปริมาณน้ำมัน (% ของน้ำหนักแห้ง)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 - 75
<i>Chlorella</i> sp.	28 - 32
<i>Cryptocodinium cohi</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16 - 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochysis</i> sp.	25 - 33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris</i> sp.	20 - 35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31 - 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 - 54
<i>Nitzschia</i> sp.	45 - 47
<i>Phaeodactylum tricomutum</i>	20 - 30
<i>Scizochylum tricomutum</i>	50 - 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 - 23

ที่มา: Chisti (2007)

4. ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย *Botryococcus*

สาหร่าย *Botryococcus* เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก เซลล์อยู่รวมกันเป็นโคโลนีรูปทรงกลมหรือรี โคโลนีมีสีเขียว น้ำตาลหรือส้ม ประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างทรงกลมหรือรี เซลล์มีความยาว 6 - 10 ไมโครเมตร และความกว้าง 3 - 6 ไมโครเมตร แต่ละเซลล์มีหนึ่งคลอโรพลาสต์ คลอโรพลาสต์มีลักษณะรูปถ้วยหรือ discoid และมีโพรินอยด์รูปถ้วยเช่นกัน เซลล์จะอยู่เรียงกันแน่นในแนวรัศมีโดยมีสารเมือกเหนียวสีเข้มจนเกือบดำหุ้มโดยรอบ บางครั้งอาจพบโคโลนีเชื่อมกับโคโลนีอื่นโดยใช้สายไซโตพลาสซึมที่เกิดจากสารเมือก มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการภายในเยื่อหุ้มโคโลนี และเซลล์ดังกล่าวจะหลุดออกนอกเยื่อหุ้มด้วยแรงดันของเยื่อหุ้มโคโลนี (Smith, 1950) สาหร่ายในสกุล *Botryococcus* มีการจัดจำแนก (classification) แสดงดังภาพที่ 2

Kingdom Plantae

Subkingdom Viridaeplantae

Phylum Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlorococcales

Family Botryococcaceae

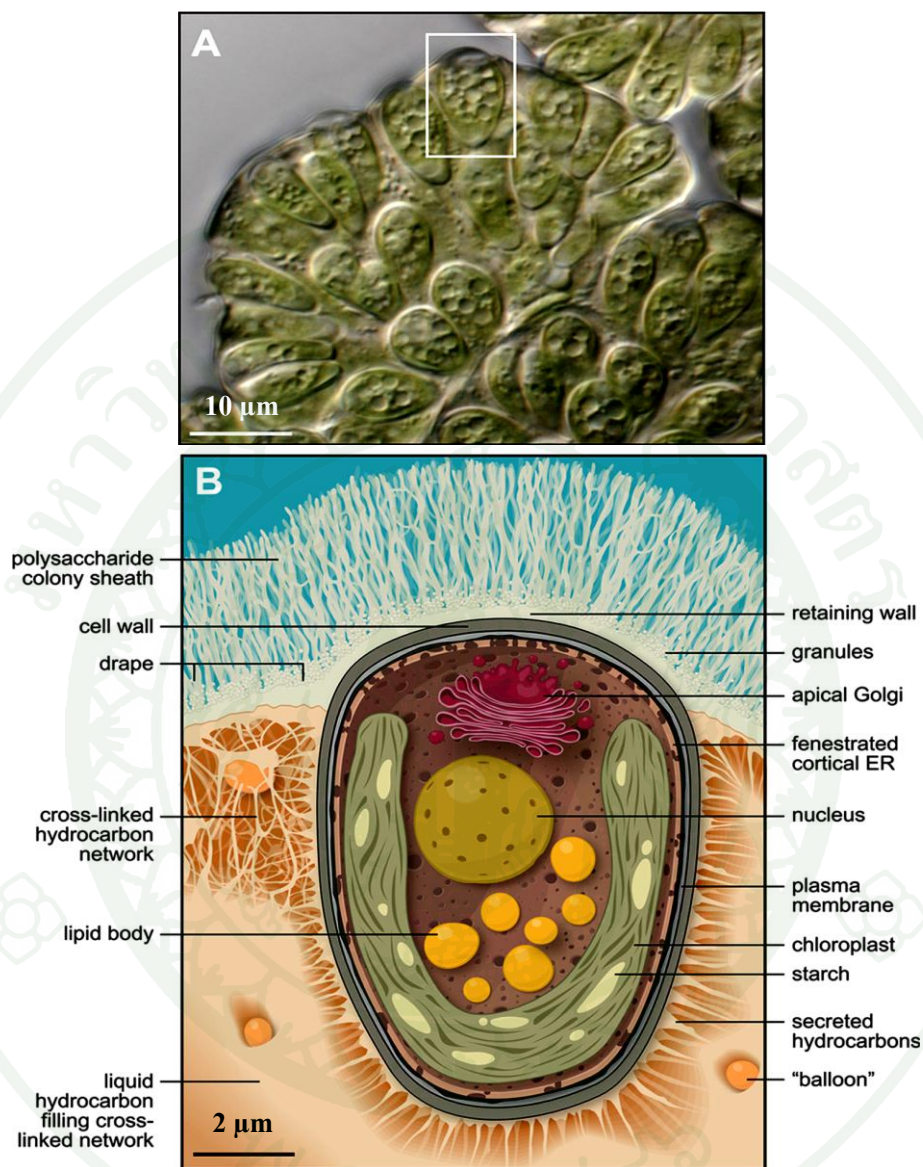
Genus *Botryococcus*

Specie *Botryococcus braunii*

ภาพที่ 2 การจัดจำแนก *Botryococcus*

ที่มา: Guiry and Guiry (2010)

การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์สาหร่าย *B. braunii* แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเซลล์ *B. braunii*; (A) บางส่วนของโคโลนี *B. braunii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ DIC และพื้นที่ในกรอบแสดงถึงเซลล์ (B) แบบโครงสร้างของเซลล์ *B. braunii* ซึ่งล้อมรอบด้วยสารประกอบภายนอกเซลล์และบางส่วนของไฮโดรคาร์บอนที่อยู่รอบ ๆ เซลล์

ที่มา: Taylor *et al.* (2012)

สาหร่ายชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำทะเล น้ำกร่อย เช่น อ่างเก็บน้ำ และบ่อน้ำในทุกทวีปดังแสดงในตารางที่ 4 จึงไม่สามารถกำหนดระบบนิเวศน์ของสาหร่าย *Botryococcus* ได้ แม้ว่าสาหร่ายชนิดนี้มีสภาวะที่จำเพาะแตกต่างกัน (Wake and Hillen, 1980)

ตารางที่ 4 การแพร่กระจายของสาหร่าย *B. braunii* ในทวีปต่าง ๆ

ทวีป	แหล่งที่พบ	ชนิดของน้ำ
ยุโรป	ทะเลสาบ บ่อน้ำ	น้ำจืด
แอฟริกา	ทะเลสาบ	น้ำจืด
เอเชีย	ทะเลสาบ	น้ำจืด น้ำทะเล
ออสเตรเลีย	ทะเลสาบ อ่างเก็บน้ำ	น้ำจืด
อเมริกาเหนือ	ทะเลสาบ บ่อน้ำ อ่างเก็บน้ำ	น้ำจืด น้ำทะเล
อเมริกาใต้	ทะเลสาบ	น้ำจืด น้ำกร่อย

ที่มา: Blackburn (1936), Aaronson *et al.* (1983)

B. braunii เป็นสาหร่ายสายพันธุ์เก่าแก่ที่พบย้อนหลังไปอย่างน้อย 500 ล้านปีก่อน และเป็นหนึ่งในสิ่งมีชีวิตจำนวนไม่มากที่ทราบกันดีว่าเป็นแหล่งกำเนิดของการสะสมน้ำมัน ถ่านหิน และหินน้ำมันที่พบบนโลก การปรากฏตัวของน้ำมันและฟอสซิลในสาหร่าย *B. braunii* ในปีโตรเลียม ถ่านหิน และหินน้ำมัน แสดงให้เห็นว่าไฮโดรคาร์บอนนี้เป็นสาเหตุของแหล่งน้ำมันสำรอง (Adam *et al.*, 2006; Audino *et al.*, 2002; Brassell *et al.*, 1986; Cane, 1977; Derenne *et al.*, 1997; Gelpi *et al.*, 1968; Glikson *et al.*, 1989; Mastalerz and Hower, 1996; Mckirdy *et al.*, 1986; Moldowan and Seifert, 1980; Stasiuk, 1999; Summons *et al.*, 2002; Testa *et al.*, 2001; Traverse, 1955) และสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้

สาหร่าย *B. braunii* มีคุณลักษณะเด่นคือสามารถสร้างและสะสมลิพิดได้หลากหลาย รวมถึงไฮโดรคาร์บอน ซึ่งไฮโดรคาร์บอนจะประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบเพียงเท่านั้น (Brown and Knights 1969; Knights *et al.* 1970) และจำนวนของ ether lipids ที่มีลักษณะจำเพาะ (Metzger *et al.* 1991; Metzger and Largeau 1999) โดยไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. Braunii* มีโครงสร้างคล้ายกับน้ำมันปีโตรเลียม ซึ่งมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับน้ำมัน

ปิโตรเลียม เพราะฉะนั้นจึงสามารถนำมาใช้ได้โดยตรงหรือผสมกับน้ำมันดีเซลได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และยังช่วยลดระบบการคมนาคมของน้ำมันเชื้อเพลิงจากเทคนิคกระบวนการผลิตน้ำมันปิโตรเลียมแบบดั้งเดิม (Hillen *et al.*, 1982; Kitazato *et al.*, 1989) สำหรับ *B. braunii* จึงมีศักยภาพเป็นแหล่งพลังงานทดแทน อีกทั้งยังสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ในปริมาณมากซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะการเจริญ โดยผลิตได้มากถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Sawayama *et al.*, 1995a) สำหรับ *B. braunii* แบ่งออกได้เป็น 3 race ขึ้นกับชนิดของการสังเคราะห์ไฮโดรคาร์บอน ซึ่งแต่ละ race มีลักษณะเฉพาะและสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ต่างชนิดกัน ดังแสดงในตารางที่ 5

ไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii*

1. ไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race A

Race A ผลิตไฮโดรคาร์บอนที่มี C_{23} - C_{33} ภายในโครงสร้างจะประกอบด้วย monoenes ถึง tetraenes และเกือบทั้งหมดมีคาร์บอนเป็นเลขคี่ มีพันธะไม่อิ่มตัวอยู่ตรงปลาย การสร้างไฮโดรคาร์บอนจะอยู่ภายใต้การควบคุมของปัจจัยทางพันธุกรรม (Metzger *et al.*, 1986) โดยทั่วไป *B. braunii* race A จะพบ dienes เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยพันธะไม่อิ่มตัวอยู่ตำแหน่งตรงกลางและปลายของสายโซ่ ส่วนมากจะพบในรูปของ cis (Metzger and Largeau, 1999) สำหรับ trienes พบได้มากที่สุดซึ่งจะมีพันธะไม่อิ่มตัวอยู่ตำแหน่งตรงกลางของสายโซ่ติดกัน 2 ตำแหน่งตรงปลาย 1 ตำแหน่ง ในขณะที่สายพันธุ์อื่นจะพบพันธะไม่อิ่มตัวติดกัน 2 ตำแหน่งตรงปลายของสายโซ่ และเป็นสาหร่ายเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่มี tetrapenes พันธะไม่อิ่มตัวติดกัน 3 ตำแหน่งอยู่ตรงตำแหน่งปลาย (Metzger, 1993) ดังแสดงในภาพที่ 4

2. ไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race B

Race B ผลิตไฮโดรคาร์บอนที่มี C_{30} - C_{37} ส่วนใหญ่เรียกว่า โบโทรโอคอกคีน (botryococcene) พบได้เฉพาะใน race B เท่านั้น ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น acyclic และ cyclic (Metzger and Largeau, 1999) นอกจากนั้นสาหร่าย race B ยังผลิต squalenes และ methyl squalenes ที่มี C_{31} - C_{34} ด้วย (Huang and Poulter, 1989; Metzger and Largeau, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 4

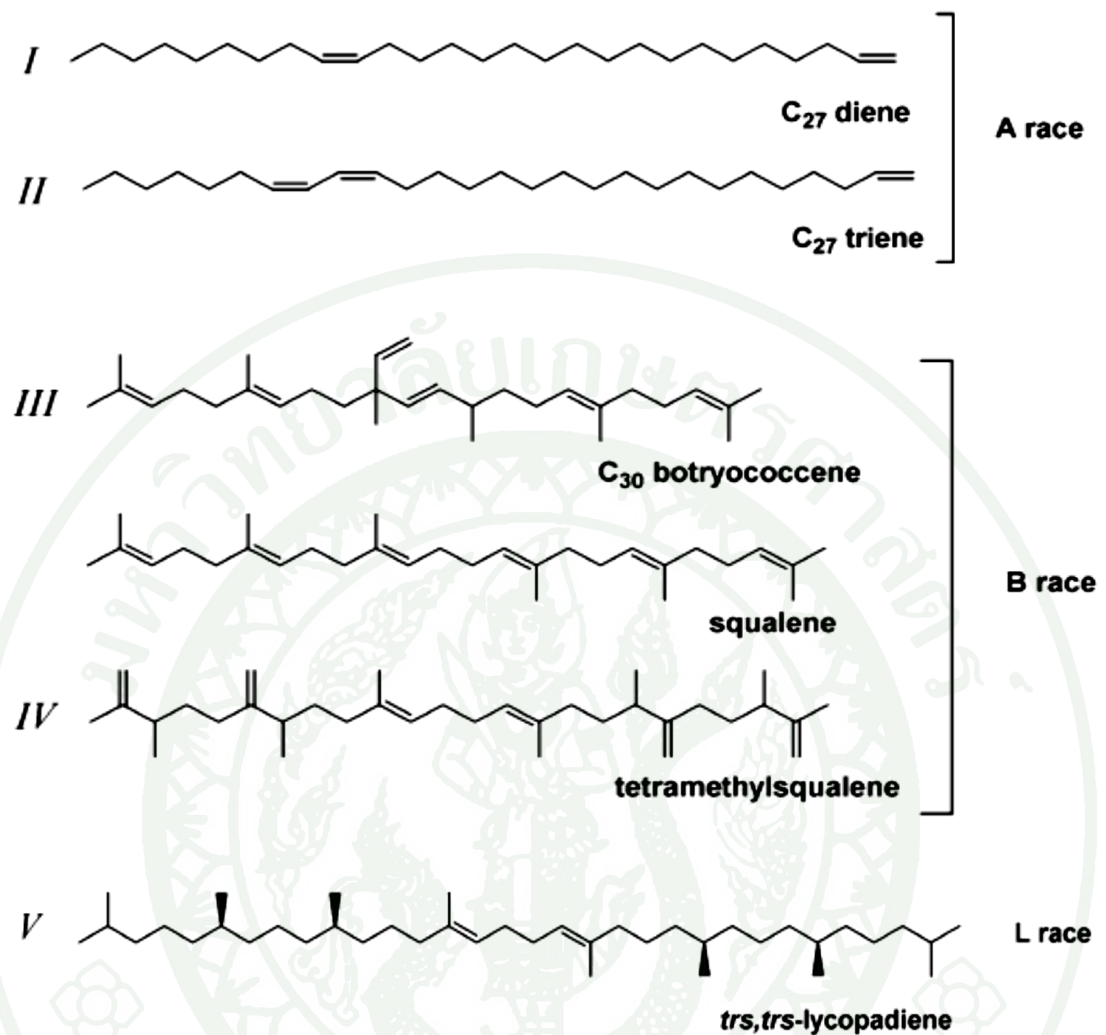
3. ไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race L

Race L ผลิตไฮโดรคาร์บอนชนิดเดียวที่เป็น tetraterpenoid ($C_{40}H_{78}$) หรือที่เรียกกันว่า lycopadiene มีรายงานว่าพบ Trs-trs-lycopadiene เพียงชนิดเดียวเท่านั้นในสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยและ Ivory Coast (Metzger และ Largeau, 1999) และมีไอโซเมอร์ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างจากสาหร่าย 2 สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศอินเดีย ทำให้ไม่สามารถทราบกระบวนการในการสังเคราะห์ lycopadiene (Metzger *et al.*, 1997) ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 5 ลักษณะเฉพาะของสาหร่าย *B. braunii* แต่ละ race

	<i>B. braunii</i>		
	Race A	Race B	Race L
ชนิดของไฮโดรคาร์บอน	$C_{25} - C_{31}$ odd numbered n-alkadienes/triens	Botryococcene (triterpene) C_nH_{2n-10} , $n = 30 - 37$	Lycopadienes (tetraterpene) $C_{40}H_{78}$
สีของโคโลนีในระยะ Stationary phase	เหลืองอ่อน หรือเขียว	ส้มปนแดง หรือส้มปนน้ำตาล เนื่องจากการสะสม Carotenoids	
Long chain alkenyl phenols	มี	ไม่มี	ไม่มี
ชนิดของ Biopolymers	Long aliphatic chains cross-linked by ether bridges และ bearing esters		Tetrapenoid cross-linked by ether bridges

ที่มา: Banerjee *et al.* (2002)



ภาพที่ 4 ชนิดของไฮโดรคาร์บอนที่พบในสาหร่าย *B. braunii* 3 race: (I: Knights *et al.*, 1970; II: Villarreal-Rosales *et al.*, 1992; III: Metzger and Casadevall, 1983; IV: Huang and Poulter, 1989; V: Metzger and Casadevall, 1987)

วิถีชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ของไฮโดรคาร์บอนโดยสาหร่าย *B. braunii*

1. วิถีชีวสังเคราะห์ของไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race A

วิถีชีวสังเคราะห์ในการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* race A โครงสร้างมีลักษณะคล้ายกับ oleic acid (18:1, cis- ω^9) โดยมีตำแหน่งของพันธะคู่และ stereochemistry ของ alkadienes คล้ายกับ oleic acid ลักษณะเฉพาะเหล่านี้บ่งบอกว่า oleic acid เป็นสารตั้งต้นของ dienes and trienes (Templier *et al.*, 1984, 1987) กระบวนการ decarboxylation ของอนุพันธ์ของกรดไขมันสายยาวมากจะถูกกระตุ้นโดย β -substituent ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่ทำให้เกิดการก่อรูปแบบไม่อิ่มตัว (Chan Yong *et al.*, 1986)

2. วิถีชีวสังเคราะห์ของไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race B

สาหร่าย *B. braunii* race B ผลิตไฮโดรคาร์บอนที่เรียกว่า โบไทรโอคอกคีน (botryococcene) ซึ่งเป็นสารประกอบ isoprenoid และ unusual 1'-3 fusion of isoprene units บริเวณตรงกลางของสายโซ่ จากภาพที่ 5 แสดงกลไกการสังเคราะห์โบไทรโอคอกคีนและสควาลีน (Squalene) โดย *B. braunii* race B สังเคราะห์ C_{30} โบไทรโอคอกคีนหรือโบไทรโอคอกคีนที่มีสายโซ่ยาวกว่า เริ่มจากสารตั้งต้นคือ farnesol จำนวน 2 โมเลกุล ถูกเปลี่ยนเป็น farnesyl diphosphate โดยเอนไซม์ farnesol phosphokinase (Inone *et al.*, 1994a, b) จากนั้น farnesyl diphosphate รวมตัวกับ carbene ซึ่งให้พันธะคู่ olefinic ได้เป็น presqualene diphosphate โดยพันธะคู่ olefinic อยู่ในกลุ่มของ chrysanthemyl species (1'-2-3 fused compound) จากนั้นปล่อย pyrophosphate ได้ cyclopropylcarbiny cation ซึ่งมีโครงสร้าง 1'-3 (artemisyl), 1'-3 (santoliny) และ 1'-1 (head-to-head)

โบไทรโอคอกคีนเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้าง artemisyl ที่มีการจัดเรียงตัวใหม่ของสารตั้งต้นคือ cyclopropylcarbiny ในกรณีนี้ C_{30} cation ($R = C_{11}H_{19}$) โดยเคลื่อนย้าย hydride จาก NADH หรือ NADPH ไปยัง allylic cation (Poulter *et al.*, 1977) และสควาลีนเกิดจากสารตั้งต้น cyclopropylcarbiny มาจัดเรียงตัวใหม่และมี hydride มาจับที่ตำแหน่ง 1'-1 fusion โดยส่วนมากปฏิกิริยาจะเกิดไปทางด้านการผลิตโบไทรโอคอกคีนมากกว่าสควาลีน เนื่องจากบริเวณพันธะ 1'-2 สามารถแตกตัวได้ง่ายกว่า

เมื่อเปรียบเทียบโบโทรโอคอกคินและสควาลีน พบว่ามีความสัมพันธ์กันกับตำแหน่งของ C_{30} และ nicotinamide co-factor ซึ่งการจับกันของเอนไซม์กับ substrate ของการสังเคราะห์สควาลีนเหมือนกับการสังเคราะห์โบโทรโอคอกคิน (Huang *et al.*, 1988) ซึ่งแสดงว่าอาจมีการใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาที่มีโครงสร้างพื้นฐานร่วมกัน ที่สำคัญรวมถึงการจับกันของ substrate และความเป็นไปได้ในองค์ประกอบ

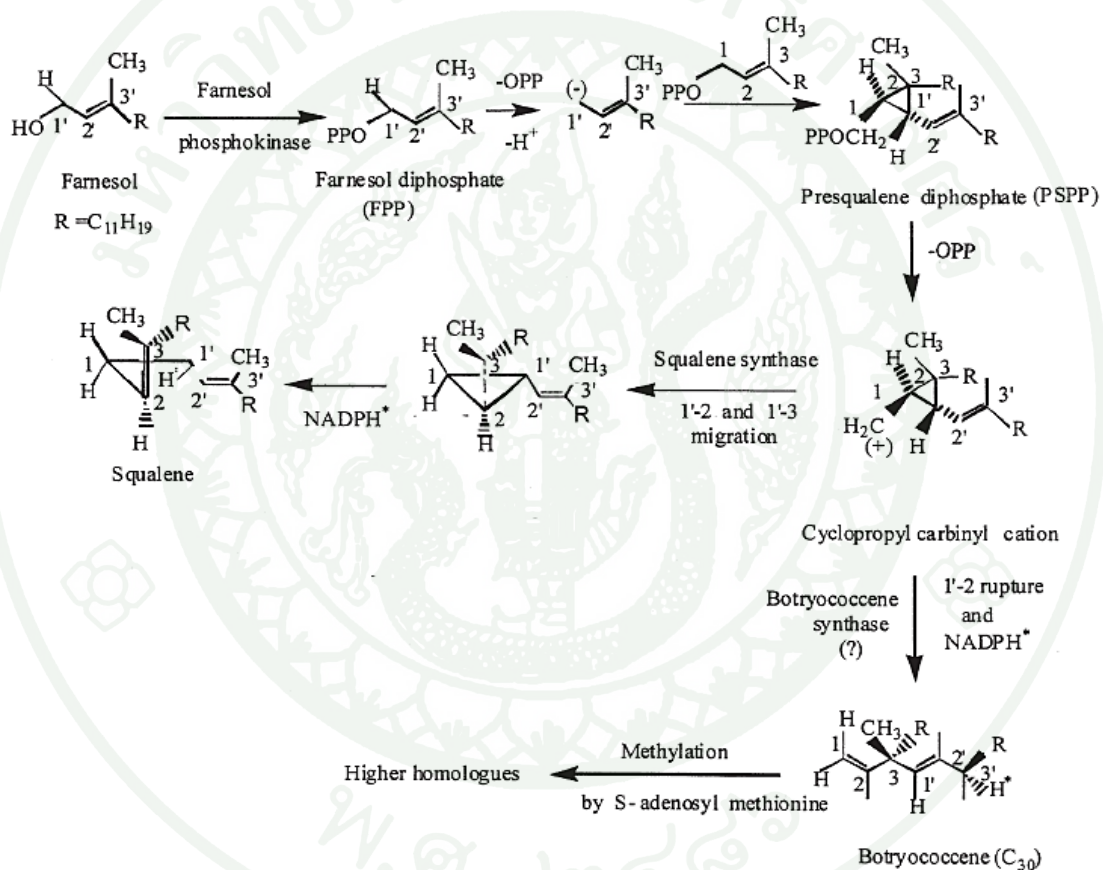
เนื่องจากการสังเคราะห์โบโทรโอคอกคินต้องมีการแตกพันธะที่ตำแหน่ง $C(1')-C(2')$ ของพันธะ cyclopropane อธิบายได้ว่าความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างการสะสมพลเซลล์และกิจกรรมในการสังเคราะห์สควาลีน ประกอบด้วยขั้นตอนในการเจริญ 2 ขั้นตอนคือ (Gu *et al.*, 1998) ขั้นตอนที่ 1 เซลล์มีการรวมกลุ่มกันมีการสะสมสควาลีนเพื่อสร้างสเตอรอลและผนังเซลล์ สร้างโพลีเมอร์ภายนอกเซลล์ ระยะนี้จึงมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างสควาลีนเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของเซลล์ ขั้นตอนที่ 2 เมื่อเซลล์เจริญสูงสุดจะเปลี่ยนไปสร้างและสะสมโบโทรโอคอกคินแทนสควาลีน

C_{30} โบโทรโอคอกคิน ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างโบโทรโอคอกคินที่มีสายยาวกว่า โดยส่วนมากเกิด mono methylation ในคาร์บอนอะตอม 3, 7, 16 และ 20 อะตอม และตำแหน่งอื่นๆ รวมถึงคาร์บอนอะตอม 18 (สำหรับ 12), 22 (สำหรับ 15), และ 30 (สำหรับ 16) (Metzger *et al.*, 1985b) S-adenosyl methionine รายงานว่าเป็น methylating agent (Wolf *et al.*, 1985b) โดยการเกิด methylation จะเกิดขึ้นได้น้อยหากมี substrate ที่จำเพาะเจาะจงอยู่น้อย ดังนั้นโครงสร้างที่ไฮโดรคาร์บอนที่สาหร่าย *B. braunii* race B ผลิตได้จึงมีหลายรูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 6

Largeau *et al.* (1980) ศึกษาการสะสมไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* ด้วยกล้อง spectroscopy และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าไฮโดรคาร์บอนถูกสะสมอยู่ในผนังเซลล์ชั้นนอก (outer walls) 95 % ในไซโตพลาสซึม 4 % และอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 % ของไฮโดรคาร์บอนที่สาหร่ายผลิตได้ทั้งหมด ไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมและที่ผนังเซลล์ชั้นนอกมีโครงสร้างเหมือนกัน แต่จะพบไฮโดรคาร์บอนสายยาวกว่าบริเวณผนังเซลล์ได้มากกว่า Metzger *et al.*, 1987 รายงานว่าพบโบโทรโอคอกคินสายยาวกว่า (C_{34} , C_{36}) ถูกสะสมอยู่บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอก และพบโบโทรโอคอกคินสายยาวกว่า (C_{30} , C_{31}) ถูกสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมเป็นต้น

3. วิธีสังเคราะห์ของไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race L

สาหร่าย *B. braunii* race L ผลิตไฮโดรคาร์บอนชนิดเดียวคือ tetraterpenoid ($C_{40}H_{78}$) หรือที่เรียกว่า lycopadienes โดยการสังเคราะห์ lycopadienes สันนิษฐานว่าเกิดจากการรวมกันของ two phytol units แบบ tail-to-tail แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการรีดักชัน (reduction) ของ lycopersene ไม่สามารถแยกได้ (Metzger and Casadevall, 1987) ทำให้ไม่สามารถทราบกระบวนการในการสังเคราะห์ lycopadiene ที่แน่นอนได้



ภาพที่ 5 กลไกการสังเคราะห์โบไตรโอคอกคีนและสควาลีน โดย *B. braunii* race B

ที่มา: Banerjee *et al.* (2002)

ตารางที่ 6 โครงสร้างไฮโดรคาร์บอนที่ผลิตโดยสาหร่าย *B braunii* race B

	Hydrocarbon	Structure
1	$C_{30}H_{50}$	
2	$C_{31}H_{52}$	
3	$C_{31}H_{52}$ (Wolficene)	
4	$C_{31}H_{52}$ (Isowolficene)	
5	$C_{32}H_{54}$	
6	$C_{32}H_{54}$ (Meijicocene/Braunicene)	
7	$C_{32}H_{54}$ (Isobraunicene)	
8	$C_{33}H_{56}$	
9	$C_{34}H_{58}$	
10	$C_{34}H_{58}$ (Isobotryococene)	
11	$C_{34}H_{58}$	
12	$C_{34}H_{58}$	
13	$C_{34}H_{58}$	
14	$C_{35}H_{60}$ (strain isolated from Darwin lake Australia)	Structure yet to be elucidated
15	$C_{36}H_{62}$ (Darwinene)	
16	$C_{37}H_{64}$	

ที่มา: Banerjee *et al.* (2002)

Ether lipid ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii*

สาหร่าย *B. braunii* นอกจากจะผลิตไฮโดรคาร์บอนขนาดใหญ่แล้ว ยังผลิตไฮโดรคาร์บอนขนาดเล็ก เป็นสารจำพวก ether lipid ซึ่ง ether lipid เกิดขึ้นอย่างมากมายในธรรมชาติโดยทั่วไป เป็น 1-O-alkyl และ 1-O-(1'-alkenyl) ที่คล้ายกับ triacylglycerols และ glycerophosphatides หรือเป็น dialkyldiglycerol isoprenoid tetraethers ในกลุ่มอาร์เคีย (archaea) (Mangold and Paltauf, 1983) โดย ether lipid จากสาหร่าย *B. braunii* ไม่ได้เกิดจากกลีเซอรอลเหมือนลิพิดที่พบจากสิ่งมีชีวิตทั่วไป แต่เป็นสารที่พบเฉพาะในสาหร่ายชนิดนี้เท่านั้น (Metzger and Largeau, 2005)

1. Ether lipid ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race A

Metzger and Casadevall (1991) รายงานว่าพบการผลิต ether lipid ประเภท alkadienyl-O-alkatrinyll ดังแสดงในภาพที่ 3 ในสาหร่าย *B. braunii* race A 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากทะเลสาบ Overjuyo ประเทศโบลิเวีย และทะเลสาบ Coat ar Herno ประเทศฝรั่งเศส ในระยะ exponential phase มีการผลิต ether lipid สูงสุด 42 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในระยะ stationary phase จะลดลงเหลือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

Metzger (1994) รายงานว่าสาหร่ายที่แยกได้จากทะเลสาบ Overjuyo ประเทศโบลิเวีย สามารถผลิต ether lipid พวกร phenoxy ซึ่งประกอบด้วย alkenylresorcinol เชื่อมกับสายของ alkadienes หรือ alkatetraenes ด้วยพันธะ phenoxy 1 หรือ 2 พันธะ สามารถผลิตได้ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนั้นยังพบว่า race A สามารถผลิต alkenyl-O-botryalyl ether ได้อีกด้วย แสดงดังภาพที่ 6

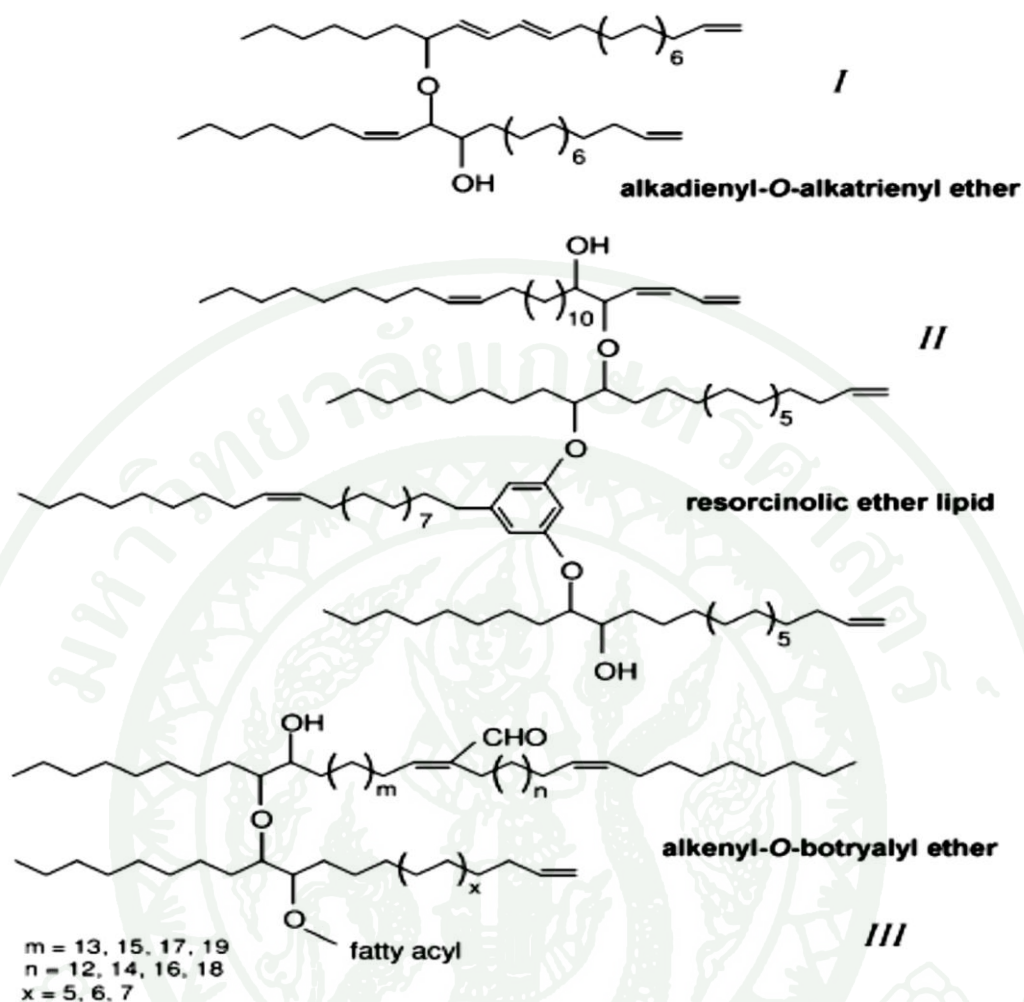
2. Ether lipid ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race B

Metzger *et al.* (2002) รายงานว่าพบการผลิต botryolin ในสาหร่ายที่แยกได้จากประเทศไต้หวันซึ่งเป็น triterpenoid triethers ที่มี tetramethylsqualene เป็นส่วนประกอบในโครงสร้าง และยังพบ braunixanthins ซึ่งเป็นสารพวกแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากประเทศญี่ปุ่น (Okada *et al.*, 1997) นอกจากนั้น Metzger (1999) ยังพบ alkylhydroquinol ซึ่ง ether bridge ตรงส่วนกลางของสาย เป็นอนุพันธ์ของ echinenone และ tetramethylsqualene ส่วนหน่วยที่

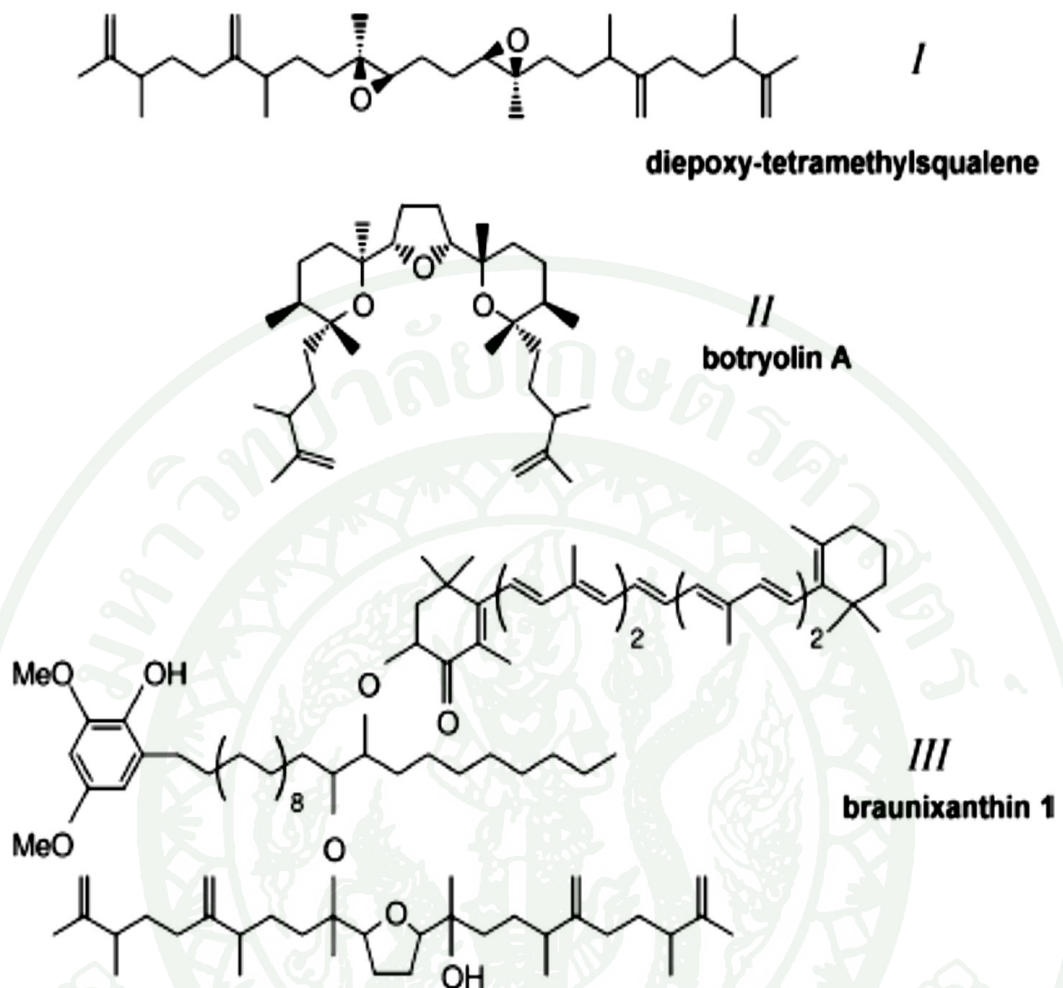
อยู่ถัดมาประกอบด้วยวงแหวน tetrahydrofuran (THF) จึงเป็นไปได้ว่ามาจากการเกิดโครงสร้างแบบไซคลิก (cyclisation) ของ diepoxy-tetramethylsqualene แสดงดังภาพที่ 7

3. Ether lipid ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race L

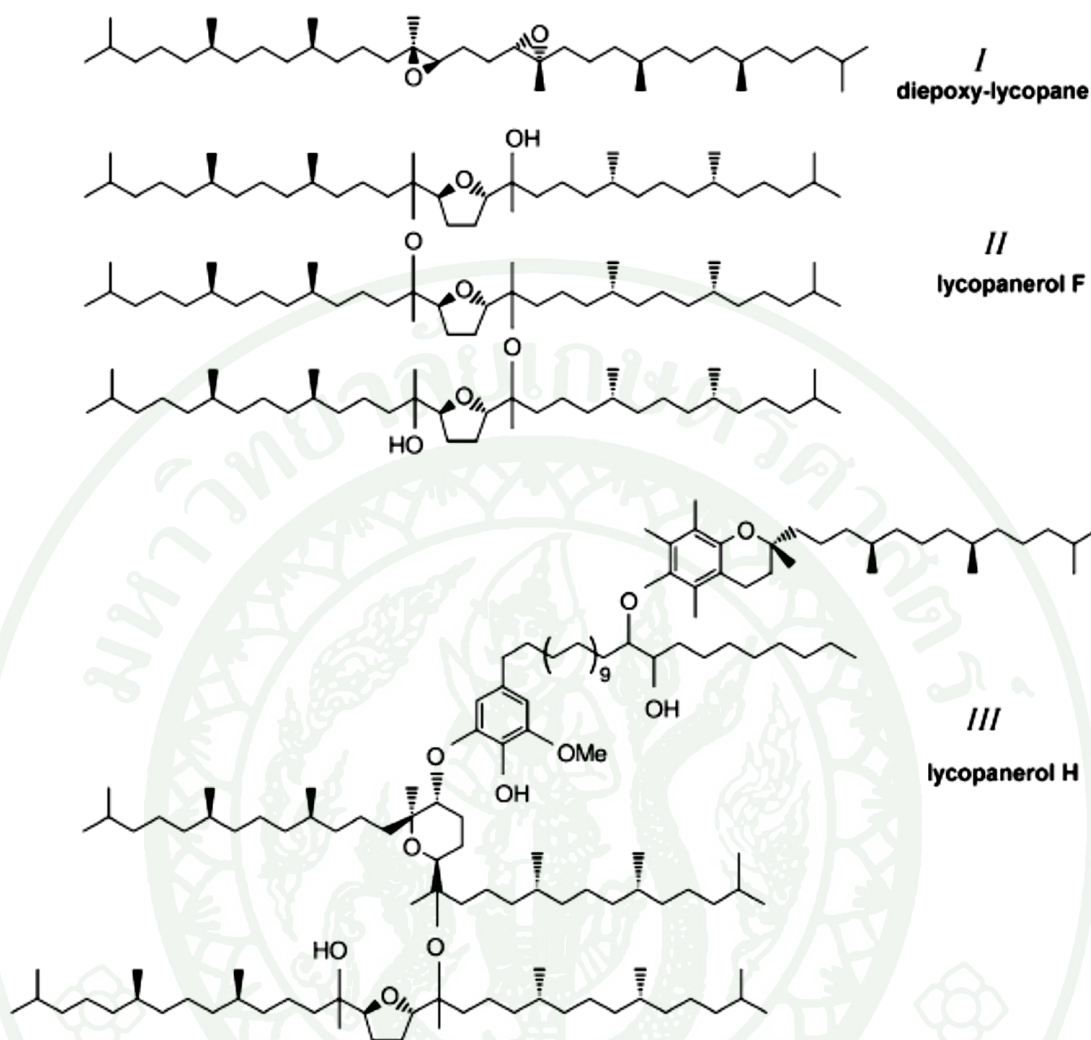
Ether lipid ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race L มีประมาณ 12 ชนิด พบ lycopanerols (lycopanerols F และ lycopanerols H) ในสาหร่ายสองสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศอินเดียและไอวอรีโคสต์ ซึ่งผลิตได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Metzger *et al.*, 2003) ยังพบว่าการผลิต diepoxy-lycopane ซึ่งคล้ายกับ diepoxy-tetramethylsqualene ที่ผลิตโดย race B แสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 6 ลักษณะของ ether lipids ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race A (I, III: Metzger and Casadevall, 1991, 1992; II: Metzger, 1994)



ภาพที่ 7 ลักษณะของ ether lipids ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race B (I: Metzger, 1999; II: Metzger *et al.*, 2002; III: Okada *et al.*, 1997)



ภาพที่ 8 ลักษณะของ ether lipids ที่ผลิตโดยสาหร่าย *B. braunii* race L (I: Metzger, 1999; II: Rager and Metzger, 2000; III: Metzger and Rager, 2002)

ระยะการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii*

Brown and Knights (1969) รายงานว่าระยะการเจริญและการสะสมไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* มี 3 ระยะดังนี้

1. ระยะเซลล์เจริญ (green active state)

สาหร่าย *B. braunii* ในระยะเซลล์มีการเจริญ พบได้ทั้งในธรรมชาติและที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างพบในธรรมชาติ เช่น เมืองแคมบริดจ์ ประเทศอังกฤษ เมืองกอดทิงเจน ประเทศเยอรมัน และเมืองออสติน ประเทศสหรัฐอเมริกา สาหร่ายจะมีลักษณะโคโลนีเหมือนกัน โดยทั่วไปมีโคโลนีสีเขียวขนาดเล็ก มีจำนวนเซลล์น้อยกว่า 15 เซลล์ บางโคโลนีมีเพียง 2 - 3 เซลล์ (Berkaloff *et al.*, 1984) มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนประมาณ 17 - 44 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Brown and Knights, 1969; Wake, 1976; Casadevall *et al.*, 1985) ประกอบด้วยโอเลฟิน ไดอิน และไตรอิน โดยมีคาร์บอนอะตอมเท่ากับ C_{17} - C_{31} องค์ประกอบหลักคือไดโอเลฟิน มีคาร์บอนอะตอม C_{29} , C_{31} และ C_{27} (Gelpi and Oro, 1968) สาหร่าย *B. braunii* สร้างและสะสมไฮโดรคาร์บอนไว้ที่ผนังเซลล์มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหลือสาหร่ายเก็บไว้ภายในเซลล์และบริเวณรอบ ๆ เซลล์ (Largeau *et al.*, 1980)

2. ระยะพัก (brown resting state)

สาหร่าย *B. braunii* ในระยะพักนี้พบได้ในธรรมชาติเท่านั้น โคโลนีมีสีน้ำตาลหรือสีส้ม ประกอบด้วย unusual isomeric triterpenoid botryococcene และไอโซโบไตรโอคอกกิน (isobotryococcene) ประมาณ 31 - 76 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีสูตรโมเลกุล $C_{34}H_{58}$ (Maxwell *et al.*, 1968; Brown and Knights, 1969; Wake and Hillen, 1980; Wake and Hillen, 1981) องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโบไตรโอคอกกินถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ระยะนี้จะไม่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลอง เนื่องจากโดยทั่วไปเมื่อสาหร่ายมีอายุมากจะมีการสะสมคาร์ทีนอยด์เพิ่มขึ้นเซลล์จึงเปลี่ยนเป็นสีแดง ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเซลล์ในระยะพัก แต่ยังคงมีไฮโดรคาร์บอนชนิดเดียวกับสาหร่ายที่มีโคโลนีสีเขียวในระยะเจริญ (Largeau *et al.*, 1980; Aaronson *et al.*, 1983)

3. ระยะที่เซลล์มีสีเขียวขนาดใหญ่ (Large green cells)

สาหร่าย *B. braunii* ในระยะนี้เซลล์อยู่รวมกันเป็นโคโลนีจะมีการเปลี่ยนแปลงทำให้มีรูปร่างไม่แน่นอนเกิดเป็นโคโลนีสีเขียวขนาดใหญ่ที่มีลักษณะคล้ายผลมัลเบอร์รี่ (mulberry) ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอนอะตอม C_{27} และ C_{29} (Wake, 1976) Brown and Knights (1969) รายงานว่าทำให้เกิดเซลล์ในระยะนี้ได้โดยนำโคโลนีสีน้ำตาลที่อยู่ในระยะพักที่เก็บได้จากเมือง Lonch Lomond และ Oakmere ประเทศอังกฤษ นำมาแยกให้บริสุทธิ์เพาะเลี้ยงในอาหาร modified Chu 13 ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิ ระยะเวลาให้แสง และความเข้มแสงคงที่ โคโลนีของสาหร่ายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีขนาดใหญ่ขึ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii*

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient composition)

การเติบโตของสาหร่ายโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงนั้นขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่าย ดังนั้นถ้าในอาหารที่เลี้ยงสาหร่ายมีความเข้มข้นของสารอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการ จะทำให้อัตราการเติบโตลดลง (ลัดดา, 2540)

ปริมาณและชนิดของธาตุอาหารเป็นปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย โดยทั่วไปธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) และธาตุอาหารรอง (micronutrients)

1.1 ธาตุอาหารหลัก (macronutrients) ประกอบด้วยธาตุต่อไปนี้

1.1.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย คาร์บอนที่สาหร่ายนำไปใช้ได้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ คาร์บอนอินทรีย์และคาร์บอนอนินทรีย์

1.1.1.1 คาร์บอนอินทรีย์

สาหร่ายจะใช้คาร์บอนอินทรีย์ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ไขมัน และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (Gladue, 1991) สารคาร์บอนอินทรีย์จะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแทนพลังงานที่ได้รับจากแสง (Ogbonna *et al.*, 1997) ดังนั้นในการเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้แสงเรียกว่า การเจริญแบบเฮเทโรโทรป (heterotroph)

1.1.1.2 คาร์บอนอนินทรีย์

สาหร่ายจะใช้คาร์บอนอนินทรีย์ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำ หรือในรูปของเกลือคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) และไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) การที่คาร์บอนจะอยู่ในรูปใดนั้นขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรดต่าง เช่น เมื่อพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 7 - 9 จะอยู่ในรูปของไบคาร์บอเนต พีเอชมากกว่า 9.5 จะอยู่ในรูปของเกลือคาร์บอเนต พีเอชประมาณ 5 คาร์บอนจะอยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ ribulose-1,5 biphosphate, carboxylase/oxygenase (rubisco) ทั้งนี้คาร์บอนอนินทรีย์จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยตรง ซึ่งจะอยู่ในรูปแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย (Kaplan *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 2004)

Wolf *et al.* (1985) พะาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* race B ในสภาวะที่ให้อากาศบริสุทธิ์และอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการให้อากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที่ พบว่าในสภาวะที่ให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์นั้นสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่ามีการเจริญเป็นสองเท่าภายใน 40 ชั่วโมง ขณะที่ในสภาวะที่ให้อากาศเพียงอย่างเดียวสาหร่ายมีการเจริญเติบโตช้าคือมีการเจริญเป็น 2 เท่าใน 6 วัน

Ranga *et al.* (2007) ได้ศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *B. braunii* LB-572, SAG 30.81, MCRC-Bb, N-836, CFTRI-Bb-1 และ CFTRI-Bb-2 โดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเพิ่มการเจริญของสาหร่ายทุกสายพันธุ์ ทำให้มีการผลิตเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dayananda *et al.* (2007) ที่ศึกษาผลของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* N-836 โดยให้คาร์บอนไดออกไซด์

ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเพิ่มการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย

1.1.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของสาหร่าย โดยมีบทบาทเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ สาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมันหรือแป้งมาแทน (วลัยลักษณ์, 2549) สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และก๊าซไนโตรเจน ไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ ได้แก่ เอมีน อามีน ยูเรีย และแอสพาราจีน เป็นต้น ไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ แกลิอแอมโมเนีย (NH_4^+) ไนเตรต (NO_3^-) และไนไตรต์ (NO_2^-) (ลัดดา, 2540)

Wolf *et al.* (1985) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* สายพันธุ์ B ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเพิ่มปริมาณ 1 และ 3 เท่าในอาหาร และเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมโพแทสเซียมไนเตรด พบว่าไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* โดยในอาหารที่ไม่เติมโพแทสเซียมไนเตรด สาหร่ายหยุดการเจริญภายใน 9 วัน และอาหารที่มีโพแทสเซียมไนเตรด 3 เท่า สาหร่ายมีการเจริญสูงสุดโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.7 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน

Vongprasert (1986) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในอาหาร Modified Chu 13 และ Kratz and Myers โดยอาหาร Kratz and Myers มีปริมาณโพแทสเซียมไนเตรดมากกว่าในอาหาร Modified Chu 13 ถึง 40 เท่า พบว่าสาหร่ายเจริญในอาหาร Kratz and Myers ได้เร็วกว่าโดยมีค่าการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 0.65 วัน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ส่วนใน Modified Chu 13 มีค่าการเจริญเป็น 2 เท่า เท่ากับ 1.75 วัน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

Lupi *et al.* (1994) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* UC58 ในอาหาร Modified Chu 13 ให้โอกาสผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 3 แหล่ง คือ โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ยูเรีย ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ไนโตรเจน และแอมโมเนียมคาร์บอเนต ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่าย *B. braunii* UC58 ผลิต exopolysaccharide (EPS) ได้สูงสุด 2.5 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยง

เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นศึกษาต่อโดยทดลองให้โพแทสเซียมไนเตรดความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.5, 2 และ 8 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรด 0.5 และ 2 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายมีการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน แต่ที่ระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรด 2 มิลลิโมลาร์ จะผลิต EPS สูงกว่า ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรด 8 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน และผลิต EPS สูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ดังนั้นการเลี้ยงสาหร่าย โดยให้โพแทสเซียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ จะเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต EPS มากที่สุด

Dayanada *et al.* (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตไฮโดรคาร์บอนและกรดไขมันของสาหร่าย *B. braunii* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* LB-572 และ SAG 30.81 ในอาหาร Modified Chu 13 ใช้แหล่งไนโตรเจน 5 แหล่ง คือ โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) แคลเซียมไนเตรด (CaNO_3) และยูเรีย (Urea, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) พบว่าสาหร่าย *B. braunii* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญ การผลิตไฮโดรคาร์บอนและกรดไขมันดีที่สุดในการที่ใช้โพแทสเซียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสาหร่าย *B. braunii* LB-572 มีค่าการเจริญ 12 กรัมต่อลิตร ผลิตไฮโดรคาร์บอน 32 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และผลิตกรดไขมันทั้งหมด 28 เปอร์เซ็นต์ (w/w) สาหร่าย *B. braunii* SAG 30.81 มีค่าการเจริญ 0.6 กรัมต่อลิตร ผลิตไฮโดรคาร์บอน 38 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และการผลิตกรดไขมันทั้งหมดอยู่ในช่วง 36 - 38 เปอร์เซ็นต์ (w/w)

1.1.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญ ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงานและกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก รวมทั้งยังทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยให้ค่าความเป็นกรดด่างคงที่ แม้นในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีปริมาณสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสสูงกว่าสารอนินทรีย์ฟอสฟอรัส แต่สาหร่ายต้องการใช้ฟอสฟอรัสในรูปสารอนินทรีย์มากกว่าสารอินทรีย์ ได้แก่ ฟอสฟอรัส และออร์โธฟอสเฟต หรือ ฟอสเฟต โดยอาศัยเอนไซม์ฟอสฟาเทสหรือฟอสโฟเอสทาเรสในปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณอาจสูงกว่าหรือต่ำกว่านี้ก็ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำ ระดับค่ากรด-ด่าง และปริมาณของธาตุอาหารชนิดอื่น ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม หรือแมกนีเซียม หากสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลเสียต่อการเจริญเติบโต คือปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์ เอ

RNA และ DNA จะลดลง แต่แป้งหรือคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนไปจากเดิม (ลัดดา, 2540; ยศวดี, 2547)

Casadevall *et al.* (1985) เเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในอาหาร Modified Chu 13 โดยให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารมีปริมาณฟอสเฟตต่าง ๆ กัน พบว่าในช่วงแรกของการเจริญปริมาณฟอสเฟตในอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากสาหร่ายจะเก็บไว้ในเซลล์ในรูปของ polyphosphate granules หลังจากนั้นสาหร่ายจะปล่อยฟอสเฟตออกมาอย่างต่อเนื่องมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ และจะหยุดปล่อยเมื่อสาหร่ายมีการเจริญเต็มที่ และเมื่อเพิ่มปริมาณฟอสเฟตเป็น 2 เท่า หรือลดปริมาณฟอสเฟตลง 10 เท่า พบว่าค่าการเจริญเป็น 2 เท่าของสาหร่ายไม่เปลี่ยนแปลงโดยมีค่าการเจริญเท่ากับ 2.3 วัน แต่สาหร่ายผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงที่สุด 33 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพิ่มการเจริญเป็น 2 เท่า

1.1.4 ซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด สาหร่ายส่วนใหญ่จะใช้ซัลเฟอร์ในรูปของซัลเฟต ซัลไฟต์ และซัลไฟด์ (วลัยลักษณ์, 2549)

Yang *et al.* (2004) ศึกษาผลของไบซัลไฟต์และซัลไฟต์ต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* ในอาหาร Modified Chu 13 จากการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีการเติมไบซัลไฟต์ในรูปของโซเดียมไบซัลไฟต์ (NaHSO_3) ปริมาณ 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิโมลต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิโมลต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย แต่ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลต่อลิตร มีผลในการยับยั้งการเจริญของสาหร่าย เช่นเดียวกับเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีการเติมซัลไฟต์ในรูปของโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ปริมาณ 0, 0.1, 0.8 และ 1.6 มิลลิโมลต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.8 มิลลิโมลต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย แต่ที่ความเข้มข้น 1.6 มิลลิโมลต่อลิตร มีผลในการยับยั้งการเจริญของสาหร่าย

1.1.5 โพแทสเซียมและแมกนีเซียม

โพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิดในสาหร่าย และมีผลในการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายบางชนิด (Wiessner, 1962) ส่วนแมกนีเซียมมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (ลัดดา, 2540)

1.1.6 แคลเซียม

แคลเซียมเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียว โดยมีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างโครงสร้างของสาหร่ายโดยเฉพาะในสาหร่ายทะเล และมีบทบาทในการสร้างผนังเซลล์ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (ลัดดา, 2540) ซึ่งปริมาณแคลเซียมที่พืชต้องการขึ้นอยู่กับปริมาณของธาตุอาหารชนิดอื่นด้วย เช่น แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี โคบอลต์ ทองแดง โมลิบดีนัม นิกเกิล อะลูมิเนียม โซเดียม โปรทเจน และตะกั่ว เป็นต้น

1.2 ธาตุอาหารรอง (Micronutrients)

เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการในปริมาณน้อย แต่สามารถช่วยให้สาหร่ายเจริญได้ดีขึ้น ซึ่งธาตุอาหารรองนี้ถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็นต่อเซลล์ เช่น เอนไซม์ และวิตามินต่าง ๆ เป็นต้น แบ่งได้เป็นธาตุอาหารรองอนินทรีย์ และธาตุอาหารรองอินทรีย์

1.2.1 ธาตุอาหารรองอนินทรีย์ (Inorganic micronutrients) ได้แก่

1.2.1.1 เหล็ก

เหล็กเป็นธาตุอาหารที่ช่วยในการดูดซึมไนโตรเจน และเป็นองค์ประกอบของรงควัตถุ ถ้าสาหร่ายขาดเหล็กจะมีผลต่อสรีระและการเจริญของสาหร่าย (Brock *et al.*, 1984) นอกจากนี้เหล็กยังเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เฟอร์ดอกซิน (ferredoxin) คตะเลส (catalase) อีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบของไซโตโครม (cytochrome) และพอไฟริน (porphyrins) (Warburg, 1948) เหล็กเป็นธาตุที่มีกตกตะกอนในสารละลาย ฉะนั้นจึงต้องใช้สารที่ป้องกันการตกตะกอนที่เรียกว่า คีเลเตอร์ หรือ Chelating agent ในอัตราส่วนคีเลเตอร์กับเหล็กเท่ากับ 1: 1 โมลาร์ เสมอ

1.2.1.2 โบรอน

เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายบางชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและไดอะตอม เป็นต้น

1.2.1.3 แมงกานีส

เป็นธาตุที่จำเป็นต่อสาหร่ายเซลล์เดียวหลายชนิด ซึ่งแมงกานีสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่าย โดย Wiessner (1962) ได้ทดลองเติมแมงกานีสลงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย พบว่ามีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญของสาหร่าย

1.2.1.4 สังกะสี

เป็นธาตุอาหารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง พบว่ามีผลต่อการเจริญของ *Stichococcus bacillaris* (Wiessner, 1962) ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายหลายชนิดจะมีสังกะสีอยู่ในความเข้มข้นประมาณ 0.01 - 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมี EDTA เป็นคีเลเตอร์ นอกจากนี้ Stegmann (1940) พบว่าเมื่อปริมาณสังกะสีลดลงจะทำให้การสร้างคลอโรฟิลล์ลดลง

1.2.1.5 ทองแดง

พบในเอนไซม์สำหรับกระบวนการออกซิเดชัน นอกจากนี้ทองแดงยังมีความสำคัญต่อกระบวนการหายใจ โดยพบว่าการหายใจลดลงเมื่อปริมาณทองแดงลดลง (Wiessner, 1962)

1.2.1.6 ซีลีกา

ซีลีกาเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นที่สุดของสาหร่ายจำพวกไดอะตอมเพื่อใช้ในการสร้างเปลือก ในขณะที่สาหร่ายชนิดอื่นไม่จำเป็นต้องใช้

1.2.2 ธาตุอาหารรองอินทรีย์ (Organic micronutrients)

ธาตุอาหารรองอินทรีย์แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ (ฤทัยรัตน์, 2548)

1.2.2.1 คาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลเดกซ์โตรส ความเข้มข้น 0.2- 0.5 เปอร์เซ็นต์ควรเติมหลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว เพราะน้ำตาลอาจจะเสื่อมสภาพได้

1.2.2.2 เกลืออินทรีย์หรือสารประกอบที่มีเกลืออินทรีย์อยู่ด้วย ได้แก่ เกลืออะซิเตรตต่าง ๆ นิยมใช้ความเข้มข้น 0.1 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในรูปของธาตุโซเดียม โปแตสเซียม

1.2.2.3 วิตามิน มี 3 ชนิด คือ วิตามิน บี 1 บี 12 และ บีรวม นิยมเติมในอาหารหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.2.2.4 อาหารเสริม ได้แก่ อาหารที่ช่วยการเจริญของสาหร่าย คือ เป็นสารเสริมการเจริญ (growth factor) ตัวอย่างเช่น อะเดนิน (adenine) ไคเนติน (kinetin) ทั้ง 2 ชนิดนี้ละลายในน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายได้ดีในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต อาหารเสริมอีก 2 ชนิดที่นิยมใช้คือ Gibberellic acid ละลายน้ำได้ดี และ Indole acetic acid (IAA) มีคุณสมบัติละลายในน้ำร้อนได้เล็กน้อยและสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงสว่าง

2. แสง

แสงเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งมีความสำคัญมากโดยเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง Richmond (1986) รายงานว่าเมื่อความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นการเติบโตของสาหร่ายจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยจะเพิ่มการสังเคราะห์ด้วยแสงและเร่งการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยจำกัดที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายด้วย เมื่อความเข้มแสงสูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการทำงานของเซลล์หรือที่เรียกว่า photoinhibition ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่ายและช่วงระยะเวลาที่รับแสง

Zhang and Kojima (1998) ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อขนาดโคโลนีของสาหร่าย *B. braunii* ในอาหาร Modified Chu 13 โดยใช้ bubble column photobioreactor โดยให้แสงที่ระดับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และ 10,000 ลักซ์ พบว่าสภาวะที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โคโลนีเริ่มต้นมีขนาดใหญ่ต่อมามีขนาดเล็กลง ส่วนในสภาวะที่ให้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ พบว่าโคโลนีเริ่มต้นมีขนาดเล็กและมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ต่อมา Kojima and Zhang (1999) ศึกษาผลของแสงต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* โดยเลี้ยงในอาหาร Modified Chu 13 โดยใช้ bubble column photobioreactor ให้ระดับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และ 10,000 ลักซ์ ทำการบดบังแสงให้สาหร่ายได้รับแสง 5 - 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในสภาวะที่ให้แสง 10,000 ลักซ์ ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายมีการเจริญสูงสุด มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 7 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร และสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ยศวดี (2547) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ที่แยกได้จากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในอาหาร Modified Chu 13 และ Kratz and Myers medium ที่ระดับความเข้มแสง 3,000 5,000 และ 10,000 ลักซ์ ให้ช่วงแสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ อัตรา 1 ลิตรต่อนาที่ พบว่าในสภาวะที่ให้ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ในอาหาร Modified Chu 13 สาหร่ายมีอัตราการเจริญสูงสุด โดยมี น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.52 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ต่อมา พวงผกา และ พิมพรรณ (2549) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในอาหาร Modified Chu 13 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ อัตรา 7 ลิตรต่อนาที่ ภายใต้ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ โดยให้ระยะเวลาในการให้แสงต่างกันที่ 12: 12, 16: 8, 24: 0 ชั่วโมง พบว่าภายใต้สภาวะที่ให้ แสงอย่างต่อเนื่อง 24: 0 ชั่วโมงนั้น สาหร่ายมีการเจริญดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.97 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 3.6 ต่อวัน ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากชุดที่ให้แสงสว่างแบบเป็นช่วง

3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงและการหายใจของสาหร่าย โดยอุณหภูมิของ สิ่งแวดล้อมสูงขึ้นอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการ เจริญ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงมากขึ้นกว่านี้อัตราการเจริญเติบโตจะลดลง แต่อุณหภูมิจะไม่มีผลต่อการ สังเคราะห์ด้วยแสงถ้าถูกจำกัดด้วยแสงหรือคาร์บอนไดออกไซด์ (Darley, 1982)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอยู่ระหว่าง 20 - 24 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ เหมาะสมอาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับชนิด สายพันธุ์ และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Kessler, 1985; Chelf, 1990)

4. พีเอช

ค่าพีเอชของสารละลายในอาหารมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการ เมตาบอลิซึมของสาหร่าย ทั้งยังมีบทบาทต่อการละลายของเกลือและสารประกอบเชิงซ้อนชนิด ต่าง ๆ ในสารละลาย ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือยับยั้งการเจริญของสาหร่ายได้ ใน ขณะเดียวกันค่าพีเอชยังส่งผลต่อการละลายของสารประกอบโลหะ โดยการเพิ่มพีเอชจะเป็นสาเหตุ

ให้สารประกอบโลหะที่เป็นธาตุอาหารจำเป็นบางชนิดตกตะกอน ดังนั้นสาหร่ายจึงอาจขาดธาตุอาหารที่จำเป็นบางตัวได้

ฟิเอนที่เป็นกลางพบว่าเหมาะสมสำหรับสาหร่ายขนาดเล็กมากที่สุด แต่บางสายพันธุ์ทนฟิเอนสูง เช่น *Spirulina platensis* ทนฟิเอน 9 (Hu *et al.*, 1998) หรือทนฟิเอนต่ำ เช่น *Chorococcum littorale* ทนฟิเอน 4 (Kodama *et al.*, 1993)

Dayananda *et al.* (2007) ศึกษาผลของฟิเอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* N-836 ในอาหาร Chu 13 ที่มีการปรับฟิเอนของอาหาร 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 พบว่าผลของฟิเอนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามที่ฟิเอน 7.5 สาหร่ายมีการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงที่สุด

การจัดการทดลอง Plackett and Burman design

Plackett and Burman (1946) ได้เสนอการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยประยุกต์ออกแบบการทดลองด้วยวิธีแฟกทอเรียล 2 ระดับ ในการวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าตอบสนองที่ต้องการจากปัจจัยจำนวนมาก และมีประโยชน์ในการคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

ในการทดลองที่มีตัวแปรหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัย จะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลองที่มีเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น ถ้าจัดสิ่งทดลองแบบ 2^n พบว่าถ้ามีปัจจัย 7 ปัจจัย จะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 128 สิ่งทดลอง ทำให้ในการทดลองใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงเป็นการยากที่จะทำการทดลองทั้ง 128 สิ่งทดลอง ดังนั้นแผนการทดลอง Plackett and Burman design จะใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือก (screening) ปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษา กล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น (Wu and Hamada, 2000)

การจัดการทดลองแบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดสิ่งทดลองแบบแฟกทอเรียล หรืออาจจัดให้เป็นแฟกทอเรียลบางส่วน ที่มีการจัดให้เป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) ใช้เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการพัฒนาสูตร หรือพัฒนากรรมวิธีการผลิตจาก 10 - 20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1 - 4 ปัจจัย โดยที่ไม่ต้องทำการทดลองจำนวนมาก สามารถลดจำนวนการทดลองได้โดยใช้

เทคนิคนี้ แต่การทดลองนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถศึกษาขอบเขตหรือชนิดของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวแปรได้ (Motola and Agharkar, 1992) วิธีนี้เหมาะที่จะใช้ในการทดลอง เพื่อคัดกรองปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติออก การจัดการทดลองจะใช้ 2^k factorial arrangement เป็นพื้นฐานโดยมีแบบแผนมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง

N	ปัจจัยที่ต้องกลั่นกรอง, k = N-1															
8	+	+	+	-	+	-	-									
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-					
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับสูง ซึ่งมีค่าเท่ากับ +1
 - หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับต่ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ -1
 N หมายถึง จำนวนสิ่งทดลอง (treatment)
 K หมายถึง จำนวนปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

ในการใช้ Plackett and Burman design ต้องกำหนดสิ่งทดลองแรกเป็นดังเมตริกแถวแรก จากนั้นสิ่งทดลองต่อไปกำหนดในลักษณะโครงสร้างวน (cyclic construction) กล่าวคือ นำรหัสสุดท้ายของ initial block ขึ้นมาลำดับหน้าสุด และวนไปจนครบ N-1 รอบ ส่วนสิ่งทดลองสุดท้ายเป็น added block คือใช้ระดับต่ำสุดทุกปัจจัย อย่างไรก็ตาม ในการวนอาจนำรหัสหน้าสุดมาต่อท้าย และวนไปจนครบ N-1 รอบได้เช่นกัน เพียงแต่ในการทดลองให้ใช้ระดับสูงหรือต่ำให้ถูกต้องตามแผนที่กำหนดหรือวางไว้เป็นสำคัญ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรอง
จำนวน 7 ปัจจัย โดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง

สิ่งทดลอง (Treatment)	ปัจจัยที่ต้องกลั่นกรอง (Factor)						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

ที่มา: คัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

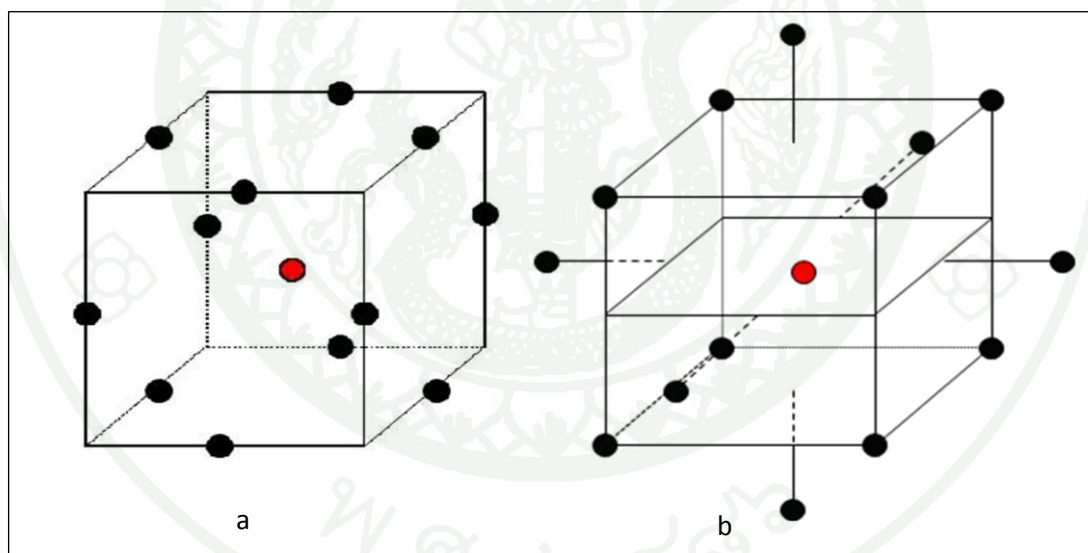
การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

Response Surface Methodology (RSM) เป็นการรวบรวมข้อมูลทางสถิติและเทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ เพื่อหาคุณลักษณะของคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า ตัวแปรตอบสนองหรือผลลัพธ์ โดยในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของผลลัพธ์กับปัจจัยการทดลอง จะต้องมีการวางแผน และออกแบบการทดลองให้เหมาะสมกับลักษณะของข้อมูลด้วย (Box *et al.*, 1978)

การออกแบบการทดลองเพื่อการปรับปรุงคุณภาพ (design of experiment: DOE) แต่ละกระบวนการผลิตนั้นจะมีจำนวนปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ ต้นทุนและคุณภาพของกระบวนการผลิต แต่ปัญหาก็คือจะสามารถหาจุดที่เหมาะสมของปัจจัยเหล่านั้นได้อย่างไร ดังนั้นการออกแบบการทดลองเป็นวิธีที่จะช่วยให้เราสามารถทำการทดลองและเก็บข้อมูลอย่างเป็นระบบ แล้วนำข้อมูลเหล่านั้นไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ ซึ่งจะทำได้ผลลัพธ์ที่เชื่อถือว่าควรจะต้องปรับตั้งปัจจัยต่าง ๆ อย่างไร เพื่อให้ได้กระบวนการทำงานมีประสิทธิภาพ ต้นทุนการ

ผลิตต่ำ และได้สินค้าคุณภาพดี นอกจากนี้การออกแบบการทดลองจะใช้เวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลองที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการลองผิดลองถูก

การออกแบบการทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมด้วยการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองที่อาศัยค่ากลางของข้อมูลจากระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อตัวแปรตอบสนองสูงสุด โดยนิยมออกแบบการทดลอง 2 วิธี คือ การทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD) และ Central Composite Design (CCD) โดยใช้การกระจายระดับของข้อมูลออกจากศูนย์กลางเพื่อศึกษาระดับของปัจจัยส่งผลต่อตัวแปรตอบสนองสูงสุด ลักษณะการวางตำแหน่งและการกระจายระดับของปัจจัย แสดงดังภาพที่ 9 เห็นได้ว่าการออกแบบการทดลองแบบ BBD นั้นจะเน้นที่จุดรอบ ๆ ค่ากลาง (center point) โดยไม่รวมค่าการกระจายในระดับแกน (star point) และค่าที่มุม (factorial point) ทำให้ค่าคงที่ได้ ไม่ครอบคลุมปลายสุดของระดับปัจจัย ดังนั้นการออกแบบการทดลองจึงได้รับความนิยมมากกว่า (Draper, 2006)



ภาพที่ 9 โมเดลแสดงการกระจายของปัจจัย

a คือ แผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD)

b คือ แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

ที่มา: Anonymous (2008)

การหาพื้นผิวตอบสนองนั้นมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) กับกลุ่มของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตอบสนองนั้น ๆ วิธีการดังกล่าวนี้ใช้การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) มาประยุกต์ในการหารูปแบบความสัมพันธ์ที่เรียกว่ารูปแบบพหุนาม (polynomial model) โดยทั่วไปรูปแบบของพื้นผิวตอบสนองจะพิจารณารูปแบบพหุนามลำดับที่ 1 (first order model) หรือลำดับที่ 2 (second order model) ส่วนการประมาณค่าพารามิเตอร์หรือสัมประสิทธิ์การถดถอยในรูปแบบดังกล่าวจะใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (นวลรัตน์, 2548; อนุวัตร, 2549)

รูปแบบพหุนามลำดับที่ 1 โดยทั่วไปมีการนำมาเฉพาะบางแผนการทดลองซึ่ง Khuri and Cornell (1987) ได้กล่าวไว้ คือการออกแบบเชิงแฟกทอเรียล 2 ระดับ (2^k factorial)

รูปแบบพหุนามลำดับที่ 2 มีแผนการทดลอง เช่น Central Composite Design, การออกแบบเชิงแฟกทอเรียล 3 ระดับ (3^k factorial) เป็นต้น ก็จะต้องมีระดับการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับ Khuri and Cornell (1987) ซึ่งรูปแบบพหุนามลำดับที่ 2 สำหรับ k ตัวแปรมีรูปแบบดังสมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ Y คือ ตัวแปรตอบสนอง

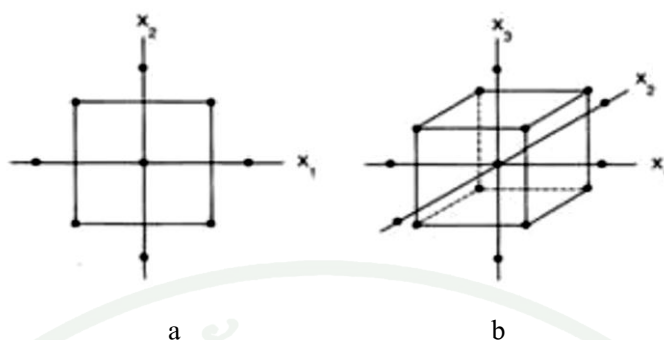
β คือ สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอย

x_i, x_j คือ ตัวแปรอิสระ

ϵ คือ ความคลาดเคลื่อน

แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

Central Composite Design (CCD) เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสม โดยทั่วไป CCD จะประกอบด้วย 2^k แฟกทอเรียลที่มี nf รัน ซึ่ง 2^k รันในแนวแกนหรือแนวรูปดาว และ nc รันที่จุดศูนย์กลาง แสดง CCD สำหรับ $k = 2$ และ $k = 3$ ปัจจัยแสดงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 Central Composite Design (CCD)

a สำหรับ $k = 2$ ปัจจัย

b สำหรับ $k = 3$ ปัจจัย

ที่มา: อิศรพงษ์ (2544)

CCD เป็นแผนการทดลองที่ดัดแปลงมาจากการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล ซึ่งเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับปัจจัย แต่เป็นการลดสิ่งทดลอง ขณะที่ CCD 3 ปัจจัย จะมีการทดลองทั้งหมด $2^3 + (2 \times 3 + 1)$ โดยที่เทอม $(2n+1)$ เป็นจุดพิเศษที่เพิ่มขึ้นมา และเพิ่มการทดลองที่จุดตรงกลางเป็น 3 จะได้เท่ากับ 17 สิ่งทดลอง (ไพโรจน์, 2544) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าของ code level ใน Central Composite Design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย

Treatment	Code level		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1.68	0	0
10	0	-1.68	0
11	0	0	-1.68
12	+1.68	0	0
13	0	+1.68	0
14	0	0	+1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

ที่มา: อนุวัตร (2549)

การวิเคราะห์การถดถอย

การวิเคราะห์การถดถอยเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป ในการวิเคราะห์การถดถอยจะเรียกตัวแปรที่สนใจว่าตัวแปรตาม (dependent variable) ส่วนตัวแปรที่แทนปัจจัยต่าง ๆ เรียกตัวแปรอิสระ (independent variable)

โดยเริ่มพิจารณาว่าตัวแปรตาม และตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กันในลักษณะใด สร้างรูปแบบการถดถอยเพื่อแทนลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร และสร้างสมการการถดถอย (regression equation) จากรูปแบบที่กำหนดนั้นโดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method) นอกจากนี้สมการการถดถอยที่สร้างขึ้นจะเป็นสมการที่เหมาะสมหรือไม่นั้น จะพิจารณาได้จากค่าสถิติ และการทดสอบสมมติฐานค่าสถิติที่ใช้ เช่น ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจปรับแล้ว (adjusted coefficient of determination; R^2_{adj}) ส่วนการทดสอบสมมติฐานเป็นการพิจารณาว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว มีอิทธิพลหรือมีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามหรือไม่ (นารัตน์, 2548)

ในการวิเคราะห์การถดถอยเพียง 1 ตัวแปร เราเรียกการวิเคราะห์การถดถอยนี้ว่า การวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis) ส่วนกรณีที่มีตัวแปรอิสระมากกว่า 1 ตัวแปรจะเรียกการวิเคราะห์การถดถอยนี้ว่า การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (multiple regression analysis)

ข้อกำหนดในการวิเคราะห์การถดถอย

- ก. ข้อมูลตัวแปรตามมีการแจกแจงแบบปกติ
- ข. ค่าเฉลี่ยของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าเท่ากับศูนย์
- ค. ความแปรปรวนของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าคงที่
- ง. ค่าคลาดเคลื่อนแต่ละตัวเป็นอิสระต่อกัน

1. การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ 1 ตัว และตัวแปรตาม รูปแบบสมการการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย แสดงดังสมการที่ 2 (วิรัช, 2546)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_1 x_1 + \varepsilon \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

2. การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

เป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลที่มีตัวแปรอิสระตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป ซึ่งเขียนสมการการถดถอยเชิงพหุคูณเมื่อมีตัวแปรอิสระ k ตัว แสดงดังสมการที่ 3 (วิรัช, 2546)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon \quad \text{.....สมการที่ 3}$$

3. การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการถดถอยเชิงพหุคูณ

เป็นการทดสอบว่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ($\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$) มีค่าเท่ากับ 0 หรือไม่ ซึ่งถ้าพบว่าอย่างน้อย 1 ค่า ที่ไม่เท่ากับ 0 แสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) และตัวแปรอิสระ ($X_1, X_2, \dots, X_k$)

สมมติฐานที่ใช้ทดสอบ คือ

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 0$$

(ตัวแปรหรือปัจจัยที่ศึกษาไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน)

$$H_1 : \beta_i \text{ อย่างน้อย 1 ค่าที่ไม่เท่ากับ 0}$$

(มีตัวแปรหรือปัจจัยอย่างน้อย 1 ตัว ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน)

ถ้ายอมรับ H_0 หมายความว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม

ถ้าปฏิเสธ H_0 หมายความว่าตัวแปรอิสระ X_i อย่างน้อย 1 ตัวที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม แสดงว่าสมการการถดถอยที่สร้างสามารถอธิบายการผันแปรของตัวแปรอิสระได้

การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

1. normal probability plot ของค่าคลาดเคลื่อน

เป็นวิธีการสร้างกราฟที่พล็อตค่าของข้อมูลจริงที่เกิดขึ้นกับค่าที่คาดไว้ (expected value) ถ้าข้อมูลตัวอย่างสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติแล้วค่าที่คาดไว้จะเป็นเส้นตรง และค่าจริงจะอยู่รอบ ๆ เส้นตรงนั้น โดยค่าที่อยู่เหนือเส้นตรงแสดงว่าค่าจริงมากกว่าค่าที่คาดไว้ ส่วนค่าที่อยู่ใต้เส้นตรง คือค่าจริงน้อยกว่าค่าที่คาดไว้ จึงใช้ในการตรวจสอบความคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่

2. การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

เป็นการตรวจสอบความเป็นอิสระหรือความคงที่ของความคลาดเคลื่อนโดยใช้กราฟการกระจาย (scatterplot) ระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า regression predicted value บนแกน X พบว่าจุดมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบและกระจายรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์ แสดงว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่

3. การทดสอบค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน

เป็นการตรวจสอบความเหมาะสมของค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกันโดยใช้กราฟระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า run number บนแกน X พบว่ากราฟมีการกระจายตัวแบบสุ่มรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์ และไม่มีลักษณะของแนวโน้มหรือมีรูปแบบอย่างชัดเจน แสดงว่าค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน

4. ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2)

เป็นสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์ที่ตัวแปรทำนายสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$R^2 = \frac{\text{ความผันแปรของ } Y \text{ เนื่องจากอิทธิพลของ } X_1, X_2, \dots, X_k}{\text{ความผันแปรทั้งหมด}}$$

Hu (1999) รายงานว่าสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก (ค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใด ๆ ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม แต่ที่ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์) เนื่องจากข้อเสียของสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ คือเมื่อตัวแปรอิสระเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า R^2 เพิ่มขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งในกรณีที่มีจำนวนข้อมูลในตัวอย่างมีน้อย การพิจารณาค่า R^2 อาจคลาดเคลื่อนเพราะค่า R^2 มีค่าสูงเกินความเป็นจริง การแก้ไขทำได้โดยใช้ค่า adjust R^2 แทน ซึ่งถ้า adjust R^2 มีค่ามากกว่า 64 เปอร์เซนต์ (>0.64) แสดงว่ารูปแบบสมการเหมาะสม

5. การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมโดยการหาค่าเบี่ยงเบนของข้อมูล

การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมซึ่งเป็นการเปรียบเทียบของข้อมูลที่ได้จากการทดลองกับข้อมูลที่ได้จากการทำนาย โดยการหาค่าเบี่ยงเบนระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลองและข้อมูลที่ได้จากการทำนาย เขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$\text{ค่าเบี่ยงเบน Error (\%)} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการทดลอง} - \text{ค่าที่ได้จากการทำนาย}}{\text{ค่าที่ได้จากการทำนาย}} \times 100$$

การเลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุด

ในการวิจัยเชิงปริมาณตัวแปรอิสระที่นำมาศึกษาจะมีหลายตัวแปร สมการการถดถอยที่เหมาะสมควรเป็นสมการที่มีตัวแปรอิสระน้อยที่สุด และอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามได้ดีที่สุด ดังนั้นเมื่อมีตัวแปรอิสระหลายตัวจึงควรเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญ การเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญจะทำได้ด้วยวิธีการเลือกสมการการถดถอยแบบต่าง ๆ ซึ่งวิธีการเลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุดที่ใช้กันมากได้แก่ วิธีพิจารณาทุกสมการ (all possible regression) วิธีลดตัวแปรอิสระ (backward elimination procedure) วิธีเพิ่มตัวแปรอิสระ (forward selection procedure) และวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise procedure) (นวรรตน์, 2548)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

สำหรับ *B. braunii* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำจืด เช่น เชื้อน อ่างเก็บน้ำ สวนสาธารณะ บ่อน้ำ เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างน้ำทั่วทุกภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และ ภาคใต้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข)

- 2.1 Krate and Myers (Gelpi *et al.*, 1970)
- 2.2 Modified Chu 13 (Largeau *et al.*, 1980)
- 2.3 Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989)
- 2.4 Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013)
- 2.5 AF-6 (Kato, 1982)
- 2.6 BG 11 (Vonshak, 1986)
- 2.7 BBM (Kanz and Bold, 1969)
- 2.8 NS III (Payer, 1971)

3. สารเคมี

- 3.1 Methanol
- 3.2 Petroleum ether
- 3.3 6% sulfuric acid
- 3.4 Hexane
- 3.5 กรดไขมันมาตรฐาน
- 3.6 สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาตรฐาน

4. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, Japan)
- 4.2 เครื่องแก้ว เช่น Petri dish, หลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร, Teflon coated screw cap test tube ขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร, ปิเปตต์แก้ว, หลอดทดลองรูปตัวแอล (Pyrex, USA)
- 4.3 ลูบิเย้เชื้อและตะเกียงเบนเสน
- 4.4 อ่างแก้ว
- 4.5 กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus, Japan)
- 4.6 ถังบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
- 4.7 เครื่องปั๊มอากาศ
- 4.8 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature gradient incubator Model TN-3, Toyo, Kagaku Sangyo Co., LTD., Tokyo, Japan)
- 4.9 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Satorius AG Göttingen Model LC621S, Germany)
- 4.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorious, USA)
- 4.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Labofuge 200, Hereaus, Germany)
- 4.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงคลื่นยูวี (UV-visible Spectrophotometer, UV - PharmaSpec 1700, Shimadzu, Japan)
- 4.13 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH meter ORION, Model SA520, USA)
- 4.14 ชุดกรอง (membrane filter) และเยื่อกรอง (nitrocellulose membrane filter, Whatman)
- 4.15 ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)
- 4.16 ตู้บ่มเชื้อ (Low temperature incubator, Precision 815, USA)
- 4.17 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven, Memmert, Germany)
- 4.18 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 4.19 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, TOMY SS-325, TOMY SEIKO CO., LTD, Japan)
- 4.20 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแบบแคปิลลารี (Capillary, (GC-14B, Shimadzu, Japan)
- 4.21 Magnetic bar และ magnetic stirrer (Framo[®] Gerätetechnik D-7821, France)
- 4.22 Vortex mixer (Vortexgenie 2TM Model 6-560E, Genie Scientific Industries, INC., USA)

วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกลำห่วย *B. braunii* ที่ผลิตไฮโดรคาร์บอน

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจืด เช่น เขื่อน อ่างเก็บน้ำ สวนสาธารณะ บ่อน้ำ เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างทั่วทุกภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคกลาง และภาคใต้ ใช้ถุงพลาสติกที่มีขนาด 20 ไมโครเมตร

1.2 การแยกลำห่วย *B. braunii* จากตัวอย่างน้ำ

นำตัวอย่างน้ำมาแยกลำห่วย *B. braunii* ด้วยวิธี micropipette washing method โดยใช้ คาปิลลารีปิเปต (capillary pipette) ดึงโคโลนีของ *B. braunii* ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ แล้วโคโลนีด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลาย ๆ ครั้ง (Stein, 1973) จากนั้นถ่ายลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร AF-6 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง

1.3 การคัดเลือกลำห่วยปฐมภูมิ (Primary screening)

นำลำห่วยที่แยกได้จากข้อ 1.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว AF-6 medium ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน แล้วเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอน

1.4 การคัดเลือกลำห่วยทุติยภูมิ (Secondary screening)

นำลำห่วยไฮโซเลตที่ได้จากการคัดเลือกลำห่วยปฐมภูมิมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว AF-6 medium ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิดเท่ากับ

16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอน แล้วคัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการเจริญและผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

ศึกษาสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *B. braunii* ที่คัดเลือกได้ เพื่อศึกษาเบื้องต้นว่าเซลล์สาหร่ายมีการสะสมไฮโดรคาร์บอน โดยการย้อมเซลล์ด้วยสี Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one) ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus, Japan) เพื่อตรวจสอบไฮโดรคาร์บอนของสาหร่ายดังกล่าว

ทำการเตรียมสารละลาย Nile red ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำไปละลายในเอทานอล เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไม่ให้โดนแสง ส่วนการย้อมสีทำได้ดังนี้ หยด cell suspension ของสาหร่ายลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด จากนั้นหยดสี Nile red ที่เตรียมไว้ลงไปอีก 1 หยด ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อตรวจสอบการเรืองแสงของไฮโดรคาร์บอนซึ่งสะสมอยู่ในเซลล์

2. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอน

นำสาหร่าย *B. braunii* ที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นสุดท้ายมาทำการศึกษหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบอโตโทรฟิกในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรต่าง ๆ ทั้งหมด 8 สูตร ได้แก่ Krat and Myers (Gelpi *et al.*, 1970), Modified Chu 13 (Largeau *et al.*, 1980), Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989), Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013), AF-6 (Kato, 1982), BG 11 (Vonshak, 1986), BBM (Kanz and Bold, 1969) และ NS III (Payer, 1971) ในหลอดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ปริมาตรของอาหาร 150 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน แล้วเก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์การเจริญ และปริมาณของไฮโดรคาร์บอน

3. การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนโดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design

การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design (N=8) (Plackett and Burman, 1946) เพื่อทำการถดถอยปัจจัยทั้งหมด 7 ปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต (NaNO_3) ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต (Fe-citrate) พีเอช (pH) ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และความเข้มของแสง (Light intensity) ในแต่ละปัจจัยจะศึกษา 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ และระดับสูง ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งในการศึกษานี้มีการทดลองทั้งหมด 8 การทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 32 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 4 วัน มาวิเคราะห์การเจริญ วิเคราะห์คลอโรฟิลล์ และปริมาณไฮโดรคาร์บอน จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS แล้วคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอน เพื่อนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนต่อไป

ตารางที่ 10 ระดับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design

Factor	Unit	Code	Low level (-)	High level (+)
ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต	มิลลิกรัมต่อลิตร	X_1	120	160
ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	มิลลิกรัมต่อลิตร	X_2	5	15
ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต	มิลลิกรัมต่อลิตร	X_3	1	3
พีเอช		X_4	6	8
ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต	เปอร์เซ็นต์	X_5	0	0.5
ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์	เปอร์เซ็นต์	X_6	0	3
ความเข้มของแสง	ลักซ์	X_7	2,000	4,000

ตารางที่ 11 การจัดการทดลอง Placket and Burman design ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรอง จำนวน 7 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii*

Treatment	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design

จากการกลั่นกรองปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยใช้การจัดการทดลอง Placket and Burman Design ตามการทดลองในข้อ 3 ทำการศึกษาต่อโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยในแต่ละปัจจัยจะศึกษา 5 ระดับ ดังตารางที่ 11 ในหลอดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขั้วเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 32 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 4 วัน มาทำการวิเคราะห์การเจริญ คลอโรฟิลล์ และปริมาณไฮโดรคาร์บอน จากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) สร้างสมการลำดับที่ 2 เพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าคุณภาพกับปัจจัยที่ศึกษา เลือกแบบจำลองที่มีระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซนต์ มาสร้างกราฟ Contour plot เพื่อหาจุดที่เหมาะสมเป็นสถานะที่มีการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงที่สุด

4.1 วิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง

แผนการทดลองสำหรับการหาพื้นที่ตอบสนองมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนกับกลุ่มของปัจจัยที่ศึกษา ด้วยวิธีออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design ที่มี 3 ปัจจัย ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ

4.1.1 จำนวนจุดของ factorial point มีจำนวนเท่ากับ 2^3 โดยมีปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย ทำการทดลอง 2 ระดับ ซึ่งใช้สัญลักษณ์ -1 แทนระดับต่ำ และ +1 แทนระดับสูง ดังนั้นการทดลองสำหรับ factorial point สามารถเขียนสัญลักษณ์ได้ดังนี้

$$(X_1, X_2, X_3) = (\pm 1, \pm 1, \pm 1)$$

4.1.2 จำนวนจุดของ center point (n_0) จะต้องมีการทำซ้ำมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อคำนวณหา pure error ในการวิเคราะห์การทดสอบความเหมาะสมของรูปแบบการทดลองสำหรับ center point สามารถเขียนสัญลักษณ์ได้ดังนี้

$$(X_1, X_2, X_3) = (0, 0, 0)$$

4.1.3 จำนวนจุดของ star point มีจำนวนเท่ากับ 2 (3) โดยแต่ละจุดห่างจาก center point ด้วยระยะเท่ากันคือระยะ α โดย $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$ เมื่อศึกษา 3 ปัจจัยจึงมีค่าเท่ากับ $\alpha = \pm 1.68$ การทดลองสำหรับ star point สามารถเขียนสัญลักษณ์ได้ดังนี้

$$(X_1, X_2, X_3) = (\pm 1.68, \pm 1.68, \pm 1.68)$$

สามารถออกแบบจำนวนชุดการทดลองได้จาก $2^k + 2k + n_0$ เมื่อ k คือ จำนวนตัวแปรที่ต้องการศึกษา และ n_0 คือ จำนวนซ้ำของการทดลองที่จุดศูนย์กลาง (center point) ดังนั้นเมื่อศึกษา 3 ปัจจัย จึงเท่ากับ $2^3 + 2(3) + 3$ สามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 17 การทดลอง ซึ่งแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 13

นำสาหร่าย *B. braunii* มาศึกษาปัจจัยร่วมที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอน ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต พีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

ในการศึกษานี้ได้ใช้รูปแบบการทดลองแบบ Central Composite Design โดยแบ่งปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$ ซึ่งสามารถกำหนดค่าของปัจจัยต่าง ๆ ได้ดังนี้ คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต 0.32, 1, 2, 3, และ 3.68 มิลลิกรัม พีเอช 5.32, 6, 7, 8, และ 8.68 ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 0, 0.8, 2, 3.2 และ 4.016 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 12

การกำหนดค่าของระดับแต่ละปัจจัยสามารถกำหนดได้จากสูตร

$$X_i = \frac{A_i - A_0}{\Delta A}$$

เมื่อ	X_i	คือ code ของระดับปัจจัย
	A_i	คือ ค่าระดับที่แท้จริงของปัจจัย (true level)
	A_0	คือ ค่าเฉลี่ยของระดับปัจจัย (average)
	ΔA	คือ ค่าช่วงกลางของระดับปัจจัย (middle) คิดจาก (ค่าสูงสุด - ค่าต่ำสุด) / 2

ตารางที่ 12 การกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาโดยวิธี Central Composite Design

Factor	Unit	Code	Level				
			-1.68	-1	0	+1	+1.68
ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต	มิลลิกรัมต่อลิตร	X_1	0.32	1	2	3	3.68
พีเอช		X_2	5.32	6	7	8	8.68
ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์	เปอร์เซ็นต์	X_3	0	0.8	2	3.2	4.0

ตารางที่ 13 แบบการทดลองในการศึกษาการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* โดยใช้
Central Composite Design

Treatment	X ₁	X ₂	X ₃	Fe-citrate	pH	CO ₂	
1	-1	-1	-1	1	6	0.8	
2	-1	-1	+1	1	6	3.2	
3	-1	+1	-1	1	8	0.8	
4	-1	+1	+1	1	8	3.2	factorial
5	+1	-1	-1	3	6	0.8	point
6	+1	-1	+1	3	6	3.2	
7	+1	+1	-1	3	8	0.8	
8	+1	+1	+1	3	8	3.2	
9	-1.68	0	0	0.32	7	2	
10	0	-1.68	0	2	5.32	2	
11	0	0	-1.68	2	7	0	star
12	+1.68	0	0	3.68	7	2	point
13	0	+1.68	0	2	8.68	2	
14	0	0	+1.68	2	7	4.0	
15	0	0	0	2	7	2	center
16	0	0	0	2	7	2	point
17	0	0	0	2	7	2	

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในอาหาร โดยทำการเพาะเลี้ยงตามแบบการทดลองที่ได้
ออกแบบไว้ทั้ง 17 การทดลอง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 4 วัน ของการทดลอง และนำไป
วิเคราะห์การเจริญ การผลิตไฮโดรคาร์บอน ตามวิธีการในข้อ 5

นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้การหาสมการการถดถอยเชิงพหุคูณ
เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน ของปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้ง
3 ปัจจัย โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.5 for windows ตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองโดย
ทดสอบการแจกแจงแบบปกติ ทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน
ทดสอบค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน แล้วนำแบบจำลองที่ได้ไป

ทำนายค่าของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยใช้การหาพื้นที่ผิวตอบสนองด้วยโปรแกรม Design - Expert 7.0

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 การวิเคราะห์การเจริญ

การวิเคราะห์การเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-visible Spectrophotometer, UV-PharmaSpec 1700, Shimadzu, Japan) โดยใช้ น้ำกลั่น ในการตั้งค่า blank และเจือจางตัวอย่าง นำค่า OD_{600} ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นเซลล์แห้ง หน่วยกรัมต่อลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5.2 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ทำได้โดยการสกัดคลอโรฟิลล์จากสาหร่าย *B. braunii* โดยใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lichtenthaler (1987) เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างสาหร่าย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดชนิดฝาเกลียวเทฟลอนขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร จากนั้นเติม เมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-visible Spectrophotometer, UV-PharmaSpec 1700, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร (OD_{665})

5.3 การวิเคราะห์หาสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

การวิเคราะห์หาสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทำได้โดยการสกัดไฮโดรคาร์บอนจากสาหร่าย *B. braunii* โดยใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sawayama *et al.* (1992) และ Maxwell *et al.* (1968) เริ่มจากนำเซลล์สาหร่าย *B. braunii* กรองผ่านกระดาษกรอง GLASS MICROFIBRE FILTERS (GF/F) นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาสกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยสารละลาย hexane ในเครื่อง sonicator เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้เป็นเวลา

ข้ามคืน จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปบรรจุในหลอดทดลองที่ได้ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว นำไปประเหยภายใต้ไอของไนโตรเจน เพื่อให้แห้งอย่างสมบูรณ์ ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำสารสกัดไฮโดรคาร์บอนที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรคาร์บอนด้วยเครื่อง GC

นำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแบบคาปิลลารี (capillary gas chromatography; GC-14B, Shimadzu, Japan) ที่มีการบันทึกข้อมูลด้วยเครื่องบันทึกผล integrator (C-R6A Chromatopac, Shimadzu) ประกอบกับบริเวณที่ฉีดมี split injector และใช้ระบบตรวจแบบ flame ionization detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิดคาปิลลารีที่ทำด้วย fused silica megabore column ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.540 มิลลิเมตร เคลือบภายในด้วยฟิล์มหนา 1 ไมโครเมตร ซึ่งประกอบด้วยสาร cyanopropyl 25 เปอร์เซนต์ phenyl 25 เปอร์เซนต์ methylsiloxane 50 เปอร์เซนต์ (Durabond 225, J&W Scientific, CA, USA) อุณหภูมิคอลัมน์ที่ใช้งานเท่ากับ 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ injector และ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 1 ไมโครลิตร มีอัตราการแบ่งตัวอย่าง (split rates) เท่ากับ 100:1 ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพา (carrier gas) และปรับอัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 40 มิลลิตรต่อนาที

ผลและวิจารณ์

1. การแยกและคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* ที่ผลิตไฮโดรคาร์บอน

1.1 การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจืด เช่น เขื่อน อ่างเก็บน้ำ สวนสาธารณะ บ่อน้ำ เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างน้ำทั่วทุกภาคของประเทศไทยได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคกลาง และภาคใต้ รวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง แสดงข้อมูลดังตารางที่ 14 พบสาหร่าย *B. braunii* ใน 74 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างน้ำแต่ละจุดมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันออกไป แสดงดังตารางที่ 15 ในจุดที่พบสาหร่าย *B. braunii* ที่อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 26.2 - 34.7 องศาเซลเซียส พีเอช 5.90 - 9.35 ความเค็ม 0 - 3 เปอร์เซ็นต์ และ conductivity 0.033 - 4.090 ms/cm แสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 14 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างน้ำในจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
1	D01-1	สำนักงานทองเที่ยวโรงเรียนจปร. จุดที่ 1	นครนายก	-	N 14°16'56.5" E 101°10'18.9"	SE 552.67 m
2	D01-2	สำนักงานทองเที่ยวโรงเรียนจปร. จุดที่ 2	นครนายก	-	N 14°16'56.5" E 101°10'18.9"	SE 552.67 m
3	D02	สำนักงานทองเที่ยวโรงเรียนจปร.	นครนายก	-	N 14°16'41.5" E 101°10'52.6"	SE 553.52 m
4	D03	อ่างเก็บน้ำคลองโสด	นครนายก	การเกษตร	N 14°17'11.4" E 101°11'30.1"	SE 553.17 m
5	D04-1	บ่อน้ำบาดน้ำเสียโรงเรียนจปร. จุดที่ 1	นครนายก	-	N 14°17'02.4" E 101°10'46.9"	SE 552.87 m
6	D04-2	บ่อน้ำบาดน้ำเสียโรงเรียนจปร. จุดที่ 2	นครนายก	-	N 14°17'02.4" E 101°10'46.9"	SE 552.87 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
7	D05	เขื่อนขุนด่านปราการชล	นครนายก	การเกษตร	N 14°18'54.3" E 101°19'24.7"	SE 556.58 m
8	D06	อ่างเก็บน้ำจักรพงษ์ (เขานี้ไต้) จุดที่ 1	ปราจีนบุรี	การเกษตร	N 14°08'55.0" E 101°24'17.7"	SE 576.98 m
9	D07	อ่างเก็บน้ำจักรพงษ์ (เขานี้ไต้) จุดที่ 2	ปราจีนบุรี	การเกษตร	N 14°09'16.8" E 101°24'21.4"	SE 576.43 m
10	D08	สวนกบินทร์เฉลิมราชย์ (หนองปลาแขยง)	ปราจีนบุรี	พักผ่อนหย่อนใจ	N 13°59'13.3" E 101°44'53.0"	SE 610.11 m
11	D09	โครงการขุดลอกหนองสระหิน	สระแก้ว	การเกษตร	N 13°59'16.7" E 102°26'48.9"	SE 666.05 m
12	D10	อ่างเก็บน้ำบ้านห้วยชัน	สระแก้ว	การเกษตร	N 13°59'16.7" E 102°26'03.3"	SE 649.88 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
13	D11	อ่างเก็บน้ำพระปรง	สระแก้ว	การเกษตร	N 13°59'50.9" E 102°25'22.0"	SE 647.54 m
14	D12	สระน้ำ ต.ท่าแขก	สระแก้ว	การเกษตร	N 13°54'2.1" E 102°05'47.9"	SE 636.63 m
15	D13	อ่างเก็บน้ำท่ากะบาก	สระแก้ว	การเกษตร	N 13°58'21.5" E 102°15'39.8"	SE 640.09 m
16	D14	อ่างเก็บน้ำห้วยยาง ต.ทับพระราบ อ.ตาพระยา	สระแก้ว	การเกษตร	N 14°00'48.4" E 102°38'41.5"	SE 659.99 m
17	D15	เขื่อนลำนางรอง	บุรีรัมย์	การเกษตร	N 14°17'57.4" E 102°45'36.4"	SE 642.48 m
18	D16	อ่างเก็บน้ำคลองมะนาว	บุรีรัมย์	การเกษตร	N 14°17'55.6" E 102°44'48.7"	SE 641.63 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
19	D17	แหล่งน้ำเพื่อการดับเพลิง อ.นางรอง	บุรีรัมย์	อุปโภค	N 14°37'56.3" E 102°49'50.6"	SE 619.20 m
20	D18	ห้วยเสรง	สุรินทร์	การเกษตร	N 14°48'48.3" E 103°29'35.1"	SE 654.70 m
21	D19	อ่างเก็บน้ำอำปี้ล	สุรินทร์	การเกษตร	N 14°46'03.0" E 103°33'05.1"	SE 662.76 m
22	D20	บ้านสองชั้น	บุรีรัมย์	การเกษตร	N 14°53'29.4" E 103°33'34.9"	SE 627.92 m
23	D21	อ่างเก็บน้ำห้วยตลาด	บุรีรัมย์	การเกษตร	N 14°52'28.2" E 103°04'01.7"	SE 617.04 m
24	T01	สถานีสูบน้ำบางพระ	ชลบุรี	อุปโภค บริโภค	N 13°13'16.4" E 100°58'09.8"	S 653.33 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
25	T02	อ่างเก็บน้ำหนองค้อ	ชลบุรี	อุปโภค บริโภค	N 13°08'29.7" E 101°01'52.5"	S 663.86 m
26	T03	อ่างเก็บน้ำหนองปลาไหล	ชลบุรี	อุปโภค บริโภค	N 12°56'12.3" E 101°14'23.8"	S 692.87 m
27	J1	อ่างเก็บน้ำดอกกราย	ระยอง	อุปโภค บริโภค	No data	No data
28	J2	อ่างเก็บน้ำมาบประชัน	ระยอง	อุปโภค บริโภค	No data	No data
29	J4	อ่างเก็บน้ำห้วยสะพาน	ชลบุรี	อุปโภค บริโภค	No data	No data
30	DU01	โรงงานน้ำตาลสุพรรณบุรี อ.สามชุก	สุพรรณบุรี	การเกษตร	N 14°42'56.8" E 100°06'22.0"	SW 105.32 m
31	DU02	บึงระหาร อ.สามชุก	สุพรรณบุรี	การเกษตร	N 14°45'10.6" E 100°06'03.6"	SW 104.15 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
32	DU03	บึงฉวาก	สุพรรณบุรี	การเกษตร	N 14°54'11.0" E 100°03'36.4"	W 103.17 m
33	DU04	วัดหนองกระทุ่ม อ.เดิมบางนางบวช	สุพรรณบุรี	-	N 14°52'23.7" E 099°51'12.8	W 125.57 m
34	DU05	เขื่อนกระเสียว อ.ด่านช้าง	สุพรรณบุรี	พักผ่อนหย่อนใจ	N 14°50'20.1" E 099°40'05.4"	W 145.87 m
35	DU06	อ่างเก็บน้ำห้วยเสลา	สุพรรณบุรี	พักผ่อนหย่อนใจ	N 15°32'38.1" E 099°26'50.0"	W 172.88 m
36	DU07	อุทยานสวรรค์	สุพรรณบุรี	พักผ่อนหย่อนใจ	N 15°41'57.8" E 100°07'20.9"	NW 113.91 m
37	DU08	เขื่อนวังรอ อ.เมือง	สุพรรณบุรี	การเกษตร	N 15°29'56.5" E 099°56'58.7"	W 120.09 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
38	DU09	บึงบอระเพ็ด	อุทัยธานี	พักผ่อนหย่อนใจ	N 15°42'34.7" E 100°10'14.4"	NW 110.59 m
39	DU10	อ่างเก็บน้ำซับตะเคียน อ.ร้านารายณ์	ลพบุรี	การเกษตร	N 15°06'46.5" E 100°59'39.7"	W 37.00 m
40	B03	อ่างเก็บน้ำเขาเต่า อ.หัวหิน	ประจวบคีรีขันธ์	อุปโภค บริโภค	N 12°27'30.0" E 099°57'11.1"	N 112.89 m
41	B04	โครงการพระราชดำรินองใหญ่ อ.เมือง	ชุมพร	การเกษตร	N 10°32'38.8" E 099°11'36.1"	SW 138.99 m
42	B05	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด สุราษฎร์ธานี	สุราษฎร์ธานี	วิจัยและพัฒนา ประมงน้ำจืด	N 09°03'39.5" E 099°13'13.3"	S 296.11 m
43	B06	เขื่อนรัชชประภา	สุราษฎร์ธานี	การเกษตร	N 08°58'32.7" E 098°49'21.8"	S 315.87 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
44	B07	ทางเข้าเขื่อนรัชชประภา อ.บ้านตาขุน	สุราษฎร์ธานี	การเกษตร	N 08°56'04.6" E 098°52'14.1"	S 318.67 m
45	B08	อ่างเก็บน้ำบ้านบางทรายขาว	สุราษฎร์ธานี	อุปโภค บริโภค และการเกษตร	N 08°44'07.9" E 098°47'28.6"	S 342.27 m
46	B09	ขุนเหินขาว อ.กลาง	ภูเก็ต	-	N 07°58'57.6" E 098°20'54.3"	S 436.69 m
47	B10	อ่างเก็บน้ำบางเหินขาวดำ	ภูเก็ต	อุปโภค บริโภค	N 07°57'58.1" E 098°20'03.7"	S 438.94 m
48	B11	เขื่อนบางวาด	ภูเก็ต	พักผ่อนหย่อนใจ	N 07°53'27.6" E 098°20'04.0"	S 446.76 m
49	B12	ใกล้แยกโลตัส อ.กระบุรี	ภูเก็ต	-	N 07°54'17.2" E 098°21'52.2"	S 444.22 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
50	B13	สระเก็บน้ำวังวิเศษ	ตรัง	อุปโภค บริโภค	N 07°43'30.1" E 099°23'22.1"	S 440.43 m
51	B14	สวนป่าวังวิเศษ	ตรัง	-	N 07°44'20.3" E 099°23'22.1"	S 440.43 m
52	B15	สวนสาธารณะวังนกน้ำ อ.วังวิเศษ	ตรัง	พักผ่อนหย่อนใจ	N 07°38'34.6" E 099°28'23.6"	S 448.86 m
53	B16	อ่างเก็บน้ำคลองท่าจั่ว	ตรัง	อุปโภค บริโภค และการเกษตร	N 07°50'14.4" E 099°41'39.4"	S 426.65 m
54	B17	สวนสาธารณะกะพังสุรินทร์	ตรัง	พักผ่อนหย่อนใจ	N 07°34'38.1" E 099°37'24.2"	S 455.50 m
55	B18	กองพันทหารราบที่ 1	สงขลา	-	N 07°01'26.6" E 099°37'24.2"	S 523.95 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
56	B19	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	สงขลา	อุปโภค บริโภค	N 07°00'28.0" E 100°30'11.7"	S 525.75 m
57	K1	สถานีกาญจนบุรี	กาญจนบุรี	เพื่อการเกษตร	No data	No data
58	K2	สถานีกาญจนบุรี	กาญจนบุรี	เพื่อการเกษตร	No data	No data
59	K3	สถานีกาญจนบุรี	กาญจนบุรี	เพื่อการเกษตร	No data	No data
60	N01	เขื่อนแม่กวงอุดมธารา	เชียงใหม่	อุปโภค บริโภค และการเกษตร	N 18°55'42.6" E 099°07'40.2"	NE 24.44 m
61	N02	แม่กวง	เชียงใหม่	-	N 18°55'34.2" E 099°07'58.5"	NE 24.71 m
62	N03	ดอยสะเก็ด	เชียงใหม่	-	N 18°51'48.2" E 099°10'15.5"	E 24.98 m
63	N04	ดอยสะเก็ด บ้านทุ่งยาว	เชียงใหม่	-	N 18°51'53.9" E 099°10'17.5"	E 25.10 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
64	N05	ราชมงคลล้านนา	เชียงใหม่	-	N 18°51'15.2" E 099°10'52.1"	E 25.71 m
65	N06	ราชมงคลล้านนา	เชียงใหม่	-	N 18°51'11.5" E 099°10'49.4"	E 25.60 m
66	N07	ห้วยฮ่องไคร้ (ร้านอาหารครัวริมป่า)	เชียงใหม่	-	N 18°54'02.3" E 099°13'26.3"	E 31.67 m
67	N08	อ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ 1	เชียงใหม่	การเกษตร	N 18°53'19.0" E 099°13'21.4"	E 31.05 m
68	N09	อ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ 2	เชียงใหม่	การเกษตร	N 18°52'43.3" E 099°13'02.7"	E 30.16 m
69	N10	อ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ 3	เชียงใหม่	การเกษตร	N 18°52'28.9" E 099°13'05.4"	E 30.10 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
70	N11	อ่างเก็บน้ำห้วยย่ำค้ำมา อ.เวียงป่าเป้า	เชียงราย	พักผ่อนหย่อนใจ	N 19°11'02.0" E 099°29'407"	NE 72.37 m
71	N12	อ่างเก็บน้ำดอยงู	เชียงราย	พักผ่อนหย่อนใจ และการเกษตร	N 19°11'34.2" E 099°29'24.5"	NE 72.60 m
72	N13	อ่างเก็บน้ำแม่สาร อ.เมือง	ลำพูน	อุปโภค บริโภค และการเกษตร	N 18°30'43.9" E 099°08'06.9"	SE 37.94 m
73	N14	สถานีพัฒนาที่ดินลำพูน	ลำพูน	การเกษตร	N 18°30'06.1 E 099°08'06.9	SE 37.94 m
74	N15	อุทยานแห่งชาติถ้ำขุนตาล	ลำพูน	พักผ่อนหย่อนใจ และการเกษตร	N 18°29'27.3 E 099°11'18.2"	SE 42.13 m
75	N16	อ่างเก็บน้ำแม่เส้า	ลำพูน	พักผ่อนหย่อนใจ	N 18°26'13.8" E 099°08'51.1"	SE 44.83 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
76	N17	โรงเรียนบ้านหล่ายทา	ลำพูน	-	N 18°27'04.0" E 099°08'51.1"	SE 43.24 m
77	N18	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง	ลำปาง	ศูนย์วิจัยและ พัฒนาการเกษตร	N 18°19'46.2" E 099°17'56.7"	SE 63.53 m
78	N19-1	สวนอนันต์ชล อ.ห้างฉัตร	ลำปาง	-	N 18°19'46.0" E 099°12'36.5"	SE 68.66 m
79	N19-2	สวนอนันต์ชล อ.ห้างฉัตร	ลำปาง	-	N 18°19'46.0" E 099°12'36.5"	SE 68.66 m
80	N20	อ่างเก็บน้ำแม่ติบ	ลำพูน	พักผ่อนหย่อนใจ	N 18°35'04.8" E 099°09'11.2"	SE 31.75 m
81	N21	อ่างเก็บน้ำหนองพญาพรหม	เชียงใหม่	พักผ่อนหย่อนใจ	N 18°43'08.0" E 099°10'44.0"	E 25.84 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
82	N22	อ่างเก็บน้ำห้วยลาน	เชียงใหม่	พัฒนาด้านป่าไม้ ด้านประมงและการเกษตร	N 18°42'22.7" E 099°12'19.8"	E 28.94 m
83	N23	อ่างเก็บน้ำคอยโตน	เชียงใหม่	พัฒนาด้านป่าไม้ ด้านประมงและการเกษตร	N 18°41'09.4" E 099°12'11.3"	SE 29.54 m
84	N24	อ่างเก็บน้ำห้วยป่าไร่	เชียงใหม่	พัฒนาด้านป่าไม้ ด้านประมงและการเกษตร	N 18°41'32.5" E 099°12'28.0"	E 29.71 m
85	N25	สวนสาธารณะเชียงใหม่	เชียงใหม่	พักผ่อนหย่อนใจ	N 18°49'55.8" E 098°57'48.9"	N 4.85 m
86	N26	อ่างเก็บน้ำห้วยตึงเต่า	เชียงใหม่	พักผ่อนหย่อนใจ	N 18°51'59.8" E 098°56'40.3"	N 8.32 m
87	N27	อ.แมริม	เชียงใหม่	พักผ่อนหย่อนใจ	N 18°53'22.5" E 098°56'54.1"	N 10.88 m

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	จังหวัด	การใช้ประโยชน์	พิกัด	ระดับความสูง จากน้ำทะเล
88	N28	อ่างเก็บน้ำห้วยโจ้	เชียงใหม่	อุปโภค บริโภค และการเกษตร	N 18°56'16.1" E 099°03'39.6"	N 20.25 m
89	N29	อ่างห้วยแก้ว	เชียงใหม่	อุปโภค บริโภค	N 18°48'18.7" E 098°57'00.7"	N 1.54 m
90	N30	สำนักงานเกษตรและสหกรณ์เชียงใหม่	เชียงใหม่	การเกษตร	N 18°47'37.0" E 098°56'46.7"	NE 15 m

หมายเหตุ – คือ ไม่พบข้อมูล

ตารางที่ 15 แสดงค่าทางกายภาพบางประการของตัวอย่างน้ำและการสำรวจสาหร่าย *B. braunii* ในแหล่งน้ำต่าง ๆ

(+ = พบ *B. braunii*, - = ไม่พบ *B. braunii*)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (‰)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
1	D01-1	สำนักงานการท่องเที่ยวโรงเรียนจปร. จุดที่ 1	33.8	7.3	0	0.087	+
2	D01-2	สำนักงานการท่องเที่ยวโรงเรียนจปร. จุดที่ 2	34.3	7.9	0	0.089	+
3	D02	สำนักงานการท่องเที่ยวโรงเรียนจปร.	34.2	9.0	0	0.056	+
4	D03	อ่างเก็บน้ำคลองโสด	34.1	8.7	0	0.044	+
5	D04-1	บ่อบำบัดน้ำเสียของจปร. จุดที่ 1	33.9	7.5	0	0.280	-
6	D04-2	บ่อบำบัดน้ำเสียของจปร. จุดที่ 2	34.1	7.8	0	0.267	-
7	D05	เขื่อนขุนด่านปราการชล	30.5	9.0	0	0.040	+
8	D06	อ่างเก็บน้ำจักรพงษ์ (เขาอีโต้)	32.3	8.5	0	0.260	+
9	D07	อ่างเก็บน้ำจักรพงษ์ (เขาอีโต้)	34.0	7.4	0	0.048	+
10	D08	สวนกบินทร์เฉลิมราชย์ (หนองปลาแขยง)	33.0	8.1	0	0.067	+
11	D09	โครงการขุดลอกหนองสระหิน	30.9	8.3	0	0.143	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (%)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
12	D10	อ่างเก็บน้ำบ้านห้วยชัน	33.0	8.0	0	0.051	+
13	D11	อ่างเก็บน้ำพระปรัง	31.5	7.5	0	0.045	+
14	D12	สระน้ำ ต.ท่าแขก	32.2	7.9	1	0.063	+
15	D13	อ่างเก็บน้ำท่ากะบาก	32.4	7.6	0	0.038	+
16	D14	อ่างเก็บน้ำห้วยยาง	32.2	7.5	0	0.092	-
17	D15	เขื่อนลำนางรอง	30.9	7.8	0	0.077	+
18	D16	อ่างเก็บน้ำคลองมะนาว	33.7	7.2	0	0.160	+
19	D17	แหล่งน้ำเพื่อการดับเพลิง อ.นางรอง	29.3	7.9	0	0.065	+
20	D18	ห้วยเสรง	29.2	7.6	0	0.038	+
21	D19	อ่างเก็บน้ำอำปิล	29.6	7.5	0	0.033	+
22	D20	บ้านสองชั้น	29.1	7.5	0	0.062	-
23	D21	อ่างเก็บน้ำห้วยตลาด	30.6	7.4	0	0.083	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (%)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
24	T01	สถานีสูบน้ำบางพระ	30.6	5.9	0	0.137	+
25	T02	อ่างเก็บน้ำหนองค้อ	31.5	6.2	0	0.105	+
26	T03	อ่างเก็บน้ำหนองปลาไหล	31.3	6.3	0	0.148	+
27	J1	อ่างเก็บน้ำดอกกราย	-	-	-	-	+
28	J2	อ่างเก็บน้ำมาบประชัน	-	-	-	-	+
29	J4	อ่างเก็บน้ำห้วยสะพาน	-	-	-	-	+
30	DU01	โรงงานน้ำตาลสุพรรณบุรี	30.9	7.9	1	0.796	+
31	DU02	บึงระหาร	29.8	7.4	1	0.280	+
32	DU03	บึงฉวาก	29.9	8.0	1	0.237	+
33	DU04	วัดหนองกระทุ่ม อ.เดิมบางนางบวช	32.1	7.7	1	0.433	-
34	DU05	เขื่อนกระเสียว	30.3	7.6	1	0.230	+
35	DU06	อ่างเก็บน้ำทับเสลา	28.8	9.0	1	0.117	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (%)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
36	DU07	อุทยานสวรรค์	29.3	7.4	1	0.287	-
37	DU08	เขื่อนวังรอ	29.0	6.9	1	0.202	-
38	DU09	บึงบอระเพ็ด	30.9	7.3	2	0.320	+
39	DU10	อ่างเก็บน้ำซับตะเคียน	30.0	8.2	1	0.128	+
40	B03	อ่างเก็บน้ำเขาเต่า อ.หัวหิน	32.6	7.9	3	4.090	+
41	B04	โครงการพระราชดำรินองใหญ่ อ.เมือง	32.0	6.0	0	0.090	+
42	B05	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุราษฎร์ธานี	31.2	6.2	0	0.313	-
43	B06	เขื่อนรัชชประภา	32.6	6.5	0	0.078	-
44	B07	ทางเข้าเขื่อนรัชชประภา อ.บ้านตาขุน	34.7	6.9	0	0.086	+
45	B08	อ่างเก็บน้ำบ้านบางทรายขาว	33.4	7.0	0	0.089	+
46	B09	ขุนเหินหว อ.กลาง	33.3	6.2	0	0.185	+
47	B10	อ่างเก็บน้ำบางเหินหวคำ	32.3	6.8	0	0.057	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (%)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
48	B11	เขื่อนบางวาด	32.4	6.4	0	0.128	+
49	B12	ใกล้แยกโลดส์ อ.กระทุ่ม	31.4	6.9	0	0.102	+
50	B13	สระเก็บน้ำวังวิเศษ	31.3	5.9	0	0.107	+
51	B14	สวนป่าวังวิเศษ	31.1	6.2	0	0.113	+
52	B15	สวนสาธารณะวังนกน้ำ อ.วังวิเศษ	30.4	6.5	0	0.095	+
53	B16	อ่างเก็บน้ำคลองท่าวี	30.8	6.5	1	0.065	+
54	B17	สวนสาธารณะกะพังสุรินทร์	29.1	6.5	0	0.157	+
55	B18	กองพันทหารราบที่ 1	31.9	6.3	0	0.094	+
56	B19	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	32.4	6.3	0	0.080	+
57	K1	สถานีกาญจนบุรี	-	-	-	-	+
58	K2	สถานีกาญจนบุรี	-	-	-	-	-
59	K3	สถานีกาญจนบุรี	-	-	-	-	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (%)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
60	N01	เขื่อนแม่กวงอุดมธารา	26.2	9.09	0	0.074	+
61	N02	แม่กวง	29.2	9.00	0	0.126	-
62	N03	คอยสะเกิด	27.9	8.24	0	0.072	+
63	N04	คอยสะเกิด บ้านทุ่งยาว	29.7	8.78	0	0.141	+
64	N05	ราชมงคลล้านนา	29.0	8.50	0	0.128	+
65	N06	ราชมงคลล้านนา	28.2	8.82	0	0.800	+
66	N07	ห้วยฮ่องไคร้ (ร้านอาหารครัวริมป่า)	27.1	8.45	1	0.329	+
67	N08	อ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ 1	28.9	9.01	1	0.45	+
68	N09	อ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ 2	28.9	7.85	1	0.193	+
69	N10	อ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ 3	30.0	8.10	1	0.328	-
70	N11	อ่างเก็บน้ำห้วยย่ำคามา อ.เวียงป่าเป้า	27.0	8.70	0	0.170	-
71	N12	อ่างเก็บน้ำคอยงู อ.เวียงป่าเป้า	27.3	9.35	0	0.071	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (%)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
72	N13	อ่างเก็บน้ำแม่สาร อ.เมือง	27.6	8.10	3	0.063	+
73	N14	สถานีพัฒนาที่ดินลำพูน	28.4	7.80	2	0.123	-
74	N15	อุทยานแห่งชาติถ้ำขุนตาล	28.8	7.85	2	0.450	+
75	N16	อ่างเก็บน้ำแม่เส้า	28.9	8.00	2	0.110	+
76	N17	โรงเรียนบ้านห้วยทา	30.0	8.18	2	0.138	+
77	N18	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง	30.4	8.51	0	0.046	+
78	N19-1	สวนอนันต อ.ห้างฉัตร	30.6	8.80	2	0.059	+
79	N19-2	สวนอนันต อ.ห้างฉัตร	29.9	8.36	1	0.049	+
80	N20	อ่างเก็บน้ำแม่ตึบ	31.1	8.32	2	0.103	+
81	N21	อ่างเก็บน้ำหนองพญาพรหม	31.2	8.24	1	0.130	+
82	N22	อ่างเก็บน้ำห้วยลาน	31.7	8.55	0	0.090	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

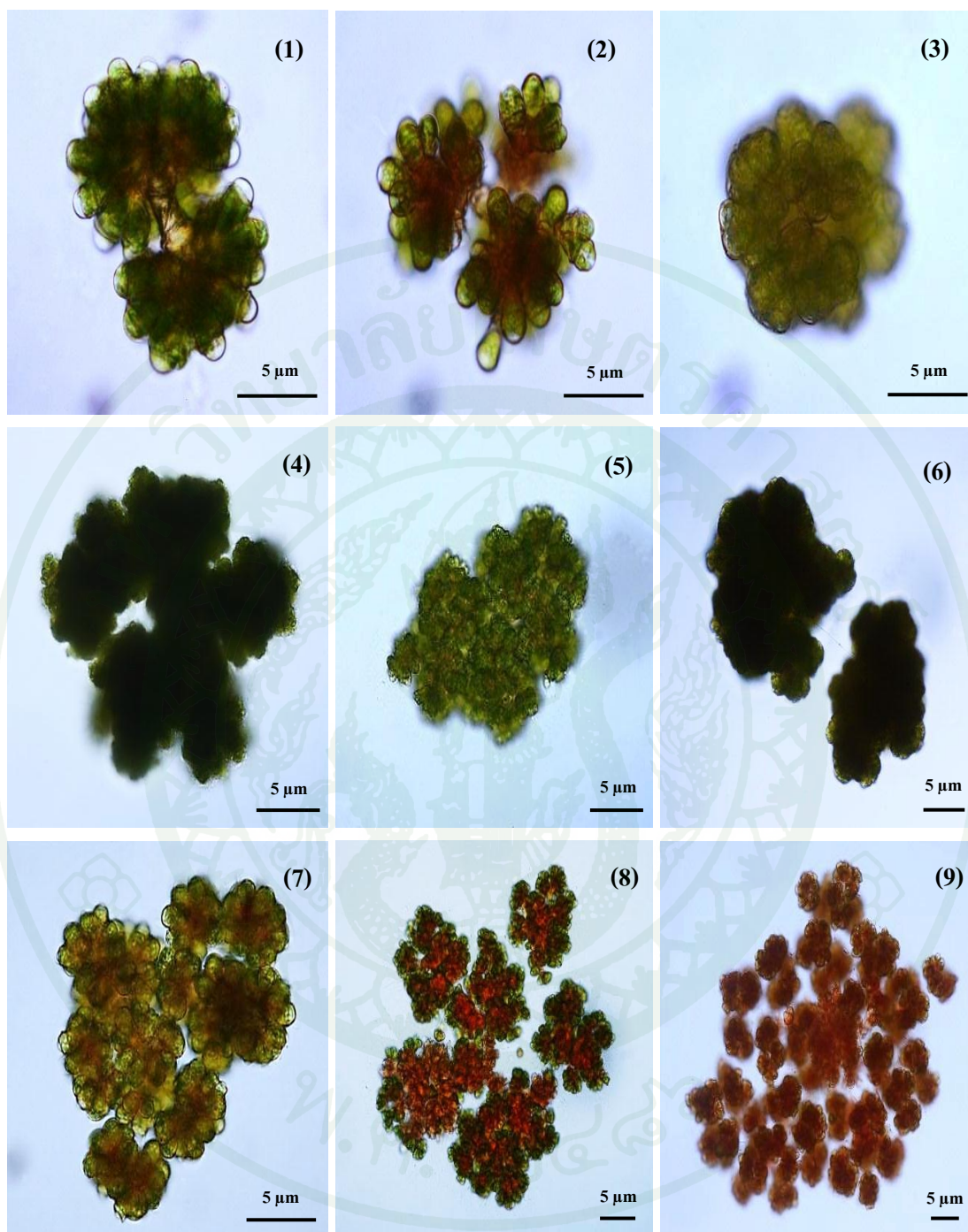
ลำดับที่	รหัส	สถานที่	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความเค็ม (%)	Conductivity (ms/cm)	<i>B. braunii</i>
83	N23	อ่างเก็บน้ำคอยโตน	33.5	7.79	0	0.205	-
84	N24	อ่างเก็บน้ำห้วยป่าไร่	30.1	8.35	3	0.085	+
85	N25	สวนสาธารณะเชียงใหม่	27.4	8.34	2	0.151	-
86	N26	อ่างเก็บน้ำห้วยตึงเฒ่า	27.7	8.26	1	0.082	+
87	N27	อ.แมริม	28.8	7.92	0	0.184	+
88	N28	อ่างเก็บน้ำห้วยโจ้	28.9	8.50	1	0.083	+
89	N29	อ่างห้วยแก้ว	29.9	8.17	0	0.156	+
90	N30	สำนักงานเกษตรและสหกรณ์เชียงใหม่	31.5	7.95	1	0.168	+

ตารางที่ 16 แสดงช่วงของค่าทางกายภาพจากตัวอย่างน้ำที่พบสาหร่าย *B. braunii*

ค่าทางกายภาพ	หน่วย	ช่วงค่าทางกายภาพ
อุณหภูมิ	(°C)	26.2 - 34.7
pH		5.90 - 9.35
ความเค็ม	(%)	0 - 3
Conductivity	(ms/cm)	0.033 - 4.090

1.2 การแยกสาหร่าย *B. braunii* จากตัวอย่างน้ำ

การคัดแยกสาหร่าย *B. braunii* ทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำมาแยกเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธี micropipette washing method จากนั้นถ่ายสาหร่ายลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร AF-6 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง ดังตารางที่ 17 พบว่าสามารถคัดแยก *B. braunii* ได้ทั้งหมด 206 ไอโซเลต โดยสาหร่ายที่แยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันหลายรูปแบบทั้งโคโลนีสีเขียว เหลืองปนส้ม บางโคโลนีพบสายไซโต พลาสซึมเชื่อมต่อระหว่างโคโลนี โคโลนีมีเมือกหุ้มและผิวโคโลนีไม่เรียบ แสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *B. braunii* จากแหล่งน้ำต่าง ๆ : (1) สถานีกาญจนบุรี (2) บึงระหาร (3) อ่างห้วยแก้ว (4) เขื่อนขุนด่านปราการชล (5) อ่างเก็บน้ำหนองปลาไหล (6) โครงการพระราชดำรินองใหญ่ (7) อ่างเก็บน้ำห้วยสะพาน (8) เขื่อนแม่วงอุดมธารา และ (9) แหล่งน้ำเพื่อการดับเพลิง

1.3 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening)

ทำการทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* ที่แยกได้ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว AF-6 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน ผลการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ พบว่าสาหร่าย *B. braunii* ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 173 ไอโซเลต มีจำนวน 102 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตปริมาณไฮโดรคาร์บอนได้ และ 71 ไอโซเลต ไม่ผลิตไฮโดรคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
1	(D01-1)-2	0.15	-
2	(D01-1)-4	0.33	-
3	(D01-1)-5	0.50	0.195
4	(D01-1)-6	0.35	0.166
5	D01-4	0.42	-
6	D02-1	NT	NT
7	D02-2	0.71	-
8	D06-1	0.13	-
9	D07-1	0.28	-
10	D11-1	0.63	-
11	D11-3	0.58	-
12	D11-4	1.11	0.082
13	D11-7	0.07	-
14	D11-8	0.93	0.029
15	D11-9	0.39	-
16	D11-10	0.68	-
17	D11-14	0.90	ND
18	D11-15	0.51	-

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
19	D11-18	1.14	0.069
20	D11-19	0.60	-
21	D11-20	0.95	-
22	D11-21	0.49	0.001
23	D11-300	0.40	0.314
24	D16-1	0.41	0.022
25	D16-3	0.85	0.171
26	D16-4	2.11	0.694
27	D17-1	NT	NT
28	D17-2	NT	NT
29	D19-2	1.41	-
30	D19-3	2.43	-
31	D19-5	0.74	-
32	D19-6	1.29	0.213
33	D19-7	NT	NT
34	D19-9	NT	NT
35	D19-10	0.40	0.009
36	D19-11	0.56	-
37	D19-20	NT	NT
38	D19-21	0.56	-
39	D19-22	NT	NT
40	T01-2	1.82	-
41	T01-3	1.85	-
42	T01-4	2.26	-
43	T01-5	0.43	0.156
44	T01-6	NT	NT

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
45	T01-7	1.43	-
46	T02-1	0.52	-
47	T03-1	1.82	0.018
48	T03-2	1.31	0.051
49	T03-3	0.42	-
50	T03-4	0.62	0.007
51	T03-5	2.34	-
52	T03-6	1.77	-
53	T03-8	0.73	0.011
54	T03-10	0.11	0.041
55	J1-2	1.01	0.043
56	J1-4	0.77	0.418
57	J1-20	0.56	0.074
58	J1-21	0.85	0.109
59	J2-1	1.05	-
60	J2-2	0.22	0.036
61	J2-4	0.40	-
62	J2-5	0.53	-
63	J2-7	0.90	0.036
64	J2-20	0.68	-
65	J3-1	0.45	-
66	J4-1	2.57	0.630
67	J4-2	0.28	0.054
68	J4-3	0.46	0.051
69	J4-20	0.97	0.149
70	DU02-2	1.15	-

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
71	DU02-3	1.28	0.231
72	DU02-20	0.47	0.043
73	DU02-21	1.35	0.146
74	DU05-1	1.77	0.101
75	DU05-2	1.04	0.047
76	DU05-3	1.02	-
77	DU05-4	1.39	0.310
78	DU05-5	0.35	0.070
79	DU05-6	1.54	0.090
80	DU05-7	1.51	0.094
81	DU05-8	NT	NT
82	DU10-5	0.55	0.035
83	DU10-7	1.37	-
84	DU10-8	0.45	0.085
85	DU10-9	NT	NT
86	B04-1	0.79	0.001
87	B04-2	1.60	0.362
88	B04-3	0.67	0.001
89	B04-4	NT	NT
90	B04-5	NT	NT
91	B04-20	1.65	-
92	B04-21	0.81	-
93	B04-25	0.70	0.359
94	B07-2	1.31	-
95	B07-3	0.97	-
96	B07-4	1.09	-

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
97	B07-5	0.90	-
98	B07-25	1.22	-
99	B07-30	0.01	-
100	B07-300	0.17	-
101	B08-1	0.96	0.142
102	B08-4	0.87	0.216
103	B08-20	0.64	-
104	B08-26	0.76	-
105	B08-27	0.31	0.011
106	B08-28	1.75	-
107	B08-29	0.87	0.483
108	B09-1	0.35	0.105
109	B09-2	0.58	0.098
110	B09-25	1.39	0.271
111	B11-1	0.80	0.093
112	B11-2	NT	NT
113	B11-3	NT	NT
114	B11-4	NT	NT
115	B11-5	NT	NT
116	B11-6	NT	NT
117	B11-11	0.59	0.122
118	B12-1	1.45	0.068
119	B12-2	NT	NT
120	B13-1	NT	NT
121	B13-2	NT	NT
122	B13-3	NT	NT

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
123	B13-4	NT	NT
124	B13-5	NT	NT
125	B14-1	1.24	0.056
126	B14-2	1.02	0.092
127	B15-1	0.30	-
128	B15-2	1.96	-
129	B15-3	NT	NT
130	B18-1	0.53	0.059
131	B18-2	0.32	0.111
132	B18-3	0.40	0.095
133	B18-25	0.30	0.011
134	B18-26	0.31	0.140
135	B18-28	1.37	-
136	B19-1	1.10	-
137	B19-2	1.49	-
138	B19-3	NT	NT
139	B19-6	0.38	0.023
140	B19-20	1.06	-
141	K1-1	0.98	0.412
142	K1-2	0.83	0.040
143	K1-3	1.01	0.370
144	K1-4	1.46	0.126
145	K1-5	1.53	0.067
146	K1-6	0.88	0.128
147	K1-7	0.42	0.039
148	K1-8	1.01	0.233

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
149	K1-9	0.65	-
150	K2-2	0.94	-
151	K3-2	0.98	-
152	K3-3	0.97	0.033
153	K3-4	0.87	-
154	K3-5	0.27	-
155	K3-9	0.52	-
156	K3-10	0.83	-
157	K3-11	0.29	0.014
158	K3-13	0.57	-
159	K3-15	1.75	-
160	K3-18	0.59	0.009
161	K3-20	0.52	-
162	K3-31	1.87	0.213
163	K3-32	1.63	0.133
164	N01-1	0.81	0.205
165	N03-1	NT	NT
166	N07-1	NT	NT
167	N12-1	0.43	0.092
168	N12-2	0.22	0.066
169	N12-3	NT	NT
170	N13-1	0.20	0.076
171	N15-1	0.43	0.079
172	N15-2	0.44	0.129
173	N15-3	0.61	0.236
174	N15-4	NT	NT

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
175	N16-1	0.13	-
176	N16-2	0.57	0.218
177	N16-3	0.38	0.170
178	N16-4	0.53	0.120
179	N17-1	0.14	0.069
180	N17-2	0.72	-
181	N17-3	0.82	0.236
182	N17-4	0.71	-
183	N17-5	0.85	-
184	N18-1	0.28	0.147
185	N(19-1)-1	NT	NT
186	N(19-2)-1	0.82	0.002
187	N20-1	NT	NT
188	N26-1	0.13	0.014
189	N26-2	0.19	0.001
190	N26-3	0.15	0.058
191	N26-4	0.33	0.053
192	N26-5	0.32	0.108
193	N26-6	NT	-
194	N27-1	0.22	0.098
195	N27-2	0.42	0.140
196	N27-3	NT	NT
197	N29-1	0.40	0.090
198	N29-2	0.34	-
199	N29-3	0.15	0.048
200	N29-4	0.38	0.217

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
201	N29-5	0.09	-
202	N29-6	0.92	0.380
203	N29-7	0.82	0.490
204	N30-1	1.13	-
205	N30-2	0.21	0.001
206	N30-3	0.32	-

หมายเหตุ: – คือ ไม่ผลิตไฮโดรคาร์บอน ; NT คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์; ND คือ ไม่สามารถตรวจสอบได้

1.4 การคัดเลือกรุ่นทุติยภูมิ (Secondary screening)

นำ *B. braunii* ที่คัดเลือกได้ทั้ง 102 ไอโซเลตจากการคัดเลือกรุ่นปฐมภูมิ มาคัดเลือกให้เหลือเพียงไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงสุดในการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลว AF-6 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 18

จากการคัดเลือกรุ่นทุติยภูมิพบว่าไอโซเลต J4-1 ซึ่งแยกได้จากอ่างเก็บน้ำห้วยสะพานอำเภอสรีราชา จังหวัดชลบุรี มีมวลเซลล์สูงสุด 2.91 กรัมต่อลิตร และผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงสุด 0.670 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสายพันธุ์ไอโซเลต J4-1 มีการเจริญและสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงที่สุดทั้งในขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อใช้สำหรับการศึกษารุ่นต่อไป

ตารางที่ 18 การเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* ในการคัดเลือก
ชั้นทุติยภูมิ

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
1	(D01-1)-5	0.45	0.170
2	(D01-1)-6	0.41	0.172
3	D11-4	0.85	0.130
4	D11-8	0.90	0.039
5	D11-14	1.07	0.001
6	D11-18	1.32	0.053
7	D11-21	0.53	0.002
8	D11-300	0.48	0.390
9	D16-1	0.37	0.019
10	D16-3	0.69	0.144
11	D16-4	1.89	0.553
12	D19-6	1.14	0.306
13	D19-10	0.35	0.008
14	T01-5	0.49	0.189
15	T03-1	1.34	0.013
16	T03-2	0.96	0.045
17	T03-4	0.57	0.007
18	T03-8	0.58	0.013
19	T03-10	0.13	0.048
20	J1-2	0.92	0.035
21	J1-4	1.45	0.454
22	J1-20	0.71	0.086
23	J1-21	0.84	0.191
24	J2-2	0.31	0.043
25	J2-7	0.92	0.039

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
26	J4-1	2.91	0.670
27	J4-2	0.41	0.059
28	J4-3	1.21	0.047
29	J4-20	0.81	0.168
30	DU02-3	0.86	0.173
31	DU02-20	0.61	0.045
32	DU02-21	0.89	0.064
33	DU05-1	1.31	0.079
34	DU05-2	0.92	0.051
35	DU05-4	1.03	0.268
36	DU05-5	0.59	0.161
37	DU05-6	1.85	0.106
38	DU05-7	0.89	0.087
39	DU10-5	0.61	0.064
40	DU10-8	0.52	0.142
41	B04-1	0.81	0.001
42	B04-2	1.45	0.323
43	B04-3	0.56	0.001
44	B04-25	0.82	0.399
45	B08-1	0.81	0.130
46	B08-4	0.89	0.227
47	B08-27	0.53	0.017
48	B08-29	0.71	0.380
49	B09-1	0.26	0.072
50	B09-2	0.69	0.105
51	B09-25	1.15	0.222

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
52	B11-1	0.95	0.118
53	B11-11	0.67	0.154
54	B12-1	1.08	0.068
55	B14-1	1.07	0.028
56	B14-2	1.24	0.116
57	B18-1	0.41	0.044
58	B18-2	0.41	0.158
59	B18-3	0.57	0.100
60	B18-25	0.32	0.010
61	B18-26	0.28	0.111
62	B19-6	0.58	0.034
63	K1-1	1.19	0.357
64	K1-2	0.96	0.030
65	K1-3	0.96	0.321
66	K1-4	0.83	0.108
67	K1-5	1.51	0.050
68	K1-6	0.96	0.185
69	K1-7	0.28	0.038
70	K1-8	0.97	0.121
71	K3-3	0.77	0.034
72	K3-11	0.25	0.011
73	K3-18	0.70	0.013
74	K3-31	1.16	0.173
75	K3-32	1.78	0.138
76	N01-1	0.93	0.188
77	N12-1	0.51	0.106

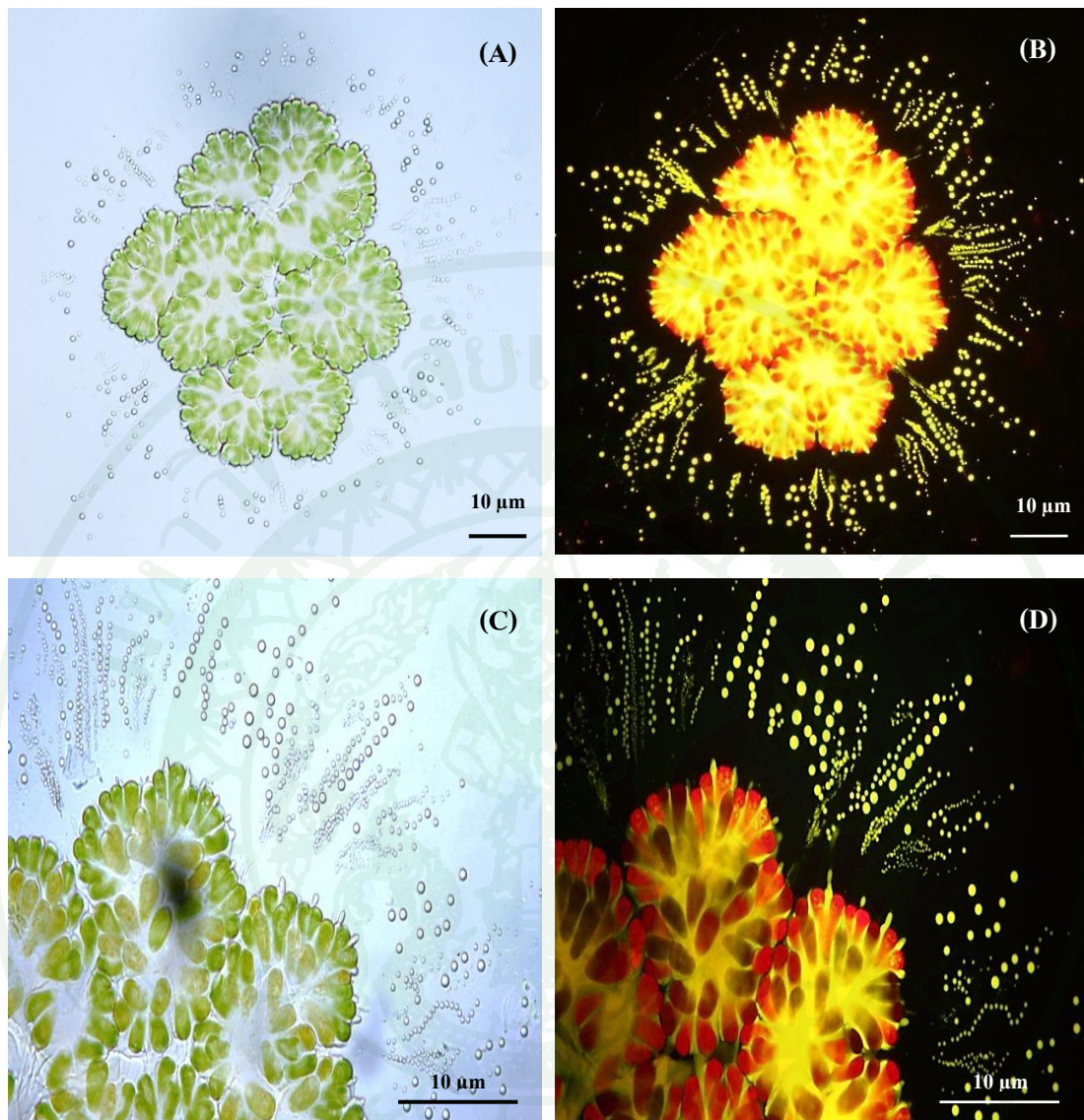
ตารางที่ 18 (ต่อ)

Number	<i>B. braunii</i> isolate no.	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)
78	N12-2	0.27	0.084
79	N13-1	0.29	0.086
80	N15-1	0.51	0.107
81	N15-2	0.47	0.174
82	N15-3	0.53	0.198
83	N16-2	0.63	0.253
84	N16-3	0.42	0.231
85	N16-4	0.46	0.061
86	N17-1	0.16	0.077
87	N17-3	0.50	0.168
88	N18-1	0.36	0.178
89	N(19-2)-1	0.75	0.002
90	N26-1	0.18	0.016
91	N26-2	0.21	0.001
92	N26-3	0.21	0.072
93	N26-4	0.37	0.057
94	N26-5	0.37	0.112
95	N27-1	0.31	0.137
96	N27-2	0.39	0.121
97	N29-1	0.43	0.112
98	N29-3	0.18	0.035
99	N29-4	0.42	0.234
100	N29-6	0.93	0.356
101	N29-7	0.77	0.435
102	N30-2	0.32	0.002

1.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเหลว AF-6 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 วัน นำมาเชื่อมด้วยสารเรืองแสง Nile red ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์พบว่า *B. braunii* J4-1 เซลล์มีลักษณะรูปร่างทรงรี มาอยู่รวมกันเป็นโคโลนี โคโลนีมีสีเขียว และผลิตไฮโดรคาร์บอนในปริมาณมาก แสดงดังภาพที่ 12

จากการเชื่อมสาหร่ายด้วยสี Nile red ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์แสดงให้เห็นถึงการเรืองแสงที่แตกต่างกันของไฮโดรคาร์บอนและคลอโรฟิลล์ ถ้าเรืองแสงสีแดงคือคลอโรฟิลล์ และเรืองแสงสีเหลืองคือไฮโดรคาร์บอน พบว่า *B. braunii* J4-1 มีการสะสมของไฮโดรคาร์บอนในปริมาณค่อนข้างมาก ซึ่งสังเกตได้จากการเรืองแสงสีเหลืองทอง (ดังภาพที่ 12B และ 12D)



ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *B. braunii* J4-1 เมื่อย้อมด้วยสี Nile red:

(A) และ (C) ลักษณะของ *B. braunii* J4-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา

(B) และ (D) ลักษณะของ *B. braunii* J4-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

โดยเรืองแสงสีแดงคือคลอโรฟิลล์ และเรืองแสงสีเหลืองคือไฮโดรคาร์บอน

2. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนโดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย 8 สูตร ได้แก่ Krate and Myers (Gelpi *et al.*, 1970), Modified Chu 13 (Largeau *et al.*, 1980), Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989), Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013), AF-6 (Kato, 1982), BG 11 (Vonshak, 1986), BBM (Kanz and Bold, 1969) และ NS III (Payer, 1971) ในหลอดทดลองขนาด 200 มิลลิลิตร ปริมาตรของอาหาร 150 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 วัน จากการศึกษพบว่าสาหร่าย *B. braunii* J4-1 มีการเจริญในอาหารทุกชนิด แต่การเจริญมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร AF-6 และรองลงมาคือ Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989), BBM, BG 11, Modified Chu 13, NS III, Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013) และ Krate and Myers ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 13 จากภาพจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่าถึงความแตกต่างของการเจริญในอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อมีการเจริญมาก ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายก็จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ

ในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันทั้ง 8 ชนิด พบว่าสาหร่าย *B. braunii* J4-1 เจริญได้ดีในอาหาร AF-6 มีค่ามวลเซลล์เท่ากับ 2.324 กรัมต่อลิตร และรองลงมาคือ Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989) มีค่ามวลเซลล์ 1.326 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหาร BBM, BG 11, Modified Chu 13, NS III, Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013) และ Krate and Myers มีการเจริญน้อยกว่า มีค่ามวลเซลล์เท่ากับ 1.251, 0.960, 0.935, 0.746, 0.412 และ 0.077 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 19 ภาพที่ 14

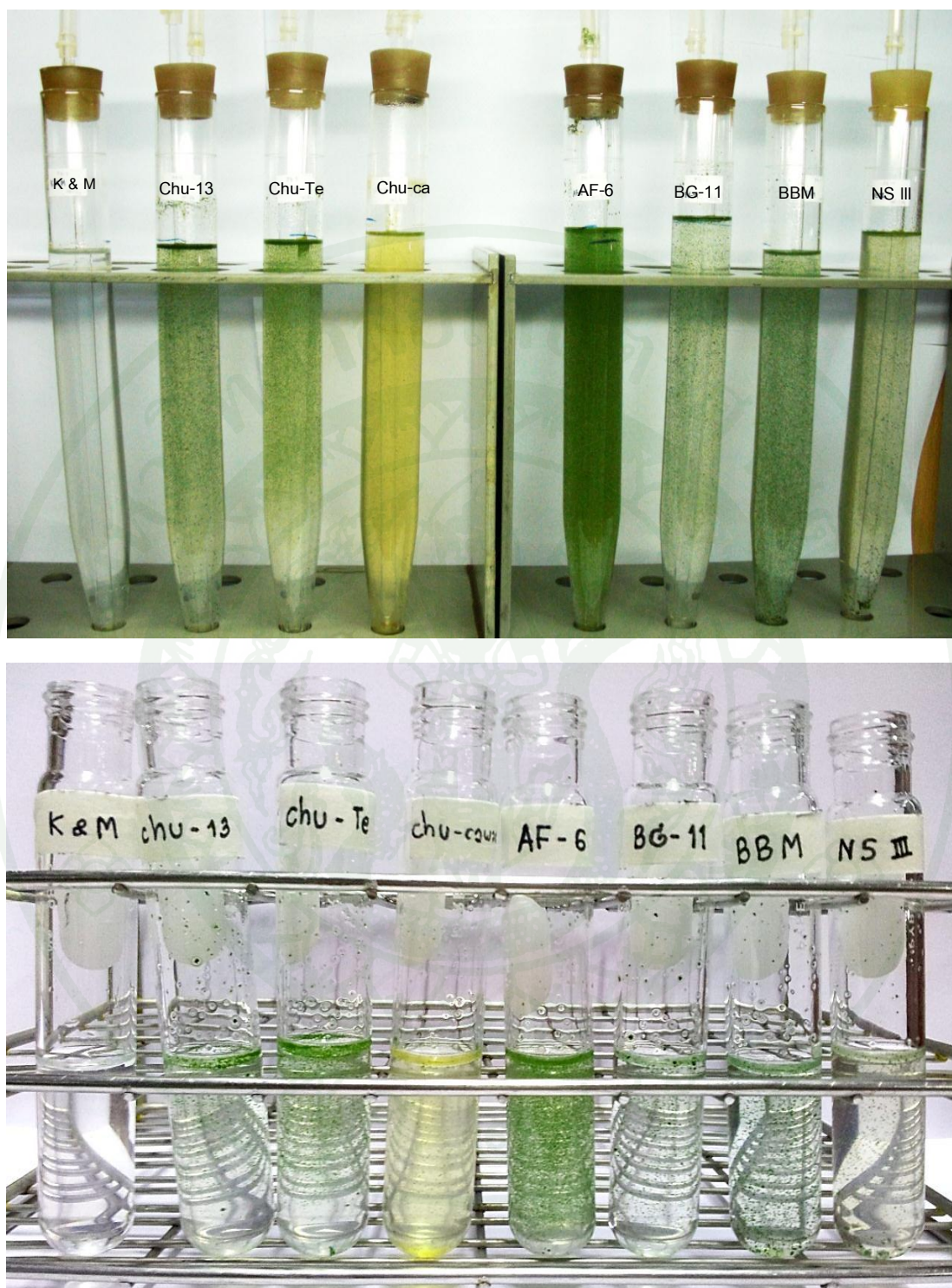
จากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เพื่อยืนยันการเจริญพบว่าสาหร่าย *B. braunii* J4-1 มีการผลิตคลอโรฟิลล์ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ AF-6 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ 0.381 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ BBM, BG 11, Modified Chu 13, Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989), NS III, Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013) และ Krate and Myers ตามลำดับ มีปริมาณคลอโรฟิลล์ 0.198, 0.166, 0.160, 0.118, 0.074, 0.046 และ 0.006 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สังเกตได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด เมื่อการเจริญลดลงปริมาณคลอโรฟิลล์ก็ลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Casadevall *et al.* (1985) ที่รายงานว่า การเสื่อมสภาพของเซลล์มีความเกี่ยวข้องค่อนข้างมากกับการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังตารางที่ 19 ภาพที่ 14

การผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 พบว่ามีการผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ดีในอาหาร AF-6 มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.731 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ BG 11, BBM, NS III, Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989), Modified Chu 13, Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013) และ Krate and Myers โดยมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.325, 0.308, 0.204, 0.036, 0.026, 0.003 และ 0.001 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 19 ภาพที่ 14

จากรายงานการศึกษาของ Largeau *et al.* (1980); Metzger *et al.* (1991) ได้กล่าวไว้ว่าอาหาร modified Chu 13 medium เป็นสูตรอาหารที่ยอมรับว่าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับสาหร่าย *Botryococcus* ทั้ง 3 race คือ race A race B และ race L แต่จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ AF-6 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดที่สนับสนุนการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 โดยมีมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.324 กรัมต่อลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ 0.381 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณไฮโดรคาร์บอน 0.731 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ AF-6 มีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่จำเพาะต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ที่แตกต่างจากสูตรอาหารอื่น ๆ ดังภาคผนวกที่ ก

จากการเปรียบเทียบสูตรอาหาร จะเห็นว่าอาหาร AF-6 มี NH_4NO_3 , CaCO_3 , Biotin, Thiamine HCl, Vitamin B6, Vitamin B12 และ PIV เป็นองค์ประกอบ ซึ่งไม่มีในอาหารชนิดอื่นทั้ง 7 สูตร คือ Krate and Myers, Modified Chu 13, Modified Chu (Tenaud *et al.*, 1989), Modified Chu (Watanabe *et al.*, 2013), BG 11, BBM และ NS III จึงเป็นไปได้ว่าองค์ประกอบที่กล่าวมาข้างต้นนี้มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย เมื่อพิจารณา NH_4NO_3 ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนประกอบด้วยแอมโมเนียมและไนเตรท สาหร่ายสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ (ลัดดา, 2540) และสอดคล้องกับงานวิจัยของพวงผกา และพิมพ์พรณ (2549) พบว่าสาหร่าย *B. braunii* สามารถลดปริมาณไนเตรดและแอมโมเนียในน้ำทิ้งที่ใช้เพาะเลี้ยงได้ถึง 73 % และ 79 % ตามลำดับ สำหรับ CaCO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปของเกลือคาร์บอเนต เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย (ลัดดา, 2540) สำหรับวิตามินเป็นปัจจัยทางโภชนาการอินทรีย์ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญอย่างต่อเนื่อง และกิจกรรมในวิถีเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต จากรายงานการศึกษาของ De Clercq (1997); Zemleni and Mock (1999) ได้กล่าวไว้ว่า Biotin หรือที่เรียกว่า Vitamin H หรือ Vitamin B7 ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับการขนส่งคาร์บอนไดออกไซด์ในเอนไซม์คาร์บอกซีเลส มีหน้าที่สำคัญในปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เช่นการสังเคราะห์กรดไขมันในวิถีเมแทบอลิซึมของ branched chain amino acid และกระบวนการ gluconeogenesis นอกจากนี้ De Clercq (1997), Zhang *et al.* (2010) รายงานว่า ไบโอดีนยังมีหน้าที่ในวัฏจักรกรดซิตริกซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้

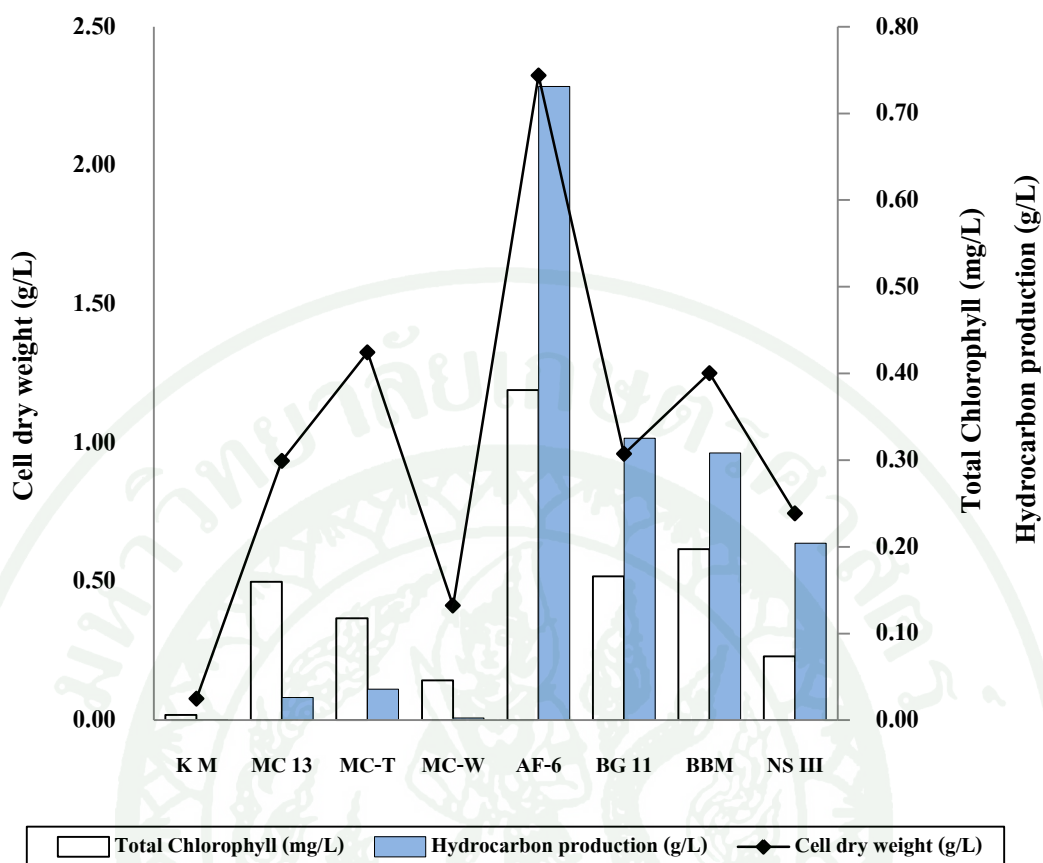
พลังงานทางชีวเคมีที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการหายใจแบบใช้ออกซิเจน สำหรับ Thiamine HCl หรือ Vitamin B1 มีหน้าที่เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ในวิถีเมทาบอลิซึมของคาร์บอน และเป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและ branched chain amino acid (Schowen, 1998; Croft *et al.*, 2006) ส่วน Vitamin B6 หรือ pyridoxine เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ และเป็นหนึ่งในกลุ่มวิตามินบีรวม ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ pyridoxal phosphate ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของหลายปฏิกิริยาในวิถีเมทาบอลิซึมของกรดอะมิโน รวมถึงกระบวนการ transamination กระบวนการ deamination และกระบวนการ decarboxylation (Desouky, 2011) สำหรับ Vitamin B12 ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในหลายวิถีเมทาบอลิซึมรวมทั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโน methionine การสังเคราะห์ DNA และการย่อยสลายกรดไขมันเลขคู่ (Croft *et al.*, 2006) PIV เป็นสารอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารรองคือ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จากการศึกษาของ Raven (1988; 1990) รายงานว่าในการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* ต้องการธาตุอาหารหลักแต่ยังคงต้องการธาตุอาหารรองในปริมาณเล็กน้อยเพื่อช่วยให้สาหร่ายเจริญได้ดีขึ้น ธาตุอาหารรองเช่น ไอรอน โมลิบดีนัม และแมงกานีส มีบทบาทสำคัญในหลายวิถีเมทาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากแสง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และคาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมืตกกับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 19 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

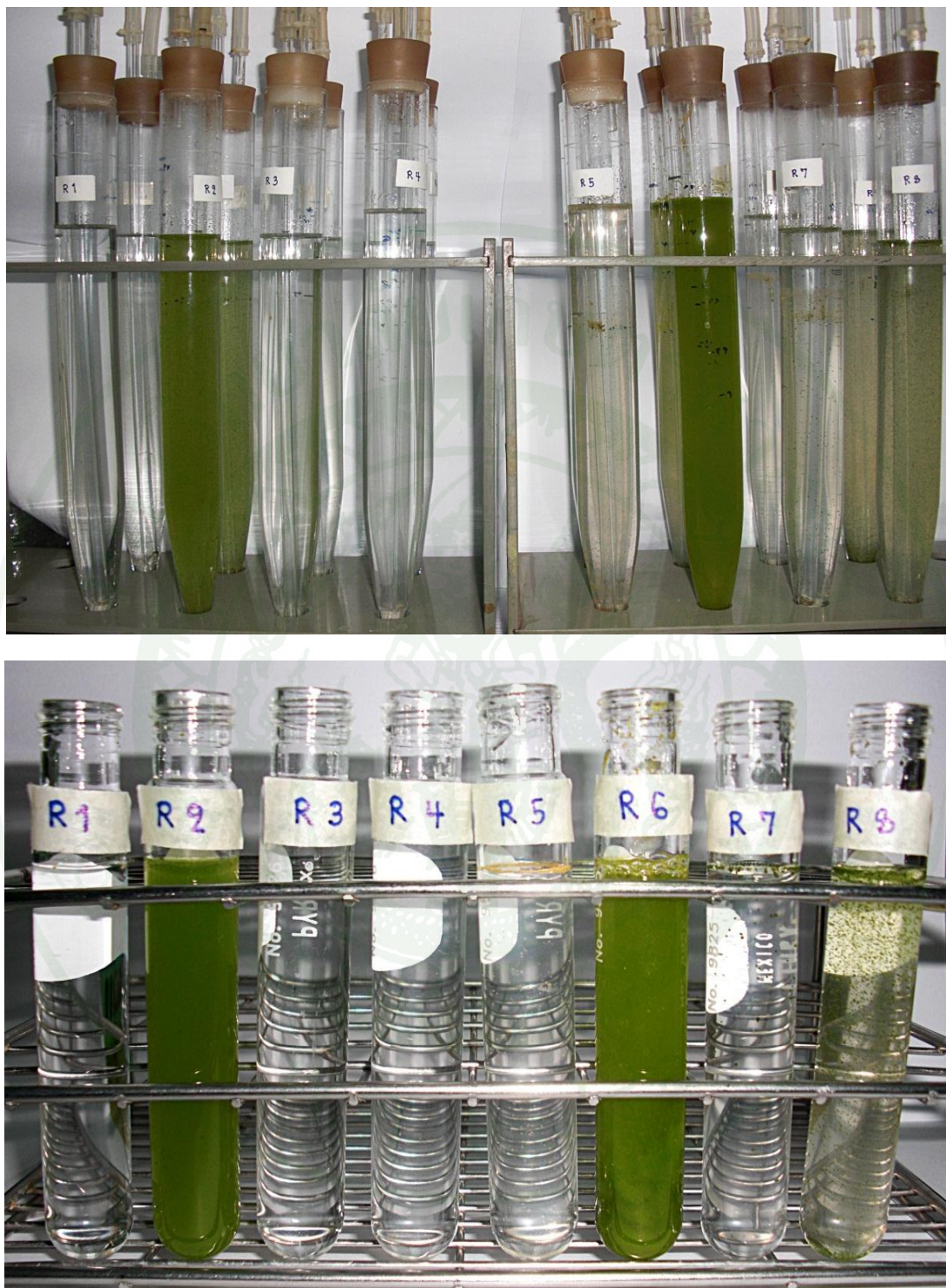
Media	CDW (g/L)	Total chlorophyll (mg/L)	Hydrocarbon production (g/L)
Krate and Myers	0.077	0.006	0.001
Modified Chu 13	0.935	0.160	0.026
Modified Chu (Tenaud <i>et al.</i> , 1989)	1.326	0.118	0.036
Modified Chu (Watanabe <i>et al.</i> , 2013)	0.412	0.046	0.003
AF-6	2.324	0.381	0.731
BG 11	0.960	0.166	0.325
BBM	1.251	0.198	0.308
NS III	0.746	0.074	0.204



ภาพที่ 14 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน

3. การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนโดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design

การคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน ของ *B. braunii* J4-1 โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman design มีปัจจัยที่นำมาศึกษา 7 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรด (มิลลิกรัมต่อลิตร, X_1) ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร, X_2) ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรด (มิลลิกรัมต่อลิตร, X_3) ฟิเอช (X_4) ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต (เปอร์เซ็นต์, X_5) ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์, X_6) และความเข้มของแสง (ลักซ์, X_7) โดยมีสิ่งทดลองทั้งหมด 8 สิ่งทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงผลดังตารางที่ 20 พบว่าสิ่งทดลองที่ 6 สาหร่ายมีการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงสุดเท่ากับ 3.000 กรัมต่อลิตร 0.563 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.5949 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสาหร่ายมีการเจริญในทุกสภาวะสิ่งทดลองและสีของสาหร่ายมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แสดงดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ในอาหาร AF-6 โดยการจัดการทดลองแบบ

Plackett and Burman design ในสภาวะสิ่งทดลอง 8 สภาวะ ภายใต้อุณหภูมิ

25 องศาเซลเซียส ให้ช่วงแสงสว่างต่อมิดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 32 วัน

สิ่งทดลองที่ 6 มีสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรด (NaNO_3) 160 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ไอรอนซิเตรต (Fe-citrate) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 8 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 0 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 3 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มของแสง 4000 ลักซ์ จากสภาวะของสิ่งทดลองที่ 6 จะเห็นว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และความเข้มของแสงมีค่าเป็นบวก แสดงว่าเมื่อความเข้มข้นของปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตมีค่าเป็นลบ แสดงให้เห็นว่าเมื่อปัจจัยเหล่านี้มีค่าต่ำจะส่งผลให้ การเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 20 แสดงค่าการเจริญ และปริมาณไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 จากการจัดการทดลองแบบ Plackett and Burman design

Treatment	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	CDW (g/L)	Chlorophyll production (mg/L)	Hydrocarbon production (g/L)
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	0.055	0.002	0.002
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	1.402	0.443	0.275
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0.043	0.002	0.001
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0.083	0.002	0.004
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	0.370	0.038	0.026
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	3.000	0.563	0.595
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	0.392	0.044	0.040
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.453	0.095	0.043

การวิเคราะห์การทดลอง Plackett and Burman design ด้วยโปรแกรมทางสถิติ จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ของการผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 0.969 สามารถอธิบายได้ว่าสัดส่วนของความแปรปรวนเท่ากับ 96.9 เปอร์เซ็นต์ ค่า R^2 ของการผลิตคลอโรฟิลล์เท่ากับ 0.975 สามารถอธิบายได้ว่าสัดส่วนของความแปรปรวนเท่ากับ 97.5

เปอร์เซ็นต์ และค่า R^2 ของการผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 0.987 สามารถอธิบายได้ว่าสัดส่วนของความแปรปรวนเท่ากับ 98.7 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ค่า P -value ต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 21 ตารางที่ 22 และ ตารางที่ 23 พบว่าปัจจัยที่มีค่า P -values น้อยกว่า 0.05 เป็นปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีจำนวน 4 ปัจจัย คือความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต ฟิเอช ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมี 2 ปัจจัยที่มีค่า main effect เป็นค่าบวก คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ หมายความว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลกระทบทางบวกและมีแนวโน้มที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้อีก เพื่อให้สาหร่ายสามารถเจริญและผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ดีขึ้น ส่วนอีก 2 ปัจจัยคือ ฟิเอช และความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต ซึ่งมีค่า main effect เป็นลบ หมายความว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลกระทบทางลบและมีแนวโน้มที่จะลดความเข้มข้นลง

เนื่องจากความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต เป็นปัจจัยมีค่าเป็นลบหมายความว่าส่งผลกระทบทางลบและควรที่จะลดความเข้มข้นลง แต่ปัจจัยนี้มีค่าระดับต่ำสุด (-1) คือ 0% (w/v) จึงไม่สามารถที่จะลดปริมาณลงได้อีกจึงตัดปัจจัยนี้ออก ดังนั้นมี 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต ฟิเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ จึงถูกเลือกไปใช้ในการศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมต่อไปโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

ผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Terry and Abadia (1986) ที่รายงานว่าเหล็กเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ปฏิกริยาแอสซิมิเลชัน (assimilation) ในโตรเจนอนินทรีย์ และตัวเร่งปฏิกริยาในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ในพืชสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย ดังนั้นเหล็กอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้ม thylakoid ซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานในการแปลงพลังงานเคมี นอกจากนี้ปริมาณเหล็กที่จำกัดยังส่งผลกระทบต่อการลดลงของความเข้มข้นของเม็ดสี ยังทำให้อัตราความจำเพาะของคลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงอีกด้วย (Greene *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1991; Terry and Abadia, 1986) การเจริญของสาหร่ายในสถานะที่มีความเข้มข้นของเหล็กต่ำมีผลทำให้เกิดการลดลงของ P700 คลอโรฟิลล์ที่เป็นศูนย์กลางปฏิกริยาของระบบแสง I และ cytochromes ชนิด c (Bohme *et al.*, 1978; Oquist, 1974) ผลกระทบของเหล็กสอดคล้องกับรายงานของ Behrenfeld *et al.* (2006) ที่กล่าวไว้ว่าเหล็กเป็นปัจจัยสำคัญทำหน้าที่ในการควบคุมชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็ก Yeesang and Cheirsilp (2010) ได้ศึกษา *Botryococcus* สายพันธุ์คือ TRG, KB,

SK และ PSU พบว่าการเพิ่มปริมาณของเหล็กมีผลต่อการสะสมน้ำมัน ซึ่งสอดคล้องกับ Tanoi *et al.* (2014) ที่รายงานว่าความเข้มข้นของเหล็กมีอิทธิพลต่อขนาด รูปร่าง การเจริญ และการผลิตน้ำมันของ *B. braunii* BOT-22 นอกจากนี้เห็นได้ชัดว่าฟิเอชมีผลต่อการกระจายของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์จะมีผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ (Azov, 1982; Celia *et al.*, 1994) สอดคล้องกับการรายงานของ Lehman (1978) ที่กล่าวไว้ว่า free CO₂ เป็นสารตั้งต้นโดยตรงสำหรับวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) ในขณะเดียวกันฟิเอชและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย *Botryococcus* sp. (Rousch *et al.*, 2003; Metzger and Largeau, 2005) ยังสอดคล้องกับ Chirac *et al.* (1985) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการให้อากาศเพียงอย่างเดียวและให้อากาศพร้อมกับคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เพิ่มอัตราการเจริญเป็นสองเท่าในระยะ exponential phase เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน มีการผลิตไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้น 5 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

Term	Variables	Coefficient	T-value	P-value
X ₁	NaNO ₃ (mg/L)	0.162	3.678	0.002 ^a
X ₂	KH ₂ PO ₄ (mg/L)	-0.177	-4.023	0.001 ^a
X ₃	Fe-citrate (mg/L)	0.415	9.431	0.000 ^a
X ₄	pH	-0.252	-5.728	0.000 ^a
X ₅	NaHCO ₃ (%)	-0.605	-13.766	0.000 ^a
X ₆	CO ₂ (%)	0.504	11.462	0.000 ^a
X ₇	light (Lux)	0.235	5.348	0.000 ^a

^aSignificant at 95% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.969$; and $R^2_{adj} = 0.956$

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

Term	Variables	Coefficient	T-value	P-value
X ₁	NaNO ₃ (mg/L)	0.020	0.499	0.624
X ₂	KH ₂ PO ₄ (mg/L)	-0.080	-2.002	0.062
X ₃	Fe-citrate (mg/L)	0.490	12.306	0.000 ^a
X ₄	pH	-0.122	-3.060	0.007 ^a
X ₅	NaHCO ₃ (%)	-0.650	-16.321	0.000 ^a
X ₆	CO ₂ (%)	0.534	13.404	0.000 ^a
X ₇	light (Lux)	0.062	1.557	0.139

^aSignificant at 95% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.975$; and $R^2_{adj} = 0.963$

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

Term	Variables	Coefficient	T-value	P-value
X ₁	NaNO ₃ (mg/L)	0.186	6.426	0.000 ^a
X ₂	KH ₂ PO ₄ (mg/L)	-0.189	-6.513	0.000 ^a
X ₃	Fe-citrate (mg/L)	0.478	16.503	0.000 ^a
X ₄	pH	-0.217	-7.484	0.000 ^a
X ₅	NaHCO ₃ (%)	-0.578	-19.943	0.000 ^a
X ₆	CO ₂ (%)	0.511	17.64	0.000 ^a
X ₇	light (Lux)	0.212	7.322	0.000 ^a

^aSignificant at 95% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.987$; and $R^2_{adj} = 0.981$

4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design

เทคนิค Response Surface Methodology (RSM) เป็นการรวบรวมข้อมูลทางสถิติและทางคณิตศาสตร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและหาสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการ RSM ประกอบด้วยกลุ่มของตัวแปรตามหลักการทางสถิติและคณิตศาสตร์ โดยจะใช้เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองกับตัวแปรอิสระ แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เป็นการออกแบบการทดลองทุกระดับของแต่ละปัจจัยห่างจากจุดกึ่งกลางของการทดลองเท่ากันและทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง แต่ละปัจจัยจะมีระดับการทดลอง 5 ระดับ ($-\alpha$, -1 , 0 , 1 , α) จากการศึกษาโดยใช้หลักการทางสถิติด้วยเทคนิค RSM แบบ CCD มาช่วยในการออกแบบ ทำให้ได้จำนวนการทดลองประกอบไปด้วย 17 การทดลอง ปัจจัยศึกษาที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน ของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ได้แก่ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต (X_1) พีเอช (X_2) และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3) พบว่าการทดลองที่ 15-17 เป็นจุดกึ่งกลางการทดลอง (central point conditions) ประกอบด้วยความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 7 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ *B. braunii* J4-1 จะมีการเจริญและผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงสุดโดยการทดลองที่ 15, 16 และ 17 มีมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.97, 4.98 และ 4.77 กรัมต่อลิตร มีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 11.77, 10.50 และ 9.81 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 1.26, 1.25 และ 1.08 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 24 แสดงค่าการเจริญ และปริมาณไฮโดรคาร์บอน ของ *B. braunii* J4-1 โดยใช้
แผนการทดลองแบบ CCD

Treatment	Code setting level			Actual level			CDW	Total	Hydrocarbon
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	(g/L)	chlorophyll (mg/L)	production (g/L)
1	-1	-1	-1	1	6	0.8	3.16	5.91	0.55
2	-1	-1	+1	1	6	3.2	3.46	6.66	0.68
3	-1	+1	-1	1	8	0.8	3.74	5.80	0.64
4	-1	+1	+1	1	8	3.2	2.84	6.67	0.50
5	+1	-1	-1	3	6	0.8	2.01	5.97	0.29
6	+1	-1	+1	3	6	3.2	3.61	6.52	0.64
7	+1	+1	-1	3	8	0.8	2.79	6.15	0.34
8	+1	+1	+1	3	8	3.2	3.15	6.22	0.51
9	-1.68	0	0	0.32	7	2	3.08	8.29	0.77
10	0	-1.68	0	2	5.32	2	4.09	8.15	0.67
11	0	0	-1.68	2	7	0	1.15	4.85	0.23
12	+1.68	0	0	3.68	7	2	3.75	8.72	0.53
13	0	+1.68	0	2	8.68	2	3.40	8.14	0.75
14	0	0	+1.68	2	7	4.0	3.01	8.09	0.96
15	0	0	0	2	7	2	4.97	11.77	1.26
16	0	0	0	2	7	2	4.98	10.50	1.25
17	0	0	0	2	7	2	4.77	9.81	1.08

4.1 การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis)

4.1.1 การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 จากผลการวิเคราะห์ปัจจัยที่ศึกษามีค่าสถิติ F เท่ากับ 8.19 ด้วย degree

of freedom (df) เท่ากับ (9, 7) มีค่า P -value เท่ากับ 0.0056 ดังตารางที่ 25 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ มีค่าสถิติ F เท่ากับ 4.17 ด้วย df เท่ากับ (9, 7) เช่นกัน มีค่า P -value เท่ากับ 0.0365 ดังตารางที่ 26 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน มีค่าสถิติ F เท่ากับ 7.41 ด้วย df เท่ากับ (9, 7) มีค่า P -value เท่ากับ 0.0075 ดังตารางที่ 27 จึงเห็นได้อย่างชัดเจนว่าการวิเคราะห์ทั้ง 3 นี้มีค่า P -value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยที่ศึกษามีผลต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA^b) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณต่อการเจริญของ *B. braunii* J4-1

Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	P-value
Regression	14.28	9	1.59	8.19	0.0056 ^a
Residual	1.36	7	0.19		
Total	15.63	16			

^a Predictors: (Constant), X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2

^b Dependent Variable: Growth

ตารางที่ 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA^b) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ของ *B. braunii* J4-1

Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	P-value
Regression	47.54	9	5.28	4.17	0.0365 ^a
Residual	8.87	7	1.27		
Total	56.41	16			

^a Predictors: (Constant), X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2

^b Dependent Variable: Total chlorophyll

ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA^b) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* J4-1

Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	P-value
Regression	1.33	9	0.15	7.41	0.0075 ^a
Residual	0.14	7	0.02		
Total	1.47	16			

^a Predictors: (Constant), X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2

^b Dependent Variable: Hydrocarbon production

4.1.2 การประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงพหุคูณ

การประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่ศึกษา เพื่อทดสอบความมีนัยสำคัญของตัวแปรที่ศึกษาและทิศทางของอิทธิพลว่ามีอิทธิพลทางบวกหรือทางลบต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน ดังแสดงผลในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

Source	CDW			Total chlorophyll			Hydrocarbon production		
	Estimate	F-value	P-level ^a	Estimate	F-value	P-level ^b	Estimate	F-value	P-level ^c
Model	4.8900	8.1900	0.0056	10.7800	4.1700	0.0365	1.2000	7.4100	0.0075
X ₁	-0.0370	0.0960	0.7654	0.0390	0.0160	0.9027	-0.0720	3.5400	0.1021
X ₂	-0.0660	0.3100	0.5944	-0.0170	0.0032	0.9563	-0.0027	0.0050	0.9454
X ₃	0.3300	7.8800	0.0262	0.5700	3.5400	0.1018	0.1300	11.1100	0.0125
X ₁ X ₂	0.0440	0.0800	0.7850	-0.0028	0.0000	0.9946	0.0005	0.0001	0.9920
X ₂ X ₃	0.3200	4.2300	0.0788	-0.1200	0.0980	0.7639	0.0660	1.7300	0.2296
X ₁ X ₃	-0.3100	3.8600	0.0902	-0.0450	0.0130	0.9140	-0.0560	1.2600	0.2991
X ₁ ²	-0.5000	14.2900	0.0069	-1.0600	9.9100	0.0162	-0.2100	25.8300	0.0014
X ₂ ²	-0.3800	8.3600	0.0233	-1.1800	12.4400	0.0096	-0.1900	20.9600	0.0026
X ₃ ²	-0.9800	54.5700	0.0002	-1.7900	28.2200	0.0011	-0.2400	30.8100	0.0009

^a significant at 95% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.9133$; and $R^2_{adj} = 0.8018$

^b significant at 95% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.8427$; and $R^2_{adj} = 0.6406$

^c significant at 95% level ($p < 0.05$), $R^2 = 0.9050$; and $R^2_{adj} = 0.7829$

จากตารางที่ 28 ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการเจริญ ซึ่งมีค่า P -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X₃) พจน์กำลังสองของความเข้มข้นของไฮดรอนซิเตรต (X₁²) พจน์กำลังสองของพีเอช (X₂²) พจน์กำลังสองของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X₃²) ส่วนตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญ ซึ่งมีค่า P -value มากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ ความเข้มข้นของไฮดรอนซิเตรต (X₁) พีเอช (X₂) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของไฮดรอนซิเตรตและพีเอช (X₁X₂) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของไฮดรอนซิเตรตและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X₁X₃) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างพีเอชและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X₂X₃) พบว่ารูปแบบสมการการถดถอยที่เหมาะสมแสดงในสมการที่ 4

$$Y_{\text{biomass}} = -20.2839 + 1.1044X_1 + 5.66321X_2 + 4.23862X_3 + 0.044105X_1X_2 + 0.26654X_1X_3 - 0.25474X_2X_3 - 0.4958X_1^2 - 0.37917X_2^2 - 0.67734X_3^2$$

สมการที่ 4

จากสมการที่ 4 สังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 และ X_1X_3 มีอิทธิพลทางบวก (มีสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว ค่ามวลเซลล์จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น

จากการทดสอบมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9133 นั่นคือกิจกรรมของการเจริญที่ได้เป็นผลหรืออิทธิพลจากตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร 91.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 8.67 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ ซึ่งมีค่า P -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ พจน์กำลังสองของความเข้มข้นของไอรอนซีเตรต (X_1^2) พจน์กำลังสองของพีเอช (X_2^2) พจน์กำลังสองของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3^2) ส่วนตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ ซึ่งมีค่า P -value มากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ ความเข้มข้นของไอรอนซีเตรต (X_1) พีเอช (X_2) ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซีเตรตและพีเอช (X_1X_2) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซีเตรตและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_1X_3) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างพีเอชและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_2X_3) พบว่ารูปแบบสมการการถดถอยที่เหมาะสมแสดงในสมการที่ 5

$$Y_{\text{Chlorophyll}} = -58.32149 + 4.49111X_1 + 16.63383X_2 + 5.93025X_3 - 2.80E-03X_1X_2 - 0.10361X_1X_3 - 0.037124X_2X_3 - 1.05642X_1^2 - 1.18366X_2^2 - 1.24607X_3^2$$

สมการที่ 5

จากสมการที่ 5 สังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 และ X_3 มีอิทธิพลทางบวก (มีสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว ปริมาณคลอโรฟิลล์จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น

จากการทดสอบมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.8427 นั่นคือกิจกรรมของปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ได้เป็นผลหรืออิทธิพลจากตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร 84.27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 15.73 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน ซึ่งมีค่า P -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3) พจน์กำลังสองของความเข้มข้นของ

ไอรอนซิเตรต(X_1^2) พจน์กำลังสองของฟิเอช (X_2^2) พจน์กำลังสองของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3^2) ส่วนตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน ซึ่งมีค่า P -value มากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต (X_1) ฟิเอช (X_2) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซิเตรตและฟิเอช (X_1X_2) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซิเตรตและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_1X_3) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่างฟิเอชและความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_2X_3) พบว่ารูปแบบสมการการถดถอยที่เหมาะสมแสดงในสมการที่ 6

$$Y_{\text{Hydrocarbon}} = -10.23013 + 0.67081X_1 + 2.78796X_2 + 0.97705X_3 + 5.20E-04X_1X_2 + 0.054772X_1X_3 - 0.04667X_2X_3 - 0.21397X_1^2 - 0.19274X_2^2 - 0.16338X_3^2$$

สมการที่ 6

จากสมการที่ 6 สังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 และ X_1X_3 มีอิทธิพลทางบวก (มีสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว ปริมาณไฮโดรคาร์บอนจะมีค่าเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9050 นั่นคือกิจกรรมของปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ได้เป็นผลหรืออิทธิพลจากตัวแปรอิสระทั้ง 3 ตัวแปร 90.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 9.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้

Hu (1999) รายงานสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก (ค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใด ๆ ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม แต่ที่ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์) อีกทั้งถ้า R^2_{adjust} มีค่ามากกว่า 64 เปอร์เซ็นต์ (>0.64) แสดงว่ารูปแบบสมการเหมาะสม

4.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

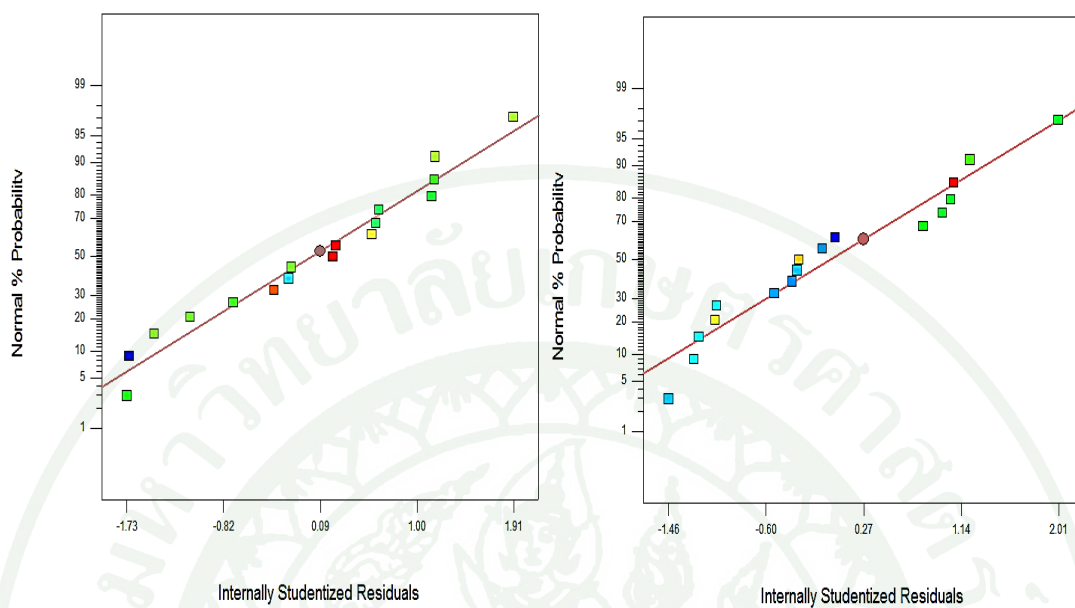
การนำสมการการถดถอยไปใช้จะต้องทำการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย (model adequacy checking) โดยมีการตรวจสอบดังนี้

4.2.1 การทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal probability plot)

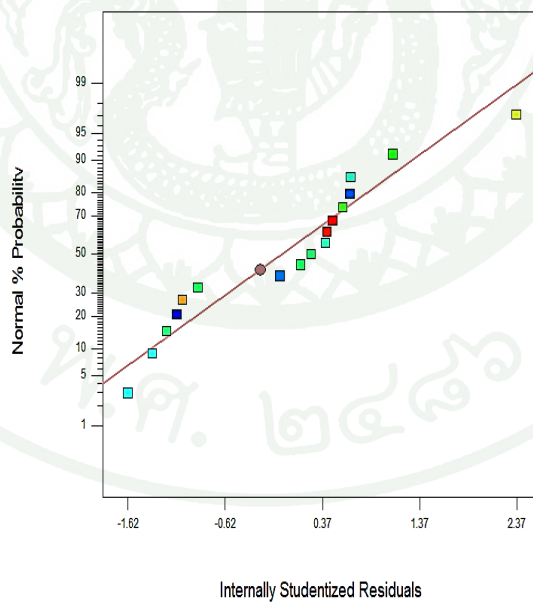
จากการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอยโดยวิธี normal probability plot พบว่าลักษณะของจุดบนกราฟของการเจริญ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และการผลิต ไฮโดรคาร์บอน ส่วนใหญ่มีการกระจายตัวใกล้เคียงเส้นตรงแต่มีบางส่วนของข้อมูลที่โค้งออกจากแนวเส้น ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการวิเคราะห์การแจกแจงเป็นแบบปกติ และเป็นไปตามข้อกำหนดเบื้องต้นของการวิเคราะห์การถดถอย แสดงดังภาพที่ 16

Dependent Variable: Growth

Dependent Variable: Total chlorophyll



Dependent Variable: Hydrocarbon production

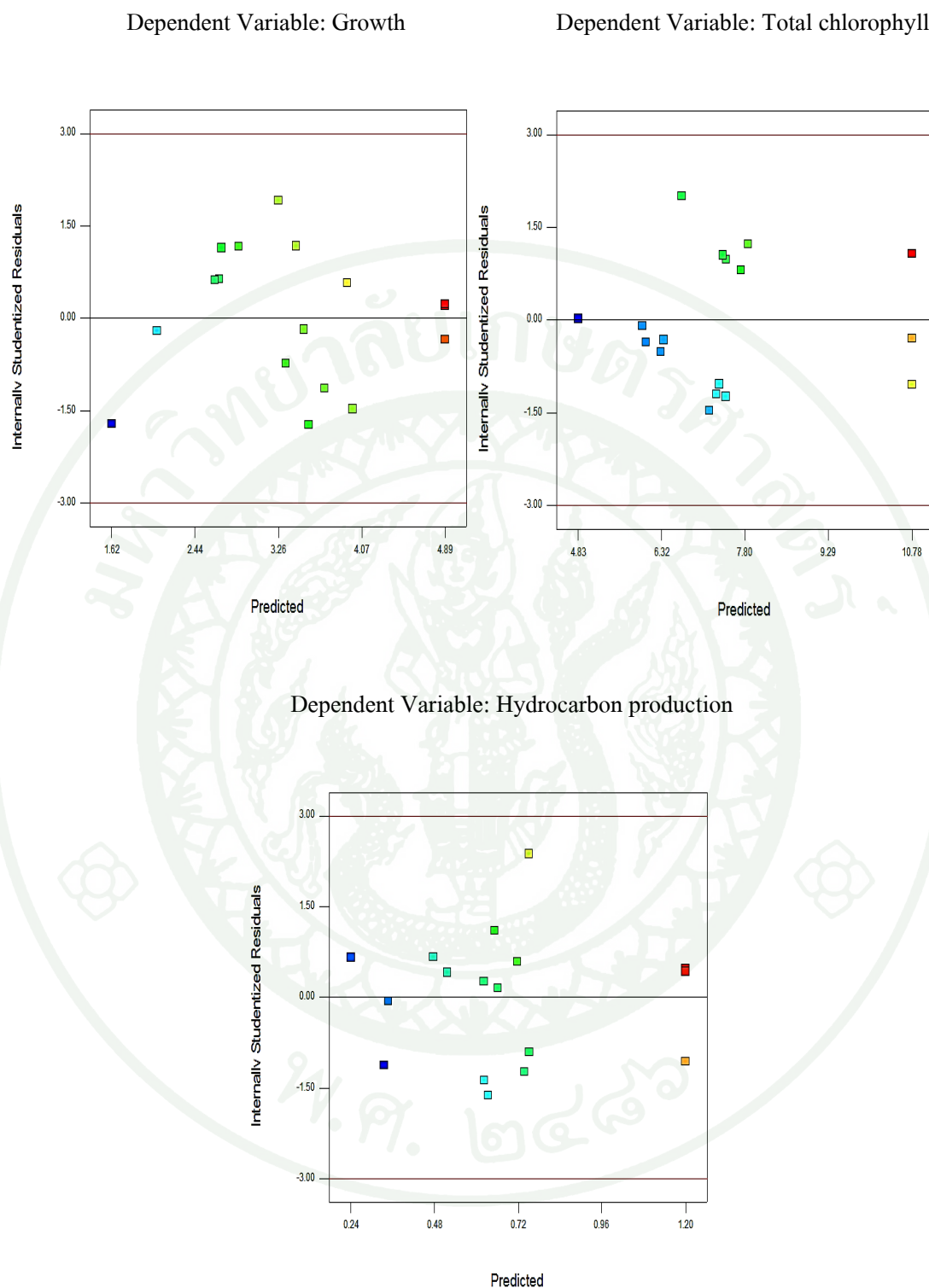


ภาพที่ 16 Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน

4.2.2 การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

จากกราฟการกระจาย (scatter plot) ระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า regression predicted value บนแกน X พบว่าจุดบนกราฟมีการกระจายตัวอย่างไม่มีรูปแบบ และกระจายรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์ ดังแสดงในภาพที่ 17 แสดงว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่





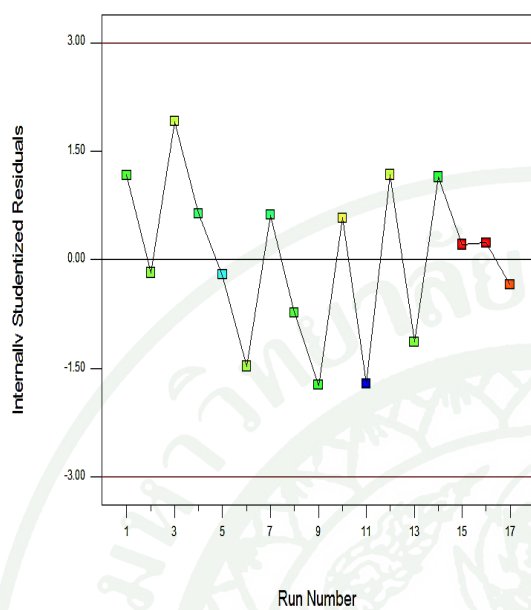
ภาพที่ 17 Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย

4.2.3 การทดสอบค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน

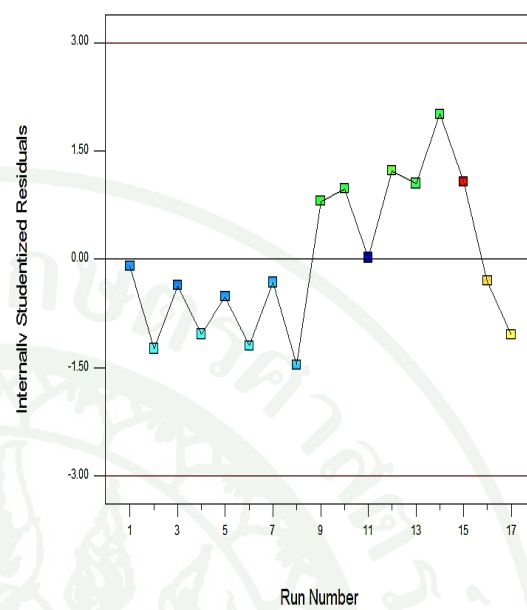
จากการตรวจสอบความเหมาะสมของค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน จากกราฟระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า run number บนแกน X พบว่าจุดบนกราฟมีการกระจายตัวแบบสุ่มรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์และไม่มีลักษณะของแนวโน้มหรือมีรูปแบบอย่างชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 18 แสดงว่าค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน



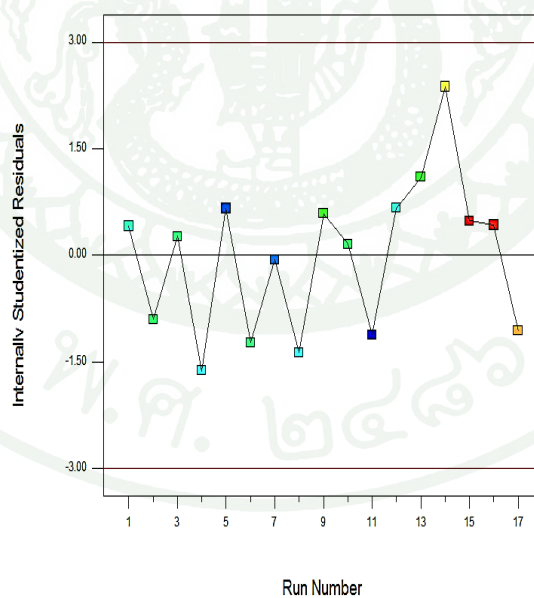
Dependent Variable: Growth



Dependent Variable: Total chlorophyll



Dependent Variable: Hydrocarbon production



ภาพที่ 18 กราฟระหว่างค่าความคลาดเคลื่อนกับอันดับของข้อมูล

เมื่อทำการตรวจสอบความเหมาะสมของรูปแบบสมการการถดถอยด้วยวิธีวิเคราะห์ทั้ง 3 แบบที่กล่าวมาข้างต้น จึงสามารถสรุปได้ว่ารูปแบบสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลองนั้นมีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้มา ขั้นตอนต่อไปนำเสนอสมการการถดถอยไปใช้ทำนายการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนต่อไป

4.3 การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลองและค่าทำนาย

เมื่อนำสมการการถดถอยที่เหมาะสม ได้แก่ สมการที่ 4 สมการที่ 5 และสมการที่ 6 ไปทำนายผลของความเข้มข้นของไอออนซีเตรต พีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ในระดับที่ศึกษาต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ผลการทำนายดังแสดงในตารางที่ 29

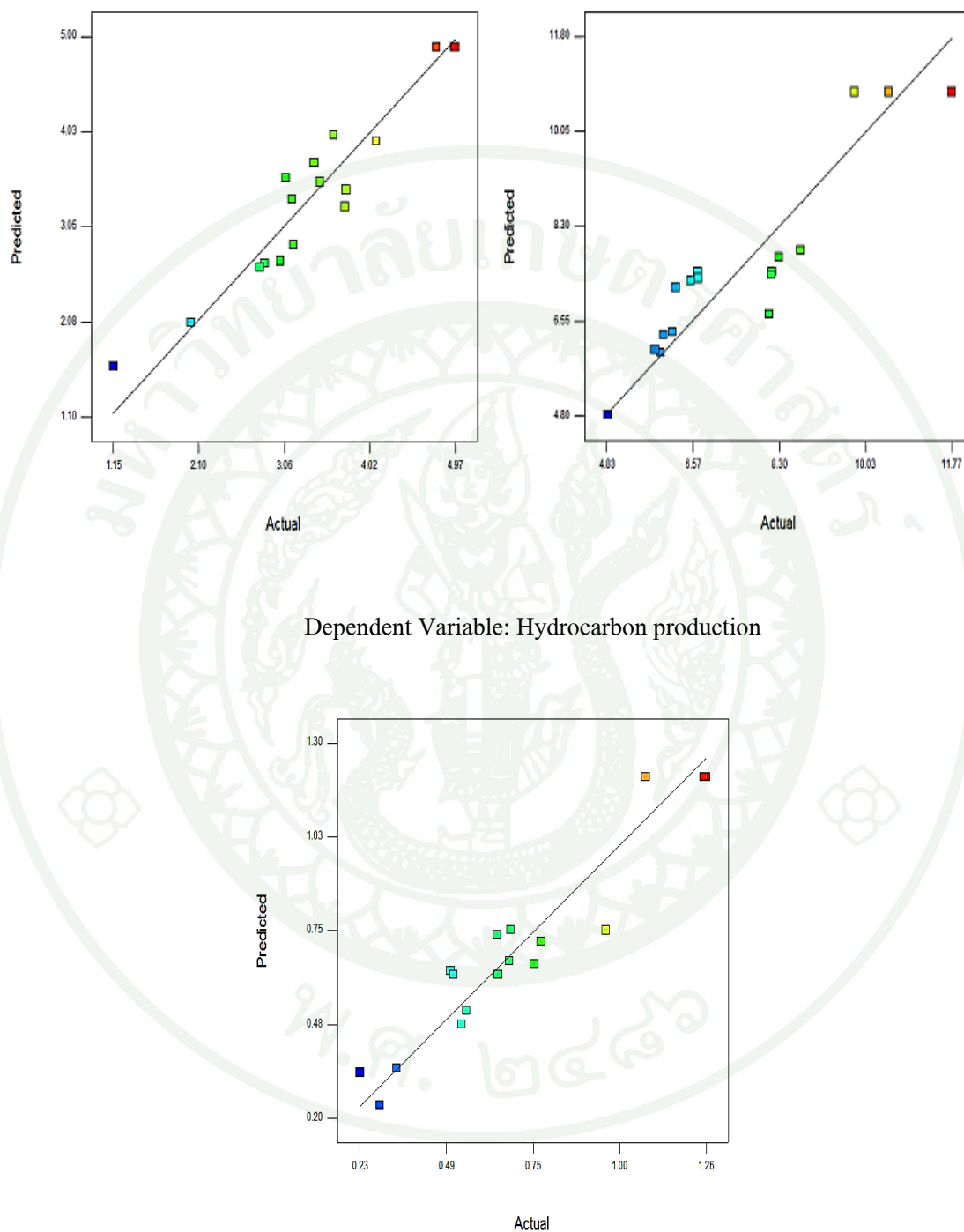
ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนกับ
ค่าทำนายของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 ในแต่ละการทดลอง

Treatment	X_1	X_2	X_3	CDW		Chlorophyll		Hydrocarbon Production	
				(g/L)		(mg/L)		(g/L)	
				predicted	Experimental	predicted	Experimental	predicted	Experimental
1	-1	-1	-1	3.25	3.16	5.99	5.91	0.51	0.55
2	-1	-1	+1	3.89	3.46	7.46	6.66	0.95	0.68
3	-1	+1	-1	2.86	3.74	6.05	5.80	0.68	0.64
4	-1	+1	+1	2.26	2.84	7.34	6.67	0.78	0.50
5	+1	-1	-1	1.66	2.01	6.31	5.97	0.37	0.29
6	+1	-1	+1	3.58	3.61	7.30	6.52	0.77	0.64
7	+1	+1	-1	3.03	2.79	6.37	6.15	0.54	0.34
8	+1	+1	+1	3.71	3.15	7.18	6.22	0.87	0.51
9	-1.68	0	0	3.54	3.08	7.72	8.29	0.73	0.77
10	0	-1.68	0	3.93	4.09	7.48	8.15	0.66	0.67
11	0	0	-1.68	1.57	1.15	4.77	4.85	0.30	0.23
12	+1.68	0	0	3.42	3.75	7.85	8.72	0.49	0.53
13	0	+1.68	0	3.71	3.40	7.42	8.14	0.66	0.75
14	0	0	+1.68	2.68	3.01	6.69	8.09	0.74	0.96
15	0	0	0	4.89	4.97	10.78	11.77	1.20	1.26
16	0	0	0	4.89	4.98	10.78	10.50	1.20	1.25
17	0	0	0	4.89	4.77	10.78	9.81	1.20	1.08

จากสมการการถดถอยที่ใช้ทำนายค่าการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนพบว่าค่าทำนายมีแนวโน้มของทิศทางสอดคล้องกับค่าจริงจากการทดลองดังแสดงในภาพที่ 19

Dependent Variable: Growth

Dependent Variable: Total chlorophyll



ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนาย

4.4 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษา

แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ และภาพเส้นโครงร่างแบบ 2 มิติ ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ถูกสร้างขึ้นเพื่อทำนายค่าที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยแต่ละภาพการตอบสนองจะแสดงถึงอิทธิพลความสัมพันธ์ของ 2 ตัวแปรอิสระ และตัวแปรอิสระอื่นจะกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย

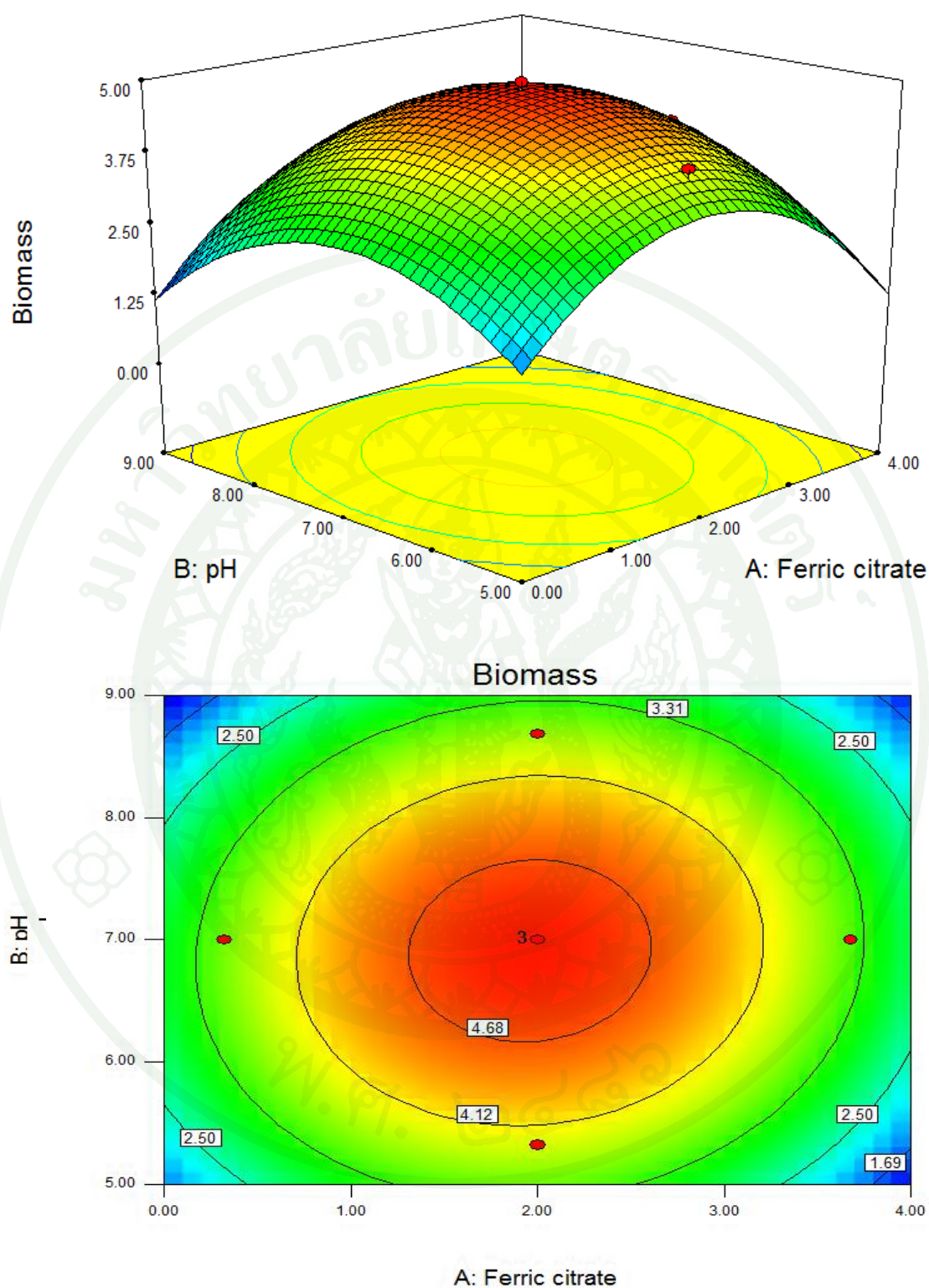
4.4.1 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

การกำหนดระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยสำหรับการเจริญ โดยนำแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 20, 21 และ 22 โดยกำหนดให้ A คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต B คือ พีเอช และ C คือ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

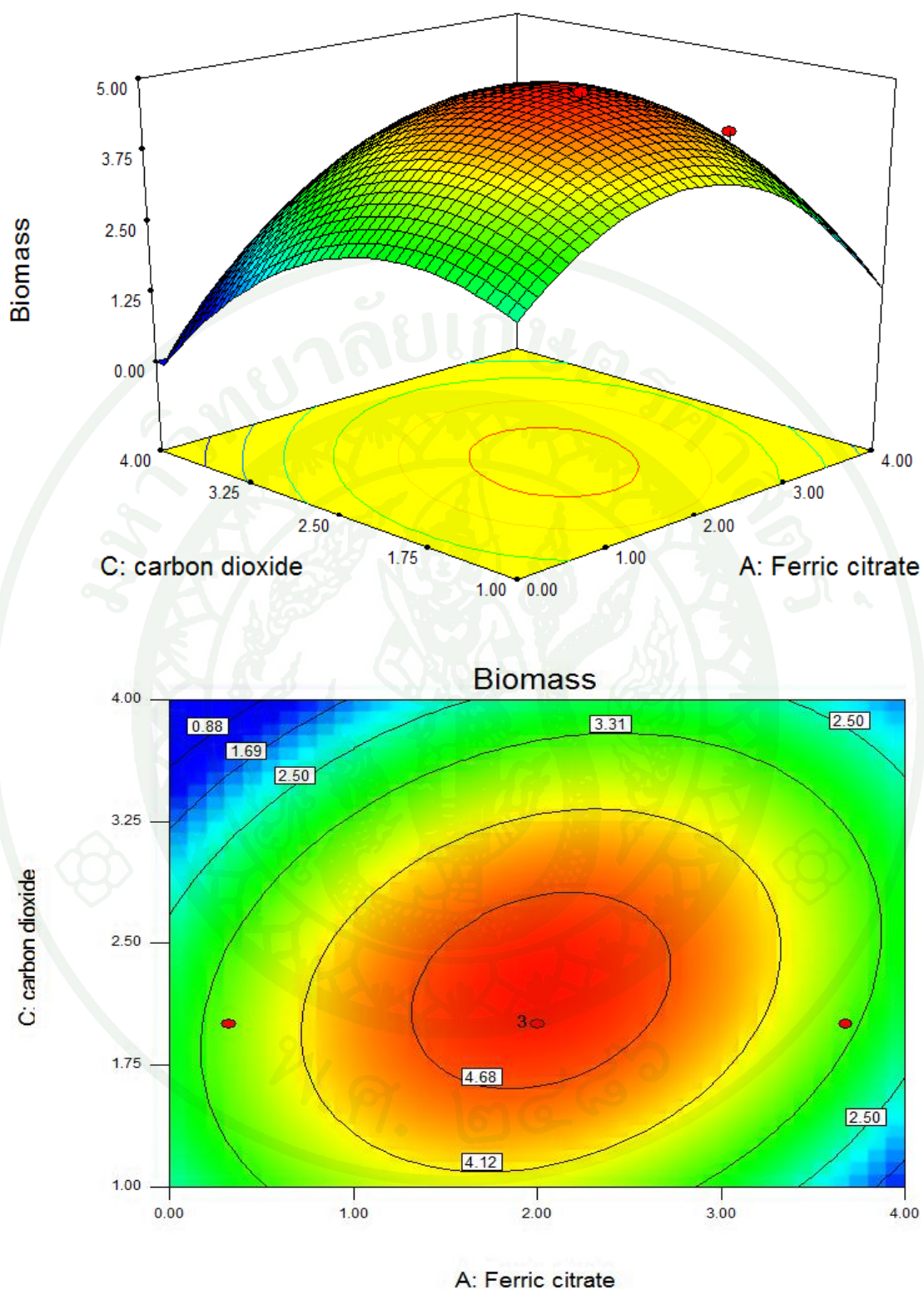
ภาพที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และพีเอชต่อการเจริญ ภาพที่ 21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญ ภาพที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญ จากภาพพบว่าช่วงที่เหมาะสมของไอรอนซิเทรต 1.5 - 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงที่เหมาะสมของพีเอช 6.5 - 7.2 และช่วงที่เหมาะสมของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.0 - 2.5 % (v/v) แสดงดังตารางที่ 30 จากนั้นวิเคราะห์หาจุดที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีผลให้ค่าการเจริญสูงสุด โดยนำค่าไอรอนซิเทรต (X_1) พีเอช (X_2) และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3) ไปแทนค่าในสมการที่ 4 จะทำให้ได้ค่าการทำนายของการเจริญสูงสุด และจุดที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัย คือ ค่าที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นทำการตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมโดยการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการทำนายและข้อมูลที่ได้จากการทดลอง เพื่อพิสูจน์ว่าสมการถดถอยที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริง

จากการวิเคราะห์พบว่าจุดที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. braunii* J4-1 คือการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.8 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากสมการที่ 4 ทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าว มีผลทำให้สามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูงสุด 5.21 กรัมต่อลิตร แต่ค่าที่ได้จากการทดลองจริงคือ สามารถผลิตมวลเซลล์ได้ 5.74 กรัมต่อลิตร

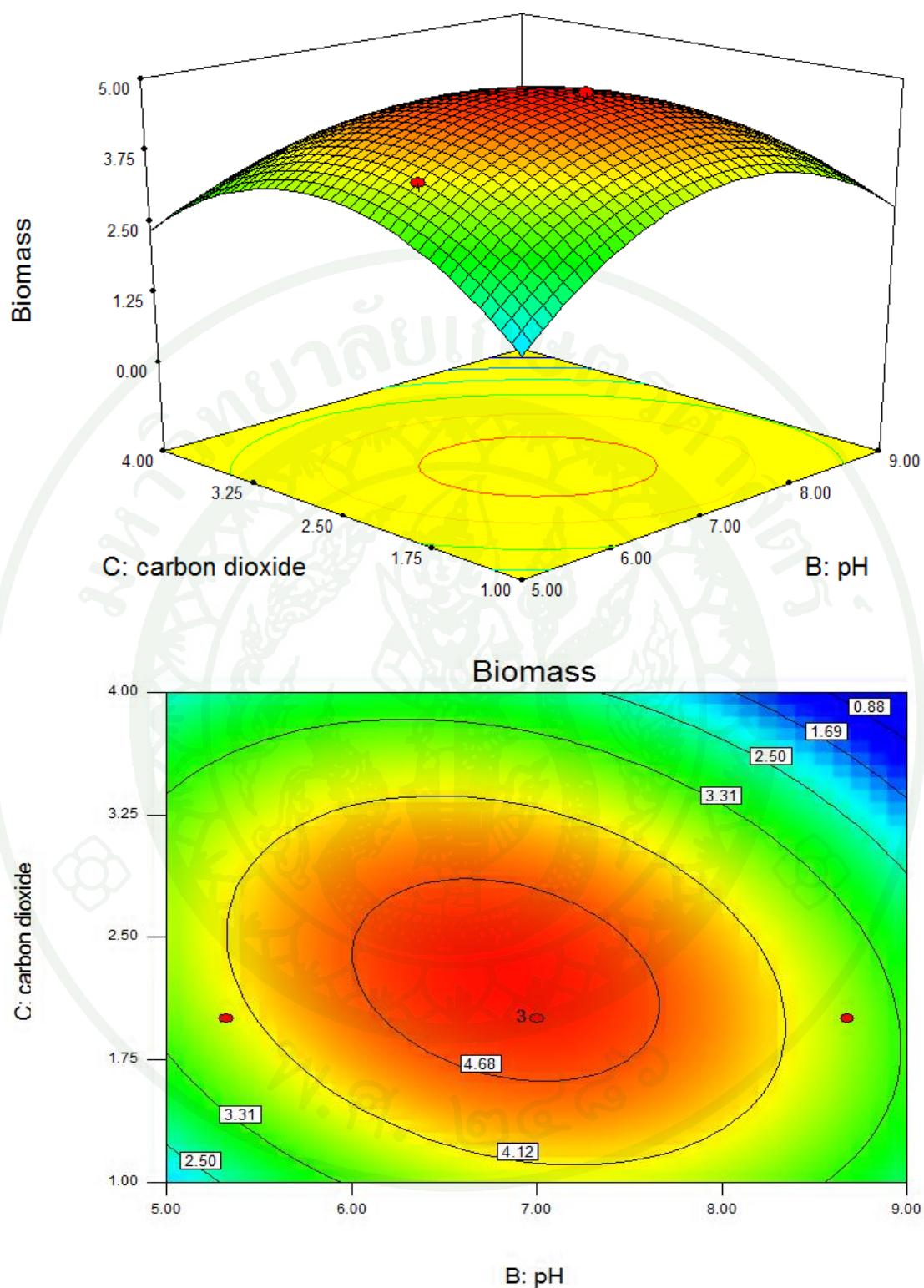
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่ามวลเซลล์ได้มากกว่าในงานวิจัยของ Dayananda *et al.* (2005) ทำการศึกษาผลกระทบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน ของ *B. braunii* สายพันธุ์ SAG 30.81 ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ RSM พบว่าโพแทสเซียมไนเตรดและไอรอนซิเตรดมีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอน ได้ค่ามวลเซลล์สูงสุด 0.65 กรัมต่อลิตร ในทำนองเดียวกันการผลิตมวลเซลล์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้สูงกว่าในรายงานของ Tran *et al.* (2010) ศึกษาผลกระทบขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตไขมันของ *B. braunii* LB572 โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) จากผลการวิจัยพบว่าโพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.058 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.09 กรัมต่อลิตร เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อเจริญและการผลิตไขมัน ได้ค่ามวลเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 4.57 กรัมต่อลิตร ยศวดี (2547) ได้ทำการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัททรอปิคอลแคนนิงจำกัด (มหาชน) ต่อ *B. braunii* โดยปรับพีเอชเท่ากับ 6.7 (มีค่าพีเอชค่อนข้างคงที่อยู่ระหว่าง 6.7 - 6.8) และ ไม่ปรับพีเอช (ค่าพีเอชเท่ากับ 7.8) พบว่าสาหร่ายเจริญสูงสุดในน้ำทิ้งที่มีการปรับพีเอช มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.62 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Vongprasert (1986) พบว่าสาหร่าย *B. braunii* เจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.7 ในขณะที่ Dayananda *et al.* (2007) ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ในอาหาร modified Chu 13 ที่มีค่าพีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญได้ดีไม่แตกต่างกันในทุกพีเอช มีค่ามวลเซลล์อยู่ระหว่าง 0.75 - 0.86 กรัมต่อลิตร ยังพบว่าความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย โดยเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าในสภาวะที่มีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) สาหร่ายมีมวลเซลล์และปริมาณไฮโดรคาร์บอนมากที่สุด



ภาพที่ 20 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต และพีเอชต่อการเจริญ



ภาพที่ 21 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลความเข้มข้นของไอออนซิเตรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญ



ภาพที่ 22 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของฟิเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญ

4.4.2 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ของสาหร่าย

B. braunii J4-1

การกำหนดระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยสำหรับการผลิตคลอโรฟิลล์ โดยนำแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 23, 24 และ 25 โดยกำหนดให้ A คือ ความเข้มข้นของไอรอนซีเทรต B คือ พีเอช และ C คือ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

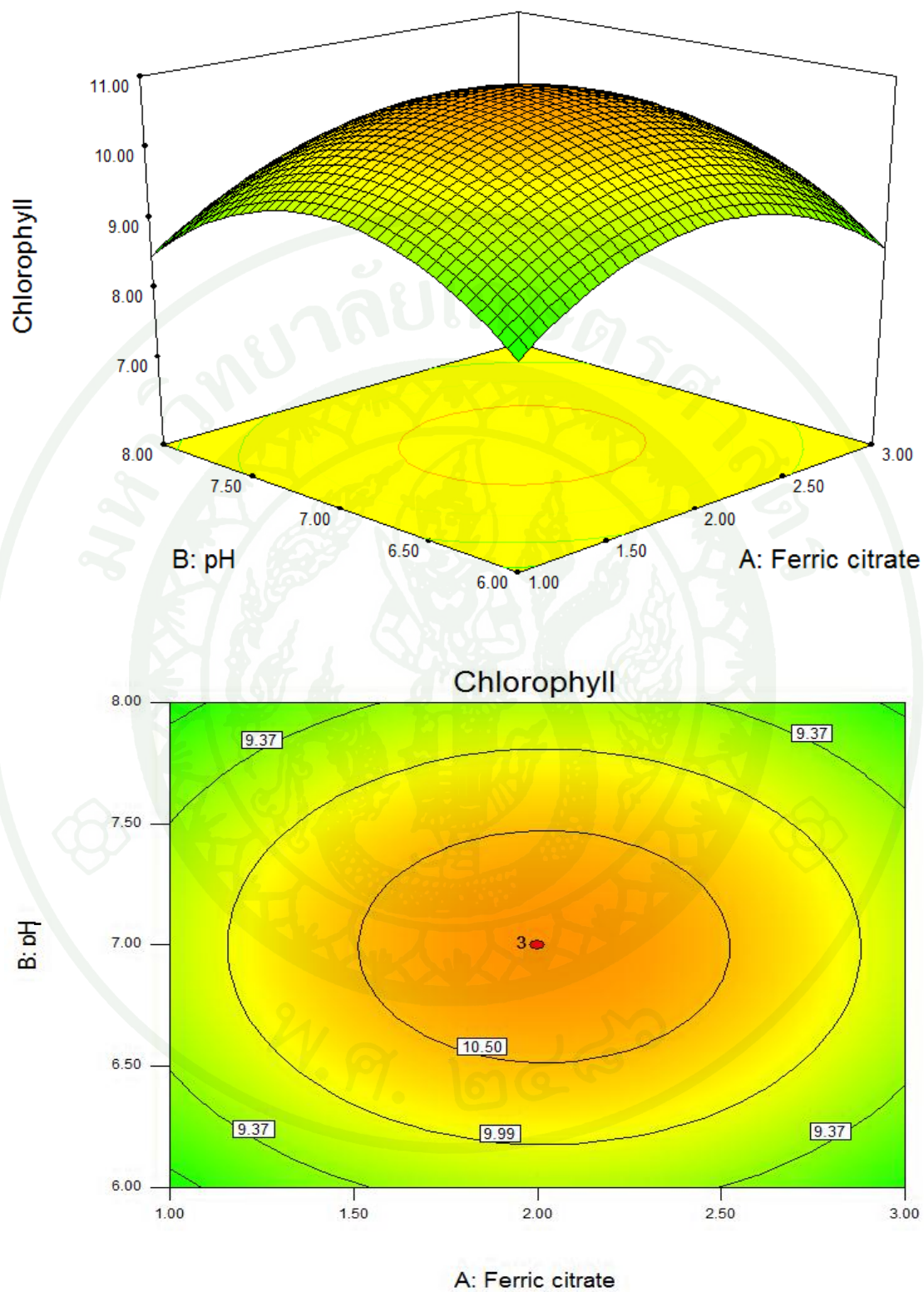
ภาพที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซีเทรต และ พีเอชต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ ภาพที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซีเทรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ ภาพที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ จากภาพพบว่าช่วงที่เหมาะสมของไอรอนซีเทรต 1.5 - 2.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงที่เหมาะสมของพีเอช 6.7 - 7.2 และช่วงที่เหมาะสมของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 1.8 - 2.5 % (v/v) แสดงดังตารางที่ 30 จากนั้นวิเคราะห์หาจุดที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีผลให้ค่าการเจริญสูงสุด โดยนำค่าไอรอนซีเทรต (X_1) พีเอช (X_2) และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3) เข้าไปแทนค่าในสมการที่ 5 จะทำให้ได้ค่าการทำนายของการผลิตคลอโรฟิลล์สูงสุด และจุดที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัย คือ ค่าที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นทำการตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมโดยการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการทำนายและข้อมูลที่ได้จากการทดลอง เพื่อพิสูจน์ว่าสมการถดถอยที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริง

จากการวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนองทั้ง 6 ภาพ พบว่าจุดที่เหมาะสมต่อการผลิตคลอโรฟิลล์ของ *B. braunii* J4-1 คือการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของไอรอนซีเทรต 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.8 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากสมการที่ 5 ทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าว มีผลทำให้สามารถผลิตคลอโรฟิลล์ได้สูงสุด 12.15 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ค่าที่ได้จากการทดลองจริงคือ สามารถผลิตคลอโรฟิลล์ได้ 13.51 มิลลิกรัมต่อลิตร

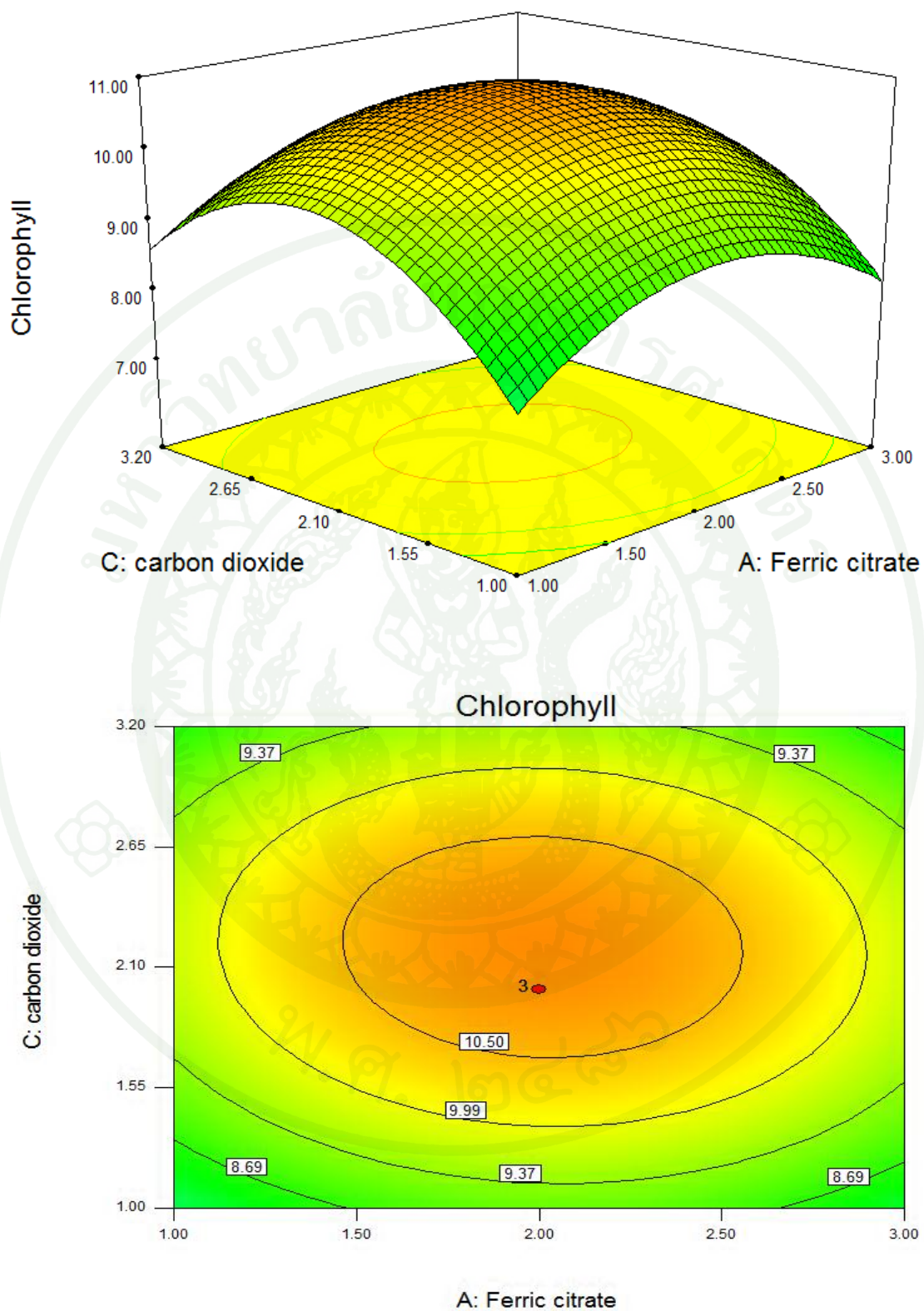
Tripathi *et al.* (2001) รายงานว่าความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ จะมีผลต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยเห็นได้ชัดว่าสาหร่ายต่างชนิดกันต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dayananda *et al.* (2007) พบว่าความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการผลิต

คลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *B. braunii* โดยเฉลี่ยในสถานะที่มีการให้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าในสถานะที่มีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) สาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด 9.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการรายงานของ Rao *et al.* (2007) ที่พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ 10.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

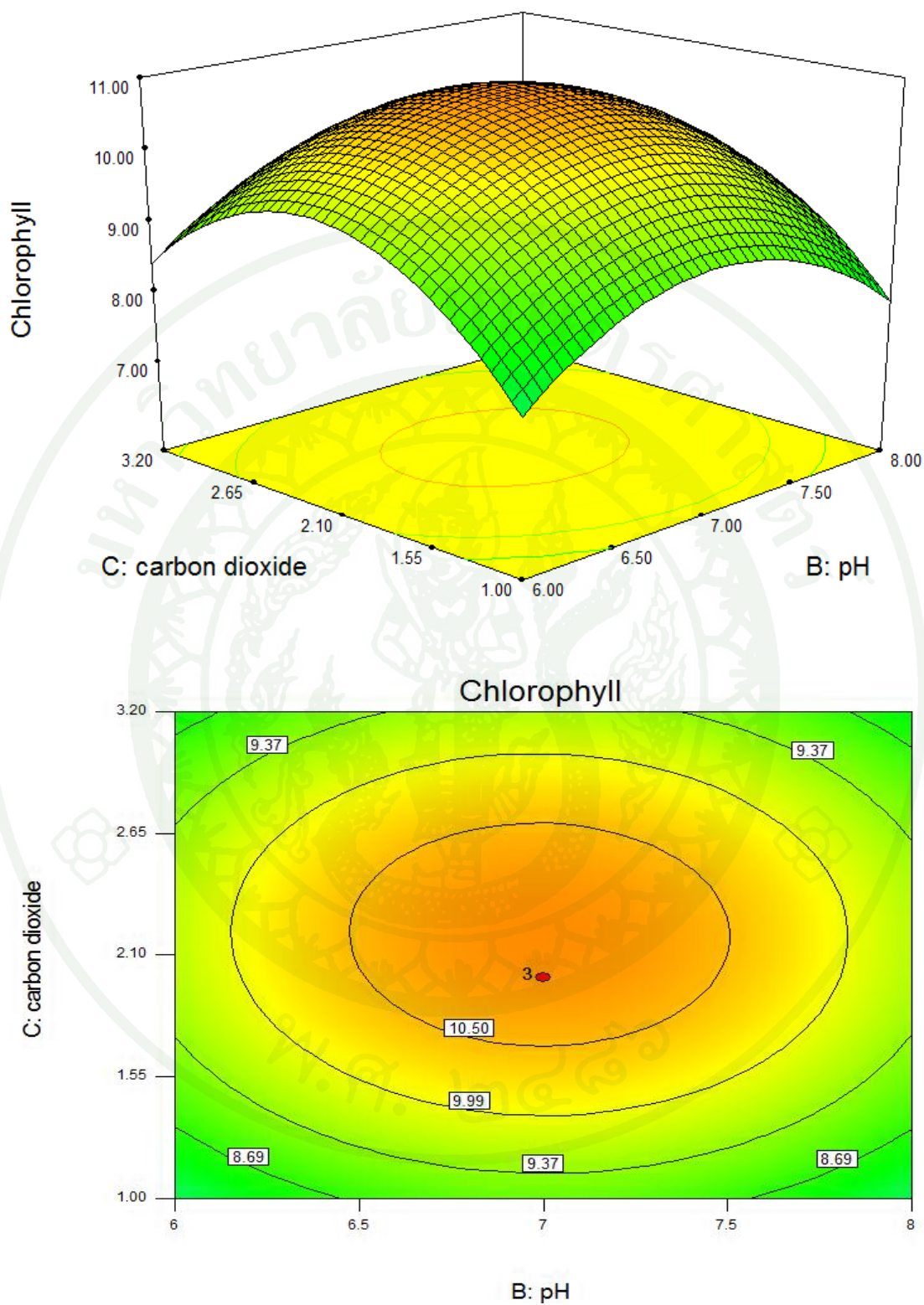




ภาพที่ 23 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของความเข้มข้นของไฮดรอนซิเตรต และฟิเอชต่อการผลิตคลอโรฟิลล์



ภาพที่ 24 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลความเข้มข้นของไอออนซิเตรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตคลอโรฟิลล์



ภาพที่ 25 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของฟิโอส และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตคลอโรฟิลล์

4.4.3 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

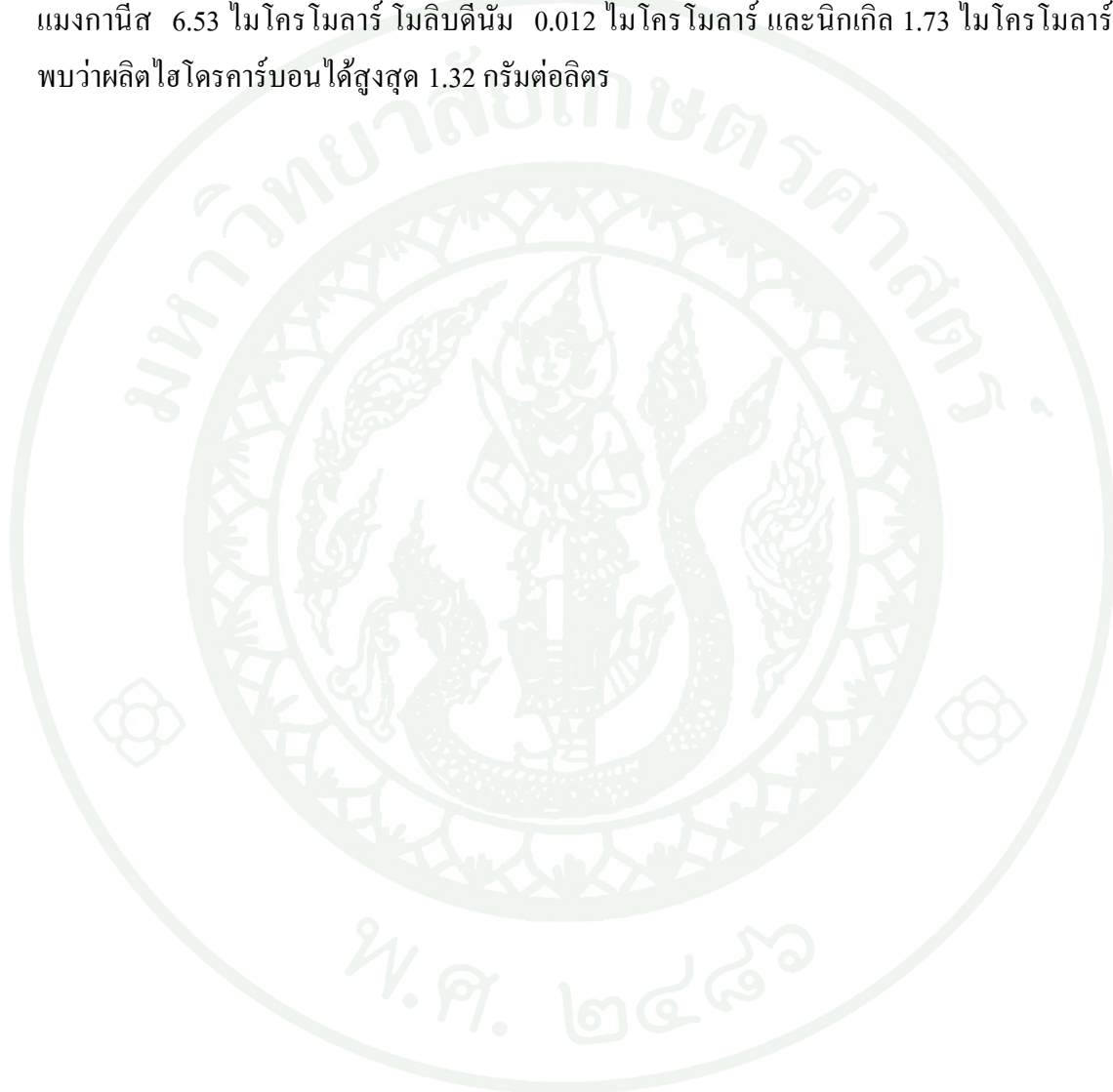
การกำหนดระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยสำหรับการผลิตไฮโดรคาร์บอน โดยนำแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 26, 27 และ 28 โดยกำหนดให้ A คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต B คือ พีเอช และ C คือ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

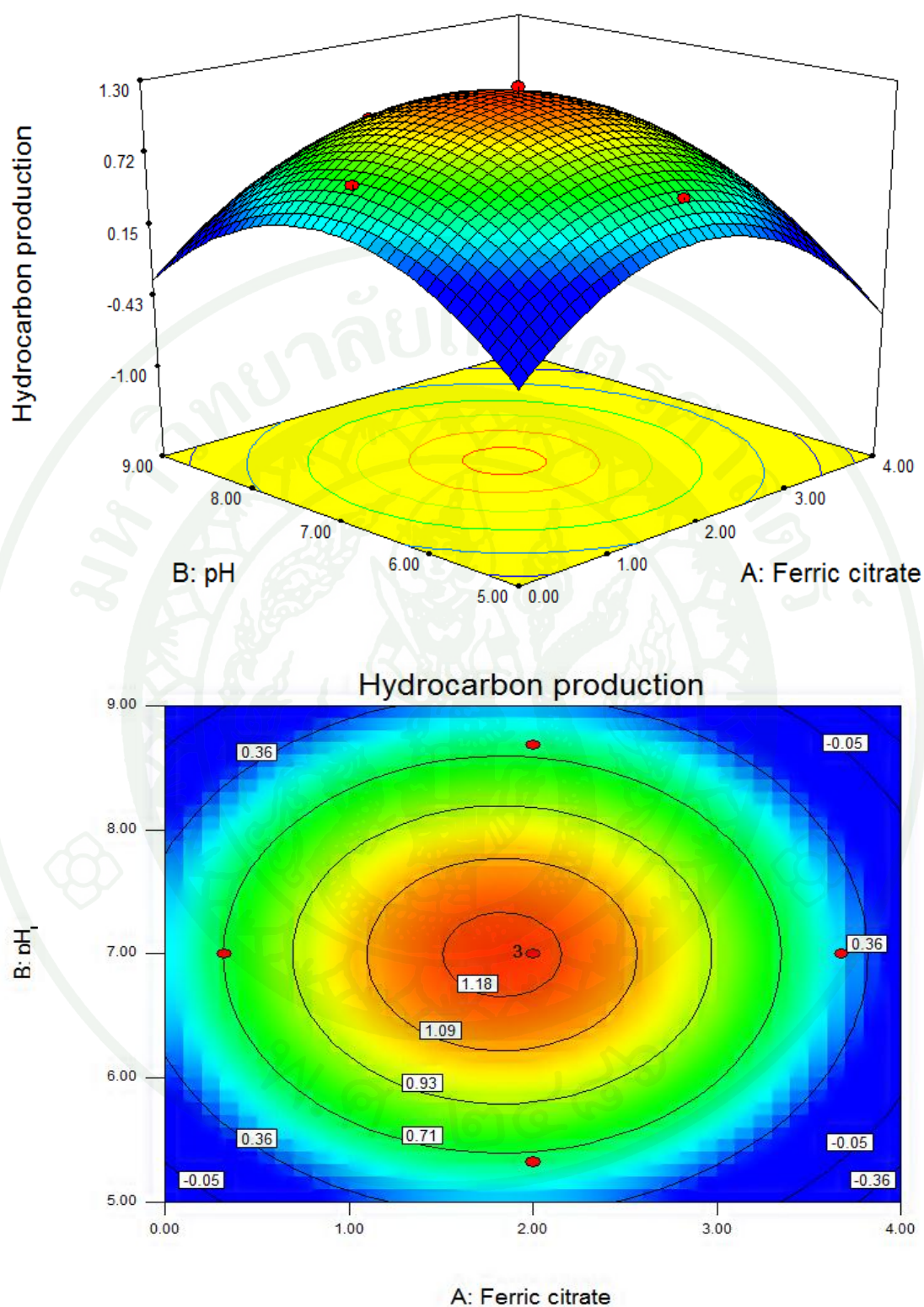
ภาพที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และพีเอชต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน ภาพที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน ภาพที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนจากภาพพบว่าช่วงที่เหมาะสมของไอรอนซิเทรต 1.5 - 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงที่เหมาะสมของพีเอช 6.5 - 7.2 และช่วงที่เหมาะสมของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.0 - 2.5 % (v/v) แสดงดังตารางที่ 30 จากนั้นวิเคราะห์หาจุดที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีผลให้ค่าการเจริญสูงสุด โดยนำค่าไอรอนซิเทรต (X_1) พีเอช (X_2) และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (X_3) เข้าไปแทนค่าในสมการที่ 6 จะทำให้ได้ค่าการทำนายของการผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงสุด และจุดที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัย คือ ค่าที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นทำการตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมโดยการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการทำนายและข้อมูลที่ได้จากการทดลอง เพื่อพิสูจน์ว่าสมการถดถอยที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริง

จากการวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนองทั้ง 6 ภาพ พบว่าจุดที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* J4-1 คือการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.8 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากสมการที่ 6 ทำนายว่าเมื่อใช้สภาวะดังกล่าว มีผลทำให้สามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ 1.42 กรัมต่อลิตร แต่ค่าที่ได้จากการทดลองจริงคือ สามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงสุด 1.44 กรัมต่อลิตร

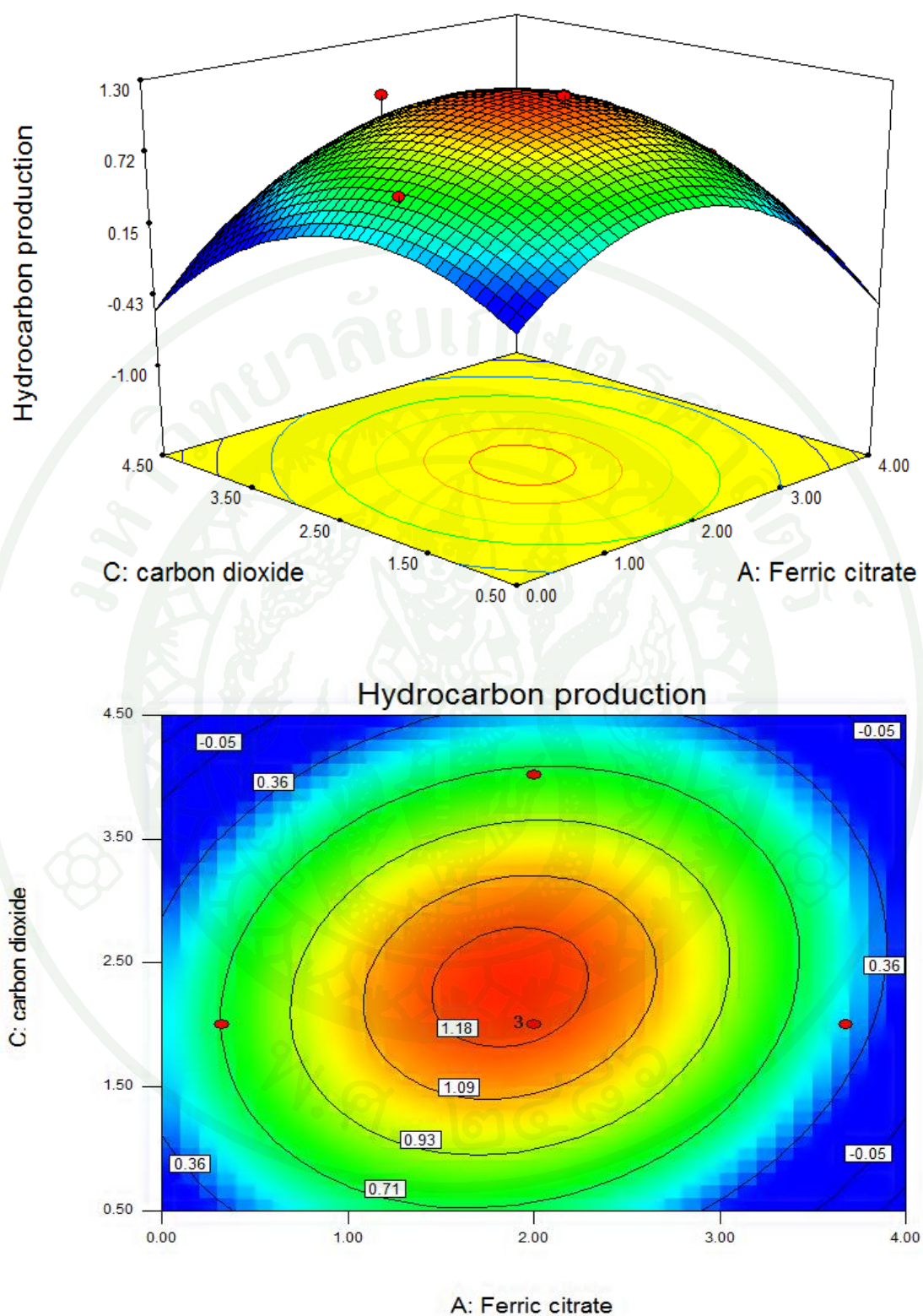
ปริมาณของเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อปริมาณไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก (Liu *et al.*, 2008) Ruangsomboon (2011) ศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของเหล็กที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่าย *B. braunii* KMITL 2 โดยมีปริมาณของเหล็กที่มีความเข้มข้น 9, 18, 27, 36 และ 45 มิลลิกรัมต่อลิตร (โดยใช้ FeSO_4 เป็นแหล่งของเหล็ก) พบว่า

ความเข้มข้นของเหล็ก 27 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณไขมันสูงสุด 0.08 กรัมต่อลิตร Song *et al.* (2012) รายงานการใช้ RSM เพื่อศึกษาความต้องการธาตุอาหารรองต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอนใน *B. braunii* UTEX 572 จาก model แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของธาตุเหล็ก แมงกานีส โมลิบดีนัม และนิกเกิล มีบทบาทอย่างมีนัยสำคัญในการเจริญของสาหร่ายและการผลิตไฮโดรคาร์บอน ระดับที่เหมาะสมของธาตุอาหารรอง สำหรับการผลิตไฮโดรคาร์บอนคือ เหล็ก 10.43 ไมโครโมลาร์ แมงกานีส 6.53 ไมโครโมลาร์ โมลิบดีนัม 0.012 ไมโครโมลาร์ และนิกเกิล 1.73 ไมโครโมลาร์ พบว่าผลิตไฮโดรคาร์บอนได้สูงสุด 1.32 กรัมต่อลิตร

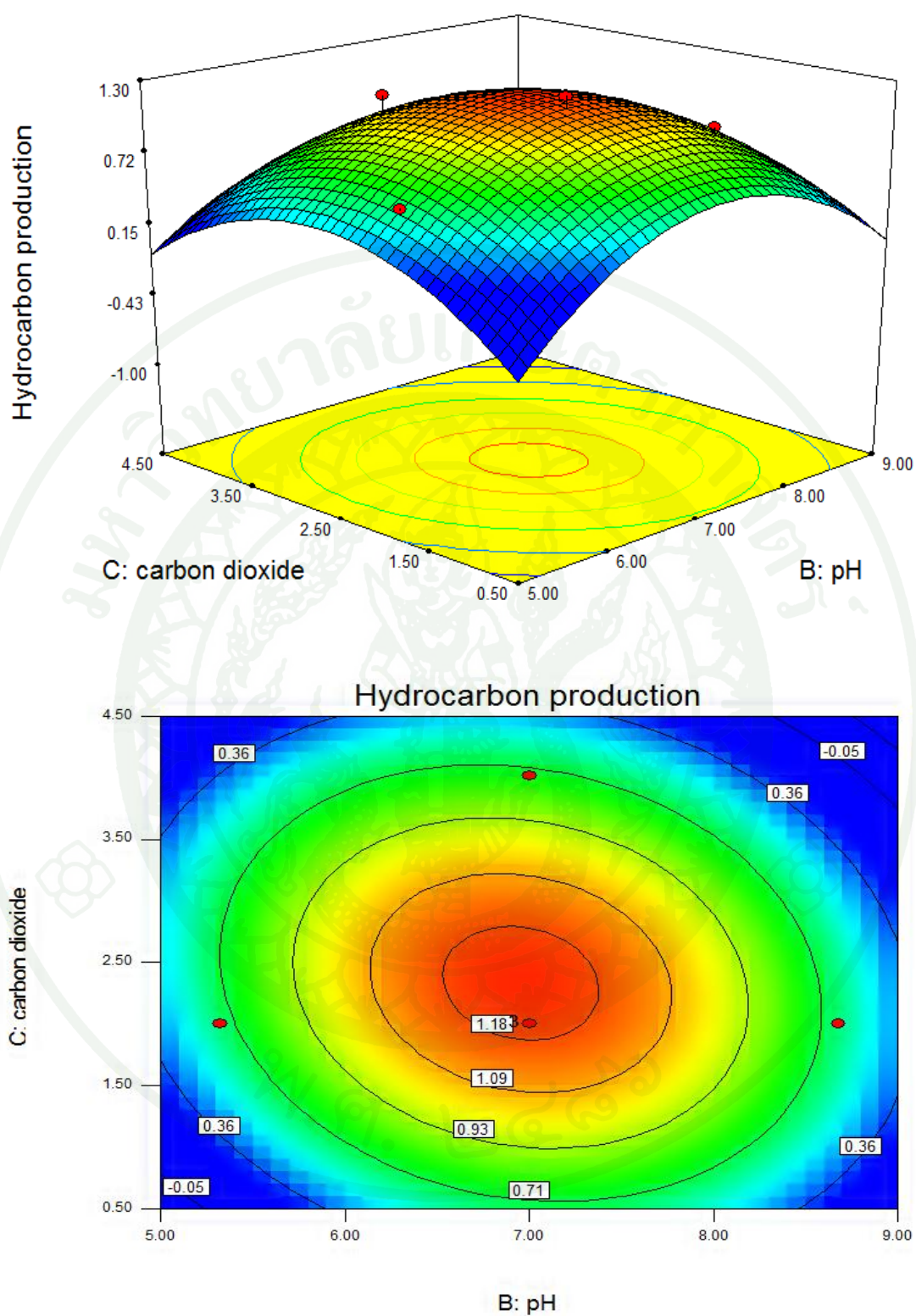




ภาพที่ 26 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของความเข้มข้นของไอออนซิเตรต และพีเอชต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน



ภาพที่ 27 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของผลความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน



ภาพที่ 28 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อตของพีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไฮโดรคาร์บอน

ตารางที่ 30 ช่วงที่เหมาะสมของปัจจัยที่ศึกษาสำหรับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน

Responses (Y)	Variable (X)		
	Fe-citrate (X ₁) mg/L	pH (X ₂)	CO ₂ (X ₃) % (v/v)
Biomass	1.5 - 2.2	6.5 - 7.2	2.0 - 2.5
Total chlorophyll	1.5 - 2.3	6.7 - 7.2	1.8 - 2.5
Hydrocarbon production	1.5 - 2.2	6.5 - 7.2	2.0 - 2.5

4.5 การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมกับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนโดยการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการทดลองกับข้อมูลที่ได้จากการทำนาย ดังแสดงในตารางที่ 31 พบว่าค่าเบี่ยงเบนของมวลเซลล์ระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลองและข้อมูลที่ได้จากการทำนายมีค่า 10.17 เปอร์เซ็นต์ ค่าเบี่ยงเบนของการผลิตคลอโรฟิลล์เท่ากับ 11.19 เปอร์เซ็นต์ และค่าเบี่ยงเบนของการผลิตไฮโดรคาร์บอนมีค่า 1.41 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 คือ การเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของไอรอนซีเทรต 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.8 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 31 การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสำหรับการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* J4-1

Response	Predicted	Experimental	Error (%)
Biomass	5.21 g/L	5.74 g/L	10.17
Total chlorophyll	12.15 mg/L	13.51 mg/L	11.19
Hydrocarbon production	1.42 g/L	1.44 g/L	1.41

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ทำการคัดแยกและคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* จากแหล่งน้ำต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ได้ทั้งสิ้น 206 ไอโซเลต ในการคัดเลือกรุ่นปฐมภูมิและทุติยภูมิ โดยทดสอบคุณสมบัติในการสร้างไฮโดรคาร์บอน พบว่า *B. braunii* J4-1 ซึ่งแยกได้จากอ่างเก็บน้ำห้วยสะพาน อำเภอสรีราชา จังหวัดชลบุรี มีศักยภาพในการเจริญและการผลิตไฮโดรคาร์บอนสูงสุด คือมีการเจริญ 2.91 กรัมต่อลิตร ผลิตไฮโดรคาร์บอน 0.670 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงคัดเลือกมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

การศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* J4-1 จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 8 สูตร พบว่าอาหาร AF-6 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดที่สนับสนุนการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย โดยมีมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.324 กรัมต่อลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ 0.381 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณไฮโดรคาร์บอน 0.731 กรัมต่อลิตร

การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* J4-1 โดยใช้ Plackett-Burman design มีปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้งสิ้น 7 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรด ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต พีเอช ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และความเข้มของแสง พบว่ามีจำนวน 3 ปัจจัย เป็นปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต พีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลในทางบวกต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอน ส่วนพีเอชส่งผลในทางลบ โดยมีมวลเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุด ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรด (NaNO_3) 160 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไอรอนซิเตรต (Fe-citrate) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช (pH) 8 ความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 0 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 3 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มของแสง (Light) 4000 ลักซ์ มีการผลิตมวลเซลล์ 3.000 กรัมต่อลิตร คลอโรฟิลล์ 0.563 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโดรคาร์บอน 0.595 กรัมต่อลิตร

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* J4-1 โดยกำหนดปัจจัยที่ต้องการศึกษา 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต (มิลลิกรัมต่อลิตร) พีเอช และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้แผนการทดลอง CCD และ RSM สามารถออกแบบการทดลองได้ 17 ชุดการทดลอง จากนั้นนำค่าการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนที่ได้จากทั้ง 17 ชุดการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ได้สมการการผลิตมวลเซลล์ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนดังนี้

$$Y_{\text{biomass}} = -20.2839 + 1.1044X_1 + 5.66321X_2 + 4.23862X_3 + 0.044105X_1X_2 + 0.26654X_1X_3 - 0.25474X_2X_3 - 0.4958X_1^2 - 0.37917X_2^2 - 0.67734X_3^2$$

$$Y_{\text{Chlorophyll}} = -58.32149 + 4.49111X_1 + 16.63383X_2 + 5.93025X_3 - 2.80E-03X_1X_2 - 0.10361X_1X_3 - 0.037124X_2X_3 - 1.05642X_1^2 - 1.18366X_2^2 - 1.24607X_3^2$$

$$Y_{\text{Hydrocarbon}} = -10.23013 + 0.67081X_1 + 2.78796X_2 + 0.97705X_3 + 5.20E-04X_1X_2 + 0.054772X_1X_3 - 0.04667X_2X_3 - 0.21397X_1^2 - 0.19274X_2^2 - 0.16338X_3^2$$

โดย Y_{biomass} คือ ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร), $Y_{\text{Chlorophyll}}$ คือ ค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร), $Y_{\text{Hydrocarbon}}$ คือ ค่าปริมาณไฮโดรคาร์บอน (กรัมต่อลิตร) X_1 คือ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต (มิลลิกรัมต่อลิตร) X_2 คือพีเอช และ X_3 คือความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (เปอร์เซ็นต์)

จากสมการข้างต้นนำไปหากราฟพื้นผิวการตอบสนอง ซึ่งจากกราฟสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ดังนี้ ความเข้มข้นของไอรอนซิเทรต 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 6.8 และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้มวลเซลล์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุดเท่ากับ 5.74 กรัมต่อลิตร 13.51 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาและการทดลองในครั้งนี้สามารถคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ และสามารถพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ การผลิตคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย *B. braunii* J4-1 โดยการนำวิธีการวางแผนการทดลองทางสถิติมาช่วยทำให้ลดจำนวนสิ่งทดลอง และผลการทดลองที่ได้อาจจะนำมาใช้เป็นประโยชน์ในทางด้านการพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการผลิตไบโอดีเซล



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นวรรตน์ จันทรกระเวน. 2548. การออกแบบการทดลองเพื่อปรับปรุงคุณภาพของแรงเหวี่ยงลูกบอล
ในกระบวนการเชื่อมวงจร: กรณีศึกษาโรงงานผลิตเซมิคอนดักเตอร์. วิทยานิพนธ์ปริญญา
โท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พวงผกา คำรัตน์ และ พิมพรรณ ตันสกุล. 2549. ผลของช่วงแสงต่อการเจริญเติบโตและปริมาณ
ไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูป
อาหารทะเล. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 28 (1): 99-105.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. พิมพ์ครั้งที่ 1 ภาควิชาเทคโนโลยี
การพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ยศวดี สวัสดิรักษา. 2547. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำ
ทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฤทัยรัตน์ วิศาสนุวรรณ. 2548. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. โดย
ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเพาะเลี้ยงในปฏิกรณ์ชีวภาพแสง.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.

วลัยลักษณ์ บุญชุม. 2549. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* Kutz. ในน้ำกากส่าเหล้า
เพื่อหาความเป็นไปได้ในการผลิตไฮโดรคาร์บอน. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิรัช พานิชวงค์. 2546. การวิเคราะห์ถดถอย. ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์.
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ.

- อนุวัตร แจ่มชัด. 2549. สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2544. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- Aaronson, S., T. Berner, K. Gold, L. Kushner, NJ. Patni, A. Repak and D. Rubin. 1983. Some observations on the green planktonic alga, *Botryococcus braunii* and its bloom form. **J. Plankton Res.** 5: 693-700.
- Adam, P., P. Schaeffer and P. Albrecht. 2006. C₄₀ monoaromatic lycopene derivatives as indicators of the contribution of the alga *Botryococcus braunii* race L to the organic matter of Messel oil shale (Eocene, Germany). **Org. Geochem.** 37: 584-596.
- Anonymous. 2008. **Optimization Designs: 2 Building the Design.**
Source: <http://www.prismtc.co.uk>, September 23, 2008.
- Antolin, G., F.V. Tinaut, Y. Bricono, V. Castano, C. Perez and A.I. Reminez. 2002. Optimization of biodiesel production by sunflower oil transesterification. **Bioresour. Technol.** 83: 111-114.
- Audino, M., K. Grice, R. Alexander and R.I. Kagi. 2002. Macrocyclic alkanes in crude oils from the algaenan of *Botryococcus braunii*. **Org. Geochem.** 33: 979-984.
- Azov, Y. 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. **Appl. Environ. Microb.** 43(6): 1300-1306.
- Banerjee, A., R. Sharma, Y. Chisti and U.C Banerjee. 2002. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Crit. Rev. Biotechnol.** 22 (3): 245-279.

- Becker, E.W. 1994. Chemical composition. Application of algae, pp. 177-195. *In* E.W. Becker, ed. **Microalgae; Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University Press London.
- Behrenfeld, M.J., K. Worthington, R.M. Sherrell, F.P. Chavez, P. Strutton, M. McPhaden and D.M. Shea. 2006. Controls on tropical Pacific Ocean productivity revealed through nutrient stress diagnostics. **Nature**. 442: 1025-1028.
- Belarbi, E.H., E. Molina Grima and Y. Chiti. 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentanoic acid esters from microalgae and fish oil. **Enzyme Microbiol. Technol.** 26: 516-259.
- Berkaloff, C., B. Rousseau, A. Coutte, E. Casadevall, P. Metzger and C. Chirac. 1984. Variability of wall structure and hydrocarbon nature in different strains of *Botryococcus braunii* Kutz. **J. Phycol.** 20: 377-89.
- Blackburn, K. B. 1936. **Botryococcus and algal coal**. Trans. R. Soc. Edin. 58: 841.
- Bohme, H., K.J. Kunert and P. Boger. 1978. The role of plastidic cytochrome c in algal electron transport and phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta**. 501: 275-285.
- Box, G., E.P. William, G. Hunter and J. Stuart Hunter. 1978. **Statistics for experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building**. New York: Wiley.
- Brassell, S.C., G. Eglinton and F.J. Mo. 1986. Biological marker compounds as indicator of the depositional history of the Maoming oil shale. **Org. Geochem.** 10: 927-941.
- Brock, T.D., D.W. Smith and M.T. Madigan. 1984. **Biology of Microorganisms**. U.S.A.: Prentice-Hall Inc. pp. 130-223.
- Brown, A.C. and B.A. Knights. 1969. Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**. 8: 543-547.

Cane, R.F. 1977. Coorongite, balkashite and related substances: an annotated bibliography.

Trans. R. Soc. S. Aust. 101: 153–154.

Casadevall, E., D. Dif, C. Largeau, C. Gudin, D. Chaumont and O. Desanti. 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell structure, and phosphate nutrition. **Biotechnol. Bioeng.** 27: 286-195.

Celia, Y.C. and G. D. Edward. 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine. Ecology. Progress. Series.** 109: 83–94.

ChanYong, T.P., C. Largeau and E. Casadevall. 1986. Biosynthesis of non-isoprenoid hydrocarbons by the microalga *Botryococcus braunii*: evidence for an elongation decarboxylation mechanism; activation of decarboxylation. **Nouv. J. Chim.** 10: 701–707.

Chelf, P. 1990. Environment control of lipid and biomass production in two diatom species. **J. Appl. Phycol.** 2: 121-129.

Chen, Y.F. 2011. Production of Biodiesel from Algal Biomass: Current Perspectives and Future. Academic Press: Waltham, MA, USA. p. 399.

Chirac, C., E. Casadevall, C. Largeau and P. Metzger. 1985. Bacterial influence upon growth and hydrocarbon production of the green alga *Botryococcus braunii*. **J. Phycol.** 21: 380–387.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol. Adv.** 25: 294-306.

Cox, R.E., A.L. Burlingame, D.M. Wilson, G. Eglinton and J.R. Maxwell. 1973. Botryococcene a tetramethylated acyclic triterpenoid of algal origin. **JCS. Chem. Commun.** 12: 284-285.

Croft, MT., MJ. Warren and AG. Smith. 2006. Algae need their vitamins. **Eukaryot. Cell.** 5: 1175-1183.

Danielo, O. 2005. **An algae-based fuel. Biofuture.** No. 255. [online]. Available: <http://www.greenfuelonline.com/news/algafuel.pdf>, 21 August, 2008.

Darley, W.M. 1982. Algal biology a physiological approach, pp. 21-53. In Wikinson, J.F. ed. **Basic Microbiology.** London: Blackwell scientific publication.

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

Dayananda, C., R. Sarada, T.R. Shamala and G.A. Ravishanhar. 2006. Influence of nitrogen on growth, hydrocarbon and fatty acid production by *Botryococcus braunii*. **Asian J. Plant Sci.** 5(5): 799-804.

Dayananda, C., R. Sarada, V. Kumar and G.A. Ravishanhar. 2007. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. **J. Biotechnol.** 10: 78-91.

De Clercq, P.J. 1997. Biotin: a timeless challenge for total synthesis. **Chem. Rev.** 97: 1755–1792.

Demirbas, M.F. 2010. Microalgae as a feedstock for biodiesel. **Energy Educ. Sci. Technol. Part A.** 25: 31-43.

Demirbas, A. and A.F. Demribas. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energ. Convers. Manage.** 52: 163-170.

- Derenne, S., C. Largeau, M. Hetényi, A. Brukner-Wein, J. Connan and B. Lugardon. 1997. Chemical structure of the organic matter in a Pliocene maar-type oil shale. Implicated *Botryococcus* races and formation pathways. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. 61: 1879–1889.
- Desouky, S.A. 2011. Response of Vitamins on the Growth Criteria and Some Metabolic Activities of Stressed *Scenedesmus Obliquus* Cultures. **Aust. J. Basic Appl. Sci.** 5(6): 89-99.
- Draper, N.R. 2006. **“Response surface design.” Encyclopedia of statistical sciences**. 2th ed. Edited by Samuel Kotz. New York: Wiley Press.
- Gelpi, E. and J. Oro. 1968. Olefins of high molecular weight in two microscopic algae. **Science**. 161 (3842): 700-702.
- Gelpi, E., H. Schneider., J. Mann and J. Oro. 1970. Hydrocarbon of geochemical significance in microscopic algae. **Phytochemistry**. 9: 603-12.
- Gladue, R.R.L. 1991. Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds, pp. 275-286. *In* Rotifer and Microalgae Culture System. **Proceeding of a U.S.-Asia Workshop. Honolulu**. The Oceanic Institute.
- Glikson, M., K. Lindsay and J. Saxby. 1989. *Botryococcus*—a planktonic green alga, the source of petroleum through the ages: transmission electron microscopical studies of oil shales and petroleum source rocks. **Org. Geochem.** 14: 595-608.
- Greene, R.M., R.J. Geider and P.G. Falkowski. 1991. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. **Limnol. Oceanogr.** 36: 1772-1782.
- Gu, P., Y. Ishii, T.A. Spencer and I. Shechter. 1998. Function-structure studies and identification of three enzyme domain involved in the catalytic activity in rat hepatic squalene synthase. **J. Biol. Chem.** 273: 12515.

- Guiry, M.D. and G.M. Guiry. 2010. **Algaebase World-wild electronic publication. National University of Ireland, Galway.** [online]. Available: <http://www.algaebase.org>, March 12, 2010.
- Hillen, L.W., G. Pollard, L.W. Wake and N. White. 1982. Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. **Biotechnol. Bioeng.** 24:193–205.
- Holub, B.J. and C.M. Skeaff. 1987. Nutritional regulation of cellular phosphatidylinositol. **Methods in Enzymology.** 141: 234-244.
- Hu, R. 1999. **Food Product Design: Computer-Aided Statistical Approach.** Technomic Publishing Co., Ltd., Pennsylvania.
- Hu, Q., Y. Zarmi and A. Richmond. 1998. Combined effect of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **Eur. J. Phycol.** 33: 165-171.
- Huang, Z., C.D. Poulter, F.R. Wolf, T.C. Somers and J.D. White. 1988. Braunicene, a novel cyclic C32 isoprenoid from *Botryococcus braunii*. **J. Am. Chem. Soc.** 110: 3959.
- Huang, Z. and C.D. Poulter. 1989. Stereochemical studies of botryococcene biosynthesis: analogies between 1'-1 and 1'-3 condensations in isoprenoid pathway. **J. Am. Chem. Soc.** 111: 2713-2715.
- Inoue, S., Y. Dote, S. Sawayama, T. Minowa, T. Ogi and S. Yokoyama. 1994a. Analysis of oil derived from liquefaction of *Botryococcus braunii*. **Biomass Bioenerg.** 6: 269.
- Inone, H., T. Korenaga, H. Sagami and K. Ogura. 1994b. Phosphorylation of farnesol by a cell free system of *Botryococcus braunii*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 200: 1036.

- Kanz, T. and H.C. Bold. 1969. **In: Physiological Studies, Morphological and Taxonomical Investigation of *Nostoc* and *Anabaena* in Culture.** Austin, TX: University of Texas, Publication No. 6924; 1969.
- Kaplan, D.S., A.E. Richmond, Z. Dubinsky and S. Aaronson. 1986. Algal nutrition, pp. 147-198. *In* A. Richmond, ed. **Handbook of microalgal Mass Culture.** CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Kato, S. 1982. Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* Ehrb. (Euglenophyceae). **Jap. J. Phycol.** 30: 63-67. (in Japanese with English summary).
- Kessler, J.O. 1985. Co-operative and concentrative phenomena of swimming microorganism. **Contemp. Phy.** 26: 147-166.
- Khuri, A.I. and J.A. Cornell. 1987. **Response surface designs and analyses.** Marcel Dekber, New York.
- Kitazato, H., S. Asaoka and H. Iwamoto. 1989. Catalytic cracking of hydrocarbons from microalgae. **Sekiyu Gakkaishi.** 32: 28-34.
- Knights, B.A., A.C. Brown, E. Conway and B.S. Middleditch. 1970. Hydrocarbons from the green from of the freshwater alga *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry.** 9: 1317-1324.
- Kodama, M., H. Ikemoto and S. Miyachi. 1993. A new species of highly CO₂- tolerant fast growing marine microalga suitable for high density culture. **J. Mar. Biotech.** 1: 21-25.
- Kojima, E. and K. Zhang. 1999. Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors. **J. Biosci. Bioeng.** 87(6): 811-815.

- Lang, X., A.K. Dalai, N.N. Bakhshi, M.J. Reaney and P.B. Hertz. 2001. Preparation and characterization of bio-diesel from various bio-oils. **Bioresour. Technol.** 80: 53-62.
- Largeau, C., E. Casadevall, C. Berkaloff and P. Dhamelincourt. 1980. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**. 19: 1043-1051.
- Lehman, L.T. 1978. Enhanced transport of inorganic carbon into algal cells and its implications for the biological fixation of carbon. **J. Phycol.** 14: 33-42.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigment of photosynthetic biomembranes, pp. 350-382. In L. Packer and R. Douce, eds. **Method. Enzymol.** Academic Press, London.
- Liu, Z.Y., G.C. Wang and B.C. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresour. Technol.** 99 (11): 4717-4722.
- Lupi, F.M., H.M.L. Fernandes, M.M. Tome, I. Sa-Correia and J.M. Novais. 1994. Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 546-550.
- Mangold, HK. and F. Paltauf. 1983. **Ether lipids, biochemical and biomedical aspects.** Academic Press, New York.
- Mastalerz, M. and J.C. Hower. 1996. Elemental composition and molecular structure of *Botryococcus* alginite in Westphalian cannel coals from Kentucky. **Org. Geochem.** 24: 301-308.
- Matting, F.B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. **J. Ind. Microbiol.** 17: 477-89.

- Maxwell, J.R., A.G. Douglas, G. Eglinton and Mc. Cormick. 1968. The botryococcenes hydrocarbons of novel structure from the alga *Botryococcus braunii*, Kutzing. **Phytochemistry**. 7: 2157-2171.
- Mc Kirdy, D.M., R.E. Cox, J.K. Volkman and V.J. Howell. 1986. Botryococcenes in a new class of Australian non-marine crude oils. **Nature**. 320: 57-59.
- Metzger, P. 1993. n-Heptacosatrienes and tetraenes from a Bolivian strain of *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**. 33: 1125-1128.
- _____. 1994. Phenolic ether lipids with an n-alkenylresorcinol moiety from a Bolivian strain of *Botryococcus braunii* (A race). **Phytochemistry**. 36: 195-212.
- _____. 1999. Two terpenoid diepoxides from the green microalga *Botryococcus braunii*: their biomimetic conversion to tetrahydrofurans and tetrahydropyrans. **Tetrahedron Lett.** 55: 167-176.
- _____ and E. Casadevall. 1983. Structure de trois nouveaux botryococcènes synthétisés par une souche de *Botryococcus braunii* cultivée en laboratoire. **Tetrahedron Lett.** 24: 4013-4016.
- _____ and E. Casadevall. 1987. Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*. **Tetrahedron Lett.** 24: 2305.
- _____ and E. Casadevall. 1991. Botryococcoid ethers, ether lipids from *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**. 30: 1439-1444.
- _____ and E. Casadevall. 1992. Ether lipids from *Botryococcus braunii* and their biosynthesis. **Phytochemistry**. 31: 2341-2349.

Metzger, P. and C. Largeau. 1999. Chemicals of *Botryococcus braunii*, pp. 205-260. In: Z. Cohen, ed. **Chemicals from microalgae**. Taylor & Francis, London.

_____ and C. Largeau. 2005. *Botryococcus braunii* : a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. **Appl. Microbiol. Biot.** 66 : 486-496.

_____, E. Casadevall., M.J. Pouet and Y. Pouet. 1985. Structure of some botryococcenes: branched hydrocarbons from the B race of the green alga *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**. 24: 2995.

_____, M. David and E. Casadevall. 1987. Biosynthesis of triterpenoid hydrocarbons in the B race of green alga *Botryococcus braunii*. Sites of production and nature of methylating agent. **Phytochemistry**. 26: 129.

_____, M. David and A. Coute. 1988. Botryococcene distribution in stains of the green alga *Botryococcus braunii* sites of production and nature of methylating agent, **Phytochemistry**. 26: 129.

_____, C. Largeau and E. Casadevall. 1991. Lipids and macromolecular lipid of the hydrocarbon-rich microalgae *Botryococcus braunii*. **Prog Chem Org Nat Prod**. 57: 1-70.

_____ and M.N. Rager. 2002. Lycopaneroles H, two high molecular weight ether lipids from *Botryococcus braunii* comprising an α -tocopherol unit. **Tetrahedron Lett.** 43: 2377-2380.

_____, P., Y. Pouet and R. Summons. 1997. Chemotaxonomic evidence for the similarity between *Botryococcus braunii* L race and *Botryococcus neglectus*. **Phytochemistry**. 44: 1071-1075.

- Metzger, P., M.N. Rager and C. Largeau. 2002. Botryolins A and B, two tetramethylsqualene triethers from the green microalga *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**. 59: 839-843.
- _____, M.N. Rager., N. Sellier and C. Largeau. 2003. Lycopaneroles I-L: four new tetraterpenoid ethers from the green microalga *Botryococcus braunii*. **J. Nat. Prod.** 66: 772-778.
- _____, J. Templier, C. Largeau and E. Casadevall. 1986. An nalkatriene and some n-alkadienes from the A race of the green alga *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry**. 25: 1869-1872.
- Miao, X., Q. Wu and C. Yang. 2004. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. **J. Anal. Appl. Pyrolysis**. 71: 855-865.
- Moldowan, J.M. and W.K. Seifert. 1980. First discovery of botryococcane in petroleum. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.** 19: 912-914.
- Morales, F., A. Abadia and J. Abadia. 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. **Plant. Physiol.** 97: 886-893.
- Motola, S. and S.N. Agharkar. 1992. Preformulation research of parenteral medications, pp. 115-172. In K. E. Avis, H. A. Lieberman and L. Lachman, eds. **Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications**. New York: Marcel Dekker.
- Okada S., I. Tonegawa, H. Matsuda, M. Murakami and K. Yamaguchi. 1997. Braunixanthins 1 and 2, new carotenoids from the green micoalga *Botryococcus braunii*. **Tetrahedron**. 53: 11307-11316.

- Ogbonna, J.C., H. Masui and H. Tanaka. 1997. Sequential heterotrophic autotrophic cultivation an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. **J. Appl. Phycol.** 9: 359-366.
- Oquisr, G. 1974. Iron deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*: changes in pigmentation and photosynthesis. **J. Plant. Physiol.** 30: 30-37.
- Payer, H.D. 1971. **Algae project 1970-1971**, Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok, pp. 55.
- Plackett, R.L. and J.P. Burman. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika.** 33: 305-325.
- Poulter, C. D. and J.M. Hughes. 1977. Model studies of the biosynthesis of non-head to tail terpenes. Stereochemistry of ionization for N-methyl-4-[(1S, 1'R, 3'R)-[1-2H] chrysanthemyloxy]- pyridinium iodide. **J. Am. Chem. Soc.** 99: 3824.
- Raven, J.A. 1988. The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon, and nitrogen sources. **New Phytol.** 109: 279-287.
- Raven, J.A. 1990. Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and C assimilation pathway. **New Phytol.** 116
- Rager, M.N. and P. Metzger. 2000. Six novel tetraterpenoid ethers, lycopanerols B-G, and some other constituents from the green microalga *Botryococcus braunii*. **Phytochem.** 54: 427-437.
- Ranga. R.A., R. Sarada and G.A. Ravishankar. 2007. Influence of CO₂ on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. **J. Microbiol. Biotechn.** 17(3): 414-419.

- Rao. A.R., C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala and G.A. Ravishankar. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. **Biores. Technol.** 98: 560-564.
- Ratledge, C. 1991. Microorganisms for lipids. **Acta Biotechnol.** 11: 429-438.
- Richmond, A. 1986. **Handbook of Microalgal Mass Culture.** CRC Press. Inc Boca Raton Florida.
- Rousch, J.M., S.E. Bingham and M.R. Sommerfeld. 2003. Change in fatty acid profiles of thermo-intolerant and thermo tolerant marine diatoms during temperature stress. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 295: 145-156.
- Ruangsomboon, S. 2011. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. **Bioresour. Technol.** doi: 10.1016
- Sawayama, S., S. Inoue and S. Yokoyama. 1994. Continuous culture of hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 41: 729-731.
- _____, S., S. Inoue and S. Yokoyama. 1995a. Phylogenetic position of *Botryococcus braunii* base on small subunit of ribosomal RNA sequence data, **J. Phycol.** 31: 419-425.
- _____, S., S. Inoue, Y. Dote and S.Y. Yokoyama. 1995b. CO₂ fixation and oil production through microalga. **Energy Convers Manage.** 36: 729-731.
- Sawayama, S., T. Minowa, Y. Dote and S. Yokoyama. 1992. Growth of hydrocarbon rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Appl. Microbiol. Biot.** 38: 135-138.

- Schowen, R. 1998. **Thiamine-dependent enzymes**. Comprehensive Biological Catalysis, ed Sinnott M (Academic, San Diego). 2: 217-266.
- Scragg, A.H., J. Morrison and S.W. Shales. 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 884-889.
- Sheehan, J., T. Dunahay, J. Bebbemmann and P. Roessler. 1998. **A look back at the U.S.** Department of Energy Aquatic Species Program- Biodiesel from Algae. NREL/TP-580-24190. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy Office of fuels development. Colorado, USA.
- Smith, G.M. 1950. **Fresh-Water Algae of the United State**. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Song, L., J.Q. Qin, S. Su, J. Xu, S. Clarke and S. Clarke. 2012. Micronutrient requirements for growth and hydrocarbon production in the oil producing green alga *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). **PLoS ONE**. 7(7): e41459.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert. 2006. Commercial application of microalgae. **J. Biosci. Bioeng.** 101: 87-96.
- Stasiuk, L.D. 1999. Confocal laser scanning fluorescence microscopy of *Botryococcus* alginite from boghead oil shale, Boltysk, Ukraine: selective preservation of various micro-algal components. **Org. Geochem.** 30: 1021-1026.
- Stegmann, G. 1940. Die Bedeutung der Spurenelemente for *Chlorella*. **Z.Botan.**, 35: 385-422.
- Stein, J.R. 1973. **Handbook of Phycological Method, Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge University Press, Cambridge.

- Summons, R.E., P. Metzger, C. Largeau, A.P. Murray and J.M. Hope. 2002. Polymethylsqualanes from *Botryococcus braunii* in lacustrine sediments and crude oils. **Org. Geochem.** 33: 99-109.
- Sung, K.D., J.S. Lee, C.S. Shin, S.C. Park and M.J. Choi. 1999. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its culture characteristics. **Bioresource. Technol.** 68: 269-273.
- Tanoi, T., M. Kawachi and M.M. Watanabe. 2014. Iron and glucose effects on the morphology of *Botryococcus braunii* with assumption on the colony formation variability. **J. Appl. Phycol.** 26: 1-8.
- Taylor, L.W., R. Robyn, G. Carrie, V. Stanislav, B. Ian. A. Parastoo, R. Jannette, H. Andreas, P.D. Timothy and G. Ursula. 2012. Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. **J. Asm. Org.** 11: 1424-1440.
- Templier, J., C. Largeau and E. Casadevall. 1984. Mechanism of nonisoprenoid hydrocarbon biosynthesis in *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry.** 23: 1017-1028.
- Templier, J., C. Largeau and E. Casadevall. 1987. Effect of various inhibitors on biosynthesis of non-isoprenoid hydrocarbon biosynthesis in *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry.** 26: 377-383.
- Tenaud, M., M. Ohmori and S. Miyachi. 1989. Inorganic carbon and acetate assimilation in *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). **J. Phycol.** 25: 662-667.
- Terry, N. and J. Abadia. 1968. Function of iron in chloroplasts. **J. Plant. Nutr.** 9: 609-646.
- Testa, M., S. Gerbaudo and E. Andri. 2001. *Botryococcus* colonies in Miocene sediments in the western Woodlark Basin, southwest pacific (ODP Leg180). **Proc. Ocean Drill. Prog. Sci. Results.** 180: 1-6.

- Tran, H.L., J.S. Kwon, Z.H. Kim, Y. Oh and C.G. Lee. 2010. Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of *Botryococcus braunii* LB572. **Biotechnol. Bioproc. E.** 15: 277–284.
- Traverse, A. 1955. Occurrence of the oil-forming alga *Botryococcus* in lignites and other Tertiary sediments. **Micropaleontology.** 1: 343-348.
- Tripathi, U., R. Sarada and G.A. Ravishankar. 2001. A culture method for microalgal forms using two-tier vessel providing carbon-dioxide environment: studies on growth and carotenoids production. **World J. Microb. Biot.** 17: 325-329.
- Vicente, G., M. Martinez and J. Aracil. 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresour. Technol.** 92: 297-305.
- Villarreal-Rosales, E., P. Metzger and E. Casadevall. 1992. Ether lipid production in relation to growth in *Botryococcus braunii*. **Phytochem.** 31: 3021-3027.
- Vongprasert, R. 1986. **Baseline for the Culture of Native Oil Rich Alga (*Botryococcus braunii*), as the Potential Source of the Biocrude Oil Production in Thailand.** Thesis of Master of Science Technology of Environmental Management. Mahidol University. Bangkok, Thailand.
- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. pp. 117-199. In A. Richmond, ed. **Handbook of Microalgal Mass Cultures.** CRC Press, FL.
- Vonshak, A. and M.A. Borowitzka. 1991. **Mass Cultivation of Microalgae Laboratory Manual.** Research Seminar and Workshop, November, 1991. Silpakorn University, Nakorn phathom, Thailand. p: 8-9.
- Wake, L.V. 1976. **Factors affecting growth and hydrocarbon production in the alga, *Botryococcus braunii*.** Lecture to section 5, 47th ANZAAS Congress, Hobart.

- Wake, L.V. and L.W. Hillen. 1980. Study of a “bloom” of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 1637-1656.
- _____, and L.W. Hillen. 1981. Nature and hydrocarbon content of bloom of the alga *Botryococcus braunii* occurring in Australian freshwater lakes. Aust. **J. Mar. Freshwater. Res.** 32(2): 353-67
- Walker, J.B. 1953. Inorganic micronutrient requirement of *Chlorella*. I Requirements for calcium (or strontium), copper and molybdenum. **Arch. Biochem. Biophys.** 46: 1-11.
- Warburg, O. 1948. Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin. **Springer.** 11: 170-184.
- Watanabe, M., K. Kaya., T. Tanoi, M. Kawachi and M. Shiho. 2013. Novel strain classified under *Botryococcus braunii*. **Patent Application Publication.** US 2013/0252304 A1
- Wiessner, W. 1962. Inorganic micronutrients. pp. 239-244. In R.A. Lewin, ed. **Physiology and Biochemistry of Algae.** London. Academic Press.
- Woft, F.R., A.M. Nonomura and J.A. Bassam. 1985a. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). **J. Phycol.** 21: 388-396.
- Wolf, F.R., E.K. Nemethy, J.H. Blanding and J.A. Bassham. 1985b. Biosynthesis of unusual acyclic isoprenoids in the green alga *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry.** 24: 733.
- Wu, C.F.J. and M. Hamada. 2000. **Experiments: Planning, Analysis and Parameter Design Optimization.** John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Yang, S., J. Wang, W. Cong, Z. Cai and F. Ouyang. 2004. Effect of bisulfite and sulfite on the microalga *Botryococcus braunii*. **Enzyme Microb. Tech.** 35: 46-50.

- Yeesang, C. and B. Cheirslip. 2010. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource Technol.** 102: 3034-3040.
- Yusuf, C. 2007. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol. Adv.** 25: 294-306.
- Yu, L. and W. Chen. 2005. Isolation and determination of culture characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae. **Energy Conver. Mgmt.** 46: 1868-1876.
- Zempleni, J. and D.M. Mock. 1999. Biotin biochemistry and human requirements* 1. **J. Nutr. Biochem.** 10: 128-138.
- Zhang, K. and E. Kojima. 1998. Effect of light intensity on colony size of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors. **J. Ferment. Bioeng.** 86(6): 573-576.
- Zhang, H.J., L.W. Sun, L. L. Liu, J. Lian, S.L. An, X. Wang, J. Zhang, J.L. Jin, S.Y. Li and J.H. Xi. 2010. Proteomic analysis of interactions between the generalist herbivore *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Arabidopsis thaliana*. **Plant. Mol. Biol. Rep.** 28: 324-333.





1. สูตรอาหาร Kratz and Myers media (Gelpi *et al.*, 1970)

KNO_3	4.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	กรัม
Na citrate	0.165	กรัม
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.004	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.0

2. สูตรอาหาร Modified Chu 13 medium (Largeau *et al.*, 1980)

KNO_3	0.2	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08	กรัม
Ferric citrate	0.01	กรัม
Citric acid	0.1	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.5

3. สูตรอาหาร Modified Chu medium (Tenaud *et al.*, 1989)

KNO_3	0.2	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.054	กรัม
Fe-EDTA	6.95	ไมโครกรัม

Microelements

H_3BO_3	28.6	ไมโครกรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18.1	ไมโครกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.22	ไมโครกรัม
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.9	ไมโครกรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.79	ไมโครกรัม
CoCl_2	0.8	มโครกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.0

4. สูตรอาหาร Modified Chu medium (Watanabe *et al.*, 2013)

KNO_3	0.2	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.054	กรัม
Iron (III) citrate hydrate	0.1	กรัม
Citric acid monohydrate	0.1	กรัม

Microelements

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18.1	ไมโครกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.22	ไมโครกรัม
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5	ไมโครกรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.79	ไมโครกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.8	ไมโครกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.0

5. สูตรอาหาร AF - 6 medium (Kato, 1981)

NaNO_3	140	มิลลิกรัม
-----------------	-----	-----------

NH_4NO_3	22	มิลลิกรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	10	มิลลิกรัม
K_2HPO_4	5	มิลลิกรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	มิลลิกรัม
CaCO_3	10	มิลลิกรัม
Fe-citrate	2	มิลลิกรัม
Citric acid	2	มิลลิกรัม
Biotin	2	ไมโครกรัม
Thiamine HCl	10	ไมโครกรัม
Vitamin B6	1	ไมโครกรัม
Vitamin B12	1	ไมโครกรัม
Trace metal = PIV	5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 6.6

Trace metal = PIV ประกอบด้วย

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	196	มิลลิกรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36	มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22	มิลลิกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4	มิลลิกรัม
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5	มิลลิกรัม
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,000	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

6. สูตรอาหาร BG 11 medium (Vonshak, 1986)

NaNO_3	1.500	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.040	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036	กรัม

Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม
EDTA	0.001	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
Trace metal mix A5	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.4

Trace metal mix A5 ประกอบด้วย

H ₃ BO ₃	2.860	มิลลิกรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.810	มิลลิกรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222	มิลลิกรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.390	มิลลิกรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	มิลลิกรัม
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0494	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

7. สูตรอาหาร BBM (Kanz and Bold, 1969)

NaNO ₃	0.250	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.074	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.0175	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.024	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.073	กรัม
NaCl	0.025	กรัม
FeSO ₄	0.005	กรัม
EDTA	0.045	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.0

8. สูตรอาหาร NSIII medium (Payer, 1971)

KNO_3	1.011	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.24 + 0.284	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.124	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.015	กรัม
NaCl	0.012	กรัม
Micro A	2	มิลลิลิตร
Micro B	2	มิลลิลิตร
Micro C	2	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

Micro A

นำสารละลาย A.1 200 มิลลิลิตร และ A.2 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

A.1

KBr	595	มิลลิกรัม
KI	415	มิลลิกรัม
LiCl	21.2	มิลลิกรัม
H_3BO_3	77	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก 3 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมสารละลายเสร็จ

A.2

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	144	มิลลิกรัม
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	658	มิลลิกรัม
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	70	มิลลิกรัม
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	167	มิลลิกรัม
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	44	มิลลิกรัม
NH_4VO_3	29	มิลลิกรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	125	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก 3 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมสารละลายเสร็จ

Micro B

ละลาย $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 มิลลิกรัม และกรด HCl 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Micro C

ละลาย $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 810 มิลลิกรัม และ EDTA 750 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

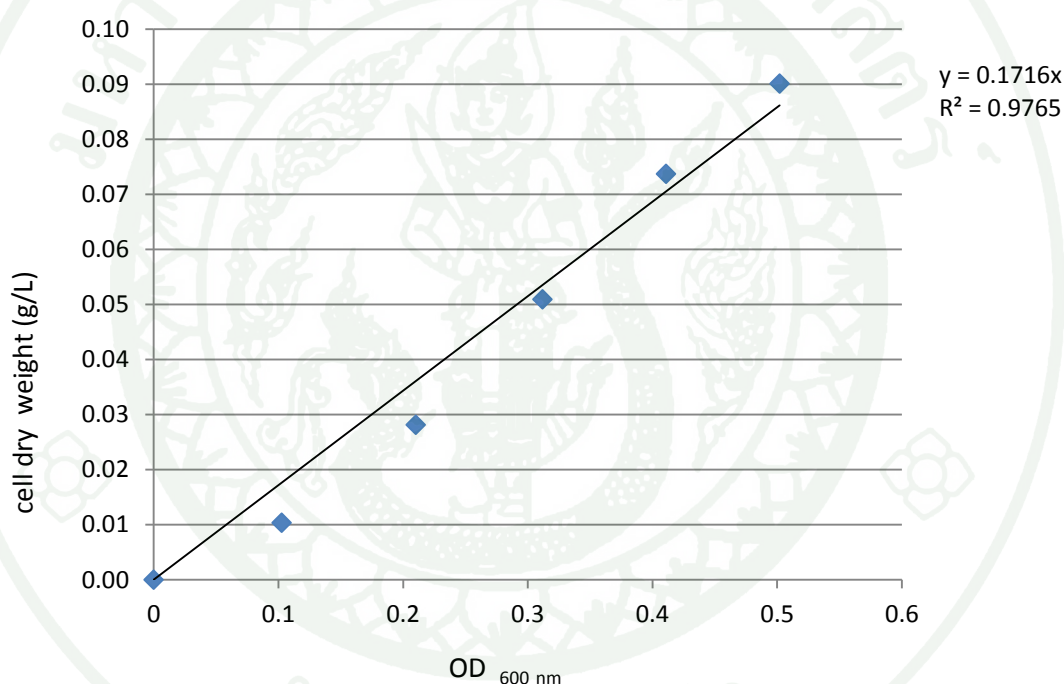


การหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย (ดัดแปลงจากวิธีการของ Vonshank and Borowitzka, 1991)

1. นำจานเพาะเชื้อพร้อมกระดาศกรอง GLASS MICROFIBRE FILTERS (GF/F) ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำออกใส่เดซิเคเตอร์ เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้องนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่
2. เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อจนเจริญสูงสุด นำเซลล์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ใช้น้ำกลั่นในการตั้งค่า blank
3. นำเซลล์ที่ระดับความขุ่นต่าง ๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาศกรอง GF/F ที่ทราบน้ำหนักแห้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น
4. นำกระดาศกรองที่มีเซลล์สาหร่ายติดอยู่ใส่ในจานเพาะเชื้อและนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง นำจานเพาะเชื้อใส่ในเดซิเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่
5. สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับค่าความขุ่นของเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณน้ำนักแห้ง

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าความขุ่นและน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* J4-1

Optical density (OD 600)	Cell dry weight (g/L)
0.1	0.133
0.2	0.250
0.3	0.477
0.4	0.667
0.5	0.827



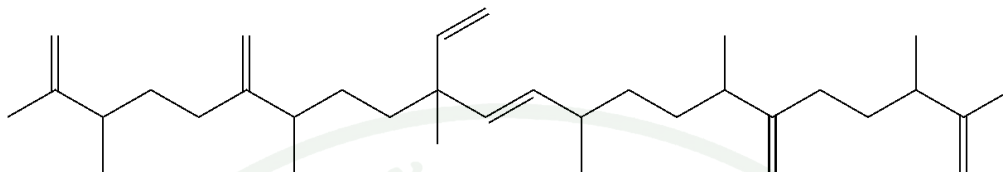
ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B. braunii* J4-1

หมายเหตุ ในกรณีที่ตัวอย่างมีค่าการดูดกลืนแสงสูงเกินกว่าช่วงที่กำหนดคือ 0.05 - 0.50 ต้องทำการเจือจางก่อน



ภาคผนวก ค
สารไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ สารไฮโดรคาร์บอน $C_{34}H_{58}$ มีน้ำหนักโมเลกุล 466 และมีความเข้มข้น 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



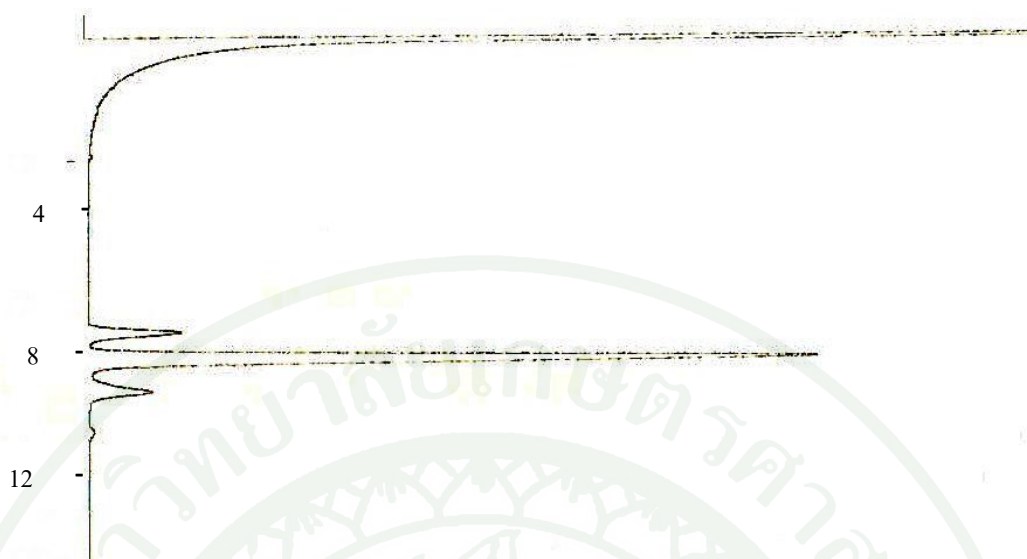
ภาพผนวกที่ ค1 สูตรโครงสร้างของสารไฮโดรคาร์บอน $C_{34}H_{58}$

ที่มา: Watanabe *et al.* (2013)



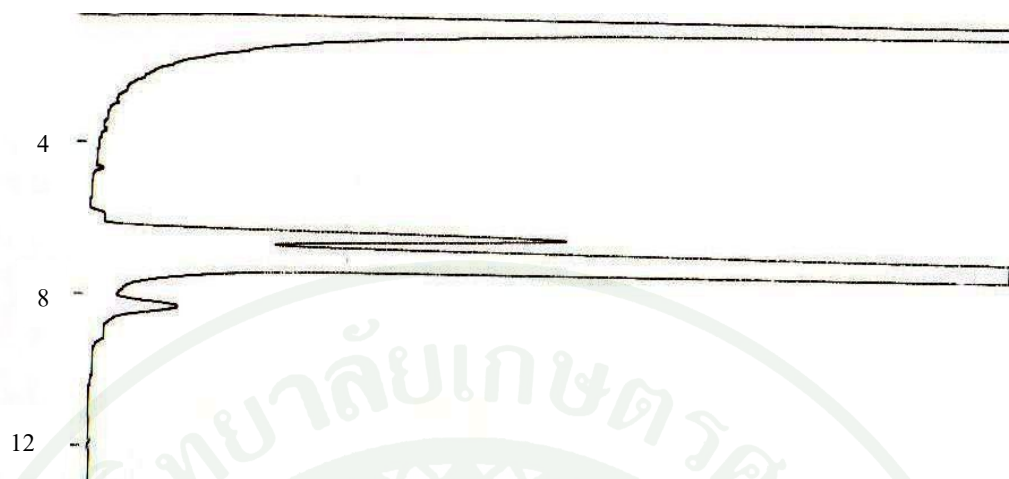
ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรมการแยกสารไฮโดรคาร์บอนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



CHROMATOPAC		C-R6A		FILE	8	
SAMPLE	NO	0		METHOD	841	
REPORT	NO	30102				
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	8.743	11037			9.7608	
2	9.518	90927	V		80.4097	botryococcene
3	10.365	10089			8.9218	
4	11.467	1026	V		0.9078	
TOTAL		113080			100	

ภาพผนวกที่ ๑1 โครมาโทแกรมการแยกสารไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานด้วยเครื่อง
แก๊สโครมาโทกราฟี



CHROMATOPAC C-R6A FILE 8
 SAMPLE NO 0 METHOD 841
 REPORT NO 44988

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.000	262			0.0454	
2	6.478	75024	V		11.3449	
3	7.318	559970	V		84.6769	
4	8.377	26485	V		3.0886	
5	9.157	2454	V		0.4742	
6	10.8	148			0.37	
TOTAL		664343			100	

ภาพผนวกที่ ๖2 โครมาโทแกรมการแยกสารไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* J4-1 ด้วยเครื่อง
 แก๊สโครมาโทกราฟี

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวศิริพรรณ จันทร์น้ำท่วม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 3 พฤศจิกายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี
ประวัติการศึกษา	1. จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนอุดรดิตต์ครุณี อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 2. จบการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนอุดรดิตต์ครุณี อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 3. จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (วิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขต ปทุมธานี
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-