



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การปรับปรุงการผลิตน้ำมันด้วยการกลายพันธุ์ *Chlorella* sp.

Improvement of Lipid Production by Mutation *Chlorella* sp.

นามผู้วิจัย นางสาววัชรา จันทาสี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( อาจารย์เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์ยวีเชียร ขงมานิตชัย, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงการผลิตน้ำมันด้วยการกลายพันธุ์ *Chlorella* sp.

Improvement of Lipid Production by Mutation *Chlorella* sp.

โดย

นางสาววัชรวิภา จันทาสี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัชรรา จันทาสี 2557: การปรับปรุงการผลิตน้ำมันด้วยการกลายพันธุ์ *Chlorella* sp.  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล, Ph.D. 105 หน้า

การจัดจำแนกและปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตน้ำมันโดยการออกแบบการทดลองทางสถิติ ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัย 18S rDNA พบว่า *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 มีความเหมือนกับ *Chlorella sorokiniana* 99 – 100 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดจำแนกเป็น *C. sorokiniana* จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 40,000 โคโลนี แล้วคัดเลือกด้วยเทคนิคไอของไอโอดีน มี 63 โคโลนี เป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่สร้างแป้ง การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วยเครื่อง GC พบว่ามี 8 starchless mutants ที่ผลิตน้ำมันภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 สามารถผลิตชีวมวล ผลิตน้ำมันและน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงสุด คือ 0.30 กรัมต่อลิตร 0.063 กรัมต่อลิตร และ 21.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดย Plackett-Burman design และ Central composite design (CCD) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิตชีวมวลและการผลิตน้ำมันของ *C. sorokiniana* DMKU5202-31 การคัดเลือกด้วยวิธีของ Plackett-Burman design ปัจจัยที่มีนัยสำคัญคือ  $\text{KNO}_3$ , pH และ light intensity จากนั้นทำวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันได้สูงสุด พบว่า  $\text{KNO}_3$  0.9 กรัมต่อลิตร pH 6.2 และ light intensity 4,000 ลักซ์ เป็นสภาวะที่ดีที่สุด ผลิตชีวมวลได้ 2.58 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำมัน 1.40 กรัมต่อลิตร และผลิตน้ำมันภายในเซลล์ 54.49 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าการปรับสูตรอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยง ทำให้สาหร่ายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 มีความสามารถในการผลิตน้ำมันได้ในปริมาณที่สูงซึ่งมีประโยชน์ต่อการผลิตไบโอดีเซล

Watchara Jantasee 2014: Improvement of Lipid Production by Mutation *Chlorella* sp  
Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of  
Microbiology. Thesis Advisor: Duenrut Chonudomkul, Ph D. 105 pages.

Identification of *Chlorella* sp. DMKU5201 and DMKU5202 by using partial 18S rDNA sequences revealed that they were closely related to *Chlorella sorokiniana* with similarity of 99 – 100%. Improvement of lipid contents of these two microalgae were carried by UV mutation for starchless mutants. The selected strain was then optimized by statistical experimental designs for growth and lipid production. Approximately 40,000 UV treated colonies were screened by iodine impregnation technique. Sixty-three colonies appeared to be starchless mutants. Secondary screening of the mutants showed that 8 of them starchless accumulated higher oil content than the wild type strains and the mutant *C. sorokiniana* DMKU 5202-31 had the highest biomass, lipid production and lipid content 0.30 g/L, 0.063 g/L and 21.16%, respectively. Optimization of *C. sorokiniana* DMKU 5202-31 was done by Plackett-Burman Design (PBD) and Central Composite Design (CCD) to determine the significant factors affecting biomass production and lipid accumulations. Finally, three factors namely KNO<sub>3</sub>, pH and Light intensity were chosen from PBD analysis. CCD was used to optimize the three selected factors. The response surface plots were observed for the maximum biomass, lipid production and lipid content. Their optimal values were determined as follows 0.9 g/L of KNO<sub>3</sub>, pH 6.2 and 4,000 lux of light intensity which yielded biomass at 2.58 g/L, lipid production of 1.40 g/L and lipid content 54.49%. It could be concluded that optimization of medium composition and culture conditions could improve oil production of the starchless mutant *C. sorokiniana* DMKU5202-31 which had the potential for biodiesel production.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. วิเชียร ขงมานิตชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่สละเวลาให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่าน ที่ถ่ายทอดความรู้ ทักษะและประสบการณ์ ทั้งด้านจุลชีววิทยา และด้านอื่น ๆ ให้แก่ข้าพเจ้า

ขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นที่กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่อย่างสูงที่อยู่เคียงข้างเป็นที่กำลังใจทั้งการเรียน และการทำวิทยานิพนธ์ ทำให้ข้าพเจ้าผ่านช่วงเวลาที่ยากลำบากไปได้ เป็นผู้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จอย่างแท้จริง ขอขอบคุณญาติทุกคนที่คอยถามเรื่องการเรียนและเพื่อน ๆ ที่ร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมาจนถึงวันนี้

วัชรา จันทาสี

เมษายน 2557

## สารบัญ

## หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	32
อุปกรณ์	32
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	82
สรุป	82
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ภาคผนวก	91
ภาคผนวก ก สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย	92
ภาคผนวก ข กรดไขมันมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมัน	95
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. DMKU5201 และ DMKU5202	97
ภาคผนวก ง เซลล์ของสาหร่ายพันธุ์กลาย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5201-31	99
ภาคผนวก จ ภาพการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	101
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	105

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบแหล่งที่มาของ ไบโอดีเซลในสหรัฐอเมริกา	6
2	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด	8
3	การเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำมันของจุลินทรีย์บางชนิด	9
4	แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือกปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง	24
5	ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องการกลั่นกรอง จำนวน 7 ปัจจัย โดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง	25
6	ค่าของ code level ใน Central Composite Design สำหรับ 3 ปัจจัย $\alpha = 1.68$	28
7	การกำหนดค่ารหัส (code value) และค่าจริง (actual value)	29
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองที่ใช้ใน RSM	30
9	การเตรียม PCR reaction mixture	37
10	สถานะในการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ด้วยเครื่อง PCR	37
11	ปัจจัยที่ต้องการคัดเลือกทั้งหมด 7 ปัจจัย โดยกำหนด model เป็น A B C D E F G	41
12	ตารางเมตริกตามแบบแผนมาตรฐานของ Plackett and Burman (1946)	41
13	กำหนดระดับของปัจจัย 5 ระดับ	42
14	กำหนดค่า code และค่าจริง	43
15	การจัดจำแนกสาหร่ายขนาดเล็ก <i>Chlorella</i> sp. โดยการหาลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA	45
16	การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่าย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5201 และ DMKU5202 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในการคัดเลือกขั้นต้น	50
17	การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่าย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5201 และ DMKU5202 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจากการคัดเลือกขั้นที่สอง	53
18	ผลการวิเคราะห์การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ ทั้ง 8 สิ่งทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design	54

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	วิเคราะห์ความแปรปรวนของ Plackett and Burman design	55
20	แสดงค่ามวลเซลล์และปริมาณน้ำมันของ สาหร่ายพันธุ้กลาย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5202-31 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD	57
21	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA <sup>b</sup> ) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุ คูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตชีวมวลของสาหร่ายพันธุ้กลาย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5202-31	58
22	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA <sup>b</sup> ) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุ คูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่าย พันธุ้กลาย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5202-31	58
23	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA <sup>b</sup> ) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุ คูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่าย พันธุ้กลาย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5202-31	59
24	แสดงค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์ การตัดสินใจ	62
25	ผลการวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์และปริมาณน้ำมัน ระหว่างค่าทำนายและการ ทดลองของสายพันธุ้กลาย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5202-31	66
26	การหาจุดที่เหมาะสมของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และ การผลิตน้ำมันภายในเซลล์	80
27	การเปรียบเทียบระหว่างค่าทดลองและค่าทำนาย	81
<b>ตารางผนวกที่</b>		
ข1	กรดไขมันมาตรฐาน (Standard fatty acid) 10 ชนิด	95

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Transesterification of triglycerides	4
2	การต่อและดึงสายคาร์บอนของกรดไขมัน	13
3	การสังเคราะห์ triglycerides ในสาหร่ายขนาดเล็ก	14
4	กลไกของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และการสะสมคาร์บอนในเซลล์สาหร่าย	21
5	แผนภูมิสายวิวัฒนาการของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. DMKU5201 และ DMKU5202	46
6	การทดสอบหาสายพันธุ์ที่ไม่สังเคราะห์แป้ง (a) และลักษณะของโคโลนีหลังจากอั่งค้ำยไอของไอโอดีน starchless mutant (b) non-starchless mutant (c)	48
7	การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่าย <i>C. sorokiniana</i> DMKU5201 และ DMKU5202 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย	52
8	Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน	63
9	Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย	64
10	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าทำนาย	67
11	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ KNO <sub>3</sub> (Nitrate) และ pH ต่อการผลิตชีวมวล (biomass production, g/L)	69
12	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ KNO <sub>3</sub> (Nitrate) และ light intensity ต่อการผลิตชีวมวล (biomass production, g/L)	70
13	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ pH และ light intensity ต่อการผลิตชีวมวล (biomass production, g/L)	71
14	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ KNO <sub>3</sub> (Nitrate) และ pH ต่อการผลิตน้ำมัน (Lipid production, g/L)	73

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		ภาพที่
15	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ $\text{KNO}_3$ (Nitrate) และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมัน (Lipid production, g/L)	74
16	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ pH และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมัน (Lipid production, g/L)	75
17	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ $\text{KNO}_3$ (Nitrate) และ pH ต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ (Lipid content, %)	77
18	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ $\text{KNO}_3$ (Nitrate) และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ (Lipid content, %)	78
19	ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ $\text{KNO}_3$ (Nitrate) และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ (Lipid content, %)	79
<b>ภาพผนวกที่</b>		
ค1	ลำดับเบสของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. DMKU5201	97
ค2	ลำดับเบสของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. DMKU5202	97
ง1	เซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรม <i>C. sorokiniana</i> DMKU5201-31 โดยการย้อมด้วยสี Nile red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope)	100
จ1	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายพันธุกรรม <i>Chlorella</i> sp. DMKU5201 และ DMKU5202 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSIII (สูตรมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 1 ส่วน 4) โดยเลี้ยง ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง นาน 7 วัน	102
จ2	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายพันธุกรรม <i>C. sorokiniana</i> DMKU5202-31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSIII โดยการจัดการทดลองแบบ Plackett and Burman design สิ่งทดลอง จำนวน 8 สิ่งทดลอง ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมืด	

- เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง นาน 7 วัน 103
- จ3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายพันธุ้กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSIII เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design สิ่งทดลองจำนวน 17 สิ่งทดลอง ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมิตเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง นาน



## การปรับปรุงการผลิตน้ำมันด้วยการกลายพันธุ์ *Chlorella* sp.

### Improvement of Lipid Production by Mutation *Chlorella* sp.

#### คำนำ

ปัจจุบันโลกกำลังประสบปัญหาหาค่าน้ำมันที่เพิ่มสูงขึ้นและภาวะโลกร้อน รวมถึงมีความต้องการใช้น้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและคาดการณ์ในอนาคตข้างหน้าว่าแหล่งน้ำมันกำลังจะหมดไป รวมถึงเกิดการสะสมของ greenhouse gases จากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงโดยตรง (Amaro *et al.*, 2012) จึงทำให้มีความต้องการอย่างเร่งด่วนในการวิจัยเพื่อหาแหล่งน้ำมันที่เป็นพลังงานทดแทน ซึ่งไบโอดีเซล (biodiesel) จัดเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจมากในปัจจุบันนี้ เนื่องจากเป็นพลังงานทดแทนที่มีราคาถูก เป็นแหล่งพลังงานที่สะอาด สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable) ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย โดยที่ไม่เพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์และมีปริมาณซัลเฟอร์ต่ำมาก ซึ่งจะช่วยลดภาวะโลกร้อนที่กำลังเป็นปัญหาในปัจจุบันอีกด้วย และยังมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเชื้อเพลิงดีเซล (Huang *et al.*, 2010)

การผลิตไบโอดีเซลที่ผ่านมาได้จากพืชน้ำมัน (เช่น ปาล์มน้ำมัน สนุ่นดำ และอื่น ๆ) จึงอาจส่งผลกระทบต่อการนำมาบริโภคเป็นอาหารได้โดยตรง ที่สำคัญต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกเป็นจำนวนมากและใช้เวลานานในการเพาะปลูก (Demirbas and Demirbas, 2011) นอกจากนี้ปริมาณน้ำมันจากพืชน้ำมันยังไม่เพียงพอต่อความต้องการเชื้อเพลิงของประเทศ ส่งผลให้มีความจำเป็นต้องใช้ไขมันจากแหล่งอื่น ๆ

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นอีกทางเลือกสำหรับการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากสาหร่ายมีข้อดีมากกว่าพืชน้ำมัน เช่น มีชีวมวลสูง บางชนิดสามารถสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ถึง 20 –70 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า และสาหร่ายยังต้องการน้ำในการเจริญน้อยกว่าพืชน้ำมัน (Chisti, 2007) *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว ที่มีประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ เช่น การบริโภคเพื่อเป็นอาหารเสริม มีความสำคัญทางด้านเภสัชกร และสามารถใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันปิโตรเลียม (Ramazanov and Ramazanov, 2006; Mata *et al.*, 2010) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. และทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันให้มีปริมาณสูงขึ้น

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจอย่างยิ่งที่จะค้นหาสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตน้ำมันได้สูงกว่าปกติ โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. ด้วยวิธีใช้รังสี UV ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันให้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ phototroph จากนั้นใช้วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของสาหร่ายพันธุ์กลาย



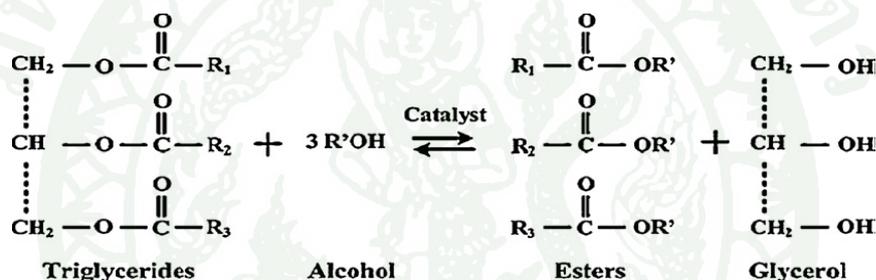
## วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202
2. เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. ให้ผลิตน้ำมันสูงขึ้นโดยวิธีการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV
3. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายของสาหร่ายขนาดเล็กที่ผลิตน้ำมันสูง
4. เพื่อหาสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันโดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ

## การตรวจเอกสาร

### 1. ไบโอดีเซล (Biodiesel)

ไบโอดีเซล (biodiesel) คือเชื้อเพลิงทางชีวภาพ จัดเป็นสารประเภทเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) ผลิตได้จากพืชน้ำมัน สัตว์ หรือของเสียจากการประกอบอาหาร ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล และมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด เบส หรือเอนไซม์ โดยผ่านกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่าทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) จะได้กลีเซอริน (glycerine) และเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) แสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งไบโอดีเซลมีคุณสมบัติในการเผาไหม้เหมือนกับดีเซล (Demirbas and Demirbas, 2011)



ภาพที่ 1 Transesterification of triglycerides

ที่มา: Demirbas and Demirbas (2011)

อย่างไรก็ตามการปลูกพืชน้ำมันเพื่อนำมาผลิตไบโอดีเซลขึ้นอยู่กับปัจจัย เช่น ต้องการพื้นที่ขนาดใหญ่ในการเพาะปลูก ความเหมาะสมของดิน คุณภาพของน้ำ ฤดูกาล และอื่น ๆ อีกมากมาย จึงไม่นิยมนำมาผลิตไบโอดีเซล (Widjaja *et al.*, 2009; Costa and Morais, 2011) ปัจจุบันนี้มีความสนใจที่จะผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายมากขึ้น เนื่องจากสาหร่ายบางสายพันธุ์มีศักยภาพสามารถผลิตไขมันได้ปริมาณมากกว่าพืชน้ำมัน สาหร่ายจำนวนมากสามารถชักนำให้มีการสะสมไขมันได้สูงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายและสภาวะในการเพาะเลี้ยงด้วย *Botyococcus* sp. บางสายพันธุ์สามารถผลิตไขมันในเซลล์ได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง หรือเมื่อมีการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงสามารถผลิตน้ำมันได้ 20 - 50 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายเป็นที่สนใจอย่างมากในปัจจุบันที่จะนำมาเป็นทางเลือกใหม่ของพลังงาน และนำมาทดแทนเชื้อเพลิงปิโตรเลียม เนื่องจากน้ำมันไบโอดีเซลมีการเผาไหม้เหมือนกับน้ำมันดีเซล ใน

ขณะเดียวกันไบโอดีเซลอาจจะมีประสิทธิภาพมากกว่าแก๊สโซลีน (gasoline) และมีคุณสมบัติดีกว่าเชื้อเพลิงปิโตรเคมีเซล ยังเป็นพลังงานทดแทน (renewable) ชีวภาพที่ย่อยสลายได้ (biodegradable) ไม่เป็นพิษ (non-toxic) ไม่มีซัลเฟอร์ (essentially free of sulfur) (Demirbas and Demirbas, 2011)

จากข้อจำกัดในพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกพืชน้ำมันทำให้นักวิจัยมุ่งความสนใจไปที่สาหร่ายขนาดเล็กซึ่งมีข้อได้เปรียบในเรื่องของพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง จากข้อมูลการวิจัยถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ปริมาณร้อยละ 50 ของน้ำมันดีเซลที่ใช้ในระบบขนส่งของสหรัฐอเมริกาต้องการพื้นที่ในการเลี้ยงสาหร่ายเพียงร้อยละ 1 ถึง 3 ของพื้นที่ทั้งหมดที่ใช้ในการปลูกพืชน้ำมัน ดังตารางที่ 1 สาหร่ายขนาดเล็กบางชนิดมีการสะสมน้ำมันในเซลล์สูงถึงร้อยละ 70 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง สาหร่ายขนาดเล็กที่มีรายงานการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตน้ำมันหรือลิปิด เช่น *Neochloris oleoabundans*, *Scenedesmus dimorphus*, *Euglena gracilis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Botryococcus braunii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Spirulina* sp. *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella protothecoides* (Mata et al., 2010)

ก่อนหน้านี้สาหร่ายขนาดเล็กได้นำมาผลิตในเชิงพาณิชย์ และใช้บริโภคเพื่อเป็นอาหารเสริมเนื่องจากสาหร่ายประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์ มีโปรตีนสูง กรดอะมิโนที่จำเป็น กรดไขมันจำเป็น เช่น โอเมก้า 3 โอเมก้า 6 ซึ่งเป็น polyunsaturated fatty acid (PUFA) และมีความสามารถในการตอบสนองต่อสุขภาพเป็นอย่างมาก เป็น antioxidant เป็นอาหารเสริมที่ช่วยลดไขมัน และอาจจะช่วยควบคุมน้ำหนักของร่างกาย (Ramazanov and Ramazanov, 2006) ซึ่งปัจจุบันนี้การนำสาหร่ายมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงทางชีวภาพได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะสาหร่ายสามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกน้อยกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ และมีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซล

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบแหล่งที่มาของไบโอดีเซลในสหรัฐอเมริกา

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

<sup>1</sup> เพื่อใช้ในระบบขนส่งครั้งหนึ่งสำหรับเชื้อเพลิงที่ต้องการใช้ทั้งหมดในสหรัฐอเมริกา

<sup>2</sup> สาหร่ายผลิตน้ำมันร้อยละ 70 ของน้ำหนักเซลล์ (จากการทดลองในการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง)

<sup>3</sup> สาหร่ายผลิตน้ำมันร้อยละ 30 ของน้ำหนักเซลล์ (จากการทดลองในการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง)

ที่มา: Chisti (2007)

ข้อดีของการใช้สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตไบโอดีเซล

ตามรายงานของ Chisti (2007) พบว่าสาหร่ายมีข้อดีหลายอย่าง เช่น

1. สามารถสังเคราะห์แสงโดยเปลี่ยนพลังงานแสงไปเป็นพลังงานเคมี
2. มีอัตราการผลิต triacylglycerol หรือ fatty acid สูง
3. มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว

4. ต้องการพื้นที่ในการเพาะปลูกน้อยกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ
5. สามารถพบสาหร่ายขนาดเล็กได้ทุกที่ที่มีความชื้น
6. ทำการเพาะเลี้ยงได้ง่ายถ้ามีสารอาหารอย่างเพียงพอ
7. สาหร่ายทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์สูง ๆ และมีการปล่อย nitrous oxide น้อยลง
8. มีความสำคัญทางการค้า เช่น เป็นอาหารเสริมของมนุษย์และเป็นอาหารสัตว์
9. สาหร่ายขนาดเล็กสามารถลดคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นปัญหาต่อภาวะโลกร้อนในปัจจุบันได้

## 2. จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำมัน

จุลินทรีย์น้ำมัน (oleaginous microorganisms) พบว่าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำมันภายในเซลล์มากถึง 20 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไบโอดีเซลนั้นสามารถใช้น้ำมันจากจุลินทรีย์ โดยเรียกว่า single cell oil (SCO) และได้รับความสนใจมากในทั่วโลก จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้ เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) แบคทีเรีย (bacteria), ยีสต์ (yeast) และ รา (fungi) ดังตารางที่ 2 แต่ไม่ใช่ทั้งหมดที่สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซลได้ จะมีเพียงบางสปีชีส์เท่านั้น ดังตารางที่ 3

Huang *et al.* (2010) พบว่าสาหร่ายน้ำมันสามารถผลิตน้ำมันได้เหมือนกับพืชน้ำมัน เนื่องจากว่าสาหร่ายมีบทบาทในการใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงานได้เหมือนกัน จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดกันและเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่ต่างกัน เช่น อุณหภูมิ pH และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ทำให้ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และองค์ประกอบของน้ำมันภายในเซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด

Microorganisms	Oil content (% dry weight)
<b>Microalgae</b>	
<i>Botryococcus braunii</i>	25 - 75
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16 - 37
<i>Nitzschia</i> sp.	45 - 47
<i>Schizochytrium</i> sp.	50 - 77
<b>Yeast</b>	
<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
<b>Fungi</b>	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Humicola lanuginose</i>	75
<i>Mortierella vinacea</i>	66
<b>Bacteria</b>	
<i>Arthrobacter</i> sp.	> 40
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27 - 38
<i>Rhodococcus opacus</i>	24 - 25
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18 - 24

ที่มา: Meng *et al.* (2009)

### ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำมันของจุลินทรีย์บางชนิด

Microorganisms	Lipid composition (W/total lipid)					
	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3
Microalgae	21 - 21	55 - 57	1 - 2	58 - 60	4 - 20	14 - 30
Yeast	11 - 37	1 - 6	1 - 10	28 - 66	3 - 24	1 - 3
Fungi	7 - 23	1 - 6	2 - 6	19 - 81	8 - 40	4 - 42
Bacteria	8 - 10	10 - 11	11 - 12	25 - 28	14 - 17	-

ที่มา: Meng *et al.* (2009)

#### 2.1 สาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นพลังงานเคมีซึ่งมีศักยภาพเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพได้ เช่น มีเทน ไบโอดีเซล และไฮโดรเจน มวลเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กส่วนใหญ่ประกอบด้วยแหล่งของกรดไขมัน โอเมก้า 3, โอเมก้า 6, กรดอะมิโนที่จำเป็น leucine, isoleucine, valine และอื่น ๆ (Meng *et al.*, 2009) สาหร่ายขนาดเล็กทั้งหมดส่วนมากจะสะสมน้ำมันอยู่ในรูปของ triacylglycerol มากกว่า 80%

สาหร่ายส่วนใหญ่สามารถผลิตน้ำมันได้ระหว่าง 1-70% ต่อน้ำหนักแห้ง แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายและสภาวะการเพาะเลี้ยงอีกด้วย แต่บางสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันได้สูงถึง 90% ต่อน้ำหนักแห้งภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เช่น *Botryococcus braunii* และ *Chlorella* sp. สามารถผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้ประมาณ 20 - 25% ของน้ำหนักแห้ง สาหร่ายจัดว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจมาผลิตพลังงานเชื้อเพลิงไบโอดีเซล เนื่องจากพื้นฐานประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสง มีการผลิตชีวมวลสูง และการเจริญเติบโตที่รวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งน้ำมันอื่น ๆ (Spolaore *et al.*, 2006)

#### 2.2 ยีสต์

ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงถึง 70% ต่อน้ำหนักแห้ง เช่น *Rhodotorula* sp. และ *Lipomyces* sp. ส่วนใหญ่แล้วยีสต์น้ำมัน (oleaginous yeasts) *Cryptococcus curvatus* สามารถสะสมน้ำมันได้มากกว่า 60% ต่อน้ำหนักแห้ง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีไนโตรเจนสามารถผลิตน้ำมันได้สูงประมาณ 90% ต่อน้ำหนักแห้งของ triacylglycerol ซึ่งเป็นของกรดไขมันอิ่มตัวประมาณ 44% เหมือนกับพืชน้ำมัน (Meng *et al.*, 2009)

### 2.3 เชื้อรา

โดยปกติแล้วเชื้อราน้ำมัน (oleaginous molds) มีการสะสม triacylglycerol จำนวนมาก ในกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวหรือจำเพาะต่อโครงสร้าง ซึ่งสามารถผลิตกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสายยาว เช่น docosahexaenoic acid (DHA; 22: 6, n - 3) และ arachidonic acid (ARA; 20: 4, n - 3)  $\gamma$ -linolenic acid (GLA; C18: 3, n - 6) ซึ่งมีความสำคัญต่อทางการแพทย์ ช่วยพัฒนาความจำและสายตา (Ratledge, 2004)

Kavadia *et al.* (2001) ได้ศึกษาเชื้อรา (Zygomycetes) ที่สามารถผลิต  $\gamma$ -linolenic acid (GLA; C18: 3, n - 6) เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีกลูโคส และจำกัดการให้ไนโตรเจนหรือให้น้อยลง พบว่ามีปริมาณ GLA ในเส้นใย (mycelium) เพิ่มขึ้น

### 2.4 แบคทีเรีย

โดยทั่วไปแบคทีเรียไม่สามารถผลิต triacylglycerol แต่จะผลิต polyhydroxyalkanoates แทนแบคทีเรียมีการสะสมน้ำมันน้อยกว่าสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งน้ำมันภายในเซลล์อยู่ระหว่าง 20-40% ต่อน้ำหนักแห้ง มีอัตราการเจริญที่สูงมาก (12 ถึง 24 ชั่วโมง ในการเพิ่มชีวมวล) และมีวิธีการเพาะเลี้ยงง่าย อย่างไรก็ตามแบคทีเรียไม่ใช่ผู้ผลิตน้ำมันที่แท้จริง มีแบคทีเรียน้อยชนิดที่สะสมน้ำมันได้ นอกจากนั้นการสกัดน้ำมันจากแบคทีเรียยังคงมีอุปสรรคมาก เพราะว่าโดยทั่วไปแล้วน้ำมันเหล่านั้นเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) (Meng *et al.*, 2009) ดังนั้นในระดับอุตสาหกรรมจึงไม่ใช่แบคทีเรีย (oleaginous bacteria) เป็นวัตถุดิบเพื่อมาผลิตไบโอดีเซล ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถที่จะสะสมไขมันเฉพาะ เช่น poly (3-hydroxybutyric acid), [3HB] หรือ polyhydroxyalkanoic acids (PHA) อื่น ๆ (Alvarez and Steinbüchel, 2002)

### 3. สาหร่าย *Chlorella* sp.

*Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่มีลำดับอนุกรมวิธาน ตามระบบการจัดหมวดหมู่ของ Hoek *et al.* (1995) ดังนี้

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlorococcales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

*Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2-10 ไมครอน ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ รูปร่างเซลล์มีลักษณะกลมหรือรี มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย หรือเป็นแผ่นอยู่ริมเซลล์ อาจมีหรือไม่มีไฟรินอยด์ ไม่มีแฟลกเจลลา มีสติโกมาและคอนแทรกไทล์แวกิวโอล พบนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส 2 ชั้น พบไมโทคอนเดรีย กอลจิบอดี และแวกิวโอลในไซโทพลาสซึม (Bold and Wynne, 1978)

#### 4. กระบวนการผลิตน้ำมันของสาหร่าย

สาหร่ายสามารถใช้คาร์บอนอนินทรีย์ (inorganic carbon) เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนอนินทรีย์ เช่น กลูโคส อะซีเตต กลีเซอรอล และอื่น ๆ เพื่อการผลิตน้ำมัน โดยพื้นฐานแล้วน้ำมันสามารถแบ่งออกเป็นน้ำมันที่ไม่มีขั้ว หรือ neutral lipid เช่น triglycerol, cholesterol และน้ำมันที่มีขั้ว (polar lipid) เช่น phospholipid, galactolipids เป็นต้น ไตรกลีเซอรอลหรือไตรเอซิลกลีเซอรอลคือน้ำมันหลักที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล

ขั้นตอนการสังเคราะห์ triacylglycerides ในสาหร่ายขนาดเล็กมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

##### 1. การเปลี่ยนรูปของ acetyl-coA ในไซโทพลาสซึม

กระบวนการเมทาบอลิซึมการใช้คาร์บอนไดออกไซด์และกลูโคสเพื่อเปลี่ยนรูป acetyl-coA ในสาหร่าย โดยมี glyceraldehydes phosphate (GAP) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญของทั้ง 2 กระบวนการ การเปลี่ยนรูปของ acetyl-coA ในปฏิกิริยาของการสังเคราะห์แสงประกอบด้วย light reactions, calvin cycle และ synthesis ซึ่งจะเกิดขึ้นที่คลอโรพลาสต์ glyceraldehydes phosphate (GAP) จะถูกดึงออกจาก Calvin cycle และส่งออกไปยังบริเวณไซโทพลาสซึม หลังจากนั้นจะมีการไหลของคาร์บอนโดยตรงสำหรับการสังเคราะห์น้ำตาลหรือการออกซิเดชัน โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolytic pathway) ไปไพรูเวต (pyruvate)

##### 2. การต่อสายและการตัดสายคาร์บอนของกรดไขมัน

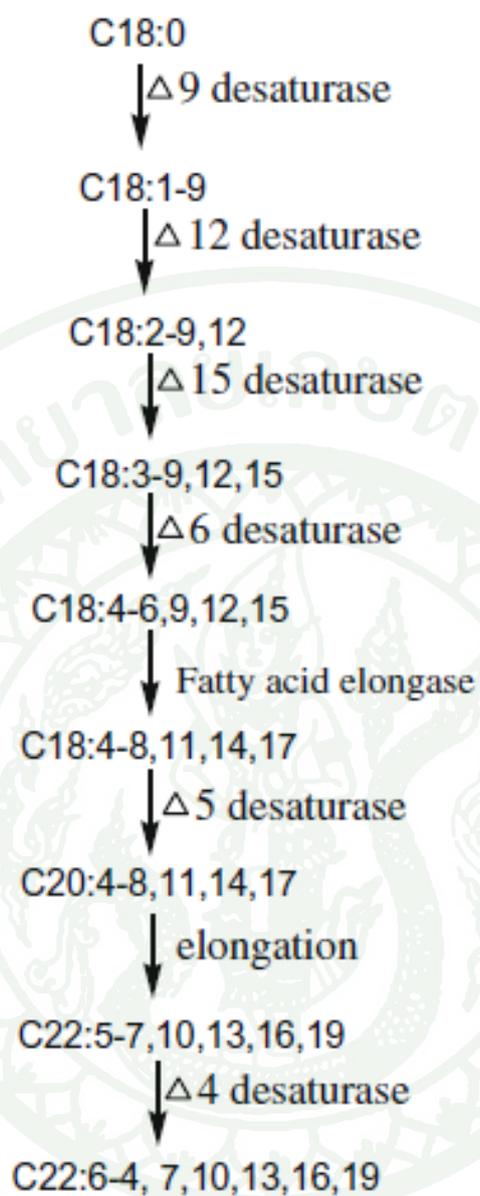
การต่อสายคาร์บอนของกรดไขมันในสาหร่ายโดยส่วนมากจะขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของ 2 เอนไซม์ ประกอบด้วย acetyl-coA carboxylic enzyme (ACCE) และ fatty acid syntheses (FAS) กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันมี acetyl-coA เป็น สารตั้งต้น ซึ่งในกระบวนการต่อสายคาร์บอน

acetyl-coA จะทำงานร่วมกับ malonyl-coA กรดไขมันชนิด  $C_{16} - C_{18}$  สามารถเปลี่ยนรูปได้หลังขั้นตอนทำปฏิกิริยา การเปลี่ยนรูปของกรดไขมันที่มีคาร์บอนสายสั้น ๆ จะเหมือนกันทั้งในเซลล์ของพืชชั้นสูง สัตว์ รา แบคทีเรียและสาหร่าย

การดึงสายคาร์บอนของกรดไขมันเริ่มจาก  $C_{18}$  และต่อสายคาร์บอนไปเรื่อย ๆ ที่สายคาร์บอนด้วยการผลิตกรดไขมันสายยาวไม่เหมือนกับพืชน้ำมัน (ดังภาพที่ 2) กรดไขมันสายยาว ( $C_{14} - C_{18}$ ) พบมากในสาหร่าย โดยปกติแล้วกรดไขมันสายสั้น ๆ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไบโอดีเซล ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่พบใน *Chlorella* sp. แต่กรดไขมันสายยาวและไฮโดรคาร์บอนที่มีปริมาณสูง ๆ ก็ขึ้นอยู่กับบางสายพันธุ์ของสาหร่าย

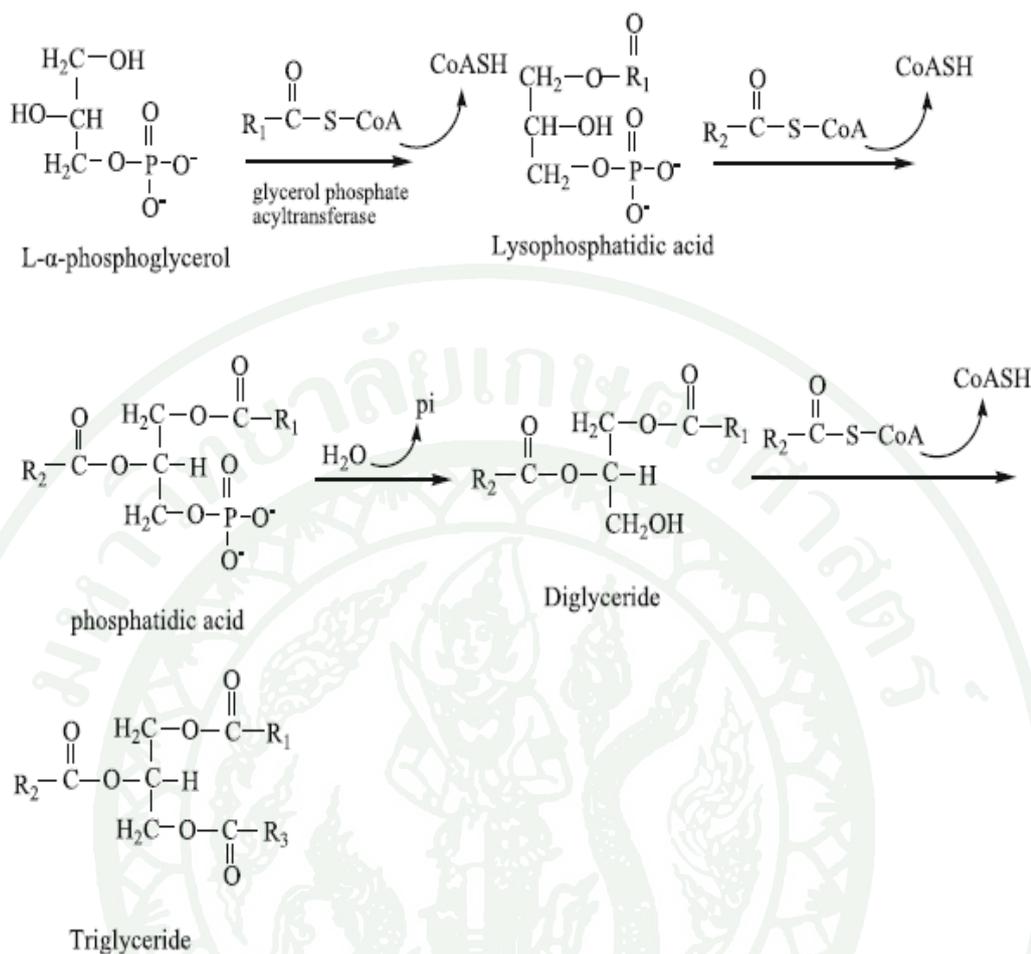
### 3. การสังเคราะห์ triglycerides ในสาหร่ายขนาดเล็ก

สาหร่ายสามารถสังเคราะห์ triglycerides เพื่อสะสมสารอาหารและเป็นแหล่งพลังงานเหมือนกับพืชชั้นสูงและสัตว์อื่น ๆ โดยทั่วไป L- $\alpha$ -phosphoglycerol และ acetyl-coA คือสารตั้งต้นหลักในการสังเคราะห์ triglycerides L- $\alpha$ -phosphoglycerol ส่วนใหญ่ได้มาจาก phosphodihydroxyacetone ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการ glycolysis ขั้นตอนของปฏิกิริยาแสดงในภาพที่ 3 hydroxyl ใน L- $\alpha$ -phosphoglycerol ทำปฏิกิริยากับ acetyl-coA เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ lysophosphatidic acid หลังจากนั้น acetyl-coA อีกตัวหนึ่งเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ phosphatidic acid ทั้ง 2 ปฏิกิริยานี้จะถูกรเร่งโดยเอนไซม์ glycerol phosphate acyl-transferase ในขั้นตอน lysophosphatidic acid จะถูกดึงน้ำออก (hydrolyzed) โดยเอนไซม์ phosphatidate phosphatase ไปอยู่ในรูป diglyceride ต่อมาเมื่อจับกับ acetyl-coA ตัวที่ 3 จะสังเคราะห์ triglycerides อย่างสมบูรณ์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเร่งโดยเอนไซม์ glyceryldiestertransacylase



ภาพที่ 2 การต่อและดัดสายคาร์บอนของกรดไขมัน

ที่มา: Huang *et al.* (2010)



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์ triglycerides ในสาหร่ายขนาดเล็ก

ที่มา: Huang *et al.* (2010)

## 5. ปัจจัยที่ผลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

### 5.1 แหล่งคาร์บอน

#### 5.1.1 แหล่งคาร์บอนประเภทสารอินทรีย์

แหล่งคาร์บอนประเภทสารอินทรีย์ ได้แก่ กลูโคส กลิเซอรอล กรดอะซิติก สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของสาหร่ายขนาดเล็กที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบ heterotroph และ mixotroph จะสามารถเจริญและผลิตปริมาณน้ำมันได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ phototroph ที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์

เป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามการใช้แหล่งอินทรีย์คาร์บอนเหล่านี้มาทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้นจะส่งผลให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น เนื่องจากว่ามีราคาสูง (Perez-Garcia *et al.*, 2011)

Yeh *et al.* (2012) ได้ศึกษาการผลิตชีวมวลและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของ *Chlorella vulgaris* ESP-31 ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบ photoheterotrophic ซึ่งมีค่า pH 8 ควบคุมบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน เช่น กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส กลีเซอรอล โซเดียมอะซิเตต และกรดอะซิติก พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงโดยไม่มีการควบคุม pH สาหร่ายสามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีความเข้มข้นชีวมวลสูงสุดคือ 3.5 กรัมต่อลิตร และผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้ 26 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อมีการควบคุม pH 8.5 สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีฟรุกโตสและโซเดียมอะซิเตต เป็นแหล่งคาร์บอนมีความเข้มข้นชีวมวลเพิ่มขึ้น 3.2 - 3.6 กรัมต่อลิตร และผลิตน้ำมันภายในเซลล์ 24-26 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามทำการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch โดยปรับค่าของ pH ด้วยกรดอะซิติก ซึ่ง pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมให้อยู่ระหว่าง 7.0 - 7.5 ผลการทดลองนี้พบว่ามีความสูงเท่ากับ 0.68 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมันภายในเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ และผลิตน้ำมันต่อเวลา 78 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนชนิดของกรดไขมันนั้นมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ ประกอบไปด้วย 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันอิ่มตัว (ส่วนใหญ่เป็น 16: 0, 18: 0) และไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (18: 1) องค์ประกอบของกรดไขมันนี้เหมาะสำหรับการใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

### 5.1.2 แหล่งคาร์บอนประเภทสารอนินทรีย์

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนประเภทสารอนินทรีย์ที่จำเป็นต่อสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะ phototroph ซึ่งจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในวัฏจักรคาร์วิน (Calvin cycle) เพื่อสังเคราะห์ไปเป็นแป้งและไขมันในเซลล์ต่อไป ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายนั้น การเขย่าจะให้คาร์บอนไดออกไซด์สำหรับการสังเคราะห์แสง ทั้งยังช่วยให้อาหารเลี้ยงสาหร่ายเข้ากันและรักษาสภาพให้เป็นเนื้อเดียวกันระหว่างเซลล์กับสารอาหาร (Amaro *et al.*, 2012)

## 5.2 แหล่งไนโตรเจน

หลักการทั่วไปเมื่อมีไนโตรเจนไม่เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหรือการผลิตชีวมวล คาร์บอนที่มากเกินไปที่ได้จากการสังเคราะห์แสงจะกลายเป็นโมเลกุลสะสม เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอลและแป้ง (Scott *et al.*, 2011)

ความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงมีความสำคัญต่อขั้นตอนแรกของกระบวนการเพาะเลี้ยง โดยจะช่วยในการสืบพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก แต่เมื่อลดระดับความเข้มข้นไนโตรเจนในขั้นตอนที่สองเพื่อสนับสนุนการสังเคราะห์ของเอนไซม์และการเปลี่ยนแปลงเซลล์ ดังนั้น ในขั้นตอนที่สองคาร์บอนจะเปลี่ยนไปเป็นลิปิดมากกว่าโปรตีน ขณะที่โปรตีนนั้นสำคัญสำหรับการเจริญของสาหร่าย ในขั้นตอนแรก ผลของกลไกการลดแหล่งไนโตรเจนจะสัมพันธ์กับการลดลงของคลอโรฟิลล์และจำนวนคลอโรพลาสต์ภายในเซลล์ ขณะที่จะมีฟอสโฟลิปิดและไกลโคลิปิดเพิ่มขึ้นจำนวนมากภายในคลอโรพลาสต์ การลดลงของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อภายในเซลล์ทำให้มีการใช้แหล่งไนโตรเจนไปสนับสนุนให้การสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์สำหรับการแบ่งเซลล์ต่อไปน้อยลง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงภายใต้ระดับของไนโตรเจนลดลงจะช่วยยับยั้งการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กและเพิ่มปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (Emma and Sarbatly, 2012)

Converti and Alessandro (2009) ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญและการสะสมไขมันภายในเซลล์ของ *Nannochloropsis oculata* และ *C. vulgaris* เพื่อผลิตไบโอดีเซล พบว่า เมื่อลดความเข้มข้นของไนโตรเจนลงจะมีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นโดยใน *N. oculata* ไขมันเพิ่มขึ้นจาก 7.90 เป็น 15.31 เปอร์เซ็นต์ และ *C. vulgaris* จาก 5.90 เป็น 16.41 เปอร์เซ็นต์

Praveenkumar *et al.* (2012) ได้ศึกษาการขาดแคลนสารอาหารที่มีผลต่อการสะสมไขมันของสาหร่าย *Chlorella* sp. BUM11008 พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายให้อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน ทำให้มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นถึง  $428.26 \pm 12.61$  มิลลิกรัมต่อกรัม ขณะที่มวลเซลล์ลดลง

### 5.3 แสง

แสงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเพาะเลี้ยงแบบ phototroph เนื่องจากใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน จึงทำให้มีผลต่อการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโต การสร้างองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ นอกจากนั้นยังคงมีปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น แหล่งของแสง ความเข้มแสง วัฏจักรของแสง (อัตราของวัฏจักรของแสงสว่างต่อมืด เช่น 12: 12, 16: 8 และ 24: 0) ความหนาแน่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการสร้างสี นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยจำกัด (Limiting Factor) ที่สำคัญมากที่สุดปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วย ถ้าผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมี

ระดับของรังสี (irradiance) มากเกินไปจะก่อให้เกิด photo-inhibition, metabolic uncoupling, photo-oxidative damage และการตายของเซลล์ (Day *et al.*, 2012)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในเชิงพาณิชย์ยังคงเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิด (open ponds) โดยใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งสามารถใช้ได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงแบบระบบปิดหรือถังปฏิกรณ์ (photobioreactor) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิดโดยปกติแล้วยังมีน้อย และต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่ในการเพาะเลี้ยง (Amaro *et al.*, 2012) วิธีการใช้เส้นใยนำแสง (optical fibers: OF) เพื่อเพิ่มแสงสว่างภายในระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย อาจจะเป็นการทดลองที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้แสงและการลดลงในการบริโภค เช่น OF สัมผัสกับพลังงานแสงสามารถรวมจับกับแสงอาทิตย์ ส่วนใหญ่วัฏจักรที่ไม่มีแสงและมีแสง (dark-light cycle) ของกระบวนการเพาะเลี้ยงนั้นมีผลต่อการผลิตไขมันในเซลล์ช่วงระหว่างระยะที่สอง (two-stage) และการทดลองเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำจืดและน้ำทะเลส่วนใหญ่ยังคงใช้ภายใต้อัตราของวัฏจักรที่ไม่มีแสงและมีแสง คือ 12: 12, 14: 10, 10: 14 และ 16: 8 (Suali and Sarbatly, 2012)

Ruangsomboon (2012) ได้ศึกษาอิทธิพลของแสงที่มีผลต่อการผลิตไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Botryococcus braunii* KMITL 2 โดยศึกษาการให้แสงสว่าง: มีด เท่ากับ 12: 12, 14: 10, 16: 8 และ 24: 0 ภายใต้ความเข้มของแสง  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  พบว่าภายใต้สภาวะที่ให้แสงสว่าง: มีด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง มีการผลิตไขมันในเซลล์และมีผลผลิตไขมันสูงคือ  $33.32 \pm 1.97$  เปอร์เซ็นต์ และ 0.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ศึกษาความเข้มของแสงที่ 0.3, 87.5, 200 และ  $538 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  พบว่าที่ความเข้มของแสงต่ำ ๆ ( $87.5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) สามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มของแสงที่สูงกว่า 200 และ  $538 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  มีความจำกัดในการเจริญแต่สามารถผลิตไขมันได้สูง

#### 5.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก การควบคุมอุณหภูมิจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้สาหร่ายขนาดเล็กสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพภูมิอากาศได้ สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกัน เช่น พื้นที่ป่าเขตร้อนที่มีฝนตก แห้งแล้ง หิมะหรือภูเขา ด้วยเหตุนี้ อุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงจึงส่งผลกระทบต่อศักยภาพของวัตถุดิบที่จะนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงทางชีวภาพ (Suali and Sarbatly, 2012) ซึ่ง *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. และ *Chlorella* sp. สามารถเพาะเลี้ยงในช่วงอุณหภูมิ 16 - 20 องศาเซลเซียส มีรายงานว่า *Schizochytrium*

sp. เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ 10 องศาเซลเซียส ส่งผลให้การผลิตไขมันลดลง เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่า 16 องศาเซลเซียส สาหร่ายที่สามารถเพาะเลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิระหว่าง 20 และ 25 องศาเซลเซียส เช่น *Chlorella* sp. *Schizochytrium* sp. *Aurantiochytrium* sp. *Haerolococcus. pluvialis* และ *B. braunii*

Illman *et al.* (2000) ได้ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันได้สูง พบว่า สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสามารถผลิตน้ำมันในเซลล์ได้ใน ปริมาณสูงถึง 63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนลดลง

Converti and Alessandro (2009) ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของ ไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญและการสะสมไขมันภายในเซลล์ของ *N. oculata* และ *C. vulgaris* เพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยทำการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมตั้งแต่ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส พบว่า *N. oculata* ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นจาก 7.90 เป็น 14.92 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *C. vulgaris* ลดอุณหภูมิลงจาก 30 เป็น 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสะสม ไขมันลดลงจาก 14.71 เหลือเพียง 5.90 เปอร์เซ็นต์

### 5.5 pH

สาหร่ายแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับ pH ต่างกัน สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นกลางจนถึงมีสภาพเป็นด่าง หรือประมาณ 6.5 - 7.5 สำหรับค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. อยู่ในช่วง 5.5 - 6 (Hirata *et al.*, 1996)

ค่า pH ของสารละลายอาหารมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม ของสาหร่าย และยังมิบทบาทต่อการละลายของเกลือและสารประกอบเชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ ใน สารละลาย ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย ขณะเดียวกันค่า pH ยังส่งผลต่อการละลายของสารประกอบโลหะ โดยการเพิ่ม pH จะเป็นสาเหตุให้สารประกอบ โลหะที่เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นบางชนิดตกตะกอน ดังนั้น สาหร่ายจึงอาจขาดธาตุอาหารที่จำเป็น บางตัวได้

## 5.6 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

Yeesang and Cheirsilp (2011) ได้ศึกษาอิทธิพลของเกลือต่อการเจริญและการผลิตไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Botryococcus* สายพันธุ์ SK, TRG, PSU และ KB ที่แยกได้จากแหล่งน้ำในประเทศไทย โดยมีความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกันคือ 54.6, 38.8, 21.6 และ 17.2 mM พบว่าสายพันธุ์ PSU สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือสูง ขณะที่สายพันธุ์ SK, TRG และ KB มีการเจริญลดลง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงขึ้น พบว่าทุกสายพันธุ์มีการผลิตไขมันในเซลล์ลดลง

## 5.7 ความเข้มข้นของเหล็ก

Liu *et al.* (2008) ได้ศึกษาอิทธิพลของเหล็ก (iron) ต่อการเจริญและการสะสมไขมันในเซลล์ของ *Chlorella vulgaris* โดยเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{FeCl}_3$  ที่ต่างกัน คือ  $1.2 \times 10^{-8}$  ถึง  $1.2 \times 10^{-5}$  โมลต่อลิตร และเติมขณะที่เจริญอยู่ในช่วง late-exponential พบว่า  $\text{FeCl}_3$  ความเข้มข้น  $1.2 \times 10^{-5}$  โมลต่อลิตร สาหร่ายเจริญได้เร็วกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่าภายใน 25 วัน และสะสมไขมันในเซลล์ได้สูงถึง 56.6 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้  $\text{FeCl}_3$  มีผลต่อการเจริญทำให้เซลล์มีความหนาแน่นเพิ่มมากขึ้น และมีผลต่อการกระตุ้นให้สะสมไขมันในเซลล์เพิ่มขึ้น

Praveenkumar *et al.* (2012) ได้ศึกษาการขาดแคลนสารอาหารที่มีแนวโน้มต่อการสะสมไขมันในสาหร่าย *Chlorella* sp. BUM11008 โดยเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนเหล็ก พบว่ามวลเซลล์ลดลงเพียงเล็กน้อย ( $2.45 \pm 0.03$  กรัมต่อลิตร) และมีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $314.62 \pm 16.92$  มิลลิกรัมต่อลิตร) ชนิดของกรดไขมันประกอบด้วย stearic acid (28.4 เปอร์เซ็นต์), arachidic acid (15.57 เปอร์เซ็นต์), heneicosanoic acid (9.35 เปอร์เซ็นต์) และ linoleic acids (15.87 เปอร์เซ็นต์) จะเห็นได้ว่ามีกรดไขมันชนิด saturated และ monounsaturated อยู่ไม่น้อยเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะนี้

## 5.8 ความเข้มข้นของฟอสเฟต

Praveenkumar *et al.* (2012) ได้ศึกษาการขาดแคลนสารอาหารที่มีแนวโน้มต่อการสะสมไขมันในสาหร่าย *Chlorella* sp. BUM11008 พบว่าการขาดแคลน potassium-phosphate มีผลต่อความเข้มข้นของมวลเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ลดลงถึง  $2.46 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร ซึ่งภายใต้สภาวะเครียด (stress) สาหร่าย *Chlorella* sp. BUM11008 มีการผลิตไขมันสูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญคือ

$319.89 \pm 10.02$  มิลลิกรัมต่อกรัม และกรดไขมันที่พบคือ stearic acid (15.38 เปอร์เซ็นต์), lignoceric acid (30.41 เปอร์เซ็นต์), oleic acid (7.62 เปอร์เซ็นต์) และ linoleic acids (9.88 เปอร์เซ็นต์)

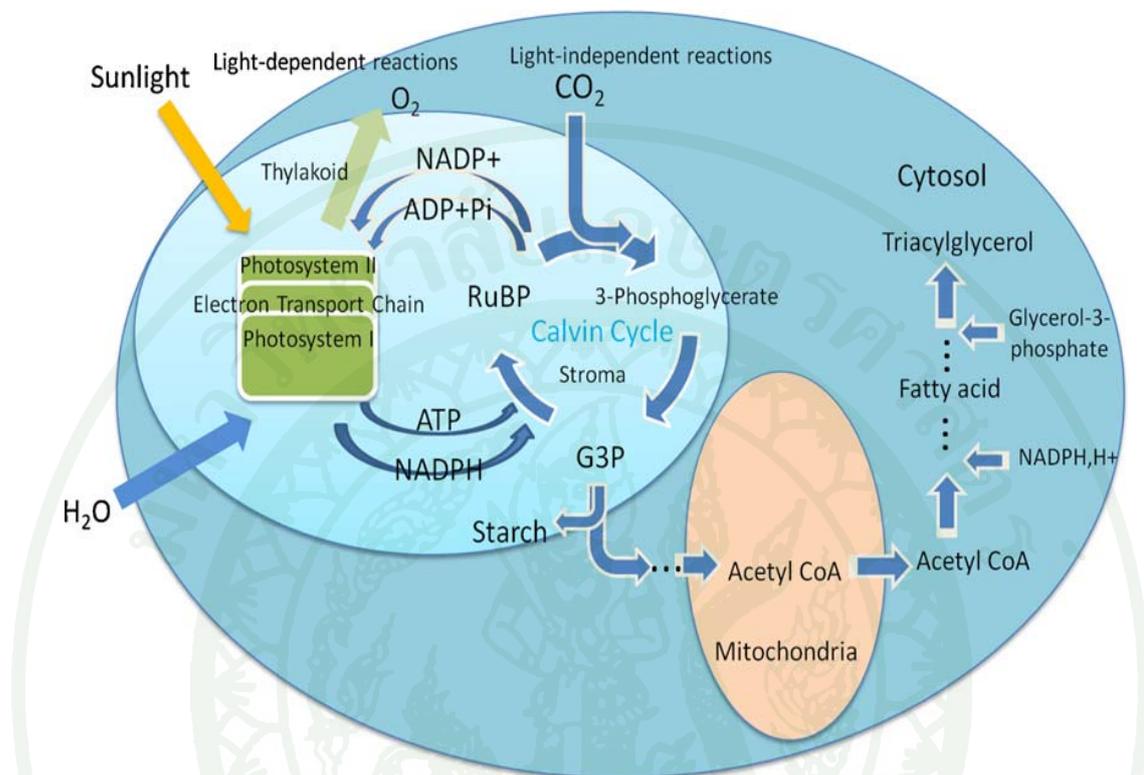
## 6. การปรับปรุงสายพันธุ์

ปัจจุบันนี้การปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายเพื่อให้สะสมน้ำมันในเซลล์เพิ่มขึ้นได้มีการศึกษากันมากขึ้น มีสาหร่ายเพียงบางชนิดที่ได้ทำการวิจัยมาบ้างแล้ว เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* และ *Chlorella pyrenoidosa* (Li *et al.*, 2010; Ramazanov and Ramazanov, 2006) เนื่องจากว่า *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นต้นแบบของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสำหรับศึกษาเซลล์ และการสังเคราะห์โมเลกุลโดยตรง (Merchant *et al.*, 2012)

การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันในเซลล์นั้นสามารถทำได้สองวิธี คือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตน้ำมัน การค้นหาพันธุ์กลายพันธุ์สามารถทำได้โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สังเคราะห์แป้งได้น้อยลง หรือไม่สามารสังเคราะห์แป้งได้เลย เนื่องจากการสังเคราะห์แป้งและการสังเคราะห์น้ำมันใช้สารตั้งต้นเดียวกัน แสดงดังภาพที่ 4 (Li *et al.*, 2010; Ramazanov and Ramazanov, 2006) ส่วนการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสามารถทำได้ โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมเลกุลน้ำมัน เช่น acetyl-CoA carboxylase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase และ ADP-glucose pyrophosphate แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับการเพิ่มการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในสาหร่าย *Chlorella sp.*

จากภาพที่ 4 แสดงกลไกของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และการสะสมคาร์บอนในเซลล์สาหร่าย การสะสมคาร์บอนคือการสังเคราะห์แป้งและการสังเคราะห์น้ำมันหรือไตรเอซิลกลีเซอรอลภายในเซลล์ เริ่มจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่บริเวณ thylakoid โดยใช้แสงเป็นแหล่งของพลังงานแล้วได้ ATP และ NADPH เป็นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาการใช้แสง (light reaction) จากนั้น ATP และ NADPH จะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาไม่ใช้แสง (dark reaction) หรือเรียกว่า calvin cycle ซึ่งในขั้นตอนนี้จะตรึง CO<sub>2</sub> ในชั้นบรรยากาศเป็นแหล่งของคาร์บอน จากนั้นเปลี่ยนรูปจากคาร์บอน 2 โมเลกุลเป็นคาร์บอน 3 โมเลกุล คือ glycerol-3-phosphate (G3P) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล ดังนั้นการสังเคราะห์แป้งขึ้นอยู่กับ AGPase และ 3-Phosphoglycerate จากนั้นเกิดการสังเคราะห์น้ำมันขึ้นบริเวณ cytosol

โดยมี acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นและใช้ NADPH, H<sup>+</sup> และ G3P ในกระบวนการสังเคราะห์น้ำมัน (Zeng *et al.*, 2011)



ภาพที่ 4 กลไกของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และการสะสมคาร์บอนในเซลล์สำหรับ

ที่มา: Zeng *et al.* (2011)

#### 6.1 การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ (mutation) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถถ่ายทอดจากชั่วอายุหนึ่งไปยังอีกชั่วอายุหนึ่ง ซึ่งเป็นกระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้น ระดับการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosome mutation) คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม หรือการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม และการกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation หรือ point mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีนจากอัลลีลหนึ่ง ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ (ประดิษฐ์,

2554) การกลายพันธุ์แบบนี้เป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่ม (random) การเกิดการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

6.1.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทอโมเมอร์ริซึม (tautomeric shift) หรือการก่อให้เกิดไอออน (ionization) ในโมเลกุลของเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

6.1.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ชักนำให้เกิดขึ้น ซึ่งสิ่งก่อกลายพันธุ์ คือ รังสีต่าง ๆ รังสีก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) และ รังสีไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) และสารเคมี

## 6.2 การซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair)

โมเลกุลของดีเอ็นเออาจเกิดการเสียหายหรือชำรุดได้หลายทาง อย่างไรก็ตามในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะมีกลไกการซ่อมแซมในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้

โฟโตรีแอกติเวชัน (photoreactivation) คือ การซ่อมแซมความผิดปกติของโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น การเกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งเกิดจากการจับกันของเบส T ในสายเดียวกัน เป็นไซโคลบิวเทนริง (cyclobutane ring) โดยใช้เอนไซม์โฟโตรีแอกติเวติง (photoreactivating enzyme) หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอส (DNA photolyase) โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโฟโตไลเอสจะเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่เกิดไทมีนไดเมอร์ และเอนไซม์นี้จะดูดซับแสงสว่าง (visible light) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เอนไซม์ชนิดนี้เข้าทำลายไซโคลบิวเทนริงที่ยึดระหว่างเบส T ด้วยกัน ทำให้เบส T เข้าคู่กับเบส A ของสายตรงข้ามได้เหมือนเดิม จากนั้นเอนไซม์ก็จะหลุดจากตำแหน่งที่ผิดปกติ ก็จะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปกติเหมือนเดิม

Ramazanov and Ramazanov (2006) ได้ศึกษาการค้นหาพันธุกลายของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI ที่สามารถผลิตไขมันได้ในปริมาณสูง โดยคัดเลือกสาหร่ายพันธุกลายที่สังเคราะห์แป้งได้น้อยหรือไม่สามารถสังเคราะห์แป้งได้เลยจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV (254 nm) นาน 30 นาที เนื่องจากการสังเคราะห์แป้งและการสังเคราะห์ไขมันใช้สารตั้งต้นเดียวกัน

จากผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์กลายสามารถผลิตไขมันได้สูงขึ้นเพิ่มจาก  $25.2 \pm 1.2$  เปอร์เซ็นต์ เป็น  $38.0 \pm 2.3$  เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักแห้ง

Li et al. (2010) ศึกษา *Chlamydomonas* สายพันธุ์กลายที่สังเคราะห์แป้งได้น้อย พบว่าข้อบกพร่องในเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase จึงทำให้มีการสะสม triacylglycerols ได้จำนวนมาก การชักนำให้เกิดพันธุ์กลายโดยใช้รังสี X - ray และ UV พบว่าสายพันธุ์กลายสามารถผลิตไขมันในเซลล์ได้ 47 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีการสะสมไขมันในเซลล์เพียง 13 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

## 7. การออกแบบการทดลองทางสถิติ

### 7.1 การออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman design

Plackett and Burman (1946) ได้ตีพิมพ์ผลงานที่มีชื่อเสียงเรื่อง “The Design of Optimal Multifactorial Experiments” ในวารสาร Biometrika (vol. 33) ได้อธิบายหลักการของการสร้างสิ่งทดลองที่ประหยัดทรัพยากรด้วยการสร้างสิ่งทดลองที่เป็นจำนวนเท่าของ 4 แทนที่จะเป็น 2 การจัดสิ่งทดลองแบบนี้มีประโยชน์มากในการคัดเลือกปัจจัยเพื่อการศึกษา โดยสนใจเฉพาะปัจจัยหลักเท่านั้น

การจัดการทดลองแบบ Plackett and Burman design นี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการแบบแฟกทอเรียล หรือจัดเป็นแฟกทอเรียลบางส่วน ที่มีการจัดให้อิสระต่อกัน (orthogonal) ใช้เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการพัฒนาสูตรหรือพัฒนาวิธีการผลิตจาก 10 - 20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1 - 4 ปัจจัย โดยที่ไม่ต้องทำการทดลองขนาดใหญ่ สามารถลดจำนวนการทดลองได้โดยใช้เทคนิคนี้ แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถศึกษาอันตรกิริยาของปัจจัยต่าง ๆ ได้ การจัดการทดลองจะใช้  $2^k$  factorial arrangement เป็นพื้นฐาน โดยจะมีแบบแผนมาตรฐาน (initial block) เป็นแถวแรกของการเริ่มต้นในการสร้างสิ่งทดลอง ดังตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าเครื่องหมายในแถวต่อมาในเมตริกจะถูกสร้างขึ้นจากการเลื่อนไปทางซ้ายมือ โดยแถวสุดท้ายของเมตริกจะเป็นเครื่องหมายลบทั้งหมด

ประโยชน์ของการจัดการทดลองแบบ Plackett and Burman design เพื่อใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกรณีที่มีปัจจัยที่ต้องการคัดเลือกหลายปัจจัย และ

ทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น แต่ไม่สามารถศึกษาถึงผลของ interaction ต่าง ๆ ที่มีในการทดลองได้

ในการใช้ Plackett and Burman design ต้องกำหนดสิ่งทดลองแรกเป็นดั่งเมตริกแถวแรก จากนั้นสิ่งทดลองต่อไปกำหนดในลักษณะโครงสร้างวน (cyclic construction) กล่าวคือ นำรหัสสุดท้ายของ Initial block ขึ้นมาอยู่ลำดับหน้าสุด และวนไปจนครบ  $N - 1$  รอบ ส่วนสิ่งทดลองสุดท้ายเป็น Added block คือใช้ระดับต่ำ (-) ทุกปัจจัย อย่างไรก็ตามการวนนั้นอาจนำรหัสหน้าสุดมาต่อท้าย และวนไปจนครบ  $N - 1$  รอบได้เช่นเดียวกัน เพียงแต่ในการทดลองให้ใช้ระดับสูงหรือต่ำให้ถูกต้องตามแผนที่กำหนดหรือวางไว้เป็นสำคัญ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือกปัจจัยในการทดลอง  $N$  ครั้ง

N	ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง, $k = N - 1$
8	+++--
12	++-++++--
16	++++-+-+--
20	++-++++-+-+--
24	++++-+-+--

หมายเหตุ + หมายถึง ระดับปัจจัยที่ทำการศึกษาที่มีระดับสูงซึ่งมีค่าเท่ากับ +1

- หมายถึง ระดับปัจจัยที่ทำการศึกษาที่มีระดับต่ำซึ่งมีค่าเท่ากับ -1

N หมายถึง จำนวนสิ่งทดลอง (treatment)

K หมายถึง จำนวนปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

ที่มา: คัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

ตารางที่ 5 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องการกลั่นกรอง จำนวน 7 ปัจจัย โดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง

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

หมายเหตุ A - G หมายถึง ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

## 7.2 การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Method, RSM)

การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Method, RSM) เป็นเทคนิคทางสถิติอย่างหนึ่งที่ใช้แผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ที่เป็นที่น่าสนใจของนักวิจัย ผลคือนักวิจัยสามารถที่จะหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ สภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (optimization) จากความสัมพันธ์เหล่านั้นเมื่อพิจารณาปัจจัยที่สนใจเหล่านั้นพร้อม ๆ กัน โดยความรู้พื้นฐานที่ต้องใช้คือ การวางแผนการทดลอง (experimental design) การวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และความรู้ในการใช้โปรแกรมที่สร้างแผนภาพคอนทัวร์ จึงทำให้การ optimization นั้นถูกต้องและแม่นยำกว่าการใช้วิธี “one factor at a time” เนื่องจากว่าตัวแปรที่สนใจเหล่านั้น มักจะผ่านการกลั่นกรองด้วยวิธี Plackett and Burman design มาก่อนโดยพิจารณาจากค่า significant (อนุวัตร, 2549)

RSM เป็นการแสดงหรือตัวแทนทางเรขาคณิตที่ได้รับ เมื่อผลตอบสนองของตัวแปร (Response, Y) ถูกพล็อตให้เป็นฟังก์ชันของตัวแปร (X) เหล่านั้น

### แบบจำลองทั่วไป

$$Y = f(X_1 + X_2 + \dots + X_k) + E$$

โดยที่

Y คือ ค่าตอบสนอง (response), dependent variable หรือ output variable

$X_1 + X_2 + \dots + X_k$  คือ ตัวแปรที่สนใจ, independent variable หรือ input variable

E = error term

แผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) เป็นอนุกรมของเส้นหรือกราฟซึ่งมีค่าที่แน่นอนและคงที่ สอดคล้องกับระดับของปัจจัยที่เปลี่ยนไป แผนภาพคอนทัวร์มีหลายแบบสอดคล้องกับสมการถดถอย ที่ตรวจสอบได้ เช่น mound-shaped, stationary ridge, rising ridge, saddle โดยแผนภาพคอนทัวร์ที่ สร้างเป็นแผนภาพ 3 มิติ เรียกว่า surface plot

การออกแบบการทดลองที่จะนำมาใช้ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมด้วยการวิเคราะห์ พื้นผิวตอบสนอง (RSM) ได้แก่ การทดลองแบบ Factorial  $3 \times 3$  in CRD or RCBD, Central Composite Design (CCD) หรือ factorial design, Box Behnken Design, Rotatable Design และ Mixture Design เป็นต้น ในที่นี้จะขอกกล่าวเฉพาะการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

การหาพื้นผิวตอบสนองนั้นมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) กับกลุ่มปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรนั้น ๆ วิธีดังกล่าวนี้ใช้ในการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) มาประยุกต์หาความสัมพันธ์ที่เรียกว่า รูปแบบโพลิโนเมียล (polynomial model) ซึ่งโดยทั่วไป รูปแบบของพื้นผิวตอบสนองจะพิจารณารูปแบบโพลิโนเมียลลำดับที่ 1 (first order model) หรือ ลำดับที่ 2 (second order model) ส่วนการประมาณค่าพารามิเตอร์ หรือสัมประสิทธิ์การถดถอย ใน รูปแบบดังกล่าวจะใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (อนุวัตร, 2549)

รูปแบบโพลิโนเมียลลำดับที่ 1 (first order model) โดยทั่วไปมีการนำมาเฉพาะบางแผนการทดลอง Khuri and Cornell (1987) กล่าวว่า การออกแบบเชิงแฟคทอเรียล 2 ระดับ ( $2^k$  factorial)

รูปแบบพหุนามอันดับที่ 2 (second order model) มีแผนการทดลอง เช่น CCD การออกแบบเชิงแฟคทอเรียล 3 ระดับ ( $3^k$  factorial) เป็นต้น ดังนั้นจะต้องมีระดับการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับ ซึ่งรูปแบบพหุนามอันดับที่ 2 โดย  $k$  เป็นตัวแปร แสดงดังสมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i^2 + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i X_j + E \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่  $Y$  คือ ตัวแปรตอบสนอง

$\beta$  คือ สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอย

$X_i, X_j$  คือ ตัวแปรอิสระ

$E$  คือ ความคลาดเคลื่อน

#### แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD)

Central Composite Design (CCD) เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองที่นิยมใช้หากระบวนการที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการทดลองที่เพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับของปัจจัยให้มากขึ้นเพื่อต้องการใช้แบบจำลองอันดับสูง จากเดิมที่ใช้ได้เพียงแค่อันดับหนึ่งเป็นอันดับสองหรือสาม วิธีการสร้างสิ่งทดลองให้เริ่มจากการสร้างสิ่งทดลองจากแฟคทอเรียล  $2^k$  แล้วเพิ่มจุดบนแกน coordinate โดยมีค่า code level  $\pm \alpha$  ดังตารางที่ 6 จากนั้นเพิ่มจำนวน  $m$  ที่จุดกลาง หลังจากนั้นสุ่มแต่ละสิ่งทดลองไปยังแต่ละหน่วยทดลอง จำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด ( $n$ ) จะมีค่า  $= 2^k + 2k + m$  ซึ่ง  $n < 3^k$  เสมอ และถ้า  $\alpha = F^{1/4}$  ( $F =$  จำนวนของสิ่งทดลองจากแฟคทอเรียลที่ใช้) การทดลองนี้นิยมทำซ้ำที่ระดับกลางของปัจจัยเพื่อใช้ประมาณความคลาดเคลื่อนของการทดลอง ซึ่งการเพิ่มจำนวนซ้ำจะมีผลกระทบต่อค่า  $\alpha$  ซึ่งอาจจะต้องเปลี่ยนไปตามจำนวนซ้ำเพื่อให้สิ่งทดลองเป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติจะกำหนดค่า  $\alpha$  ก่อนเสมอแล้วจึงทำการทดลองซ้ำที่จุดกลาง

ตารางที่ 6 ค่าของ code level ใน Central Composite Design สำหรับ 3 ปัจจัย  $\alpha = 1.68$

สิ่งทดลอง (Treatment)	Code level		
	ปัจจัย $X_1$	ปัจจัย $X_2$	ปัจจัย $X_3$
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)

#### ขั้นตอนการทำ RSM

1. เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมให้มีสิ่งทดลองจำนวนมากพอที่จะสร้างแบบจำลองเพื่อใช้สร้างแผนภาพคอนทัวร์ได้
2. สร้างแบบจำลองโดยวิธีการทางสถิติ เช่น สมการถดถอยที่ดีที่สุด (นิยมใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS, SPSS, MINITAB)

3. สร้างแผนภาพคอนทัวร์จากสมการที่หามาได้
4. ตรวจสอบจุดที่เหมาะสม (optimization)
5. พิสูจน์แบบจำลอง (verification) โดยทำการทดลองที่เป็นอิสระ (นอกเหนือจากที่ใช้สร้างแบบจำลอง) ภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัวที่ศึกษา เปรียบเทียบค่าที่สังเกตกับค่าทำนาย เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง
6. ถ้าแบบจำลองไม่เหมาะสม (invalid) ให้สร้างแบบจำลองใหม่ (กลับไปทำซ้ำข้อ 2 ถึง 5) หรือให้ไปกำหนดขอบเขตของตัวแปรที่ศึกษาใหม่

การกำหนดค่ารหัส (code value) และค่าจริง (actual value)

ค่ารหัส (code values) คือ ค่าที่ปรับ scale ของค่าจริงให้อยู่ใน scale เดียวกัน ซึ่งพิจารณาจากจำนวนปัจจัยที่นำมาศึกษา และถูกกำหนดค่าสูงสุด (maximum value) และค่าต่ำสุด (minimum value) จากจำนวนปัจจัย ซึ่งได้แสดงวิธีคำนวณไว้ ดังตารางที่ 6

$$\text{คำนวณได้จาก } \alpha = [2^k]^{1/4}$$

k คือ จำนวนปัจจัย

ถ้า k = 2 ดังนั้นค่า  $\alpha = 1.414$

ถ้า k = 3 ดังนั้นค่า  $\alpha = 1.68$

ตารางที่ 7 การกำหนดค่ารหัส (code value) และค่าจริง (actual value)

Design	Code values	
	Minimum value	Maximum value
Factorial	-1	+1
CCD (2 ปัจจัย)	-1.414	+1.414
CCD (3 ปัจจัย)	-1.68	+1.68

RSM เป็นวิธีที่ใช้สำหรับหา optimization โดยมีการคัดกรองปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญออกตามวิธีการของ Plackett and Burman Design หลังจากที่ได้แบบจำลองมาแล้ว ควรพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลอง (model) ซึ่งมักจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการวิเคราะห์สมการการถดถอย โดยเริ่มพิจารณาว่าตัวแปรตามและตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กันในลักษณะใด สร้างรูปแบบการถดถอยเพื่อแทนลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร และสร้างสมการการถดถอย (regression equation) จากรูปแบบที่กำหนดนั้นโดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method) นอกจากนี้สมการการถดถอยที่สร้างขึ้นจะเป็นสมการที่เหมาะสมหรือไม่นั้น จะพิจารณาได้จากค่าสถิติ และการทดสอบสมมติฐานค่าสถิติที่ใช้ คือค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination;  $R^2$ ) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจปรับแล้ว (adjusted coefficient of determination;  $R^2_{adj}$ ) นอกจากนี้การวิเคราะห์ lack of fit จะช่วยยืนยันถึงความเหมาะสมของแบบจำลอง การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการวิเคราะห์ lack of fit ซึ่งแสดงวิธีการในลำดับถัดไป

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

#### ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองที่ใช้ใน RSM

Source of variance	Df	SS	MS	F
Model	-	-	-	-
Linear	-	-	-	-
Quadratic	-	-	-	-
Cross product	-	-	-	-
Residual		Run regression		
Lack of fit		By difference		
Pure error		Run gim เลือก option LOF		

Ho:  $b_0 = b_1 = b_2 = b_3 = 0$

Ha: อย่างน้อย 1 เทอมไม่เท่ากับ 0

Ho: ไม่มี Lack of fit

ถ้า model significant แสดงว่า model ที่สร้างไว้เหมาะสมดีแล้ว (ให้ดูว่า significant ที่ linear หรือ quadratic) และถ้า Lack of fit นั้น significant แสดงว่านอกจาก model ที่สร้างขึ้นแล้ว อาจมี model อื่นที่อาจจะเหมาะสมกว่า ดังตารางที่ 8

การทดสอบ lack of fit (LOF) ของ RSM ใน SPSS คือ

1. Run regression เพื่อหา residual SS (df1)
2. Run proglm เลือก option LOF เพื่อหาค่า pure error SS (df2)
3. LOF SS (df3) = residual ค่า df - pure error โดยที่  $df3 = df1 - df2$
4. นัยสำคัญของ LOF ทดสอบโดย  $F = LOF MS / pure error ms$  เทียบกับ F table ที่ df3 และ df

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### อุปกรณ์

#### 1. ตัวอย่างของสาหร่ายที่ใช้ในงานวิจัย

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2 ไอโซเลต ได้แก่ DMKU5201 และ DMKU5202 ที่คัดแยกและเก็บรักษา โดย อ. ดร. วิเชียร ขงมานิตชัย และ อ. ดร. เคื่อนรัตน์ ชลอุดมกุล

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารแข็ง NSIII

2.2 อาหารเหลว NSIII

2.3 อาหารเหลว NSIII ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ

#### 3. สารเคมี

3.1 กรดไขมันมาตรฐาน (sigma. Co., Ltd., USA)

3.2 กรดซัลฟูริก (sulfuric acid)

3.3 กรดอะซิติก (acetic acid)

3.4 คลอโรฟอร์ม (chloroform)

3.5 โซเดียมโพรพิโอเนต (sodium propionate)

3.6 บิวทานอล (buthanol)

3.7 เมทานอล (methanol)

3.8 เอทานอล (ethanol or ethyl alcohol)

3.9 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

3.10 ไอโอดีน

3.11 เฮกเซน (hexane)

#### 4. เครื่องมือ

4.1 กล้องจุลทรรศน์ Light microscope (Olympus, Japan)

4.2 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)

4.3 แก๊สโครมาโทกราฟีแบบแคปิลลารี (GC-14B, Shimadzu, Japan)

4.4 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Satorius AG Göttingen Model LC621S, Germany)

4.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Satorius, USA)

4.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Labofuge 200, Hereaus, Germany)

4.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับ microcentrifuge tube (Spectrafuge 16M Labnet)

4.8 เครื่องผสมแบบเขย่า (Vortexgenie 2TM Model 6-560E, Genie Scientific Industries, INC., USA)

4.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงคลื่นยูวี (UV-visible Spectrophotometer, UVPharma Spec1700, Shimadzu, Japan)

4.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, ORION Model SA520, USA)

4.11 เครื่องทำน้ำ DI (Deionizer water)

4.12 เครื่องทำน้ำ RO (Reversosmosis water)

4.13 เครื่องระเหยแห้ง (Evaporator)

4.14 ตู้บ่มเชื้อ (Precision low temperature incubator 815)

4.15 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven, Memmert)

4.16 ไมโครปิเปต (pipetman, Gilson, France)

4.17 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave TOMY SS-325, TOMY SEIKO CO., LTD, Japan)

4.18 Magnetic bar และ magnetic stirrer (Framo® Gerätetechnik D-7821, France)

4.19 ชุดกรอง (membrane filter) และเยื่อกรอง (nitrocellulose membrane filter, Whatman)

4.20 ถังบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

4.21 เครื่องปั๊มอากาศ

## 5. อุปกรณ์

5.1 ขวดรูปหมุ่นขนาด 125 มิลลิลิตร

5.2 หลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร

5.3 Teflon coated screw-cap test tube ขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร

5.4 Petri dish

5.5 ปิเปตแก้ว

5.6 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

5.7 พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)

5.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

5.9 ปืนยิงแก๊ส

## วิธีการ

### 1. สาหร่ายที่ใช้ในการวิจัย

สาหร่ายที่ใช้ในการวิจัย เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กในสกุล *Chlorella* sp. 2 ไอโซเลต ได้แก่ DMKU5201 และ DMKU5202 ซึ่งเป็นสาหร่ายบริสุทธิ์ (axenic culture) แยกได้ในประเทศไทยและเก็บรักษาโดย อ.ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย และ อ. ดร. เตือนรัตน์ ชลอุดมกุล ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NSIII ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในตู้บ่ม ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง: มืด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยง

### 2. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp.

2.1 การสกัดดีเอ็นเอของ *Chlorella* sp. ตามวิธีการของ Wu *et al.* (2001)

นำ *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 เลี้ยงในอาหารเหลว NSIII นาน 5 - 7 วัน ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย CTAB buffer

ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำ Chloroform: Isophenyl (24: 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที 2 ครั้ง ดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน ซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ในหลอดใหม่ เติมน้ำ ethanol 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.7 เท่าของส่วนใสที่ดูดได้เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ให้เหลือเพียงตะกอนดีเอ็นเอ

2.2 การเตรียม PCR reaction mixture (ตารางที่ 9) โดยใช้ primer NS1 (5' - GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') และ NS2 (5' - GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3') เพื่อเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ขนาด 550 bp

2.3 นำ PCR reaction mixture ใส่ในเครื่อง PCR (ของบริษัท G-STORM รุ่น GT 482.0125 ประเทศไทย) และปรับสถานะในแต่ละ cycle เพื่อเพิ่มปริมาณ 18S rDNA (ตารางที่ 10) ทั้งหมด 30 cycles

2.4 นำ PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ภายใต้สนามไฟฟ้าผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (agarose gel electrophoresis)

เตรียมเจลโดยใช้วุ้นนางเหงือกความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ไปหลอมละลายใน 0.5X TAE buffer ปริมาตร 50 มิลลิตร แล้วเทลงใน apparatus ร่อนเจลแข็งตัว จึงนำไปวางในเครื่อง Gel electrophoresis เติมน้ำ 0.5x TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล แล้วเตรียมตัวอย่างเพื่อโหลดลงเจล ดังนี้

- DNA marker ที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ได้แก่ DNA ladder 100 bp ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ dH<sub>2</sub>O 3 ไมโครลิตร และ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร

- PCR product 5 ไมโครลิตร ผสม 6X loading dye 1 ไมโครลิตร

หลังจาก load ตัวอย่างลงบนแผ่นเจลแล้ว ปิดฝาเครื่องแล้วตั้งกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 - 40 นาที จึงนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) นาน 5 - 10 นาที แล้วนำเจลไปส่องดูแถบ ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง Transilluminator (ของบริษัท VILBER LOURMAT รุ่น VL - 6.C ประเทศฝรั่งเศส)

ตารางที่ 9 การเตรียม PCR reaction mixture

Reaction	Volume ( $\mu$ l)
DNA template (100 ng – 10 $\mu$ g)	6
Primer Forward NS1 (20 $\mu$ M)	1
Primer Rword NS2 (20 $\mu$ M)	1
dNTP (20 $\mu$ M)	2
PCR buffer	2
Taq polymerase	0.2
dH <sub>2</sub> O	7.8
Total volume	20

ตารางที่ 10 สภาวะในการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ด้วยเครื่อง PCR

PCR condition	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	94	5 นาที
Denaturation	94	45 วินาที
Annealing	53	45 วินาที
Extension	72	1 นาที
Final extension	72	5 นาที
Hold	4	จนกว่าจะใช้งาน

หมายเหตุ ทำการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ทั้งหมด 30 cycles

### 2.5 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIA quick® Gel extraction kit ตามขั้นตอน ดังนี้ ตัดแถบดีเอ็นเอจาก agarose gel ใส่ในหลอด เดิม buffer QG ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจล (มีเจล ประมาณ 100 ไมโครลิตร) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเขย่า 2 - 3 นาที เพื่อให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของเจล เขย่าให้เข้ากัน แล้วย้ายทั้งหมดลง QIA quick spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ

ต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม buffer QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใส จากนั้นล้างด้วย buffer PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นย้าย QIA quick spin column ไปยัง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วชะดีเอ็นเอด้วย buffer EB ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม buffer EB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 4 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ซึ่งจะได้ปริมาณของ PCR product รวมทั้งหมด 30 ไมโครลิตร นำไปแช่ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

## 2.6 การหาลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA

นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบส บริเวณ 18S rDNA โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

## 2.7 การจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย

นำลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA ไปเปรียบเทียบความเหมือนในฐานข้อมูล Gen Bank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ซึ่งจะทำให้สามารถจัดจำแนกสาหร่ายในระดับ genus และ species ได้

## 3. การกลายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp.

3.1 การชักนำให้สาหร่ายเกิดกลายพันธุ์ โดยใช้รังสี UV ตามวิธีการของ Ramazanov และ Ramazanov (2006)

นำสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NSIII นาน 5 วัน ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^6 - 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาวางให้รับรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่างระหว่างรังสี UV กับเซลล์สาหร่าย 35 เซนติเมตร นาน 40 นาที จากนั้นนำไป spread บนอาหารแข็ง NSIII บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง: มืด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง จนกว่าจะเห็นสาหร่ายเจริญ แล้วเก็บโคโลนีที่เจริญบนอาหารมาทดสอบเพื่อคัดเลือกพันธุ์กลาย (mutant) ที่

ไม่สามารถสังเคราะห์แป้ง จำนวน 40,000 โคโลนี จากนั้น picked up โคโลนีทั้งหมดไปยังบนอาหาร อาหารแข็ง NSIII และ NSIII (ไม่มีไนโตรเจน) แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะปกติ นาน 7 วัน เพื่อทดสอบหาสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แป้ง (starchless mutant)

### 3.2 การทดสอบหาสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แป้ง

เลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์กลาย บนอาหารแข็ง NSIII ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ นาน 7 วัน นำมาทดสอบโดยการอิงให้ได้รับไอของไอโอดีน ถ้าโคโลนีของสาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน คือ สายพันธุ์กลายที่สังเคราะห์แป้ง แต่ถ้าโคโลนีไม่เปลี่ยนสีเมื่อกระทบกับไอของไอโอดีน จะเห็นเป็นสีเหลืองส้มของไอโอดีน คือ สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แป้งได้หรือสังเคราะห์ได้น้อยกว่าปกติ จากนั้นเก็บสายพันธุ์กลายนี้ไว้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ผลิตน้ำมันได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) โดยวิธีการสกัดน้ำมันภายในเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันด้วยเครื่อง GC

## 4. การคัดเลือก *Chlorella* sp. พันธุ์กลายที่ผลิตไขมันสูง

### 4.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

ทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 สายพันธุ์กลาย ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 และสายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหาร NSIII ที่ลดปริมาณไนโตรเจนลงให้เหลือเพียง 1 ใน 4 ส่วนของไนโตรเจนทั้งหมด ในตู้บ่มแบบมีแสง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง: มืด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง นาน 7 วัน เก็บตัวอย่างไปวัดค่าการเจริญและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมัน

### 4.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

นำสาหร่ายพันธุ์กลายที่มีไขมันสะสมในเซลล์สูงที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิ มาทำการคัดเลือกหาพันธุ์กลายที่ผลิตไขมันได้สูงที่สุด โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 4.1

## 5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ *Chlorella* sp. สายพันธุ์กลายเพื่อการผลิตน้ำมัน โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design และ วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Method)

### 5.1 Plackett and Burman design

5.1.1 คัดเลือกปัจจัยที่ต้องการที่มีความสำคัญต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและน้ำมันภายในเซลล์มา 7 ปัจจัย คือ แหล่งไนโตรเจน ( $\text{KNO}_3$ ) แหล่งฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) pH คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) และความเข้มแสง (light intensity) ดังตารางที่ 11

ในการออกแบบการทดลองนี้เลือก  $\text{KNO}_3$  เป็นแหล่งของไนโตรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. เนื่องจากว่าไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญหรือการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลอย่างมาก แต่ถ้าแหล่งของไนโตรเจนถูกจำกัดจะมีผลต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่ายเช่นเดียวกัน (Scott *et al.*, 2011; Emma and Sarbatly, 2012), แหล่งฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของสาหร่าย เนื่องจากฟอสฟอรัสมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน และกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก เหตุผลที่เลือกทั้ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  เพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ด้วย,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์และสาหร่ายจะนำไปใช้ในการสร้างคลอโรฟิลล์,  $\text{NaCl}$  เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของสาหร่าย, pH ทำหน้าที่ให้เอนไซม์ทำงานได้ดี,  $\text{CO}_2$  เป็นแหล่งของคาร์บอน และแสงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากในการสังเคราะห์แสง เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงมีผลต่อการเจริญ การสร้างรงควัตถุ นอกจากนี้ความเข้มแสงยังเป็นปัจจัยจำกัด (Limiting Factor) ที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลของสาหร่ายอีกด้วย

5.1.2 สร้างเมตริกขึ้นมา โดยใช้  $N=8$  ดังตารางที่ 12 แทนค่าของปัจจัยที่ต้องการคัดเลือก low level (-) และ high level (+) ตามตารางดังกล่าว จะมีทั้งหมด 8 สิ่งทดลอง

5.1.3 หลังจากวางแผนการทดลองเสร็จ ให้เตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายตามสิ่งทดลองที่กำหนด แล้วทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. ในสภาวะโฟโตโทรฟ (phototroph condition) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่าง: มีด (16: 8) โดยเชื้อเริ่มต้นมีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.20 จากนั้นเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุกวันเริ่มตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์การเจริญ และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมัน

5.1.4 นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม PASW Statistics 18 โดยทำการคัดเลือกปัจจัยที่ต้องการจากค่า significant ค่า  $P < 0.1$  ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำปัจจัยที่มีค่า significant ที่ได้อย่างน้อย 2 - 3 ปัจจัยไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่อไปในวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Method)

ตารางที่ 11 ปัจจัยที่ต้องการคัดเลือกทั้งหมด 7 ปัจจัย โดยกำหนด model เป็น A B C D E F G

No.	Model	Factors	Low level (-)	High level (+)
1	A	KNO <sub>3</sub> (g/L)	0.2	2
2	B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	0.1	1
3	C	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	0.01	1
4	D	NaCl (g/L)	0.01	1
5	E	pH	5.5	7.0
6	F	CO <sub>2</sub> (%)	0	5
7	G	Light intensity (lux)	1,000	5,000

ตารางที่ 12 ตารางเมตริกตามแบบแผนมาตรฐานของ Plackett and Burman (1946)

สิ่งทดลอง	ปัจจัย						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

ที่มา: คัดแปลงจาก Plackett และ Burman (1946)

## 5.2 Response Surface Method

5.2.1 เลือกปัจจัยที่มีค่า significant ที่ได้จากการทดลองคือ แห่่งไนโตรเจน (KNO<sub>3</sub>) pH และความเข้มแสง (light intensity) แล้วกำหนดระดับของปัจจัย 5 ระดับ ตามตารางที่ 13 และ 14

5.2.2 เตรียมอาหารตามสิ่งทดลอง (treatment หรือ RUN) ที่กำหนดดังตารางที่ 14 แล้วทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะโฟโตโทรป ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่าง: มีด (16: 8) โดยเชื้อเริ่มต้นมีค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 จากนั้นเริ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุกวัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์การเจริญ และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมัน

5.2.3 นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้การหาสมการการถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ และตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองโดยทดสอบการแจกแจงแบบปกติและทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนและนำแบบจำลองที่ได้ไปทำนายค่าของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ โดยใช้โปรแกรม Design - Expert 7.0.0

ตารางที่ 13 กำหนดระดับของปัจจัย 5 ระดับ

Factors	Unit	Code	Level				
			-1.68	-1	0	1	1.68
KNO <sub>3</sub>	g/L	X1	0	0.2	1.1	2	2.612
pH		X2	4.99	5.5	6.25	7	7.51
Light intensity	lux	X3	0	1,000	3,000	5,000	6,360

ตารางที่ 14 กำหนดค่า code และค่าจริง

Treatment	X1	X2	X3	KNO <sub>3</sub>	pH	Light intensity	
1	-1	-1	-1	0.2	5.5	1000	
2	-1	-1	1	0.2	5.5	5000	
3	-1	1	-1	0.2	7	1000	
4	-1	1	1	0.2	7	5000	factorial
5	1	-1	-1	2	5.5	1000	point
6	1	-1	1	2	5.5	5000	
7	1	1	-1	2	7	1000	
8	1	1	1	2	7	5000	
9	-1.68	0	0	0	6.25	3000	
10	0	-1.68	0	1.1	4.99	3000	
11	0	0	-1.68	1.1	6.25	0	star
12	1.68	0	0	2.612	6.25	3000	point
13	0	1.68	0	1.1	7.51	3000	
14	0	0	1.68	1.1	6.25	6360	
15	0	0	0	1.1	6.25	3000	
16	0	0	0	1.1	6.25	3000	center
17	0	0	0	1.1	6.25	3000	point

## 6. วิธีการวิเคราะห์

### 6.1 การวัดการเจริญ (growth)

โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV-visible Spectrophotometer, UVPharmaSpec 1700, Shimadzu, Japan) จากนั้นนำค่าความขุ่นที่วัดได้คูณกับค่า cell factor จะได้เป็นค่าของ biomass production (g/L)

## 6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันทำได้โดยการสกัดไขมันจากสาหร่ายตามวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) แล้วเปลี่ยนรูปกรดไขมันนั้นให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ methyl ester (derivatization) ด้วยกระบวนการ transmethylation ตามวิธีการของ Holub and Skeaff (1987) จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแบบคาปิลลารี (capillary gas chromatography; GC-14B, Shimadzu, Japan) ร่วมกับการบันทึกข้อมูลด้วยเครื่องบันทึกผล integrator (C-R6A Chromatopac, Shimadzu) ประกอบกับบริเวณที่ฉีดมี split injector และใช้ระบบตรวจแบบ flame ionization detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิดคาปิลลารีที่ทำด้วย fused silica megabore column ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.540 มิลลิเมตร ที่ทำการเคลือบภายในด้วยฟิล์มหนา 1 ไมโครเมตร ประกอบด้วยสาร cyanopropyl 25 เปอร์เซ็นต์ phenyl 25 เปอร์เซ็นต์ methylsiloxane 50 เปอร์เซ็นต์ (Durabond 225, J&W Scientific, CA, USA) อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้ทำงานเท่ากับ 210 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของ injector และ detector ที่ใช้เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดคือ 1 ไมโครลิตร และอัตราการแบ่งตัวอย่าง (split rates) เท่ากับ 100: 1 ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพา (carrier gas) และปรับอัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 40 มิลลิลิตร ต่อนาที การวิเคราะห์เชิงปริมาณจะใช้การวิเคราะห์แบบเติมสาร internal standard (pentadecanoic acid, 15:0) เติมลงในกรดไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่างเซลล์สาหร่ายแล้วทำการคำนวณเปรียบเทียบเวลาคงตัว (retention time) ที่ได้จากกรดไขมันมาตรฐานและจากตัวอย่างเพื่อระบุชนิดของกรดไขมันจากนั้นคำนวณหาปริมาณกรดไขมันโดยการเทียบกับสารมาตรฐาน 9 ชนิด

## ผลการทดลอง

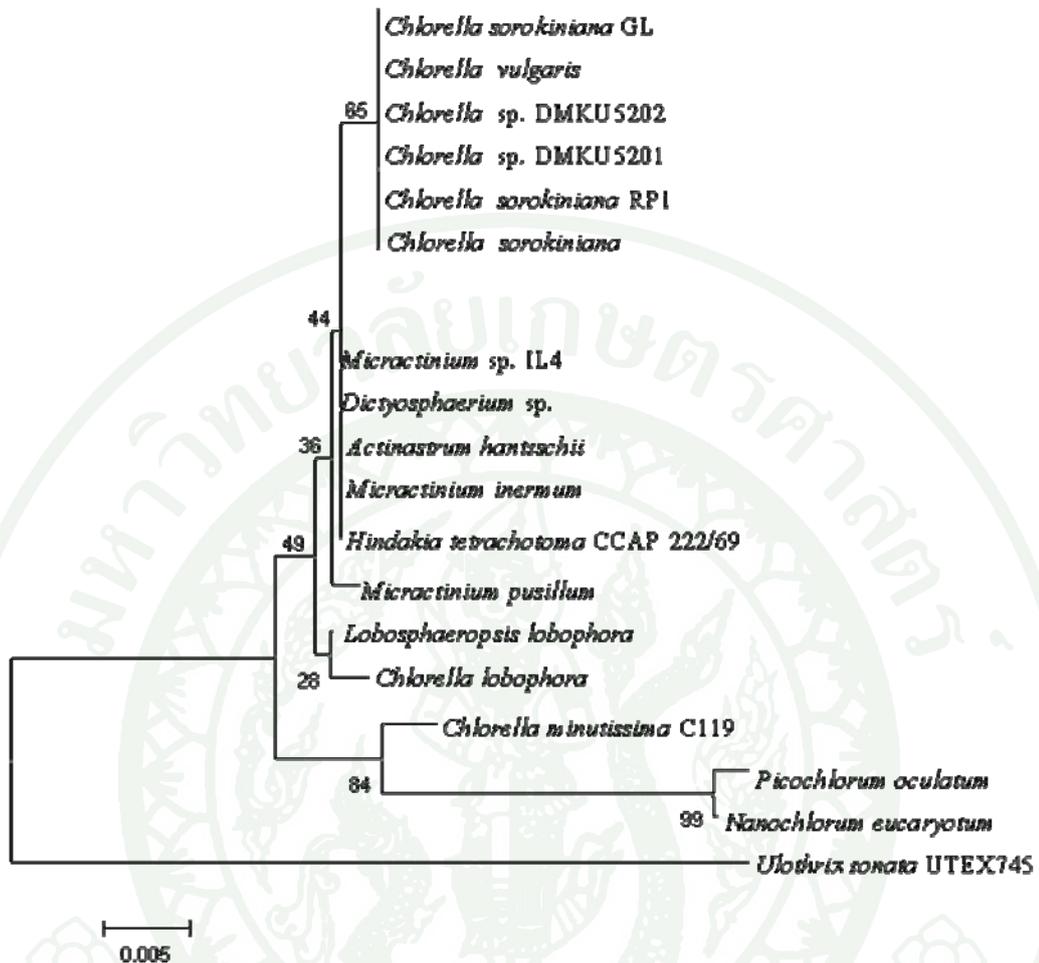
### 1. ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp.

ทำการสกัดดีเอ็นเอของ *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 ตามวิธีการของ Wu *et al.* (2001) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นยีนบริเวณ 18S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIA quick® Gel extraction kit นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบส บริเวณ 18S rDNA โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี หลังจากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gen Bank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เพื่อทำการจัดจำแนกชนิดของสาหร่าย

ผลจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 จากลำดับเบส บริเวณยีน 18S rDNA จำนวน 500 bp พบว่า สาหร่ายทั้งสองไอโซเลตมีความเหมือนใกล้เคียงกับ *Chlorella sorokiniana* ซึ่ง *Chlorella* sp. DMKU5201 มีความเหมือน *C. sorokiniana* 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Chlorella* sp. DMKU5202 มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสาหร่ายทั้งสองไอโซเลต จึงจัดจำแนกเป็น *C. sorokiniana* ดังแสดงในตารางที่ 15 และแผนภูมิสายวิวัฒนาการของสาหร่าย *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 แสดงดังภาพที่ 5

ตารางที่ 15 การจัดจำแนกสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. โดยการหาลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA

Isolates	Description	Accession number	Homology (%)
DMKU5201	<i>Chlorella sorokiniana</i>	GQ122327.1	99
DMKU5202	<i>Chlorella sorokiniana</i>	GQ122327.1	100



รูปที่ 5 แผนภูมิสายวิวัฒนาการของสาหร่าย *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202

## 2. ผลการกลายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp.

นำสาหร่ายขนาดเล็กมาเลี้ยงในอาหารเหลว NSIII นาน 5 - 7 วัน ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^6$ - $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาวางให้รับรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร นาน 40 นาที จากนั้นนำไป spread บนอาหารแข็ง NSIII นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง: มืด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง จนกว่าจะเห็นสาหร่ายเจริญ แล้วเก็บโคโลนีที่เจริญบนอาหารทดสอบเพื่อคัดเลือกพันธุ์กลาย (mutant) ที่ไม่สามารถสังเคราะห์แป้ง จากการทดลองสามารถชักนำให้สาหร่ายขนาดเล็ก *C. sorokiniana* DMKU5201 และ DMKU5202 กลายพันธุ์ด้วยรังสี UV ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ประมาณ 2 - 5 เปอร์เซ็นต์ ได้ทั้งหมด 40,000 โคโลนี โดยแบ่งเป็น DMKU5201 กลายพันธุ์ได้ 20,000 โคโลนี และ

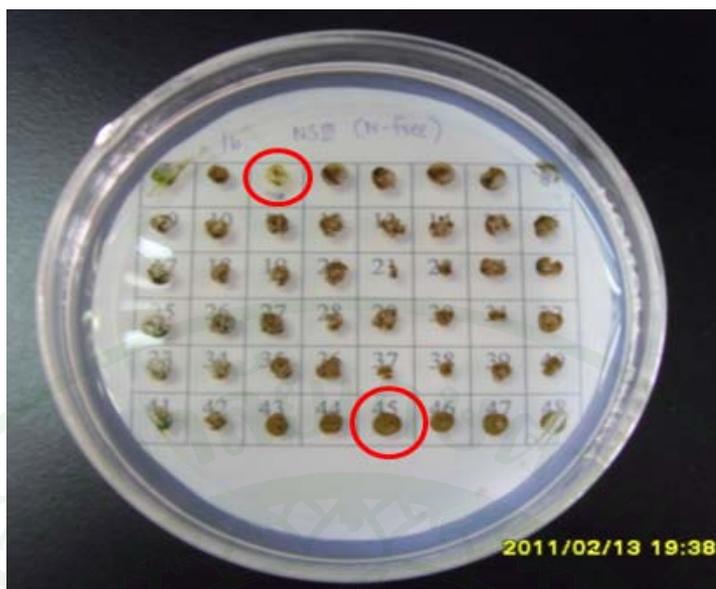
DMKU5202 กลายพันธุ์ได้ 20,000 โคโลนี จากนั้นนำสาหร่ายพันธุ์กลายไปคัดเลือกขั้นต้นเพื่อหาพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ด้วยไอของไอโอดีน

ซึ่งการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV เป็นวิธีและเทคนิคที่ทำกันมานาน ทำได้ง่าย และค่อนข้างปลอดภัยหรือเสี่ยงต่ออันตรายน้อยกว่าวิธีอื่น ที่สำคัญสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้อีกด้วย แต่ก็มีข้อเสียคือ มีความเสถียรน้อยกว่าวิธีอื่นและการกลายพันธุ์ด้วยวิธีนี้จุลินทรีย์จะมีกลไกในการซ่อมแซมตัวเองได้

## 2.1 การคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายที่ไม่สังเคราะห์แสง

ทำการเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์กลาย บนอาหารแข็ง NSIII ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง: มีด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง นาน 7 วัน จากนั้นนำมาทดสอบ โดยการอึ่งให้ได้รับ ไอของไอโอดีน ถ้าโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน คือ สายพันธุ์กลายที่สังเคราะห์แสง แต่ถ้าโคโลนีไม่เปลี่ยนสีเมื่อกระทบกับไอของไอโอดีน โดยจะเห็นเป็นสีเหลืองส้มของไอโอดีน คือ สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้หรือสังเคราะห์ได้น้อยกว่าปกติ

จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV จำนวน 40,000 โคโลนี หลังจากทดสอบหาสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงหรือสังเคราะห์ได้น้อยลงโดยการให้ไอของไอโอดีน พบว่า มีโคโลนีที่เปลี่ยนเป็นสีส้มออกเหลืองทั้งหมด 63 ไอโซเลต (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่สังเคราะห์แสง แต่อาจจะสังเคราะห์น้ำมันได้เพิ่มมากขึ้นจะเก็บสายพันธุ์กลายนี้ไว้คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ผลิตน้ำมันได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) โดยการคัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นต่อไป โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ด้วยเครื่อง GC



(a) การทดสอบหาสายพันธุ์ที่ไม่สังเคราะห์แป้ง โดยการอ้งด้วยไอโอดีน



(b) starchless mutant



(c) non-starchless mutant

ภาพที่ 6 การทดสอบหาสายพันธุ์ที่ไม่สังเคราะห์แป้ง (a) และลักษณะของโคโลนีหลังจากอ้งด้วย ไอโอดีน starchless mutant (b) non-starchless mutant (c)

## 2.2 การคัดเลือก *Chlorella* sp. สายพันธุ์กลายที่ผลิตน้ำมันสูง

ทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 สายพันธุ์กลาย ที่คัดเลือกได้ จากข้อ 2.1 จำนวน 63 ไอโซเลต ในอาหาร NSIII ที่ลดปริมาณไนโตรเจนลงให้เหลือเพียง 1 ใน 4 ส่วน ของแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด ในตู้บ่มแบบมีแสง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง: มืด เท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง นาน 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างไปวัดค่าการผลิตชีว มวลและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันด้วยเครื่อง GC การคัดเลือกขั้นต้น 63 ไอโซเลต ได้แก่

*C. sorokiniana* DMKU5201 สายพันธุ์กลาย 31 ไอโซเลต และ DMKU5202 สายพันธุ์กลาย 32 ไอโซเลต พบว่า DMKU5201 สายพันธุ์กลายมีชีวมวลอยู่ในช่วง 0.0464 - 0.2806 กรัมต่อลิตร มีน้ำมัน 0 - 0.0541 กรัมต่อลิตร มีน้ำมันภายในเซลล์ 0 - 23.7070 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ DMKU5201 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีชีวมวล 0.2806 กรัมต่อลิตร มีน้ำมัน 0.0514 กรัมต่อลิตร มีน้ำมันภายในเซลล์ 18.3146 เปอร์เซ็นต์ ส่วน DMKU5202 สายพันธุ์กลาย มีชีวมวลอยู่ในช่วง 0.1855 - 0.6227 กรัมต่อลิตร มีน้ำมัน 0 - 0.0828 กรัมต่อลิตร มีน้ำมันภายในเซลล์ 0 - 29.0236 เปอร์เซ็นต์ แต่ DMKU5202 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีชีวมวล 0.378 กรัมต่อลิตร มีน้ำมัน 0.0339 กรัมต่อลิตร มีน้ำมันภายในเซลล์ 11.0127 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 16 จึงคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีน้ำมันสูงมาคัดเลือกในขั้นสุดท้าย พบว่ามีอยู่ 8 ไอโซเลต ที่ผลิตชีวมวลและผลิตน้ำมันได้สูง ได้แก่ *C. sorokiniana* DMKU5201-02, DMKU5201-05, DMKU5201-13, DMKU5201-25, DMKU5202-04, DMKU5202-16, DMKU5202-29, DMKU5202-31 โดยผลิตชีวมวลได้ 0.27, 0.28, 0.25, 0.28, 0.28, 0.29, 0.35 และ 0.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลิตน้ำมัน 0.0405, 0.0502, 0.0339, 0.0346, 0.0416 0.0378, 0.0560 และ 0.0636 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลิตน้ำมันภายในเซลล์ 14.96, 17.89, 13.46, 12.33, 15.05, 13.02, 15.79 และ 21.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *C. sorokiniana* DMKU5201 สายพันธุ์ดั้งเดิม ผลิตชีวมวล 0.26 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 0.0271 กรัมต่อลิตร และมีน้ำมันภายในเซลล์ 10.27 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *C. sorokiniana* DMKU5202 สายพันธุ์ดั้งเดิม ผลิตชีวมวล 0.34 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 0.0512 กรัมต่อลิตร และมีน้ำมันภายในเซลล์ 15 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพที่ 7 และ ตารางที่ 17

จากการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยการวิเคราะห์น้ำมันด้วยเครื่อง GC พบว่า สายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 นั้นมีความสามารถในการผลิตชีวมวล 0.30 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 0.0636 กรัมต่อลิตร และผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้ 21.16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสูงกว่าไอโซเลตอื่น ๆ ดังนั้นสายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 จึงถูกคัดเลือกนำไปศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตชีวมวลและการผลิตน้ำมัน โดยการออกแบบการทดลองทางสถิติ

ตารางที่ 16 การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่าย *C. sorokiniana* DMKU5201 และ DMKU5202 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายในการคัดเลือกขั้นต้น

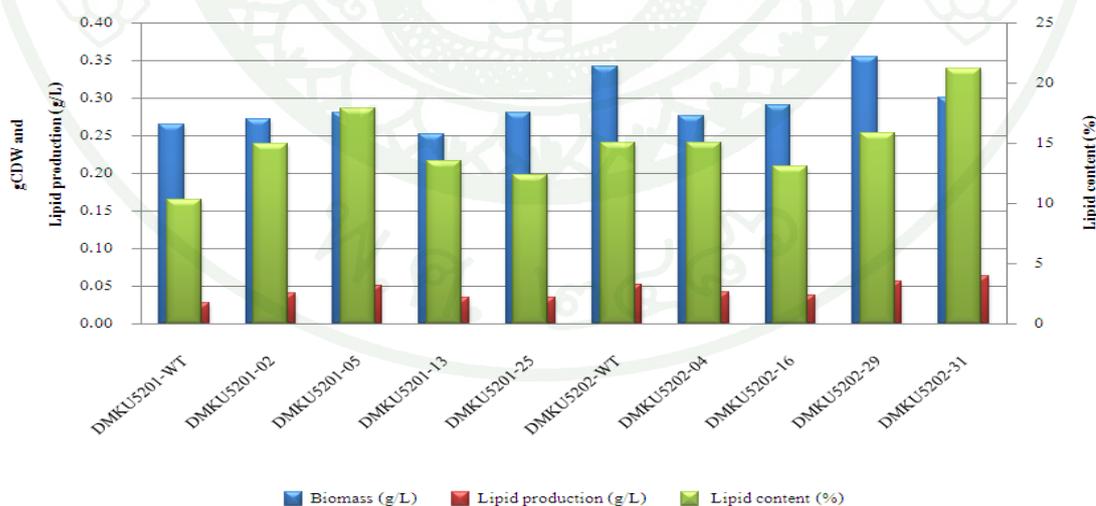
NO. Isolates	Biomass (g/L)	Lipid production (g/L)	Lipid content (%)
DMKU5201-WT	0.2806	0.0514	18.3146
DMKU5201-01	0.2175	0.0217	9.9615
DMKU5201-02	0.1997	0.0345	17.2508
DMKU5201-03	0.2116	0.0304	14.3593
DMKU5201-04	0.1783	0.0235	13.1934
DMKU5201-05	0.2057	0.0328	15.9615
DMKU5201-06	0.2152	0.0348	16.1765
DMKU5201-07	0.2354	0.0324	13.7835
DMKU5201-08	0.0464	0.0000	0.0000
DMKU5201-09	0.2104	0.0301	14.3141
DMKU5201-10	0.1843	0.0187	10.1518
DMKU5201-11	0.2140	0.0258	12.0715
DMKU5201-12	0.2592	0.0457	17.6235
DMKU5201-13	0.2282	0.0541	23.7070
DMKU5201-14	0.1926	0.0243	12.6115
DMKU5201-15	0.2473	0.0398	16.1055
DMKU5201-16	0.2021	0.0289	14.3249
DMKU5201-17	0.2663	0.0428	16.0785
DMKU5201-18	0.2152	0.0293	13.6393
DMKU5201-19	0.2045	0.0312	15.2433
DMKU5201-20	0.1795	0.0150	8.3624
DMKU5201-21	0.1712	0.0000	0.0000
DMKU5201-22	0.2033	0.0262	12.8864
DMKU5201-23	0.2532	0.0291	11.5078
DMKU5201-24	0.2318	0.0323	13.9244
DMKU5201-25	0.2211	0.0414	18.7243

ตารางที่ 16 (ต่อ)

<b>NO. Isolates</b>	<b>Biomass (g/L)</b>	<b>Lipid production (g/L)</b>	<b>Lipid content (%)</b>
DMKU5201-26	0.2175	0.0231	10.6296
DMKU5201-27	0.1450	0.0000	0.0000
DMKU5201-28	0.1070	0.0120	11.2331
DMKU5201-29	0.2164	0.0312	14.3999
DMKU5201-30	0.0975	0.0130	13.3526
DMKU5201-31	0.1997	0.0315	15.7675
DMKU5202 (WT)	0.3078	0.0339	11.0127
DMKU5202-01	0.2866	0.0171	5.9697
DMKU5202-02	0.2882	0.0215	7.4553
DMKU5202-03	0.3010	0.0159	5.2923
DMKU5202-04	0.1855	0.0258	13.9075
DMKU5202-05	0.2580	0.0024	0.9457
DMKU5202-06	0.2141	0.0227	10.6039
DMKU5202-07	0.2709	0.0207	7.6425
DMKU5202-08	0.3324	0.0079	2.3661
DMKU5202-09	0.2296	0.0126	5.4877
DMKU5202-10	0.3612	0.000	0.0000
DMKU5202-11	0.2376	0.0241	10.1238
DMKU5202-12	0.2793	0.0156	5.5812
DMKU5202-13	0.2185	0.0207	9.4930
DMKU5202-14	0.3187	0.0179	5.6279
DMKU5202-15	0.2682	0.0196	7.2907
DMKU5202-16	0.2851	0.0828	29.0236
DMKU5202-17	0.3078	0.0207	6.7282
DMKU5202-18	0.2695	0.0177	6.5498
DMKU5202-19	0.4043	0.0165	4.0842
DMKU5202-20	0.6227	0.0072	1.1513

ตารางที่ 16 (ต่อ)

NO. Isolates	Biomass (g/L)	Lipid production (g/L)	Lipid content (%)
DMKU5202-21	0.2345	0.0237	10.1071
DMKU5202-22	0.3244	0.0178	5.5015
DMKU5202-23	0.2474	0.0221	8.9250
DMKU5202-24	0.2257	0.0222	9.8341
DMKU5202-25	0.2387	0.0226	9.4821
DMKU5202-26	0.2276	0.0235	10.3229
DMKU5202-27	0.1921	0.0168	8.7590
DMKU5202-28	0.2543	0.0252	9.8990
DMKU5202-29	0.2630	0.0233	8.8531
DMKU5202-30	0.2555	0.0303	11.8562
DMKU5202-31	0.2928	0.0337	11.5192
DMKU5202-32	0.3114	0.0178	5.7247



ภาพที่ 7 การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรม

*C. sorokiniana* DMKU5201 และ DMKU5202

ตารางที่ 17 การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรมสาย C. sorokiniana DMKU5201 และ DMKU5202 จากการคัดเลือกชั้นที่สอง

NO. Isolates	Biomass (g/L)	Lipid production (g/L)	Lipid content (%)
DMKU5201-WT	0.26	0.0271	10.27
DMKU5201-02	0.27	0.0405	14.96
DMKU5201-05	0.28	0.0502	17.89
DMKU5201-13	0.25	0.0339	13.46
DMKU5201-25	0.28	0.0346	12.33
DMKU5202-WT	0.34	0.0512	15.00
DMKU5202-04	0.28	0.0416	15.05
DMKU5202-16	0.29	0.0378	13.02
DMKU5202-29	0.35	0.0560	15.79
DMKU5202-31	0.30	0.0636	21.16

### 3. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของ *Chlorella* sp. สายพันธุกรรมเพื่อการผลิตน้ำมัน โดยการวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design และ Response surface method

การใช้แผนการทดลองของ Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยหลาย ๆ ปัจจัย ให้เหลือเพียงปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตชีวมวลและการผลิตน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุกรรมสาย C. sorokiniana DMKU5202-31 ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 7 ปัจจัย คือ  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $X_2$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $X_3$ ),  $\text{NaCl}$  ( $X_4$ ),  $\text{pH}$  ( $X_5$ ),  $\text{CO}_2$  ( $X_6$ ) และ light intensity ( $X_7$ ) โดยมีสิ่งทดลองทั้งหมด 8 สิ่งทดลอง ทำการทดลองจำนวน 3 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมิต 16: 8 นาน 7 วัน พบว่า การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และการผลิตน้ำมันในเซลล์ของสายพันธุกรรมสาย C. sorokiniana DMKU5202-31 จากการวางแผนการทดลองด้วย Plackett and Burman Design แสดงค่าที่แตกต่างกัน โดยในสิ่งทดลองที่ 5 คือ  $\text{KNO}_3$  ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$  ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ปริมาณ 0.01 กรัมต่อลิตร  $\text{NaCl}$  ปริมาณ 0.01 กรัมต่อลิตร  $\text{pH}$  7.0  $\text{CO}_2$  5 เปอร์เซ็นต์ และ light intensity 5,000 ลักซ์ จะให้ผลการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และการผลิตน้ำมันในเซลล์ สูงสุดคือผลิตชีวมวล 2.2727 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 0.1804 กรัมต่อลิตร และมีน้ำมันในเซลล์ 7.93 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 18

เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ จากแผนการทดลอง 8 สิ่งทดลอง ปัจจัยที่สนใจนำมาศึกษา 7 ปัจจัย กำหนดค่าที่ระดับสูง (+) และระดับต่ำ (-) โดยกำหนดค่านัยสำคัญของปัจจัยที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.1$ ) จากการทดลองพบว่า ปัจจัยที่มีค่า  $P$ -value น้อยกว่า 0.1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ คือ  $KNO_3$ , pH และ light intensity ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และการผลิตน้ำมันในเซลล์ ปัจจัยที่มีค่า main effect มีค่าเป็นลบ คือ  $KNO_3$  หมายความว่าปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อทางลบและมีแนวโน้มลดความเข้มข้นลง เพื่อให้สาหร่ายสามารถเจริญ และผลิตน้ำมันได้มากขึ้น และปัจจัยที่มีค่า main effect มีค่าเป็นบวก คือ pH และ light intensity หมายความว่าปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อทางบวกและมีแนวโน้มเพิ่มความเข้มข้นได้อีก เพื่อให้สาหร่ายสามารถเจริญและผลิตน้ำมันได้มากขึ้น แสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ ทั้ง 8 สิ่งทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design

Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	Biomass (g/L)	Lipid production (g/L)	Lipid content (%)
1	+	+	+	-	+	-	-	0.2131	0.0206	9.65
2	-	+	+	+	-	+	-	0.1405	0.005	3.57
3	-	-	+	+	+	-	+	1.8862	0.1387	7.35
4	+	-	-	+	+	+	-	0.1091	0.0057	5.22
5	-	+	-	-	+	+	+	2.2727	0.1804	7.93
6	+	-	+	-	-	+	+	1.4718	0.1073	7.28
7	+	+	-	+	-	-	+	1.8185	0.1249	6.87
8	-	-	-	-	-	-	-	0.1707	0.0107	6.28

ตารางที่ 19 วิเคราะห์ความแปรปรวนของ Plackett and Burman design

Variables	Biomass		Lipid production		Lipid content	
	Effect	P-level	Effect	P-level	Effect	P-level
KNO <sub>3</sub> (g/L)	-0.016	0.186	-0.172	0.119	2.466	0.057
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	0.020	0.114	0.244	0.032	1.891	0.137
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	-0.010	0.418	-0.122	0.259	1.718	0.174
NaCl (g/L)	-0.008	0.486	-0.001	0.994	-0.332	0.787
pH	0.027	0.036	0.263	0.023	2.926	0.027
CO <sub>2</sub> (%)	0.004	0.769	0.019	0.858	0.226	0.854
Light intensity (lux)	0.130	0.000	1.747	0.000	2.848	0.310

หมายเหตุ พิจารณาที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์ ( $P < 0.1$ )

#### 4. ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

Plackett and Burman design เป็นการจัดการการทดลองโดยคัดเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ ซึ่งเป็นการศึกษาที่ละเอียดจึงไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยได้ เนื่องจากว่ามีปัจจัยที่ต้องศึกษาเพิ่มขึ้นจึงทำให้ชุดการทดลองเพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงนำวิธีการทางสถิติมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบการทดลอง เพื่อลดจำนวนชุดการทดลองแต่ยังสามารถครอบคลุมระดับไว้ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ central composite conditions (CCD) ของ 3 ปัจจัย ซึ่งประกอบด้วยชุดการทดลอง 17 สิ่งทดลอง โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมัน ของสาหร่ายพันธุ์กล้วย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ได้แก่ KNO<sub>3</sub> ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) และ light intensity ( $X_3$ ) กำหนดจุด central point หรือค่ากลางของปัจจัยนั้น ๆ ในสิ่งทดลองที่ 15–17 กำหนดจุด factorial point ในสิ่งทดลองที่ 1-8 โดยจะใช้ค่าระดับต่ำ (low level) และค่าระดับสูง (high level) จากแผนการทดลอง Plackett and Burman design และกำหนดจุด star point ในสิ่งทดลองที่ 9–14 โดยกำหนดค่าระดับแต่ละปัจจัยให้มีค่าต่ำกว่าอีก 1 ระดับและสูงกว่าอีก 1 ระดับจากจุด factorial point ซึ่งจุด central point นั้นสามารถบอกค่าที่สูงสุดของตัวแปรตาม ( $Y_p$ ) ได้ โดยพิจารณาจากภาพพื้นผิวตอบสนอง (response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต

(contour plot) และได้ผลของการผลิตชีวมวล ผลิตน้ำมันและน้ำมันภายในเซลล์ จากการทดลองและจากการทำนาย แสดงดังตารางที่ 20

#### 4.1 การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis)

##### 4.1.1 การทดสอบสมมติฐานของสมการการถดถอยหรือสมการความสัมพันธ์

จากการนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์สมการการถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 แสดงในตารางที่ 21, 22 และ 23 การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวล มีค่าทางสถิติ F เท่ากับ 2.47 มีค่า *P*-value (significant) เท่ากับ 0.1237 ส่วนการผลิตน้ำมันมีค่าทางสถิติ F เท่ากับ 8.81 มีค่า *P*-value เท่ากับ 0.0045 และการผลิตน้ำมันภายในเซลล์มีค่าทางสถิติ F เท่ากับ 14.24 มีค่า *P*-value เท่ากับ 0.0010 สังเกตได้ว่า model ของการผลิตน้ำมันและน้ำมันภายในเซลล์มีค่า *P*-value น้อยกว่า 0.01 ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยที่นำมาศึกษานั้นมีผลต่อการผลิตน้ำมันและผลิตน้ำมันสะสมในเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.01$ ) ขณะที่การผลิตชีวมวลมีค่า *P*-value เท่ากับ 0.1237 ( $P > 0.01$ ) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่นำมาศึกษาไม่มีผลต่อการผลิตชีวมวล หรือไม่มีนัยสำคัญ ตามรายงานวิจัยของ Li *et al.* (2011) แนะนำว่าค่า *P*-value ที่มีค่าน้อยกว่า 0.30 ถือว่ามีผลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 20 แสดงค่ามวลเซลล์และปริมาณน้ำมันของ สาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD

Treatment	Code level			Variables			Biomass	Lipid production	Lipid content
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	pH	Light intensity			
1	-1	-1	-1	0.2	5.5	1000	1.17	0.12	9.99
2	-1	-1	1	0.2	5.5	5000	2.23	0.66	29.66
3	-1	1	-1	0.2	7	1000	1.07	0.13	11.66
4	-1	1	1	0.2	7	5000	2.08	0.4	19.32
5	1	-1	-1	2	5.5	1000	0.6	0.11	18.37
6	1	-1	1	2	5.5	5000	1.44	0.1	6.92
7	1	1	-1	2	7	1000	0.37	0.08	20.6
8	1	1	1	2	7	5000	2.07	0.14	6.65
9	-1.68	0	0	0	6.2	3000	0.41	0.15	36.66
10	0	-1.68	0	1.1	4.99	3000	2.13	0.29	13.54
11	0	0	-1.68	1.1	6.2	0	0.13	0.02	16.16
12	1.68	0	0	2.612	6.2	3000	2.27	0.24	10.53
13	0	1.68	0	1.1	7.51	3000	2.09	0.16	7.62
14	0	0	1.68	1.1	6.2	6360	2.86	1.03	36.16
15	0	0	0	1.1	6.2	3000	2.94	1.62	54.97
16	0	0	0	1.1	6.2	3000	2.07	1.1	53.07
17	0	0	0	1.1	6.2	3000	2.41	1.37	56.99

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA<sup>b</sup>) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตชีวมวลของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31

Model	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F-value	P-value
Regression	9.53	9	1.06	2.47	0.1237 <sup>a</sup>
Residual	3.01	7	0.43		
Total	12.54	16			
$R^2 = 0.7602$					

<sup>a</sup> Predictor: (Constant),  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ,  $X_3^2$

<sup>b</sup> Dependent Variable: biomass production (g/L)

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA<sup>b</sup>) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31

Model	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F-value	P-value
Regression	3.81	9	0.42	8.81	0.0045 <sup>a</sup>
Residual	0.34	7	0.05		
Total	4.14	16			
$R^2 = 0.9189$					

<sup>a</sup> Predictor: (Constant),  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ,  $X_3^2$

<sup>b</sup> Dependent Variable: Lipid production (g/L)

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA<sup>b</sup>) ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเพื่อประเมินผลของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31

Model	Sum of Squares	Df	Mean Squares	F-value	P-value
Regression	4607.98	9	512.00	14.24	0.0010 <sup>a</sup>
Residual	251.73	7	35.96		
Total	4859.70	16			
$R^2 = 0.9482$					

<sup>a</sup> Predictor: (Constant),  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ,  $X_3^2$

<sup>b</sup> Dependent Variable: Lipid content (%)

#### 4.1.2 การประมาณสัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยเชิงพหุคูณ

การประมาณค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการวิเคราะห์สมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจแสดงถึงความมีนัยสำคัญของปัจจัยที่ศึกษาทิศทางของอิทธิพลทางบวกหรือลบ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31 พิจารณาว่า  $P$ -value ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าตัวแปรอิสระนั้นมีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ แต่ถ้าค่า  $P$ -value ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ตัวแปรอิสระนั้นไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31

จากการประมาณค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการวิเคราะห์สมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ พบว่าตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ซึ่งมีค่า  $P$ -value มากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ  $KNO_3$  ( $X_1$ ) pH ( $X_2$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง  $KNO_3$  และ pH ( $X_1X_2$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง  $KNO_3$  และ light intensity ( $X_1X_3$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง pH และ light intensity ( $X_2X_3$ ) พจน์กำลังสองของ  $KNO_3$  ( $X_1^2$ ) พจน์กำลังสองของ pH ( $X_2^2$ ) พจน์กำลังสองของ light intensity ( $X_3^2$ ) ส่วนตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพล

ต่อการเจริญของสาหร่ายพืชน้ำสกุล *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ซึ่งมีค่า *P*-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ light intensity ( $X_3$ ) ดังแสดงในตารางที่ 24

$$Y_{\text{biomass}} = -10.332 + 0.455641 X_1 + 3.614022 X_2 - 0.000469 X_3 + 0.120593 X_1 X_2 + 0.0000321 X_1 X_3 + 0.0000678 X_2 X_3 - 0.55472 X_1^2 - 0.31548 X_2^2 - 0.000000099 X_3^2 \quad \text{สมการที่ 2}$$

จากสมการที่ 2 จะสังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระ  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_1 X_2$ ,  $X_1 X_3$  และ  $X_2 X_3$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าบวก จึงมีอิทธิพลไปในทางบวกต่อค่าตอบสนอง ( $Y_{\text{biomass}}$ ) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น ค่าตอบสนองหรือมวลเซลล์ก็จะมีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่ตัวแปรอิสระที่เหลือคือ  $X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  และ  $X_3^2$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าลบ จึงมีอิทธิพลไปในทางลบต่อค่าตอบสนอง ( $Y_{\text{biomass}}$ ) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระมีค่าลดลง ค่าตอบสนอง ( $Y_{\text{biomass}}$ ) หรือมวลเซลล์จะมีค่าเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 0.7602 กล่าวคือ มวลเซลล์ที่ผลิตได้มีอิทธิพลมาจากตัวแปรอิสระ 76.02 เปอร์เซ็นต์ และมาจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ในการทดลอง 23.98 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 24 ตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่ายพืชน้ำสกุล *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ซึ่งมีค่า *P*-value มากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ pH ( $X_1 X_2$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ light intensity ( $X_1 X_3$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง pH และ light intensity ( $X_2 X_3$ ) ส่วนตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่ายพืชน้ำสกุล *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ซึ่งมีค่า *P*-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ light intensity ( $X_3$ ) พจน์กำลังสองของ  $\text{KNO}_3$  ( $X_1^2$ ) พจน์กำลังสองของ pH ( $X_2^2$ ) พจน์กำลังสองของ light intensity ( $X_3^2$ )

$$Y_{\text{Lipid production}} = -28.5536 + 0.948434 X_1 + 9.077213 X_2 + 0.00071 X_3 - 0.047333 X_1 X_2 - 0.000054 X_1 X_3 + 0.000016 X_2 X_3 - 0.51962 X_1^2 - 0.73008 X_2^2 - 0.000000076 X_3^2 \quad \text{สมการที่ 3}$$

จากสมการที่ 3 จะสังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระ  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  และ  $X_2 X_3$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าบวก จึงมีอิทธิพลไปในทางบวกต่อค่าตอบสนอง ( $Y_{\text{Lipid production}}$ ) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น ค่าตอบสนองหรือการผลิตน้ำมันก็จะมีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่ตัวแปรอิสระที่เหลือคือ  $X_1 X_2$ ,  $X_1 X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  และ  $X_3^2$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าลบ จึงมีอิทธิพลไปในทางลบต่อค่าตอบสนอง

( $Y_{\text{Lipid production}}$ ) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระมีค่าลดลง ค่าตอบสนองหรือการผลิตน้ำมันจะมีค่าเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 0.9189 กล่าวคือ น้ำมันที่ผลิตได้มีอิทธิพลมาจากตัวแปรอิสระ 91.89 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือมาจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ในการทดลอง 8.11 เปอร์เซ็นต์

สำหรับตัวแปรอิสระที่ไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31 จากตารางที่ 24 ซึ่งมีค่า  $P$ -value มากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ pH ( $X_2$ ) และ light intensity ( $X_3$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ pH ( $X_1X_2$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง pH และ light intensity ( $X_2X_3$ ) ส่วนตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ซึ่งมีค่า  $P$ -value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ ) พจน์อิทธิพลร่วมระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ light intensity ( $X_1X_3$ ) พจน์กำลังสองของ  $\text{KNO}_3$  ( $X_1^2$ ) พจน์กำลังสองของ pH ( $X_2^2$ ) พจน์กำลังสองของ light intensity ( $X_3^2$ )

$$Y_{\text{Lipid content}} = -1126.85 + 25.37506 X_1 + 361.7263 X_2 + 0.029057 X_3 - 1.967412 X_1X_2 - 0.00366 X_1X_3 - 0.00121 X_2X_3 - 14.4246 X_1^2 - 28.9511 X_2^2 - 0.0000027 X_3^2 \quad \text{สมการที่ 4}$$

จากสมการที่ 4 จะสังเกตได้ว่าตัวแปรอิสระ  $X_1$ ,  $X_2$ , และ  $X_3$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าบวก จึงมีอิทธิพลไปในทางบวกต่อค่าตอบสนอง ( $Y_{\text{Lipid content}}$ ) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น ค่าตอบสนองหรือการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ก็จะเพิ่มขึ้น ขณะที่ตัวแปรอิสระที่เหลือคือ  $X_2X_3$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  และ  $X_3^2$  มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าลบ จึงมีอิทธิพลไปในทางลบต่อค่าตอบสนอง ( $Y_{\text{Lipid content}}$ ) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระมีค่าลดลง ค่าตอบสนองหรือการผลิตน้ำมันภายในเซลล์จะมีค่าเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 0.9482 กล่าวคือ น้ำมันภายในเซลล์มีอิทธิพลมาจากตัวแปรอิสระ 94.82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือ 5.18 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลมาจากตัวแปรอิสระอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ในการทดลอง

จากการประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยเชิงพหุคูณพบว่า สมการการถดถอยเชิงพหุคูณของการผลิตชีวมวล (สมการที่ 2) มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 76.02

เปอร์เซ็นต์ การผลิตน้ำมัน (สมการที่ 3) มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 91.89 เปอร์เซ็นต์ และการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ (สมการที่ 4) มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 94.82 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ารูปแบบของสมการการถดถอยเชิงพหุนามนั้นเหมาะสม ตามรายงานวิจัยของ Hu (1999) ได้กล่าวรายงานว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ หรือ  $R^2$  ที่นิยมนำไปใช้ควรมีค่าน้อยกว่า 0.75 แต่ถ้ามากกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก นั่นคือ ค่า  $R^2$  ควรเข้าใกล้ 1 ให้มากที่สุด แสดงว่าตัวแปรตามและตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์ ขณะที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและตัวแปรอิสระ และถ้าค่า  $R^2$  adjust มีค่ามากกว่า 64 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.64 แสดงว่ารูปแบบของสมการนั้นเหมาะสม

ตารางที่ 24 แสดงค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอยและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

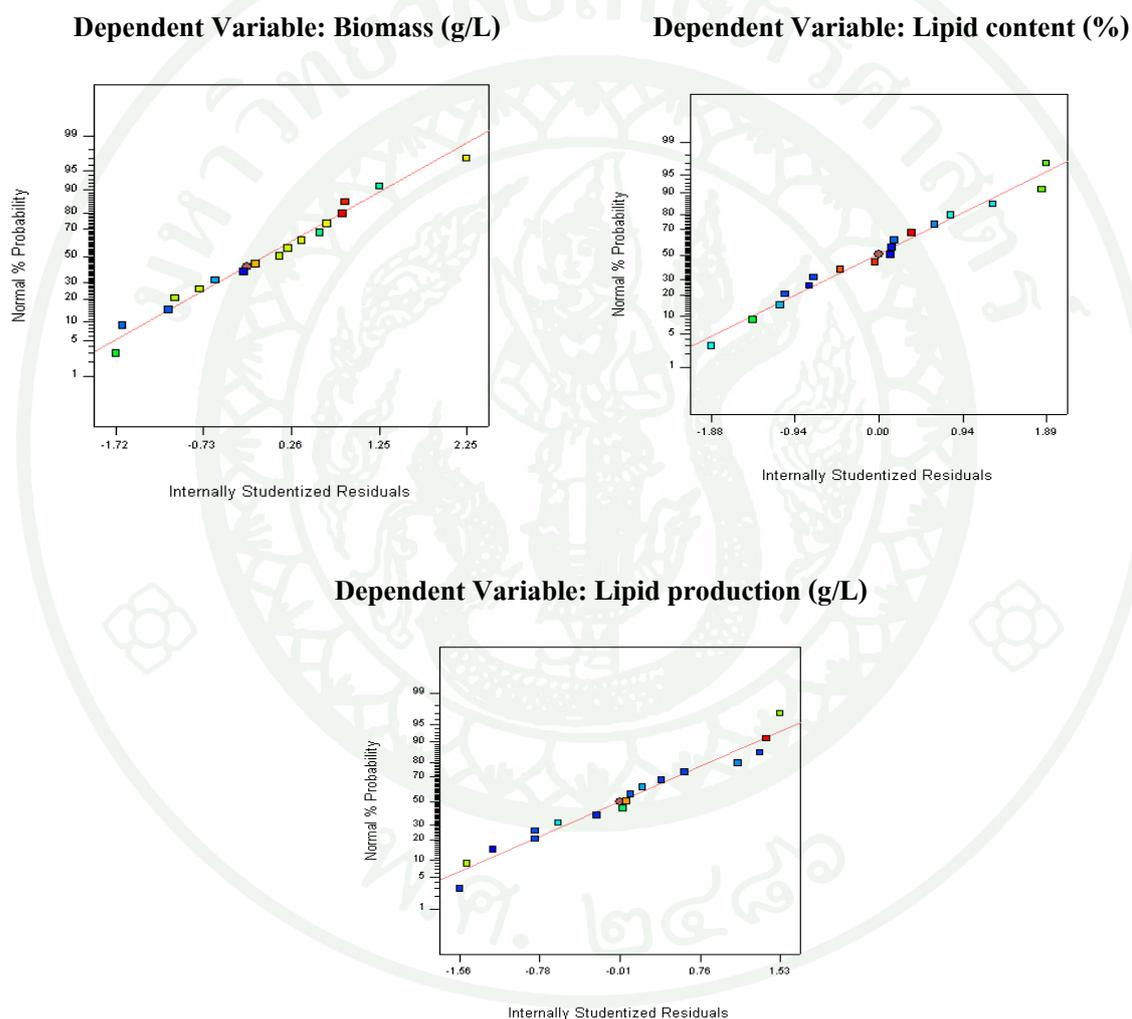
Source	Biomass (g/L)			Lipid production (g/L)			Lipid content (%)		
	Estimate	F-value	P-level	Estimate	F-value	P-level	Estimate	F-value	P-level
Model	2.4881	2.4652	0.1237	1.3654	8.8122	0.0045	55.1795	14.2376	0.0010
$X_1$	0.0767	0.1871	0.6783	-0.0536	0.8188	0.3956	-4.5424	7.8358	0.0266
$X_2$	0.0050	0.0008	0.9783	-0.0341	0.3315	0.5828	-1.2210	0.5661	0.4763
$X_3$	0.6717	14.3374	0.0068	0.1883	10.0938	0.0156	2.6037	2.5746	0.1526
$X_1X_2$	0.0814	0.1233	0.7358	0.0320	0.1702	0.6923	1.3280	0.3923	0.5509
$X_1X_3$	0.0578	0.0621	0.8103	-0.0964	1.5502	0.2532	-6.5906	9.6629	0.0171
$X_2X_3$	0.1017	0.1926	0.674	-0.0244	0.0991	0.7621	-1.8148	0.7327	0.4203
$X_1^2$	-0.4493	5.2960	0.0549	-0.4209	41.6215	0.0003	-11.6839	42.7958	0.0003
$X_2^2$	-0.1775	0.8261	0.3936	-0.4107	39.6252	0.0004	-16.2850	83.1378	0.0001
$X_3^2$	-0.3952	4.0972	0.0826	-0.3035	21.6384	0.0023	-10.7770	36.4098	0.0005

#### 4.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

ทำการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย (model adequacy checking) เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบคือ การวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อน (residual analysis) ถ้าหากแบบจำลองถูกต้อง ความคลาดเคลื่อนจะต้องไม่มีรูปแบบ โดยทำการตรวจสอบความเหมาะสมดังนี้

#### 4.2.1 การทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution)

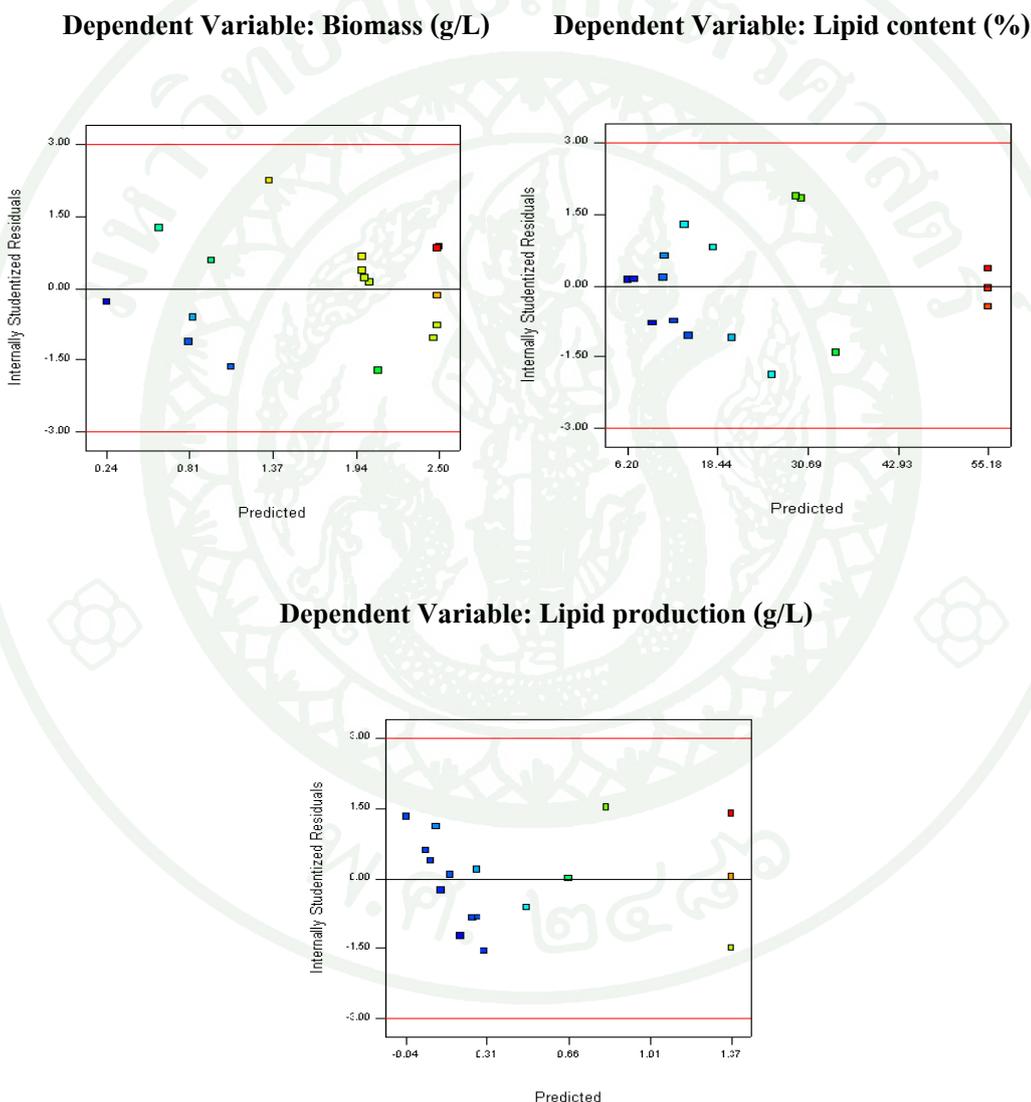
จากการตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอยโดยวิธี normal probability plot พบว่า ลักษณะของจุดบนกราฟมีการกระจายตัวเกาะในแนวเส้นตรง แสดงดังภาพที่ 8 จึงสรุปได้ว่าความคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงเป็นแบบปกติ และเป็นไปตามข้อกำหนดเบื้องต้นของการวิเคราะห์การถดถอย



ภาพที่ 8 Normal probability plot ของค่าความคลาดเคลื่อน

### 4.2.2 การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

จากกราฟการกระจาย (scatter plot) ระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า regression predicted value บนแกน X พบว่า จุดมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบ และการกระจายรอบศูนย์ นั้นหมายความว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่ แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 Scatter plot ของค่าความคลาดเคลื่อนกับค่าทำนาย

ดังนั้นเมื่อทำการตรวจสอบความเหมาะสมของรูปแบบสมการการถดถอยด้วยวิธีวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนกับการพล็อตกราฟ normal probability plot และ scatter plot ให้ผลสรุปว่ารูปแบบสมการถดถอยหรือสมการสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลองนั้นเป็นรูปแบบที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนต่อไปนำสมการถดถอยไปใช้ในการทำนายการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสายพันธุ์กลายของ *C. sorokiniana* DMKU5202-31

#### 4.3 การเปรียบเทียบค่าจริงจากการทดลองและค่าที่ทำนายของการเจริญและการผลิตน้ำมัน

จากสมการการถดถอยที่เหมาะสม คือ สมการที่ 1 กำหนดให้  $X_1$  แทน  $KNO_3$ ,  $X_2$  แทน pH,  $X_3$  แทน light intensity โดยนำสมการไปทำนายผลของ  $KNO_3$ , pH และ light intensity ต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 แสดงผลการทำนายในตารางที่ 25 และจากการทดลองทั้งหมด 17 สิ่งทดลองพบว่าสิ่งทดลองที่ 15 – 17 มีการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์สูงกว่าสิ่งทดลองอื่น ๆ เนื่องจากถูกกำหนดให้เป็นจุด center point จากนั้นจะหาจุดที่เหมาะสมที่สุดของตัวแปรอิสระ ( $KNO_3$ , pH และ light intensity) ที่ทำให้ค่าตัวแปรตาม (การผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์) สูงสุด โดยสังเกตจาก contour plot ในขั้นตอนต่อไป

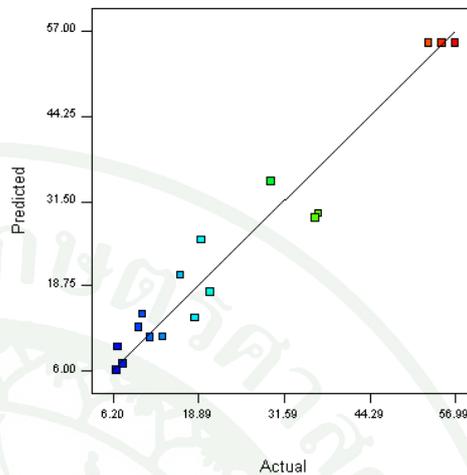
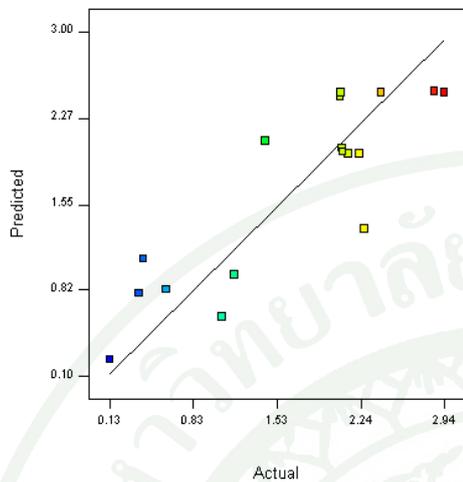
จากสมการการถดถอยที่ใช้ทำนายค่าการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 พบว่าค่าทำนายมีแนวโน้มสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลองแต่มีบางสิ่งทดลองที่ไม่ใกล้เคียงกับค่าจริงนัก ดังแสดงในภาพที่ 10

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์และปริมาณน้ำมัน ระหว่างค่าทำนายและการทดลองของสายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31

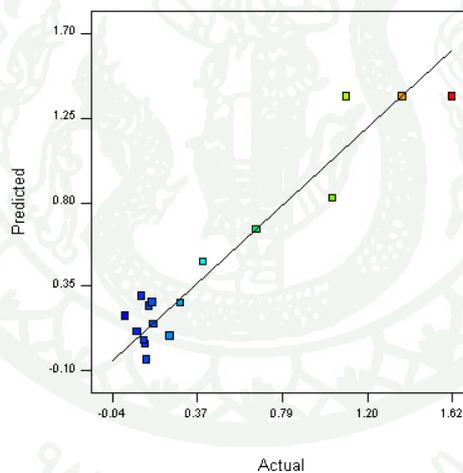
Treatment	Variables			biomass (g/L)		Lipid production (g/L)		Lipid content (%)	
	KNO <sub>3</sub>	pH	Light intensity	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	0.2	5.5	1000	1.1743	0.9528	0.1173	0.0423	9.99	13.36
2	0.2	5.5	5000	2.2280	1.9700	0.6609	0.6631	29.66	35.24
3	0.2	7	1000	1.0716	0.5964	0.1250	0.0407	11.66	11.89
4	0.2	7	5000	2.0790	2.0205	0.4016	0.4841	19.32	26.51
5	2	5.5	1000	0.6041	0.8279	0.1110	0.0632	18.37	14.80
6	2	5.5	5000	1.4357	2.0763	0.0994	0.2952	6.92	10.33
7	2	7	1000	0.3738	0.7971	0.0770	0.1080	20.60	18.64
8	2	7	5000	2.0655	2.4523	0.1374	0.2440	6.65	6.91
9	0	6.2	3000	0.4124	1.7250	0.1512	0.8092	36.66	44.19
10	1.1	4.99	3000	2.1331	1.9753	0.2889	0.2653	13.54	12.07
11	1.1	6.2	0	0.1293	0.6003	0.0209	0.3982	16.16	27.70
12	2.612	6.2	3000	2.2686	1.3350	0.2389	0.0848	10.53	15.24
13	1.1	7.51	3000	2.0858	1.9919	0.1590	0.1526	7.62	7.96
14	1.1	6.2	6360	2.8578	2.4767	1.0334	0.8309	36.16	29.97
15	1.1	6.2	3000	2.9391	2.4833	1.6157	1.3684	54.97	55.99
16	1.1	6.2	3000	2.0722	2.4833	1.0998	1.3684	53.07	55.99
17	1.1	6.2	3000	2.4108	2.4833	1.3739	1.3684	56.99	55.99

**Dependent Variable: Biomass (g/L)**

**Dependent Variable: Lipid content (%)**



**Dependent Variable: Lipid production (g/L)**

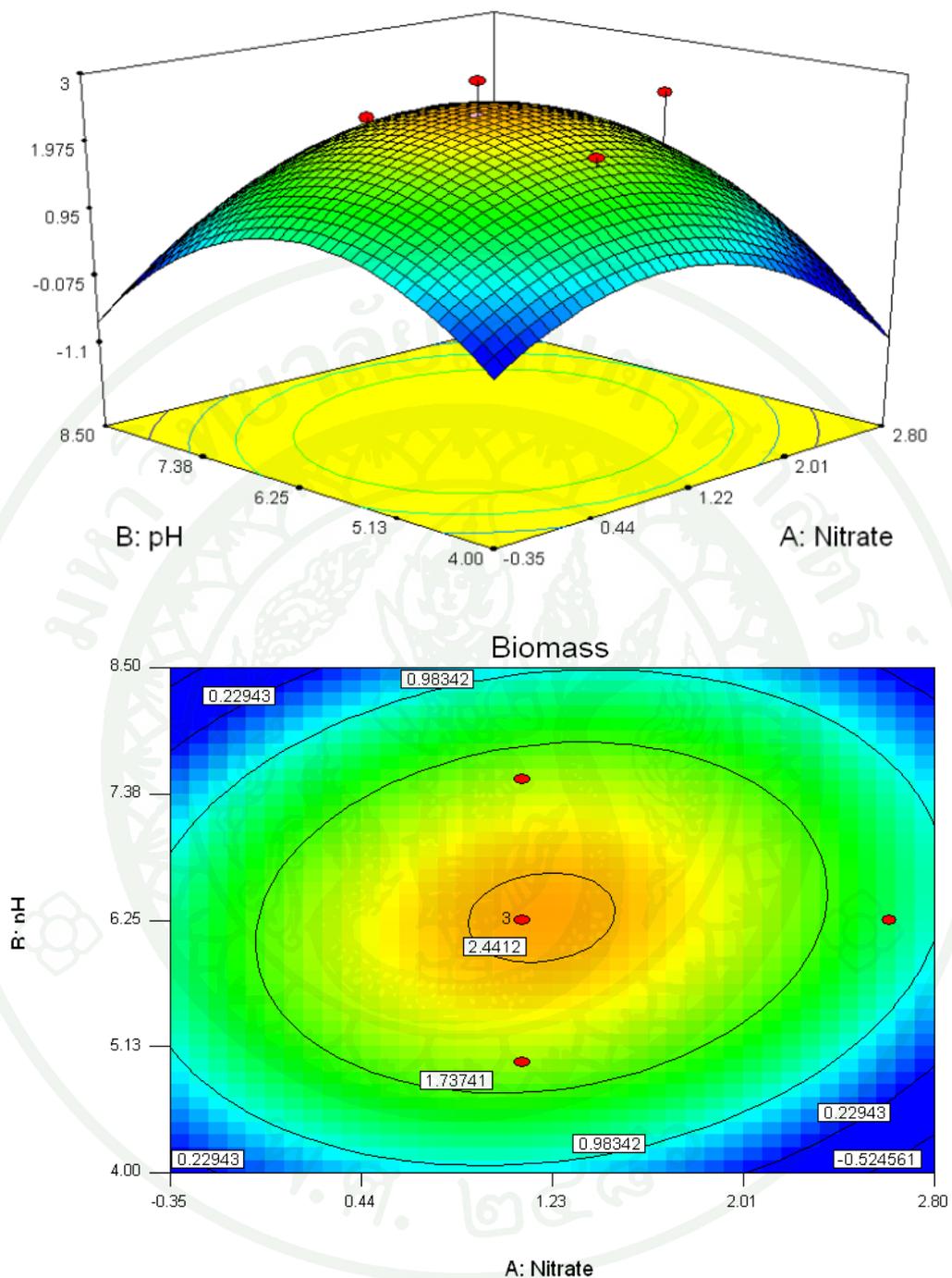


**ภาพที่ 10** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและค่าทำนาย

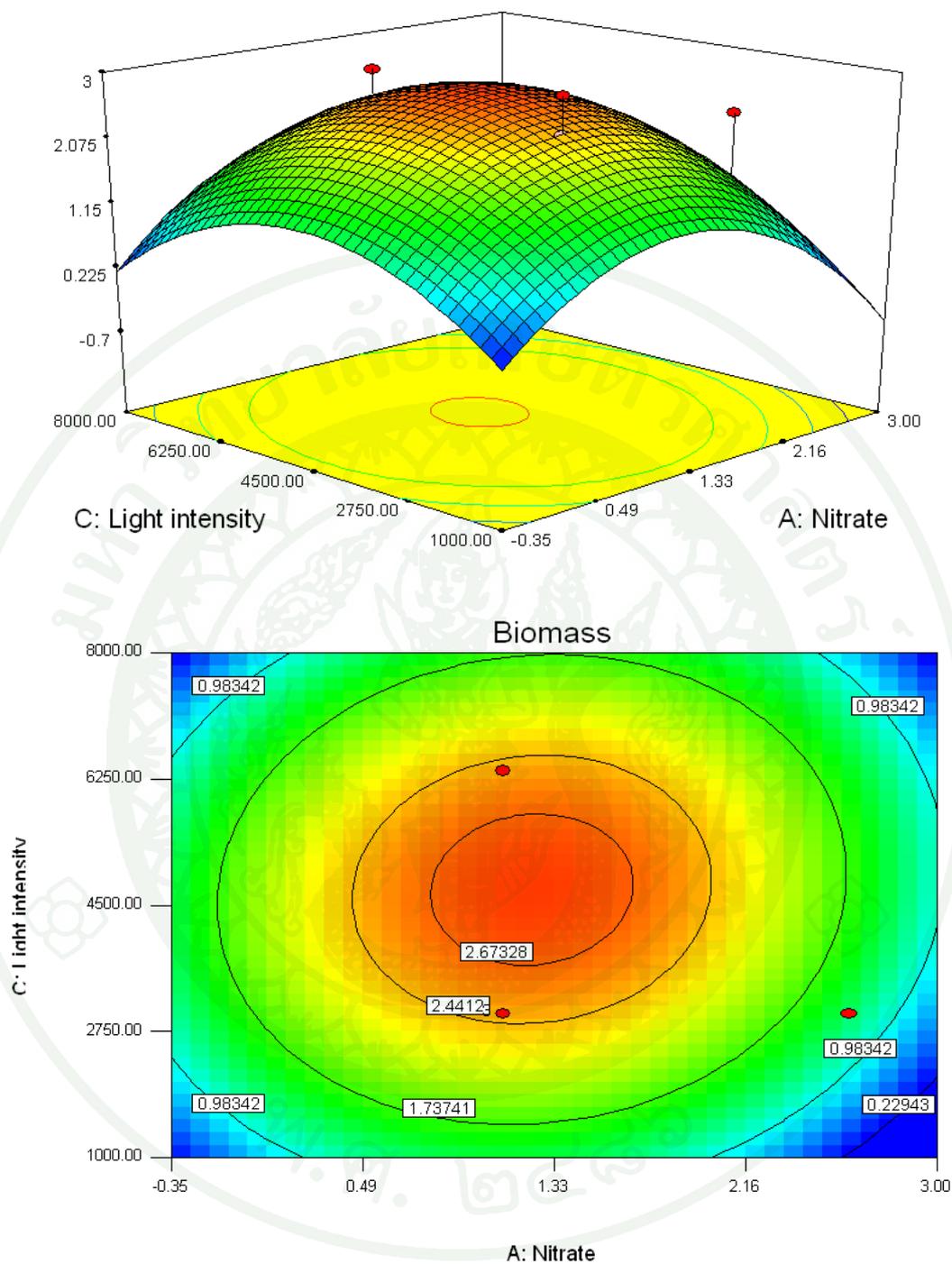
#### 4.4 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษา

##### 4.4.1 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระที่ศึกษาต่อการผลิตชีวมวล (biomass production)

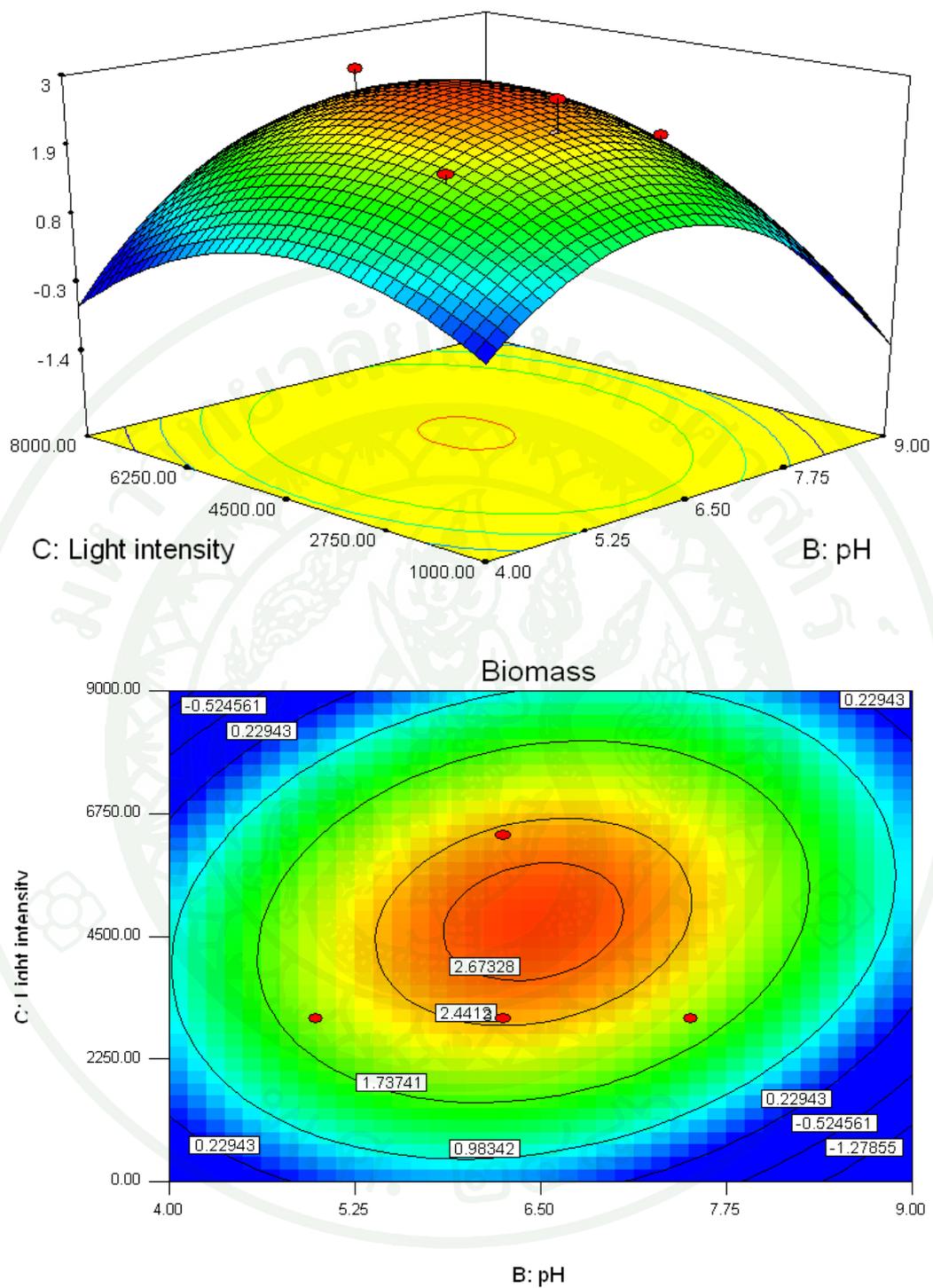
แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเพื่อหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยที่จะส่งผลให้มีการผลิตชีวมวลสูงสุด โดยแสดงผลของภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) ในภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ pH ที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลของสาหร่ายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 พบว่า  $\text{KNO}_3$  1.2 กรัมต่อลิตร และ pH 6.3 ขณะที่ light intensity เท่ากับ 3,000 ลักซ์ โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตชีวมวลได้สูงสุดคือ 2.49 กรัมต่อลิตร ส่วนภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ light intensity พบว่า  $\text{KNO}_3$  1.25 กรัมต่อลิตร และ light intensity 4,700 ลักซ์ ขณะที่ pH เท่ากับ 6.2 โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตชีวมวลได้สูงสุดคือ 2.78 กรัมต่อลิตร และภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ light intensity พบว่า pH 6.4 และ light intensity 4,800 ลักซ์ ขณะที่  $\text{KNO}_3$  เท่ากับ 1.1 กรัมต่อลิตร โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตชีวมวลได้สูงสุดคือ 2.79 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 26 ตามรายงานวิจัยของ Li *et al.* (2011) ได้ทำวิจัยเกี่ยวกับการคัดเลือกสาหร่ายที่สามารถผลิตชีวมวล 14 สายพันธุ์ จาก 5 จินัส ได้แก่ *Chlorella*, *Haematococcus*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* และ *Chlorococcum* ด้วยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง โดยวิธีการทางสถิติ Plackett-Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการเพาะเลี้ยง คือ คาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ความเข้มแสง (light intensity) และระยะเวลาในการให้แสง (light period) พบว่าสาหร่าย *C. kessleri* และ *C. protothecoides* สามารถผลิตชีวมวลได้สูงสุด 2.01 และ 1.31 กรัมต่อลิตร ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบ mixotroph



ภาพที่ 11 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ  $\text{KNO}_3$  (Nitrate) และ pH ต่อการผลิตชีวมวล (biomass production, g/L)



ภาพที่ 12 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ  $\text{KNO}_3$  (Nitrate) และ light intensity ต่อการผลิตชีวมวล (biomass production, g/L)

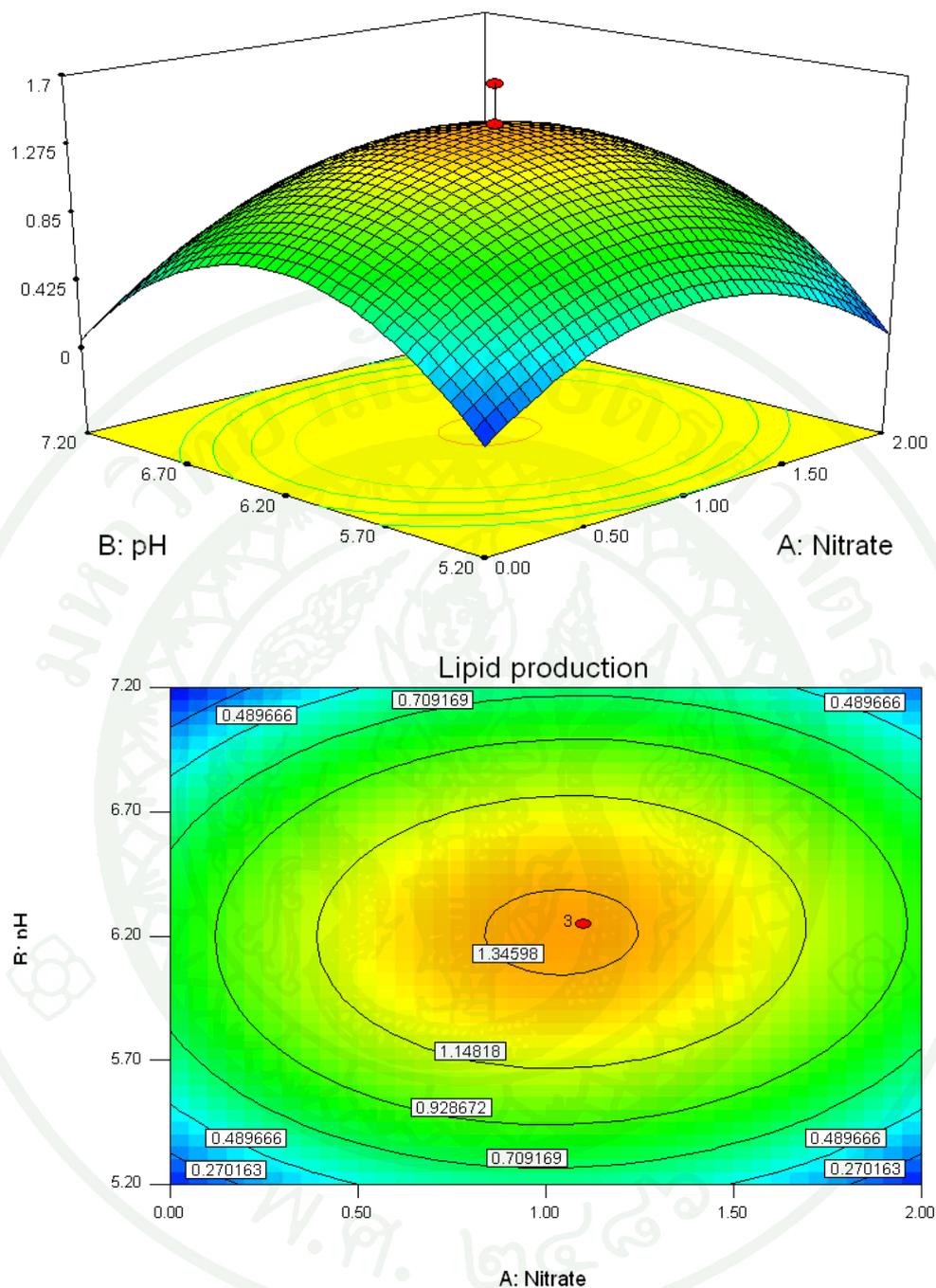


ภาพที่ 13 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ pH และ light intensity ต่อการผลิตชีวมวล (biomass production, g/L)

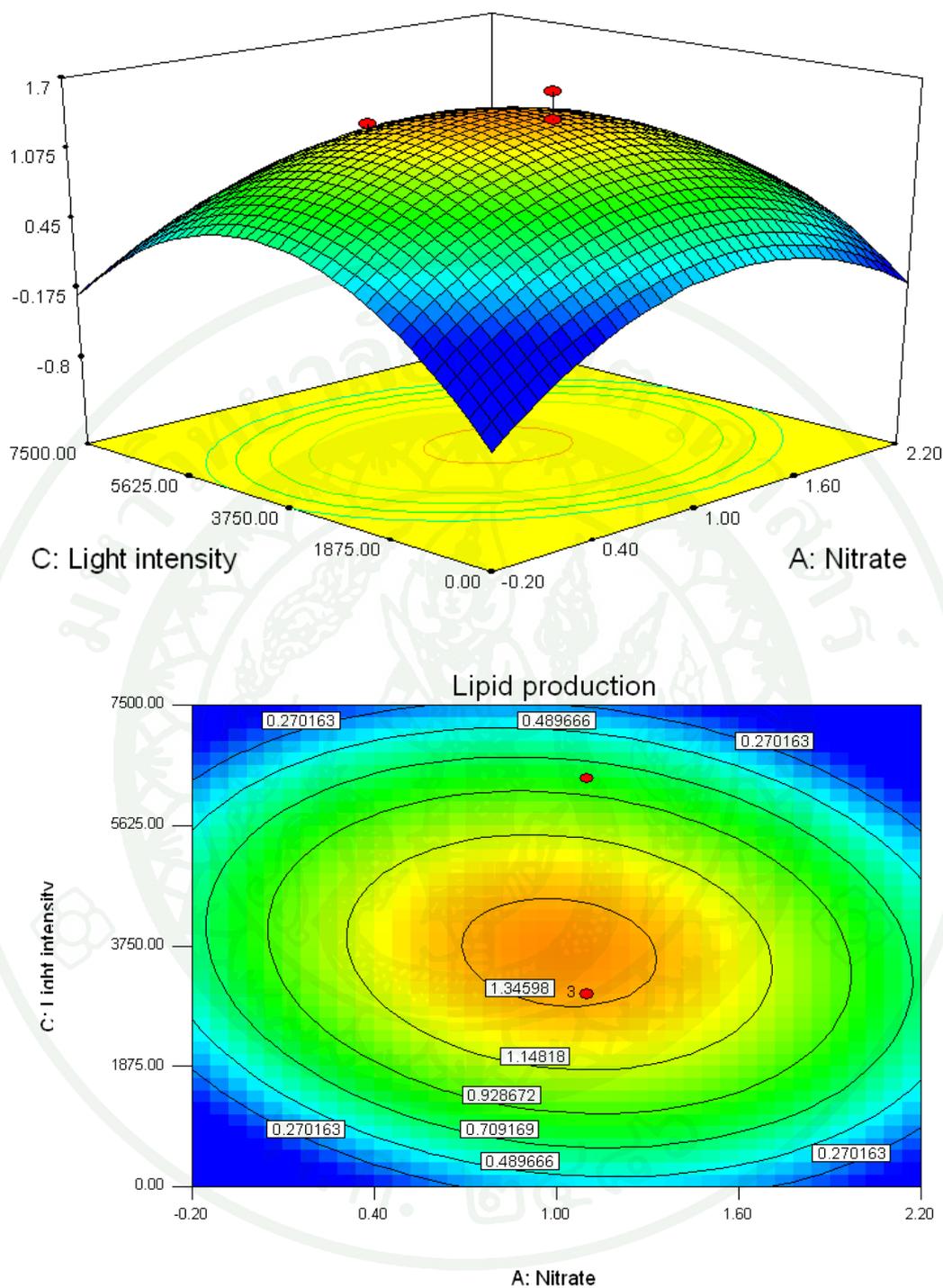
#### 4.4.2 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระที่ศึกษาต่อการผลิตน้ำมัน (Lipid production)

แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเพื่อหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยที่จะส่งผลให้มีการผลิตน้ำมันสูงสุด โดยแสดงผลของภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) ในภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ pH ที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่ายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 พบว่า  $\text{KNO}_3$  1.0 กรัมต่อลิตร และ pH 6.2 ขณะที่ light intensity เท่ากับ 3,000 ลักซ์ โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตน้ำมันได้สูงสุดคือ 1.37 กรัมต่อลิตร ส่วนภาพที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ light intensity พบว่า  $\text{KNO}_3$  1.0 กรัมต่อลิตร และ light intensity 3,700 ลักซ์ ขณะที่ pH เท่ากับ 6.2 โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตน้ำมันได้สูงสุดคือ 1.39 กรัมต่อลิตร และภาพที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ light intensity พบว่า pH 6.3 และ light intensity 3,700 ลักซ์ ขณะที่  $\text{KNO}_3$  1.1 กรัมต่อลิตร โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตน้ำมันได้สูงสุดคือ 1.39 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 27

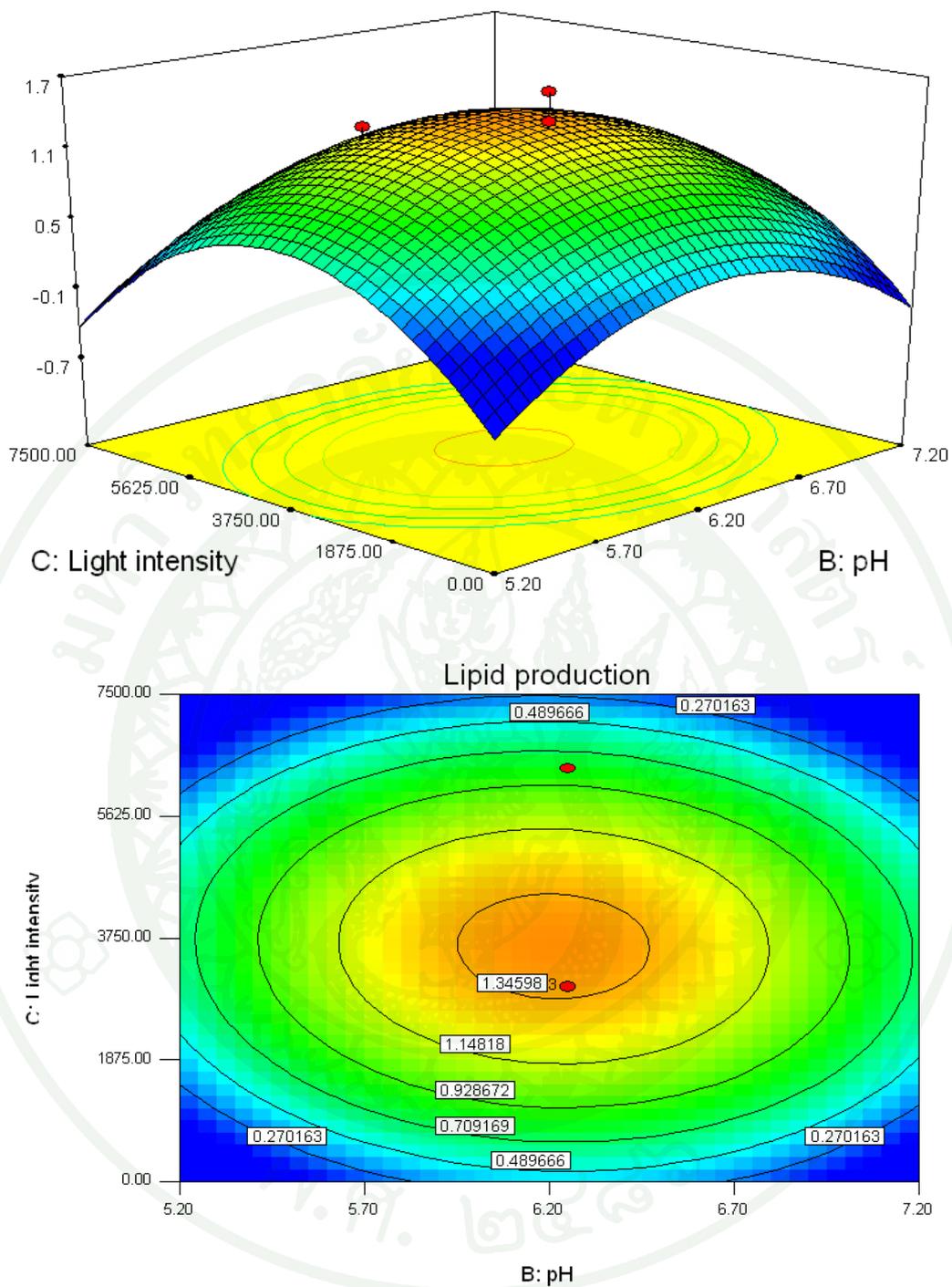
Cheng *et al.* (2013) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* UTEX 250 เพื่อการผลิตชีวมวลและการผลิตน้ำมัน ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตชีวมวลและน้ำมันได้มากกว่าการเพาะแบบดั้งเดิม โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัว (C18:2 และ C18:3) ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดที่มีคุณสมบัติเดียวกับน้ำมันเชื้อเพลิง



ภาพที่ 14 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ  $\text{KNO}_3$  (Nitrate) และ pH ต่อการผลิตน้ำมัน (Lipid production, g/L)



ภาพที่ 15 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ  $\text{KNO}_3$  (Nitrate) และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมัน (Lipid production, g/L)

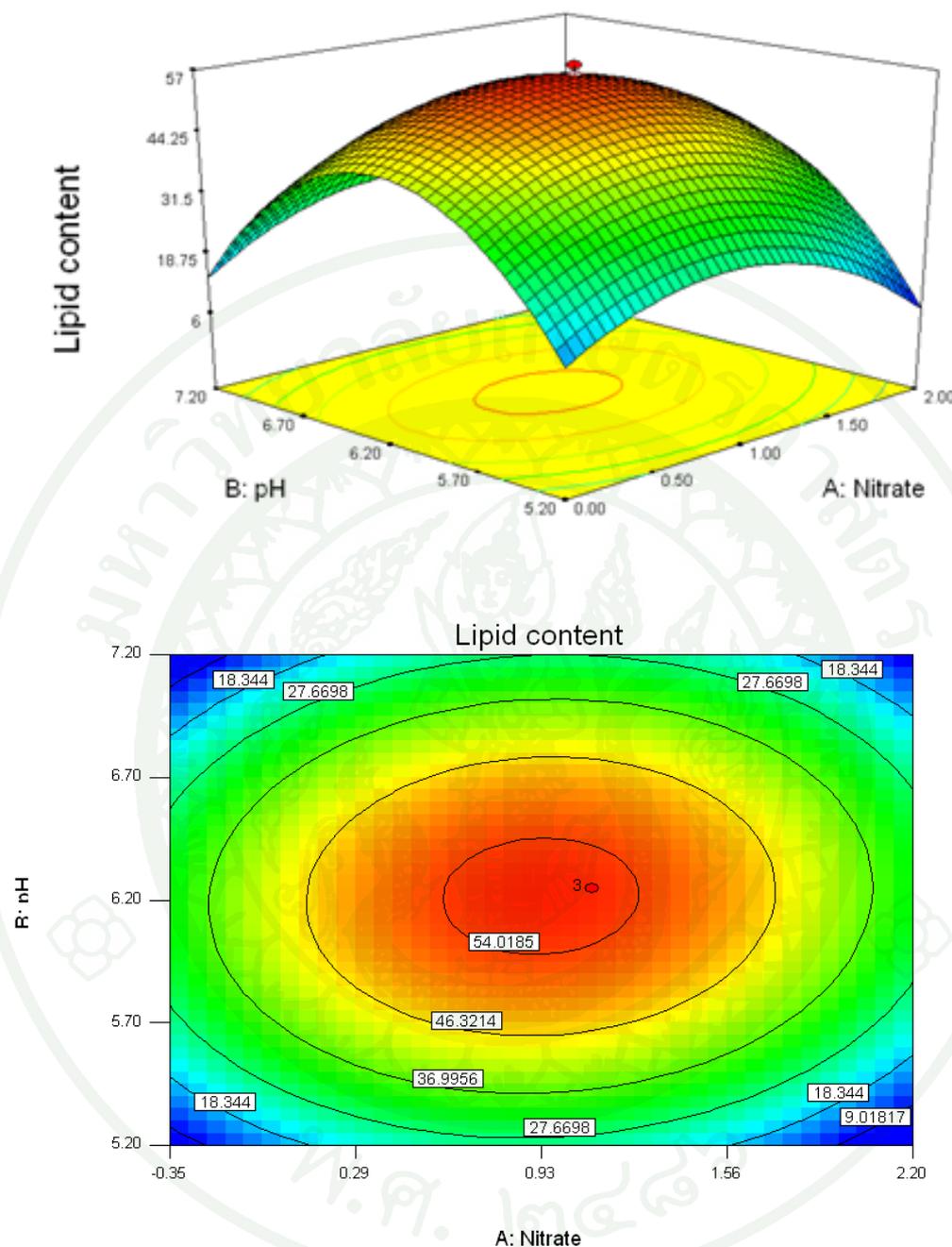


ภาพที่ 16 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ pH และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมัน (Lipid production, g/L)

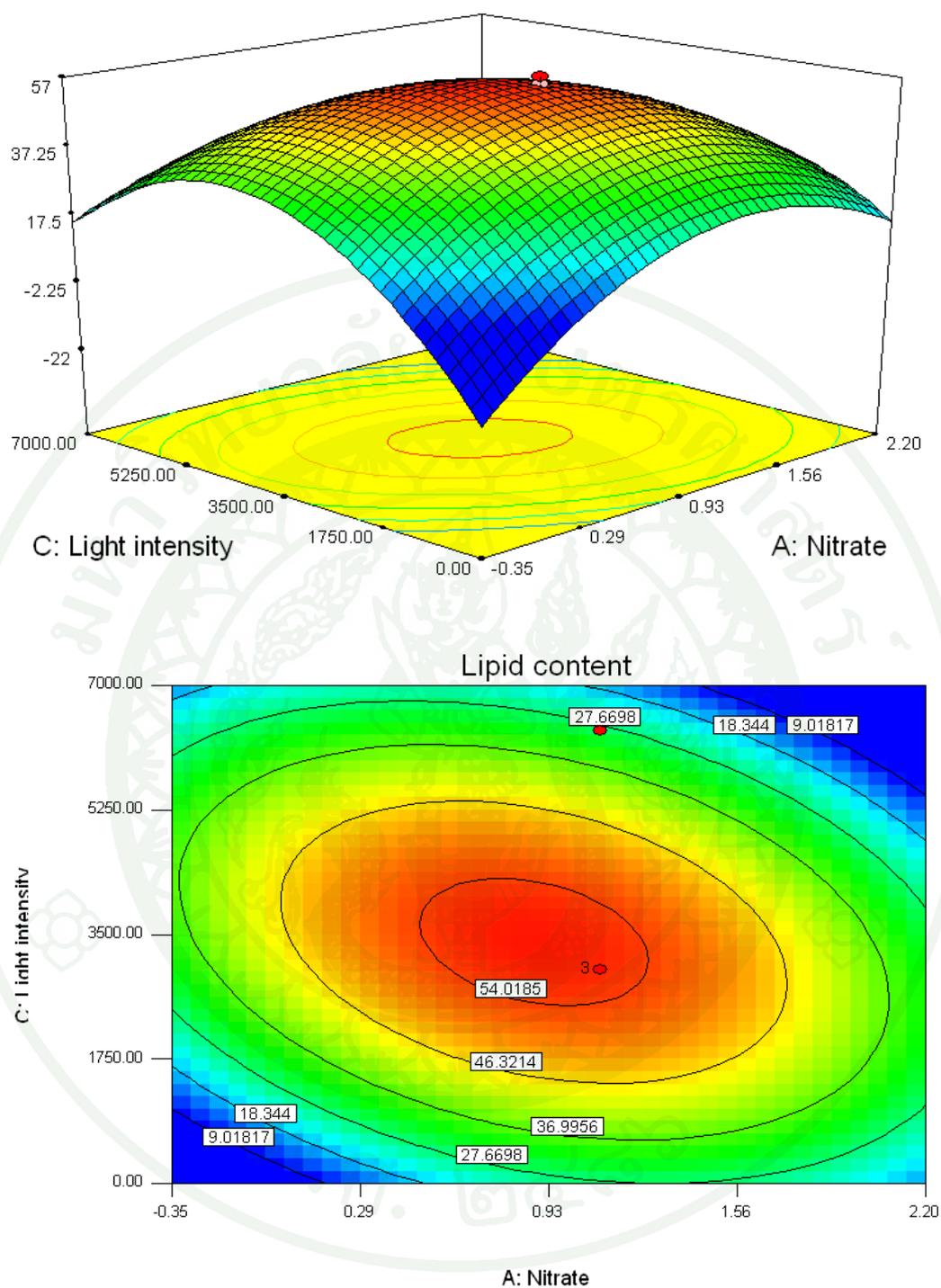
#### 4.4.3 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษาต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์(Lipid content)

แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเพื่อหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยที่จะส่งผลให้มีการผลิตน้ำมันภายในเซลล์สูงสุด โดยแสดงผลของภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (ภาพ 3 มิติ) และคอนทัวร์พล็อต (ภาพ 2 มิติ) ในภาพที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ pH ที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 คือ  $\text{KNO}_3$  0.9 กรัมต่อลิตร และ pH 6.2 ขณะที่ light intensity เท่ากับ 3,000 ลักซ์ โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงสุดคือ 55.65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนภาพที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\text{KNO}_3$  และ light intensity คือ  $\text{KNO}_3$  0.9 กรัมต่อลิตร และ light intensity 3,500 ลักซ์ ขณะที่ pH เท่ากับ 6.2 โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงสุดคือ 55.98 เปอร์เซ็นต์ และภาพที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ light intensity คือ pH 6.2 และ light intensity 3,300 ลักซ์ ขณะที่  $\text{KNO}_3$  เท่ากับ 1.1 กรัมต่อลิตร โดยถูกกำหนดไว้ที่ค่ากลางของระดับปัจจัย (center point) ทำให้การผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงสุดคือ 55.36 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 27

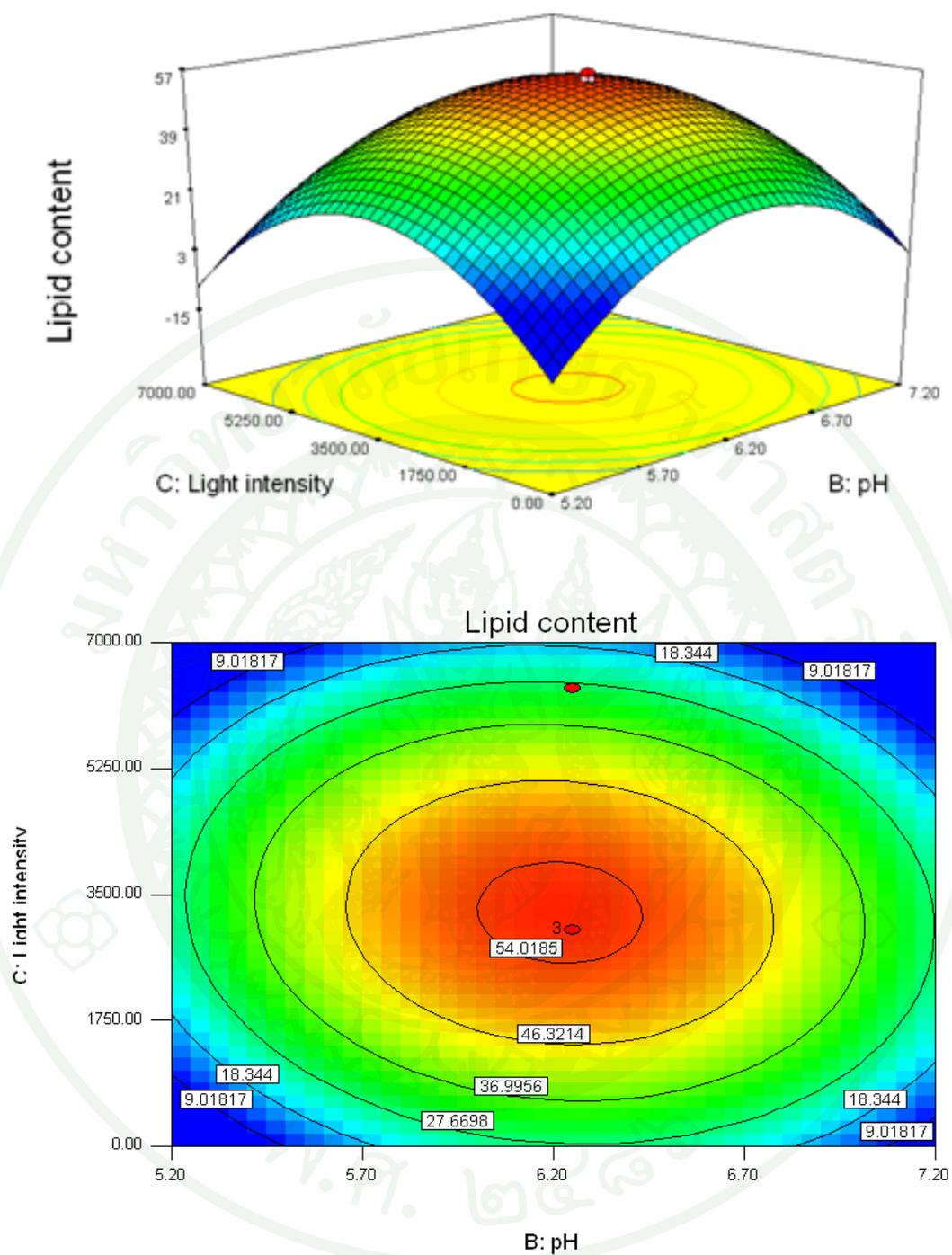
จากการวิเคราะห์หาจุดที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยหรือตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงสุด แทนค่า  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) และ light intensity ( $X_3$ ) นำเข้าไปแทนค่าในสมการที่ 5 ซึ่งจะให้ได้ค่าการทำนายของการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงสุด นั่นคือค่าที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นทำการทดลองอีกครั้งเพื่อสร้างความมั่นใจว่าสมการที่ได้มานี้ fit กับผลการทดลองจริง โดยเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายกับค่าที่ได้จากการทดลองจริง



ภาพที่ 17 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ  $\text{KNO}_3$  (Nitrate) และ pH ต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ (Lipid content, %)



ภาพที่ 18 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ  $\text{KNO}_3$  (Nitrate) และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ (Lipid content, %)



ภาพที่ 19 ภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) และคอนทัวร์พล็อต (Contour plot) ของ pH และ light intensity ต่อการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ (Lipid content, %)

ตารางที่ 26 การหาจุดที่เหมาะสมของปัจจัยที่ศึกษาต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และการผลิตน้ำมันภายในเซลล์

Responses	Variables			Yields
	KNO <sub>3</sub> (g/L)	pH	Light intensity (lux)	
Biomass production (g/L)	1.2	6.3	3,000	2.49
	1.25	6.2	4,700	2.78
	1.1	6.4	4,800	2.79
Lipid production (g/L)	1	6.2	3,000	1.37
	1	6.2	3,700	1.39
	1.1	6.3	3,700	1.39
Lipid content (%)	0.9	6.2	3,000	55.65
	0.9	6.2	3,500	55.98
	1.1	6.2	3,300	55.36

จากการวิเคราะห์หาจุดที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยหรือตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงสุด โดยแทนค่า KNO<sub>3</sub> (X<sub>1</sub>), pH (X<sub>2</sub>) และ light intensity (X<sub>3</sub>) นำเข้าไปแทนค่าในสมการที่ 2-4 ซึ่งจะให้ได้ค่าการทำนายของตัวแปรตามได้สูงสุดและจุดที่เหมาะสมที่สุดของค่าตัวแปรอิสระ นั่นคือค่าที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นทำการทดลองอีกครั้งเพื่อสร้างความมั่นใจว่าสมการที่ได้มานี้ fit กับผลการทดลองจริง โดยเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายกับค่าที่ได้จากการทดลองจริง

Song *et al.* (2007) ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ที่ใช้หมักสำหรับการผลิตชีวมวลและ DHA ของ *Schizochytrium limacinum* OUC88 โดยใช้วิธีการทางสถิติคือ Plackett-burman และ Response surface methodology สำหรับคัดเลือกปัจจัยหลาย ๆ และเลือกใช้แผนการทดลอง CCD เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีนัยสำคัญและปฏิกริยาระหว่างปัจจัย พบว่า ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการหมักเพื่อผลิตชีวมวลคือ อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน และอายุเชื้อเริ่มต้น สามารถผลิตชีวมวลได้ 24.1 กรัมต่อลิตร และผลิต DHA ได้ 4.7 กรัมต่อลิตร

#### 4.5 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์

จากสมการการถดถอยที่ใช้ตรวจสอบสภาวะนั้นมีความเหมาะสมต่อผลของการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมัน และการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ สังเกตได้จากค่าสัมประสิทธิ์ในการตัดสินใจ ( $R^2$ ) และ  $P$ -value ที่มีระดับความเชื่อมั่นถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) โดยมีค่า  $KNO_3$  เท่ากับ 0.9 กรัมต่อลิตร, pH เท่ากับ 6.2 และ light intensity เท่ากับ 4,000 ลักซ์ จากการเปรียบเทียบค่าทำนายและค่าการทดลองซึ่งมีความเบี่ยงเบนไม่มากนัก ดังแสดงในตารางที่ 27 พบว่าการผลิตชีวมวลมีความเบี่ยงเบน 3.47 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองสามารถผลิตชีวมวลได้ 2.58 กรัมต่อลิตร และค่าทำนายเท่ากับ 2.67 กรัมต่อลิตร การผลิตน้ำมัน มีความเบี่ยงเบน 1 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองสามารถผลิตน้ำมันได้ 1.40 กรัมต่อลิตร และจากค่าทำนายสามารถผลิตน้ำมันได้ 1.39 กรัมต่อลิตร ส่วนการสะสมน้ำมันในเซลล์มีความเบี่ยงเบน 2.35 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองมีน้ำมันภายในเซลล์ 55.80 เปอร์เซ็นต์ และจากค่าทำนาย 54.59 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 27 การเปรียบเทียบระหว่างค่าทดลองและค่าทำนาย

Response (Y)	Experimental	Predicted	Error (%)
Biomass (g/L)	2.58	2.67	-3.47
Lipid production (g/L)	1.40	1.39	1.01
Lipid content (%)	54.49	55.80	-2.35

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 จากลำดับเบสบริเวณยีน 18S rDNA จำนวน 500 bp พบว่าสาหร่ายทั้งสองไอโซเลตมีความใกล้เคียงกับ *Chlorella sorokiniana* ซึ่ง *Chlorella* sp. DMKU5201 มีความเหมือน *C. sorokiniana* 99 เปอร์เซ็นต์ และ *Chlorella* sp. DMKU5202 มีความเหมือน *C. sorokiniana* 100 เปอร์เซ็นต์

การชักนำสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *C. sorokiniana* DMKU5201 และ DMKU5202 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธี UV-mutagenesis ทั้งหมดจำนวน 40,000 โคลโลนี จากนั้นคัดเลือกสาหร่ายพันธุ์กลายในเบื้องต้นโดยการคัดเลือกหาสายพันธุ์กลายที่ไม่สังเคราะห์แป้งด้วยการอ้อมด้วยไอโอดีน โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของฟิโนไทป์ ถ้าฟิโนไทป์ของสายพันธุ์ดั้งเดิมจะเห็นเป็นสีน้ำเงินคือมีแป้งสะสมภายในเซลล์ ถ้าโคลโลนีเป็นสีเหลืองออกส้ม แสดงว่าภายในเซลล์มีการสะสมแป้งน้อยหรืออาจมีการสะสมไขมันแทน เป็นการคัดเลือกฟิโนไทป์ของพันธุ์กลายขั้นต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วในการคัดเลือกสาหร่ายพันธุ์กลายที่มีจำนวนมาก ซึ่งสามารถคัดเลือกสาหร่ายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แป้งได้จำนวน 63 ไอโซเลต มาคัดเลือกขั้นต่อมาโดยการวิเคราะห์เชิงปริมาณของปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแบบคาปิลลารี พบว่ามีสาหร่ายพันธุ์กลายที่มีปริมาณน้ำมันสูงสุดและมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ผลิตชีวมวล 0.30 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 0.0636 กรัมต่อลิตร และมีน้ำมันภายในเซลล์ 21.16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง DMKU5202 สายพันธุ์ดั้งเดิมผลิตชีวมวลได้ 0.34 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 0.0512 กรัมต่อลิตร และผลิตน้ำมันภายในเซลล์ 15.00 เปอร์เซ็นต์

การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของสายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 โดยใช้ Plackett and Burman design ซึ่งนำปัจจัยทั้งหมด 7 ปัจจัยมาทำการคัดเลือกคือ  $\text{KNO}_3$  (กรัมต่อลิตร),  $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$  (กรัมต่อลิตร),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (กรัมต่อลิตร), NaCl (กรัมต่อลิตร), pH,  $\text{CO}_2$  (เปอร์เซ็นต์), light intensity (ลักซ์) พบว่า  $\text{KNO}_3$ , pH และ light intensity เป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.1$ ) ต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของสายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของ *C. sorokiniana* DMKU5202-31 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ 17 สิ่งการทดลอง ด้วยการกำหนดปัจจัยที่ต้องการศึกษา 3 ปัจจัย ที่ได้ถูกกลั่นกรองปัจจัยจาก Plackett-Burman design แล้ว คือ  $\text{KNO}_3$ , pH และ light intensity จากนั้นนำค่าการเจริญและการผลิตน้ำมันที่ได้จาก 17 สิ่งการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติได้สมการการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ ดังนี้

$$Y_{\text{biomass}} = -10.332 + 0.455641 X_1 + 3.614022 X_2 - 0.000469 X_3 + 0.120593 X_1 X_2 + 0.0000321 X_1 X_3 + 0.0000678 X_2 X_3 - 0.55472 X_1^2 - 0.31548 X_2^2 - 0.000000099 X_3^2$$

$$Y_{\text{Lipid production}} = -28.5536 + 0.948434 X_1 + 9.077213 X_2 + 0.00071 X_3 - 0.047333 X_1 X_2 - 0.000054 X_1 X_3 + 0.000016 X_2 X_3 - 0.51962 X_1^2 - 0.73008 X_2^2 - 0.000000076 X_3^2$$

$$Y_{\text{Lipid content}} = -1126.85 + 25.37506 X_1 + 361.7263 X_2 + 0.029057 X_3 - 1.967412 X_1 X_2 - 0.00366 X_1 X_3 - 0.00121 X_2 X_3 - 14.4246 X_1^2 - 28.9511 X_2^2 - 0.0000027 X_3^2$$

ค่า  $Y_{\text{biomass}}$  คือค่าน้ำหนักแห้งของชีวมวล (กรัมต่อลิตร),  $Y_{\text{Lipid production}}$  คือ ปริมาณน้ำมัน (กรัมต่อลิตร),  $Y_{\text{Lipid content}}$  คือ ปริมาณน้ำมันที่ผลิตภายในเซลล์ (เปอร์เซ็นต์),  $X_1$  คือ  $\text{KNO}_3$  (กรัมต่อลิตร)  $X_2$  คือ pH และ  $X_3$  คือ light intensity (ลักซ์)

จากสมการที่ได้นำไปหากราฟพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งกราฟสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและการผลิตน้ำมันภายในเซลล์ ได้ดังนี้ คือ  $\text{KNO}_3$  0.9 กรัมต่อลิตร pH 6.2 และ light intensity 4,000 ลักซ์ ซึ่งจากการทดลองสามารถผลิตชีวมวล 2.58 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 1.40 กรัมต่อลิตรและน้ำมันภายในเซลล์ 54.49 เปอร์เซ็นต์ และค่าทำนายผลิตชีวมวล 2.67 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 1.39 กรัมต่อลิตรและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ 54.80 เปอร์เซ็นต์

### ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายดั่งข้างต้น สามารถนำมาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันของสาหร่ายให้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และการทดลองเพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงสูตรของอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายและปรับปรุงสถานะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวล การผลิตน้ำมันและน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายพันธุ์กลาย *C. sorokiniana* DMKU5202-31 โดยการนำวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติมาช่วย ซึ่งจากสมการถดถอยที่ได้สามารถให้ค่าทำนายใกล้เคียงกับค่าทดลองจริงคือค่าทำนายผลิตชีวมวลได้ 2.67 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 1.39 กรัมต่อลิตรและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ 54.80 เปอร์เซ็นต์ ค่าการทดลองจริงผลิตชีวมวลได้ 2.58 กรัมต่อลิตร ผลิตน้ำมัน 1.40 กรัมต่อลิตรและน้ำมันภายในเซลล์ 54.49 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการทางด้านพันธุศาสตร์ก็สามารถเพิ่มปริมาณน้ำมันของสาหร่ายได้ในปริมาณหนึ่งแต่ไม่มากนัก ซึ่งจะเห็นได้ว่าการปรับปรุงสูตรอาหารและสถานะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายก็สามารถเพิ่มปริมาณน้ำมันของสาหร่ายได้เช่นเดียวกัน

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2554. พันธุศาสตร์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อนุวัตร แจ่มชัด. 2549. สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Alvarez, H.M. and A. Steinbüchel. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**. 60, 367 – 376.
- Amaro, H.M., A.C. Macedo and F.X. Malcata. 2012. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels. **Energy**. 44: 158 - 166.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 37: 911 - 917.
- Bold, H.C. and M.J. Wynne. 1978. **Introduction to the Algae: Structure and Reproduction**. Prentice-Hall, New Jersey.
- Chen, C.Y., K.L. Yeh, R. Aisyah, D. Lee and J.S. Chang. 2010. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**. 102: 71-81.
- Cheng, K.C., M. Ren and K.L. Ogden. 2013. Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* UTEX 250. **Bioresource Technology**. 128: 44-48.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advance**. 25: 294-306.

- Converti, A. and A. Alessandro. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**. 48: 1146-1151.
- Costa, J.A.V. and M.G. de Morais. 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**. 102: 2-9.
- Day, J.G., S.P. Slocombe and M.S. Stanley. 2012. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels. **Bioresource Technology**. 109: 245-251.
- Demirbas, A. and A. F. Demirbas. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**. 52: 163-170.
- Emma, S. and R. Sarbatly. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Review**. 16: 4316-4342.
- Hirata, S., M. Hayashitani, M. Taya and S. Tone. 1996. Technical note carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sunlight-collection device. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 81(5): 470-472.
- Hoek, C.V., D.G. Mann and H.M. Jahns. 1995. **Algae: An Introduction to Phycology**. Cambridge University press, USA:
- Holub B.J. and C.M. Skeaff. 1987. Nutritional regulation of cellular phosphatidylinositol. **Methods Enzymol**. 141: 234-244.
- Hu, R. 1999. **Food Product Design: Computer-Aided Statistical Approach**. Technomic Publishing Co., Ltd., Pennsylvania.

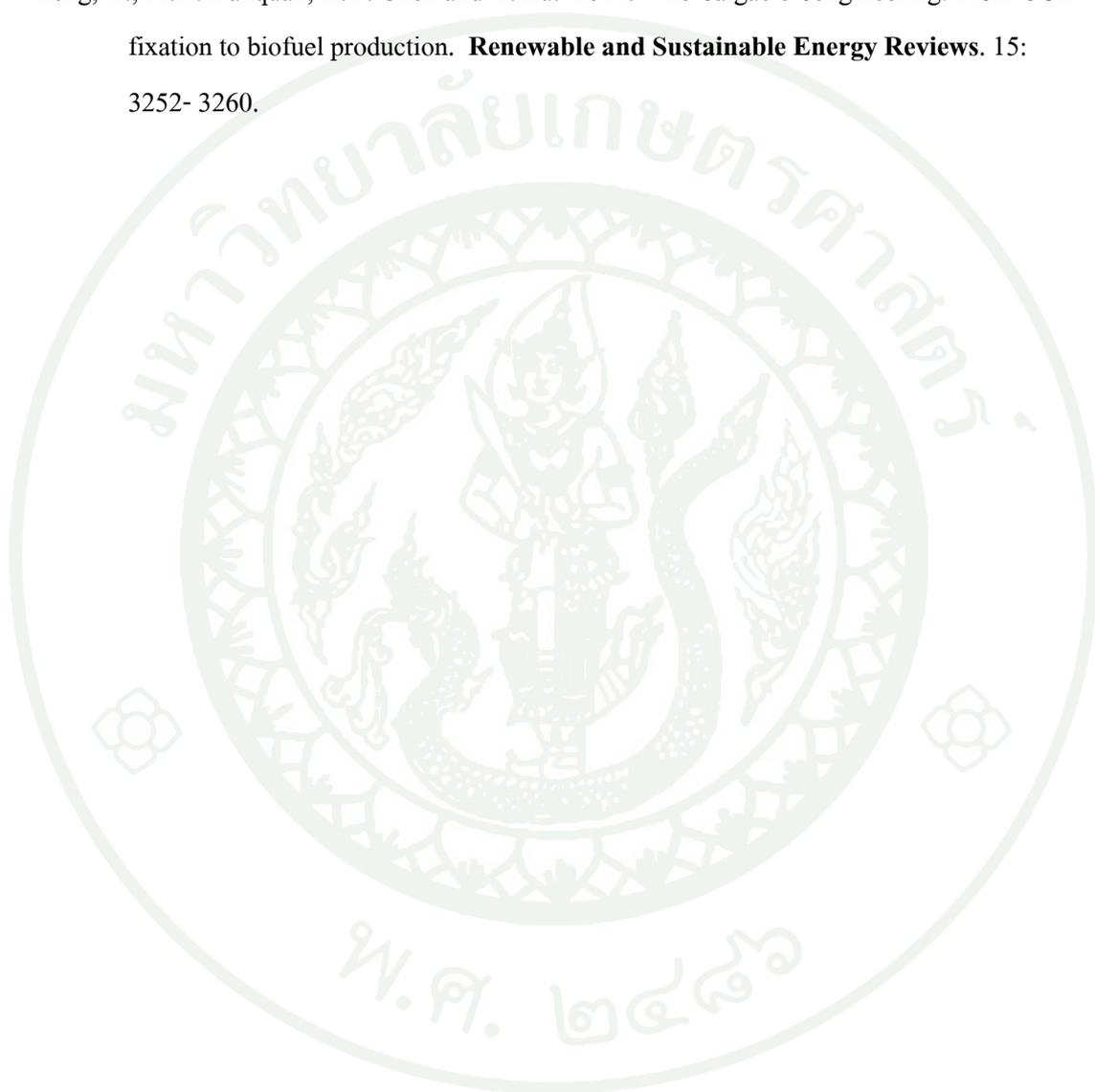
- Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. Zhang and G. Chen. 2010. Biodiesel production by microalgae biotechnology. **Applied Energy**. 87: 38-46.
- Kavadia, A., M. Komaitis, I. Chevalot, F. Blanchard, I. Marcand and G. Aggelis. 2001. Lipid and  $\alpha$ -linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 170: 4.
- Khuri, A.I. and J.A. Cornell. 1987. **Response surface designs and analyses**. Marcel Dekber, New York.
- Li, Y., D. Han, G. Hu, D. Dauvillee, M. Sommerfeld, S. Ball and Q. Hu. 2010. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophorylase hyper-accumulates triacylglycerol. **Metabolic Engineering**. 12: 387 - 391.
- Li, Y., W. Zhou, B. Hu, M. Min, P. Chen and R.R. Ruan. 2011. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. **Bioresource Technology**. 102: 10861-10867.
- Liu Z., G. wang and B. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**. 99: 4717–4722.
- Illman, A.M., A.H. Scragg and S.W. Shales. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**. 40: 631 – 635.
- Mata, T.M., A.A. Martins and N.S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other application: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 14: 217-232.

- Meng, X., J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie and M. Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganism. **Renewable Energy**. 34: 1-5.
- Merchant, S.S., J. Kropat., B. Liu, J. Shaw and J. Warakanont. 2012. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. **Biotechnology**. 23: 352-363.
- Praveenkumar, R., K. Shameera, G. Mahalakshmi, M.A. Akbarsha and N. Thajuddin. 2012. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp. BUM11008: Evaluation for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**. 37: 60-66.
- Plackett, R.L. and J.P. Burman. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**. 33: 305-325.
- Perez-Garcia O., F.M.E. Escalante, L.E. de-Bashan and Y. Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Science Direct**. 45: 11–36.
- Ramazanov A. and Z. Ramazanov. 2006. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PL with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. **Phycological Research**. 54: 255-259.
- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**. 86: 807-815.
- Ruangsomboon, S., 2012. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL2. **Bioresource Technology**. 109: 261-265.

- Scott, S.A., M.P. Davey, J.S. Dennis, I. Horst, C.J. Howe, D.J. Lea-Smith and A.G. Smith. 2011. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion Biotechnology**. 21: 277–86.
- Song, X., X. Zhang, C. Kuang, L. Zhu and N. Guo. 2007. Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. **Process Biochemistry**. 42: 1391-1397.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert. 2006. A commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 101: 87-96.
- Steinbuechel, A. and B. Fuchtenbusch. 1998. Bacteria and other biological systems for polyester production. **Trends Biotechnol**. 16: 419–427.
- Suali, E. and R. Sarbatly. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 16: 4316-4342.
- Talling, J.F. and D. Driver. 1963. Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. Proceedings, Conference of Primary Productivity Measurement, Marine and Freshwater, Hawaii, 1961. U.S. **Atomic Energy Commission**. TID-7633: 142-146.
- Widjaja, A., C.C. Chien and Y.H. Ju. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 40: 13-20.
- Wu, H.L., R.S. Hseu and L.P. Lin. 2001. Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. 42: 115-121.
- Yeesang, C. and B. Cheirsilp. 2011. 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 Technology**. 102: 3034–3040.

Yeh, K. L., C.Y. Chen and J.S. Chang. 2012. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**. 64: 1-7.

Zeng, X., M.K. Danquah, X.D. Chen and Y. Lu. 2011. Microalgae bioengineering: From CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 15: 3252- 3260.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

## 1. อาหารเหลวเลี้ยงสาหร่ายสูตร NSIII medium

$\text{KNO}_3$	1.011 กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.12 + 0.14 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.24 กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0148 กรัม
$\text{NaCl}$	0.0117 กรัม
Micro A	2 มิลลิลิตร
Micro B (manganese)	2 มิลลิลิตร
Micro (Iron-EDTA)	2 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

เตรียม Stock solution ของ microelements

Micro A: ผสม A.1 solution 200 มิลลิลิตร และ A.2 solution 2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 798 มิลลิลิตร

A.1	$\text{KBr}$	595 มิลลิกรัม
	$\text{KI}$	415 มิลลิกรัม
	$\text{LiCl}$	21.2 มิลลิกรัม
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	77 มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3 มิลลิลิตร

A.2	$\text{Zn} \cdot \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	125 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
	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	29 มิลลิกรัม
	Distilled water	100 มิลลิลิตร

Micro B: ละลาย  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  50 มิลลิกรัม และกรดไฮโดรคลอริก 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Micro C: ละลาย  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  810 มิลลิกรัม และ EDTA 750 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารเหลวเลี้ยงสาหร่ายสูตร NSIII (1/4 nitrogen)

เตรียมอาหารเหมือนสูตรอาหาร ข้อ 1. ยกเว้น  $\text{KNO}_3$  เติมเพียง 2.5 กรัมต่อลิตร

3. อาหารเหลวเลี้ยงสาหร่ายสูตร NSIII (Nitrogen free)

เตรียมอาหารเหมือนสูตรอาหาร ข้อ 1. ยกเว้นไม่เติม  $\text{KNO}_3$

4. อาหารแข็งเลี้ยงสาหร่ายสูตร

เตรียมอาหารเหมือนสูตรอาหาร ข้อ 1. เติมวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ



กรดไขมันมาตรฐาน (Standard fatty acid) ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไขมัน 10 ชนิด ได้แก่ กรดไขมันมาตรฐาน Pentadecanoic acid (15: 0) 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เป็นสาร internal standard รวมทั้งกรดไขมันมาตรฐานอื่น ๆ อีก 9 ชนิด

ตารางผนวกที่ ข1 กรดไขมันมาตรฐาน (Standard fatty acid) 10 ชนิด

Fatty acid (Sigma, Co, Ltd)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Myristic acid (14: 0)	10.00
Palmitic acid (16: 0)	10.00
Palmitoleic acid (16: 1)	10.00
Stearic acid(18: 0)	10.00
Oleic acid (18: 1)	10.00
Linoleic acid (18: 2)	10.00
Alpha-Linolenic acid (18: 3 $\alpha$ )	10.00
Gamma-Linolenic acid (18: 3 $\gamma$ )	10.00

หมายเหตุ คุณสารละลายกรดไขมันมาตรฐานแต่ละชนิดผสมกันอย่างละ 100 ไมโครลิตร



ภาคผนวก ค

ลำดับเบสและแผนภูมิสายวิวัฒนาการของสาหร่าย *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202

>110526-16\_M22\_DMKU5201-NS1.ab1756

TCTAGTATAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGT  
 TTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCG  
 TAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTCTG  
 CCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGAT  
 GTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGG  
 TGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACG  
 GCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGG  
 AGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAG  
 TACAATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGG

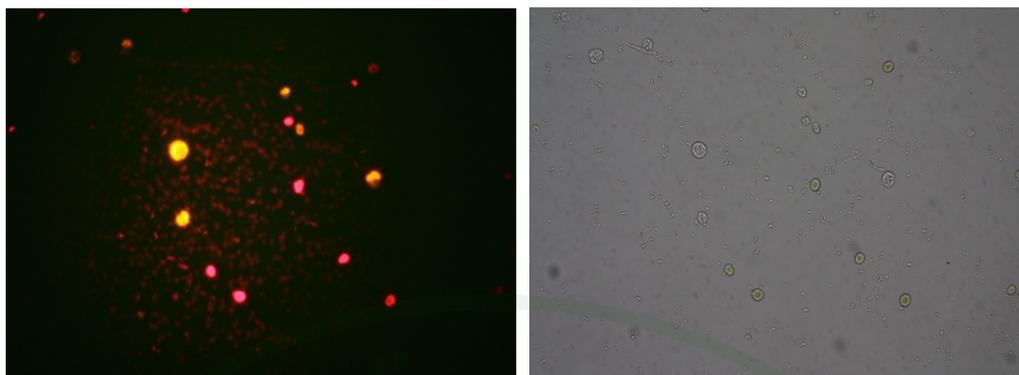
**ภาพผนวกที่ ค1** ลำดับเบสของสายรหัส *Chlorella* sp. DMKU5201

110526-16\_O22\_KU05-NS1.ab1948

GTCTAGTATAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAG  
 TTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGC  
 GTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTCT  
 GCCC GACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGA  
 TGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATG  
 GTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC  
 GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGG  
 GAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGA  
 GTACAATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTG

**ภาพผนวกที่ ค2** ลำดับเบสของสายรหัส *Chlorella* sp. DMKU5202



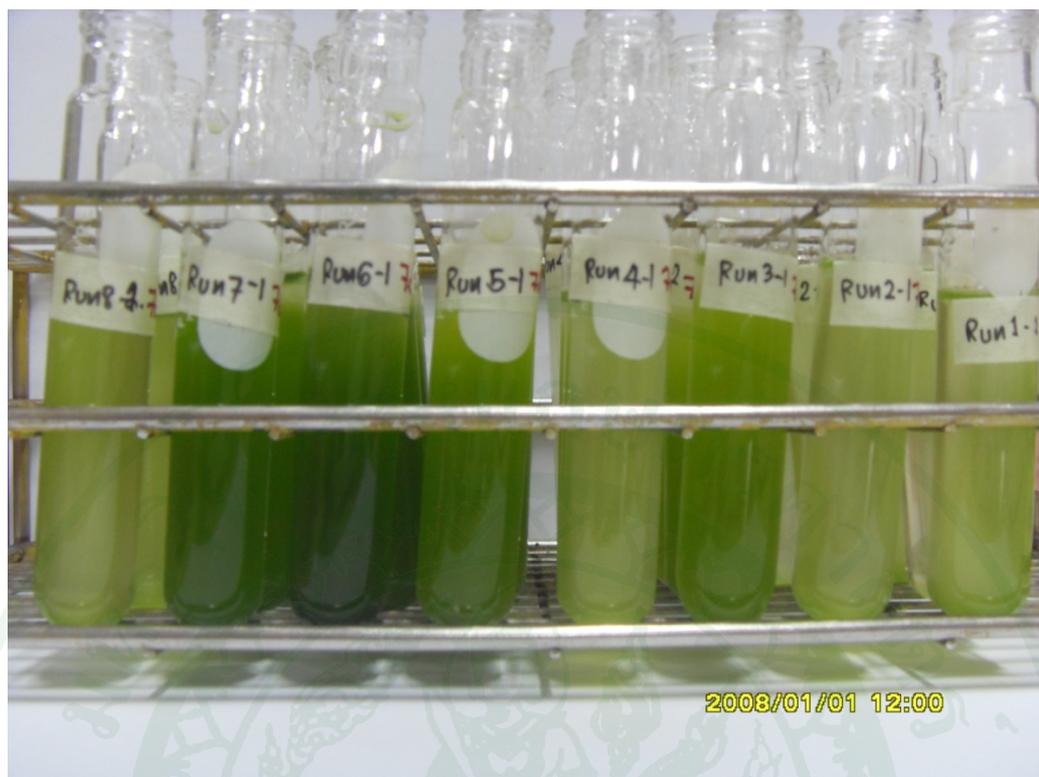


ภาพผนวกที่ ๑1 เซลล์ของสาหร่ายพืชรูปร่างคล้าย *C. sorokiniana* DMKU5201-31 โดยการย้อมด้วยสี Nile red ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope)

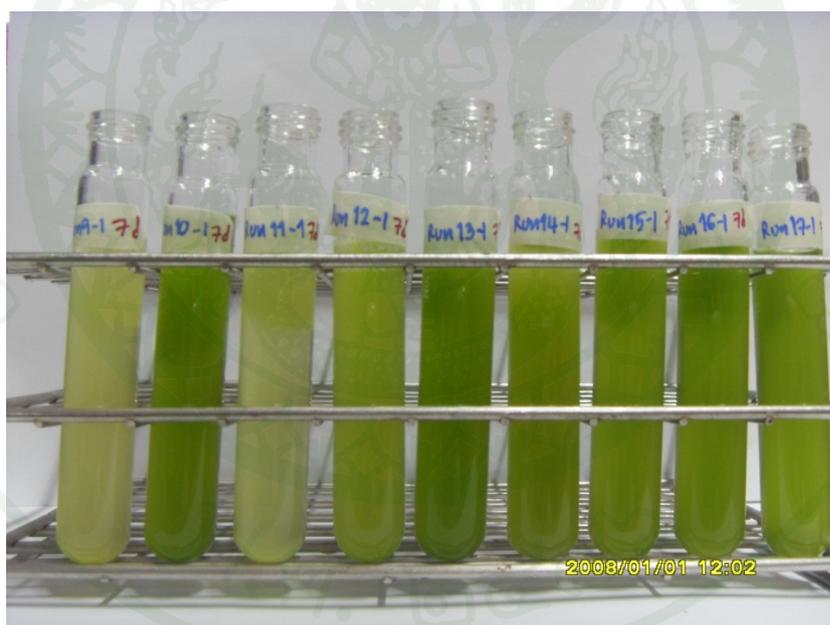




ภาพผนวกที่ จ1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายพืชรูปร่างกลม *Chlorella* sp. DMKU5201 และ DMKU5202 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSIII (ลดไนโตรเจนลงเหลือ 1 ใน 4 ส่วน) โดยเลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง นาน 7 วัน



ภาพผนวกที่ จ2 ลักษณะการเจริญของสาหร่ายพันธุกรรม *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSIII จากการจัดการทดลองแบบ Plackett and Burman design ที่ทดลองจำนวน 8 สิ่งทดลอง ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมึดเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง นาน 7 วัน



**ภาพผนวกที่ ๑3** ลักษณะการเจริญของสาหร่ายพืชน้ำสกุล *C. sorokiniana* DMKU5202-31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NSIII เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพินผิวตอบสนอง ซึ่งออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design สี่ทดลองจำนวน 17 สี่ทดลอง ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างต่อมิตเท่ากับ 16: 8 ชั่วโมง นาน 7 วัน

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาววัชรา จันทาสี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	9 มีนาคม 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและปลายจาก โรงเรียนแม่วงก์พิทยาคม ตำบลแม่วงก์ อำเภอแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์</li> <li>2. จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่</li> </ol>
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	-