หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกและจำแนกสาหร่าย *Chlorella* sp. B.K.1 จากแหล่งน้ำจืด

1.1 การแยกสาหร่าย *Chlorella* sp. B.K.1 จากการเก็บตัวอย่างน้ำจืดจากแหล่งน้ำจืดต่างๆในกรุงเทพมหานครพบว่าสามารถแยกสาหร่ายที่มีลักษณะคล้าย *Chlorella* sp. จากแหล่งน้ำต่างๆได้ 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9. แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่เก็บได้

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
1.สระน้ำข้างเรือนต้นไม้ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	1
3.สระน้ำบริเวณ พุทธมณฑล	1
4.สระน้ำบริเวณสวนลุมพินี	1

เมื่อนำสาหร่าย *Chlorella* sp. จากน้ำทั้ง 3 ตัวอย่างมาแยกเพื่อให้เป็นยูนิอัลกัลโคโลนี โดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวๆของสาหร่ายและนำมาแยกบนอาหารแข็งหลายๆครั้ง พบว่าเหลือเพียงสายพันธุ์เดียว คือสายพันธุ์ที่แยกได้จากสระน้ำข้างเรือนต้นไม้ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาหร่ายที่แยกได้เมื่อศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา (รูปที่ 8) พบว่ามีรูปร่างรีค่อนข้างกลม สีเขียว เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่เคลื่อนที่ เซลล์ที่แบ่งตัวจากเซลล์แม่จะมีผนังเซลล์ใหม่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีหนามรอบตัว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-7.5 ไมครอน และเมื่อ

1.2 การจำแนกสกุลของสาหร่ายที่แยกได้ จากการจำแนกสาหร่ายตาม key ที่รายงานใน Bold และ Wynne พบว่าสาหร่ายที่แยกได้อยู่ในสกุล Chlorella

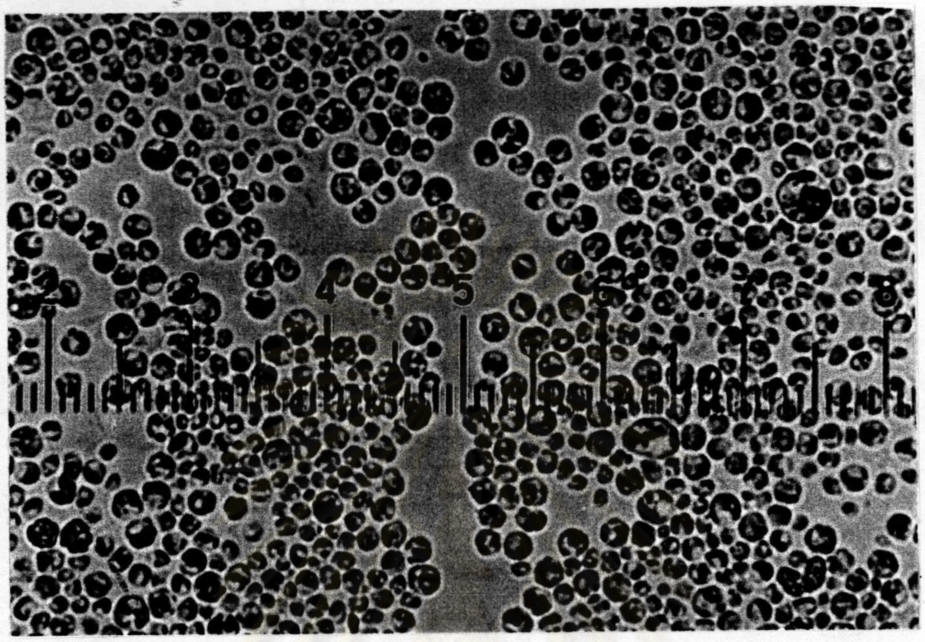
1.3 Japan Dairy Technical Association ยืนยันว่า สาหร่ายที่แยกได้อยู่ในสกุล Chlorella (ภาคผนวก ง)

1.4 การจำแนกชนิดของ Chlorella ที่แยกได้ จากการจำแนกสาหร่ายตาม key ของ Pascher (Nakamura, 1981a) พบว่าสาหร่ายที่แยกได้น่าจะเป็น Chlorella ellipsoidea โดยมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันเมื่อศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในตารางที่ 10 แต่เนื่องจากในการจำแนกชื่อให้ถูกต้องแน่นอน ต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เพื่อป้องกันการผิดพลาดจึงใช้เรียกชื่อ Chlorella sp. B.K.1 นำ Chlorella sp. B.K.1 ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ Chlorella ellipsoidea และ Chlorella sp. B.K.1

Chlorella ellipsoidea	Chlorella sp. B.K.1
เซลล์รีค่อนข้างกลม	เซลล์รีค่อนข้างกลม
ผนังเซลล์หนา	ผนังเซลล์ไม่สามารถบ่งได้ชัดเจน
คลอโรพลาสกระจายเล็กน้อย	คลอโรพลาสกระจายเล็กน้อย
เส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 ไมครอน	เส้นผ่าศูนย์กลาง 5- 7.5 ไมครอน
สร้างออโตสปอร์ 4-8 เซลล์	สร้างออโตสปอร์ 4-8 เซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



H = 2.5 ไมครอน

รูปที่ 8. แสดงลักษณะเซลล์ของ <u>Chlorella</u> sp.สายพันธุ์ B.K.1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการเจริญของ</u> <u>*Chlorella*</u> <u>sp. B.K.1</u>

จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราในการให้อากาศ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะเพิ่มขึ้น โดยจะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะดีที่สุดเมื่อให้อากาศ 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที ได้แก่ 0.032, 0.031 และ 0.032 ชม$^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

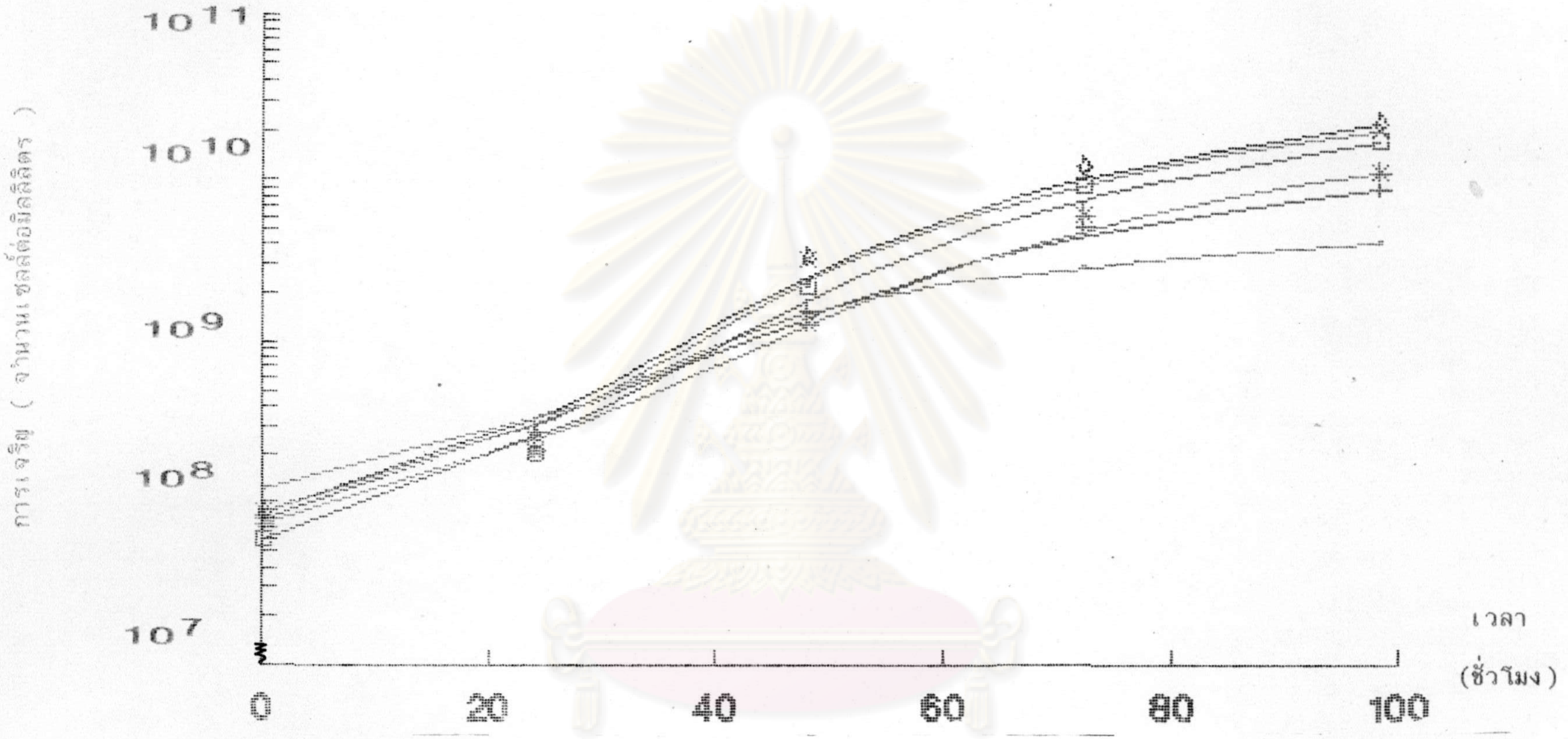
เมื่อพิจารณาการเจริญของสาหร่าย จากการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ จะเห็นว่าที่อัตรา 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที จะให้ผลที่ใกล้เคียงกันคือ มีจำนวนเซลล์ 1.7×10^{10}–2.2×10^{10} เซลล์ต่อมล. ในชั่วโมงที่ 98 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์ที่วัดจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คือมีค่าในช่วง 0.06-0.09 ในชั่วโมงที่ 98 (รูปที่ 9,10)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ โดยผันแปรการให้อากาศด้วยอัตราต่างๆจาก 0-80 มล.ต่อนาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละการทดลอง

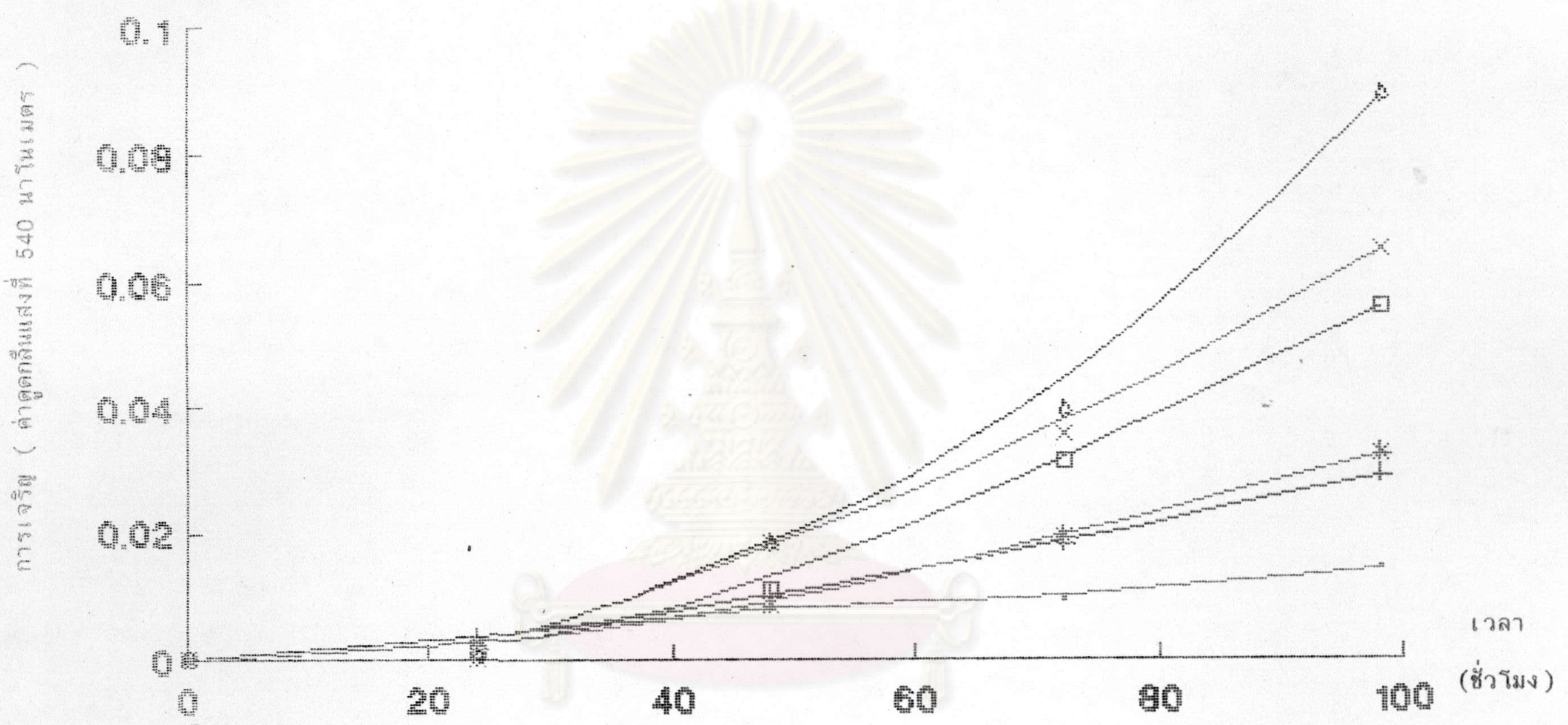
อัตราการพ่นอากาศ (มล./นาที)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)
0	98	0.017
10	98	0.022
20	98	0.028
40	98	0.032
60	98	0.031
80	98	0.032

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ผันแปรอัตราการให้อากาศด้วยอัตราต่างๆ ได้แก่; 0 มล.ต่อนาที: —•— 10 มล.ต่อนาที: —+— 20 มล.ต่อนาที: —✱— 40 มล.ต่อนาที: —□— 60 มล.ต่อนาที: —✕— 80 มล.ต่อนาที: —◇—

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 10. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ผันแปรอัตราการให้อากาศด้วยอัตราต่างๆ ได้แก่; 0 มล.ต่อนาที: —•— 10 มล.ต่อนาที: —+— 20 มล.ต่อนาที: —✱— 40 มล.ต่อนาที: —□— 60 มล.ต่อนาที: —×— 80 มล.ต่อนาที: —◇— .

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ศึกษาการเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic

3.1 การเพาะเลี้ยง Chlorella sp.B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ จากการทดลองเติมอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราต่างๆดังนี้คือ 0,5, 10, 20, 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที พบว่าเมื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอัตรา 60 มล.ต่อนาที จะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.024 ชม$^{-1}$ (ตารางที่ 12) และจะเริ่มลดลงที่อัตรา 80 มล.ต่อนาที ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญที่วัดโดยการนับจำนวนเซลล์และการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (รูปที่ 11,12)

จากการทดลองข้างต้นเลือกอัตราการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 4 ค่า ได้แก่ 0,40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที นำมาทดลอง 10 ซ้ำ เพื่อคำนวณค่าทางสถิติว่าแต่ละอัตราจะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะ, ปริมาณของโปรตีน และผลผลิตแตกต่างกันทางสถิติหรือไม่ พบว่าการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ในอัตรา 60 มล.ต่อนาที จะให้ค่าการเจริญและผลผลิตสูงสุดคือที่ชั่วโมงที่ 121 จะให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.028 ชม$^{-1}$, ผลผลิตเท่ากับ 7.010 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ส่วนการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ดและโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 42.44 และ 42.04 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ แต่พบว่ามีปริมาณโปรตีนที่หาได้จากทั้ง 2 วิธี ไม่ต่างกับที่ให้อากาศในอัตรา 80 มล.ต่อนาที (ตารางที่ 13)

จากกราฟแสดงการเจริญของสาหร่าย (รูปที่ 13,14) ก็จะให้ผลเช่นเดียวกัน นั่นคือที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที จะมีการเจริญดีที่สุด คือ มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^{11} เซลล์ต่อมล. และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 1.74 ที่ชั่วโมงที่ 121 และจะลดลงที่อัตรา 80 มล.ต่อนาที

จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรม ไมโครสะแตต พบว่าการให้อากาศทั้ง 4 อัตราให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ผลผลิต และปริมาณโปรตีนต่างกัน ยกเว้นที่อัตรา 60 และ 80 มล.ต่อนาทีมีปริมาณโปรตีนไม่ต่างกัน (ภาคผนวก ค)

ดังนั้นสรุปได้ว่าเมื่อให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตรา 60 มล.ต่อนาที Chlorella sp.B.K.1เจริญได้ดีที่สุดโดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^{11} เซลล์ต่อมล. และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 1.74 ที่ชั่วโมงที่ 121

จากผลการทดลองในข้อ 3.1 และข้อ 2 จะเห็นว่าที่อัตราการให้อากาศที่ 60 มล.ต่อนาทีจะให้ผลดีที่สุด ดังนั้นในการทดลองต่อๆไปจึงได้เลือกใช้อัตราการให้อากาศที่ 60 มล.ต่อนาที

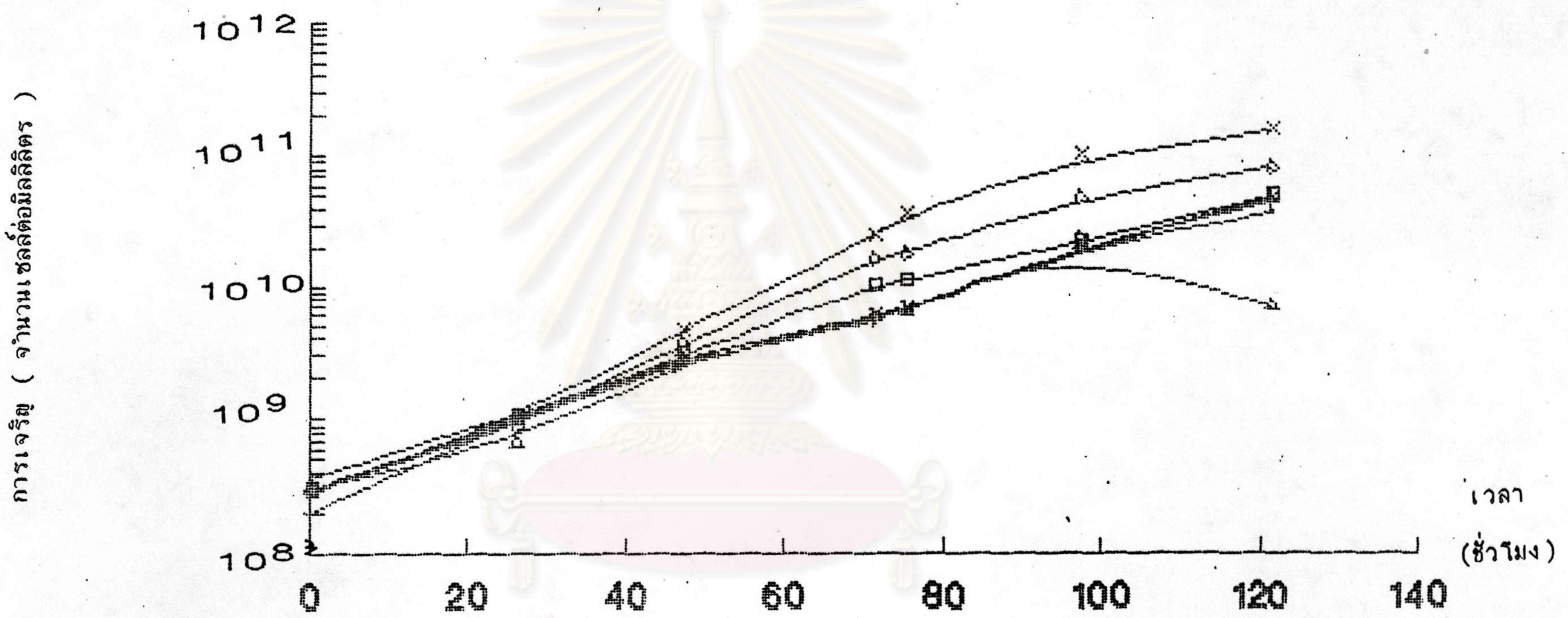
3.2 การเพาะเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ จากการทดลองเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic โดยใช้อัตราการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ พบว่าที่ชั่วโมงที่ 144 จะให้อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.012 ชม$^{-1}$ ผลผลิตเท่ากับ 0.610 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และ ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ดและ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 34.52 และ 34.78 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 14) และสามารถดูการเจริญได้จากกราฟ (รูปที่ 15,16) คือมีจำนวนเซลล์ 3.3×10^{10} เซลล์ต่อมล. และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 0.23 ที่ชั่วโมงที่ 144

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ โดยผันแปรการให้อากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราต่างๆ จาก 0-80 มล.ต่อนาที โดยทำการทดลอง 1 ซ้ำ แต่ละการทดลอง

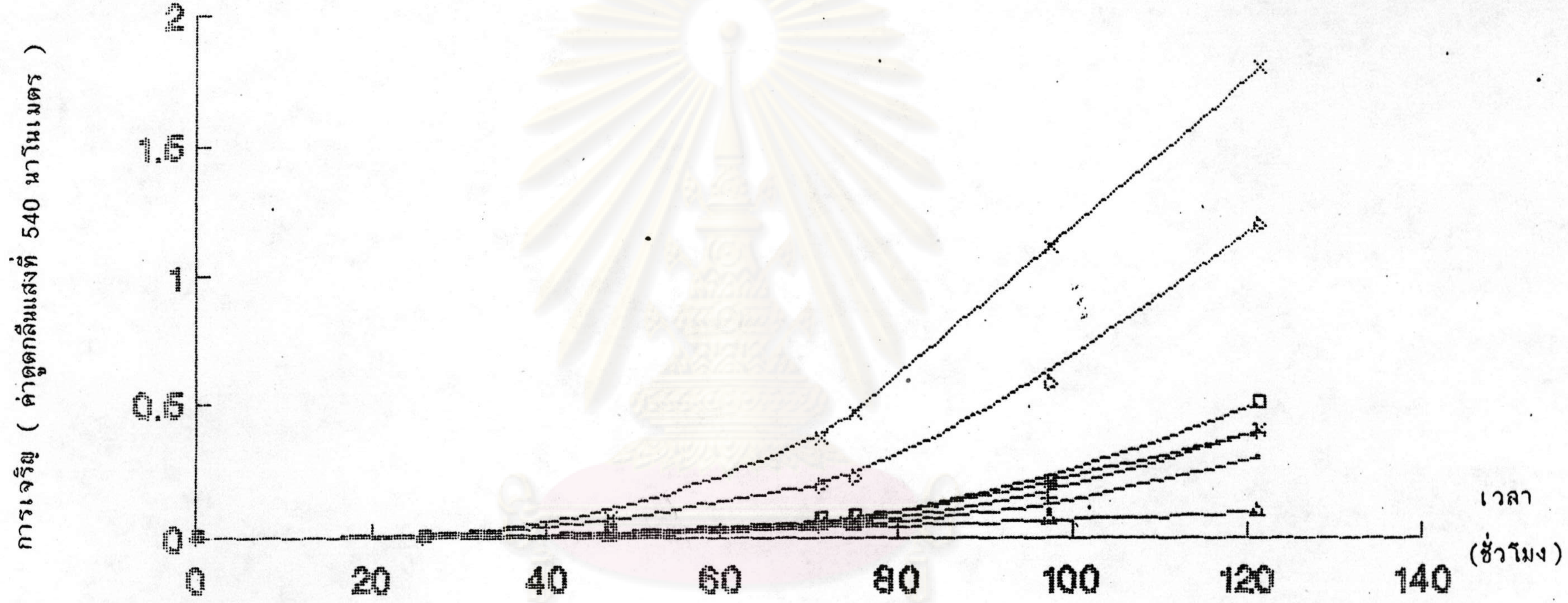
อัตราการพ่นอากาศ (มล./นาที)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)
0	121	0.014
5	121	0.017
10	121	0.019
20	121	0.018
40	121	0.019
60	121	0.024
80	121	0.021

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ผันแปรอัตราการให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอัตราต่างๆ ได้แก่; 0 มล.ต่อนาที: —△— 5 มล.ต่อนาที: —•— 10 มล.ต่อนาที: —+— 20 มล.ต่อนาที: —*— 40 มล.ต่อนาที: —□— 60 มล.ต่อนาที: —×— 80 มล.ต่อนาที: —◇— ทำการทดลอง 1 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ Chlorella sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ผันแปรอัตราการให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอัตราต่างๆ ได้แก่; 0 มล.ต่อนาที: —△—

5 มล.ต่อนาที: —•— 10 มล.ต่อนาที: —+— 20 มล.ต่อนาที: —*— 40 มล.ต่อนาที: —□—

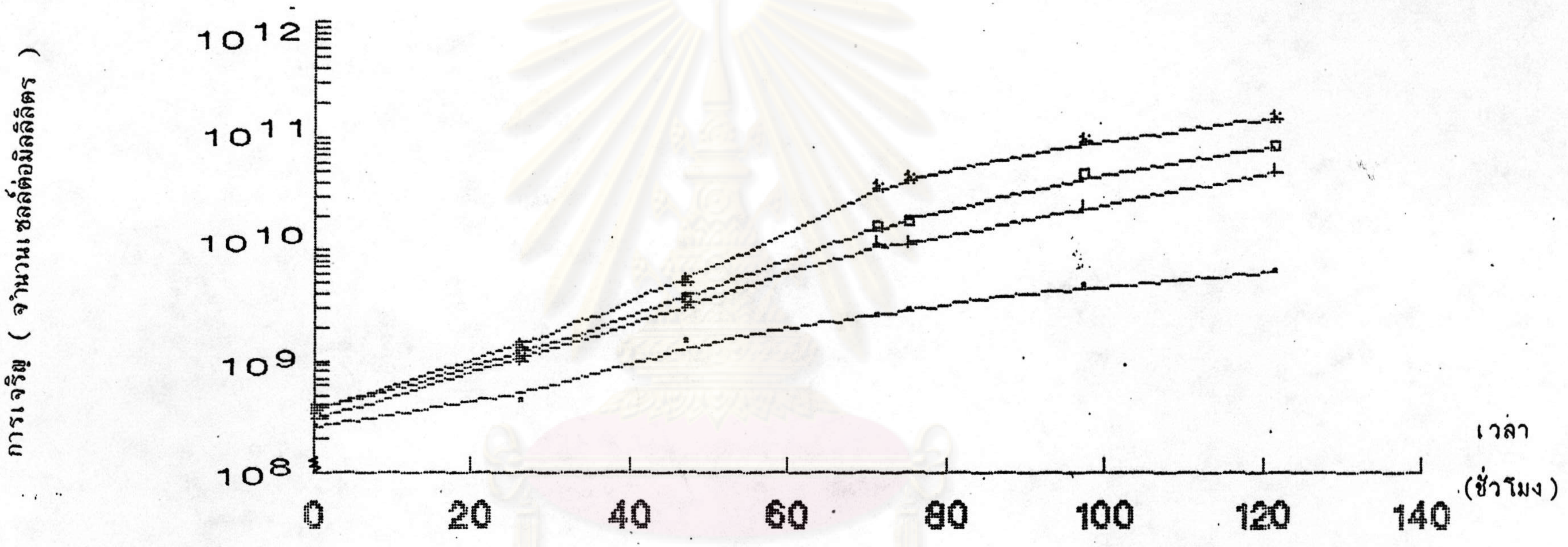
60 มล.ต่อนาที: —×— 80 มล.ต่อนาที: —◇— ทำการทดลอง 1 ซ้ำ

ตารางที่ 13 แสดงการเจริญของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ โดยผันแปรการให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยอัตรา 0, 40, 60 และ 80 มล.ต่อนาที โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ แต่ละการทดลอง

อัตราการพ่นอากาศ (มล./นาที)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีนแบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
0	121	0.012	*	*	*
40	121	0.019	2.322	25.80	24.64
60	121	0.028	7.010	42.44	42.04
80	121	0.023	4.072	42.77	42.17

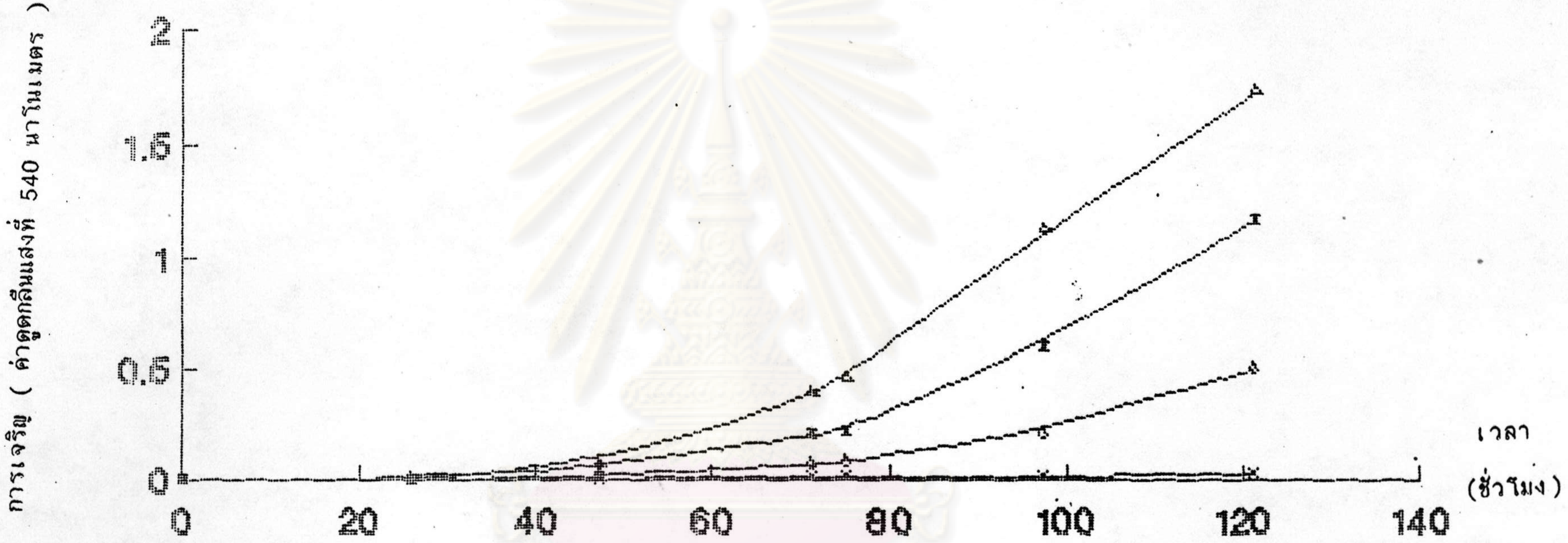
* = ไม่ได้ทำการวัดเนื่องจากเซลล์มีจำนวนน้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอัตราต่างๆ ได้แก่; 0 มล.ต่อนาที: —•— 40 มล.ต่อนาที: —+— 60 มล.ต่อนาที: —*— 80 มล.ต่อนาที: —□— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



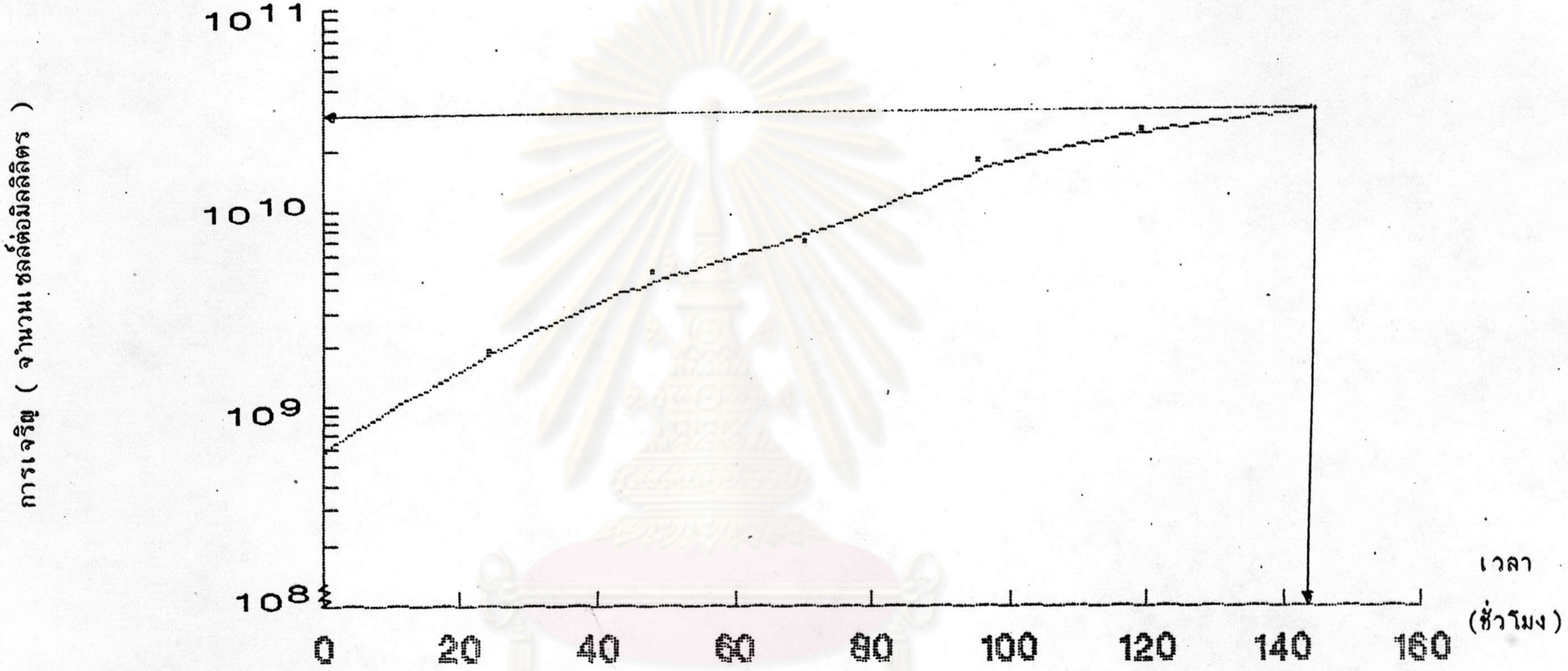
รูปที่ 14. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอัตราต่างๆ ได้แก่; 0 มล.ต่อนาที: —×— 40 มล.ต่อนาที: —◇— 60 มล.ต่อนาที: —△— 80 มล.ต่อนาที: —⧗— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ เมื่อให้อากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตรา 60 มล.ต่อนาที โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ

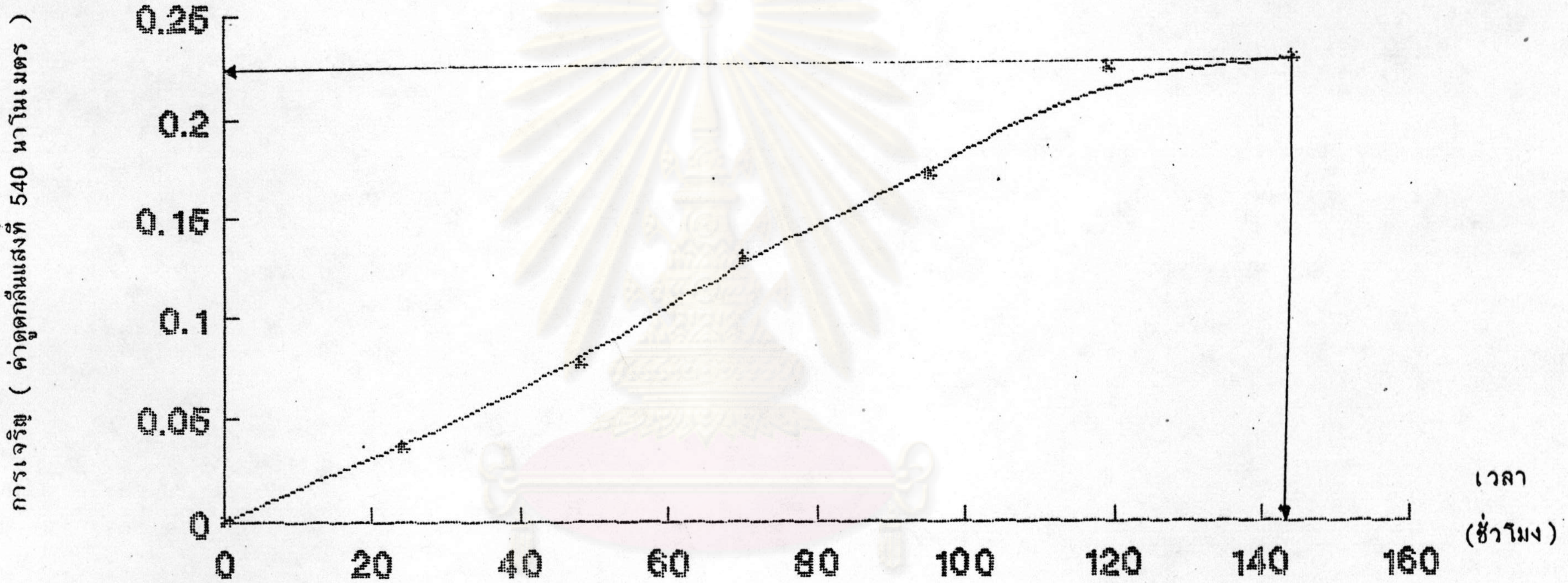
อัตราการพ่นอากาศ (มล./นาที)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
60	144	0.012	0.610	34.52	34.78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Chlorella* sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ *Chlorella* sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

3.3 เปรียบเทียบการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ และ 1750 ลักซ์ ได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะ Autotrophic เมื่อให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์

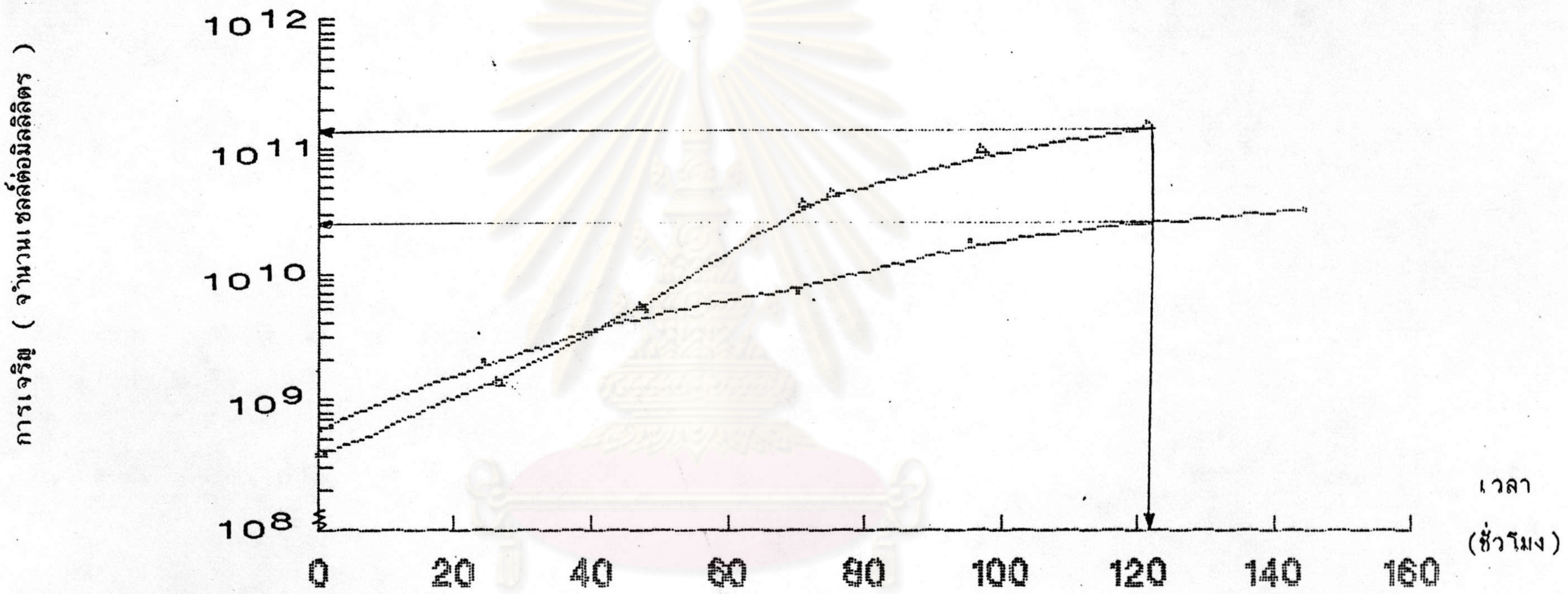
จากตารางที่ 15 พบว่า ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ Chlorella sp.B.K.1 จะมีการเจริญ และผลผลิตดีกว่าที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ คือที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ จะมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.028 $ชม^{-1}$ ผลผลิตเท่ากับ 7.010 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และ ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ดและโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 42.44 และ 42.04 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และสามารถดูการเจริญได้จากกราฟ (รูปที่ 17,18) คือมีจำนวนเซลล์ 1.5×10^{11} เซลล์ต่อมล. และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 1.74 ที่ชั่วโมงที่ 121

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่ความเข้มแสง 1750 และ 3500 ลักซ์ เมื่อให้อากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตรา 60 มล.ต่อนาที โดยทำการทดลองความเข้มแสงละ 10 ซ้ำ

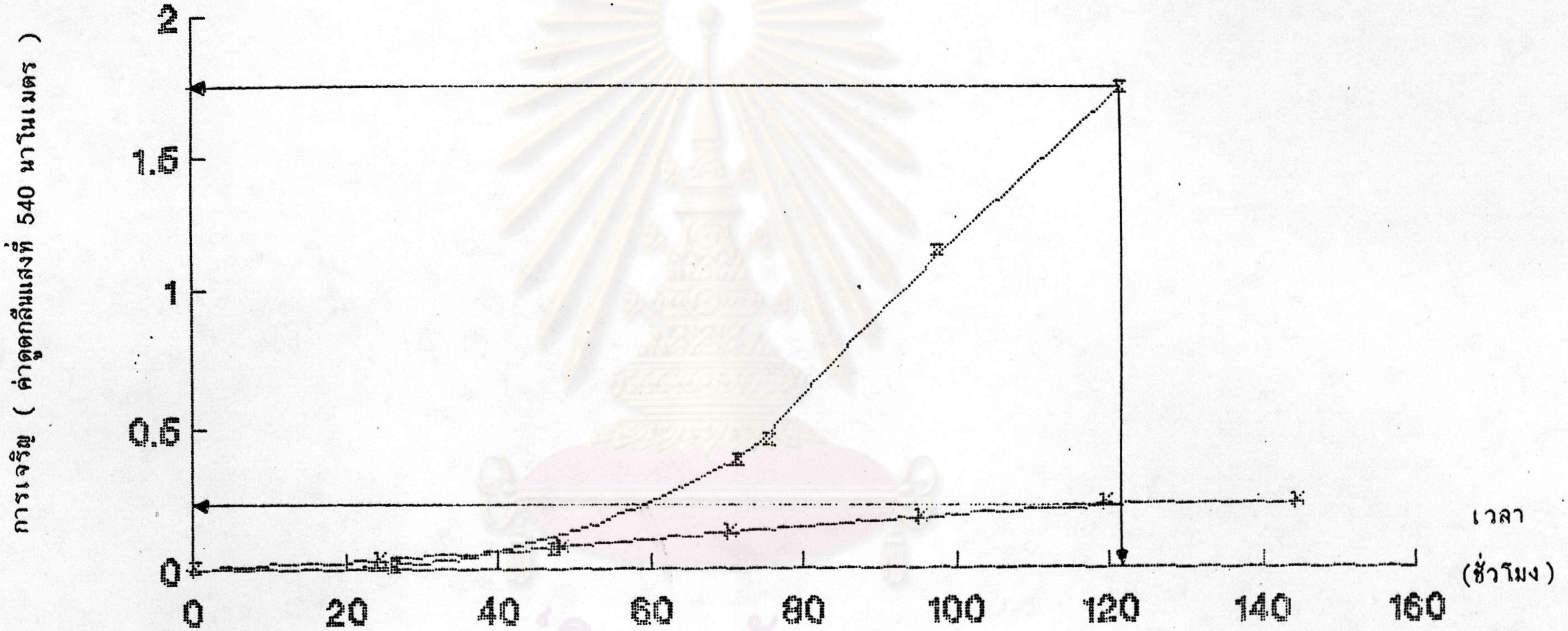
ความเข้มแสง (ลักซ์)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
1750	144	0.012	0.610	34.52	34.78
3500	121	0.028	7.010	42.44	42.04

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญ ด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —•— และ 3500 ลักซ์: —▲— ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18. แสดงการเปรียบเทียบ การเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ Chlorella sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —*— และ 3500 ลักซ์: —⌛— ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

4. ศึกษาการเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด

นอกจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว Chlorella บางสายพันธุ์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์อื่นได้ เช่น กรดแอซีติก กลูโคส และกาแลคโตส (Samejima และ Myers, 1958)

สำหรับกลูโคสและกาแลคโตสนั้นไม่เหมาะที่จะใช้ในการเลี้ยง Chlorella ในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้เนื่องจากมีราคาแพงรวมทั้งมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ง่ายกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพราะจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นรวมทั้งเป็นการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้สูง

สำหรับแอซีติกนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่ากลูโคสและกาแลคโตส และนอกจากจะใช้เป็นแแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังช่วยควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้กรดแอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืดโดยใช้กรดแอซีติกที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้คือ 0, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด(ตารางที่ 16) แต่ถ้าดูจากกราฟแสดงการเจริญ (รูปที่ 19, 20) จะพบว่าที่ความเข้มข้นกรดแอซีติก 20, 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ จะให้จำนวนเซลล์ใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 1.2-1.3x10^{11} เซลล์ต่อมล. และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.45-0.88 จากการทดลองนี้เลือกความเข้มข้นของกรดแอซีติกมา 4 ค่า ได้แก่ 0, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ นำมาทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อคำนวณค่าทางสถิติว่าแต่ละความเข้มข้นจะให้ค่า อัตราการเจริญจำเพาะปริมาณโปรตีน และผลผลิตแตกต่างกันทางสถิติหรือไม่

จากตารางที่ 17 พบว่าที่ความเข้มข้นกรดอะซิค 30,40 และ 50 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าการเจริญและผลผลิตใกล้เคียงกันคือจะให้อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.028 ชม$^{-1}$ ผลผลิตประมาณ 3.000 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และ ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธี แบรดฟอร์ด และวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตประมาณ 41.00 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ซึ่งสอดคล้องกับรูปที่ 21 และ 22 คือที่ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ จะมีการ

เจริญไม่ต่างกันคือ มีจำนวนเซลล์ 1.2×10^{11} เซลล์ต่อมล. และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรประมาณ 0.80 ที่ชั่วโมงที่ 192

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 ในภาวะ Heterotrophic ในที่มืดโดยใช้ความเข้มข้นกรดแอซีติกเท่ากับ 30 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.2×10^{11} เซลล์ต่อมล. และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 0.77 ที่ชั่วโมงที่ 192

จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรม ไมโครสะแตต พบว่ากรดแอซีติกที่ ความเข้มข้น 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีนไม่ต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ค)

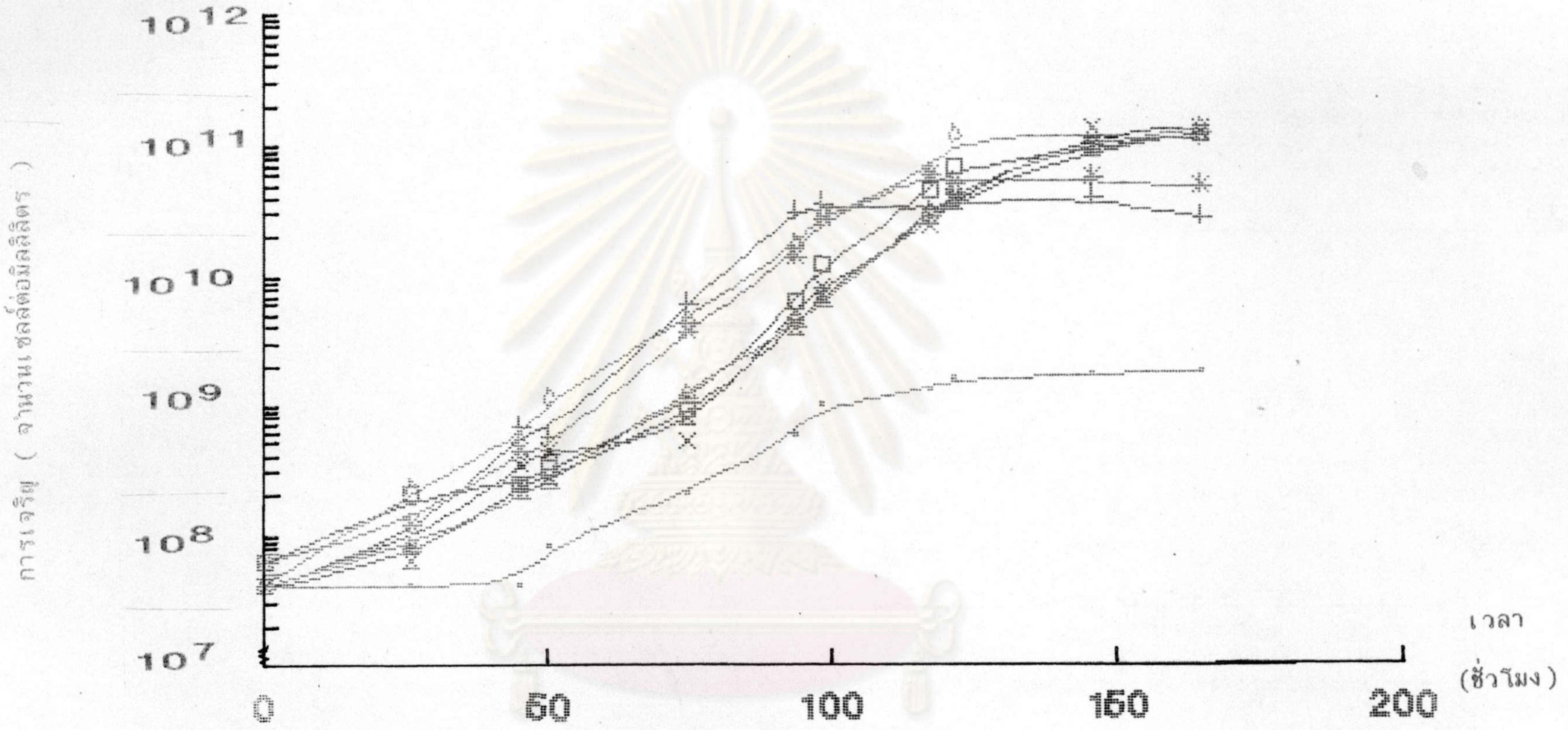
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงการเจริญของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืดให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที โดยผันแปรกรดแอซีติกที่ความเข้มข้นต่างๆ จาก 0-200 มิลลิโมลาร์ โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ

กรดแอซีติก (มิลลิโมลาร์)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)
0	164	0.020
5	164	0.037
10	164	0.031
20	164	0.033
30	164	0.027
50	164	0.028
60	164	0.025
80	164	0.028
100	164	0
150	164	*
200	164	*

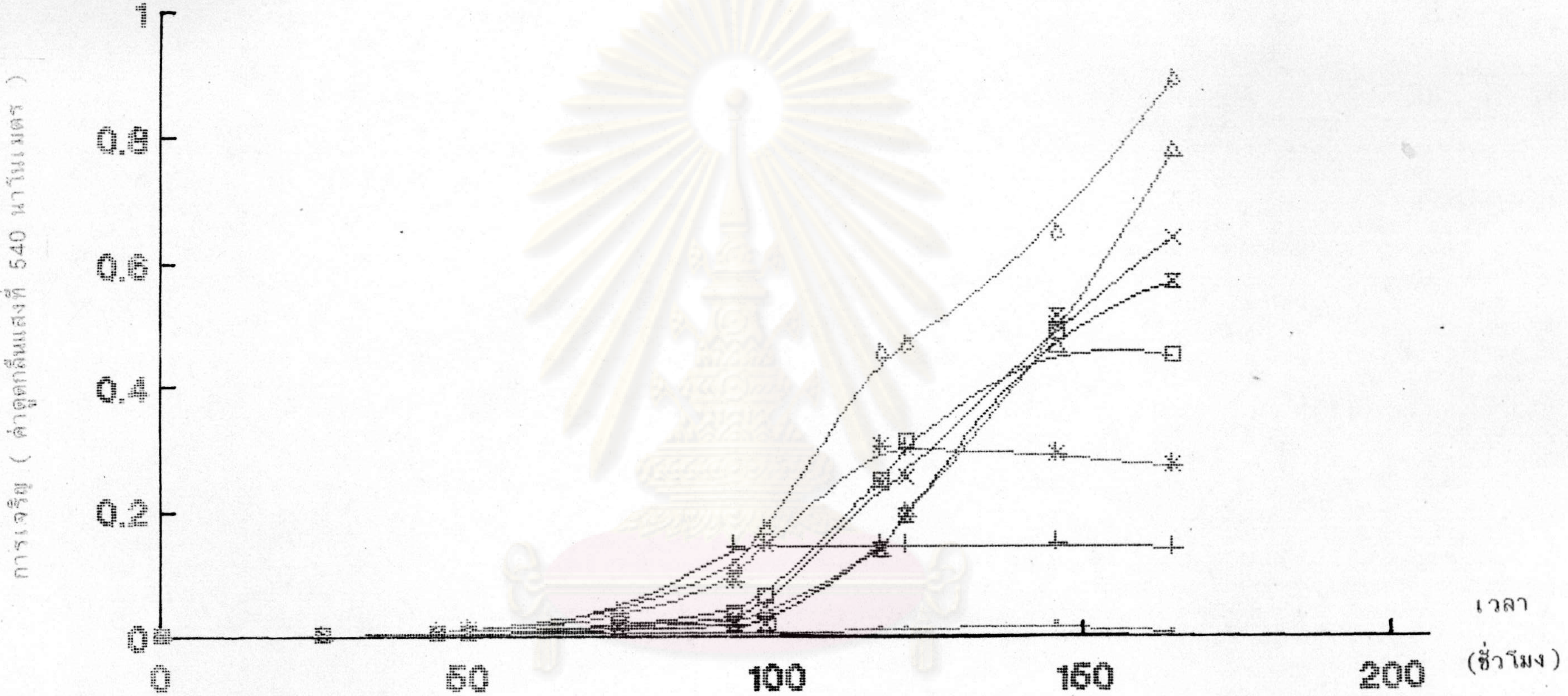
* = ไม่ได้ทำการวัดเนื่องจากเซลล์มีจำนวนน้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ผันแปรความเข้มข้นกรดแอซีติกด้วยความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่; 0 มิลลิโมลาร์: —•— 5 มิลลิโมลาร์: —+— 10 มิลลิโมลาร์: —✱— 20 มิลลิโมลาร์: —□— 30 มิลลิโมลาร์: —×— 50 มิลลิโมลาร์: —◊— 60 มิลลิโมลาร์: —△— 80 มิลลิโมลาร์: —⧗—
โดยให้อากาศที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ทำการทดลอง 1 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ผันแปรความเข้มข้นกรดแอซีติกด้วยความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่; 0 มิลลิโมลาร์: ——•—— 5 มิลลิโมลาร์: ——+—— 10 มิลลิโมลาร์: ——✱—— 20 มิลลิโมลาร์: ——□—— 30 มิลลิโมลาร์: ——×—— 50 มิลลิโมลาร์: ——◇—— 60 มิลลิโมลาร์: ——△—— 80 มิลลิโมลาร์: ——⧖—— โดยให้อากาศที่อัตรา 60 มล./นาที ทำการทดลอง 1 ซ้ำ

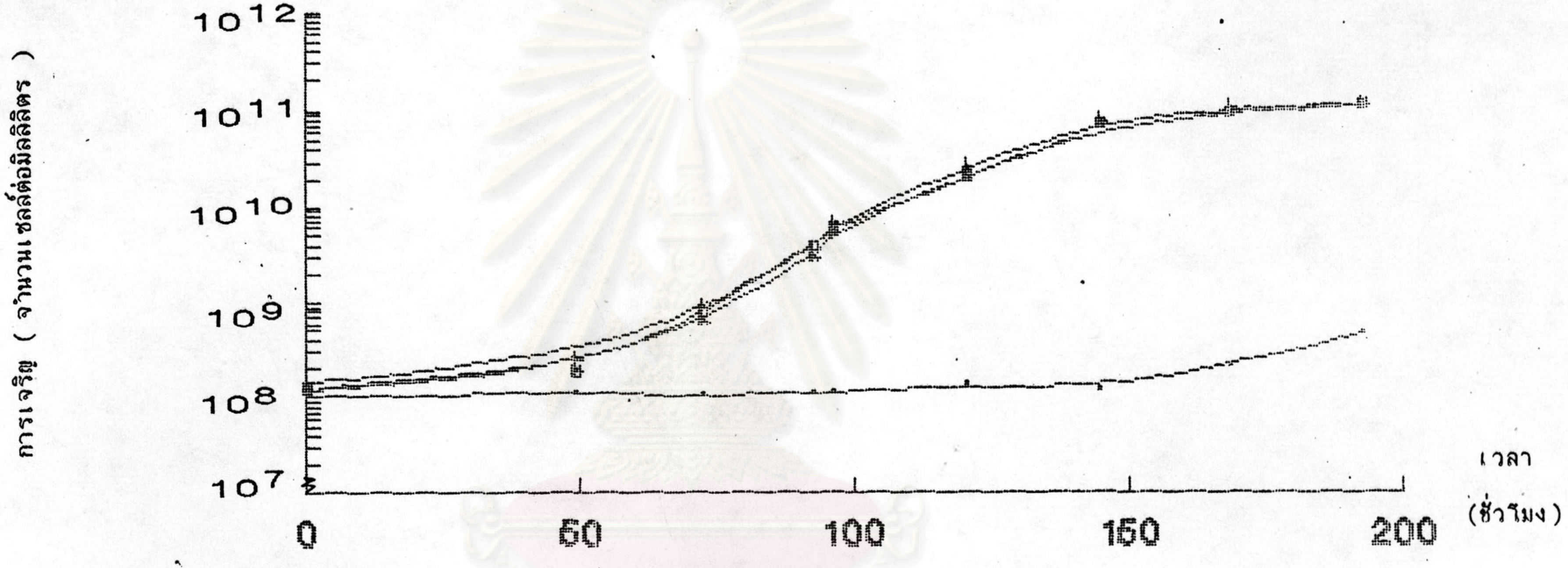
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที โดยผันแปรความเข้มข้นกรดแอซีติกที่ 0,30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ ในที่มืด โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

กรดแอซีติก (มิลลิโมลาร์)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
0	192	0.003	*	*	*
30	192	0.028	3.093	41.10	41.13
40	192	0.028	3.106	40.94	41.08
50	192	0.028	2.969	40.75	40.70

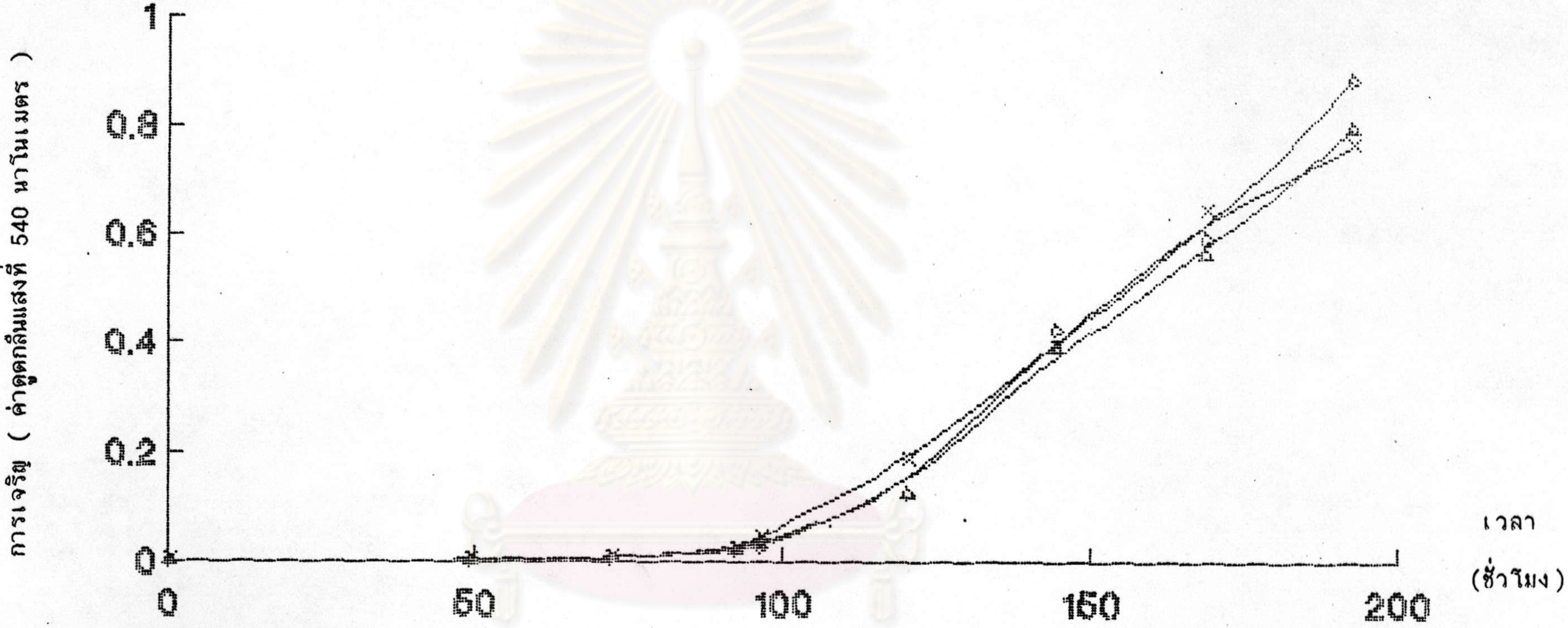
* = ไม่ได้ทำการวัดเนื่องจากเซลล์มีจำนวนน้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ผันแปรความเข้มข้นกรดแอซีติกด้วยความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่; 0 มิลลิโมลาร์: —•— 30 มิลลิโมลาร์: —+— 40 มิลลิโมลาร์: —✱— 50 มิลลิโมลาร์: —□— โดยให้อากาศที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ผันแปรความเข้มข้นกรดแอซีติกด้วยความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่; 30 มิลลิโมลาร์: —x— 40 มิลลิโมลาร์: —◇— 50 มิลลิโมลาร์: —△—
โดยให้อากาศที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. <u>ศึกษาการเพาะเลี้ยง</u> <u>Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic</u>

5.1 การเพาะเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ <u>Chlorella</u> ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญโดยใช้ คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้และบางสายพันธุ์ยังสามารถใช้กรดแอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย ซึ่งจากการทดลองในข้อ 4.1 พบว่า <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 สามารถใช้แอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จะเลือกใช้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที จากข้อ 3.1 และกรดแอซีติกเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ จากข้อ 4.1 มาเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เพื่อทดสอบว่า <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 สามารถเจริญโดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ได้หรือไม่ จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ จะได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.024 ชม.$^{-1}$ ค่าผลผลิต 5.042 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ดและโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 47.83 และ 46.80 ไมโครกรัมต่อไมโครกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

จากกราฟแสดงการเจริญของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 (รูปที่ 23,24)พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.1×10^{11} เซลล์ต่อมล. และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 1.32 ที่ชั่วโมงที่ 121

เมื่อนำค่าการเจริญ และ ผลผลิตของการเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ Heterotrophic ในที่มืด และ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ มาเปรียบเทียบกัน (ตารางที่ 19) พบว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์นี้จะเท่ากับ 0.024 ชม$^{-1}$ ซึ่งต่ำกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ และ Heterotrophic ซึ่งเท่ากับ 0.028 ชม$^{-1}$ ค่าผลผลิตของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic เท่ากับ 5.042 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. จะต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ซึ่งเท่ากับ 7.010 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. แต่จะมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ที่เท่ากับ 3.093 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม.

ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ดในการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic เท่ากับ 47.83 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) จะสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic และในสภาวะ Heterotrophic ซึ่งเท่ากับ 42.44 และ 41.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ได้จากวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตคือการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic จะมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 46.80 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ซึ่งสูงกว่าปริมาณโปรตีนของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic ซึ่งเท่ากับ 42.04 และ 41.13 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ

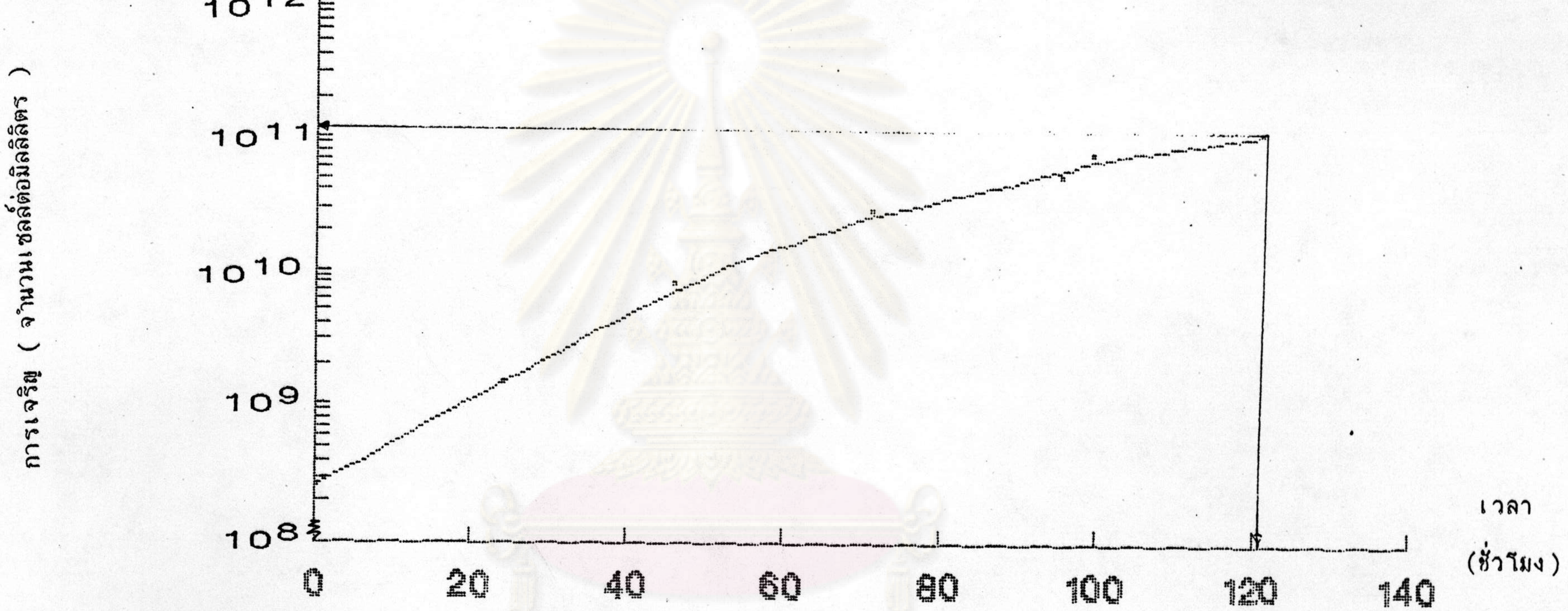
จากกราฟแสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 (รูปที่ 25,26) จะเห็นว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้จาก ฮีมาไซโตมิเตอร์ ของ การเพาะเลี้ยงทั้ง 3 วิธี ที่ชั่วโมงที่ 121 การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic และ Mixotrophic จะให้จำนวนเซลล์ใกล้เคียงกันคือประมาณ $1.1-1.5 \times 10^{11}$ เซลล์ต่อมล. แต่การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic จะให้จำนวนเซลล์น้อยที่สุดคือ 2.7×10^{10} เซลล์ต่อมล. ซึ่งสอดคล้องกับวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คือการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic จะมีค่าเท่ากับ 1.74 และ การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic เท่ากับ 1.32 ซึ่งใกล้เคียงกัน แต่การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic จะให้ค่าน้อยที่สุดคือ 0.18 ที่ชั่วโมงที่ 121

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ โดยให้อากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที และกรดแอซีติกเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ

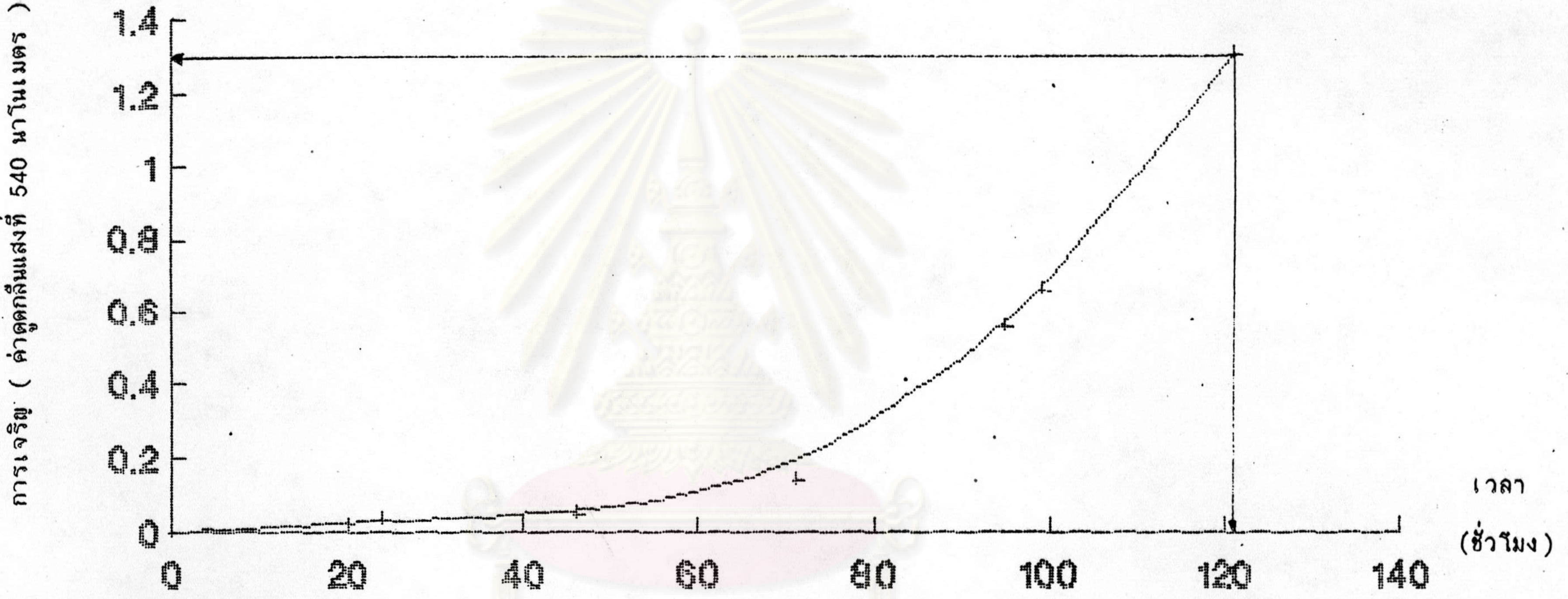
ความเข้มแสง (ลักซ์)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
3500	121	0.024	5.042	47.83	46.80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



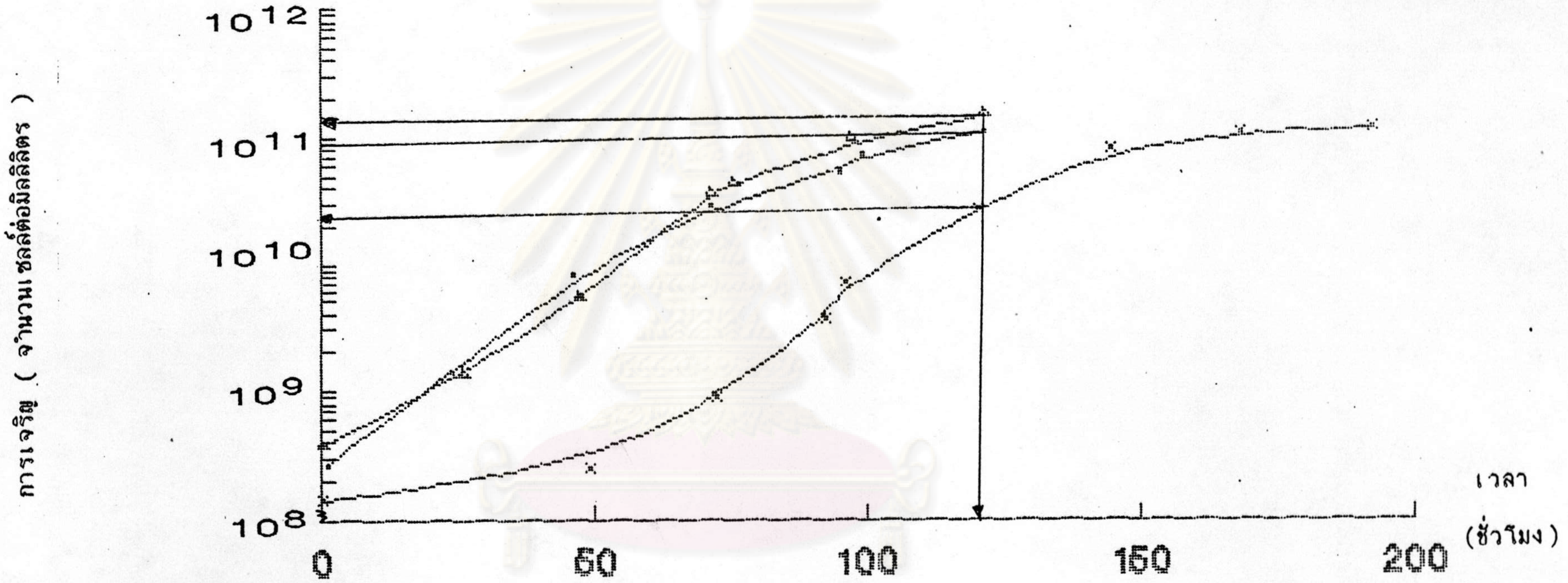
รูปที่ 24. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

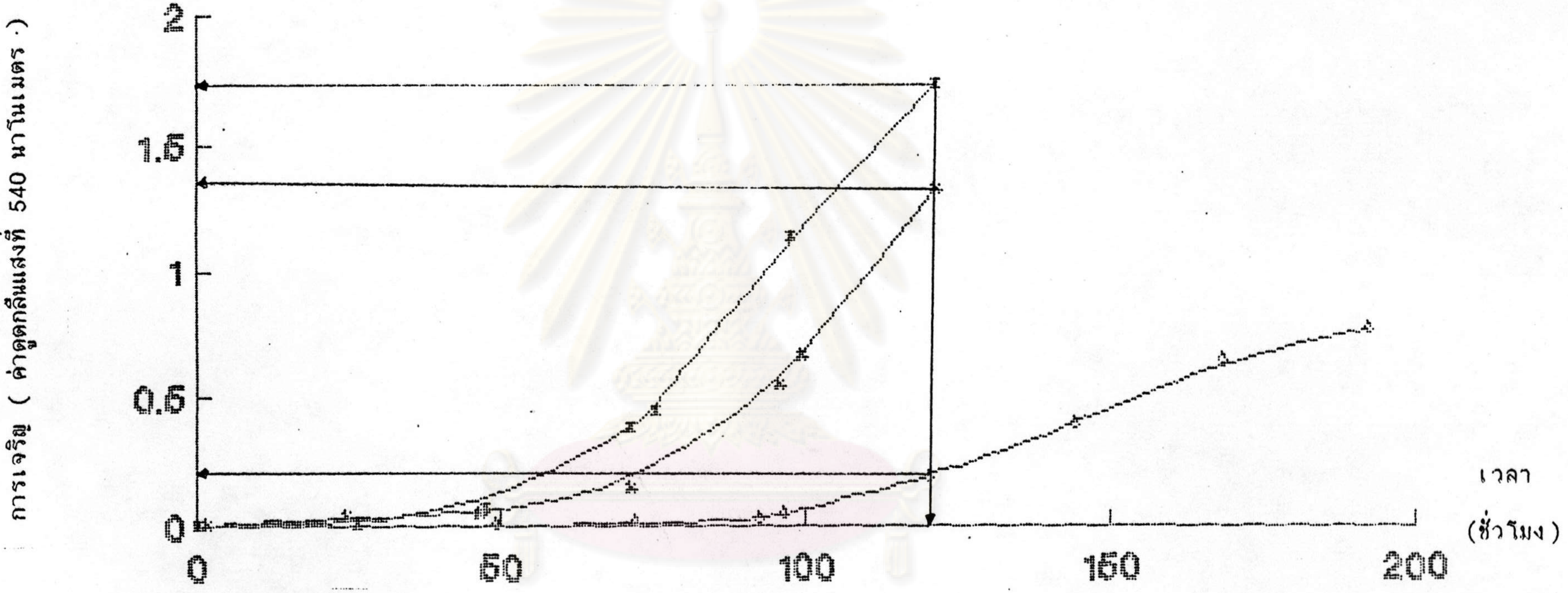
ตารางที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck โดยการเพาะเลี้ยงแบบ Autotropic ที่ 3500 ลักซ์ (1) การเพาะเลี้ยงแบบ Heterotrophic (2)และ Mixotrophic ที่ 3500 ลักซ์ (3)

สภาวะการเพาะเลี้ยง	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
1	121	0.028	7.010	42.44	42.04
2	192	0.028	3.093	41.10	41.13
3	121	0.024	5.042	47.83	46.80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในสภาวะ Autotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 3500ลักซ์: —△— Heterotrophic ในที่มืด: —×— และ Mixotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์: —•— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ



รูปที่ 26. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในสภาวะ Autotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์: —Δ— Heterotrophic ในที่มืด: —C— และ Mixotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 3500 ลักซ์: —*— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

5.2 การเพาะเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1,750 ลักซ์ จากการทดลองเพาะเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1,750 ลักซ์ จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.032 ชม$^{-1}$ ผลผลิตเท่ากับ 6.871 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ด และวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 55.34 และ 55.53 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)ตามลำดับ (ตารางที่ 20) และ มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.4×10^{11} เซลล์ต่อมล. และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 1.46 ที่ชั่วโมงที่ 121 จากรูปที่ 27 และ 28

เมื่อนำค่าการเจริญ และ ผลผลิตของการเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ Heterotrophic ในที่มืด และ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ มาเปรียบเทียบกันพบว่า ในภาวะ Mixotrophic จะให้ค่าการเจริญและผลผลิต สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ 1750 และ Heterotrophic ในที่มืด (ตารางที่ 21) ดังนี้

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ จะเท่ากับ 0.032 ชม.$^{-1}$ ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ซึ่งเท่ากับ 0.012 ชม.$^{-1}$ และสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ซึ่งเท่ากับ 0.028 ชม.$^{-1}$

ค่าผลผลิตการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ 1750 ลักซ์ เท่ากับ 6.871 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. จะสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ 1,750 ลักซ์ และ Heterotrophic โดยมีค่าเท่ากับ 0.610 และ 3.093 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ตามลำดับ

สำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ 1750 ลักซ์ จะมีปริมาณโปรตีน มากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ 1750 ลักซ์ และ การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic มีปริมาณโปรตีน 55.34 , การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic มีปริมาณโปรตีน 34.52 และการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic มีปริมาณโปรตีน 41.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)

ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือ

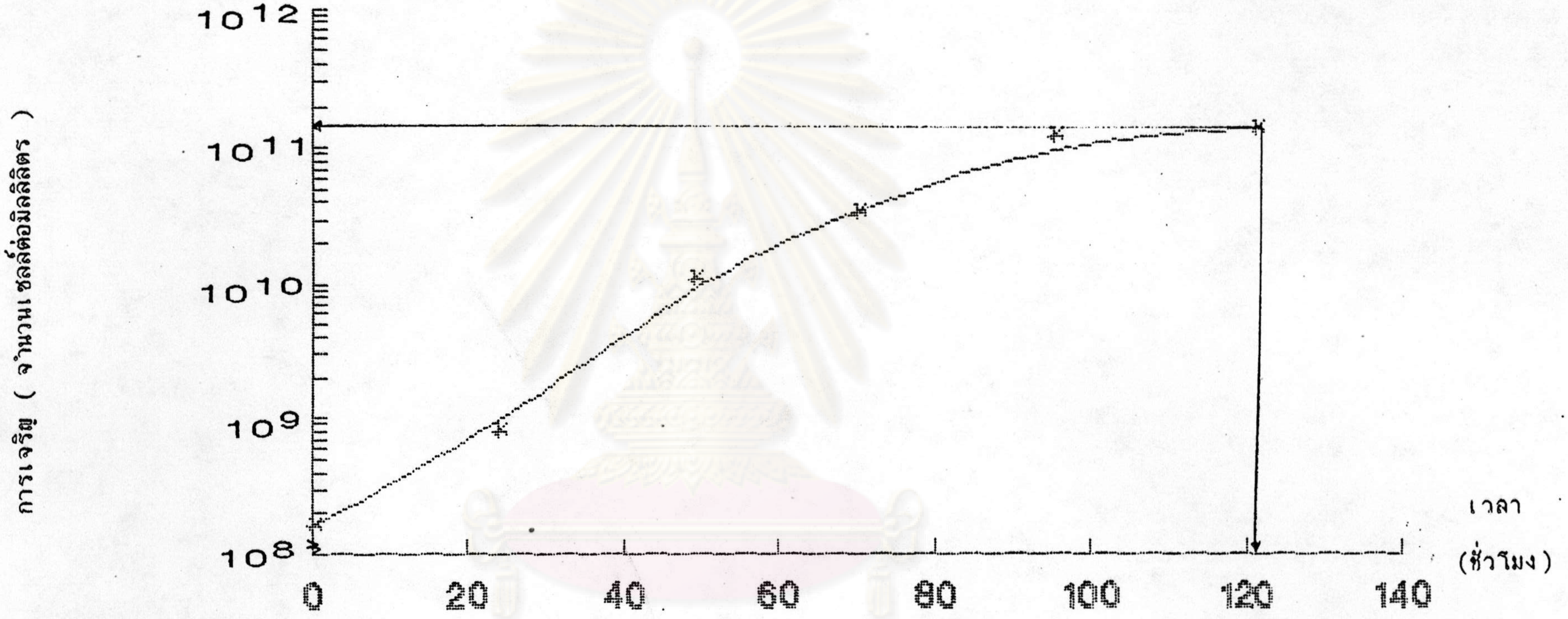
การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ 1750 ลักซ์ จะมีปริมาณโปรตีนมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ 1750 ลักซ์ และการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืดโดยจะมีค่าดังนี้ 55.53, 34.78 และ 41.13 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับกราฟแสดงการเจริญของสาหร่าย (รูปที่ 29, 30) คือการเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ 1750 ลักซ์ จะให้การเจริญดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic และ การเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ 1750 ลักซ์ โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ 1750 ลักซ์ จะมีจำนวนเซลล์ประมาณ $1.4\text{x}10^{11}$ เซลล์ต่อมล. และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 1.46 ที่ชั่วโมงที่ 121 ซึ่งมากกว่าจำนวนเซลล์ของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ 1750 ลักซ์และ Heterotrophic ในที่มืด ที่เวลาเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ โดยให้อากาศที่ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที และ กรดแอซีติกเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ

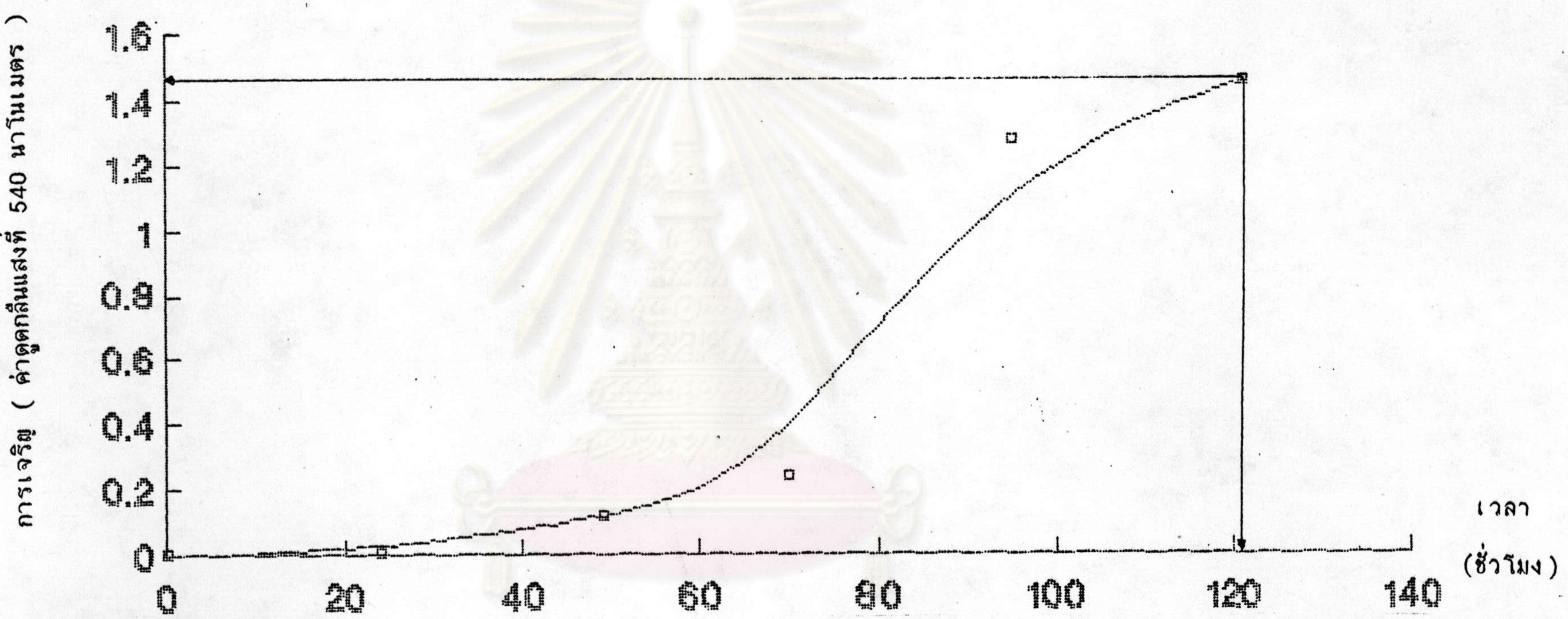
ความเข้มแสง (ลักซ์)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
1750	121	0.032	6.871	55.34	55.53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27. แสดงการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

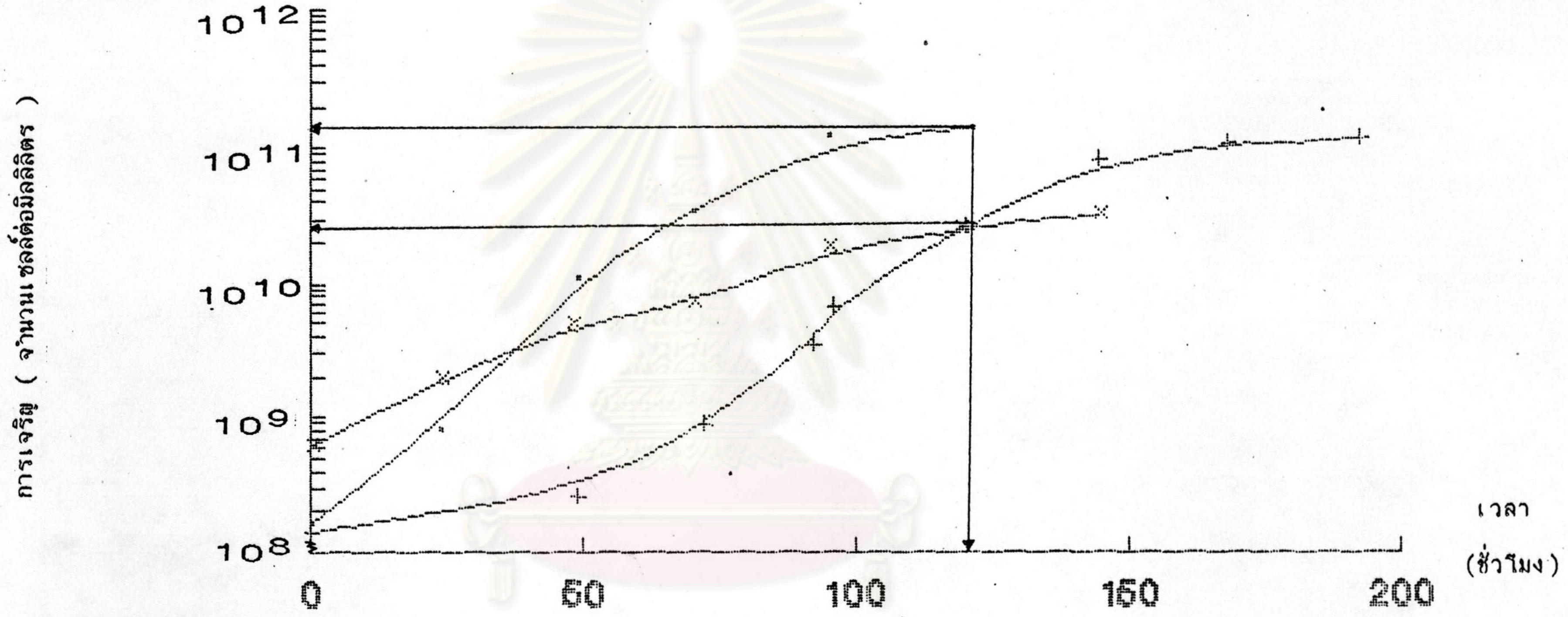


รูปที่ 28. แสดงการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ให้อากาศที่ผสม 1 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 60 มล.ต่อนาที ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

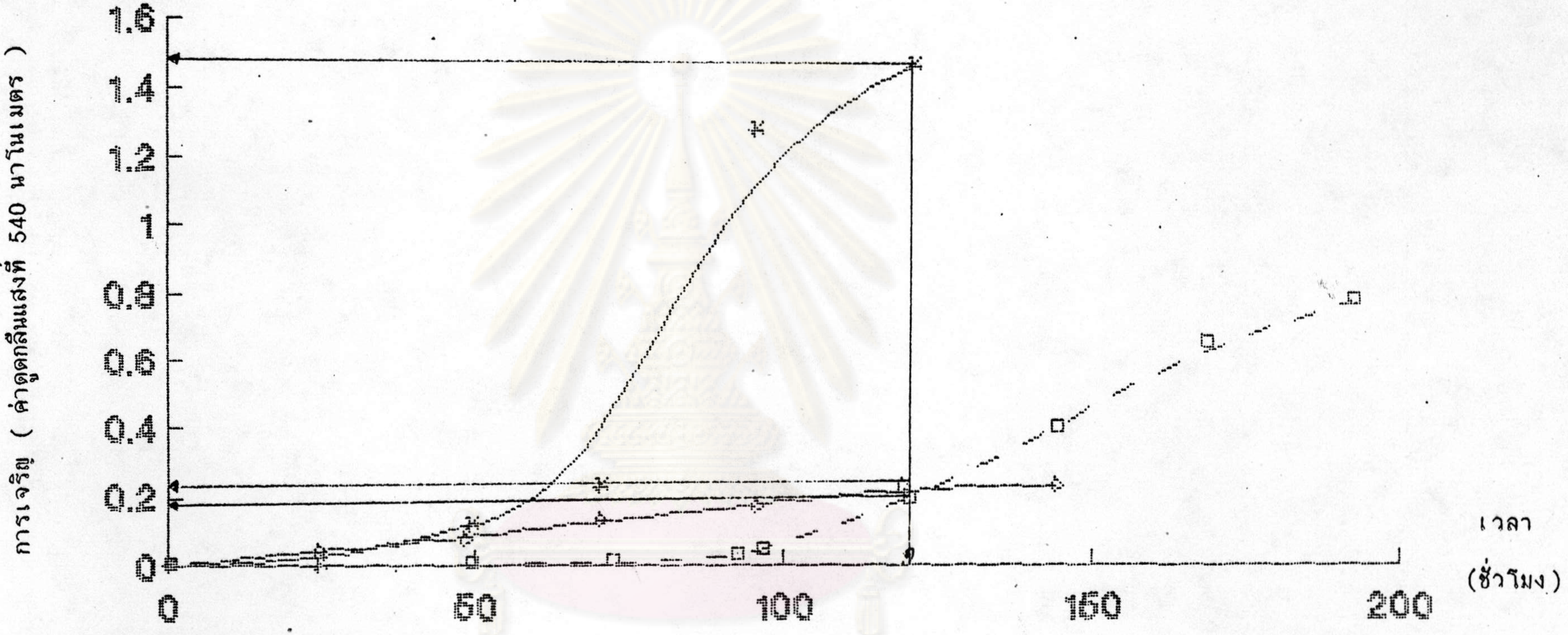
ตารางที่ 21 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck โดยการเพาะเลี้ยงแบบ Autotropic ที่ 1750 ลักซ์ (1) การเพาะเลี้ยงแบบ Heterotrophic (2)และ Mixotrophic ที่ 1750 ลักซ์ (3)

สภาวะการเพาะเลี้ยง	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
1	144	0.012	0.610	34.52	34.78
2	192	0.028	3.093	41.10	41.13
3	121	0.032	6.871	55.34	55.53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในสภาวะ Autotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750ลักซ์: —×— Heterotrophic ในที่มืด: —+— และ Mixotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —•— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ



รูปที่ 30. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ Chlorella sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในสภาวะ Autotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —◇— Heterotrophic ในที่มืด: —□— และ Mixotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —✳— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. <u>เปรียบเทียบการเจริญในสภาวะต่างๆกันของ *Chlorella* sp. B.K.1ที่ผันแปรแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสง</u>

จากการทดลองเลี้ยง *Chlorella* sp. B.K.1 ในสภาวะต่างๆคือ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์, Heterotrophic ในที่มืด และ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน สูงกว่าวิธีอื่นคือ จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.032 ชม$^{-1}$, ผลผลิตเท่ากับ 6.871 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และ ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธี แบรดฟอร์ด และ วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต เท่ากับ 55.34 และ 55.53 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่22) ยกเว้นผลผลิตของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ มีค่า 7.010 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากผลผลิตของการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ซึ่งเท่ากับ 6.871 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม.และพบว่าปริมาณโปรตีนของการเลี้ยงในสภาวะ Autotrophic และ Heterotrophic มีค่าไม่ต่างกัน (ทั้งจากวิธีแบรดฟอร์ด และ วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต)

แต่เมื่อดูจากกราฟแสดงการเจริญโดยวิธีนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์และ วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (รูปที่ 31,32) จะพบว่าการเจริญในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 และ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์ มีจำนวนเซลล์และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใกล้เคียงกันคือ การเจริญในสภาวะ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 จะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^{11} เซลล์ต่อมล. การเจริญในสภาวะ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 และ 1750 ลักซ์ มีจำนวนเซลล์ 1.1×10^{11} และ 1.4×10^{11} เซลล์ต่อมล.ตามลำดับ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรมีค่า 1.74, 1.32 และ 1.46 ที่ชั่วโมงที่ 121 ตามลำดับ

ตารางที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ Chlorella sp.B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน โดยการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck

สภาวะการเพาะเลี้ยง	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
1	121	0.028	7.010	42.44	42.04
2	144	0.012	0.610	34.52	34.78
3	192	0.028	3.093	41.10	41.13
4	121	0.024	5.042	47.83	46.80
5	121	0.032	6.871	55.34	55.53

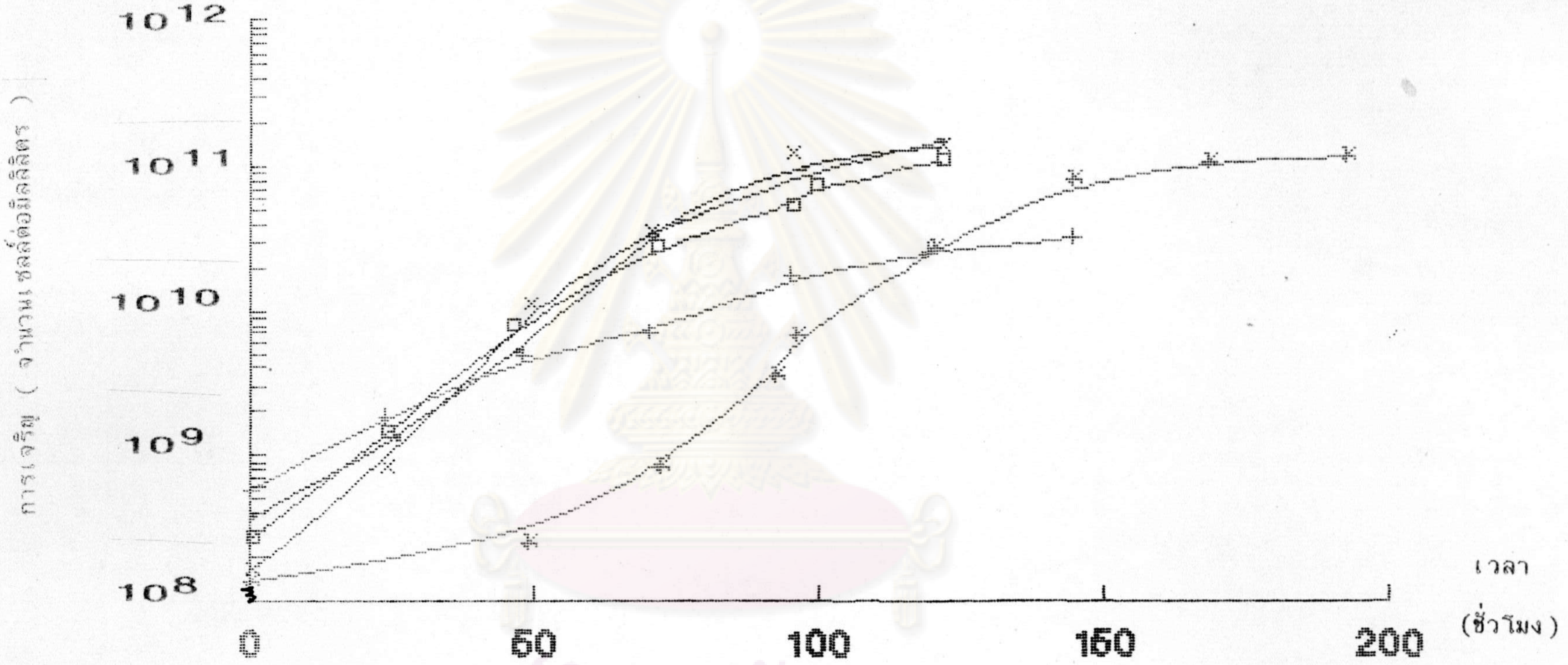
1= การเพาะเลี้ยงแบบ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ที่อัตราการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 60 มล.ต่อนาที

2= การเพาะเลี้ยงแบบ Autotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ที่อัตราการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 60 มล.ต่อนาที

3= การเพาะเลี้ยงแบบ Heterotrophic ที่ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ในที่มืด

4= การเพาะเลี้ยงแบบ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 3500 ลักซ์ ที่อัตราการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 60 มล.ต่อนาที และ กรดแอซีติกเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์

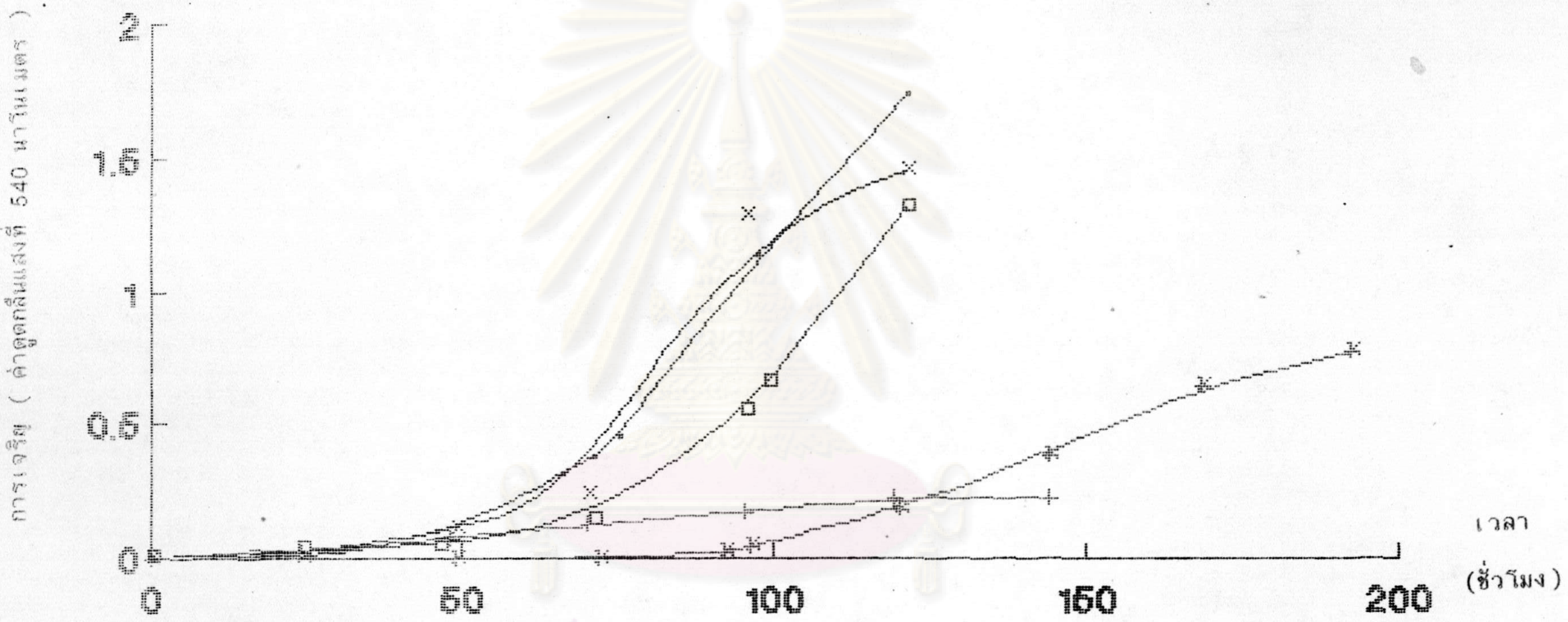
5= การเพาะเลี้ยงแบบ Mixotrophic ที่ความเข้มแสง 1750 ลักซ์ ที่อัตราการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ 60 มล.ต่อนาที และ กรดแอซีติกเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 31. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในสภาวะ Autotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —•— Autotrophic 3500 ลักซ์: —+— Heterotrophic ในที่มืด: —✱— Mixotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —□— และMixotrophic 3500 ลักซ์: —×—

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ _Chlorella_ sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในสภาวะ Autotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —•— Autotrophic 3500 ลักซ์: —+— Heterotrophic ในที่มืด: —*— Mixotrophic ภายใต้ความเข้มแสง 1750 ลักซ์: —□— และMixotrophic 3500 ลักซ์: —×—

ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

7. <u>ศึกษาการเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด โดยใช้กรดแอซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน</u>

สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนได้จากหลายแหล่งเช่น เกลือแอมโมเนียม, ยูเรีย และไนเตรต

ในการทดลองข้างต้นในอาหารสูตร Beijerinck ใช้ แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นในการทดลองนี้ จะเลือกใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนแทน แต่ทั้งนี้ในการที่สาหร่ายใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น สาหร่ายจะเปลี่ยนยูเรีย ให้เป็นแอมโมเนียม และไบคาร์บอเนตอิออนก่อนนำไปใช้ ดังนั้นเพื่อตัดปัญหาในเรื่องที่การเจริญอาจจะเป็นผลจากไบคาร์บอเนตอิออนจึงเลือกใช้การเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ในที่มืด ดังนั้นสาหร่ายจะใช้คาร์บอนจากกรดแอซีติกเท่านั้น เพื่อที่ว่าจะได้เป็นการเปรียบเทียบการเจริญระหว่างการใช้แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรียเท่านั้น

7.1 การศึกษาความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมในการเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic จากการทดลองเลี้ยง <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic โดยใช้กรดแอซีติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ และแปรค่าความเข้มข้นของยูเรียต่าง ๆ ดังนี้คือ 0, 0.0187, 0.187, 0.93, 1.87, 3.74 และ 18.7 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.93 และ 1.87 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ตารางที่ 23) แต่ถ้าดูจากกราฟแสดงการเจริญของสาหร่าย (รูปที่ 33, 34) จะพบว่าที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.93, 1.87, 3.74 และ 18.7 มิลลิโมลาร์ จะให้จำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ใกล้เคียงกัน จากการทดลองนี้เลือกความเข้มข้นของยูเรียมา 4 ค่าได้แก่ 0, 0.93, 1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ นำมาทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อคำนวณค่าทางสถิติว่าแต่ละความเข้มข้นจะให้ค่า อัตราการเจริญจำเพาะ, ปริมาณโปรตีนและผลผลิตแตกต่างกันทางสถิติหรือไม่

จากตารางที่ 24 พบว่าที่ความเข้มข้นยูเรีย 1.87 และ 0.93 มิลลิโมลาร์ จะมีอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกันคือ ที่ความเข้มข้นยูเรีย 1.87 มิลลิโมลาร์ จะมีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.022 ชม.$^{-1}$ และที่ความเข้มข้นยูเรีย 0.93 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.023 ชม.$^{-1}$ส่วนที่ความเข้มข้นยูเรีย 3.74 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.016 ชม.$^{-1}$ แต่ผลผลิตจะมีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 ความเข้มข้น คือ ที่ความเข้มข้นยูเรีย 0.93

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิลลิโมลาร์ มีผลผลิตเท่ากับ 2.164 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ที่ความเข้มข้นยูเรีย 1.87 มิลลิโมลาร์ มีผลผลิตเท่ากับ 2.228 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. และที่ความเข้มข้นยูเรีย 3.74 มิลลิโมลาร์ มีผลผลิตเท่ากับ 2.194 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ด และ วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ที่ความเข้มข้นยูเรีย 1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ จะมีค่าใกล้เคียงกันคือ ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ดมีค่าเท่ากับ 40.80 และ 43.32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตมีค่าเท่ากับ 40.53 และ 43.16 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นยูเรีย 0.93 มิลลิโมลาร์ จะมีปริมาณโปรตีนต่ำสุดคือมีปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ดและวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเท่ากับ 30.89 และ 29.91 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง)ตามลำดับ

ถ้าดูจากกราฟแสดงการเจริญของสาหร่าย (รูปที่ 35,36)จะพบว่าที่ความเข้มข้นยูเรีย 0.93 และ 1.87 มิลลิโมลาร์ จะมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน นั่นคือ จะมีค่าจำนวนเซลล์ $6.7x10^{10}$ และ $7.5x10^{10}$ เซลล์ต่อมล. และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 0.44, 0.44 ที่ชั่วโมงที่ 168 ตามลำดับ

ดังนั้นในการนำการเจริญไปเปรียบเทียบในขั้นต่อไป จึงได้เลือกใช้ยูเรียที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ $8.1x10^{10}$ เซลล์ต่อมล. และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเท่ากับ 0.49 ที่ชั่วโมงที่ 120 ซึ่งเท่ากับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต ในสูตร Beijerinck

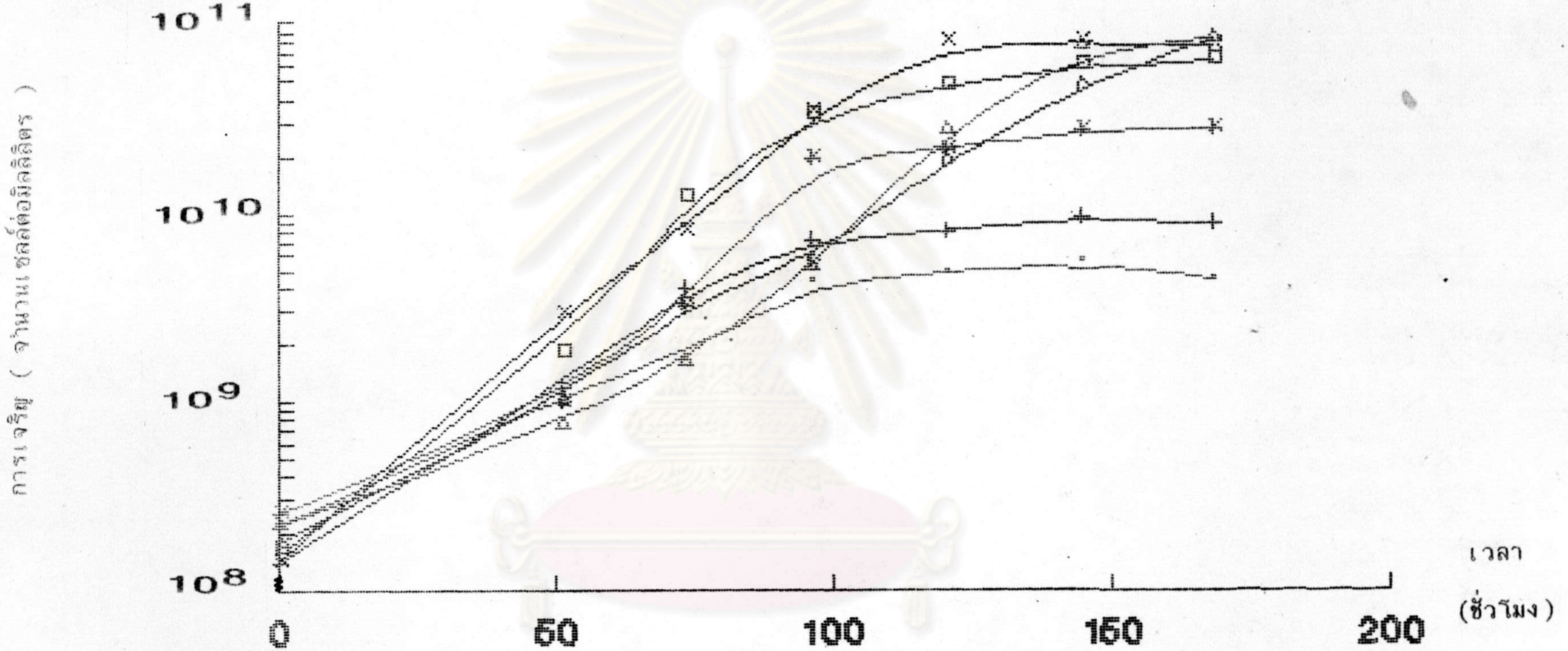
จากการคำนวณทางสถิติโดยใช้โปรแกรม ไมโครสะแตต พบว่า ที่ความเข้มข้นยูเรีย 0.93 และ 1.87 มิลลิโมลาร์ มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะไม่ต่างกัน ในขณะที่ผลผลิตจะไม่ต่างกันที่ความเข้มข้น 0.93, 1.87 และ3.74 มิลลิโมลาร์ และปริมาณโปรตีนทั้ง 2 วิธี ที่ความเข้มข้นยูเรีย 1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ จะไม่ต่างกัน (ภาคผนวก ค)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ด้วยอัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที โดยผันแปรการให้ยูเรียที่ความเข้มข้นต่างๆจาก 0-18.7 มิลลิโมลาร์ โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ

ยูเรีย (มิลลิโมลาร์)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)
0	168	0.013
0.0187	168	0.018
0.187	168	0.019
0.930	168	0.025
1.870	168	0.023
3.740	168	0.016
18.700	168	0.017

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



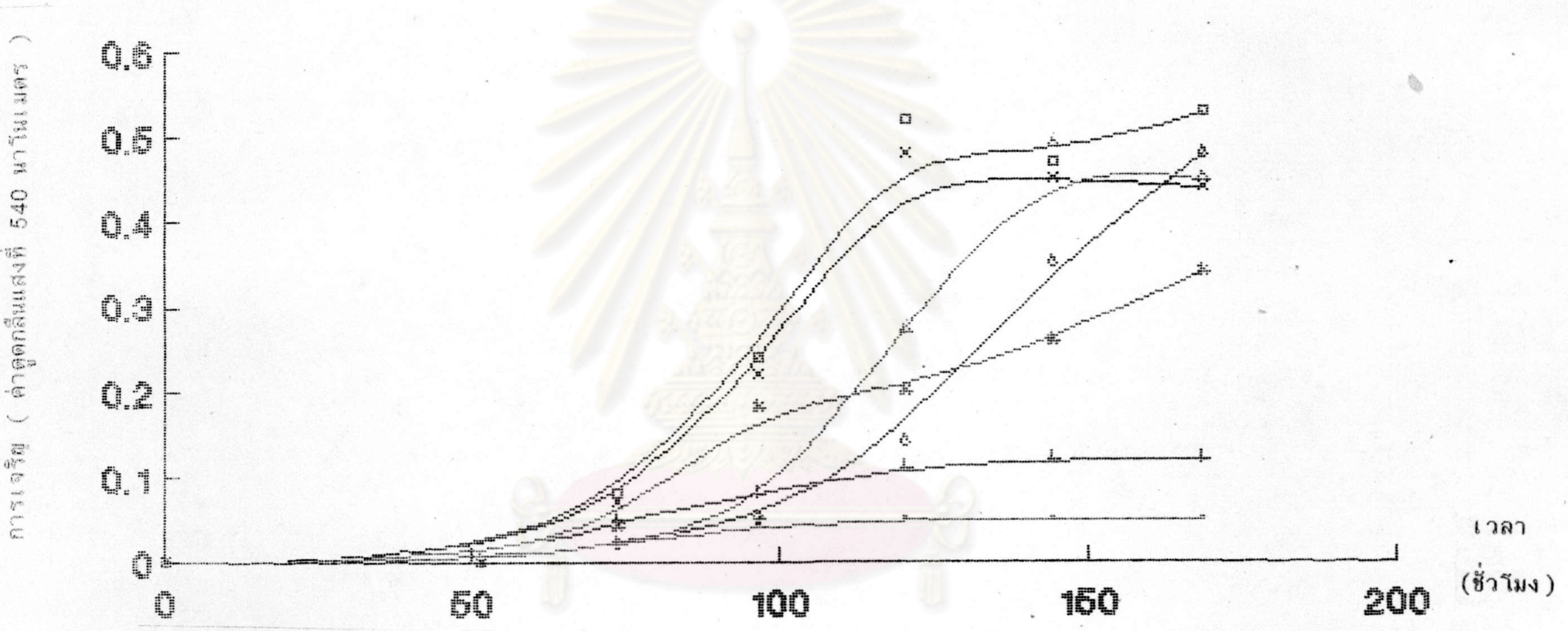
รูปที่ 33. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ Chlorella sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที ผันแปรความเข้มข้นยูเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่; 0 มิลลิโมลาร์: —•—

0.0187 มิลลิโมลาร์: —+— 0.187 มิลลิโมลาร์: —✱— 0.93 มิลลิโมลาร์: —□—

1.87 มิลลิโมลาร์: —×— 3.74 มิลลิโมลาร์: —◇— 18.7 มิลลิโมลาร์: —△—

ทำการทดลอง 1ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 34. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที ผันแปรความเข้มข้นยูเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่; 0 มิลลิโมลาร์: —•—

0.0187 มิลลิโมลาร์: —+— 0.187 มิลลิโมลาร์: —*— 0.93 มิลลิโมลาร์: —□—

1.87 มิลลิโมลาร์: —×— 3.74 มิลลิโมลาร์: —◇— 18.7 มิลลิโมลาร์: —△—

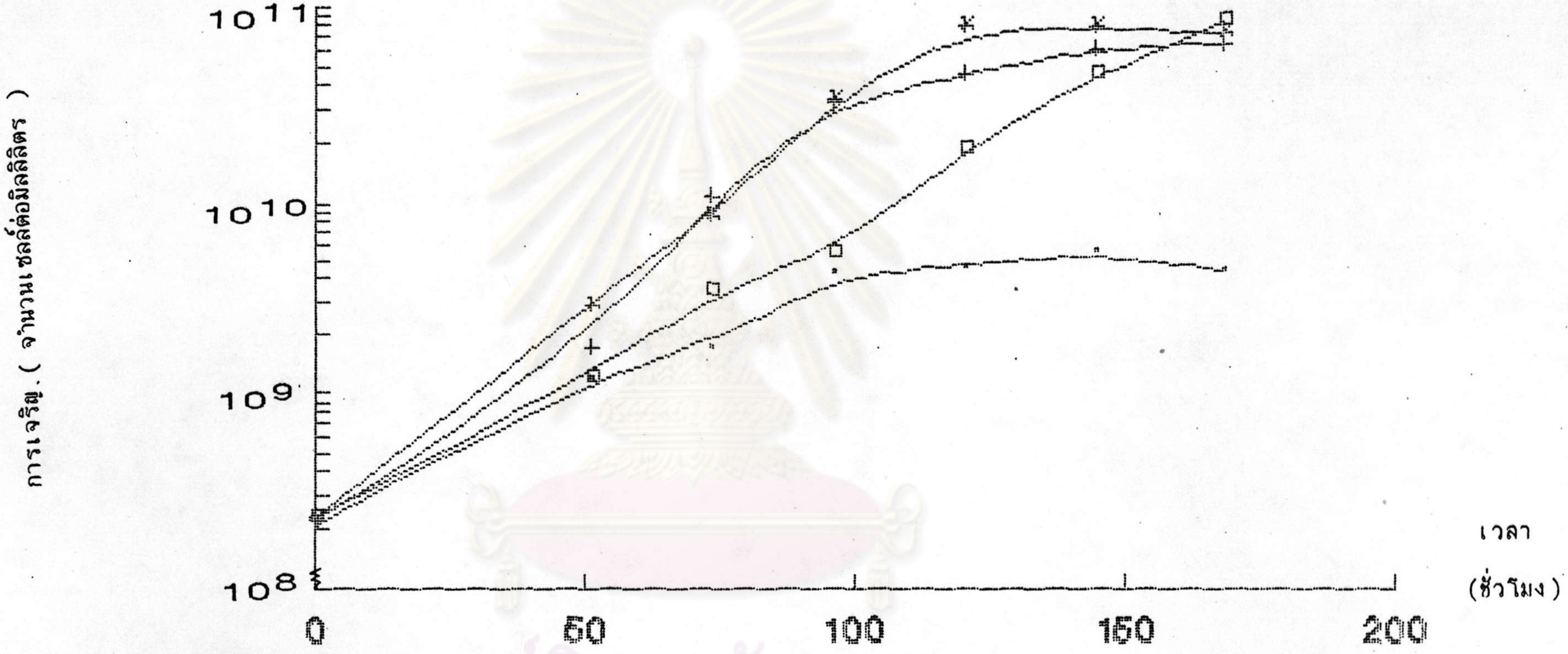
ทำการทดลอง 1ซ้ำ

ตารางที่ 24 แสดงการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืดที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที โดยผันแปรความเข้มข้นยูเรียที่ 0, 0.93,1.87 และ 3.74 มิลลิโมลาร์ โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

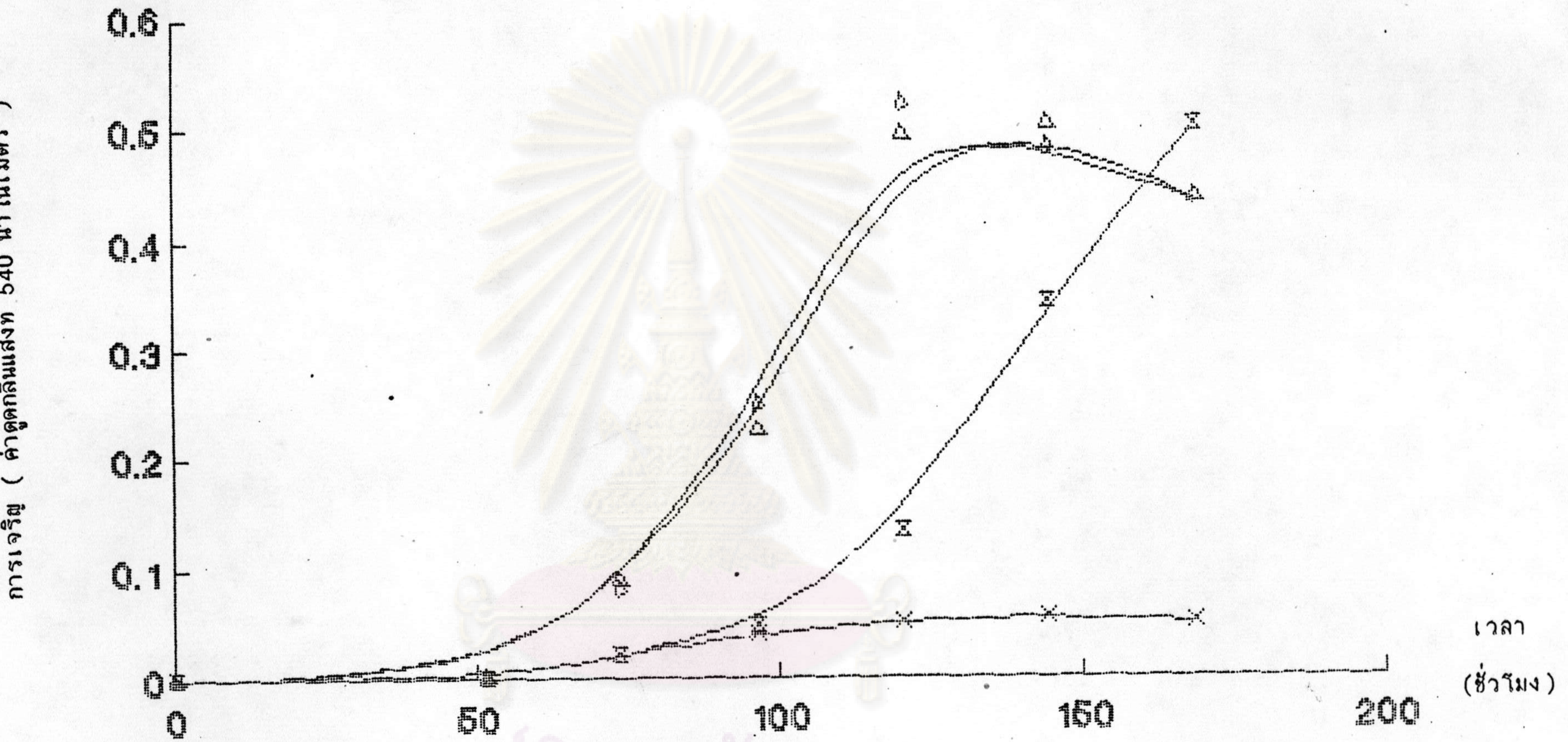
ยูเรีย (มิลลิโมลาร์)	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
0	168	0.013	*	*	*
0.93	168	0.023	2.164	30.89	29.91
1.87	168	0.022	2.228	40.80	40.53
3.74	168	0.016	2.194	43.32	43.16

* = ไม่ได้ทำการวัดเนื่องจากเซลล์มีจำนวนน้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ Chlorella sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที ที่ความเข้มข้นยูเรียต่างๆได้แก่; 0 มิลลิโมลาร์: —•— 0.93 มิลลิโมลาร์: —+— 1.87 มิลลิโมลาร์: —✳— 3.74 มิลลิโมลาร์: —□— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ



รูปที่ 36. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ Chlorella sp.B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที ที่ความเข้มข้นยูเรียต่างๆได้แก่; 0 มิลลิโมลาร์: —×— 0.93 มิลลิโมลาร์: —◇— 1.87 มิลลิโมลาร์: —△— 3.74 มิลลิโมลาร์: —⧖— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

7.2. เปรียบเทียบการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงในสภาวะ Heterotrophic ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ ระหว่างการใช้ยูเรียหรือแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองใช้ยูเรียและ แอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง Chlorella sp. B.K.1 ในสภาวะ Heterotrophic นำมาเปรียบเทียบค่าต่างๆได้ผลดังตารางที่ 25 และรูปที่ 37, 38 พบว่า การใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมี ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และผลผลิตน้อยกว่า การใช้ แอมโมเนียมไนเตรต การใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.022 ชม.$^{-1}$ และมีค่าผลผลิตเท่ากับ 2.228 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. ซึ่งน้อยกว่าการใช้ แอมโมเนียมไนเตรตที่มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.028 ชม.$^{-1}$ และมีค่าผลผลิตเท่ากับ 3.093 ไมโครกรัมต่อมล.ต่อชม. แต่มีปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธีแบรดฟอร์ด และวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ใกล้เคียงกันคือประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง) (ตารางที่ 25)

สำหรับจำนวนเซลล์ของ Chlorella sp. B.K.1 ที่ใช้ยูเรีย และแอมโมเนียม-ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะใกล้เคียงกันคือ 7.5×10^{10} และ 1.1×10^{11} เซลล์ต่อมล. ตามลำดับและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จะเท่ากับ 0.44 และ 0.65 ที่ชั่วโมงที่ 168 ตามลำดับ (รูปที่ 37, 38)

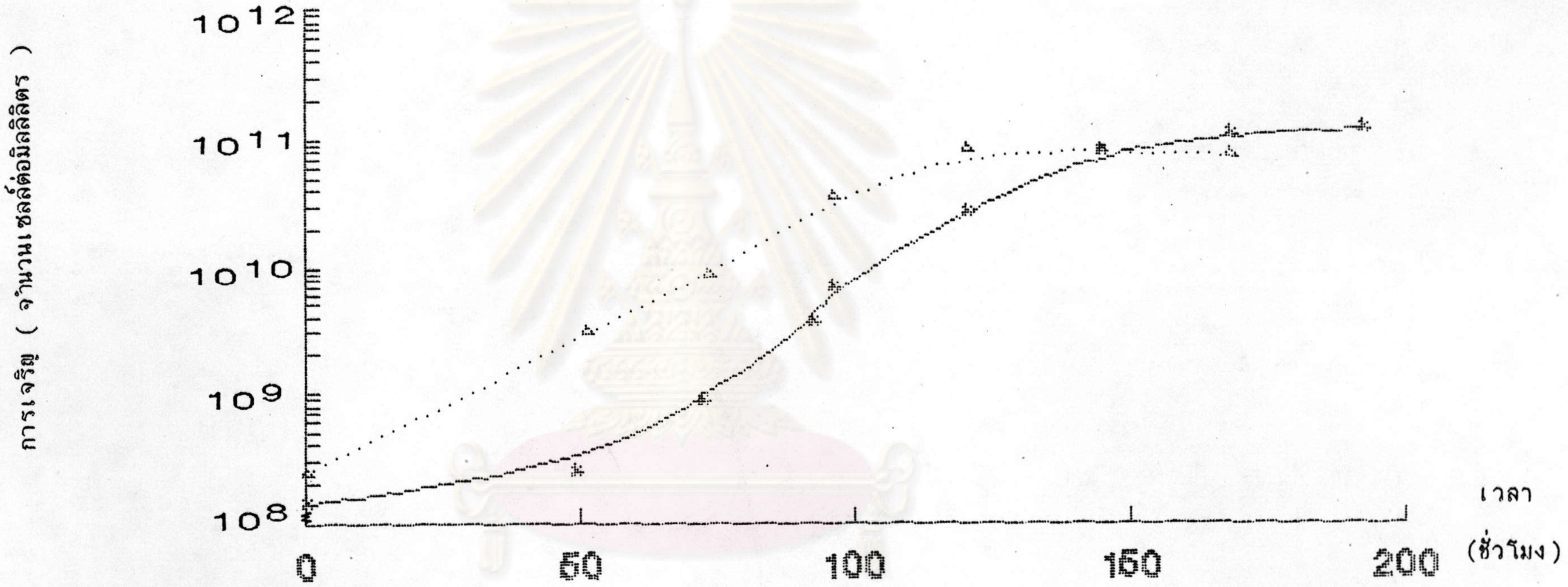
จากการคำนวณทางสถิติพบว่า แหล่งไนโตรเจนทั้งสองให้ค่า อัตราการเจริญจำเพาะและค่าผลผลิตต่างกัน แต่ปริมาณโปรตีนที่วัดโดยวิธี แบรดฟอร์ด และ วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต โดยแอมโมเนียมไนเตรตและยูเรียจะไม่ต่างกัน (ภาคผนวก ค)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

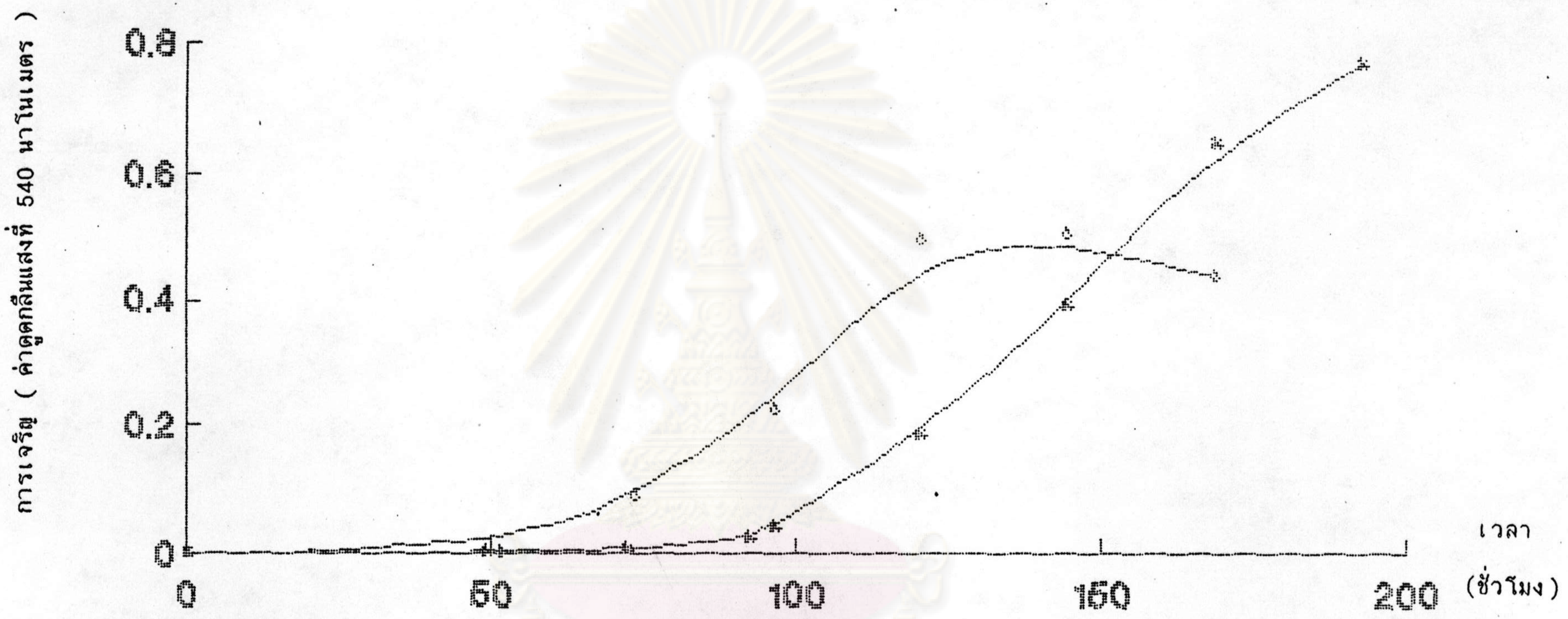
ตารางที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ Chlorella sp. B.K.1 ด้วยค่าอัตราการเจริญจำเพาะ, ผลผลิต และ ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที และ กรดแอซีติกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ Heterotrophic โดยใช้ยูเรีย หรือ แอมโมเนียมไนเตรต ที่ความเข้มข้น 1.87 มิลลิโมลาร์ การทดลองละ 10 ซ้ำ

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (ช.ม)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม.$^{-1}$)	ผลผลิต (ไมโครกรัม/มล./ชม.)	%โปรตีน แบรดฟอร์ด	%โปรตีน UV
NH_4NO_3	192	0.028	3.093	41.10	41.13
ยูเรีย	168	0.022	2.228	40.80	40.53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ต่อมล.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Chlorella* sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที ใช้ยูเรีย 1.87 มิลลิโมลาร์: --△-- หรือแอมโมเนียมไนเตรต 1.87 มิลลิโมลาร์: —*— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ



รูปที่ 38. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ <u>Chlorella</u> sp. B.K.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Beijerinck ในที่มืด ความเข้มข้นกรดแอซีติก 30 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการให้อากาศ 60 มล.ต่อนาที ใช้ยูเรีย 1.87 มิลลิโมลาร์: —◇— หรือแอมโมเนียมไนเตรต 1.87 มิลลิโมลาร์: —✳— ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ยของการทดลอง 10 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย