รายวิจัยฉบับสมบูณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยใช้เทคนิคสเปกโตรเมทรี

Developing of Quantification Method for Lipid in Microalgae using Spectrophotometry Techniques

เมธินี จามกระโทก และ มะลิวัลย์ คุตะโค

โครงการวิจัยประเภทเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802309

สัญญาเลขที่ 92/2558

รายวิจัยฉบับสมบูณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายโดย ใช้เทคนิคสเปกโตรเมทรี

Developing of Quantification Method for Lipid in Microalgae using Spectrophotometry Techniques

หัวหน้าโครงการ

ดร. เมธินี จามกระโทก

คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะลิวัลย์ คุตะโค

คณะเทคโนโลยีทางทะเล

มหาวิทยาบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

ตุลาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 92/2558

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through national Research Council of Thailand (Grant no. 92/25858)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กที่ถูกเพาะเลี้ยงขึ้นเพื่อเป็นแหล่งไขมันในการผลิตไบโอดีเซล ศึกษาผลของการเติมสารเคมีต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย้อมไขมันในเซลล์ของ Nile red เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันใน *Scenedesmus* sp. จากการติดตามพีคที่ 590 นาโนเมตร ซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ของ Nile red ที่ทำปฏิกิริยากับหยดไขมันในเซลล์ พบว่าเมื่อในทุกสภาวะที่ทำการทดลอง สารเคมี เช่น DMSO MeOH และ H_2SO_4 ที่ทดสอบไม่ปรากฏการเพิ่มขึ้นของความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าไม่การเกิดปฏิริยาระหว่าง Nile red และหยดไขมันภายในผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่ทำให้ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรสูงสุดเพื่อนำมาใช้การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีการย้อมด้วยสีย้อม Nile red กับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม *Nitzschia* sp. พบว่าถึงแม้ใช้ที่สภาวะการย้อมที่ทำให้ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร สูงที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณแบบ External standard และ Standard addition โดยใช้ ไขมันที่สกัดจากน้ำมันคาโนลาร์เป็นสารมาตรฐาน ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรกับจำนวนเซลล์ไม่มีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นตรง ไม่สามารถหาปริมาณไขมันโดยเทียบกับสารมารตรฐานได้ ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาการวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ที่มีการเติม Nile red ในส่วนสกัดไขมัน (extraction method) ที่ได้จากวิธีการสกัดของ Folch (Folch et al., 1956) และ Higgins และคณะ (Higgins B. T. *et al.*, 2014) พบว่าการใช้ส่วนสกัดที่ได้จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกจะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีมากของความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรกับปริมาณของเซลล์ ทั้งในการวิเคราะห์ปริมาณแบบ External standard และ standard addition แสดงว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้หาปริมาณไขมันได้ ทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ไขมันด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีเกวิเมตริกซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม พบว่าโดยส่วนใหญ่ปริมาณไขมันในเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *Nitzschial* sp. และ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์จากวิธีที่พัฒนาขึ้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลที่ได้จากวิธีแกรวิเมตริก ($p > 0.05$, ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยความแตกต่างผลการวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีเกรวิเมตริกจะพบในกรณีกับเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. เท่านั้น ($p < 0.05$, ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ดังนั้น เทคนิคการหาปริมาณไขมันที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยจึงมีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วเพียงพอและเหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันในกระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในการผลิตไบโอดีเซลได้

คำสำคัญ

Biodiesel, Natural lipid, microalgae, Nile red, external standard, standard addition

Abstract

This research attempt to develop fluorescent technique for the lipid determination in microalgae due to the most attractive source of natural lipid feedstock for biofuel production. The optimum condition for lipid qualification by staining method was explored in *Scenedesmus* sp.. According the monitoring of lipid-Nile red characteristic peak at 590 nanometer, the result reveal that the chemicals such as DMSO, MeOH and H_2SO_4 cannot increase the efficiency of Nile red dye penetrating to react with oil droplet in the cell. Moreover, the Nile red optimum condition for *Chlorella* sp. and *Nitzschia* sp study was performed using Nile red staining method. According to the fluctuation of fluorescent intensity at 590 nm, there cannot offer linear correlation with the number cells. Therefore, result suggest that the Nile red staining method is an insufficient method for natural lipid quantitation. In order to solve the inefficient of staining, the lipid extraction was carried out using modified method of Folch (Folch et al., 1956) and Higgins (Higgins B. T. et al., 2014). The lipid extracted of dry and wet cell of Chlorella sp. and *Nitzschia* sp were determined lipid quantity using Nile red as a fluorescent dye. Excellent linearity was established for external standard addition qualification methods. This finding is important to imply that this developed method is suitable for lipid measurement. By the comparison using Pair test at 95% confidence level with gravimetric conventional lipid quantification method, almost results show insignificant different between lipid quantities of developed method and conventional method. In summary, this developed assay could potentially method for natural lipid quantification in microalgae cultivation process in term of high accuracy, high precision and rapid.

Keywords :

Biodiesel, Natural lipid, microalgae, Nile red, external standard, standard addition

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	**ค**
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	**ง**
สารบัญ	**จ**
สารบัญตาราง	**ช**
สารบัญรูปภาพ	**ซ**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
1.1.1 การตรวจวัดไขมันด้วยตัวตรวจวัดโมเลกุลไขมัน หรือ lipid molecular probe	3
1.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณมันในสาหร่ายขนาดเล็ก	5
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	6
1.3 วัตถุประสงค์	7
1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย	8
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	**9**
2.1 เครื่องมือและสารเคมี	9
2.1.1 สารเคมี	9
2.1.2 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง	10
2.13 เครื่องฟลูออร์เรสเซนต์สเปกโตรมิเตอร์	10
2.2 วิธีการทดลอง	11
2.2.1 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method)	11
2.2.2 การเตรียมสารมาตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ (canola oil extract standard, CNE STD)	13
2.2.3 การหาปริมาณของไขมันเทคนิคแกรวิเมตริก	13
2.2.4 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อมด้วยสีย้อม Nile red (Staining method)	14
2.2.5 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method)	15
2.3 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	19

หน้า

บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง **20**

3.1 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method) 20

3.1.1 ศึกษาผลสารเคมีที่มีต่อการย้อมสีไขมันในเซลล์ของในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. 20

3.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายด้วยวิธีการย้อม (staining method) ด้วย Nile red และ Eosin Y 25

3.1.3 การหาปริมาณของไขมันในสาหร่ายสีเขียว โดยการย้อมด้วยสีย้อม Nile red 36

3.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) 40

3.2.1 การหาปริมาณของไขมันเทคนิคแกรวิเมตริกจากเซลล์เปียกและแห้ง 40

3.2.2 ผลการของเติมตัวออกซิไดส์ NaClO และ H_2O_2 ต่อความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ในการหาปริมาณไขมันโดยวิธีการสกัด 41

3.2.3 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายและไดอะตอมโดยวิธีการสกัด 43

บทที่ 4 สรุปการวิจัย **55**

4.1 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method) 55

4.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) 56

4.3 ข้อเสนอแนะ 56

4.4 การนำไปใช้ประโยชน์และ 56

รายงานการเงิน **57**

บรรณานุกรม **58**

ประวัตินักวิจัย **60**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ชนิดและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)	2
3.1	ปริมาณของไขมันเทคนิคแกรวิเมตริกจากเซลล์เปียกและเซลล์แห้งของ *Chlorelllar* sp. และ *Nitzschia* sp.	41
3.2	ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้ง ของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard	44
3.3	ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้ง ของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard	46
3.4	ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard	48
3.5	ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard	49
3.6	ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition	51
3.7	ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้งของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition	53
3.8	ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition	53
3.9	ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition	54

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้าง lipid molecular probe ซึ่งได้มีการปรับปรุงโครงสร้างสีย้อมอินทรีย์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent dye) (Maier *et al.*, 2002) โดยหมู่ R คือส่วนที่มีโครงสร้างคล้ายไขมันหรือหมู่ฟังก์ชั่นอื่นๆ	2
1.2	โครงสร้างของสีย้อมอินทรีย์ที่ใช้เป็นที่ใช้เป็น lipid molecular probes	4
2.1	เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Carry Eclipse fluorescence spectrometer ที่ติดตั้ง Microplate reader	11
3.1	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% DMSO	21
3.2	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ MeOH เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% MeOH	22
3.3	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ H_2SO_4 เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% H_2SO_4	23
3.4	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ H_3PO_4 เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% H_3PO_4	24
3.5	การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ *Scenedesmus* sp. 3×10^6 เซลล์ และ Nile red 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มี 25% DMSO MeOH H_2SO_4 และ H_3PO_4 เปรียบเทียบกับในสภาวะที่เดียวกันของน้ำมันมะกอก	25
3.6	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30% เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 °C ตามลำดับ	26
3.7	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในไดอะตอม *Nitz*schia sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30% เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 °C ตามลำดับ	27

รูปที่ **หน้า**

3.8 Normalize intensity ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. 3×10^6 เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 1-30% ที่เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 °C ตามลำดับ 28

3.9 Normalize intensity ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของ Nile red 0.5-5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. 3×10^6 เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ที่เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 °C ตามลำดับ 29

3.10 Normalize intensity ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. 3×10^6 เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ DMSO 5% ที่เวลาในการทำ incubation เท่ากับ 10 20 30 และ 40 นาที ที่อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C 30

3.11 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Eosin Y (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30% 32

3.12 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Eosin Y (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในไดอะตอม *Nitz*schia sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30% 32

3.13 Normalize intensity ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ของ Eosin Y (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 1-30% 33

3.14 Normalize intensity ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของ Eosin Y 0.5-5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% 34

3.15 การเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ที่ เวลา 15 30 และ 40 นาที ของ *Chlorelllar* sp. และ *Nitzschia* sp. 3×10^6 เซลล์ และ Eosin Y 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ความเข้มข้นของ Eosin Y เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C 35

3.16 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ CNE standard 0-50 ไมโครกรัม ใน Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C 36

3.17 กราฟมาตรฐานของไขมันที่สกัดจากน้ำมันคาโนลาร์ หรือ CNE standard ความเข้มข้น 0-40 ไมโครกรัม (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง) 37

รูปที่		หน้า
3.18	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ ของ ก) *Chlorelllar* sp. ข) *Nitzschia* sp. ที่จำนวนของเซลล์แตกต่างกัน ใน Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO และ ค) การเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ *Chlorelllar* sp. และ *Nitzschia* sp. ที่จำนวนของเซลล์แตกต่างกัน ใน Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO	38
3.19	ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของสารมาตรฐาน CNE standard 0-20 ไมโครกรัม ที่มีการเติมสาหร่าย ก) *Chlorelllar* sp. และ ข) $3x10^6$ เซลล์ ในสภาวะที่ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO	39
3.20	ก) ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัม Nile red ในวิธีการย้อม (stain) และใช้ส่วนสกัดไขมัน (extract) ของ *Chlorelllar* sp. (C) และ *Nitzschia* sp. (N) และมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ที่ได้จากส่วนสกัดไขมัน (ext) และการย้อมไขมันในเซลล์ (stain) ของ ก) *Chlorelllar* sp. และ ข) *Nitzschia* sp. ในสภาวะที่ความเข้มข้น Nile red เท่ากับ2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5% DMSO และ 0.3% NaClO หรือ H_2O_2	42
3.21	กราฟมาตรฐานของสารมารตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาโนลา หรือ CNE standard ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม ที่ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง)	44
3.22	การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ที่ปริมาณของส่วนสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของ *Nitzschia* sp. 0-500 ไมโครกรัม (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)	45
3.23	การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ของส่วนสกัดไขมันที่จากเซลล์เปียกของ *Chlorella* sp. $2.5 x10^4$ -$10 x10^4$ เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C โดยใช้เวลาในการ incubation 30 นาที	47
3.24	การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ของส่วนสกัดไขมันท่ำด้จากเซลล์เปียกของ *Nitzschia* sp. $2.5 x10^4$ -$25 x10^4$ เซลล์ (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)	48

รูปที่		หน้า
3.25	การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรของสารมาตรฐาน CNE 0-50 ไมโครกรัม ที่มีการเติมส่วนสกัดจากไขมันที่ได้จากเซล์แห้งของ *Chlorella* sp. 500 ไมโครกรัม (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)	50
3.26	การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรของสารมาตรฐาน CNE 0-50 ไมโครกรัม ที่มีการเติมส่วนสกัดจากไขมันที่ได้จากเซล์แห้งของ *Nitzschia* sp. 100 200 และ 500 ไมโครกรัม (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)	52

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 เครื่องมือและสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย

สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงสหร่ายทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

(ก) สารเคมีสำหรับอาหารสูตร Modified Chu 13 สำหรับการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. (Largeau *et al*.,1980)

- KNO_3
- K_2HPO_4
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- Feric citrate
- Citric acid
- H_3BO_3
- $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$
- $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
- $CuSo_4 \cdot 5\ H_2O$
- $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$
- $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$

(ข) สารเคมีสำหรับอาหารสูตร F/2 สำหรับการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ไดอะตอม *Nitzschia* sp. (Gillard medium (*Guilllard*,1975)

- $NaNO_3$
- $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
- $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$
- Na_2EDTA
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$
- Thiamine HCk
- Biotin
- Vitamin B12

- Agar powder

2.1.1.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

สารเคมีประภทสีย้อมทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดใช้ในเกรดสเปกโตรสโกปีโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม และน้ำที่ใช้เป็นเกรด Ultrapure (MilliQ water)

- Nile Red, (Sigma-Aldrich)
- Eosin Y (Sigma-Aldrich)
- Acetone (Sigma-Aldrich)
- Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- Methanol, MeOH (Sigma-Aldrich)
- H_3PO_4 (Sigma-Aldrich)
- Chloroform, $CHCl_3$ (Sigma-Aldrich)
- Oleic acid (Sigma-Aldrich)
- NaOCl (Sigma-Aldrich)
- H_2O_2 (Sigma-Aldrich)
- Anhydrous Na_2SO_4 (Sigma-Aldrich)

2.1.2 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายและไดอะตอมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ท้งหมดได้มาจากแยกและเลี้ยง ณ ศูนย์วิจัยทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด คือ *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp. การเลี้ยงสาหร่ายและไดอะตอมใช้วิธีการเลี้ยงแบบออร์โทฟิค โดยการนำหัวเชื้อของสาหร่ายแต่ละชนิดมาเพิ่มจำนวนด้วยการขยายการเจริญเติบโตโดยการเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร เลี้ยงด้วยอาหารสูตรของกิลลารด์หรือ F/2 หรือ Modified Chu 13 (ความเค็ม 30 PSU) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 5,500 ลักซ์ จากหลอด LED และให้อากาศตลอดเวลา จนกระทั่งสาหร่ายหรือไดอะตอมเติบโตจนถึงระยะที่การเจริญเติบโตของเซลล์หยุดนิ่ง หรือ stationary phase จึงนำไปใช้ในการทดลอง

2.1.3 เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การวัดฟลูออร์เรสเซนส์เสปกตรัมทั้งหมดในงานวิจัยนี้จะใช้เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Carry Eclipse fluorescence spectrometer ที่มีแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัด (detector) เป็น Xenon flash lamp และ Photomultiplier tube (PMT) ตามลำดับ การวัดฟลูออร์เรสเซนส์เสปกตรัมทั้งหมดจะใช้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตรในระดับไมโครลิตร ดังนั้นใน

งานวิจัยนี้เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้จะมีการติดตั้งอุปกณ์เพิ่มเติม คือ Microplate Reader ตามรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Carry Eclipse fluorescence spectrometer ที่ติดตั้ง Microplate reader

ในการตรวจวัดฟลูออร์เรสเซนซ์สเปกตรัมของสารตัวอย่างจะทำการวัดโดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ชนิด 96 well plate ใช้ mode scan ในการวัด ทำการวัดแบบ pre-scan ก่อน เพื่อหา *Excitation wavelength* และสภาวะของเครื่องมือ ที่เหมาะสมในการตรวจวัดฟลูออร์เรสเซนซ์สเปกตรัมของสารตัวอย่าง

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method)

2.2.1.1 ศึกษาผลสารเคมีที่มีต่อการย้อมสีไขมันในเซลล์ของในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

ปิเปตเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ในระยะ stationary phase ให้มีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 3×10^6 เซลล์ ใส่หลอด Eppendorf 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำ MilliQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง เซลล์ของสาหร่ายจะมีลักษณะเป็นแผ่น เติมสารละลาย Nile red ใน DMSO ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารเคมีที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ 1) DMSO 2) MeOH 3) H_2SO_4 และ 4) H_3PO_4 ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีที่ต้องการทดสอบ เท่ากับ 0 และ 25% เติมน้ำเพื่อเจือจางให้มีปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทำชุดการทดลองเปรียบโดยการเตรียมสารละลายตัวอย่างแบบเดียวกันโดยใช้น้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แทนเซลล์สาหร่าย เขย่าสารละลายตัวอย่าง ด้วยเครื่องเขย่าสาร vortex 30 วินาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอัลตราโซนิคที่มีอุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

2.2.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายด้วยวิธีการย้อมด้วย Nile red และ Eosin Y

นำสาหร่ายสีเขียว คือ *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม คือ *Nitzschia* sp. ทำการมาทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมไขมันในเซลล์ของสาหร่ายและไดอะตอม นำเซลล์สาหร่ายหรือไดอะตอมในระยะ stationary phase จำนวน 3×10^6 เซลล์ ใส่ใน Eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น เติมสารละลาย Nile red หรือ Eosin Y ใน DMSO ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมตัวทำละลายอื่นๆ ที่ต้องการเติมน้ำ MilliQ เพื่อเจือจางให้มีปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

ในการทดลองนี้จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย้อมสีของสีย้อมไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายเพื่อหาสภาวะที่ที่ใช้เพื่อหาปริมาณไขมันโดยวิธีการย้อม ดังนี้ 1) ความเข้มข้น DMSO 2) ความเข้มข้นของสีย้อม 3) อุณหภูมิ และ 4) เวลาในการ incubation

2.2.2 การเตรียมสารมาตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ (canola oil extract standard, CNE STD)

สารมาตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ หรือ canola oil extract standard, CNE STD เตรียมจากน้ำมันคาร์โนลาร์ (Crisco) ที่ซื้อมาจากท้องตลาด น้ำหนัก 2.000 กรัม ใส่ลงในกรวยแยก เติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) 10 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % w/v) 10 มิลลิลิตร แยกส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ใส่ขวดรูปกรวย ส่วนชั้นน้ำนำมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายอินทรีย์ผสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำส่วนสารละลายอินทรีย์ทั้งหมดมาทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous Na_2SO_4 แล้วกรองเอา anhydrous Na_2SO_4 ออก กำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง ถ่ายของเหลวของไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ลงใน vial จากนั้นทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ 24 ชั่วโมง แล้วเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เก็บสารมาตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ หรือ CNE STD ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

2.2.3 การหาปริมาณของไขมันเทคนิคแกรวิเมตริก (Folch *et al*., 1956)

นำสาหร่ายหรือไดอะตอมที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยระบบ freeze dry จำนวน 50 มิลลิกรัม หรือเซลล์เปียกจำนวน 2.5 $\times 10^6$ เซลล์ ที่ผ่านการล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง และดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วบดเซลล์ด้วย Tissue grinder เติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) 4 มิลลิลิตร แช่ในอ่างอุลตราโซนิค 20 นาที นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอาเศษเนื้อเยื่อออก นำส่วนสารละลายที่ได้มาเติมโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % w/v) 800 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vortex 3-4 นาที และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนสารละลายอินทรีย์ใส่ขวด vial ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ส่วนสารละลายชั้นน้ำนำมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายอินทรีย์ผสม ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vortex 3-4 นาที และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีเก็บส่วนสารละลายอินทรีย์รวมใส่ขวด vial ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นทำให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน และชั่งขวด vial อีกครั้ง โดยนำค่าที่ได้ลบกับค่าน้ำหนักเปล่าของขวด vial เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมัน

2.2.4 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อมด้วยสีย้อม Nile red (Staining method)

2.2.4.1 การปริมาณด้วยวิธี External standard

1) เตรียมกราฟสารละลายมาตรฐาน CNE STD ความเข้มข้น 0-40 มิลลิกรัม ปิเปต สารละลาย CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0 5 10 20 30 และ 40 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย DMSO 25 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำอุลตราโซนิค ที่ อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วย MilliQ water ให้ให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

2) การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method) แบบ external standard

นำสาหร่ายสีเขียว คือ *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม คือ *Nitzschia* sp. ในระยะ stationary phase จำนวน 1×10^6, 5×10^6, 10×10^6, 20×10^6, 50×10^6 และ 100×10^6 เซลล์ ใส่ใน Eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น เติมตัวทำละลาย DMSO 25 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำอุลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที สารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วย MilliQ water ให้ให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE

2.2.4.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method) แบบ Standard addition

นำสาหร่ายสีเขียว คือ *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม คือ *Nitzschia* sp. ในระยะ stationary phase จำนวน 3×10^6 เซลล์ ใส่ใน Eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น เติมสารละลายมาตรฐาน CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0, 1, 2, 4, 8, 10, และ 20 ไมโครลิตร เติมสารตัวทำละลาย DMSO 25 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำอุลตราโซนิค ที่ อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที สารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วย MilliQ water ให้ให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือแบบเดียวกับการปริมาณด้วยวิธี External standard

2.2.5 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method)

2.2.5.1 การสกัดไขมันจากเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม

นำสาหร่ายหรือไดอะตอมที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยระบบ freeze dry จำนวน 10 มิลลิกรัม หรือ เซลล์เปียกจำนวน 2.5×10^6 เซลล์ ที่ผ่านการล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง และดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) 3 มิลลิลิตร แช่ในอ่างอุลตราโซนิค 30 นาที เติมโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % w/v) 3 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ใส่ในขวด vial ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) ครั้งละ 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vortex 3-4 นาที และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รวมส่วนสารละลายอินทรีย์ทั้งหมด นำส่วนสารละลายอินทรีย์ทั้งหมดมาทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous Na_2SO_4 แล้วกรองเอา anhydrous Na_2SO_4 ออก กำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง ทำให้แห้งต่อภายใต้สุญญากาศ 24 ชั่วโมง แล้วเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เก็บส่วนสกัดไขมันจากเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม (lipid extracted crude) ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.2.5.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัดด้วยสีย้อม Nile red (Extraction method) แบบ External standard

1) การสร้างกราฟมาตรฐาน CNE STD ความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัม

ปิเปิตสารละลาย CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0, 5, 10, 25 และ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaClO 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

2) การหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้งสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ External Standard

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 1

$$\text{ปริมาณไขมัน (ไมโครกรัม)} = \frac{I_{590nm} - intercept}{slope} \quad (1)$$

เมื่อ I_{590nm} = ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร

Intercept = ค่าจุดตัดแกน y ของกราฟมารตรฐาน CNE

Slope = ความชันของกราฟมารตรฐาน CNE

3) การหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียกสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ External Standard

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์เปียกสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 20, 50, 100 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียก ตามสมการที่ 1

2.2.5.3 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัดด้วยสีย้อม Nile red (Extraction method) แบบ Standard addition

1) การหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้งสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ Standard addition

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0 25 50 100 200 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐาน CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0 5 10 25 และ 50 ไมโครลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 0.6 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรส

เซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร สร้างกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 2 นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 2

ปริมาณไขมัน (ไมโครกรัม) = - (x-intercept) (2)

เมื่อ x-Intercept = ค่าจุดตัดแกน x เมื่อ y = 0

2) การหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียกสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ Standard addition

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์เปียกสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 20, 50, 100 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐาน CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0, 5, 10, 25, และ 50 ไมโครลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียก ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 2

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทำ Linear regression และการเปรียบเทียบปริมาณไขมันจากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริกกับปริมาณไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ ใช้ Pair t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OringinPro 8

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 เครื่องมือและสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย

สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงสหร่ายทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

(ก) สารเคมีสำหรับอาหารสูตร Modified Chu 13 สำหรับการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. (Largeau *et al*.,1980)

- KNO_3
- K_2HPO_4
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- Feric citrate
- Citric acid
- H_3BO_3
- $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$
- $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
- $CuSo_4 \cdot 5\ H_2O$
- $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$
- $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$

(ข) สารเคมีสำหรับอาหารสูตร F/2 สำหรับการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ไดอะตอม *Nitzschia* sp. (Gillard medium (*Guilllard*,1975)

- $NaNO_3$
- $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
- $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$
- Na_2EDTA
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$
- Thiamine HCk
- Biotin
- Vitamin B12

- Agar powder

2.1.1.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

สารเคมีประภทสีย้อมทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดใช้ในเกรดสเปกโตรสโกปีโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม และน้ำที่ใช้เป็นเกรด Ultrapure (MilliQ water)

- Nile Red, (Sigma-Aldrich)
- Eosin Y (Sigma-Aldrich)
- Acetone (Sigma-Aldrich)
- Dimethyl sulfoxide, DMSO (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- Methanol, MeOH (Sigma-Aldrich)
- H_3PO_4 (Sigma-Aldrich)
- Chloroform, $CHCl_3$ (Sigma-Aldrich)
- Oleic acid (Sigma-Aldrich)
- NaOCl (Sigma-Aldrich)
- H_2O_2 (Sigma-Aldrich)
- Anhydrous Na_2SO_4 (Sigma-Aldrich)

2.1.2 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายและไดอะตอมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ท้งหมดได้มาจากแยกและเลี้ยง ณ ศูนย์วิจัยทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสาหร่ายสีเขียว 2 ชนิด คือ *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp. การเลี้ยงสาหร่ายและไดอะตอมใช้วิธีการเลี้ยงแบบออร์โทฟิค โดยการนำหัวเชื้อของสาหร่ายแต่ละชนิดมาเพิ่มจำนวนด้วยการขยายการเจริญเติบโตโดยการเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร เลี้ยงด้วยอาหารสูตรของกิลลารด์หรือ F/2 หรือ Modified Chu 13 (ความเค็ม 30 PSU) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้ม 5,500 ลักซ์ จากหลอด LED และให้อากาศตลอดเวลา จนกระทั่งสาหร่ายหรือไดอะตอมเติบโตจนถึงระยะที่การเจริญเติบโตของเซลล์หยุดนิ่ง หรือ stationary phase จึงนำไปใช้ในการทดลอง

2.1.3 เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การวัดฟลูออร์เรสเซนส์เสปกตรัมทั้งหมดในงานวิจัยนี้จะใช้เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Carry Eclipse fluorescence spectrometer ที่มีแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัด (detector) เป็น Xenon flash lamp และ Photomultiplier tube (PMT) ตามลำดับ การวัดฟลูออร์เรสเซนส์เสปกตรัมทั้งหมดจะใช้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตรในระดับไมโครลิตร ดังนั้นใน

งานวิจัยนี้เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้จะมีการติดตั้งอุปกณ์เพิ่มเติม คือ Microplate Reader ตามรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Carry Eclipse fluorescence spectrometer ที่ติดตั้ง Microplate reader

ในการตรวจวัดฟลูออร์เรสเซนซ์สเปกตรัมของสารตัวอย่างจะทำการวัดโดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ชนิด 96 well plate ใช้ mode scan ในการวัด ทำการวัดแบบ pre-scan ก่อน เพื่อหา *Excitation wavelength* และสภาวะของเครื่องมือ ที่เหมาะสมในการตรวจวัดฟลูออร์เรสเซนซ์สเปกตรัมของสารตัวอย่าง

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method)

2.2.1.1 ศึกษาผลสารเคมีที่มีต่อการย้อมสีไขมันในเซลล์ของในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

ปิเปตเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ในระยะ stationary phase ให้มีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 3×10^6 เซลล์ ใส่หลอด Eppendorf 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำ MilliQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง เซลล์ของสาหร่ายจะมีลักษณะเป็นแผ่น เติมสารละลาย Nile red ใน DMSO ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารเคมีที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ 1) DMSO 2) MeOH 3) H_2SO_4 และ 4) H_3PO_4 ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีที่ต้องการทดสอบ เท่ากับ 0 และ 25% เติมน้ำเพื่อเจือจางให้มีปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทำชุดการทดลองเปรียบโดยการเตรียมสารละลายตัวอย่างแบบเดียวกันโดยใช้น้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แทนเซลล์สาหร่าย เขย่าสารละลายตัวอย่าง ด้วยเครื่องเขย่าสาร vortex 30 วินาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอัลตราโซนิคที่มีอุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

2.2.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายด้วยวิธีการย้อมด้วย Nile red และ Eosin Y

นำสาหร่ายสีเขียว คือ *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม คือ *Nitzschia* sp. ทำการมาทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมไขมันในเซลล์ของสาหร่ายและไดอะตอม นำเซลล์สาหร่ายหรือไดอะตอมในระยะ stationary phase จำนวน 3×10^6 เซลล์ ใส่ใน Eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น เติมสารละลาย Nile red หรือ Eosin Y ใน DMSO ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมตัวทำละลายอื่นๆ ที่ต้องการเติมน้ำ MilliQ เพื่อเจือจางให้มีปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

ในการทดลองนี้จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย้อมสีของสีย้อมไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายเพื่อหาสภาวะที่ที่ใช้เพื่อหาปริมาณไขมันโดยวิธีการย้อม ดังนี้ 1) ความเข้มข้น DMSO 2) ความเข้มข้นของสีย้อม 3) อุณหภูมิ และ 4) เวลาในการ incubation

2.2.2 การเตรียมสารมาตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ (canola oil extract standard, CNE STD)

สารมาตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ หรือ canola oil extract standard, CNE STD เตรียมจากน้ำมันคาร์โนลาร์ (Crisco) ที่ซื้อมาจากท้องตลาด น้ำหนัก 2.000 กรัม ใส่ลงในกรวยแยก เติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) 10 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % w/v) 10 มิลลิลิตร แยกส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ใส่ขวดรูปกรวย ส่วนชั้นน้ำนำมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายอินทรีย์ผสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำส่วนสารละลายอินทรีย์ทั้งหมดมาทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous Na_2SO_4 แล้วกรองเอา anhydrous Na_2SO_4 ออก กำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง ถ่ายของเหลวของไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ลงใน vial จากนั้นทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ 24 ชั่วโมง แล้วเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เก็บสารมาตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาร์โนลาร์ หรือ CNE STD ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

2.2.3 การหาปริมาณของไขมันเทคนิคแกรวิเมตริก (Folch *et al*., 1956)

นำสาหร่ายหรือไดอะตอมที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยระบบ freeze dry จำนวน 50 มิลลิกรัม หรือเซลล์เปียกจำนวน 2.5 $\times 10^6$ เซลล์ ที่ผ่านการล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง และดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วบดเซลล์ด้วย Tissue grinder เติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) 4 มิลลิลิตร แช่ในอ่างอุลตราโซนิค 20 นาที นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอาเศษเนื้อเยื่อออก นำส่วนสารละลายที่ได้มาเติมโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % w/v) 800 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vortex 3-4 นาที และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนสารละลายอินทรีย์ใส่ขวด vial ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ส่วนสารละลายชั้นน้ำนำมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายอินทรีย์ผสม ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vortex 3-4 นาที และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีเก็บส่วนสารละลายอินทรีย์รวมใส่ขวด vial ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นทำให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน และชั่งขวด vial อีกครั้ง โดยนำค่าที่ได้ลบกับค่าน้ำหนักเปล่าของขวด vial เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมัน

2.2.4 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อมด้วยสีย้อม Nile red (Staining method)

2.2.4.1 การปริมาณด้วยวิธี External standard

1) เตรียมกราฟสารละลายมาตรฐาน CNE STD ความเข้มข้น 0-40 มิลลิกรัม ปิเปต สารละลาย CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0 5 10 20 30 และ 40 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย DMSO 25 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำอุลตราโซนิค ที่ อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วย MilliQ water ให้ให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

2) การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method) แบบ external standard

นำสาหร่ายสีเขียว คือ *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม คือ *Nitzschia* sp. ในระยะ stationary phase จำนวน 1×10^6, 5×10^6, 10×10^6, 20×10^6, 50×10^6 และ 100×10^6 เซลล์ ใส่ใน Eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น เติมตัวทำละลาย DMSO 25 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำอุลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที สารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วย MilliQ water ให้ให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE

2.2.4.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method) แบบ Standard addition

นำสาหร่ายสีเขียว คือ *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม คือ *Nitzschia* sp. ในระยะ stationary phase จำนวน 3×10^6 เซลล์ ใส่ใน Eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น เติมสารละลายมาตรฐาน CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0, 1, 2, 4, 8, 10, และ 20 ไมโครลิตร เติมสารตัวทำละลาย DMSO 25 ไมโครลิตร แช่ในอ่างน้ำอุลตราโซนิค ที่ อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที สารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วย MilliQ water ให้ให้มีปริมาตรเท่ากับ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือแบบเดียวกับการปริมาณด้วยวิธี External standard

2.2.5 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method)

2.2.5.1 การสกัดไขมันจากเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม

นำสาหร่ายหรือไดอะตอมที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยระบบ freeze dry จำนวน 10 มิลลิกรัม หรือ เซลล์เปียกจำนวน 2.5×10^6 เซลล์ ที่ผ่านการล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MillQ 2 ครั้ง และดูดของเหลวทั้งหมดทิ้ง ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นแผ่น ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) 3 มิลลิลิตร แช่ในอ่างอุลตราโซนิค 30 นาที เติมโซเดียมคลอไรด์ (0.9 % w/v) 3 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเฉพาะส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ใส่ในขวด vial ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ผสม (Chloroform : MeOH 2:1) ครั้งละ 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vortex 3-4 นาที และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที รวมส่วนสารละลายอินทรีย์ทั้งหมด นำส่วนสารละลายอินทรีย์ทั้งหมดมาทำให้ปราศจากน้ำโดยเติม anhydrous Na_2SO_4 แล้วกรองเอา anhydrous Na_2SO_4 ออก กำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง ทำให้แห้งต่อภายใต้สุญญากาศ 24 ชั่วโมง แล้วเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เก็บส่วนสกัดไขมันจากเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม (lipid extracted crude) ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.2.5.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัดด้วยสีย้อม Nile red (Extraction method) แบบ External standard

1) การสร้างกราฟมาตรฐาน CNE STD ความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัม

ปิเปิตสารละลาย CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0, 5, 10, 25 และ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaClO 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

2) การหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้งสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ External Standard

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 1

$$\text{ปริมาณไขมัน (ไมโครกรัม)} = \frac{I_{590nm} - intercept}{slope} \quad (1)$$

เมื่อ I_{590nm} = ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร

Intercept = ค่าจุดตัดแกน y ของกราฟมารตรฐาน CNE

Slope = ความชันของกราฟมารตรฐาน CNE

3) การหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียกสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ External Standard

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์เปียกสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 20, 50, 100 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียก ตามสมการที่ 1

2.2.5.3 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัดด้วยสีย้อม Nile red (Extraction method) แบบ Standard addition

1) การหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้งสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ Standard addition

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0 25 50 100 200 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐาน CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0 5 10 25 และ 50 ไมโครลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 0.6 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรส

เซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm
End: 750 nm
Excitation wavelength: 500 nm
Excitation Slit: 5.0 nm
Emission Slit: 5.0 nm
Scan rate: 120 nm/min
PMT = 750 voltage

นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร สร้างกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 2 นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 2

ปริมาณไขมัน (ไมโครกรัม) = - (x-intercept) (2)

เมื่อ x-Intercept = ค่าจุดตัดแกน x เมื่อ y = 0

2) การหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียกสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method) แบบ Standard addition

ปิเปตสารละลายส่วนสกัดไขมันจากเซลล์เปียกสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. และ ไดอะตอม *Nitzschia* sp. ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 20, 50, 100 และ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐาน CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0, 5, 10, 25, และ 50 ไมโครลิตร ระเหยตัวทำละลายโดยให้ความร้อนด้วย heating block อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมตัวทำละลาย isopropanol 40 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Nile red ใน MilliQ water ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 320 ไมโครลิตร และเติม 3 % NaOCl 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ่ายสารละลายตัวอย่างทั้งหมดใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ใส่ลงใน Microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือเดียวสารมาตรฐาน CNE นำความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ (Intensity) ที่ 590 นาโมเมตร ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์เปียก ไปเปรียบเทียบกับกราฟมารตฐาน CNE เพื่อคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้ง ตามสมการที่ 2

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทำ Linear regression และการเปรียบเทียบปริมาณไขมันจากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริกกับปริมาณไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ ใช้ Pair t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OringinPro 8

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method)

3.1.1 ศึกษาผลสารเคมีที่มีต่อการย้อมสีไขมันในเซลล์ของในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

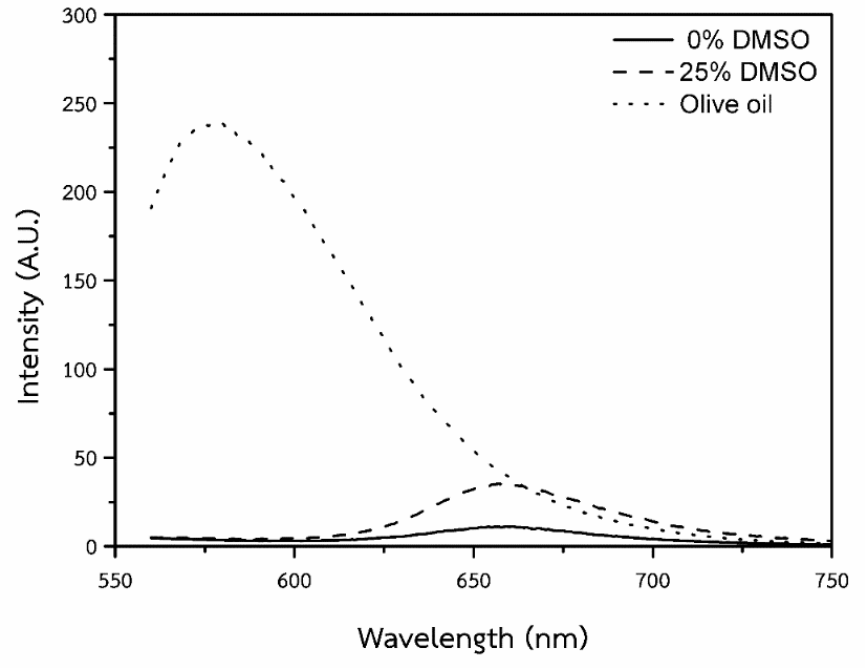
การทดลองนี้จะเป็นการศึกษาผลสารเคมีที่มีต่อการย้อมสีไขมันในเซลล์ของในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. โดยใช้สีย้อมไขมัน Nile red ซึ่งเป็นสีย้อมไขมันชนิดฟลูออร์เรสเซนส์ ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ไขมันมากที่สุด ในการทดลองจะใช้วิธีการย้อม (staining method) โดยศึกษาผลของสารเคมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ 1) DMSO 2) MeOH 3) H_2SO_4 และ 4) H_3PO_4 ที่มีผลต่อการย้อมสีของไขมันภายในเลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยคาดหวังว่าสารเคมีเหล่านี้จะช่วยในทะลุผ่านผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว เช่น *Scenedesmus* sp. ซึ่งมีองค์ประกอบด้วยเซลลูโลส และเมื่อเกิดการทะลุผ่านผนังเซลล์ของสีย้อมไขมันเกิดขึ้น ปริมาณไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวก็สามารถตรวจวัดหรือหาปริมาณได้โดยความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ของสีย้อมที่ทำปฏิกิริยากับไขมันในสาหร่าย

3.1.1.1 ผลของ DMSO ที่มีผลการย้อมสีไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบการย้อมไขมันของสีย้อม Nile red ในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว ในสภาวะ 0% และ 25% DMSO เปรียบเทียบกับสภาวะเดียวกันที่ใช้น้ำมันมะกอก เพื่อเป็นตัวแทนของไขมัน ในการทดลองนี้ใช้สาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) หรือน้ำมันมะกอก (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผสมกับ Nile red ความเข้มข้น 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม DMSO และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร incubation ในอ่างอุลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะปิเปตสารละลายจำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate และนำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ microplate reader ที่ excitation wavelength เท่ากับ 500 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.1

จากฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมในสภาวะที่มีสาหร่าย *Scenedesmus* sp. พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มขันของ DMSO เท่ากับ 0 และ 25% จะปรากฏของตำแหน่งของความยาวคลื่นที่มีความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์สูงสุด หรือ $\lambda_{emission}$ ที่เดียวกัน คือ 670 นาโนเมตร ในขณะที่การทดลองในน้ำมันมะกอกจะพบตำแหน่งของ $\lambda_{emission}$ ของ Nile red อยู่ที่ 590 นาโนเมตร จากฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมที่เกิดขึ้นแสดงว่าการย้อมสีไขมันในสาหร่าย *Scenedesmus* sp. หรือปฏิกิริยาระหว่างไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายกับสีย้อม Nile red ไม่เกิดขึ้น ในสภาวะที่มีตัวทำละลาย DMSO การปรากฏพีคที่ 670 นาโนเมตร แสดงว่าสีย้อม Nile red อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีขั้วหรือยังคงอยู่ในสารละลายเอเควียส ซึ่งถ้าการย้อมสีไขมันของ Nile red เกิดขึ้น ควรจะเกิดพีคที่ประมาณ 580-590 นาโนเมตร ซึ่งเป็นพีคของ Nile red ในสภาพแวดล้อมที่เป็น hydrophobic ในการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติม DMSO และการให้ความร้อนในระหว่างการ incubation ไม่สามารถทำให้ Nile red การทะลุผ่านผนังเซลล์ของสาหร่ายสี

เขียวอย่าง *Scenedesmus* sp. ได้ Nile red ยังคงอยู่ภายนอกเซลล์ จึงพบ $\lambda_{emission}$ ที่ 670 นาโนเมตร เป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ในตัวทำละลายที่มีขั้ว หรือสภาพแวดล้อมที่เป็น hydrophilic นั่นเอง



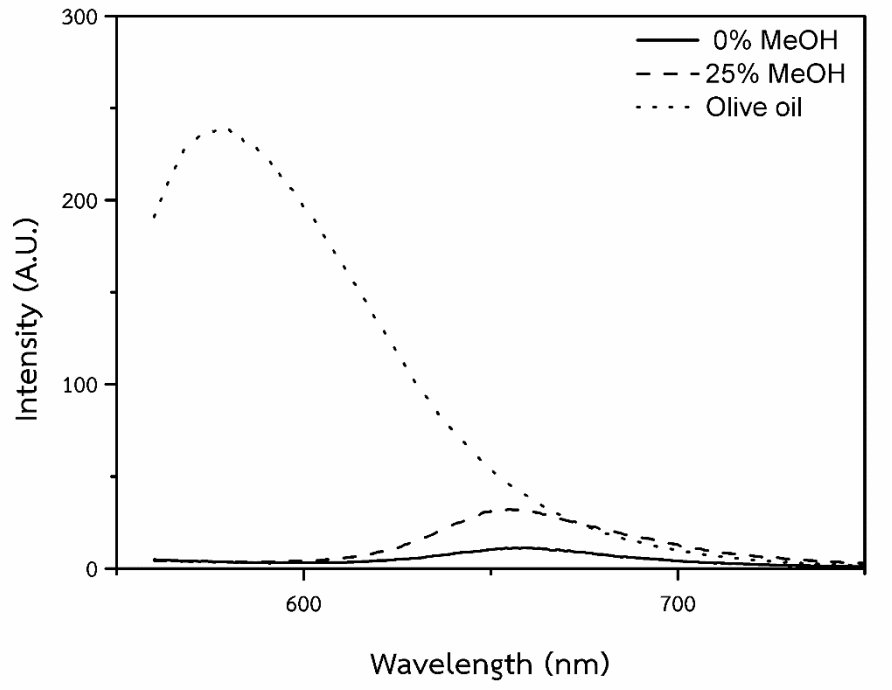
รูปที่ 3.1 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% DMSO

3.1.1.2 ผลของ MeOH ที่มีผลการย้อมสีไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

ทดสอบการย้อมไขมันของสีย้อม Nile red ในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว ในสภาวะ 0% และ 25% MeOH เปรียบเทียบกับสภาวะเดียวกันที่ใช้น้ำมันมะกอก ในการทดลองนี้ใช้สาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) หรือ น้ำมันมะกอก (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผสมกับ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม MeOH และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการเขย่า และ incubation ในอ่างอุลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะปิเปตสารละลายจำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate และนำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ microplate reader ที่ excitation wavelength เท่ากับ 500 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.2

จากฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมในสภาวะที่มีสาหร่าย *Scenedesmus* sp. พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มขันของ MeOH เท่ากับ 0 และ 25% พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับในสภาวะที่มี DMSO คือ จะปรากฏของตำแหน่งของพีคฟลูออร์เรสเซนส์ หรือ $\lambda_{emission}$ ที่เดียวกัน คือ 670 นาโนเมตร

แสดงว่า Nile red อยู่ในสภาพแวดล้อมแบบ hydrophilic และไม่มีการย้อมสีของ Nile red กับหยดไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายเกิดขึ้นในสภาวะนี้



รูปที่ 3.2 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ MeOH เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% MeOH

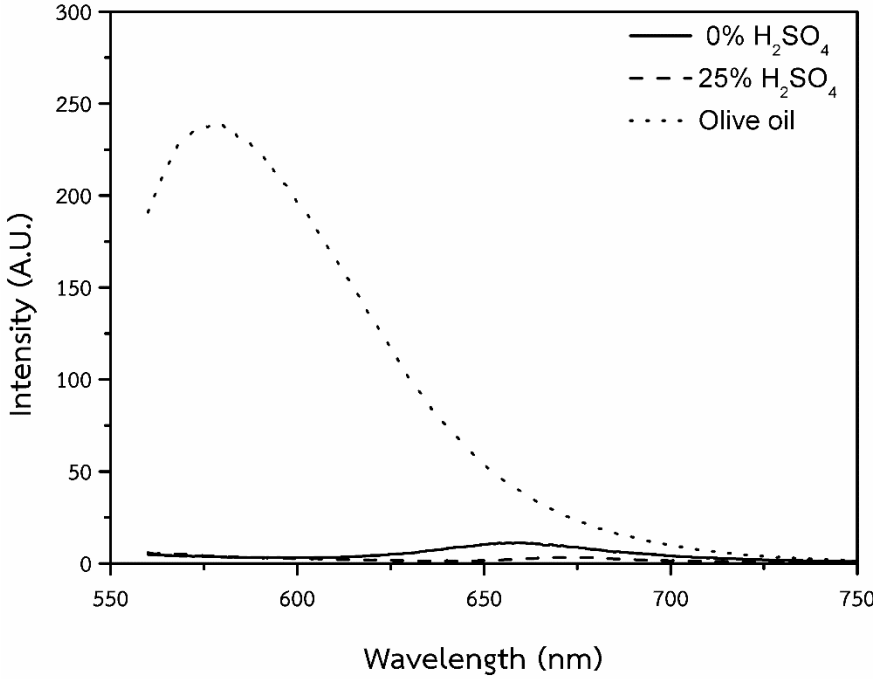
ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. อยู่ที่ ตำแหน่ง 670 นาโนเมตร ในสภาวะที่มี MeOH 25% ไม่แตกต่างจากในน้ำกลั่นและใน 25% DMSO และแตกต่างจาก Nile red ในสภาวะที่มีน้ำมันมะกอก ลักษณะของสปกตรัมที่ได้แสดงให้เห็นว่า Nile red ไม่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็น hydrophobic หรือไม่อยู่ใน oil droplet แสดงว่าวิธีการย้อมสีไขมันของสีย้อมอินทรีย์ Nile red ในระบบ MeOH/น้ำ ไม่เกิดขึ้น แสดงในสภาวะนี้ MeOH ไม่สามารถทำให้ เกิดการทะลุผ่านของสีย้อมอินทรย์ Nile red ไปภายในเซลล์ของสาหร่ายไปทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเซลล์ได้

3.1.1.3 ผลของ H_2SO_4 ที่มีผลการย้อมสีไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

ทดสอบการย้อมไขมันของสีย้อม Nile red ในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว ในสภาวะ 0% และ 25% H_2SO_4 เปรียบเทียบกับสภาวะเดียวกันที่ใช้น้ำมันมะกอก ในการทดลองนี้ใช้สาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) หรือ น้ำมันมะกอก (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผสมกับ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม H_2SO_4 และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการเขย่า และ incubation ในอ่างอุลตราโซนิคที่

อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะปิเปตสารละลายจำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate และนำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ microplate reader ที่ excitation wavelength เท่ากับ 500 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.3

จากฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมในสภาวะที่มีสาหร่าย *Scenedesmus* sp. พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ H_2SO_4 เท่ากับ 0 และ 25% พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับในสภาวะที่มี DMSO และ MeOH คือ จะปรากฏของตำแหน่งของพีคฟลูออร์เรสเซนส์ หรือ $\lambda_{emission}$ ที่เดียวกัน คือ 670 นาโนเมตร แสดงว่า Nile red อยู่ในสภาพแวดล้อมแบบ hydrophilic และไม่มีการย้อมสีของ Nile red กับหยดไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายเกิดขึ้นในสภาวะนี้



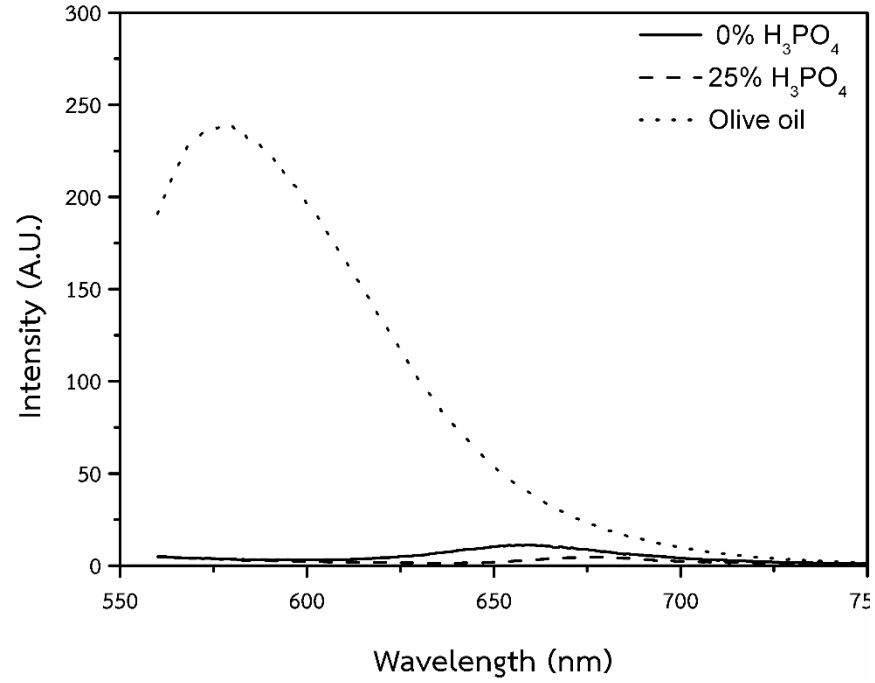
รูปที่ 3.3 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ H_2SO_4 เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% H_2SO_4

3.1.1.4 ผลของ H_3PO_4 ที่มีผลการย้อมสีไขมันในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

ทดสอบการย้อมไขมันของสีย้อม Nile red ในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว ในสภาวะ 0% และ 25% H_3PO_4 เปรียบเทียบกับสภาวะเดียวกันที่ใช้น้ำมันมะกอก ในการทดลองนี้ใช้สาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) หรือ น้ำมันมะกอก (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผสมกับ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม H_3PO_4 และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการเขย่า และ incubation ในอ่างอุลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะปิเปตสารละลายจำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate

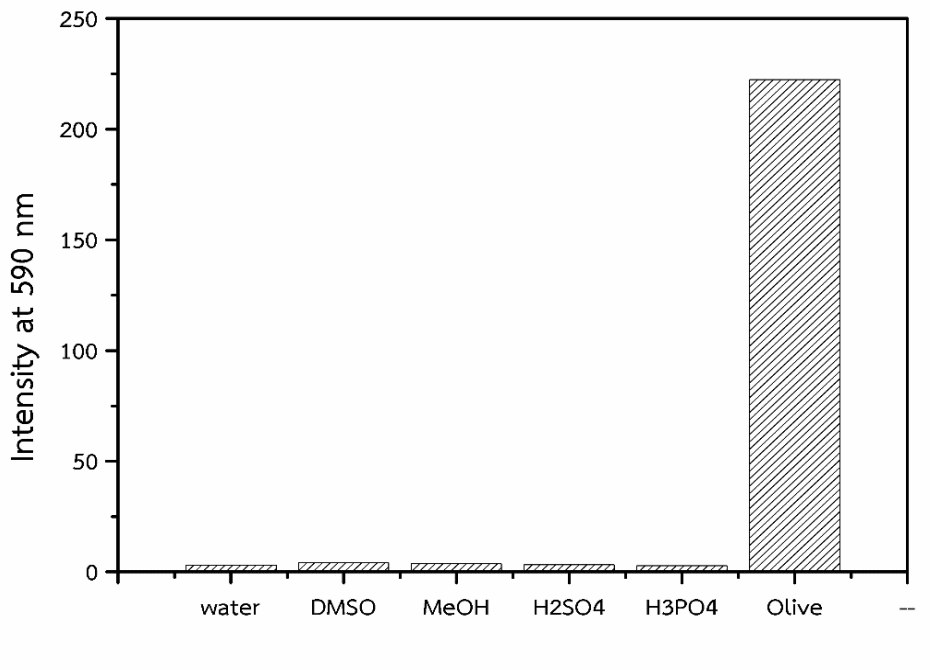
และนำไปวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ microplate reader ที่ excitation wavelength เท่ากับ 500 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.4

จากฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมในสภาวะที่มีสาหร่าย Scenedesmus sp. พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มขันของ H_3PO_4 เท่ากับ 0 และ 25% พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับในสภาวะที่มี DMSO MeOH และ H_2SO_4 คือ จะปรากฏของตำแหน่งของพีคฟลูออร์เรสเซนส์ หรือ λemission ที่เดียวกัน คือ 670 นาโนเมตร แสดงว่า Nile red อยู่ในสภาพแวดล้อมแบบ hydrophilic และไม่มีการย้อมสีของ Nile red กับหยดไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายเกิดขึ้นในสภาวะนี้



รูปที่ 3.4 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. (3×10^6 เซลล์) ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ H_3PO_4 เท่ากับ 0 และ 25% และฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำมันมะกอก (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน 25% H_3PO_4

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสารเคมีทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ DMSO MeOH H_2SO_4 และ H_3PO_4 ไม่สามารถทำให้ Nile ทะลุผ่านผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวได้ เมื่อติดตามความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ Nile red ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อม hydrophobic จะเห็นได้ว่าความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ตำแหน่งนี้ในทุกสภาวะการทดลองมีค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบการทดลองกับน้ำมันมะกอกซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำมัน ดังแสดงการเปรียบเทียบความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ที่ทุกสภาวะการทดลองในในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ *Scenedesmus* sp. 3×10^6 เซลล์ และ Nile red 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มี 25% DMSO MeOH H_2SO_4 และ H_3PO_4 เปรียบเทียบกับในสภาวะที่เดียวกันของน้ำมันมะกอก

3.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายด้วยวิธีการย้อม (staining method) ด้วย Nile red และ Eosin Y

เพื่อเป็นการศึกษาความเป็นไปในได้ในการใช้สีย้อมฟลูออร์เรสเซนส์ชนิดอื่นเพื่อใช้แทนสีย้อม Nile red เพื่อหาปริมาณไขมันด้วยวิธีการย้อมโดยใช้เซลล์เปียกของสาหร่ายสีเขียวและไดอะตอม โดยในการทดลองนี้เลือกใช้ Eosin Y ซึ่งเป็นสีย้อมอินทรีย์ที่ใช้ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาโดยทั่วไป มาทดสอบการย้อมสีไขมันภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กและไดอะตอมเพื่อศึกษาความเป็นเป้นไปได้ในการนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กและไดอะตอมด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ต่อไป

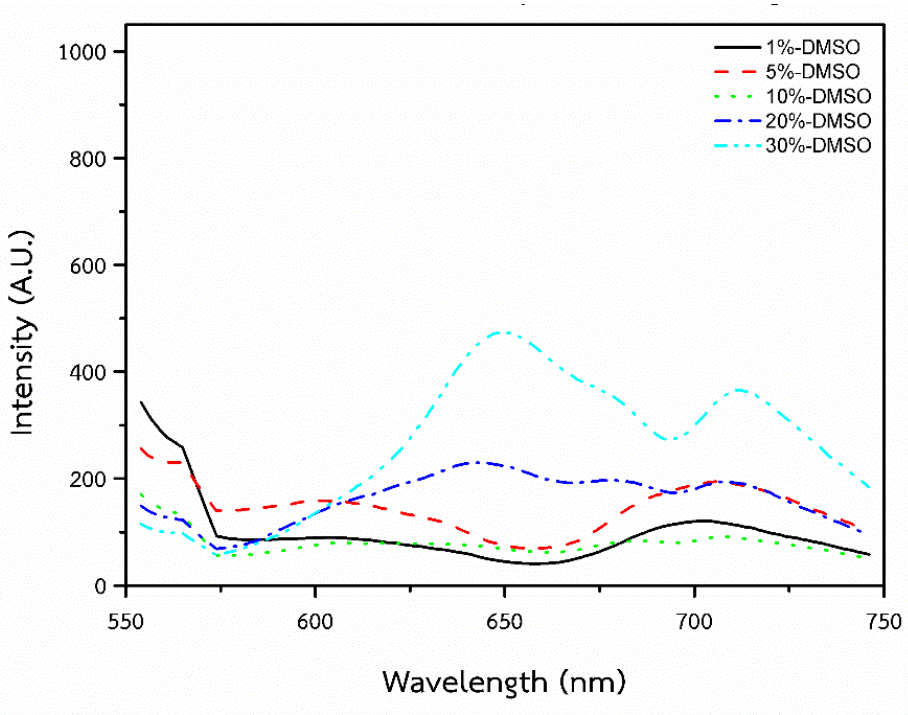
3.1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายด้วยวิธีการย้อม (staining method) ด้วยสีย้อม Nile red

ในการหาปริมาณไขมันของสาหร่ายและไดอะตอมโดยวิธีการย้อมไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วย Nile red โดยทำการศึกษาสหร่ายสีเขียว 1 ชนิด คือ *Chlorella* sp. และไดอะตอม 1 ชนิด คือ *Nitzschia* sp. โดยให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ตัวอย่างเท่ากับ 3×10^6 เซลล์ สภาวะที่ทำการศึกษาได้แก่ 1) ความเข้มข้นของ DMSO 2) ความเข้มข้นของ Nile Red และ 3) ระยะเวลาการ incubation ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัม โดยใช้ excitation wavelength ที่ 500 นาโนโมตร และติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนต์ที่ความคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ตำแหน่ง $\lambda_{emission}$

ของ Nile red ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อม hydrophobic หรือ Nile red อยู่ภายในหยดน้ำมันภายในเซลล์ของสาหร่ายหรือไดอะตอม

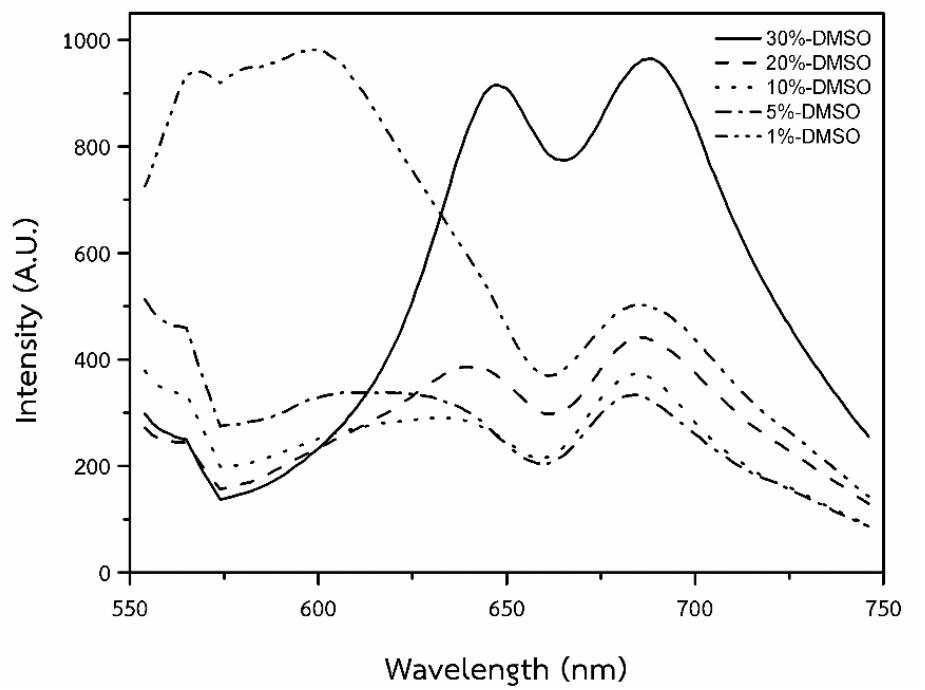
1) ผลของความเข้มข้นของ DMSO ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วยสีย้อม Nile red

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ DMSO ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม โดยสภาวะควบคุมของการทดลอง คือ จำนวนเซลล์ $3x10^6$ เซลล์ ความเข้มข้นของ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อลิตร เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาที และ 40 °C ตามลำดับ โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของ DMSO 1-30 % ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ excitation wavelength ที่ 500 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.6 และ 3.7

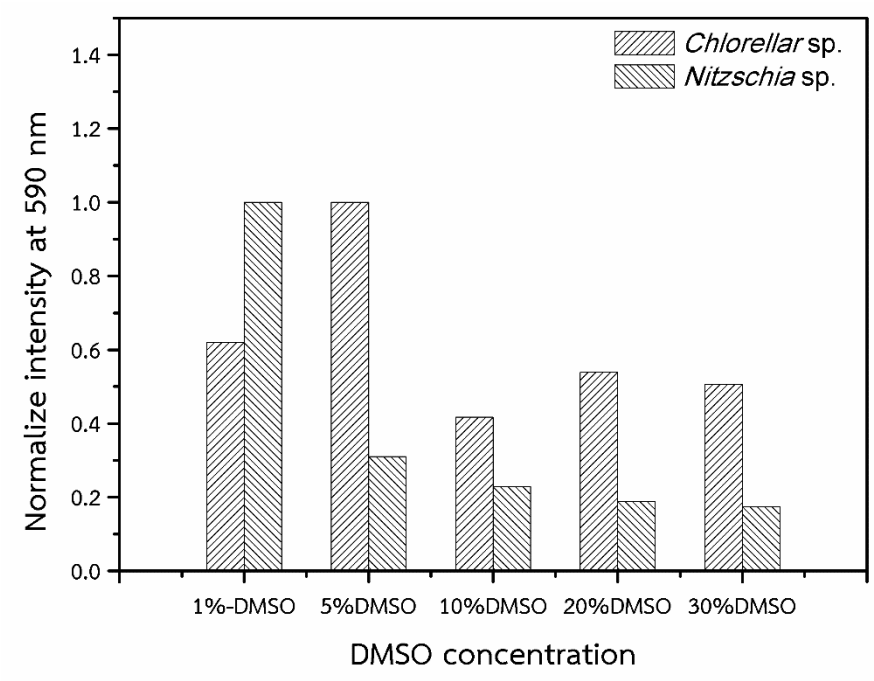


รูปที่ 3.6 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30% เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 °C ตามลำดับ

จากสเปกตรัมที่ได้พบว่าทั้งใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. จะพบพีคของฟลูออร์เรสเซนส์ 2 พีค ที่มีความเข้มสูง คือ 650 และ 710 นาโนเมตร ซึ่งไม่ใช่พีคของ Nile red ที่อยู่ในหยดน้ำมันภายเซลล์ของสาหร่ายหรือไดอะตอม โดยที่ตำแหน่ง 650 นาโนเมตร คือ $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ที่อยู่ในน้ำและที่ตำแหน่ง 730 นาโนเมตร คือ พีคของคลอโรฟิลที่อยู่ในสาหร่ายหรือไดอะตอม แต่อย่างไรก็ตามในสภาวะของการทดลองพบการเกิดพีคที่ 590 นาโนเมตร แสดงว่า Nile red ผ่านเข้าไปในเซลล์และเกิดปฏิกิริยากับหยดไขมันภายในเซลล์ได้บ้าง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% และ 1% สำหรับ *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. ตามลำดับ จากรูปที่ 3.8 Normalize intensity ของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าจะได้ว่าความเข้มข้นของ DMSO ที่เหมาะสมในการย้อมสีไขมันภายในเซลล์ของ *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. คือ 5% และ 1% ตามลำดับ



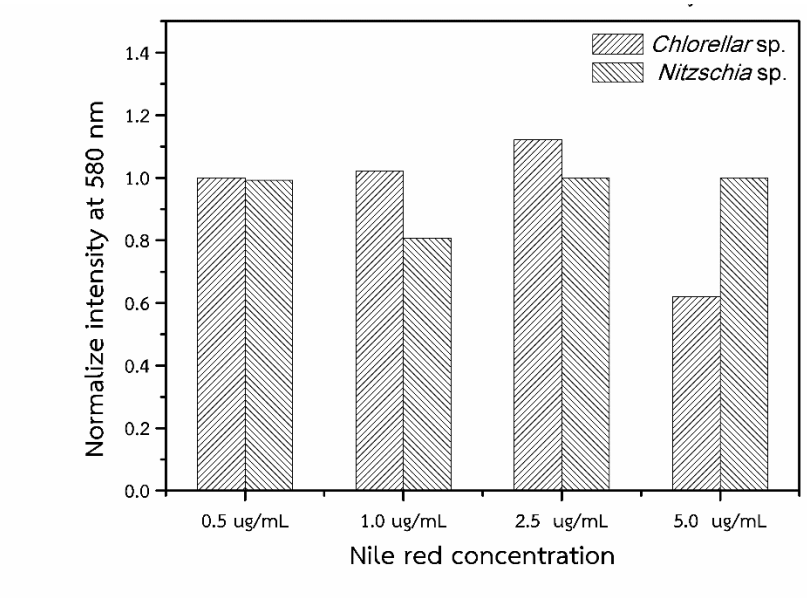
รูปที่ 3.7 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในไดอะตอม *Nitz*schia sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30% เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 $^{\circ}$C ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 Normalize intensity ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. 3×10^6 เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 1-30% ที่เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 °C ตามลำดับ

2) ผลของความเข้มข้นของ Nile red ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม

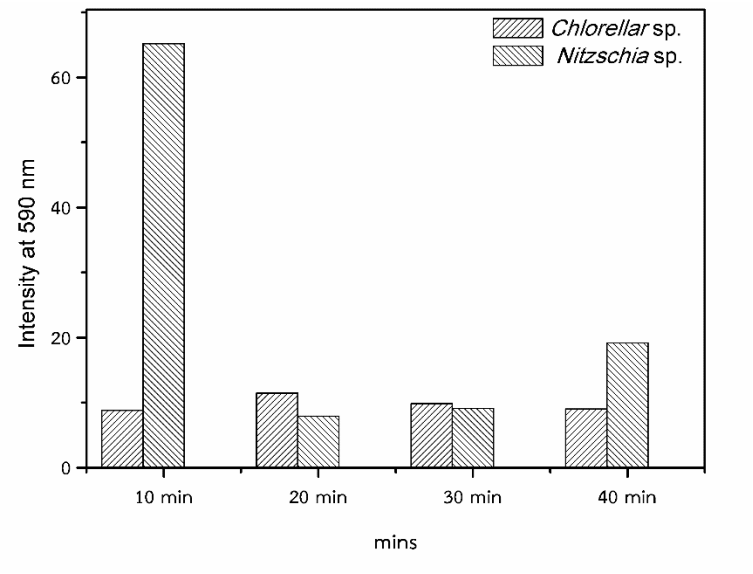
ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ Nile red ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม โดยสภาวะควบคุมของการทดลอง คือ จำนวนเซลล์ $3x10^6$ เซลล์ ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาที และ 40 °C ตามลำดับ โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของ Nile red 0.5-5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ excitation wavelength ที่ 500 นาโนเมตร จากรูปที่ 3.9 Normalize intensity ของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าจะได้ว่าความเข้มข้นของ Nile red ที่เหมาะสมในการย้อมสีไขมันภายในเซลล์ของ *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. คือ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.9 Normalize intensity ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของ Nile red 0.5-5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. 3×10^6 เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ที่เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 $^{\circ}$C ตามลำดับ

3) ผลเวลาในการ incubation ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วยสีย้อม Nile red

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลเวลาในการ incubation ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม โดยสภาวะควบคุมของการทดลอง คือ จำนวนเซลล์ $3\text{x}10^6$ เซลล์ ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 $^{\circ}$C ตามลำดับ ทำการ incubation ด้วยระยะเวลาที่แตต่างกันคือ 10 20 30 และ 30 นาที จากรูปที่ 3.10 Normalize intensity ของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าจะได้ว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำ incubation คือ 10 นาที



รูปที่ 3.10 Normalize intensity ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. 3×10^6 เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ DMSO 5% ที่เวลาในการทำ incubation เท่ากับ 10 20 30 และ 40 นาที ที่อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C

จากการทดลองแสดงว่าการสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมไขมันในเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorelllar* sp. คือ ความเข้มข้นของสีย้อม nile red เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO เท่ากับ 5% อุณหภูมิและเวลาในการ incubation เท่ากับ 40 °C 20 นาที ตามลำดับ ในขณะที่ สภาวะที่เหมาะสมในการย้อมไขมันในเซลล์ของไดอะตอม *Nitzschia* sp. คือ ความเข้มข้นของสีย้อม nile red เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO เท่ากับ 1% อุณหภูมิและเวลาในการ incubation เท่ากับ 40 °C 20 นาที ตามลำดับ

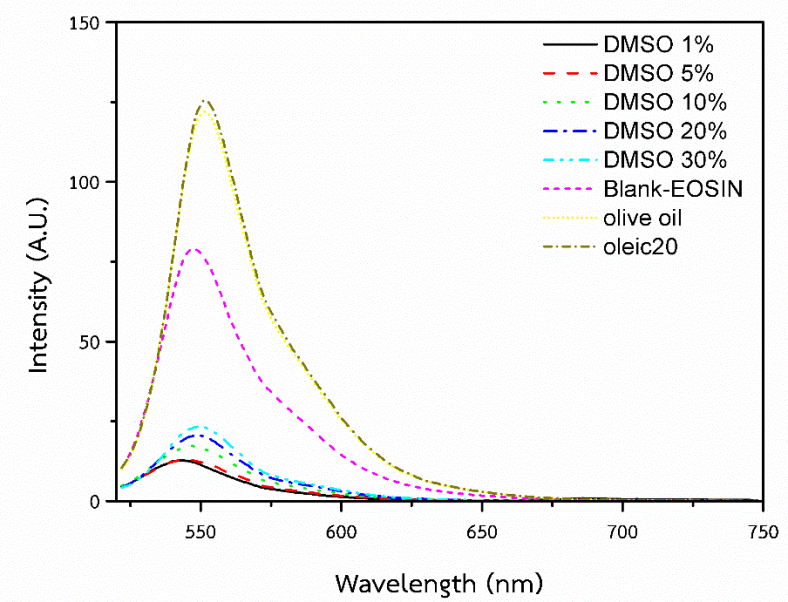
3.1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไขมันในสาหร่ายด้วยวิธีการย้อมด้วย Eosin Y

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้การใช้สีย้อมไขมันชนิดอื่นในการหาปริมาณไขมันของสาหร่ายและไดอะตอมโดยวิธีการย้อมไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วย Eosin Y โดยทำการศึกษาสหร่ายสีเขียว 1 ชนิด คือ *Chlorella* sp. และไดอะตอม 1 ชนิด คือ *Nitzschia* sp. โดยให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ตัวอย่างเท่ากับ 3×10^6 เซลล์ สภาวะที่ทำการศึกษาได้แก่ 1) ความเข้มข้นของ DMSO 2) ความเข้มข้นของ Eosin Y 3) ระยะเวลาการ incubation

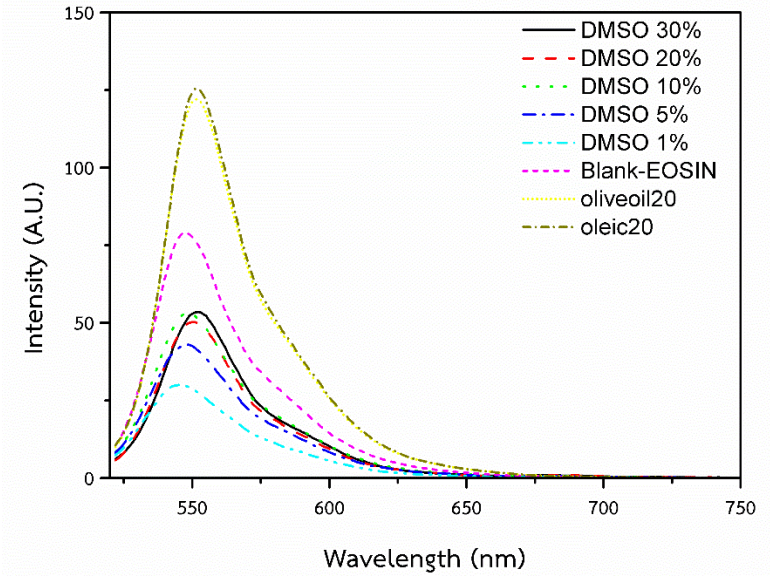
1) ผลของความเข้มข้นของ DMSO ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วยสีย้อม Eosin Y

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ DMSO ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม โดยสภาวะควบคุมของการทดลอง คือ จำนวนเซลล์ $3x10^6$ เซลล์ ความเข้มข้นของ Eosin 2.50 ไมโครกรัมต่อลิตร เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาที และ 40 °C ตามลำดับ โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของ DMSO 1-30 % ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ excitation wavelength ที่ 500 นาโนเมตร และทำการทดลองเปรียบเทียบกับน้ำมันมะกอกและกรดโอเลอิก 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.11 และ 3.12

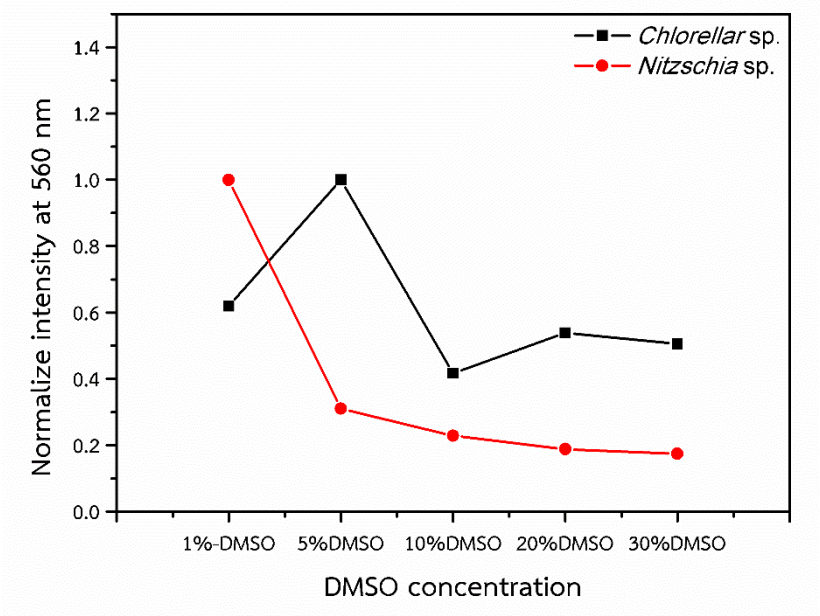
จากผลการทดลองแสดงให้ว่า Eosin Y ในสภาวะที่เป็น hydrophobic อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำมันหรือกรดไขมันจะเลื่อนตำแหน่งของพีคไปทางพลังงานต่ำ หรือเกิด red shift จาก 540 นาโนเมตร ไปยังที่ 560 นาโนเมตร พร้อมกับความเข้มฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้น ซึ่งในสภาวะการทดลองใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. ก็จะพบ $\lambda_{emission}$ ในตำแหน่ง 560 นาโนเมตร ของ Eosin Y ที่เกิดปฏิริยากับไขมันเช่นเดียวกันและความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ตำแหน่งนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเมื่อความเข้มข้นของ DMSO เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงแนวโนวในการเกิดปฏิกิริยาของ Eosin Y กับไขมันในเซลล์ของสาหร่ายและไดอะตอมเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการติดตามสัญญาณ Eosin Y ที่เกิดปฏิกิริยากับไขมันจะติดตามความเข้มของฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 560 นาโนเมตร



รูปที่ 3.11 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Eosin Y (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30%



รูปที่ 3.12 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Eosin Y (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในไดอะตอม *Nitzschia* sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO 1-30%

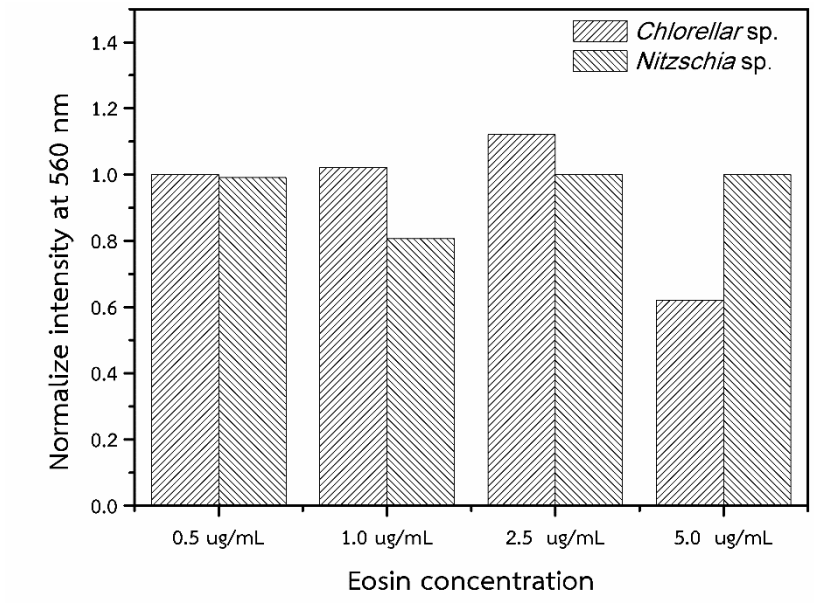


รูปที่ 3.13 Normalize intensity ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ของ Eosin Y (2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 1-30%

จากรูปที่ 3.13 แสดงให้เห็นความเข้มข้นของ DMSO ที่เหมาะสมในการย้อมสีไขมันภายในเซลล์ด้วย Eosin Y ของ *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. โดยการติดตามความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 560 นาโนเมตร คือ 5% DMSO

2) ผลของความเข้มข้นของ Eosin Y ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วยสีย้อม Eosin Y

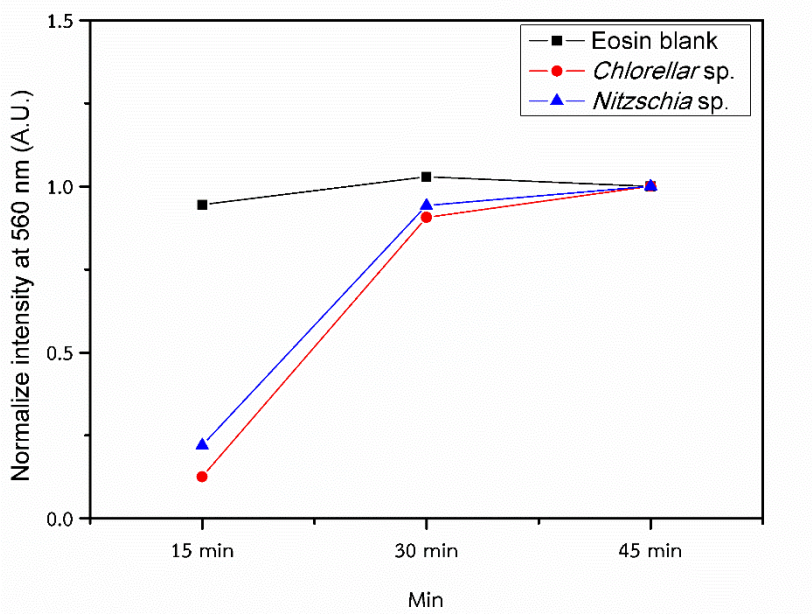
ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ Eosin Y ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม โดยสภาวะควบคุมของการทดลอง คือ จำนวนเซลล์ $3\text{x}10^6$ เซลล์ ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% เวลาและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 30 นาทีและ 40 °C ตามลำดับ โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของ Eosin Y 0.5-5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ excitation wavelength ที่ 500 นาโนเมตร จากรูปที่ 3.14 Normalize intensity ของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าจะได้ว่าความเข้มข้นของ Eosin Y ที่เหมาะสมในการย้อมสีไขมันภายในเซลล์ของ *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. คือ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.14 Normalize intensity ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของ Eosin Y 0.5-5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน *Chlorella* sp. และ *Nitz*schia sp. (3×10^6 เซลล์) ที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5%

3) ผลเวลาในการ incubation ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วยสีย้อม Eosin Y

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลเวลาในการ incubation ต่อการย้อมสีของไขมันในเซลล์สาหร่ายและไดอะตอม โดยสภาวะควบคุมของการทดลอง คือ จำนวนเซลล์ $3x10^6$ เซลล์ ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ความเข้มข้นของ Eosin Y เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C ตามลำดับ ทำการ incubation ด้วยระยะเวลาที่แตต่างกันคือ 15 30 และ 45 นาที จากรูปที่ 3.15 Normalize intensity ของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าความข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์จะเพิ่มเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นโดยแสดงค่าสูงสุดในการทดลองนี้คือ 30 นาที



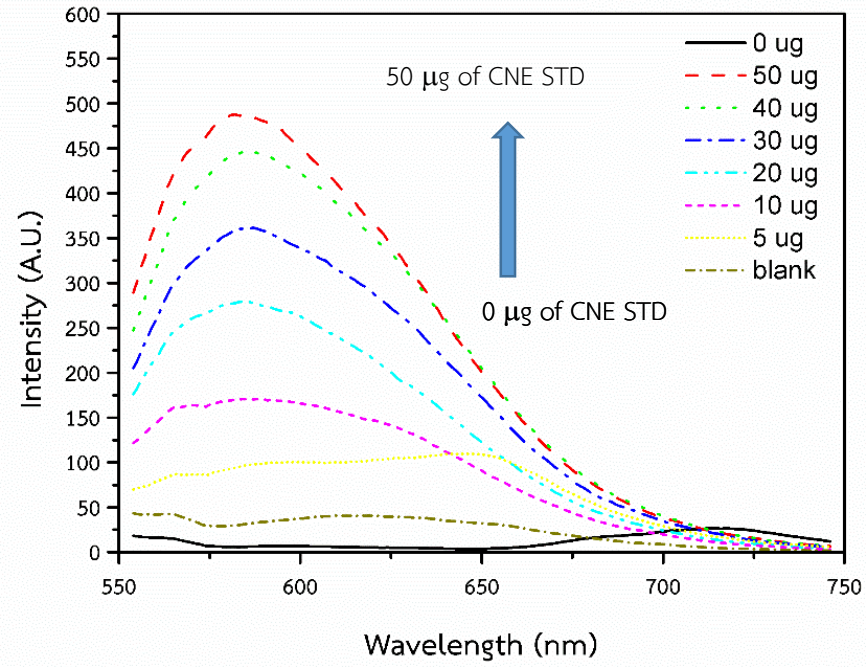
รูปที่ 3.15 การเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ที่เวลา 15 30 และ 40 นาที ของ *Chlorelllar* sp. และ *Nitzschia* sp. 3×10^6 เซลล์ และ Eosin Y 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ความเข้มข้นของ Eosin Y เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C

จากการทดลองจะสภาะที่ดีที่สุดในการย้อมไขมันด้วย Eosin Y จากการติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 560 นาโนเมตร คือ ความเข้มข้นของสีย้อม Eosin Y เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO เท่ากับ 5% อุณหภูมิและเวลาในการ incubation เท่ากับ 40 °C 30 นาที ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามจากผลของการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ Eosin Y ในการใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยการย้อมมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ต่ำมาก แสดงว่าการทะลุผ่านของ Eosin Y ผ่านผนังเซลล์เกิดขึ้นน้อยหรือไขมันในเซลล์น้อย Eosin Y ไม่ได้อยู่ใน oil droplet ทำให้ในสภาวะที่มีสาหร่ายหรือไดอะตอมพบ $\lambda_{emission}$ ในตำแหน่ง 540 นาโนเมตร ดังนั้นในการหาปริมาณไขมันโดยวิธีการย้อมในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ Nile red เป็นสีย้อมในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีการย้อมที่สภาวะที่ความเข้มข้นของสีย้อม Nile red เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO เท่ากับ 5% อุณหภูมิและเวลาในการ incubation เท่ากับ 40 °C 30 นาที ตามลำดับ

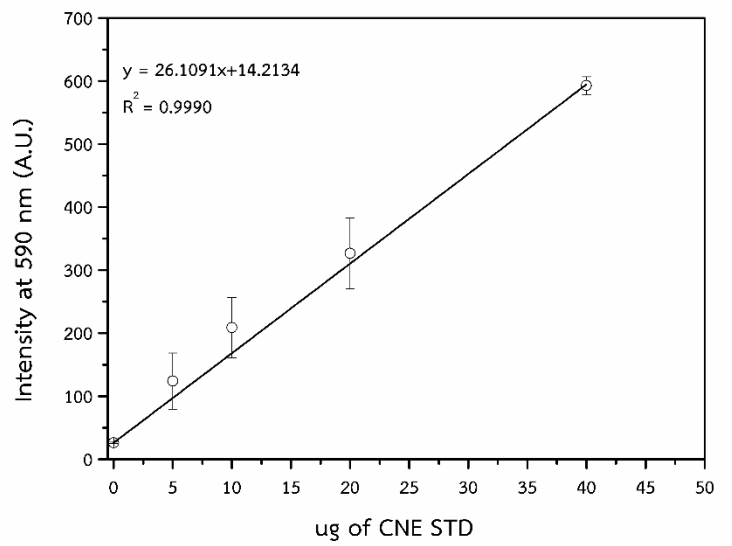
3.1.3 การหาปริมาณของไขมันในสาหร่ายสีเขียว โดยการย้อมด้วยสีย้อม Nile red

3.1.3.1 การหาปริมาณไขมันแบบ external standard โดยวิธีการย้อม

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของไขมัน โดยสารมาตรฐาน คือ ไขมันที่สกัดจากน้ำมันคาโนลาร์ หรือ CNE standard ที่ทำการสกัดโดยวิธีของ Folch (Folch et al., 1956) ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนซ์สเปกตรัมที่ความเข้มข้นของ CNE standard 0-40 ไมโครกรัม ที่สภาวะความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C จากรูปที่ 3.16 จะเห็นได้ว่า พบความเข้มของฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งเป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ในไขมันหรือในสภาพแวดล้อมที่เป็น hydrophobic เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ CNE standard เพิ่มขึ้น ในรูปที่ 3.17 แสดงกราฟมาตรฐานในหาปริมาณของไขมันสร้างจากความเข้มของฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร กับ จำนวนไมโครกรัมของ CNE standard พบว่าในปริมาณสารส่วนมาตรฐาน CNE 0-40 ไมโครกรัม ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร กับปริมาณของสารส่วนมาตรฐาน CNE ให้ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงที่ดี คือ ให้ค่า Correlation coefficient หรือ R^2 เท่ากับ 0.9900 โดยให้มีค่า detection limit เท่ากับ 3.078 ไมโครกรัม (คำนวณมากจาก detection limit = 3*standard deviation ของแบล็งค์ ในการวัดซ้ำ = 10 ครั้ง)



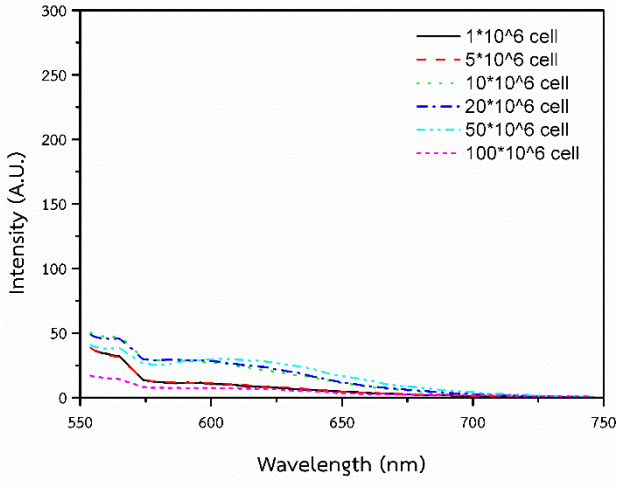
รูปที่ 3.16 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ CNE standard 0-50 ไมโครกรัม ใน Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C



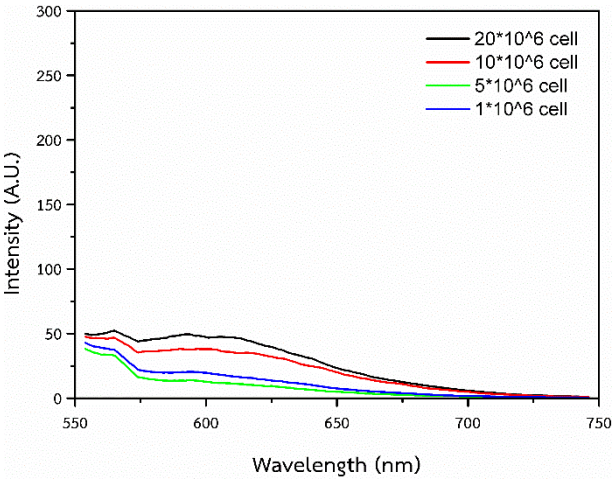
รูปที่ 3.17 กราฟมาตรฐานของไขมันที่สกัดจากน้ำมันคาโนลาร์ หรือ CNE standard ความเข้มข้น 0-40 ไมโครกรัม (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง)

การหาปริมาณของไขมันในสาหร่ายสีเขียวและไดอะตอม *Chlorella* sp. และ *Nitzschia* คือ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Nile red โดยใช้สภาวะในการย้อม คือ ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 ^{o}C ในการทดลองนี้ทำการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์ 1×10^{6}-1×10^{8} เซลล์ โดยได้ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมตามรูปที่ 3.18 จะเห็นได้ว่า ภายใต้สภาวะของการทดลองความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนโนเมตร ต่ำมากและและพบแถบของฟลูออรเรสเซนซ์ที่บริเวณ 650 นาโนเมตรซึ่งแสดงให้เห็นว่า Nile red อยู่ภายนอกเซลล์ เมื่อติดตามการเปลี่ยนแลงความเข้มฟลูออร์เซนส์ที่ 590 นาโนเมตร เมื่อจำนวนของเซลล์สาหร่ายหรือไดอะตอมเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.18 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นบ้าง แสดงว่า Nile red อยู่ใน oli droplet มากขึ้นเมื่อจำนวนของเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างไรตามการเพิ่มของสัญญานฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร กับจำนวนเซลล์ไม่มีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นตรง ซึ่งจะเกิดจากการรบกวนเมตริกซ์และความขุ่นที่เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น หรือจากการย้อมสีไขมันที่ไม่มีประสิทธิภาพสภาวะในการทดลอง จากการทดลองนีแสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้การหาปริมาณแบบ external standard โดยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Nile red ได้

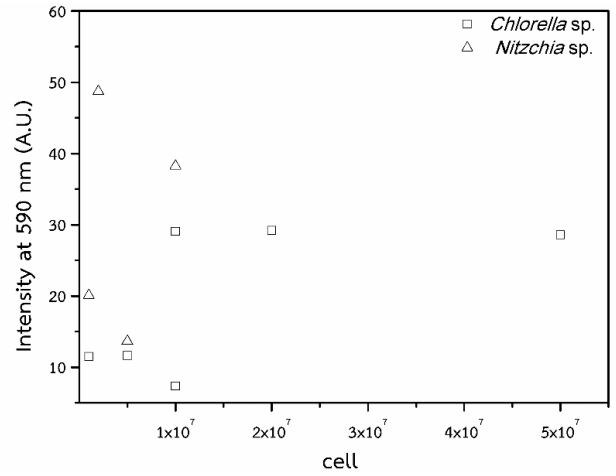
ก)



ข)



ค)



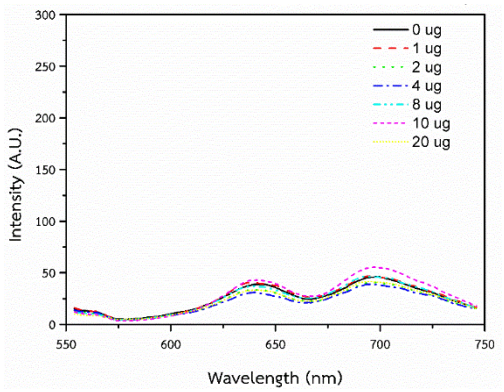
รูปที่ 3.18 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ ของ ก) *Chlorella* sp. ข) *Nitzschia* sp. ที่จำนวนของเซลล์แตกต่างกัน ใน Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO และ ค) การเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ของ *Chlorelllar* sp. และ *Nitzschia* sp. ที่จำนวนของเซลล์แตกต่างกัน ใน Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO

3.1.3.1 การหาปริมาณไขมันแบบ Standard addition โดยวิธีการย้อม

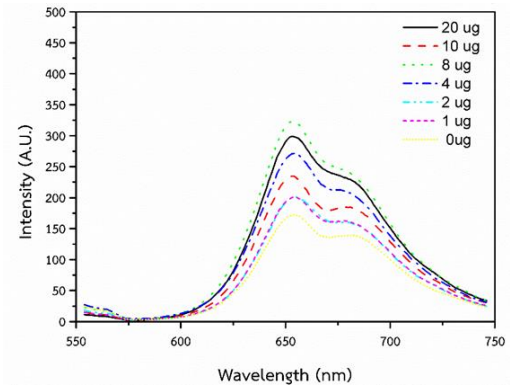
จากปัญหาสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ไม่แน่นอนซึ่งเป็นผลมาจากเมตริกในสาหร่ายและไดอะตอมเพื่อเป็นการกำจัดผลของเมตริกในการทดลองนี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition เพื่อให้สารมารตรฐานและสารตัวอย่างมีเมตริกที่เหมือนกัน ในการทดลองนี้จึงทำการเติมสาหร่ายหรือไดอะตอมในการขั้นตอนของเตรียมสารลายมาตรฐาน CNE การเติมสาหร่ายหรือไดอะตอมในปริมาณที่เท่ากันจะทำให้สารมาตรฐานและสารตัวอย่างมีเมตริกที่เหมือนกัน

ในการทดลองนี้ได้ทำเตรียมสารมาตรฐาน CNE ปริมาณ 0-20 ไมโครกรัม โดยให้สารมาตรฐานทุกความเข้มข้นมีมีปริมาณสาหร่ายหรือไดอะตอม *Chlorelllar* sp. และ *Nitzschia* sp. เท่ากับ 3 x10^6 เซลล์ ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 5% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 °C ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนส์เสปกตรัม ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปจากรูปที่ 3.19 จากสเปกตรัมของสารมาตรฐานที่มีการเติมสาหร่ายหรือไดอะตอมจะไม่พบการเกิดพีคที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งเป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ที่ติดอยู่ไขมัน แสดงว่าการย้อมสีในสภาวะดังกล่าวไม่เกิด ขึ้นพบเฉพาะแถบของฟลูออรเรสเซนซ์ที่บริเวณ 650 นาโนเมตร เท่านั้นแสดงให้เห็นว่า Nile red อยู่ในหยดน้ำมันภายในเซลล์

ก)



ข)



รูปที่ 3.19 ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของสารมาตรฐาน CNE standard 0-20 ไมโครกรัม ที่มีการเติมสาหร่าย ก) *Chlorelllar* sp. และ ข) 3x10^6 เซลล์ ในสภาวะที่ Nile red 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5% DMSO

จากการศึกษาเพื่อสภาวะและวิธีการในการหาปริมาณไขมันสาหร่ายขนาดเล็กและไดอะตอมโดยการย้อมสีด้วยสีย้อม (staining method) พบว่าการย้อมไขมันในเซลล์เปียกของสาหร่ายและไดอะตอมไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันได้ ไม่พบพีคของของฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร หรือให้ความเข้มของฟลูออร์เรสเซนส์ที่ตำแหน่งนี้ต่ำมากซึ่งมีสาเหตุมาจากปัจจัยดังต่อไปนี้

1) สภาวะที่ทำการย้อมไขมันด้วยสีย้อม Nile red มีประสิทธิภาพต่ำ สีย้อม Nile red ไม่สามารถในทะลุทะลวงเข้าสู่ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียงหรือไดอะตอมได้

2) การรบการการวิเคราะห์ของเมตริกและสัญญาณจากรงค์วัตถุในสาหร่าย เช่น คลอโรฟิลล์ ในวิธีวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition

3) ปริมาณไขมันในสาหร่ายและไดอะตอมที่นำมาทดลองมีปริมาณต่ำมาก ต่ำกว่าขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์

3.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method)

จากผลทดลองที่ผ่านมาแสดการหาปริมาณไขมันในเวลล์สาหร่ายและไดอะตอมด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์โดยวิธีการย้อมสีไขมันในเซลล์ (staining method) ไม่ประสิทธิภาพเพียงพอ ไม่สามารถให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของปริมาณสาหร่ายและสัญญาณฟลูออร์เซนส์ได้ ในการทดลองต่อไปนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยใช้วิธีการที่ประยุกต์มากจากรายงานของ Higgins และคณะ (Higgins B. T. *et al.*, 2014) ที่ทำการพัฒนาการวิเคราะห์ไขมันโดยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์กับส่วนสกัดไขมันที่จากน้ำมันพืชและสาหร่าย *Chlorelllar* ซึ่งพบว่าผลที่ดี สอดคล้องกับผลที่ได้จากเทคนิคการวิเคราะห์ไขมันอื่น คือ thin layer chromatography มากกว่าเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ที่ใช้วิธีการย้อมในการหาปริมาณของไขมัน

ในการทดลองนี้ได้ประยุกต์วิธีการหาปริมาณไขมันด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์กับส่วนสกัดไขมันของ Higgins และคณะ โดยวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งในเซลล์แห้งหรือเซลล์ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (freeze dry cell) และเซลล์ที่อยู่ในสารละลายหรือเซลล์เปียก โดยการวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard และ standard addition เปรียบเทียบผลที่ได้กับการหาไขมันโดยเทคนิคแบบแกรวิเมตริกของ Folch (Folch *et al*., 1956)

3.2.2 การหาปริมาณของไขมันเทคนิคแกรวิเมตริกจากเซลล์เปียกและแห้ง

ในการหาปริมาณไขมันในการทดลองนี้ปรับปรุงมาจากการหาไขมันโดยเทคนิคแบบแกรวิเมตริกของ Folch (Folch *et al*., 1956) ซึ่งจะทำให้เซลล์ของสาหร่ายผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้สนใจที่พัฒนากระบวนการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายในกระบวนเลี้ยงจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันเซลล์เปียกด้วย ในการทดลองจึงทำการศึกษาสาหร่ายสีเขียว คือ *Chlorelllar* sp. และไดอะตอม คือ *Nitzschia* sp. โดยวิเคราะห์ปริมาณไขมันอยู่ในรูปน้ำหนักไขมันต่อปริมาตรสำหรับเซลล์เปียกและเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งสำหรับเซลล์แห้ง ได้ผลการวิเคราะห์ตามตารางที่ 3.1 โดยผลการทดลองนี้จะใช้เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับของการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยเทคนิคฟลูออร์เรสซนส์ต่อไป

ตารางที่ 3.1 ปริมาณของไขมันเทคนิคแกรวิเมตริกจากเซลล์เปียกและเซลล์แห้งของ *Chlorelllar* sp. และ *Nitzschia* sp.

น้ำหนักไขมันต่อปริมาตร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)*		เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้ง*	
Chlorelllar sp.	*Nitzschia* sp.	*Chlorelllar* sp.	*Nitzschia* sp.
$2.13((\pm 0.987) \times 10^{-2}$	$1.36(\pm 0.140) \times 10^{-1}$	14.47 ± 1.22	16.00 ± 2.78

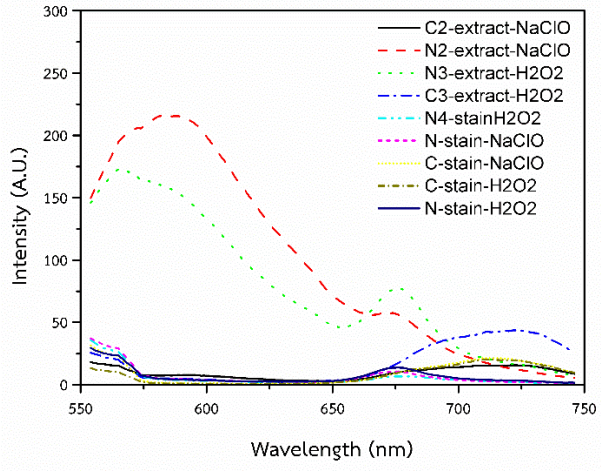
*ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.3 ผลการของเติมตัวออกซิไดส์ NaClO และ H_2O_2 ต่อความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ในการหาปริมาณไขมันโดยวิธีการสกัด

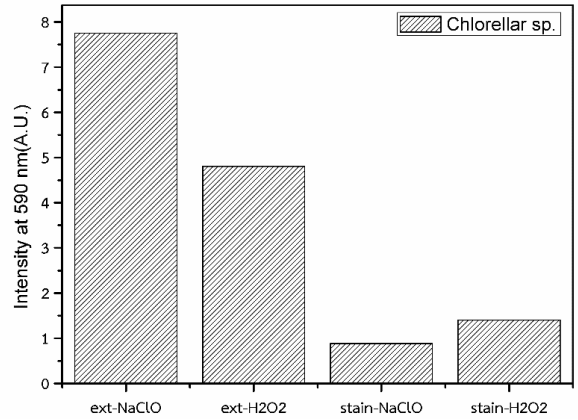
ในการทดลองศึกษาฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณไขมันโดยวิธีสกัด Higgens และคณะฯ (Higgens, B.T., *et.al.*, 2014) ได้มีการเติมตัวออกซิไดส์ NaClO เพื่อกำจัดสัญญานรบกวนจากการเกิดฟลูออร์เรสเซนส์ของรงค์วัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ ที่ตำแหน่ง 680 นาโนเมตร ในการทดลองนี้จึงทำการวัดฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของ Nile red ที่มีการเติมส่วนสกัดไขมันที่จากสาหร่าย *Chlorella* sp.และ ไดอะตอม *Nitzschial* sp. เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ Nile red และสาหร่าย *Chlorella* sp.และ ไดอะตอม *Nitzschial* sp. ที่ได้จากวิธีการย้อมในสภาวะที่มีการเติมและไม่ได้เติมตัวออกซิไดส์ ได้แก่ NaClO และ H_2O_2

จากรูปที่ 3.20 ก) พบว่าฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัมของในส่วนสกัดไขมันของทั้งสาหร่าย *Chlorella* sp.และ ไดอะตอม *Nitzschial* sp. ในสภาวะที่มีการเติม เติมตัวออกซิไดส์ ได้แก่ NaClO และ H_2O_2 จะพบ $\lambda_{emission}$ ที่ 590 โนโนเมตรซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ของ Nile red ในขณะที่สเปกตรัมของ *Nitzschial* sp. และ *Chlorella* sp. ที่ใช้วิธีการย้อมด้วย Nile red และเติมตัวออกซิไดส์ยังคงไม่พบ $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ที่ 590 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ในสภาวะที่ เติม NaClO ทั้งใน *Nitzschial* sp. และ *Chlorella* sp. จะให้ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรสูงสุด ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณในการทดลองต่อไปจะใช้ NaClO เติมในสารละลายตัวอย่างเพื่อเป็นการกำจัดสัญญาณรบกวนจากรงค์วัตถุ

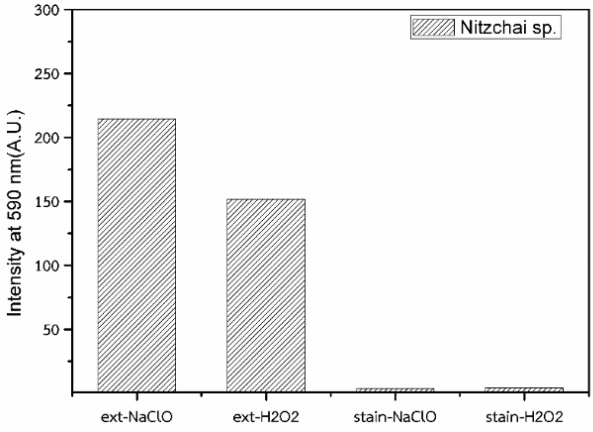
ก)



ข)



ค)



รูปที่ 3.20 ก) ฟลูออร์เรสเซนส์สเปกตรัม Nile red ในวิธีการย้อม (stain) และใช้ส่วนสกัดไขมัน (extract) ของ *Chlorelllar* sp. (C) และ *Nitzschia* sp. (N) และมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ที่ได้จากส่วนสกัดไขมัน (ext) และการย้อมไขมันในเซลล์ (stain) ของ ก) *Chlorelllar* sp. และ ข) *Nitzschia* sp. ในสภาวะที่ความเข้มข้น Nile red เท่ากับ2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5% DMSO และ 0.3% NaClO หรือ H_2O_2

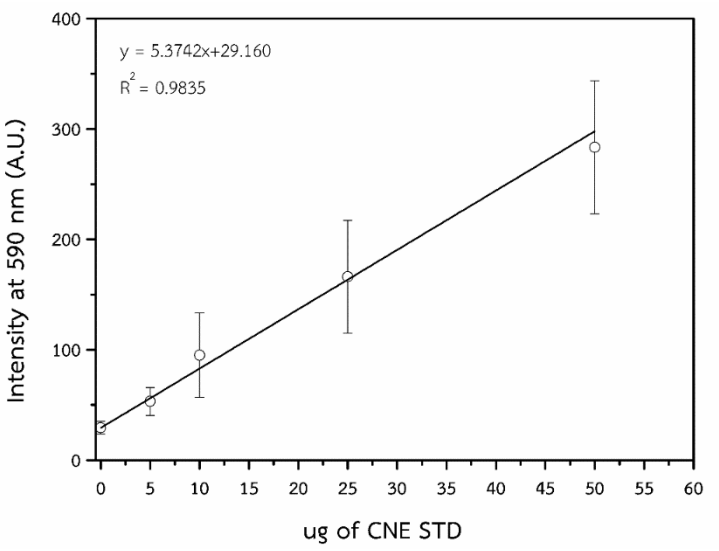
3.2.3 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายและไดอะตอมโดยวิธีการสกัด

3.2.3.1 การหาปริมาณไขมันวิธีการสกัดโดยใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการย้อมสีไขมันในสาหร่ายไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้ทั้งการวิเคราะห์ปริมาณแบบ External standard และ standard addition ได้ในการทดลองนี้ปรับปรุงวิธีการวิคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีการสกัดจากวิธีการของ Higgins และคณะ (Higgins B. T. *et al.*, 2014) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายสีเขียวและไดอะตอมทั้งในเซลล์ที่ทำให้แห้งโดยผ่านกระบวนการเยือกแข็ง หรือ freeze dry cell และ เซลล์ที่อยู่ในสารละลาย หรือ เซลล์เปียก โดยใช้การวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard จะทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันจากส่วนสกัดไขมัน (extraction method) ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กและไดอะตอม ได้แก่ *Chlorella* sp. และ *Nitzschia* sp. ตามลำดับ โดยใช้ไขมันที่สกัดจากน้ำมันคาโนลาร์ หรือ CNE standard เป็นสารมาตรฐาน

1) การสร้างกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานของไขมันสร้างโดยใช้สารมาตรฐาน คือ ไขมันที่สกัดจากน้ำมันคาโนลาร์ หรือ CNE standard ที่ทำการสกัดโดยวิธีของ Folch (Folch et al., 1956) ทำการวัดฟลูออร์เรสเซนซ์เสปกตรัมที่ความเข้มข้นของ CNE standard 0-50 ไมโครกรัม ที่ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากรูปที่ 3.16 จะเห็นได้ว่า พบความเข้มของฟลูออร์เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งเป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ในไขมันกับปริมาณของสารส่วนมาตรฐาน CNE ให้ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงที่ดี คือ ให้ค่า Correlation coefficient หรือ R^2 เท่ากับ 0.9835 ซึ่งจะใช้กราฟมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณไขมันในเซลล์แห้งจากกระบวนการ freeze dry และเซลล์ที่อยู่ในสารละลายหรือเซลล์เปียกต่อไป



รูปที่ 3.21 กราฟมาตรฐานของสารมารตรฐานไขมันสกัดจากน้ำมันคาโนลา หรือ CNE standard ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม ที่ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง)

2) การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเซลล์แห้งที่จากระบวนการ freeze dry

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันของ *Chlorella* sp. และ *Nitzschia* sp. โดยใช้ส่วนสกัดที่ได้จากการสกัดที่ประยุกต์จากวิธีของ Folch โดยใช้น้ำหนักแห้งของสาหร่ายหรือไดอะตอม 10 มิลลิกรัม ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม 2:1 Chloroform : MeOH และใช้การแช่ในอ่างอัลตราโซนิค 30 นาที เพื่อช่วยให้เซลล์แตกทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นำส่วนสกัดในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ผ่านการล้างด้วย 0.9% NaCl และทำให้แห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ มาเตรียมเป็นสารละลายโดยใช้ Chloroform เป็นตัวทำละลาย ได้สารละลายส่วนสกัดไขมัน ที่พร้อมจะวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ต่อไป

ตารางที่ 3.2 ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้ง ของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard

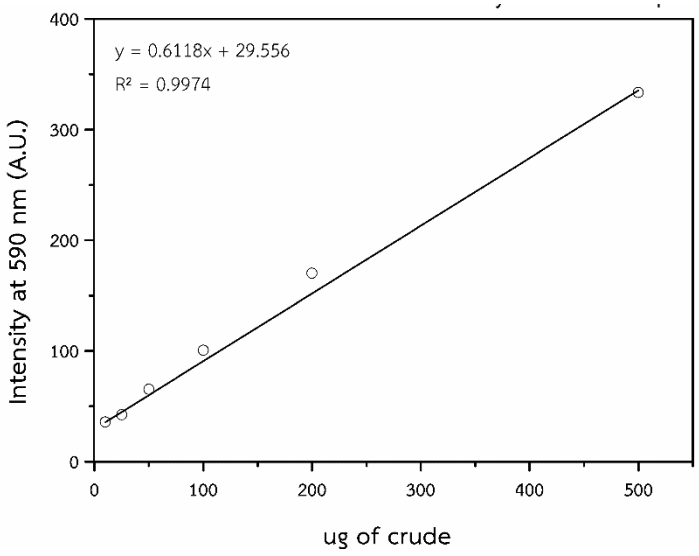
น้ำหนักส่วนสกัดไขมัน (ไมโครกรัม)	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้ง*,**
500	12.75 ($\pm$0.49)	**1.27($\pm$0.049)$\times10^{-1}$**

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันแบบ External standard จะทำการทดลองใช้ที่ปริมาณของน้ำหนักส่วนสกัดไขมันของสาหร่าย *Chlorella* sp. 500 ไมโครกรัม หลังจากระเหย Chloroform และละลายส่วนสกัดอีกครั้งด้วย isopropanol 40 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Nile red (0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร) จำนวน 320 ไมโครลิตร และ 0.3% NaClO จำนวน 40 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดฟลูออร์ติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรซึ่งเป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ในไขมัน พบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน CNE 0-50 ไมโครกรัม ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ *Chlorella* sp. ตามตารางที่ 3.2

ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี external standard โดยการทำ pair t-test ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ด้วยส่วนสกัดไขมันที่ได้จากจากเซลล์แห้ง 500 ไมโครกรัม ของ *Chlorella* sp. ด้วยวิธี external standard แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3.1) ซึ่งผลที่แตกต่างกันนี้แสดงให้เห็นว่าในภาวะที่ทำการทดลองนี้ *Chlorella* sp. มีปริมาณไขมันน้อย อาจจำเป็นที่จะต้องใช้น้ำหนักส่วนสกัดไขมันเพิ่มมากกว่า 500 ไมโครกรัม นอกจากนี้ เซลล์ของ *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวซึ่งมีผนังเซลล์เป็นเซลลูโลสทำให้กระบวนการสกัดโดยใช้การแช่ในอ่างอัลตราโซนิค 30 นาที ในการทำให้เซลล์แตกอจะไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอทำให้มีปริมาณไขมันในส่วนสกัดน้อย



รูปที่ 3.22 การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ที่ปริมาณของส่วนสกัดไขมันจากเซลล์แห้งของ *Nitzschia* sp. 0-500 ไมโครกรัม (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันของไดอะตอม *Nitzschia* sp. โดยการวิเคราะห์ปริมาณแบบ External standard ใช้ส่วนสกัดไขมันที่ได้จากเซลล์แห้งของไดอะตอมที่ผ่านกระบวนการ freeze dry ใช้น้ำหนักของส่วนสกัดตั้งแต่ 0-500 ไมโครกรัม เตรียมสารตัวอย่างแบบเดียวกับสารมาตรฐาน CNE ติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรซึ่งเป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ในไขมัน ดังแสดงในรูปที่ 3.22 ความเข้มของความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรกับน้ำหนักของส่วนสกัดของ *Nitzschia* sp. เป็นเชิงเส้นตรงที่ดี คือ Correlation coefficient หรือ R^2 เท่ากับ 0.9974 แสดงว่าการใช้ส่วนสกัดของเซลล์แห้งของไดอะตอม *Nitzschia* sp. ที่มีการเติมตัวออกซิไดส์ คือ NaClO สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันได้ดี เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟส่วนมาตรฐานได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ *Nitzschia* sp. ตามตารางที่ 3.3

ทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี external standard กับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริกพบโดยการทำ pair t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งในทุกๆ ชุดของการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้ง ของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard

น้ำหนักส่วนสกัดไขมัน (ไมโครกรัม)	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้ง*,**
10	1.21±0.064	12.18±0.64
25	2.45±0.35	9.79±1.40
50	6.71±0.78	13.41±1.57
100	13.27±1.92	13.27±1.92
200	26.26±2.06	13.13±1.03
500	56.60±0.99	11.32±0.20

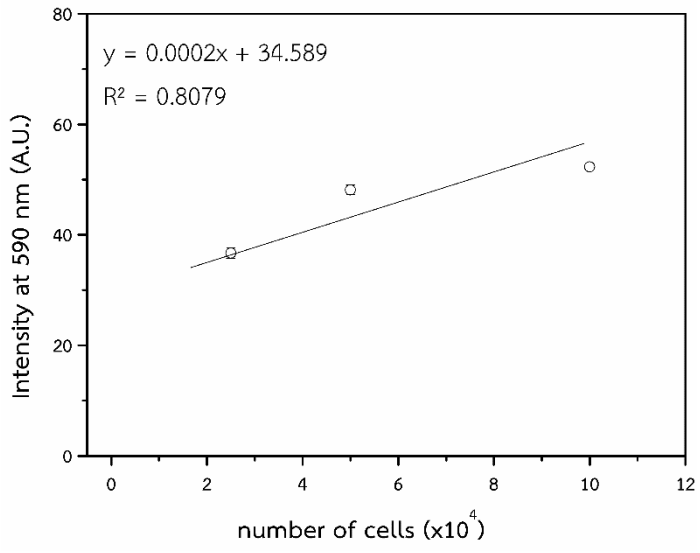
* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

3) การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเซลล์ที่อยู่ในสารละลายหรือเซลล์เปียก โดยการวิเคราะห์ปริมาณแบบ External standard

ในงานวิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะพัตนาการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้ติดตามการสะสมไขมันระหว่างกระบวนการเลี้ยงจึงในพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไขมันโดยเทคคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ โดยใช้ส่วนสกัดไขมันที่ได้จากเซลล์ที่อยู่ในสารละลายหรือเซลล์เปียก โดยการวิเคราะห์ปริมาณแบบ External standard เพื่อหาปริมาณไขมันต่อปริมาตร ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp.

ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. จะใช้ส่วนสกัดที่ได้จากเซลล์ (wet cell extract) ที่ปริมาณของเซลล์ตั้งแต่ 0-10 x10^4 เซลล์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรที่ปริมาณเซลล์ต่างๆ กัน แสดงในรูปที่ 3.23 จากกราฟแสดงความเข้มของความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรกับปริมาณเซลล์ของ *Chlorella* sp. มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง คือ Correlation coefficient หรือ R^2 เท่ากับ 0.8079 นำค่าความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรที่ปริมาณเซลล์ต่างๆ กันไปวิเคราะห์ปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกับกราฟมาตรฐาน ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ *Chlorella* sp. ตามตารางที่ 3.4



รูปที่ 3.23 การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ของส่วนสกัดไขมันที่จากเซลล์เปียกของ *Chlorella* sp. 2.5 x10^4 -10 x10^4 เซลล์ ที่ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และอุณหภูมิในการ incubation เท่ากับ 40 $^{\circ}$C โดยใช้เวลาในการ incubation 30 นาที

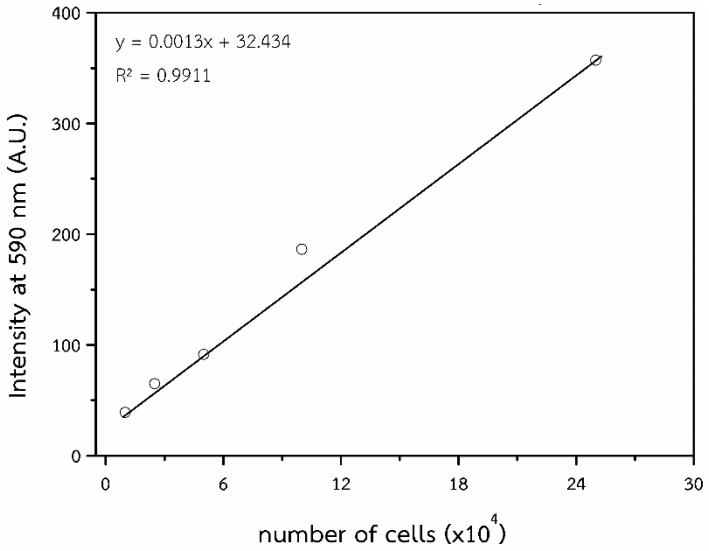
ตารางที่ 3.4 ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard

จำนวนเซลล์	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	น้ำหนักไขมันต่อปริมาตร*,** (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
2.5×10^4	1.91 ± 0.37	$3.82(\pm 0.740) \times 10^{-2}$
5.0×10^4	4.19 ± 0.43	$4.19(\pm 0.428) \times 10^{-2}$

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดจากเซลล์ 2.5×10^4 และ 5.0×10^4 เซลล์ โดยใช้วิธี external standard กับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก โดยการทำ pair t-test ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าผลที่ได้ของทั้งสองชุดการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก



รูปที่ 3.24 การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ของส่วนสกัดไขมันท่ำด้จากเซลล์เปียกของ *Nitzschia* sp. 2.5×10^4 -25×10^4 เซลล์ (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)

ในกรณีของ *Nitzschia* sp. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันต่อปริมาตรของเซลล์ของ จะใช้ปริมาณของเซลล์ตั้งแต่ 0-25 x10^4 เซลล์ ติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรซึ่ งเป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ในไขมัน ตามที่แสดงในรูปที่ 3.24 ความเข้มของความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรกับปริมาณเซลล์ของ *Nitzschia* sp. เป็นเชิงเส้นตรงที่ดี คือ Correlation coefficient หรือ R^2 เท่ากับ 0.9991 แสดงว่าการใช้ส่วนสกัดของเซลล์เปียกในเซลล์ไดอะตอม *Nitzschia* sp. ที่มีการเติมตัวออกซิไดส์ คือ NaClO สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันได้ดี เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ *Nitzschia* sp. ตามตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ external standard

จำนวนเซลล์	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	น้ำหนักไขมันต่อปริมาตร*,** (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
2.5 $\times 10^4$	6.26$\pm$0.52	1.25($\pm$0.105) $\times 10^{-1}$
5.0 $\times 10^4$	12.16$\pm$0.63	1.22($\pm$0.0635) $\times 10^{-1}$
10 $\times 10^4$	28.70$\pm$1.20	1.44($\pm$0.0602) $\times 10^{-1}$
25 $\times 10^4$	59.88$\pm$4.21	1.20($\pm$0.0843) $\times 10^{-1}$

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

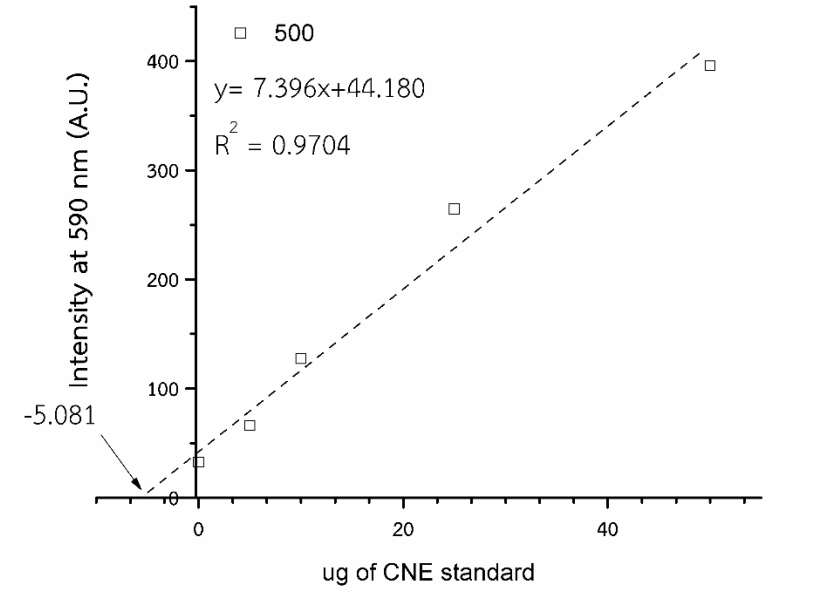
ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี external standard พบว่าผลการวิเคราะห์น้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ในทุกๆ จำนวนเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$, ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) (ตารางที่ 3.5)

3.2.3.2 การหาปริมาณไขมันในจากเซลล์เปียกและแห้งโดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี Standard addition

การวิเคราะห์ปริมาณแบบ standard addition ทำเพื่อลดผลกระทบจากการรบกวนของเมตริกที่อยู่ในสารตัวอย่างในการทดลองจึงทำการวิเคราห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายสีเขียวและไดอะตอมทั้งในเซลล์ที่ทำให้แห้งที่ผ่านกระบวนการเยือกแข็ง หรือ freeze dry cell และ เซลล์ที่อยู่ในสารละลาย หรือ เซลล์เปียก โดยใช้การวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition โดยการเติมสารมาตรฐาน CNE ในปริมาณต่างๆ กัน ลงในส่วนสกัดไขมัน (extraction method) ที่จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ สาหร่าย*Chlorella* sp. และไดอะตอม *Nitzschia* sp. ปริมาณไขมันจะได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากปริมาณสารมารตฐาน (ไมโครกรัม) กับ ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ดังแสดงในรูป 3.25

1) การหาปริมาณไขมันในจากเซลล์แห้งที่ได้การสกัดโดยการวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition

ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันแบบ Standard addition จะทำการทดลองใช้ที่ปริมาณของน้ำหนักส่วนสกัดไขมันของสาหร่าย *Chlorella* sp. 500 ไมโครกรัม เติมสารละลายมาตรฐาน CNE STD ใน $CHCl_3$ ความเข้มข้น 1×10^3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0, 5, 10, 25, และ 50 ไมโครลิตร หลังจากระเหย Chloroform ละลายส่วนสกัดอีกครั้งด้วย isopropanol 40 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Nile red (0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร) จำนวน 320 ไมโครลิตร และ 0.3% NaClO จำนวน 40 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดฟลูออร์ติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรซึ่งเป็น $\lambda_{emission}$ ของ Nile red ในไขมัน ได้การวิเคราะห์ตามรูปที่ 3.24 ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันจากวิธีการสกัดจากของเซลล์แห้ง *Chlorella* sp. ตามตารางที่ 3.6



รูปที่ 3.25 การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรของสารมาตรฐาน CNE 0-50 ไมโครกรัม ที่มีการเติมส่วนสกัดจากไขมันที่ได้จากเซล์แห้งของ *Chlorella* sp. 500 ไมโครกรัม (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)

ตารางที่ 3.6 ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้งของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition

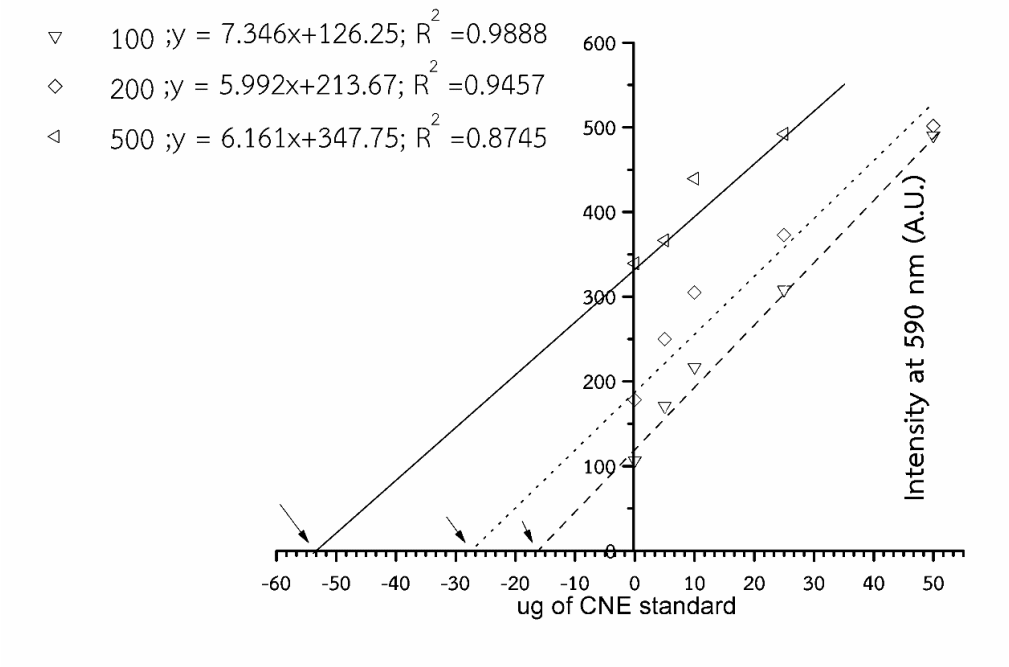
น้ำหนักส่วนสกัดไขมัน (ไมโครกรัม)	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้ง*,**
500	$1.85(\pm 0.734) \times 10^2$	**1.85 ± 0.73**

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี Standard addition โดยการทำ pair t-test ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ด้วยส่วนสกัดไขมันที่ได้จากจากเซลล์แห้ง ของ *Chlorella* sp. ด้วยวิธี Standard addition แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3.5) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบ External standard นั่นคือ ในสภาวะที่ทำการวิเคราะห์นี้ทั้งสองวิธีนี้ให้ผลที่แตกต่างกับแบบแกรวิเมตริก แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ทำการทดลองนี้ *Chlorella* sp. มีปริมาณไขมันน้อย อาจจำเป็นที่จะต้องใช้น้ำหนักส่วนสกัดไขมันเพิ่มมากกว่า 500 ไมโครกรัม นอกจากนี้ เซลล์ *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวซึ่งมีผนังเซลล์เป็นเซลลูโลสทำให้กระบวนการสกัดโดยใช้การแช่ในอ่างอัลตราโซนิค 30 นาที ในการทำให้เซลล์แตกอจะไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอทำให้มีปริมาณไขมันในส่วนสกัดน้อย

ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันแบบ Standard addition จะทำการทดลองใช้ที่ปริมาณของน้ำหนักส่วนสกัดไขมันของ *Nitzschia* sp. 100 200 และ 500 ไมโครกรัม เติมสารมาตรฐาน CNE STD จำนวน 0 5 10 25 และ 50 ไมโครกรัม ติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานของ CNE 0-50 ไมโครกรัม ดังแสดงในรูปที่ 3.26



รูปที่ 3.26 การเปลี่ยนแปลงความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรของสารมาตรฐาน CNE 0-50 ไมโครกรัม ที่มีการเติมส่วนสกัดจากไขมันที่ได้จากเซล์แห้งของ *Nitzschia* sp. 100 200 และ 500 ไมโครกรัม (ความเข้มข้นของ isopropanol 10% ความเข้มข้นของ Nile red เท่ากับ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้น NaClO เท่ากับ 0.3% และโดยใช้เวลาในการ incubation ที่อุณภูมิห้อง 30 นาที)

ตารางที่ 3.7 ปริมาณไขมันจากเซลล์แห้งของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition

น้ำหนักส่วนสกัดไขมัน (ไมโครกรัม)	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้ง*,**
25	2.72±0.73	10.89±2.90
50	6.61±0.53	13.22±1.06
100	17.40±1.43	17.40±1.43
200	25.90±1.54	12.95±0.76
500	57.27±3.67	11.45±0.73

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

2) การหาปริมาณไขมันในจากเซลล์เปียกที่ได้การสกัดโดยการวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition

ทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี Standard addition กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก โดยการทำ pair t-test ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งในทุกๆ ชุดของการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3.7)

ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. จะใช้ส่วนสกัดที่ได้จากเซลล์ (wet cell extract) ที่ปริมาณของเซลล์1.0 x10^4 และ 2.5 x10^4 เซลล์ เติมสารมาตรฐาน CNE STD ปริมาณ 0 5 10 25 และ 50 ไมโครกรัม ติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันจากส่วนสกัดที่ได้จากเซลล์เปียกของ *Chlorella* sp. ตามตารางที่ 3.8 ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ของ *Chlorella* sp. 1.0 ×10^4 และ 2.5 ×10^4 เซลล์ ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี Standard addition กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก โดยการทำ pair t-test ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าผลการวิเคราะห์น้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ ทุกจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก

ตารางที่ 3.8 ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Chlorella* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition

จำนวนเซลล์	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	น้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์* (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1.0 ×10^4	4.04±1.26	2.02(±0.632)×10^{-1}
2.5 ×10^4	5.93±0.66	1.19(±0.132)×10^{-1}

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3.9 ปริมาณไขมันจากเซลล์เปียกของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition

จำนวนเซลล์	ปริมาณไขมัน* (ไมโครกรัม)	น้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์*,** (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
2.5×10^4	6.13 ± 0.66	$1.23(\pm 0.132) \times 10^{-1}$
5.0×10^4	11.19 ± 0.16	$1.19(\pm 0.016) \times 10^{-1}$

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

** ตัวอักษรแบบหนาแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลการวิเคราะห์ที่ได้กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p \leq 0.05$)

ในไดอะตอม *Nitzschia* sp. จะใช้ส่วนสกัดที่ได้จากเซลล์ (wet cell extract) ที่ปริมาณของเซลล์ 2.5 $x10^4$ และ 5.0 $x10^4$ เซลล์ เติมสารมาตรฐาน CNE STD ปริมาณ 0-50 ไมโครกรัม ติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตร ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันจากส่วนสกัดที่ได้จากเซลล์เปียกของ *Nitzschia* sp. ตามตารางที่ 3.9 ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบน้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ของ *Nitzschia* sp. 2.5 $\times 10^4$ และ 5.0 $\times 10^4$ เซลล์ ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี Standard addition การทำ pair t-test เทียบกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแกรวเมตริก พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลการวิเคราะห์น้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ในทุกจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

4.1 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการย้อม (Staining method)

4.1.1 ในการทดลองศึกษาความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ *Scenedesmus* sp. โดยวิธีการย้อมด้วยสีย้อมฟลูออร์เรสเซนต์ Nile red โดยการใช้สารเคมี 5 ชนิด ได้แก่ 1) DMSO 2) MeOH 3) H_2SO_4 และ 4) H_3PO_4 พบว่าเมื่อเทียบกับน้ำมันมะกอกพบว่าสารเคมีต่างๆ ที่ได้ทำการการทสอบไม่สามารถทำให้ Nile red การทะลุผ่านผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวอย่าง *Scenedesmus* sp. ได้

4.1.2 ในการหาสภาะวที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์โดยวิธีการย้อมด้วยสีย้อมฟลูออร์เรสเซนต์ Nile red พบว่าสภาวะที่ให้ความเข้มฟลูออร์เรสเซนต์ที่ 590 นาโนเมตร สูงสุดเหมาะสมที่จะไปใช้หาปริมาณไขมันในสาหร่ายเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. คือ ความเข้มข้นของสีย้อม nile red เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO เท่ากับ 5% อุณหภูมิและเวลาในการ incubation เท่ากับ 40 ^{o}C 10 นาที ตามลำดับ ในขณะที่ สภาวะที่เหมาะสมในการย้อมไขมันในเซลล์ของไดอะตอม Nitzschia sp. คือ ความเข้มข้นของสีย้อม nile red เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO เท่ากับ 1% อุณหภูมิและเวลาในการ incubation เท่ากับ 40 ^{o}C 20 นาที ตามลำดับ

4.1.3 ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สีย้อมฟลูออร์เรสเซนต์อื่นนอกเหนือจากสีย้อมฟลูออร์เรสเซนต์ Nile red ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโดยใช้สีย้อมฟลูออร์เรสเซนต์ Eosin Y โดยการติดตามความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 560 นาโนเมตร พบว่าทั้งในสาหร่ายเซลล์สาหร่ายสีเขียว Chlorelllar sp. และเซลล์ของไดอะตอม Nitzschia sp. ที่ให้ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ตำแหน่งดังกล่าวสูงที่สุด คือ ความเข้มข้นของสีย้อม Eosin Y เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO เท่ากับ 5% อุณหภูมิและเวลาในการ incubation เท่ากับ 40 ^{o}C 30 นาที แสดงว่า Eosin Y สามารถใช้เป็นสีย้อมฟลูออร์เรสเซนต์สำหรับไขมันได้

4.1.4 การหาปริมาณไขมันในสามหร่ายการหาปริมาณของไขมันในสาหร่ายสีเขียวและไดอะตอม *Chlorella* sp. และ *Nitzschia* คือ โดยการย้อมด้วยสีย้อม Nile red โดยวิธี External Standard และ Standard addition โดยใช้สารมาตรฐาน CNE ปริมาณ 0-40 ไมโครกรัม และ 0-20 ไมโครกรัม ตามลำดับ ไม่สามามารถทำได้เนื่องพบว่าความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรกับจำนวนเซลล์ไม่มีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นตรง ซึ่งเกิดจาก 1) สภาวะที่ทำการย้อมไขมันด้วยสีย้อม Nile red มีประสิทธิภาพต่ำ สีย้อม ไม่สามารถในทะลุทะลวงเข้าสู่ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียงหรือไดอะตอมได้ 2) การรบการการวิเคราะห์ของเมตริก ในวิธีวิเคราะห์ปริมาณแบบ Standard addition และ 3) ปริมาณไขมันในสาหร่ายและไดอะตอมที่นำมาทดลองมีปริมาณต่ำมาก ต่ำกว่าขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์

4.2 การหาปริมาณไขมันในสาหร่ายโดยวิธีการสกัด (Extraction method)

4.2.1 การเติมตัวออกซิไดส์ NaClO เป็นการกำจัดสารรบกวนการวิเคราะห์เช่นรงควัตถุต่างๆ ทำให้ความเข้มฟลูออร์เรสเซนส์ที่ 590 นาโนเมตรสูง ทั้งในส่วนสกัดไขมันของไดอะตอม *Nitzschial* sp. และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

4.2.2 การหาปริมาณไขมันของไดอะตอม *Nitzschial* sp. และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. โดยใช้การสกัดจากเซลล์แห้ง (Extraction method) โดยการวิเคราะห์แบบ External Standard พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งของ *Chlorella* sp. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีแกรวิเตรตริก ($p < 0.05$) ในขณะที่ของเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งของ *Nitzschia* sp. ที่วิเคราะห์โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี external standard ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$)

4.2.3 การหาปริมาณไขมันของเซลล์เปียกของไดอะตอม *Nitzschial* sp. และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. โดยวิธีการสกัด (Extraction method) โดยการวิเคราะห์แบบ External Standard พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% น้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ ของ *Chlorella* sp. และ *Nitzschia* sp. ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$)

4.2.4 ในการวิเคราะหีปริมาณแบบ Standard addition ในหาปริมาณไขมันในจากเซลล์แห้งของไดอะตอม *Nitzschial* sp. และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. พบว่าเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนส์ ของ *Chlorella* sp. จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$) ในขณะที่ในเซลล์แห้งของไดอะตอม *Nitzschial* sp. เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งในทุกๆ ชุดของการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$)

4.2.5 การหาปริมาณไขมันในจากเซลล์เปียกของไดอะตอม *Nitzschial* sp. และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่โดยวิธีการสกัดโดยใช้วิธี Standard addition น้ำหนักไขมันต่อปริมาตรเซลล์ของ *Chlorella* sp. (1.0×10^4 และ 2.5×10^4 เซลล์) และ *Nitzschia* sp. (2.5×10^4 และ 5.0×10^4 เซลล์) พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าผลการวิเคราะห์ในทุกจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลที่จากการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริก ($p > 0.05$)

4.2.6 ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยเทคนิคฟลูเรสเซนส์โดยใช้ส่วนสกัดเป็นวิธีที่เหมาะสมทั้งในสีเขียวขนาดเล็กและไดอะตอมโดยในผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกับวิธีวิเคราะห์ไขมัน แบบแกรวิเมตริกทั้งการวิเคราะห์ปริมาณแบบ External Standard และ Standard Addition และสามารถใช้กับการหาปริมาณทั้งเซลล์แห้งและเซลล์เปียกโดยใช้ปริมาณสารตัวอย่างที่น้อยกว่าแบบแกรวิเมตริก

4.3 ข้อเสนอแนะ

4.3.1 ในการวิจัยขั้นต่อไปควรทำการวิเคราะห์เปรียบกับวิธีการวิเคราะห์ไขมันโดยใช้ส่วนสกัดโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟฟี

4.3.2 ควรทำการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันกับเซลล์ปีกในกระบวนการเลี้ยงสาหร่ายในระยะต่างๆ

4.4 การนำไปใช้ประโยชน์

4.4.1 การวิเคราะห์ไขมันในเซลล์แห้งของสาหร่ายขนาดเล็กและไดอะตอมโดยวิธีการสกัด (extraction method) ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ สามารถวิเคราะห์ปริมาณไขมันได้ระดับต่ำในระดับไมโครกรัม โดยใช้น้ำหนักแห้งของสาหร่ายในระดับกว่าการวิเคราะห์แบบแกรวิเมตริกจึงเหมาะสมในการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไขมันต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็ก (micro algae)

4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กและไดอะตอมโดยวิธีการสกัด (extraction method) จากเซลล์เปียกหรือสารละลายเซลล์สาหร่าย ด้วยเทคนิคฟลูออร์เรสเซนต์ สามรถนำไปใช้ในการติดตามปริมาณไขมันต่อจำนวนเซลล์ระหว่างกระบวนการเลี้ยง (cultivation process) เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. หัวหน้าโครงการ

1.1 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวเมธินี จามกระโทก

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Matinee Jamkratoke

1.2 ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

1.3 หน่วยงาน

คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันบุรี

57 หมู่ 1 ตำบลโขมง อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี 22170

โทรศัพท์ 039310000 ต่อ 3010 โทรสาร 039310128

e-mail matinee@buu.ac.th

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

2.1 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางมะลิวัลย์ คุตะโค

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Maliwan Kutako

2.2 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2.3 หน่วยงานที่สังกัด

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

57 หมู่ 1ถนนชลประทาน ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170

โทรศัพท์ 0-3931-0000

โทรสาร 0-3931-0218

E-mail address maliwan@buu.ac.th