บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2552. **รายงานการศึกษาแนวคิดผลิตภัณฑ์ใหม่ ของอาหารเสริมจาก DHA สาหร่ายเซลล์เดียว**. กรุงเทพฯ : ส่วนบริหารจัดการข้อมูล และปรึกษาแนะนำ สานักบริหารยุทธศาสตร์. 30 น.

กาญจนภาชน์ ลิ่วโนมนต์. 2527. **สาหร่าย**. กรุงเทพฯ : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 289 น.

กุสุมา พรมสีดา. ม.ป.ป. **องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์**. มหาสารคาม : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 17 น.

ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. 2549. **คู่มือปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Algal Culture)**. เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 44 น.

โครงสร้างเคมี. 2553ก. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.google.com. (1 กรกฎาคม 2553).

_____. 2553ข. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.pensuk.krubpom.com. (1 กรกฎาคม 2553).

จงกล พรมยะ. 2552. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย**. เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและ-ทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 128 น.

_____. 2543. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ในน้ำทิ้งจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพมูลสุกร**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 69 น.

จงกล พรมยะ, ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม และ อนุภาพ วรรณคนาพล. 2552. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *SPIRULINA PLATENSIS* ในน้ำทิ้งจากโรงอาหาร เพื่อเป็นอาหารในการอนุบาล และเลี้ยงปลาแฟนซีคาร์ฟ แบบยั่งยืน**. เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 39 น.

จงกล พรมยะ, จารุวรรณ แผนนาง และ ศิริเพ็ญ ตรัยไชยาพร. 2545. **Carotenoide Content and Nutritional Value of Some Edible Algae**. เชียงใหม่ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย-เชียงใหม่.

จงกล พรมยะ และ ขจรเกียรติ์ แซ่ตัน. 2548. **การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อสุขภาพ**. เชียงใหม่ : ภาคเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

จารุณี เกิดวงค์ และ วาสนา ฉัตรดำรง. ม.ป.ป. **การผลิตแอสต้าแซนทิน และกรดไขมันโอเมก้า - 3 จากจุลินทรีย์**. พิษณุโลก : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 7 น.

ธนิตชัย ปรัชญาถาวรกุล และ ศศิธร จันทนวรางกูร. ม. ป .ป. **ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อปริมาณ ซี - ไฟโคไซยานิน และสมบัติการต้านออกซิเดชันของสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*)**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 8 น.

ธนัชสัณห์ พูนไพบูลย์พิพัฒน์, จำรูญ เล้าสินวัฒนา และ สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. 2551. ผลทางอัลลีโลพาทีของสาหร่าย 10 ชนิด. ภาควิชาพืชสวน ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. **วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร** 39(3): 484-487.

ธีรศักดิ์ สมดี. 2545. มหันต์ภัยสาหร่ายพิษ. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข** 30(2): 99-107.

นพรัตน์ ภานุวณิชชากร. 2546. **การแพร่กระจายของสาหร่ายพิษสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* spp. และคุณภาพน้ำในอ่างเก็บน้ำลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมาในปี 2543-2544**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 124 น.

นิวุฒิ หวังชัย. 2549. **โภชนาศาสตร์สัตว์น้ำ**. เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 226 น.

นุชนรี จันทร์มณี. 2543. **ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.

ดุจชีวัน คำภาพงษา. ม.ป.ป. **องค์ประกอบของกรดไขมันในเมล็ดพืชบางชนิด**. มหาสารคาม : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 17 น.

พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล. ม.ป.ป. **กรดไขมันชนิดไหนที่เราต้องการ**. ปทุมธานี : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.).

ไพฑูรย์ สุขสถาวรพันธุ์. 2537. การสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นที่อยู่ตัวโดยยีสต์และทางเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี อ้างโดย กุสุมา พรมสีดา. ม.ป.ป. **องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์**. มหาสารคาม : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 17 น.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. **สาหร่ายวิทยา**. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 497 น.

_____. 2548. ศักยภาพของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการนำมาเป็นอาหารและยา. **วารสารนานาสัตว์น้ำ** 8(2): 20-21.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2530. **แพลงก์ตอน**. กรุงเทพฯ : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 289 น.

_____. 2544. **แพลงก์ตอนพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 851 น.

ศิริเพ็ญ ตรัยไชยาพร. 2543. **การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 125 น.

สมศักดิ์ พิภภิญโญ และ สุฤทธิ์ สมบูรณ์ชัย. ม.ป.ป. **บทปฏิบัติการชลธีวิทยา**. เชียงใหม่ : ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 43 น.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2529. **สรีรวิทยาของพืช**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 330 น.

สินีนาฏ อักโขสุวรรณ และ ศศิธร จันทนวรางกูร. ม.ป.ป. **ผลของการทำแห้งต่อ C-Phycocyanin และสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*)**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 8 น.

สุฤทธิ์ สมบูรณ์ชัย, จงกล พรมยะ และ ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. 2551. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Cladophora* (ไก) และ *Spirulina* เพื่อเป็นอาหารปลาบึก**. เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 60 น.

สุมนทิพย์ บุนนาค และ ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธ์. 2532. การเปรียบเทียบคุณค่าทางอาหารระหว่างออสซิลลาทอเรีย (*Oscillatoria* sp.) และสไปรูไลน่า (*Spirulina* sp.). **วารสารวิทยาศาสตร์ มข** 17(2): 90-95.

อัยรา พันอนุ. 2549. **การเพิ่มปริมาณ conjugated linoleic acid (CLA) ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโดยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 93 น.

อาภารัตน์ มหาขันธ์. ม.ป.ป. **กลุ่มของสารพิษที่ผลิตโดยสาหร่ายน้ำจืด**. ปทุมธานี : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.).

Ahmed, A. I. 1999. Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 8: 33-37.

AOAC. 2001. **Official Method 996.06 Fat in Foods Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic Method**. U.S.A. : AOAC international.

Bold, H. C. and M. J. Wyne. 1978. **Introduction to the algal cultures**. New Jersey : Prentice Hall Inc, Englewood Cliffs. 706 p.

Boussiba, S., C. M. Rech and J Giben. 1984. Ammonia uptake and retention is some cyanobacteria. **Arch Microbiol** 25(2): 65-68.

Britton, G. 2005. **Workshop on Carotenoid : The Qualitative and Quantitative Analysis**. Songkla : Prince of Songkla University.

Carmicharl, W. W. 1995. Cyanobacterial toxins in manual on harmful marine microalgae. In Hallegraeff, G. M. (Ed.) Manual and guides 33, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. อ้างโดย นพรัตน์ ภานุวณิชชากร. 2546. **การแพร่กระจายของสาหร่ายพิษสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* spp. และคุณภาพน้ำในอ่างเก็บน้ำลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมาในปี 2543-2544**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 124 น.

Codd, G. A. 2001. Cyanobacterial toxins water quality and eutrophication control. Lecture on 6th WRC workshop cutrophication and toxin cyanobacteria in freshwater reservoir. Faculty of Science, Chiang Mai University. 8-10 February 2001. อ้างโดย นพรัตน์ ภานุวณิชชากร. 2546. **การแพร่กระจายของสาหร่ายพิษสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* spp. และคุณภาพน้ำในอ่างเก็บน้ำลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมาในปี 2543-2544**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 124 น.

Cohen, Z., M. Reungjitchawali and M. Tanticharoen. 1993. Production and partial purification of gamma linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology** 5: 109-115.

Dinesh, K. R., D. Manikandavelu and K. K. Guru. 2010. Fixation of Carbon dioxide and oxygen production by photosynthetic simulations in indoor environs. **J. Algal Biomass Utln** 4: 84-88.

Domuinguez, B. I., I. G. Legarreta and A. T. Campocosio. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology** 92: 209-214.

Dow, C. S. and U. K. Swoboda. 2000. Cyanotoxin. In Whitton B.A. and Potts M. (Eds.), The ecology of cayanobacteria, their diversity in time and space, the Netherland, Kluwer Academic Publisher, pp. 613-632. อ้างโดย นพรัตน์ ภานุวณิชชากร. 2546. **การแพร่กระจายของสาหร่ายพิษสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* spp. และคุณภาพน้ำในอ่างเก็บน้ำลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมาในปี 2543-2544**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 124 น.

Epply, R. W., J. N. Rogers and A. Sournia. 1971. Light/Dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankton *Skeletonema costatum* and *Coccoliths luxlexi* in nitrogen limited chemostat cultures. J. Phycol 7: 150-154. อ้างโดย นุชนรี จันทร์มณี. 2543. **ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.

Falkowski, P. G. 1980. Light-shade adaptation in marine phytoplankton, pp. 99-119. In Falkwski, P. G. (ed.). Primary Productivity in the Sea. New York : Plenum Press. อ้างโดย นุชนรี จันทร์มณี. 2543. **ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.

Fogg, G. E. 1966. Algae Culture and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press, London. 170 p. อ้างโดย จงกล พรมยะ และ ขจรเกียรติ์ แซ่ตัน. 2548. **การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไปรูลินาเพื่อสุขภาพ**. เชียงใหม่ : ภาคเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

Gisela, F., L. Jonte and E. Morales. 2009. Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relaci?n al pH en cultivos discontinuos. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia** 29: 21-25.

Gutierrez, L. E. and R. C. M. Silva. 1993. Fatty acid composion of cane molasses and yeasts.**Sci.agric** 50 (3): 473-477.

Harri, T. K., J. Holliday and W. W. Carmichael. 2005. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales Australia-a sase on cyanobacteria diversity and hepatoxin bioaccum ulation. **Toxicology and Applied** 203: 243-256.

Humm, H. J. and S. R. Wicks. 1980. **Introduction and Guide to the Marine Blue-green Algae**. New York : A Wiley Interscience Publication. 194 p.

Jensen, S. and G. Knusten. 1993. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina plantensis*. J. App. Phycol 5: 495-504. Cited by Mohan, N., R. P. Hanumantha and V. Sivasubramanian. 2010. **TITLE: Mass Cultivation of *Chroococcus turgidus* and *Oscillatoria* sp. and Effective Harvesting of Biomass by Low-cost methods**. Tamil Nadu : Vivekananda Institute of Algal Technology. 15 p.

Judith, B., R. E. Susana and P. Peter. 1994. Characterization of Metal Binding Bioflocculants Produced by the Cyanobacterial Component of Mixed Microbial Mats. **Applied and environmental microbiolog** 60: 2311-2315.

Kuiper, G. T., I. Falconer and J. Fitzgerald. 1999. Human health aspect. In Chorus, I. and Bartram, J. (Eds.), Toxic cyanobacteria in water, London and New York, E&FN Spon, pp. 15-34. อ้างโดย นพรัตน์ ภานุวณิชชากร. 2546. **การแพร่กระจายของสาหร่ายพิษสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* spp. และคุณภาพน้ำในอ่างเก็บน้ำลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมาในปี 2543-2544**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 124 น.

Lobban, C. S., P. S. Harrison and M. J. Duncan. 1985. The Physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge University Press, London. 242 p. อ้างโดย ศิริวรรณ คิดประเสริฐ และ ประพฤติ พรหมสมบูรณ์. 2540. **การใช้สาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรียช่วยลดปริมาณออโธฟอสเฟตในน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้ง**. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล-ธัญบุรี คณะเกษตรศาสตร์บางพระ. 39 น.

Mahakhant, A., P. Klungsupya and P. Atthasampunna. 1998. Toxicity of cyanobacteria blooms in Thailand. Final report, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, project no. 39-02, 48 p. อ้างโดย สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. **สาหร่าย ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ : สำนักผู้ประสานงานชุดโครงการ "อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ" สกว. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 356 น.

Mazel, D., J. Houmard and M. N. Taodeau. 1990. Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. **J. Bacteriol** 172: 2755-2761.

Millie, D., F. Ingram and C. P. Dionigi. 1990. Pigment and photosynthetic response of *Oscillatoria agardhii* (Cyanophyta) to photon fluex density and spectral quality. J. Phycol 26: 660-666. Cited by Mohan N., R. P. Hanumantha and V. Sivasubramanian. 2010. **TITLE: Mass Cultivation of *Chroococcus turgidus* and *Oscillatoria* sp. and Effective Harvesting of Biomass by Low-cost methods**. Tamil Nadu : Vivekananda Institute of Algal Technology. 15 p.

Mohan, N., R. P. Hanumantha and V. Sivasubramanian. 2010. **TITLE: Mass Cultivation of *Chroococcus turgidus* and *Oscillatoria* sp. and Effective Harvesting of Biomass by Low-cost methods**. Tamil Nadu : Vivekananda Institute of Algal Technology. 15 p.

Nicole, A. D., T. S. Henricus and C. K. Jacco. 2010. Composition and heterogeneity of the microbial community in a coastal microbial mat as revealed by the analysis of pigments and phospholipid derived fatty acids. **Journal of Sea Research** 63: 62-70.

Niyom, K. and K. W. Fan. 2003. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. **Songklanakarin J. Sci. Technol** 25 (5): 1-7.

Oppenheimer, C. H. 1966. Marine Biology. New York : CRC Press. 111 p. อ้างโดย นุชนรี จันทร์มณี. 2543. **ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.

Park, H. and M. F. Watanabe. 1996. Toxin *Microcystis* in eutrophic lakes. In Watanabe, M. F., Harada, K. and Fujiki, H. (Eds.) Toxin *Microcystis*. CRC Press, Inc. อ้างโดย นพรัตน์ ภานุวณิชชากร. 2546. **การแพร่กระจายของสาหร่ายพิษสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* spp. และคุณภาพน้ำในอ่างเก็บน้ำลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมาในปี 2543-2544**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 124 น.

Peerapornpisal, Y., S. Proengkarn and K. Kasantikul. 1997. Nutritional value and Cultivational of *Spirogyra* spp. Proceedings of the 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, 7-10 May 1997, Phuket, Thailand, pp. 152-162. อ้างโดย จงกล พรมยะ. 2552. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย**. เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 128 น.

Prerna, A., G. Rani and R. K. Saxena. 1999. Zn^{2+} biosorption by *Oscillatoria anguistissima*. **Process Biochemistry** 34: 77-85.

Prescott, G. W. 1978. **How to Know the Freshwater Algae**. Duluque Iowa : Wm. C. Brown. 293 p.

Rasmussen, U. and M. M. Svenning. 1998. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. **Appl. Environ. Microbiol** 64: 265-272.

Richmond, A. 1986. Outdoor mass cultures of microalgae, pp. 285-330. In Richmond, A. (ed.). **CRC Handbook of Microalgae Mass Culture**. Florida : CRC Press, Inc.

Rippka, R., J. B. Waterbury and R. Y. Stanier. 1981. Isolation and purification of cyanobacteria : some general principles, pp. 210-220. In Starr, M. P., H. Stolp and H. G. Schlegal. (eds.). **The Prokaryotes : A Handbook on Habitats Isolation and Identification of Bacteria**. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Salisbury, F. B. and C. Ross. 1969. Plant Physiology. Wadswoth Publ. Inc., California. 214 p. อ้างโดย นุชนรี จันทร์มณี. 2543. **ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.

Schwimmer, D. and M. Schwimmer. 1985. Algae and Medicine, p. 370. In Jackson, D. F. (ed.). **Algae and Man**. New York : CRC Press.

Siangdung, W., B. Bunnag and M. Tanticharoen. 1996. **Effect of temperature and NAD on D - 12 desaturase of *Spirulina platensis***. Germany : Poster present at the 1st European Phycological Congress, Aug 11-18, 1996, Cologne.

Sivonen, K. 1990. Effect of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl. Environ. Microbiol 56(9): 2658-2666. อ้างโดย นุชนรี จันทร์มณี. 2543. **ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์-ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.

Smith, G. M. 1950. **The Fresh-Water Algae of the Unite States**. London : McGraw-Hill Book Company. 719 p.

Sommer, T. R., F. M. L. Souza and N. M. Morry. 1992. Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorthnchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Aquacult** 106: 63-74.

Somrak, R., J. Niran and M. Kazuhisa. 2007. High Biomass Production and Starch Accumulation in Native Green Algal Strains and Cyanobacterial Strains of Thailand. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 41: 570-575.

Silveira, S. T., J. F. M. Burkert and S. J. Kalil. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioressource Technology** 98: 1629-1634.

Tabachek, J. L. and M. Yurkowski. 1976. Isolation and identification of blue-green algae producing muddy odor metabolites, geosmin and 2-methylisoborneol in saline lakes in Manitoba. J. Fish. Res. Board Can 33: 25-35. อ้างโดย นุชนรี จันทร์มณี. 2543. **ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.

Vanessa, G., S. Y. Nair and P. Ernani. 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry** 120: 585-590.

Vonshak, A. and R. Guy. 1988. Photoinhibitionas a limiting factor in outdoor cultivation of *Spirulina plantensis*. Algal Biotechnology. 365-370. Cited by Mohan, N., R. P. Hanumantha and V. Sivasubramanian. 2010. **TITLE: Mass Cultivation of *Chroococcus turgidus* and *Oscillatoria* sp. and Effective Harvesting of Biomass by Low-cost methods**. Tamil Nadu : Vivekananda Institute of Algal Technology. 15 p.

Vonshak, A., R. Guy and M. Guy. 1988. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. **Arch. Microbiol** 150: 417-420.

Vonshak, A., G. Torzillo and L. Tomaseli. 1994. Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibitionin outdoor cultures of *Spirulina platensis*. J.Appl. Phycol 6: 31-34. Cited by Mohan, N., R. P. Hanumantha and V. Sivasubramanian. 2010. **TITLE: Mass Cultivation of *Chroococcus turgidus* and *Oscillatoria* sp. and Effective Harvesting of Biomass by Low-cost methods**. Tamil Nadu : Vivekananda Institute of Algal Technology. 15 p.

Wangwibulkit, S., L. Chalor and C. Niti. 2008. Effects of Salinity and pH on the Growth of Blue-Green Algae, *Oscillatoria* sp. And *Microcystis* sp., Isolated from Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Ponds. **Kasetsart University fisheries research bulletin** 32: 1-9.

Wu, Q. and Y. Yi. 1989. Liposoluble compounds in *Oscillatoria tenuis*. **Acta Botanica Sinica** 31: 798-802.

Yongmanitchai, V., D. Chonudomkul and N. Noparatnaraporn. 1999. Diversity of toxic cyanobacteria in water reservoirs of Thailand. Proceedings of International Conference on Asian Network on Microbial Research, Chiang Mai Plaza Hotel, Chiang Mai, Thailand, 29 Now.-1 Dec. 1999, TISTR, p. 689-696. อ้างโดย สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. **สาหร่าย ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ : สำนักผู้ประสานงานชุดโครงการ "อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ" สกว. จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย. 356 น.

Youji, W. J., B. Grant and M. Tadashi. 1995. Effect of ultraviolet-A (UV-A) light on growth, photosynthetic activity and production of biopterin glucoside by the marine UV-A resistant cyanobacterium *Oscillatoria* sp. **Biochimica et Biophysics Acta** 1244: 165-168.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ตารางผนวกการวัดความหนาแน่นของเซลล์, คุณภาพน้ำ, คุณค่าทางโภชนาการ และรงควัตถุสารสี ตลอดทั้งการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ในห้องปฏิบัติการ

ตารางผนวก 1 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ (OD, optical density) ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน

	สูตรอาหารที่ 1	สูตรอาหารที่ 2	สูตรอาหารที่ 3	สูตรอาหารที่ 4
0	0.01 ± 0.00^{ns}	0.01 ± 0.00^{ns}	0.01 ± 0.00^{ns}	0.01 ± 0.00^{ns}
1	0.072 ± 0.01^{a}	0.028 ± 0.01^{b}	0.026 ± 0.01^{b}	0.049 ± 0.00^{b}
2	0.082 ± 0.01^{a}	0.033 ± 0.00^{c}	0.051 ± 0.01^{bc}	0.06 ± 0.01^{b}
3	0.077 ± 0.01^{a}	0.036 ± 0.02^{b}	0.101 ± 0.03^{a}	0.088 ± 0.03^{a}
4	0.082 ± 0.0^{ab}	0.041 ± 0.01^{b}	0.123 ± 0.04^{a}	0.106 ± 0.03^{a}
5	0.088 ± 0.01^{ab}	0.046 ± 0.00^{b}	0.142 ± 0.02^{a}	0.161 ± 0.04^{a}
6	0.094 ± 0.01^{ab}	0.052 ± 0.01^{b}	0.166 ± 0.03^{a}	0.204 ± 0.03^{a}
7	0.115 ± 0.02^{b}	0.069 ± 0.01^{b}	0.244 ± 0.03^{a}	0.241 ± 0.04^{a}
8	0.164 ± 0.02^{b}	0.082 ± 0.01^{b}	0.285 ± 0.03^{a}	0.263 ± 0.03^{a}
9	0.195 ± 0.03^{b}	0.095 ± 0.02^{bc}	0.325 ± 0.03^{a}	0.301 ± 0.05^{ab}
10	0.206 ± 0.02^{ab}	0.105 ± 0.03^{b}	0.297 ± 0.04^{a}	0.27 ± 0.06^{a}
11	0.225 ± 0.03^{ns}	0.103 ± 0.05^{ns}	0.192 ± 0.04^{ns}	0.251 ± 0.06^{ns}
12	0.21 ± 0.03^{a}	0.076 ± 0.03^{b}	0.165 ± 0.05^{ab}	0.217 ± 0.03^{a}
13	0.193 ± 0.02^{ns}	0.074 ± 0.03^{ns}	0.143 ± 0.05^{ns}	0.193 ± 0.04^{ns}
14	0.184 ± 0.03^{a}	0.064 ± 0.03^{b}	0.105 ± 0.04^{ab}	0.166 ± 0.01^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางผนวก 2 ผลของการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน (กรัมต่อลิตร)

		สูตรที่ 1	**สูตรที่ 2**	**สูตรที่ 3**	**สูตรที่ 4**
น้ำหนักเซลล์แห้ง	**วันที่ 0**	0.10 ± 0.00^{ns}	0.10 ± 0.00^{ns}	0.10 ± 0.00^{ns}	0.10 ± 0.00^{ns}
	วันที่ 7	0.34 ± 0.11^{a}	0.22 ± 0.03^{b}	0.34 ± 0.12^{a}	0.28 ± 0.13^{ab}
	วันที่ 14	0.64 ± 0.04^{a}	0.54 ± 0.10^{ab}	0.65 ± 0.06^{a}	0.44 ± 0.07^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางผนวก 3 ผลของคุณภาพน้ำทางกายภาพ และเคมี ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน

		อุณหภูมิน้ำ (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)	DO (mg/l)	pH	NH_3-N (mg/l)	NO_3-N (mg/l)	PO_4-P (mg/l)
วันที่ 0	สูตรที่ 1	28.16 ± 0.17^{ab}	30 ± 0.00^{ns}	5.6 ± 0.76^{ab}	10 ± 0.00^{ns}	1.413 ± 0.13^{a}	2.879 ± 0.30^{b}	2.381 ± 0.03^{c}
	สูตรที่ 2	27.83 ± 0.17^{b}	30 ± 0.00^{ns}	5.5 ± 0.59^{ab}	10 ± 0.00^{ns}	1.535 ± 0.11^{a}	2.032 ± 0.22^{c}	2.541 ± 0.03^{ab}
	สูตรที่ 3	28.17 ± 0.17^{ab}	30 ± 0.00^{ns}	5.9 ± 0.23^{a}	10 ± 0.00^{ns}	1.458 ± 0.14^{a}	3.710 ± 0.33^{a}	2.662 ± 0.08^{a}
	สูตรที่ 4	28.33 ± 0.17^{a}	30 ± 0.00^{ns}	4.9 ± 0.49^{b}	10 ± 0.00^{ns}	0.873 ± 0.11^{b}	0.298 ± 0.07^{d}	1.243 ± 0.20^{d}
วันที่ 7	สูตรที่ 1	30.00 ± 0.06^{ns}	30.5 ± 0.00^{ns}	6.9 ± 0.03^{ns}	9.7 ± 0.04^{ns}	1.181 ± 0.01^{a}	2.677 ± 0.34^{a}	2.190 ± 0.05^{c}
	สูตรที่ 2	29.93 ± 0.13^{ns}	30.5 ± 0.00^{ns}	6.3 ± 0.55^{ns}	9.5 ± 0.20^{ns}	1.137 ± 0.01^{b}	2.017 ± 0.23^{b}	2.292 ± 0.02^{b}
	สูตรที่ 3	29.80 ± 0.40^{ns}	30.5 ± 0.00^{ns}	6.6 ± 0.08^{ns}	9.8 ± 0.19^{ns}	1.125 ± 0.00^{b}	2.513 ± 0.50^{ab}	2.403 ± 0.01^{a}
	สูตรที่ 4	30.00 ± 0.21^{ns}	30.5 ± 0.00^{ns}	6.8 ± 0.22^{ns}	9.7 ± 0.13^{ns}	0.723 ± 0.00^{c}	0.273 ± 0.04^{c}	0.868 ± 0.04^{c}
วันที่ 14	สูตรที่ 1	28.63 ± 0.37^{b}	31.5 ± 0.00^{ns}	7.5 ± 0.15^{ns}	8.15 ± 0.19^{ns}	1.019 ± 0.01^{a}	1.613 ± 0.26^{ab}	2.083 ± 0.06^{a}
	สูตรที่ 2	29.33 ± 0.34^{ab}	31.5 ± 0.00^{ns}	7.4 ± 0.15^{ns}	8.18 ± 0.39^{ns}	1.032 ± 0.01^{a}	1.920 ± 0.09^{a}	2.166 ± 0.01^{a}
	สูตรที่ 3	29.03 ± 0.30^{ab}	31.5 ± 0.00^{ns}	7.7 ± 0.09^{ns}	8.11 ± 0.26^{ns}	1.010 ± 0.01^{a}	1.459 ± 0.21^{b}	2.179 ± 0.15^{a}
	สูตรที่ 4	29.53 ± 0.33^{a}	31.5 ± 0.00^{ns}	7.6 ± 0.23^{ns}	8.05 ± 0.36^{ns}	0.622 ± 0.01^{b}	0.257 ± 0.13^{c}	0.741 ± 0.19^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางผนวก 4 ผลของคุณค่าโภชนาการของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)

	สูตรอาหารที่ 1	สูตรอาหารที่ 2	สูตรอาหารที่ 3	สูตรอาหารที่ 4
ความชื้น	9.220 ± 0.15^{b}	9.160 ± 0.19^{b}	9.583 ± 0.17^{a}	8.698 ± 0.17^{c}
เถ้า	15.319 ± 0.64^{ns}	14.666 ± 0.23^{ns}	14.732 ± 0.02^{ns}	15.185 ± 0.07^{ns}
โปรตีน	16.566 ± 1.56^{c}	21.338 ± 1.31^{bc}	27.190 ± 0.82^{a}	23.692 ± 0.77^{b}
ไขมัน	2.379 ± 0.32^{a}	1.616 ± 0.07^{b}	1.729 ± 0.14^{b}	1.415 ± 0.16^{b}
เยื่อใย	1.387 ± 0.02^{ab}	1.363 ± 0.03^{b}	1.351 ± 0.01^{bc}	1.419 ± 0.02^{a}
คาร์โบไฮเดรต	55.130 ± 2.06^{a}	51.856 ± 1.24^{ab}	45.640 ± 0.64^{c}	49.591 ± 0.79^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางผนวก 5 ผลของรงควัตถุสารสี (pigment) ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

	สูตรอาหารที่ 1	สูตรอาหารที่ 2	สูตรอาหารที่ 3	สูตรอาหารที่ 4
Total carotenoid	408.654 ± 0.14^{b}	258.013 ± 0.04^{c}	855.436 ± 1.11^{a}	445.513 ± 1.26^{b}
ß - caroten	99.737 ± 1.03^{c}	9.439 ± 0.11^{d}	155.418 ± 1.07^{a}	124.820 ± 1.69^{b}
C - phycocyanin	$26.971+0.76^{c}$	$15.213+1.10^{d}$	$35.638+1.31^{a}$	$29.622+1.42^{bc}$

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\leq0.05$)

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ในบ่อกลางแจ้ง

ตารางผนวก 6 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ (OD, optical density) ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน

	สูตรอาหารที่ 3	สูตรอาหารที่ 4
0	0.01 ± 0.00^{ns}	0.01 ± 0.00^{ns}
1	0.026 ± 0.01^{ns}	0.049 ± 0.00^{ns}
2	0.024 ± 0.01^{ns}	0.060 ± 0.01^{ns}
3	0.077 ± 0.01^{ns}	0.075 ± 0.01^{ns}
4	0.119 ± 0.02^{ns}	0.096 ± 0.01^{ns}
5	0.142 ± 0.02^{ns}	0.128 ± 0.01^{ns}
6	0.196 ± 0.02^{ns}	0.171 ± 0.01^{ns}
7	0.256 ± 0.02^{ns}	0.208 ± 0.01^{ns}
8	0.295 ± 0.03^{ns}	0.240 ± 0.02^{ns}
9	0.354 ± 0.00^{ns}	0.275 ± 0.02^{ns}
10	0.364 ± 0.01^{a}	0.270 ± 0.03^{b}
11	0.295 ± 0.01^{ns}	0.218 ± 0.03^{ns}
12	0.218 ± 0.02^{a}	0.177 ± 0.02^{b}
13	0.106 ± 0.01^{ns}	0.107 ± 0.03^{ns}
14	0.048 ± 0.01^{ns}	0.065 ± 0.01^{ns}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\geq0.05$)

ตารางภาคผนวก 7 ผลของการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน (กรัมต่อลิตร)

		สูตรอาหารที่ 3	สูตรอาหารที่ 4
น้ำหนักเซลล์แห้ง	เริ่มการทดลอง	0.10 ± 0.000^{ns}	0.10 ± 0.00^{ns}
	ระหว่างการทดลอง	0.44 ± 0.03^{a}	0.30 ± 0.03^{b}
	สิ้นสุดการทดลอง	0.78 ± 0.05^{a}	0.63 ± 0.11^{b}

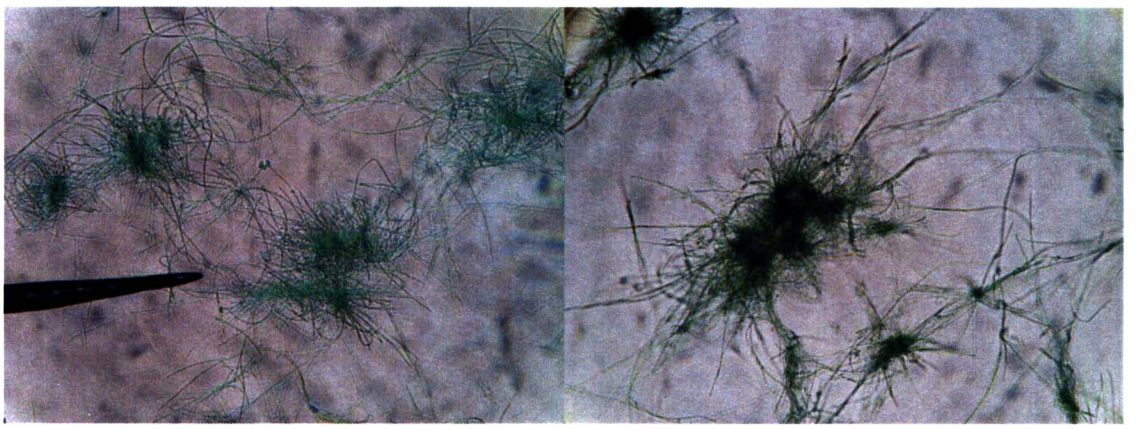
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\geq0.05$)

ตารางผนวก 8 ผลของคุณภาพน้ำทางกายภาพ และเคมี ของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน

		อุณหภูมิน้ำ (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)	DO (mg/l)	pH	NH_3-N (mg/l)	NO_3-N (mg/l)	PO_4-P (mg/l)
วันที่ 0	**สูตรที่ 3**	30.0±0.21^{ns}	30.5±0.00^{ns}	6.3±0.06^{ns}	10±0.00^{ns}	1.129±0.02^{a}	3.697±0.33^{a}	2.962±0.02^{a}
	สูตรที่ 4	29.8±0.40^{ns}	30.5±0.00^{ns}	6.2±0.06	10±0.00^{ns}	0.761±0.01^{b}	0.432±0.01^{b}	1.210±0.19^{b}
วันที่ 7	**สูตรที่ 3**	29.5±0.33^{ns}	30.5±0.00^{ns}	6.4±0.03^{ns}	9.3±0.12^{ns}	0.926±0.00^{a}	3.013±0.35^{a}	2.715±0.02^{a}
	สูตรที่ 4	29.0±0.30^{ns}	30.5±0.00^{ns}	6.4±0.06^{ns}	9.5±0.09^{ns}	0.457±0.07^{b}	0.206±0.01^{b}	0.899±0.11^{b}
วันที่ 14	**สูตรที่ 3**	28.3±0.17^{ns}	30.0±0.00^{ns}	6.6±0.09^{a}	8.9±0.09^{ns}	0.543±0.03^{a}	1.459±0.21^{a}	2.479±0.15^{a}
	สูตรที่ 4	28.2±0.17^{ns}	30.0±0.00^{ns}	6.8±0.06^{b}	8.7±0.09^{ns}	0.189±0.04^{b}	0.06±0.01^{b}	0.674±0.12^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

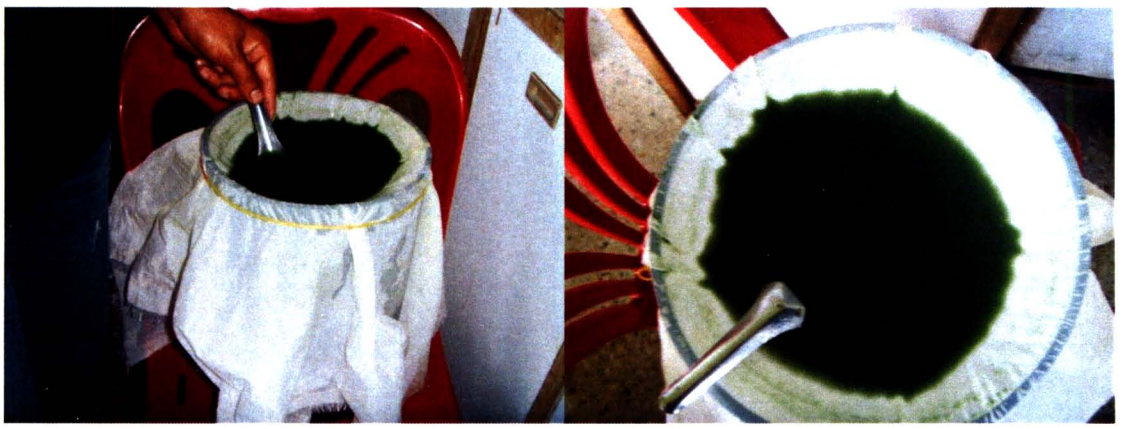
ภาคผนวก ข
ภาพผนวกปฏิบัติงานต่างๆ ในการวิจัย



ภาพผนวก 1 เซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

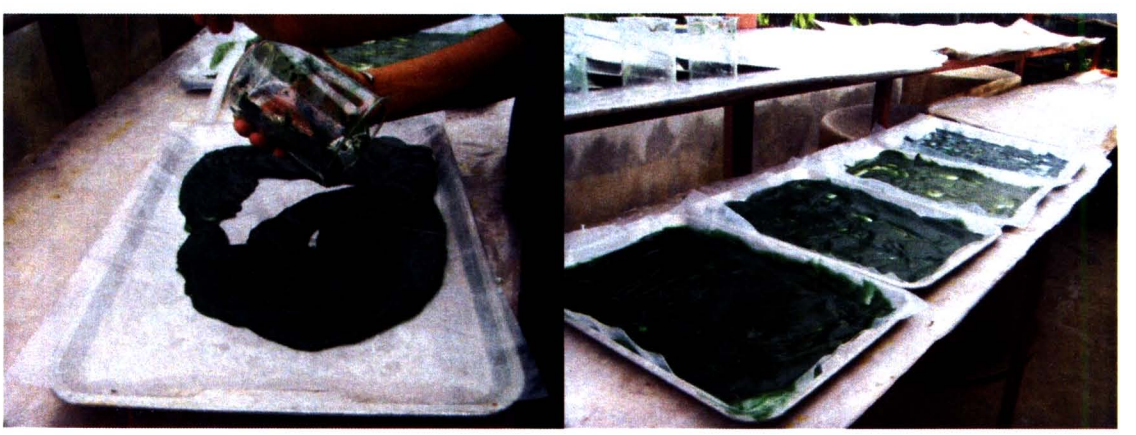
ภาพผนวก 2 หัวเชื้อสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

ภาพผนวก 3 สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โหลแก้วขนาด 10 ลิตร

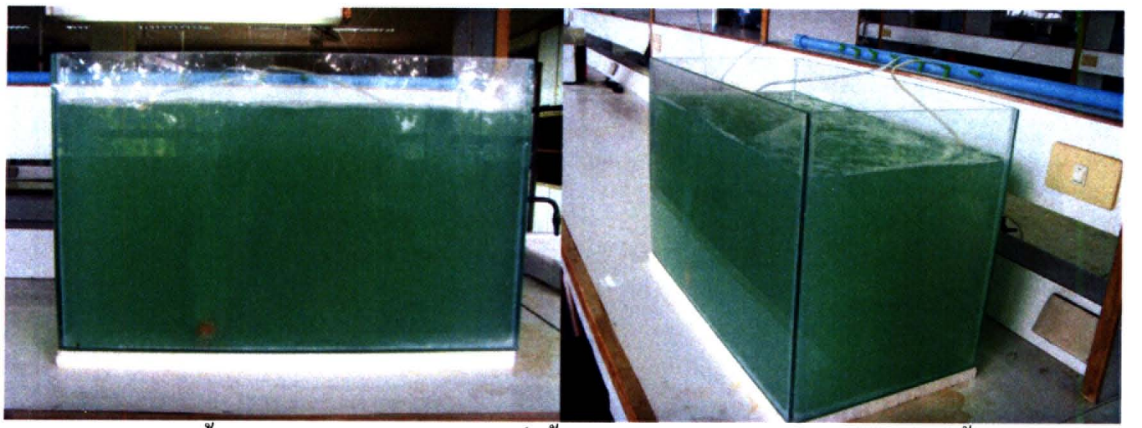


ภาพผนวก 4 การเก็บเกี่ยวผลผลิตสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ในห้องปฏิบัติการ

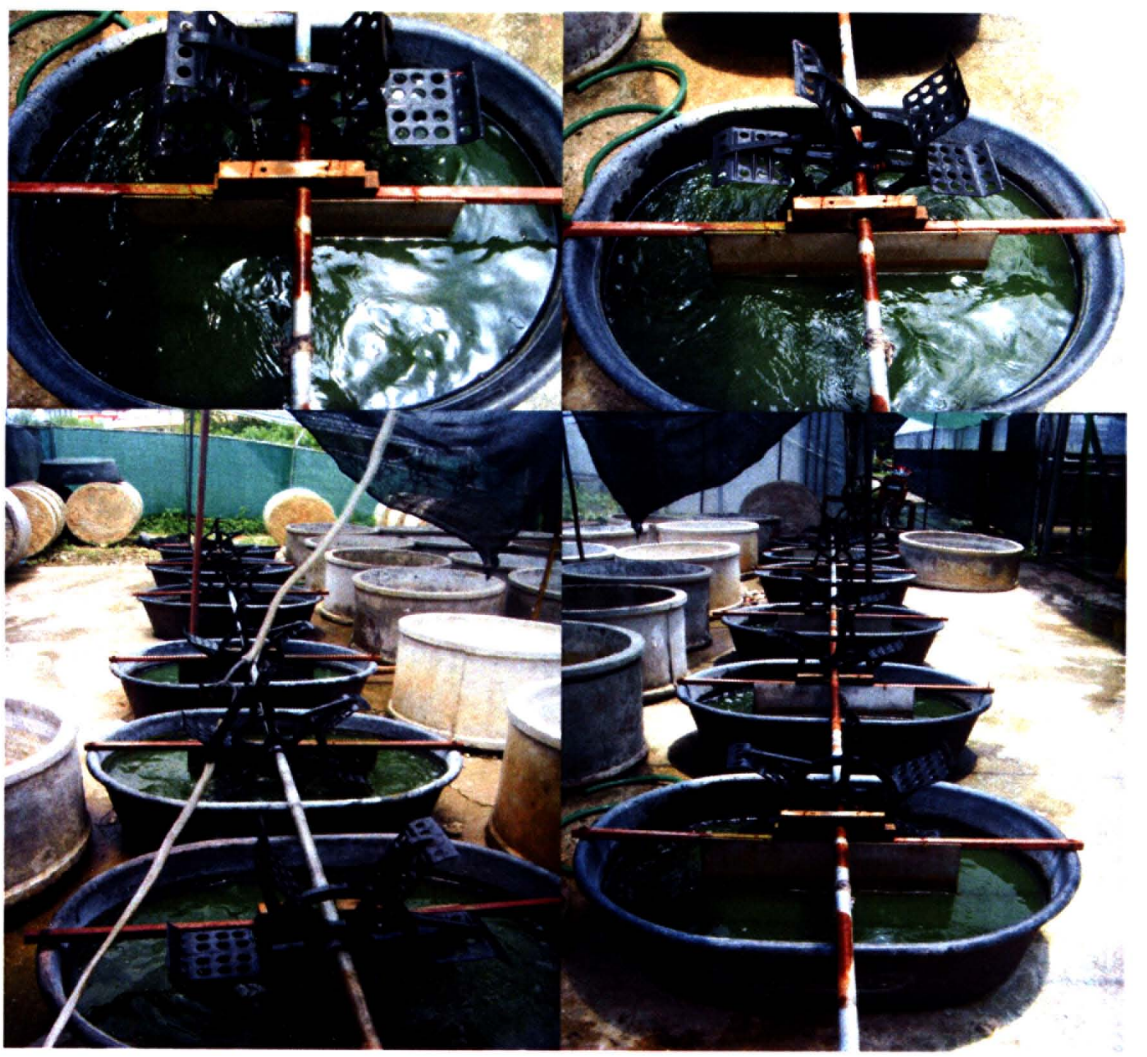
ภาพผนวก 5 ผลผลิตสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ในห้องปฏิบัติการ



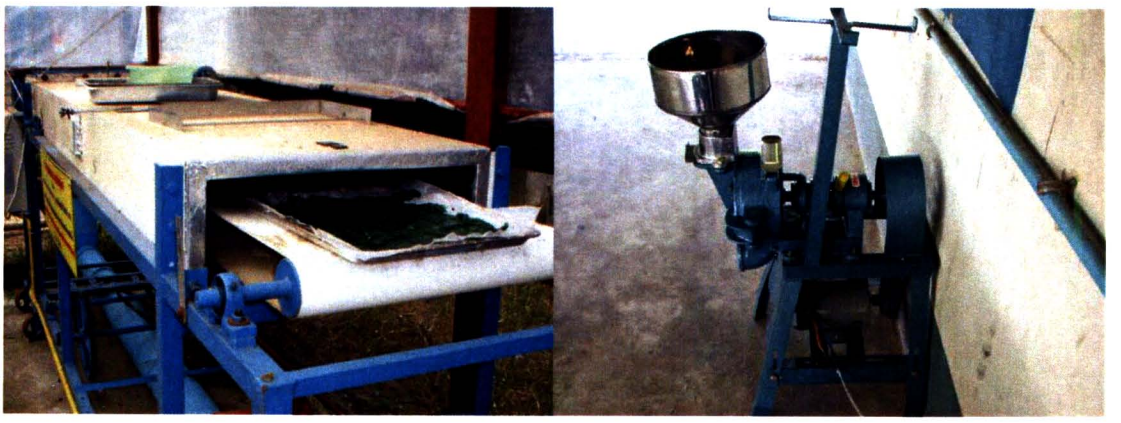
ภาพผนวก 6 การตากสาหร่าย *Oscillatoria* sp.



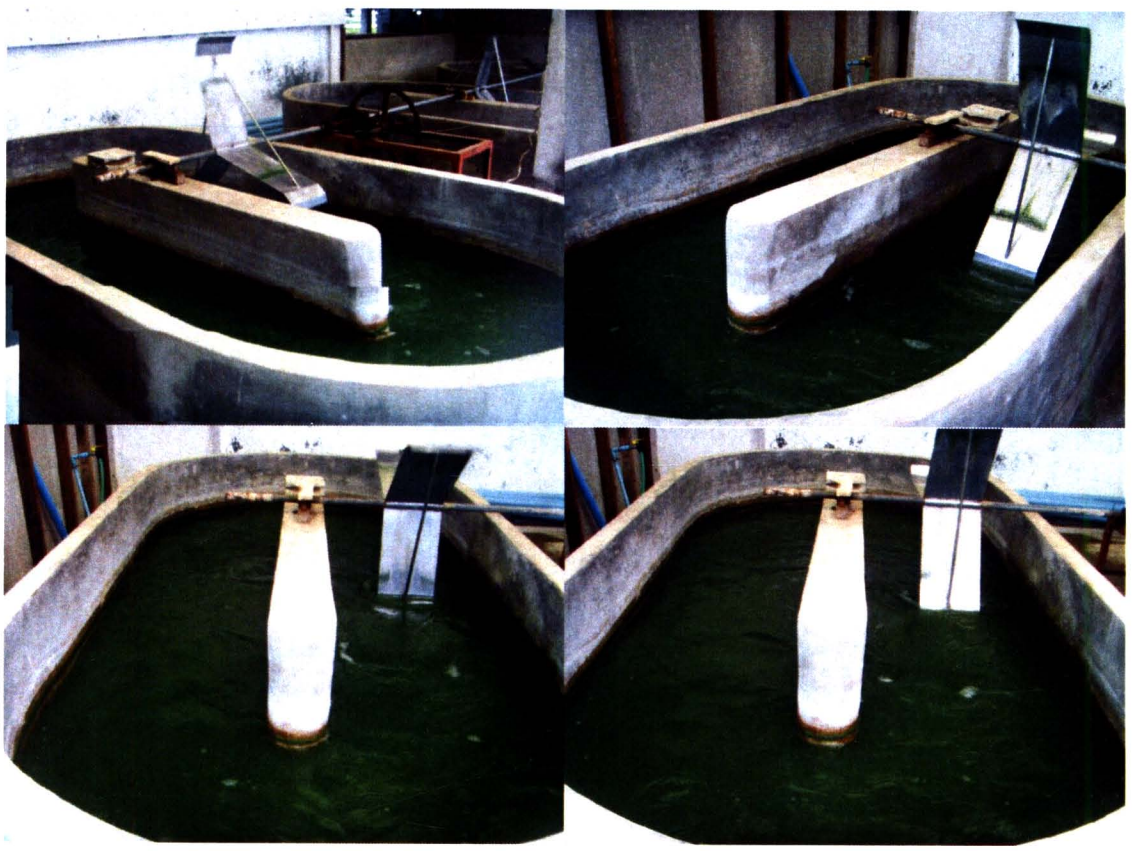
ภาพผนวก 7 หัวเชื้อสาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในตู้กระจก ขนาด 15 × 24 × 15 นิ้ว เพื่อนำไปทดลองในบ่อกลางแจ้ง



ภาพผนวก 8 สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในถังพลาสติกสีดำขนาด 500 ลิตร



ภาพผนวก 9 เครื่องอบสาหร่าย *Oscillatoria* sp. แบบ Tray dryer และเครื่องบดสาหร่าย



ภาพผนวก 10 สาหร่าย *Oscillatoria* sp. ที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ receway pond ขนาด 1.6 × 3.4 × 0.6 เมตร เพื่อเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved Oxygen; DO)

(สมศักดิ์ และสุฤทธิ์, ม.ป.ป.)

อุปกรณ์

1 ขวด BOD

2 อุปกรณ์ในการไตเตรต

3 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

สารเคมี

1 Manganous sulphate solution ($MnSO_4$)

ละลาย $MnSO_4.4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4.2H_2O$ 400 กรัม หรือ $MnSO_4.2H_2O$ 346 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

2 สารละลาย Alkali - iodide - reagent (AIA)

ละลาย NaN_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และเติม NaOH 480 กรัม และ NaI 750 กรัม ลงไป คนจนละลายจนหมดแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร (สารละลายที่ได้จะมีสีขาวขุ่นของโซเดียมคาร์บอเนต)

3 Sulfuric acid (H_2SO_4) เข้มข้น

4 Starch indicator

ละลายผงแป้ง (Soluble Starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มเพื่อให้ความร้อนคนจนกระทั่งใส แล้วเติม salicylic acid 0.2 กรัม หรือฟอร์มาลินลงไป 0.5 มิลลิลิตร (ใช้เป็นสารกันบูด)

5 Sodium thiosulfate solution ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)

ละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 6.025 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มให้เดือดแล้วทำให้เย็นจนได้ปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร เติม Chloroform ลงไป 2-3 หยด เพื่อเก็บรักษาไว้ได้นานหรือเติม NaOH 0.4 กรัม

วิธีการ

1 เก็บน้ำตัวอย่างในขวด BOD เติมสารละลาย $MnSO_4$ 1 มิลลิลิตร และ Alkali - iodide - azide regent (AIA) 3 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มใต้ผิวน้ำ ปิดจุกคว่ำขึ้นลงตั้งทิ้งให้ตกตะกอน

2 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1 - 2 มิลลิลิตร ปิดจุก คว่ำขึ้นลงจนตะกอนละลาย

3 ตวงสารละลายมา 100 มิลลิลิตร ไตเตรตกับสารละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 0.025 N จนสีของสารละลายจางลง จากนั้นเติมน้ำแป้ง 2 - 3 หยด สีสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน แล้วไตเตรทต่อจนสารละลายกลายเป็นสีใส

4 จดปริมาตรละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 0.025 N ที่ใช้ไป

5 คำนวณความเข้มข้น

ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) เท่ากับปริมาณของสารละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ ที่ใช้ไป × 2

การวิเคราะห์แอมโมเนีย ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen; NH_3 - N)

(สมศักดิ์ และสุฤทธิ์, ม.ป.ป.)

แอมโมเนียในแหล่งน้ำเกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายของสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ เช่น โปรตีน และจากการขับถ่ายของเสียของสัตว์น้ำ แอมโมเนียในแหล่งน้ำจะปรากฏ อยู่ 2 รูปแบบ คือ NH_3 (หรือ NH_4OH: unionized form) และ NH_4^+ (ionzed form) ซึ่งสัดส่วนระหว่าง NH_3 กับ NH_4^+ จะเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิของแหล่งน้ำ

แอมโมเนียในรูปของ unionized form (NH_3) ในปริมาณที่เข้มข้น จะเกิดโทษต่อสัตว์น้ำหลายอย่าง เช่น เกิดการระคายเคืองของเหงือก, รบกวนการหายใจ, การขับถ่ายของเสีย, pH ของเลือดสูง, รบกวนขบวนการบางอย่างของ enzyme บางตัว เป็นต้น ประกอบกัน เกณฑ์มาตรฐานของคุณภาพน้ำสำหรับสัตว์น้ำโดยทั่วไป ควรมีปริมาณ unionized แอมโมเนียไม่เกิน 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

อุปกรณ์

1 Spectrophotometer และ Cuvette

สารเคมี

1 Oxidizing solution

เตรียมสาร 10 มิลลิลิตร ของ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (5 เปอร์เซ็นต์ available cholrine) หรือใช้น้ำยาฟอกสี (bleach) เช่น ไฮเตอร์, คลอรอกซ์ ที่มีคลอรีนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับpH ของสารละลายให้อยู่ระหว่าง 6.5 - 7.0 ด้วยกรดเกลือ (HCI) สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่สัปดาห์

2 Rochelle salt solution

ละลาย Rochelle salt จำนวน 50 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้ม 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วจึงเติม Manganous sulphate ($MnSO_4$) 50 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนียให้ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3 Phenate solution

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.5 กรัม และ ฟีนอล (Phenol) 10 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนียให้ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

4 Standard Ammonium chloride solution

ชั่ง NH_4Cl ที่อบแห้ง 3.819 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนีย ให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแอมโมเนียมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นดูดสารละลายมาจำนวน 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 15 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแอมโมเนียมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใช้เป็น Standard Ammonium chloride solution)

วิธีการ

1 ดูดน้ำตัวอย่างที่กรองด้วยกระดาษกรอง โดยใช้ Volumetric pipet จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขณะเขย่าน้ำตัวอย่างในขวดรูปชมพู่ ให้เติมสารละลาย

2 Rochelle salt solution 1 หยด

3 Oxidizing solution 0.5 มิลลิลิตร

4 Phenate solution 0.6 มิลลิลิตร

5 ตั้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้สารละลายทำปฏิกิริยาเต็มที่ สีของสารละลายนี้จะคงตัวอยู่ได้หลายชั่วโมง

6 นำไปวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร (nm) ไว้ คือ เตรียม Reagent blank โดยใช้น้ำกลั่น และ Standard solution โดยใช้ Standard ammonia chloride (0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างละ 10 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำและเติมสารละลายใน

7 คำนวณปริมาณ Total ammonia - nitrogen ด้วยสมการ

$C_1 = A_1$ หรือ $C_2 = \frac{C_1 \ A_2}{A_1}$

$C_2 = A_2$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นของ Total ammonia - nitrogen ใน Standard solution (0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร)

C_2 = ความเข้มข้นของ Total ammonia - nitrogen ใน Sample

A_1 = ค่า Absorbance ของ Standard solution

A_2 = ค่า Absorbance ของ Sample

การวิเคราะห์ไนเตรท ไนโตรเจน (Nitrate nitrogen; NO_3 - N)

(ศิริเพ็ญ, 2543)

ไนโตรเจนส่วนใหญ่จะพบในรูปก๊าซ มีเพียงปริมาณน้อยที่พบในรูปของ NH_4^+, NO_3^-, NO_2^- และ $CO(NO)_2$ ถ้าแอมโมเนียมีปริมาณมากพอพืชจะนิยมดูดไปใช้มากกว่าไนเตรท เพราะถ้าพืชใช้ไนเตรทโดยตรง พืชจะต้องใช้เอนไซม์ Nitrate reductase มาช่วยเปลี่ยนให้แอมโมเนียก่อนจึงเอาไปใช้ได้

ไนเตรทเป็นสารประกอบของไนโตรเจนที่พบได้มากที่สุดในลำธารและทะเลสาบ ซึ่งปริมาณจะมากหรือน้อยขึ้นกับลักษณะและวิธีการใช้ดินทางการเกษตรกรรมของบริเวณแหล่งต้นน้ำ เนื่องจากไนเตรทเป็นสารประกอบที่สามารถถูกชะล้าง (leaching) ไปได้ง่ายเมื่อมีการไหลผ่านของน้ำไปบนพื้นดิน

อุปกรณ์

1 Spectrophotometer
2 ตาชั่งละเอียด
3 Volumetric flask 100 มิลลิลิตร
4 ขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร
5 ปิเปต
6 กระดาษกรอง Whatmann No.1, No.42

สารเคมี

1 Standard 0.02 N H_2SO_4

ทำ H_2SO_4 เข้มข้นให้เจือจางโดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\frac{20}{\text{Normality of stock } H_2SO_4} = \text{ml stock } H_2SO_4 \text{ ซึ่งจะใช้ในการเตรียม 1000 มิลลิลิตร ของ 0.02 N } H_2SO_4$$

2 Aluminium hydroxide ($Al(OH)_3$)

ละลาย $Al_2(OH_4)_3$ 125 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติม NH_4OH จนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ รินเอาสารละลายใสเก็บโดยการกรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ทำการคนและทำให้ตกตะกอน เพื่อกำจัดคลอไรด์ ไนเตรท และแอมโมเนีย

3 Standard silver sufate solution

ละลาย Ag_2SO_4(CP) 4.397 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

4 Phenoldisulfonic acid solution

ละลาย Phenol บริสุทธิ์ 25 กรัม ใน H_2SO_4 เข้มข้น 150 มิลลิลิตร และเติม Fuming H_2SO_4 75 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ Water bath

5 12 N NaOH

ละลาย NaOH 480 กรัม ในน้ำกลั่น และทำให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

6 Standard nitrate solution

ละลาย KNO_3(AR grade) 0.7216 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตราฐานของ ไนเตรทมา 50 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้งบน Water bath และเติม Phenoldisulfonic acid 2 มิลลิลิตร จนตะกอนเปียก ใช้แท่งแก้วบดให้ตะกอนเข้ากับกรดให้เปียกทั่วถึงและทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร = 10 ไมโครกรัม N = 44.26 ไมโครกรัม NO_3^-

วิธีการ

1 กรองน้ำ 70-75 มิลลิลิตร โดยใช้กระดาษกรอง Whatmann No.1 หรือ No.42

2 ใช้น้ำ 50 มิลลิลิตร มาระเหยให้แห้งบน Water bath (ถ้าไม่มีอาจใช้ hot plate ที่มีอุณหภูมิต่ำแทน)

3 เติม Phenoldisulfonic acid 1 มิลลิลิตร ลงบนตะกอนให้เปียกโดยทั่วถึง และทำให้เป็น 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4 เติม 12 N NaOH จนกระทั่งสารละลายเป็นสีเหลืองเต็มที่ แต่ไม่ควรใช้เกิน 5 - 6 มิลลิลิตร

5 กรองด้วยกระดาษกรอง rinse ภาชนะและกระดาษกรองและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6 นำไปวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร (nm)

7 คำนวณ

$$\text{มิลลิกรัมต่อลิตร N} = \frac{\text{A}}{\text{มิลลิลิตร ของตัวอย่างในข้อ 2}}$$

เมื่อ A = ไมโครกรัม NO_3-N ที่อ่านได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

หรือ มิลลิกรัมต่อลิตร NO_3^- = มิลลิกรัมต่อลิตร N × 4.427

8 ปิเปต 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิลิตร Standard KNO_3 และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม 12 N NaOH 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer พร้อมด้วย blank

การวิเคราะห์ออร์โธฟอสเฟต (Orthophosphate; PO_4-P)

(สมศักดิ์ และสุฤทธิ์, ม ป ป.)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุสำคัญชนิดหนึ่งต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในแหล่งน้ำ โดยปกติแหล่งน้ำตามธรรมชาติจะพบจะพบธาตุนี้ในปริมาณน้อยและนับเป็นปัจจัยที่สำคัญ ที่สำคัญที่สุดต่ออัตราผลผลิตทางชีวภาพ หรือเป็นปัจจัยจำกัดความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำในแง่ธาตุอาหารตามธรรมชาติ ฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำพบได้หลายรูปแบบ ทั้งในรูปของสารละลายและสารแขวนลอย ทั้งในรูปของสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ แต่ในที่สุดทุกรูปแบบจะสลายตัวไปอยู่ในรูปของออร์โธฟอสเฟต (Orthophosphate) ซึ่งเป็นรูปแบบของฟอสฟอรัสที่ใช้ในการวิเคราะห์หาได้โดยตรง ส่วนรูปแบบอื่นต้องทำการย่อยให้สลายตัวอยู่ในรูปของ orthophosphate ก่อนทำการวิเคราะห์

อุปกรณ์

1 Spectrophotometer และ Cuvette

สารเคมี

1 Ammonia Molybdate Solution

เตรียมสารละลาย Ammonia molybdate $(NH_4)_6 Mo_7.4H_2O$ จำนวน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 35 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าว เติมลงในสารละลายกรด H_2SO_4 (ละลายกรด H_2SO_4 56 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร

2 Stannous Chloride Solution

เตรียมสารละลาย Stannous Chloride ($SnCl_2.2H_2O$) จำนวน 2.5 กรัม ละลายใน Glycerol ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้อ่างน้ำร้อน (Water bath) ในการทำละลายสาร

3 Standard Phosphate Solution

เตรียมสารละลาย KH_2PO_4 จำนวน 0.2195 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1.000 มิลลิลิตร (ได้สารละลายเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร PO_4 - P)

4 ใช้ Volumetric pipet 50 มิลลิลิตร. ดูดสารละลาย Standard Phosphate Solution ที่ได้มา เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร (ได้สารละลายเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร PO_4 - P) เพื่อใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

วิธีการ

1 ดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 25 มิลลิลิตร ลงใน Beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร

2 เติมสารละลาย Ammonia Molybdate Soloution จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3 เติมสารละลาย Stannous Chloride Solution จำนวน 5 หยด เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 12 นาที

4 นำไปวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่คลื่น 690 นาโนเมตร (nm)

5 คำนวณค่าความเข้มข้นฟอสฟอรัส (Phosphorus) จากกราฟมาตรฐาน ทำการแปลงค่าความเข้มข้นออร์โธฟอสเฟต ฟอสฟอรัส (PO_4 - P) ให้เป็นออร์โธฟอสเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยคูณด้วย 3.06

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ และวัตถุสารสี (pigment)

การวิเคราะห์ความชื้น

(นิวุฒิ, 2549)

การหาความชื้น เป็นสิ่งจำเป็นมากเพื่อจะได้สามารถหาค่าตัวอย่างเปียก เมื่อคำนวณกลับมา การหาความชื้นนั้นทำได้หลายวิธีแต่ละวิธีที่ง่ายที่สุดคือ การทำให้แห้งซึ่งเป็นวิธีที่ใช้คำนวณหาปริมาณน้ำที่สูญเสียไป หลังจากที่ทำให้แห้งแล้ว ข้อเสีย ที่อาจเกิดขึ้นจากการทำวิธีนี้คือ

1 เป็นการยากที่จะทำให้แห้งสนิท

2 ที่อุณหภูมิหนึ่งขณะทำให้แห้ง อาจทำให้สารอาหารบางชนิดสูญสลายไปด้วย

3 สารอื่นๆ ที่ระเหยได้นอกจากนั้น จะสูญเสียไปด้วย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1 เตาอบแห้ง (Drying over)

2 ขวดชั่ง (Weighting bottle) หรือจานอลูมิเนียม (Aluminium dish)

3 โถอบแห้ง (Desiccator and silicagel)

4 คีม (Tong)

5 ตาชั่งไฟฟ้า (Analytical balance)

6 ช้อนตักสาร

วิธีการ

1 นำขวดชั่งไปอบจนได้น้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำเอามาชั่งและจดน้ำหนักไว้

2 ตักตัวอย่างอาหารใส่ขวดชั่ง ประมาณ 2-3 กรัม ชั่งน้ำหนักแล้วจกน้ำหนักไว้

3 นำขวดชั่งที่บรรจุตัวอย่างอาหาร ไปอบในตู้ที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในระหว่างอบจะต้องเปิดฝาขวดชั่ง

4 นำขวดชั่งออกจากตู้อบ แล้วนำไปใส่โถอบแห้งทิ้งไว้ให้เย็น ปิดฝาขวดชั่ง แล้วนำไปชั่งจดน้ำหนักไว้

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นทั้งหมด} = \frac{(\text{ก} - \text{ข}) \times 100}{\text{ค}}$$

เมื่อ ก. = น้ำหนักขวดชั่งรวมตัวอย่างก่อนอบแห้ง

ข. = น้ำหนักขวดรวมชั่งรวมตัวอย่างหลังอบแห้งจนได้น้ำหนักที่แน่นอน

ค. = น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

การวิเคราะห์เถ้า

(นิวุฒิ, 2549)

เถ้า หรือ Ash ปริมาณสารอินทรีย์ ที่มีอยู่ในอาหารหลังจากที่เผาผลาญ สารอินทรีย์หมดแล้ว ในการหามักจะใช้ความร้อนเผาผลาญสารอินทรีย์ ดังนั้น ค่าเถ้า หรือ Ash ที่ได้จึงจำเป็นต้องเท่ากับปริมาณสารเกลือแร่ ทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร ในตอนแรกเพราะสารอินทรีย์ หรือเกลือแร่บางส่วนจะสูญเสียไปโดยระเหยเพราะความร้อนสูงที่ใช้การเผานั่นเอง ค่าเถ้าที่ได้จึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของสารอาหารนั้นๆ

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1 ถ้วยกระเบื้อง (dish crucible)

2 โถอบแห้ง (Desiccator)

3 เตาเผา (Muffle furnace)

4 แผ่นความร้อน (Hot plate)

5 ตู้ควัน (Furne cupboard)

6 คีม (Tong)

7 ตาชั่งไฟฟ้า (Analytical balance)

8 ช้อนตักสาร

วิธีการ

1 นำถ้วยกระเบื้อง มาเขียนเลขกำกับตามลำดับของตัวอย่างอาหาร แล้วนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 - 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2 จากนั้น นำถ้วยกระเบื้องออกจากเตาเผา ตั้งทิ้งไว้บนแผ่นกระเบื้องเคลือบให้เย็นสักครู่ แล้วนำไปตั้งให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้

3 ตักตัวอย่างอาหารใส่ในถ้วยกระเบื้อง ประมาณ 2 - 3 กรัม แล้วชั่งน้ำหนัก และจดบันทึกไว้

4 นำถ้วยกระเบื้องพร้อมตัวอย่างไปเผาบนแผ่นความร้อนในตู้ควันจนกระทั้งหมดควัน

5 นำถ้วยกระเบื้องพร้อมตัวอย่างไปเผาต่อในเตาเผาที่มีอุณหภูมิ 550 - 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยประมาณจนเถ้าสีขาว แต่หากเถ้าที่ได้ยังไม่ขาว แสดงว่ายังมีคาร์บอนเหลืออยู่จะต้องนำถ้วยกระเบื้อง มาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นบนแผ่นกระเบื้องเคลือบ แล้วหยดสารละลายแอมโมเนียคาร์บอเนต 4-5 หยด ให้เถ้าชื้นนำเอาไประเหยให้แห้งบนแผ่นความร้อน แล้วนำไปเผาต่อจนได้เถ้าสีขาว นำถ้วยกระเบื้องออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่บนแผ่นกระเบื้องเคลือบ แล้วนำเอาไปตั้งทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง นำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เถ้า

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้าทั้งหมด} = \frac{(\text{ก} - \text{ข}) \times 100}{\text{ค}}$$

เมื่อ ก. = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมตัวอย่างหลังเผา

ข. = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังเผา

ค. = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์

การวิเคราะห์โปรตีน

(นิวุฒิ, 2549)

การวิเคราะห์โปรตีน ในอาหารทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ที่มีอยู่ในสารอาหารนั้น เนื่องจากไนโตรเจนในสารอาหารส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปโปรตีน โดยปกติในโปรตีนจะมีปริมาณของไนโตรเจนอยู่ประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น เมื่อทราบค่าไนโตรเจนแล้วคูณด้วย 6.25 จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหารที่วิเคราะห์

สารเคมี

1 สารเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วย

Anhydrous sodium sulfate ($NaSO_4$) : Anhydrous copper sulfate ($CuSO_4$) ในอัตรา 20:1 หรือ Anhydrous copper sulfate ($CuSO_4$) : Anhydrous potassium sulfate (K_2SO_4) ในอัตรา 20:1

2 Screened methyl red indicator

ละลาย Methyl red จำนวน 0.2 กรัม และ Methylene blue จำนวน 0.1 กรัม ใน Ethanol (96 เปอร์เซ็นต์) 100 มิลลิลิตร

3 สารละลาย NaOH 45 เปอร์เซ็นต์

ละลาย NaOH 450 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร

4 สารละลาย H_2SO_4 มาตรฐาน 1 นอร์มอล

5 สารละลาย NaOH มาตรฐาน 1 นอร์มอล

6 ลูกแก้ว

7 ก้อนสังกะสี

อุปกรณ์

1 Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร

2 เครื่องย่อยอาหาร

3 เครื่องกลั่น

4 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

5 ไปเปต ขนาด 50 มิลลิลิตร

6 กระบอกตวง ขนาด 25, 50 มิลลิลิตร

7 บิวเรตพร้อมขาตั้ง

8 เครื่องชั่ง

9 ขวดล้างพร้อมน้ำกลั่น

10 กระดาษกรอง

วิธีการ

1 ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรอง โดยใช้ตัวอย่างที่มีโปรตีนสูง 1 - 2 กรัม และใช้ตัวอย่างที่มีโปรตีนต่ำ 2 - 4 กรัม ห่อกระดาษกรองแล้วนำไปใส่ใน Kjeldahl flask (ทำ Blank ด้วย)

2 เติมสารเร่งปฏิกิริยา ประมาณ 2 กรัม แล้วลูกแก้ว 2 ลูก แล้วเติมสารละลาย H_2SO_4 จำนวน 25 มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกตวง แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3 นำเอา Kjeldahl flask ไปต่อเข้ากับเครื่องย่อยเปิดให้ความร้อนน้อยๆ ก่อนจนหยุดกระเด็น หลังจากนั้นจึงให้ความร้อนจนเดือด ระหว่างการย่อยให้การหมุน Kjeldahl flask เป็นครั้งคราว ทำการย่อยจนได้สารละลายสีใส

4 ปิดเครื่องให้ความร้อน แต่เปิดพัดลมดูดไว้ปล่อย Kjeldahl flask ไว้ให้เย็นหากบริเวณ ที่คอของ Kjeldahl flask มีจุดสีดำๆ เกาะติดอยู่ให้ใช้น้ำกลั่นล้างลงไป แล้วทำการย่อยต่อจนใส และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

5 เติมน้ำกลั่นลงไป 500 มิลลิลิตร

6 ใช้ไปเปทดูดสารละลาย H_2SO_4 มาตรฐาน 1 นอร์มอล จำนวน 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Screened methyl red indicator จำนวน 4 หยด แล้วนำเอาไปต่อเข้ากับปลายของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายของท่อกลั่นจุ่มอยู่ในสารละลาย เปิดน้ำให้ไหลผ่านเครื่องควบแน่นของเครื่องกลั่น

7 เติมสารละลาย NaOH 45 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร ใส่ใน Kjeldahl flask ที่ย่อยมาแล้วอย่างช้าๆ จากนั้นรีบนำ Kjeldahl flask ไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่นทันที และทำการเขย่าสารละลายให้เข้ากัน

8 ให้ความร้อนเครื่องกลั่นจนกระทั่ง แอมโมเนียถูกกลั่นออกประมาณ 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเลื่อนขวดชมพู่ออกจากปลายเครื่องกลั่น ให้ปลายท่อกลั่นอยู่เหนือสารละลายใช้ น้ำกลั่นล้างปลายท่อกลั่นเอาขวดรูปชมพู่ออก และเอาขวดรูปชมพู่ที่ใส่น้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร มาต่อเข้ากับปลายท่อกลั่นแทนแล้วปิดไฟฟ้าของเตาความร้อน

9 นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ ไปไตเตรทกับสารละลาย NaOH มาตรฐาน 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งเป็นสีกลาง (สีใส)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน

NaOH จำนวน 1 มิลลิลิตร มาตรฐาน 0.1 นอร์มอล ทำปฏิกิริยาได้พอดีกับไนโตรเจน 0.014 กรัม

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(\text{ข} - \text{ก}) \times 0.014 \times \text{ค} \times 100}{\text{ต}}$$

เมื่อ ก. มิลลิลิตรของ NaOH มาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายจากตัวอย่าง

ข. มิลลิลิตรของ NaOH มาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทสารละลายจาก Blank

ค. ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH มาตรฐานที่ใช้จริงๆ

ต. น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

เปอร์เซ็นต์ Crude protein = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน × 6.25

การวิเคราะห์ไขมัน

(นิวุฒิ, 2549)

Ether Extract คือ ส่วนที่สามารถละลายได้ใน Ether ซึ่งได้แก่ Fat, Oils, Waxes หรือพวก Carotene, Chlorophyll และ Sterol ในพืช นอก Ether แล้ว สารพวกนี้ยังสามารถละลายในตัวทำละลายที่เป็น Organic Solvent ตัวอื่นๆ ได้เช่น Alcohol, Choroform หรือ benzene เป็นต้น ดังนั้นจึงสามารถหา Ether Extract ได้โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายตัวใดตัวหนึ่ง และใช้ชุดอุปกรณ์ในการสกัดเรียกว่า Soxhlet Extract ต่อเข้าระบบเตาความร้อนและระบบน้ำ เพื่อช่วยให้เกิดการควบแน่น รวมทั้งชุดเรียกว่า Extraction Apparatus

สารเคมี

1 Petroleum ether หรือ Dichoromethane

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1 Soxhlet apparatus
2 Thimble
3 ตู้อบ
4 โถอบแห้ง
5 ขวดก้นแบน 250 มิลลิลิตร
6 สำลี
7 คีม (สำหรับจับขวดก้นแบน)
8 แผ่นความร้อน
9 ขาตั้งพร้อมที่ยึด

วิธีการ

1 นำขวดก้นแบนมาเขียนเรียงลำดับหลายเลขเสร็จแล้วนำไปเข้าตู้อบที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2 จากนั้น นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำไปชั่งและจดบันทึกไว้

3 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ถ้าเป็นปลาป่น ใช้ประมาณ 0.8 กรัม กากถั่วเหลือง ใช้ประมาณ 1.0 กรัม รำใช้ประมาณ 1.5 กรัม ปลายข้าวใช้ประมาณ 2.0 กรัม และอาหารใช้ประมาณ 1.0 - 2.0 กรัม บนกระดาษกรอง และจดน้ำหนักตัวอย่างไว้ ห่อตัวอย่างใส่ลง Thimble แล้วปิดด้วยสำลี

4 นำ Thimble ไปใส่ใน Soxhlet

5 ต่อ Soxhlet เข้ากับเครื่องควบแน่น

6 เติม Dichoromethane ลงในขวดกันแบน ประมาณ 2 ใน 3 ของขวด แล้วนำเอาไปต่อเข้ากับ Soxhlet และแผ่นความร้อน

7 เปิดน้ำผ่านเครื่องควบแน่น แล้วเปิดความร้อนของแผ่นความร้อน โดยเปิดความร้อนประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส ทำการสกัดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง (อยู่กับชนิดของตัวอย่าง)

8 ทำการถ่าย สารละลายออกจาก Soxhlet โดยให้เหลือสารละลาย ที่อยู่ในขวดก้นแบนน้อยที่สุด และทำการถอด Soxhlet ออกจากขวดก้นแบนและเครื่องควบแน่น จากนั้นตั้งทิ้งขวดก้นแบนบนแผ่นความร้อนจนเกือบแห้ง

9 นำขวดก้นแบนไปใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 4 ชั่วโมง แล้วนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{(\text{ก} - \text{ข}) \times 100}{\text{ต}}$$

เมื่อ ก = น้ำหนักขวดก้นแบน

ข = น้ำหนักขวดก้นแบนหลังจากสกัดไขมันและอบแห้ง

ต = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์เยื่อใย

(นิวุฒิ, 2549)

การหาเยื่อใยสามารถกระทำได้โดยการต้มตัวอย่างกับกรด H_2SO_4 ที่เข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 30 นาที เสร็จแล้วจึงกรอง ต่อมานำกากนั้นไปต้มด้วยด่าง NaOH ที่เข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาอีก 30 นาที นำกากที่เหลือไปเผาที่ 500 - 600 องศาเซลเซียส ส่วนที่หายไปคือเยื่อใยหยาบ ซึ่งประกอบด้วย Hemicellulose, Cellulose และ Lignin ค่าปริมาณเยื่อใยหยาบ ถ้าสูงมากแสดงว่าคุณค่าทางโภชนาการของอาหารนั้นต่ำ

สารเคมี

1 H_2SO_4 เข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์

โดยใช้กรด H_2SO_4 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2 NaOH เข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์

โดยใช้ด่าง NaOH 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3 แอลกอฮอล์

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1 เครื่องย่อยหาเยื่อใย

2 ผ้ากรอง (ผ้าลินิน)

3 Crucible

4 บีคเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร

5 โถอบแห้ง

6 เตาเผา

7 กรวยกรอง (Buchner funnel)

8 เครื่องดูดสุญญากาศ

9 ตู้อบ

วิธีการ

1 นำตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ไขมันมา แล้วชั่งให้ได้จำนวนที่แน่นอนประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีคเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร แล้วทำเครื่องหมายไว้ที่ระดับ 200 มิลลิลิตร

2 เติม H_2SO_4 1.25 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 200 มิลลิลิตร แล้วนำเอาไปต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น ของเครื่องควบแน่น ของเครื่องย่อยแล้วต้มให้เดือด ถ้ามีฟองเกิดขึ้นให้เติม Antifoam 1 หยด ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที

3 นำไปกรองตะกอนด้วยผ้าลินิน บน Buchner funnel ที่ต่อกับขวดกรอง แล้วเครื่องดูดสุญญากาศ ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นร้อนจนหมดกรด

4 ถ่ายตะกอนใส่ในบีคเกอร์ใบเดิม เติม NaOH 1.25 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 200 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับเครื่องควบแน่น ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที

5 นำไปกรองด้วยผ้าลินินผืนเดิม บน Buchner funnel ที่ต่อกับขวดกรอง แล้วเครื่องดูดสุญญากาศ ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นร้อนจนหมดด่าง

6 ล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ประมาณ 20 - 25 มิลลิลิตร

7 ถ่ายตะกอนใส่ใน Crucible แล้วนำไปอบไล่ความชื้นให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8 นำ Crucible ออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้

9 นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600±15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่บนกระเบื้องเคลือบ และนำไปไว้ในโถอบแห้งทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เยื่อใย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เยื่อใย} = \frac{(\text{ก} - \text{ข}) \times 100}{\text{ค}}$$

เมื่อ ก = น้ำหนักของ Crucible หลังย่อยและอบแห้ง

ข = น้ำหนักของ Crucible หลังเผา

ค = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรก)

(นิวุฒิ, 2549)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรก)

เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรก) = 100 - ช - ถ - ป -ข - ย

เมื่อ ช. เปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างอาหาร

ถ. เปอร์เซ็นต์เถ้าของตัวอย่างอาหาร

ป. เปอร์เซ็นต์โปรตีนของตัวอย่างอาหาร

ข. เปอร์เซ็นต์ไขมันของตัวอย่างอาหาร

ย. เปอร์เซ็นต์เยื่อใยของตัวอย่างอาหาร

การวิเคราะห์กรดไขมัน

(AOAC, 2001)

หลักการ

ไขมันและกรดไขมันจะถูกสกัดจาอาหารโดยวิธี hydrolysis method โดยการเติม pyrogallic acid เพื่อย่อยกรดไขมันให้มีขนาดเล็กในระหว่างการวิเคราะห์ มีการเติม triglyceride, triundecanoin ($C_{11:0}$) เพื่อเป็น internal standard ไขมันจะสกัดด้วย ether fatty acid methyl esters (FAMEs) จะถูก methylate โดยการใช้ BF_3 ใน methanol วัดปริมาณ FAMEs โดย capillary gas chromatography (GC) against $C_{11:0}$ internal standard ไขมันรวมจะถูกคำนวณเป็นผลรวมของกรดไขมันแต่ละชนิด โดยแสดงเป็น triglyceride equivalents saturated fats และ monounsaturated fats จะคำนวณเป็นผลรวมของกรดไขในแต่ละตัว monosaturated fat จะรวมอยู่ในรูป *cis*

เครื่องมือ

1 Gas chromatography มี hydrogen flame ionization detector capillary column หัวฉีดแบบแยก, เตาอบกำหนดอุณหภูมิแบบ hold-ramp-hold sequence สภาวะการทำงาน: injection prot 250 องศาเซลเซียส; FID Detector 250 องศาเซลเซียส; internal temp. 140 องศาเซลเซียส; hold 5 นาที increase temp 3 องศาเซลเซียสต่อนาที -250 องศาเซลเซียส; hold 17 นาที; carrier gas, helium: อัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที; split ratio 200: 1; run time 55 นาที

2 capillary column: Sepelco SP-2560

3 Mojonnier flasks

4 จุกปิด: ยางสังเคราะห์หรือไม้ก๊อก

5 Mojonnier centrifuge basket

6 Hengar micro boiling granules

7 Baskets: อะลูมิเนียมและพลาสติก

8 shaker water bath: อยู่ที่อุณหภูมิ 70 - 80 องศาเซลเซียส

9 Steam bath: ทำด้วยเครื่องแก้ว

10 Water bath: ที่ให้ nitrogen stream อยู่ที่อุณหภูมิ 40±5 องศาเซลเซียส

11 Wrist action shaker: ออกแบบสำหรับ Mojonnier centrifuge basket

12 Mojonnier motor driven centrifuge

13 เตาอบลมร้อน: อยู่ที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส

14 Vortex mixer

15 Gas dispersion tubes: 25 มิลลิเมตร ความพรุน "A" หยาบพิเศษ 175 ไมโครเมตร

16 ขวดแก้วขนาด 3 dram: ประมาณ 11 มิลลิลิตร

17 ฝาปิดขวด: ทำด้วย polyvinyl liner ขนาดพอดีกับขวด

18 Teflon/silicone septa: ขนาดพอดีกับขวด

สารเคมี

1 Pyrogallic acid

2 Hydrochloric acid: 12M และ 8.3M การทำ 8.3M HCl, เติม 12M HCl 250 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำ 110 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 - 25 องศาเซลเซียส)

3 Ammonium hydroxide: 58 เปอร์เซ็นต์ (w/w)

4 Diethyl ether: บริสุทธิ์สำหรับสกัดไขมัน

5 Petroleum ether: ปราศจากน้ำ

6 Ethanol: 95% เปอร์เซ็นต์ (v/v)

7 Toluene: nanograde

8 Chloroform

9 Sodium sulfate: ปราศจากน้ำ

10 Boron trifluoride reagent: 7%BF_3 (w/w) ใน methanol, เกิดจาก 14 เปอร์เซ็นต์ BF_3 solution ซึ่งเตรียมใน hood

11 Diethyl ether-petroleum ether mixture 1±1 (v/v)

12 Triglyceride internal standard solution-$C_{11:0}$-triundecanoin

13 Fatty acid methyl esters (FAMEs) standard solutions.

13.1 Mixed FAMEs standard solution C11:0 FAME standard solution

13.2 C11:0-Undecanoic methyl ester ใน hexane.

13.3 FAME standard solution แต่ละชนิด

การสกัดไขมัน

1 บดตัวอย่างให้ละเอียดและทำให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนทำการสกัดไขมัน

2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างและบดตัวอย่างให้ละเอียดใส่ใน mojonnier flask ที่มีการ labelไว้

3 เติม Pyrogallic acid ca 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ triglyceride internal standard solution 2.0 มิลลิลิตร เติม boiling granules 2-3 เม็ดใส่ใน flask เติม ethanol 2.0 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน

4 เติมน้ำ 4.0 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน เติม ammonium hydroxide 2.0 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ใส่ flask วางใน shaker water bath ที่ 70 - 80 องศาเซลเซียส เซตความเร็วให้มีการเขย่าพอประมาณ เป็นเวลา 10 นาที

5 นำ flask ไปใส่ vortex mixer ทุก 5 นาที หลังจากการย่อย เอา flask ออกจาก water bath และเติม phenolphthalein 2 หยด เก็บสารละลาย(สีชมพู) ด้วยการเติม ammonium hydroxide เติม ethanol ให้เต็มก้น flaskและเขย่าให้ผสมกันเบาๆ

6 การสกัดเติม diethyl ether 25 มิลลิลิตร ใน mojonnier flask ที่มีตัวอย่างก่อนหน้า ปิดจุก flask แล้วนำไปวางไว้ใน centrifuge basket แล้วนำ basket ไปวางใส่ใน wrist action shaker, shake flask 5 นาที ล้างจุกปิดด้วย diethyl ether-petroleum ether mixture ใส่ใน flask

7 เติม petroleum ether 5 มิลลิลิตร ปิดจุก flask แล้ว shake 5 นาที แล้วนำ flask ไป centrifuge ที่ 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างจุกปิดด้วย diethyl ether-petroleum ether mixture

8 ใส่ใน flask เทชั้น ether (ส่วนบน) เบาๆ อย่างให้ขุ่นใน บิคเกอร์ 150 มิลลิลิตร และล้างขอบปาก flask อย่างระวังด้วย diethyl ether-petroleum ether mixture ใส่ในบีคเกอร์ ให้ ether ระเหยช้าๆ บน steam bath โดยการใช้ nitrogen stream เพื่อเร่งการระเหย ส่วนที่เหลือในบิคเกอร์จะเป็นส่วนของไขมันที่ถูกสกัดได้

Methylation (ปฏิกิริยาการเติมหมู่ methyl เข้าไปในโมเลกุล)

ไขมันที่เหลือที่สกัดได้จะถูกละลายใน chloroform 2-3 มิลลิลิตร และ diethyl ether 2-3 มิลลิลิตร จะนำส่วนผสมที่ได้ใส่ในขวดแก้วขนาด 3 dram และต่อมาจะทำการระเหยเพื่อให้แห้งสนิทใน water bath ที่ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ nitrogen stream เติม BF_3 reagent และ toluene 1.0 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยฝาปิดขวดที่มี Teflon/silicone septa นำขวดไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที shake ขวดเบาๆ ทุกๆ 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง(20 - 25 องศาเซลเซียส) แล้วเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร hexane 1.0 มิลลิลิตร และ Na_2SO_4 ca 1.0 กรัม ปิดขวดและ shake 1นาที ซึ่งจะเกิดชั้นขึ้นหลังจากนั้นเทชั้นบนที่มี Na_2SO_4 ca 1.0 กรัม ใส่ในภาชนะ (หมายเหตุ: ชั้นบนจะมี FAMEs ซึ่งประกอบด้วย FAME ของ triglyceride internal standard solution) ฉีด FAMEs ไปบน GC column หรือย้ายไปที่ autosampler vial สำหรับการวิเคราะห์ GC

การวิเคราะห์ GC

Relative retention time (เปรียบเทียบกับ FAME ของ triglyceride internal standard solution) และความสามารถในการตอบสนองต่อปัจจัยของ FAMEs แต่ละชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ GC ของ FAME standard solution แต่ละชนิด โดยฉีด FAME standard solution แต่ละชนิด ca 2 ไมโครลิตร และ FAMEs standard solution ที่ผสมกัน 2 ไมโครลิตร ใช้ FAMEs standard solution ที่ผสมกันเพื่อการตอบสนองของ chromatographic ให้เหมาะสมก่อนการฉีดทดสอบสารละลายใดๆ หลังจากการควบคุมสภาวะ chromatographic ที่เหมาะสม จะฉีดสารละลายทดสอบที่ได้จากการ methylation

การคำนวณ

1 ไขมันทั้งหมดจะเป็นผลรวมของกรดไขมันจากทุกแหล่ง ซึ่งแสดงเป็น triglycerides กรดไขมันจะถูกคำนวณเป็น triglyceride ของกรดไขมันแต่ละตัวที่มี glycerol

2 การคำนวณ retention time สำหรับแต่ละ FAME ใน FAMEs standard solution แต่ละชนิด โดยการลบ retention time ของ $C_{11:0}$ peak จาก retention time ของ fatty acid peak ใช้ retention time เหล่านี้เพื่อระบุ FAMEs ที่รวมกันใน FAMEs standard solution ใช้การเพิ่ม FAME solution (จากตำแหน่งเดียวกัน) เมื่อต้องการสำหรับการระบุ FAME ที่เป็นลักษะจริง

3 การคำนวณปัจจัยการตอบสนอง(R_i) สำหรับแต่ละกรดไขมัน i

$$R_i = \frac{Ps_i \times W_{C11:0}}{Ps_{C11:0} W_i}$$

เมื่อ Ps_i = peak area ของกรดไขมันแต่ละชนิดใน FAMEs standard solution ที่ผสมกัน; $Ps_{C11:0}$ = peak area ของ $C_{11:0}$ fatty acid ใน FAMEs standard solution ที่ผสมกัน; $W_{C11:0}$ = น้ำหนักของ internal standard ใน FAMEs standard solution ที่ผสมกัน; และ W_i = น้ำหนักของ FAME แต่ละชนิดใน FAMEs standard solution ที่ผสมกัน

4 การคำนวณปริมาณของแต่ละชนิด (triglycerides) (W_{TG}) ในส่วนทดสอบ

$$W_{FAMEi} = \frac{Pt_i \times Wt_{C11:0} \times 1.0067}{Pt_{C11:0} \times R_i}$$

$$W_{TGi} = W_{FAMEi} \times f_{TGi}$$

เมื่อ Pt_i = peak area ของกรดไขมัน i ในส่วนทดสอบ; $Wt_{c11:0}$ = น้ำหนักของ $C_{11:0}$ internal standard ซึ่งถูกเติมที่ส่วนทดสอบ (กรัม); 1.0067 = การเปลี่ยนแปลงของ internal standard จาก triglycerides เป็น FAME; $Pt_{C11:0}$ = peak area ของ $C_{11:0}$ internal standard ในส่วนทดสอบ

และ f_{TGi} = ปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสำหรับ FAMEs เป็น triglycerides สำหรับกรดไขมันแต่ละชนิด

5 การคำนวณปริมาณของไขมันรวมในส่วนทดสอบ (ผลรวมของกรดไขมันทั้งหมด; ที่แสดงเป็น triglycerides [ประกอบด้วยรูป *cis* และ *trans* ของ monounsaturated acids])

Total fat เปอร์เซ็นต์ = ($\sum WD_{TG}$ / $W_{test\ portion}$)

เมื่อ $W_{test\ portion}$ = น้ำหนักของส่วนทดสอบ (กรัม)

5.1 การคำนวณปริมาณของแต่ละกรดไขมัน (W_i)

$$W_i = W_{FAMEi} \times f_{TGi}$$

เมื่อ f_{TGi} = ปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสำหรับการเปลี่ยนแปลง FAMEs ที่สอดคล้องกับกรดไขมัน

5.2 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ saturated fat ในส่วนทดสอบ (w/w; แสดงเป็น saturated fatty acids; ผลรวมของ $C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$ เป็นต้น)

Saturated fat เปอร์เซ็นต์ = ($\sum$saturated W_i / $W_{test\ portion}$) × 100 เปอร์เซ็นต์

5.3 การคำนวณปริมาณของ monounsaturated fat ในส่วนทดสอบ (w/w; แสดงเป็นผลรวมในรูป *cis* เท่านั้นของ monounsaturated fatty acids[$C_{16:1}$, $C_{17:1}$, $C_{18:1}$ *cis*, $C_{20:1}$ เป็นต้น])

Monounsaturated fat เปอร์เซ็นต์ = ($\sum$ monounsaturated W_i / $W_{test\ portion}$) × 100 เปอร์เซ็นต์

Polyunsaturated fat เปอร์เซ็นต์ = ($\sum$ monounsaturated W_i / $W_{test\ portion}$) × 100 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม

(Sommer *et al.*, 1992)

1 ใส่สาร่ายแห้งปริมาณ 0.02 กรัม ลงในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

2 เติม 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม 60 เปอร์เซ็นต์ KOH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อตึงเซลล์สาหร่ายจากนั้นนำไปให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator นาน 5 นาที

3 นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำการสกัดเอารงควัตถุออกจากเซลล์ แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วนเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายสีเหลืองที่ได้ใส่ในหลอดทดลองหุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์ เพื่อป้องกันการถูกละลายจากแสง

4 เทสารละลายสีเหลืองที่ได้ลง Kjeldahl flask เติม Diethyl Ether ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ 9 เปอร์เซ็นต์ NaCl ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นสีใสและสีเหลือง โดนที่สารละลายสีใสจะอยู่ชั้นล่าง

5 ใช้ปิเปตดูดเอาสารละลายสีใสทิ้งไป เหลือแต่ชั้นสีเหลืองของแคโรทีนอยด์ แล้วเติม 9 เปอร์เซ็นต์ NaCl ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นสีใสและสีเหลือง จากนั้นใช้ ปิเปตดูดเอาสารละลายสีใสที่อยู่ชั้นล่างทิ้งไป

6 นำสารละลายสีเหลืองใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Diethyl Ether จนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Sodium sulphate anhydrous เพื่อเป็นการกำจัดน้ำที่เหลือแล้วเทลงหลอดทดลองที่หุ้มด้วย กระดาษฟลอยด์เพื่อป้องกันการถูกทำลายด้วยแสง

7 นำสารละลายสีเหลืองที่สกัดได้ ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วบันทึกผล

8 คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์จากสูตร

ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง) = $\frac{A_{450} \times 25 \times 1000}{260 \times \text{มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง}}$

การวิเคราะห์หาปริมาณ C - Phycocyanin

(ดัดแปลงจากวิธีของ Silveira *et al.*, 2007)

1 ชั่งน้ำหนักแห้งของสาหร่ายผง 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

2 เติม Sodium phosphate buffer (Na_2HPO_4) 10 มิลิโมล ปรับ pH 7 กับ Sodium azide ($NaNO_3^-$) 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.005 กรัม) คนให้เข้ากัน

3 จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator นาน 5 นาที

4 นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการสกัดเอารงควัตถุออกจากเซลล์

5 นำไป vortex เพื่อให้เซลล์ผสมกันดี เก็บไว้ในตู้เย็นตลอดทั้งคืนที่ 4 องศาเซลเซียส

6 นำไป Centrifuge 10 นาที ที่ 3,500 รอบต่อนาที ดูดตะกอนที่อยู่ด้านล่างทิ้ง นำไปวัดค่า absorbency ที่ความยาวคลื่นที่ 615 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ 652 นาโนเมตร โดยใช้ Sodium phosphate buffer เป็น Blank นำไปคำนวณปริมาณสาร C - Phycocyanin แล้วบันทึกผล

7 คำนวณปริมาณ C - Phycocyanin จากสูตร

ปริมาณสาร C - Phycocyanin (มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ของน้ำหนักแห้ง)

$$PC = \frac{(OD_{615} - 0.474\ (OD_{652}))}{5.34}$$

8 นำไปวัดค่า absorbency ที่ความยาวคลื่นที่ 615 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร แล้วบันทึกผล

9 คำนวณความบริสุทธิ์ของสาร C - Phycocyanin จากสูตร

ความบริสุทธิ์ของสาร C - Phycocyanin (มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ของน้ำหนักแห้ง)

$$EP = \frac{OD_{615}}{OD_{280}}$$

การคำนวณหาความบริสุทธิ์ของการสกัด C - Phycocyanin

$$\text{ความบริสุทธิ์} = \frac{PC \times V}{DB}$$

เมื่อ V = ปริมาณของสารละลาย (มิลลิลิตร)

DB = น้ำหนักแห้งของสาหร่าย (กรัม)

การวิเคราะห์หาปริมาณ ß-carotene

(Britton, 2005)

การสกัดแคโรทีนอยด์

1 ชั่งน้ำหนักสาหร่าย 5 กรัม และบดตัวอย่างด้วยเครื่อง sonicator นาน 5 นาที สกัดแคโรทีนอยด์ ด้วยอะซิโตน 5 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที

2 นำไป Centrifuge 10 นาที ที่ 3,500 รอบต่อนาที ทำซ้ำ 3 - 4 ครั้ง

3 ระเหยอะซิโตน และปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร

4 การวิเคราะห์ ß-carotene ด้วยวิธี HPLC mobile phase : methanol:chloroform (80:20) flow rate was 1.0 มิลลิลิตรต่อวินาที

5 นำไปวัดค่า absorbency ที่ความยาวคลื่นที่ 456 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer UV-Vis

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ปริมาณไมโครซิลติน (Microcystin)

การวิเคราะห์ปริมาณไมโครซิลติน (Microcystin)

(ดัดแปลงจากวิธีของ Harri *et al.*, 2005)

1 นำตัวอย่างสาหร่าย ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม แล้วเติม 100 เปอร์เซ็นต์ Methanol จำนวน 10 มิลลิลิตร บดตัวอย่างด้วยเครื่อง sonicator นาน 10 นาที

2 นำไป Centrifuge 10 นาที ที่ 3,500 รอบต่อนาที กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง GF/C

3 ระเหยแอลกอฮอล์ และปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร

4 การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน (microcystin) ด้วยวิธี HPLC คอลัมน์ชื่อ BDS C18 mobile phase : Buffer:ACN (Acetonitrile) (80:20) flow rate was 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับปริมาตรด้วย เมทานอล 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5 นำไปวัดค่า absorbency ที่ความยาวคลื่นที่ 238 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer UV-Vis

ภาคผนวก ฉ
ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล นายชำนิ ด้วงเทพ

เกิดเมื่อ 3 พฤษภาคม 2527

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2545 ประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช

พ.ศ. 2547 ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (ปวส.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ไสใหญ่) จังหวัดนครศรีธรรมราช

พ.ศ. 2549 ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่