วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 25 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2563
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 25 (No.3) September – December 2020 บทความวิจัย

การเติบโตและองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายขนาดเล็ก *Selenastrum bibraianum* BPR1107 ที่แยกจากอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี ในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการและกลางแจ้ง

Growth and Fatty Acid Composition of Microalgae *Selenastrum bibraianum* BPR1107 Isolated from Bangpra Reservoir, Chonburi Province, under Laboratory and Outdoor Condition Cultivation

วราทิตย์ ดลสุจิต[1*], ธัญญารัตน์ คนซื่อ[1] และ ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ[2]

Waratit Donsujit[1*], Thanyarat Khonsue[1] and Thaithaworn Lirdwitayaprasit[2]

[1] *สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก*

[2] *ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

[1] *Fisheries Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Rajamangala University of Technology Tawan-ok*

[2] *Marine Science Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University*

Received : 1 January 2020

Revised : 4 March 2020

Accepted : 10 March 2020

บทคัดย่อ

ทำการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิคหลอดแก้วปลายแหลม จากอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสง คือ 16:8 ชั่วโมง ด้วยอาหารสูตร BG11 พบว่าสามารถคัดแยกและจำแนกชนิดได้เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Selenastrum bibraianu*m BPR1107 ซึ่งเซลล์มีลักษณะเป็นรูปโค้งหัวแหลมท้ายแหลมอยู่รวมเป็นกลุ่ม 4-6 เซลล์ มีขนาดประมาณ 5-20 ไมโครเมตร จากการเพาะเลี้ยงแบบกะในขวดปริมาตร 2 ลิตร เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและชีวมวลสูงสุดในวันที่ 11 เท่ากับ 1,014.11±343.19 x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 0.61±0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.98±0.10 ต่อวัน หรือใช้เวลาที่ 0.72±0.07 วัน ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า และมีปริมาณไขมันรวมเท่ากับ 23.15±0.41% โดยพบกรดไขมันชนิด C16:0 (palmitic acid) มากที่สุดคือ 76.73% และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแบบกะในบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้งปริมาตร 1,000 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและชีวมวลสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 413.17±98.60x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 0.11±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.74±0.11 ต่อวัน หรือใช้เวลาที่ 0.95±0.13 วัน ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า และมีปริมาณไขมันรวมเท่ากับ 20.51±0.32% โดยพบกรดไขมันชนิด C16:0 (palmitic acid) มากที่สุดคือ 60.89% สำหรับองค์ประกอบหลักและสัดส่วนของกรดไขมันในสาหร่ายชนิดนี้พบว่ามีความคล้ายคลึงกับน้ำมันปาล์ม ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *S. bibraianu*m BPR1107 เป็นตัวเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

คำสำคัญ : สาหร่ายขนาดเล็ก ; *Selenastrum* ; การคัดแยก ; การเติบโต ; กรดไขมัน ; อ่างเก็บน้ำบางพระ

*Corresponding author. E-mail : waratit17@hotmail.com

Abstract

Microalgae were isolated from the Bangphra reservoir, Chonburi Province by the micro-manipulative method and cultured in BG11 culture medium under laboratory conditions at 26±2 °C under the light intensity approximately 60 μmols^{-1}m^{-2}, light and dark period of 16:8 hours. After isolation and morphology identification, the green microalgae *Selenastrum bibraianum* BPR1107 with curve and sharp shape, colony form 4-6 cells and cell size of 5-20 microns, was selected. Batch culture of *S. bibraianum* BPR1107 in 2 L bottle provided the maximum cell density and maximum biomass (days 11) of 1,014.11±343.19 x10^4 cells/ml and 0.61±0.05 g/L, respectively. The specific growth rate of 0.98±0.10 per day or doubling time 0.72±0.07 day. The total lipid of 23.15±0.41% and found maximum fatty acid content was palmitic acid (76.73%). Batch culture of *S. bibraianum* BPR1107 in raceway pond provided the maximum cell density and maximum biomass (days 6) of 413.17±98.60 x10^4 cells/ml and 0.11±0.01 g/L, respectively. The specific growth rate of 0.74±0.11 per day or doubling time 0.95±0.13 day. The total lipid of 20.51±0.32% and found maximum fatty acid content was palmitic acid (60.89%). The analysis of the fatty acid profile of *S. bibraianum* BPR1107 showed that similar to palm oil. Therefore, microalgae *S. bibraianum* BPR1107 was feasible as feedstock for biodiesel production. The present study indicated that *S. bibraianum* BPR1107, was one alternative as a source for biodiesel production.

Keywords : microalgae ; *Selenastrum* ; isolate ; growth ; lipid ; Bangpra Reservior

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยผลิตไบโอดีเซลจากปาล์มน้ำมันเป็นหลัก ซึ่งปาล์มน้ำมันเป็นพืชอาหารและเริ่มมีปริมาณจำกัด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแหล่งวัตถุดิบจากพืชอื่น ๆ ที่ไม่ใช่พืชอาหารมาผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและไบโอดีเซล โดยสาหร่ายขนาดเล็กจะให้ปริมาณน้ำมันได้สูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ สามารถเก็บเกี่ยวได้ต่อเนื่อง ช่วยดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งยังสามารถแปรรูปกากสาหร่ายเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้อีกด้วย เช่น การอัดทำแท่งเชื้อเพลิงหรือถ่านชีวภาพ (biochar) อาหารสัตว์ และปุ๋ย ฯลฯ (Brennan & Owende, 2010; Chisti, 2007; Xiaodong *et al*., 2009) โดยกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย การเพาะเลี้ยงขยายเพื่อผลิตชีวมวลสาหร่าย การเก็บเกี่ยวชีวมวล การสกัดน้ำมัน และการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด โดยสายพันธุ์สาหร่ายที่ดีควรมีการเติบโตรวดเร็ว ให้ผลผลิตชีวมวลปริมาณสูง สามารถเพาะเลี้ยงขยายในที่กลางแจ้ง มีการสะสมน้ำมันหรือไขมันภายในเซลล์ปริมาณมาก สามารถเติบโตและปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้าง (ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม) การทนต่อการกินของแพลงก์ตอนสัตว์ สามารถเก็บเกี่ยวง่าย และมีต้นทุนต่ำ เป็นต้น (Borowitzka,1992; Doan *et al*., 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Xiao *et al*., 2013) สาหร่ายต่างชนิดต่างสายพันธุ์จะมีองค์ประกอบชีวมวล ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดนิวคลีอิกที่ต่างกัน และให้ปริมาณน้ำมันที่ต่างกัน จึงมีการศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลมากมาย

(Nascimento *et al*., 2013; Sadvakasova *et al*., 2019) โดยเฉพาะสาหร่ายขนาดเล็กในครอบครัว Selenastraceae เช่น *Monoraphidium* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Selenastrum* sp. และ *Kirchneriella* sp. (Yee, 2016) สำหรับสาหร่ายน้ำจืดสกุล *Selenastrum* เป็นสกุลที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากมีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์สูง สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และให้ผลผลิตชีวมวลสูง (Griffiths and Harison, 2009; Song *et al*., 2013; Pe'rez *et al*., 2015; Chakravarty and Mallick, 2019) และจากข้อมูลงานวิจัยที่มีการศึกษา เช่น การศึกษาสภาวะการสะสมไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Selenastrum* sp.GA66 เพื่อการผลิตไบโอดีเซล พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติ มีผลผลิตชีวมวลสูงสุดที่ 1.11 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมัน 16.12% น้ำหนักแห้ง แต่เมื่อมีการเติม NaCl ปริมาณ 5.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยง ทำให้มีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 37.6% แต่ผลผลิตชีวมวลลดลงเหลือ 0.54 กรัมต่อลิตร (Chakravarty and Mallick, 2019) Kudahettige *et al*. (2018) รายงานการใช้น้ำเสียจากชุมชนเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. minutum* ด้วยชุดปฏิกรณ์แบบใช้แสงที่อุณหภูมิ 22±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงคือ 16:8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 6 วัน จากการทดลอง 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม (น้ำเสียเข้มข้น) ชุดเจือจาง และชุดเติม NaCl 5% พบว่ามีผลผลิตชีวมวลที่ 122, 99.8 และ 78.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณไขมันสูงสุดที่ 35.5, 40 และ 39% น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Marika *et al*. (2017) รายงานการใช้น้ำเสียชีวภาพจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ สวนบ้านเรือน และอุตสาหกรรม นำมาทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Selenastrum* sp. โดยเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย ด้วยชุดปฏิกรณ์แบบใช้แสง ที่อุณหภูมิ 24-27 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 230 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงคือ 16:8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่ามีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.34-0.68 ต่อวัน ผลผลิตชีวมวล 0.1-2.4 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณไขมัน 4-17% นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในสาหร่ายสกุล *Ankistrodesmus* เนื่องจากอยู่ในครอบครัว Selenastraceae เช่นเดียวกับสาหร่ายสกุล *Selenastrum* อีกทั้งบางชนิดยังมีลักษณะเซลล์คล้ายคลึงกันมาก เช่น มีการคัดแยกสาหร่ายสกุล *Ankistrodesmus* จากแม่น้ำ Hainan Dao มณฑลไห่หนาน ประเทศจีน เมื่อจำแนกชนิดพบว่าเป็นชนิด *A. gracilis* ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งมีชีวมวลสูงสุดที่ 1.16-1.39 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะที่ 0.21-0.44 ต่อวัน และมีปริมาณไขมัน 30.66-47.90% ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 160 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงคือ 14:10 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7-10 วัน (Zhang *et al*., 2014) จากการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาของสาหร่าย *A. falcatus* ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงคือ 12:12 ชั่วโมง พบปริมาณไขมัน 35% มีอัตราการเติบโตจำเพาะที่ 0.2 ต่อวัน และมีชีวมวล 190 มิลลิกรัมต่อลิตร (George *et al*., 2014) ส่วนการศึกษาปรับลดสารอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเหล็กต่อการผลิตไขมันในสาหร่าย *A. falcatus* kj671624 พบว่าที่การเพาะเลี้ยงแบบปกติโดยไม่มีการปรับสูตรอาหารพบปริมาณไขมันในสาหร่าย 23.33% ในสภาวะอาหารเลี้ยงสูตร BG11 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 120 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงคือ 16:8 ชั่วโมง และมีการเขย่าที่ 110 รอบต่อนาที (Singh *et al*., 2015)

จากข้อมูลปริมาณการสะสมไขมัน อัตราการเติบโต และผลผลิตชีวมวลที่ค่อนข้างสูงในสาหร่ายขนาดเล็กสกุล *Selenastrum* อีกทั้งยังเป็นสกุลที่สามารถพบได้ในแหล่งน้ำของประเทศไทย (Peerapornpisal, 2013) และจากการสำรวจเบื้องต้นของผู้วิจัยได้พบสาหร่ายสกุลนี้ในแหล่งน้ำท้องถิ่นคือ อ่างเก็บน้ำบางพระ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กสกุล *Selenastrum* จากอ่างเก็บน้ำบางพระ

จังหวัดชลบุรี ทำการจำแนกชนิดและศึกษารูปแบบการเติบโต ปริมาณไขมัน และองค์ประกอบกรดไขมัน โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการและในบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้งซึ่งมีสภาพแวดล้อมไม่คงที่ เพื่อเป็นแนวทางในการนำสาหร่ายสายพันธุ์นี้มาใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงระดับมหมวลและระดับเชิงพาณิชย์ และพัฒนาไปเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล หรือสารประกอบทางชีวเคมีอื่น ๆ รวมทั้งใช้ในงานด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและด้านสิ่งแวดล้อมได้ต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

เก็บตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำบางพระ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยการเก็บน้ำที่ระดับผิวหน้าน้ำความลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ด้วยการใช้ถังตักน้ำประมาณ 100 ลิตร กรองผ่านถุงแพลงก์ตอนขนาดตา 21 ไมโครเมตร นำตัวอย่างที่ได้เก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างสาหร่ายที่ได้มาส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการแยกเฉพาะโคโลนีของสาหร่าย *Selenastrum* ด้วยเทคนิคหลอดแก้วปลายแหลม ตามวิธีการของ Hoshow & Rosowski (1973); Anderson & Kawachi (2005) จากนั้นถ่ายลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่บรรจุอาหารสูตร BG11 (Stanier *et al*., 1971) นำไปบ่มบนชั้นเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสง คือ 16:8 ชั่วโมง หลังจากนั้นประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะมีโคโลนีสีเขียวขึ้นในหลอด ให้เขี่ยโคโลนีมาตรวจสอบว่าเป็นเซลล์ *Selenastrum* หรือไม่

การทำให้เชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์และการเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้น

ทำการแยกเชื้อสาหร่าย *Selenastrum* sp. BPR1107 ให้บริสุทธิ์ (ปลอดแบคทีเรีย) โดยวิธีการแยกบนอาหารวุ้นในจานเพาะเชื้อ (Guillard, 1995, 2005) และเก็บไว้เป็นหัวเชื้อในหลอดทดลองฝาเกลียว จากนั้นถ่ายหัวเชื้อสาหร่าย *Selenastrum* sp. BPR1107 ลงในขวดกลมก้นแบน ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร BG11 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.1 วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงคือ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำสาหร่ายไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่าง ๆ ต่อไป และทำการจำแนกชนิดสาหร่าย *Selenastrum* sp. BPR1107 ในระดับชนิด โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ผลกับศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ศึกษาการเติบโตของสาหร่าย Selenastrum sp. BPR1107

การเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการ

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Selenastrum* sp. BPR1107 ในอาหารเหลวสูตร BG11 ปริมาตร 1.5 ลิตร ในขวดแล็บฝาเกลียวปริมาตร 2 ลิตร โดยเติมหัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้น 10% ของปริมาตรอาหารเลี้ยง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงคือ 16:8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดเวลา จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยวิธีปลอดเชื้อทุกวัน ครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์การเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายและวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 680 นาโนเมตร จนกระทั่งสาหร่ายเติบโตเข้าสู่

ระยะตาย (death phase) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนด้วยวิธีมาตรฐานทางสถิติ จากนั้นนำค่าจำนวนเซลล์ที่ได้สร้างกราฟการเติบโตของสาหร่ายเพื่อใช้วิเคราะห์หาอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: μ) (หน่วย: ต่อวัน) และระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเซลล์ (doubling time: D_t) (หน่วย: วัน) (สูตรที่ 1 และ 2)

$$\mu = \frac{Ln(N_2/N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$D_t = \frac{Ln}{\mu} \quad (2)$$

เมื่อ N_1 = จำนวนเซลล์วันแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
N_2 = จำนวนเซลล์วันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
t_1 = วันที่เก็บตัวอย่างวันแรก
t_2 = วันที่เก็บตัวอย่างวันสุดท้าย

การเพาะเลี้ยงในสภาวะบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง

ทำการเตรียมน้ำสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้งปริมาตร 1,000 ลิตร กรองน้ำผ่านถุงกรองและฆ่าเชื้อน้ำให้สะอาด โดยเติมโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10% ลงในน้ำให้มีความเข้มข้น 50 ส่วนในล้าน เปิดใบพัดให้กวนน้ำตลอดเวลาเป็นเวลา 2 วัน แล้วใช้ชุดทดสอบคลอรีนตรวจสอบ ถ้ายังมีคลอรีนตกค้างอยู่ให้เปิดใบพัดกวนน้ำต่ออีก 1 วัน เมื่อน้ำปราศจากคลอรีนแล้ว ให้เติมสารเคมีเกรดอุตสาหกรรมทั้งหมด ตามอาหารสูตร BG11 จากนั้นใส่ลงหัวเชื้อสาหร่ายที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการประมาณ 10% ของปริมาตรน้ำเลี้ยง เปิดใบพัดให้กวนน้ำในบ่อตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อไปวิเคราะห์การเติบโตเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการ

<u>การวิเคราะห์ปริมาณไขมันรวมและองค์ประกอบกรดไขมัน</u>

ดัดแปลงตามวิธีของ Bligh & Dyer (1959) และ Lee *et al*. (2010)

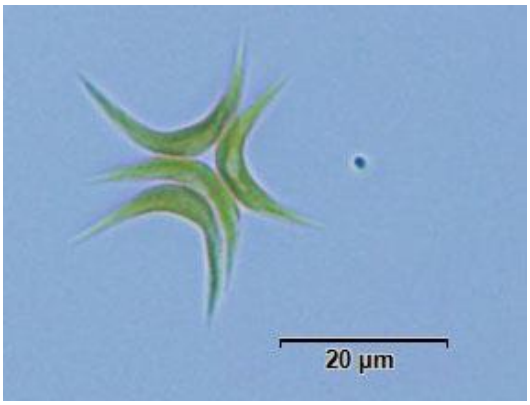
ทำการเก็บสาหร่ายในระยะเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) มาทำให้แห้งด้วยการอบลมร้อน อุณหภูมิไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส บดสาหร่ายที่แห้งแล้วให้ละเอียด จากนั้นชั่งสาหร่ายแห้งประมาณ 1 กรัม เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) เขย่า แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที แล้วใส่ในเครื่องโซนิเคเตอร์เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการกรองเซลล์สาหร่ายออก แล้วนำไประเหยสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลออกด้วยการอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำไปใส่ในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และคำนวณปริมาณไขมันรวม โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนด้วยวิธีมาตรฐานทางสถิติ

จากนั้นนำสาหร่ายมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย เพื่อตรวจสอบคุณภาพของไขมัน โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lepage & Roy (1986) และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน ด้วยเครื่อง GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometer) (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ โดยห้องปฏิบัติการวิจัยและบริการ ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ผลการวิจัย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก Selenastrum sp. BPR1107 ที่คัดแยกได้

การศึกษาเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายขนาดเล็กสกุล *Selenastrum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่ามีลักษณะเซลล์คล้ายเสี้ยวพระจันทร์หรือเคียวปลายแหลม มีสีเขียวใบไม้ อยู่รวมเป็นกลุ่มโดยเกาะกันแบบหลวม ๆ ตั้งแต่ 4-16 เซลล์ โดยหันด้านโค้งเข้าหากัน มีขนาดเซลล์ประมาณ 5-20 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์วางตัวตามแนวยาวโค้งของผนังเซลล์ด้านโค้ง มี 1 ไพรีนอยด์ ซึ่งจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่ได้กล่าวมานี้และผลวิเคราะห์จากศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ทำให้สามารถระบุลำดับอนุกรมวิธานของสาหร่ายขนาดเล็กสกุล *Selenastrum* sp. สายพันธุ์ BPR1107 ได้ว่าเป็นสมาชิกของดิวิชัน Chlorophyta ชั้น Chlorophyceae อันดับ Sphaeropleales วงศ์ Selenastraceae สกุล *Selenastrum* สายพันธุ์ *Selenastrum bibraianu*m BPR1107 (ภาพที่ 1)



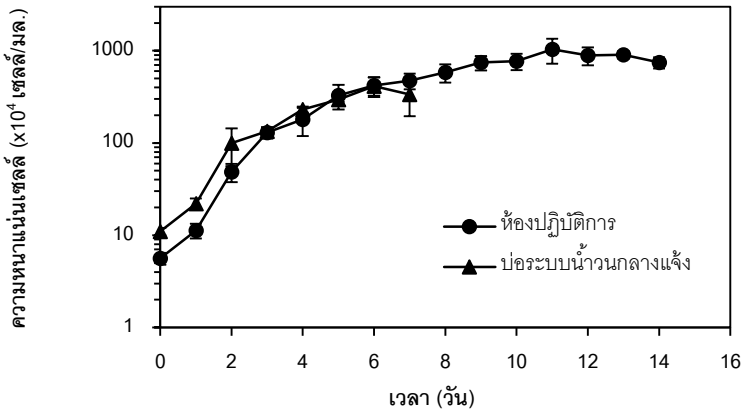
ภาพที่ 1 สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำบางพระ (กำลังขยาย 400 เท่า)

การเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก S. bibraianum BPR1107

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าในช่วงเริ่มต้นมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ $5.28\pm1.40\times10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการเติบโตจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ $1,014.11\pm343.19\times10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 11 และมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ $466.02\pm115.38\times10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนชีวมวลพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.27 ± 0.03 และ 0.61 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการเติบโตจำเพาะของ *S. bibraianum* BPR1107 อยู่ที่ 0.98 ± 0.10 ต่อวัน หรือใช้เวลาที่ 0.72 ± 0.07 วัน ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า มีรูปแบบการเติบโต คือ มีระยะปรับตัว ในวันที่ 0-1 เซลล์จะเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล ในวันที่ 1-4 มีระยะเฉื่อยในวันที่ 5-7 มีระยะคงที่ในวันที่ 8-11 และมีระยะตายตั้งแต่วันที่ 12-14 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ภายใต้สภาวะบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้งเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าในช่วงเริ่มต้นมีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ $11.10\pm1.06\times10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการเติบโตจนมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ $413.17\pm98.60\times10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 และมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ

226.63±41.63x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนชีวมวลพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.07±0.01 และ 0.11±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการเติบโตจำเพาะของ *S. bibraianum* BPR1107 อยู่ที่ 0.74±0.11 ต่อวัน หรือใช้เวลาที่ 0.95±0.13 วัน ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า มีรูปแบบการเติบโต คือ มีระยะปรับตัวในวันที่ 0-1 เซลล์จะเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล ในวันที่ 1-4 มีระยะเฉื่อยในวันที่ 4-5 มีระยะคงที่ในวันที่ 5-6 และมีระยะตายตั้งแต่วันที่ 6-7 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเติบโตของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการและบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง

ตารางที่ 1 รูปแบบการเติบโตของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการและบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง (ค่าเฉลี่ย ± S.D.; n = 3)

รูปแบบ	ห้องปฏิบัติการ	บ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง
ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น (x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	5.28±1.40	11.10±1.06
ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	1,014.11±343.19	413.17±98.60
ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย (x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	466.02±115.38	226.63±41.63
วันที่มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด	11	6
น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	0.27±0.03	0.07±0.01
น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.61±0.05	0.11±0.01
วันที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด	11	6
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	0.98±0.10	0.74±0.11
ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเซลล์ (วัน)	0.72±0.07	0.95±0.13
ลักษณะรูปแบบการเติบโต (วันที่)		
ระยะปรับตัว	0-1	0-1
ระยะเอกซ์โพเนนเชียล	1-4	1-4
ระยะเฉื่อย	5-7	4-5
ระยะคงที่	8-11	5-6
ระยะตาย	12-14	6-7

ปริมาณไขมันและองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก S. bibraianum BPR1107

จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันรวมในสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ พบมีปริมาณไขมันรวมเท่ากับ 23.15±0.41% เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน พบกรดไขมันจำนวน 4 ชนิด โดยมีกรดไขมันชนิด C16:0 (palmitic acid) มากที่สุดคือ 76.73% รองลงมาคือกรดไขมันชนิด C18:1 (oleic acid) และ C18:3 (linolenic acid) คือ 14.80% และ 3.94% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ และมีกรดไขมันที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (unidentified) 4.53% ของกรดไขมันทั้งหมด สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง พบมีปริมาณไขมันรวมเท่ากับ 20.51±0.32% เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน พบกรดไขมันจำนวน 7 ชนิด โดยมีกรดไขมันชนิด C16:0 (palmitic acid) มากที่สุดคือ 60.89% รองลงมาคือกรดไขมันชนิด C18:3 (linolenic acid), C18:1 (oleic acid), C16:1 (palmitoleic acid), C18:2 (linoleic acid) และ C14:0 (myristic acid) คือ 15.65, 12.42%, 3.21%, 2.67% และ 0.37% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ และมีกรดไขมันที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 4.79% ของกรดไขมันทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการและบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง

กรดไขมัน	ปริมาณ (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	
	ห้องปฏิบัติการ	บ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง
C14:0 (myristic acid)	-	0.37
C16:0 (palmitic acid)	76.73	60.89
C16:1 (palmitoleic acid)	-	3.21
C18:1 (oleic acid)	14.80	12.42
C18:2 (linoleic acid)	-	2.67
C18:3 (linolenic acid)	3.94	15.65
Unidentified	4.53	4.79

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาอัตราการเติบโต ชีวมวล และปริมาณไขมันรวมในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 ที่ได้คัดแยกมาจากอ่างเก็บน้ำบางพระ ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ. ชลบุรี แล้วนำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 14 วัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าค่าต่าง ๆ มีทั้งใกล้เคียงและแตกต่างกัน (ตารางที่ 3) เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ รวมทั้งสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ สูตรอาหาร อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงเวลาที่ได้รับแสง นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ในสาหร่ายมีความแตกต่างกัน รวมทั้งวิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหรือไขมันจากสาหร่าย ซึ่งมีอยู่หลายวิธีขึ้นกับผู้วิจัยเลือกนำมาใช้ในการศึกษา (Lee *et al*., 2010; Halim *et al*. 2012; Yee, 2016) เช่นการศึกษาของ Rocha *et al*. (2018) รายงานว่า *S. gracile* (CH005) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร LC Oligo, อุณหภูมิ 22±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงการให้แสงสว่างและมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง เมื่อมีการปรับความเข้มข้นของสารฟอสฟอรัส

ในอาหารเลี้ยงลดลงจากระดับปกติที่ 230 ไมโครโมลต่อลิตร เป็น 23 และ 2.3 ไมโครโมลต่อลิตร ทำให้อัตราการเติบโตของสาหร่ายลดลงจาก 1.14 ต่อวัน เป็น 0.88-1.00 ต่อวัน เช่นเดียวกับผลผลิตชีวมวลที่ลดลงจาก 48.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 21.4-27.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่มีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น จาก 1.29 เป็น 2.08-2.19 พิโคกรัมต่อเซลล์ ในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งฟอสฟอรัสพบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *A. falcatus* มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น 50-65 % ซึ่งไขมันส่วนใหญ่เป็นประเภทไตรกลีเซอไรด์ (Kilham *et al*., 1997) เช่นเดียวกับ Álvarez-Díaz *et al*. (2014) ศึกษาการสะสมไขมันในสาหร่าย *A. falcatus* (SAG-202-2) เมื่อมีการลดธาตุอาหารบางชนิด โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติ พบว่าสาหร่ายมีปริมาณไขมัน 36.54% แต่เมื่อทำการปรับลดปริมาณฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงทำให้มีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเป็น 45.94 % การศึกษาของ Ouyang *et al*. (2015) ได้ศึกษาปัจจัยของความเข้มแสง พบว่าเมื่อสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* ได้รับความเข้มแสงที่ระดับ 80-100 และ 150-170 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน มีผลผลิตชีวมวลสูงกว่าที่ความเข้มแสงที่ระดับ 220-240 โดยที่ระดับความเข้มแสง 150-170 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที มีผลผลิตชีวมวลสูงสุดที่ 393.88 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการที่ความเข้มแสงสูงขึ้นเกินระดับความต้องการของสาหร่ายอาจทำให้ไปจำกัดและยับยั้งการเติบโตหรือเกิดความเสียหายจากกระบวนโฟโต้ออกซิเดชั่นได้ (Jeong *et al*., 2013) สอดคล้องกับการศึกษาของ He *et al*. (2015) ศึกษาปัจจัยของแสงที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการสะสมไขมันในสาหร่าย *A. fusiformis* H1 โดยได้ให้ความเข้มแสง 3 ระดับ ได้แก่ 40, 200 และ 400 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสง 3 แบบ ได้แก่ 24:0, 18:6 และ 12:2 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และช่วงเวลาได้รับแสง:ไม่ได้รับแสงที่ 18:6 ชั่วโมง เป็นสภาวะแสงที่เหมาะสมที่ทำให้มีปริมาณไขมันรวมสูงสุดคือ 57.58% เช่นเดียวกันการให้อากาศแก่สาหร่ายเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สาหร่ายเติบโตต่างกัน จากรายงานการศึกษาโดยเพาะเลี้ยง *Ankistrodesmus* sp. ในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารสูตร BBM เป็นเวลา 14 วัน โดยมีการทดลองให้อากาศ 3 รูปแบบ ผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายมีผลผลิตชีวมวลสูงสุด เมื่อได้รับอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 2.4 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือได้รับอากาศแบบปกติ และไม่ได้รับอากาศเท่ากับ 2.1 และ 1.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Salim *et al*., 2013) การศึกษาของ Chakravarty and Mallick (2019) พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายขนาดเล็ก *Selenastrum* sp.GA66 เช่น การเติมเกลือในอาหารเลี้ยง หรือการทำให้อาหารเลี้ยงขาดแคลนสารอาหาร ได้แก่ ไนเตรทและฟอสเฟต ทำให้มีการสะสมไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น แต่มีผลทำให้ผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายลดลง เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยง *A. falcatus* แบบกะที่ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ช่วงการให้แสงสว่างและมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง โดยเติมเกลือในอาหารสูตร BG11 ปริมาณ 160 มิลลิโมลาร์ พบว่าทำให้ได้ไขมันรวมเพิ่มขึ้นจาก 38.3% เป็น 55.3% ส่วนอัตราการเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 0.21 ต่อวัน เป็น 0.31 ต่อวัน และพบกรดไขมันหลักคือ palmitic acid, oleic acid และ linolenic acid (Jayanta *et al*., 2012) มีรายงานการศึกษาไว้ว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัด สาหร่ายจะมีการสะสมไขมันในเซลล์เพิ่มขึ้น เช่น เมื่อขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนจะกระตุ้นให้เกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวที่ช้าลง ซึ่งเกิดจากสารอาหารที่ไม่เพียงพอทำให้เซลล์เลือกที่จะสะสมอาหารในรูปของไขมัน เพราะเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์ไขมันสามารถทนต่อการขาดไนโตรเจนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้การขาดไนโตรเจนยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้ดีมากขึ้น เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกลไกการสังเคราะห์ไขมันคือ Diacylglyceroltransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน Diacylglyceral

เป็น Triacylglyceriade (TAG) ดังนั้นโมเลกุลคาร์บอนที่ได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์หรือสารอินทรีย์จึงถูกชักนำให้เปลี่ยนไปเป็นไขมันมากกว่าคาร์โบไฮเดรต ทำให้สามารถพบปริมาณไขมันสูงในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Xin *et al*., 2010; Feng *et al*., 2012)) นอกจากนี้ความแตกต่างของวิธีการสกัดและวิเคราะห์ไขมันอาจทำให้ได้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันได้ เช่นการศึกษาของ El-Sheekh & Hamouda (2016) พบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *Ankistrodesmus falcatus* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ในครอบครัวเดียวกับ *Selenastrum* เป็นสาหร่ายที่มีผนังเซลล์แข็ง การทำให้ผนังเซลล์แตกค่อนข้างยาก จึงได้ศึกษาวิธีการทำให้ผนังเซลล์สาหร่ายชนิดนี้แตกด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การบด การใช้ความดันไอ (autoclaving) การใช้คลื่นรังสีไมโครเวฟ (microwave) การใช้คลื่นเสียง (sonication) การใช้เทคนิคออสโมซิสโดยอาศัยความต่างของความดัน (osmotic shock) ด้วยสารละลาย NaCl 10% จากนั้นใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ สกัดและวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้เทคนิคออสโมซิสทำให้เซลล์แตกและสกัดไขมันในสาหร่ายด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (1:1) มีปริมาณไขมันสูงสุดที่ 11.93% น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ การบดและการใช้คลื่นเสียง มีค่า 11.8% และ 10.46% ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดไขมันที่สกัดได้สูงสุดเท่ากับ 75.26% ของไขมันรวม เมื่อทำให้เซลล์แตกด้วยเทคนิคออสโมซิส รองลงมาคือการใช้ความดันไอและการบด มีค่า 67.74% และ 63.11% ของไขมันรวม ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในสาหร่าย *S. bibraianum* BPR1107 ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าไขมันที่สกัดได้ประกอบด้วยสัดส่วนกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว 61.26-76.73% และ 18.74-33.95% ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบหลักและสัดส่วนของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม (ตารางที่ 3) (Lamasiri *et al*., 2015) จากการศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Selenastrum* ชนิดต่าง ๆ พบว่ามีกรดไขมันชนิดหลักคือ C16:0 (palmitic acid) C18:1 (oleic acid) และ C18:3 (linolenic acid) เช่นเดียวกับการศึกษานี้ (ตารางที่ 3) ซึ่งองค์ประกอบกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตามตัวเลขคาร์บอน โดยกรดไขมันที่มีเลขคาร์บอน 14-20 เป็นกรดไขมันอิ่มตัว เหมาะสำหรับใช้ในการผลิตไบโอดีเซล และกรดไขมันที่มีเลขคาร์บอนมากกว่า 20 (PUFAs) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นสารอาหารที่มีมูลค่าสูงใช้ในงานด้านอาหารและสุขภาพ (Scott *et al*., 2010; Singh and Sai, 2010)

สำหรับองค์ประกอบหลักและสัดส่วนของกรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล แต่ทั้งนี้ต้องศึกษาคุณภาพน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายชนิดนี้ตามมาตรฐาน ASTM ต่อไป แต่จากงานวิจัยนี้พบว่าสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 สามารถเพาะเลี้ยงในสภาวะกลางแจ้งที่สภาพแวดล้อมไม่คงที่ได้ ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การขยายการเพาะเลี้ยงกลางแจ้งแบบมหมวลในระดับเชิงชุมชนหรือระดับเชิงพาณิชย์ในอนาคตได้ ดังนั้นสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 จึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์กรดไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก *Selenastrum* ชนิดต่าง ๆ และน้ำมันปาล์ม

กรดไขมัน	*S. gracile* [1]	S. *bibraianum* [2]	*S. minutum* [3]	*Selenastrum* sp. [4]	น้ำมันปาล์ม [5]
C14:0 (myristic acid)	nd	5.59	nd	nd	1.04
C16:0 (palmitic acid)	23.9	35.83	29.3	24.4	46.6
C18:0 (stearic acid)	nd	nd	3.3	3.7	4.83
C16:1 (palmitoleic acid)	nd	nd	3.6	nd	-
C18:1 (oleic acid)	24.7	nd	25.2	40.7	36.6
C18:2 (linoleic acid)	5.5	4.64	3.6	4.2	10.8
C18:3 (linolenic acid)	15.4	37.45	18.7	17.7	-

หมายเหตุ: [1]Rocha *et al*. (2018) [2]Mori *et al*. (2018) [3]Kudahettige *et al*. (2018) [4]Marika *et al*. (2018) [5]Lamasiri *et al*. (2015)
nd = not detected

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี จำแนกได้เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 และสามารถเพาะเลี้ยงได้ผลดีทั้งในสภาวะห้องปฏิบัติการและในบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้ง โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะในขวดปริมาตร 2 ลิตร เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 1,014.10$\pm$343.19x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 0.61$\pm$0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.98$\pm$0.10 ต่อวัน และมีปริมาณไขมันรวมเท่ากับ 23.15$\pm$0.41% โดยพบกรดไขมันชนิด C16:0 (palmitic acid) มากที่สุดคือ 76.73% ส่วนเพาะเลี้ยงแบบกะในบ่อระบบน้ำวนกลางแจ้งปริมาตร 1,000 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 413.17$\pm$98.60x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 0.11$\pm$0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.74$\pm$0.11 ต่อวัน และมีปริมาณไขมันรวมเท่ากับ 20.51$\pm$0.32% โดยพบกรดไขมันชนิด C16:0 (palmitic acid) มากที่สุดคือ 60.89% สำหรับองค์ประกอบหลักและสัดส่วนของกรดไขมันในสาหร่ายชนิดนี้พบว่ามีความคล้ายคลึงกับน้ำมันปาล์ม อีกทั้งยังสามารถเพาะเลี้ยงในสภาวะกลางแจ้งที่สภาพแวดล้อมไม่คงที่ได้ ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การขยายการเพาะเลี้ยงกลางแจ้งแบบมหมวลในระดับเชิงชุมชนหรือระดับเชิงพาณิชย์ในอนาคตได้ ดังนั้นสาหร่ายขนาดเล็ก *S. bibraianum* BPR1107 จึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารอ้างอิง

Anderson, R. A. & Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. In R. A. Anderson. (ed.), *Algal Culturing Techniques*. (pp. 83-100). London: Elsevier Academic Press.

Álvarez-Díaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, C. & Perales, J. A. (2014). Lipid production of microalga *Ankistrodesmus falcatus* increased by nutrient and light starvation in a two-stage cultivation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, *174*, 1471-1483.

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol*, *37*, 911-917.

Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 557-577.

Borowitzka, M. A. (1992). Algal biotechnology products and processes-matching science and economics. *J. Appl. Phycol*., *4*, 267-279.

Chakravarty, S. & Mallick, N. (2019). Optimization of lipid accumulation in an aboriginal green microalga *Selenastrum* sp. GA66 for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, *126*, 1-13.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology*, *25*, 294-306.

Doan, T. T. Y., Sivaloganathan, B. & Obbard, J. P. (2011). Screening of marine microalgae for biodiesel Feedstock. *Biomass and Bioenergy*, *35*, 2534-2544.

El-Sheekh, M. M. & Hamouda, R. A. (2016). Lipids extraction from the green alga *Ankistrodesmus falcatus* using different methods. *Rend. Fis. Acc. Lincei*., *27*, 589-595.

Feng, P., Deng, Z., Hua, Z., & Fan, L. (2012). Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *J. Biosci. Bioeng*., *114*, 405-410.

George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T. & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*-A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, *171*, 367-374.

Griffiths, M. J. & Harrison, S. T. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol*., *21*, 493-507.

Guillard, R. R. L. (1995). Culture methods. In G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson and A. D. Cembella. (eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides No.33*. (pp.45-62). Paris: UNESCO.

Guillard, R. R. L. (2005). Purification methods for microalgae. In R. A. Anderson. (ed.), *Algal Culturing Techniques*. (pp. 117-132). London: Elsevier Academic Press.

Halim, R., Danquah, M.K. & Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, *30*, 709-732.

He, Q., Yang, H. & Hu, C. (2015). Optimizing light regimes on growth and lipid accumulation in *Ankistrodesmus fusiformis* H1 for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *198*, 876-883.

Hoshow, R. W. & Rosowski, J. R. (1973). Method of microscopic algae, pp. 53-68, In Stein, J. R. (ed.), Hand book of phycological methods culture methods and growth measurements. Cambridge: Cambridge University Press.

Jayanta, T., Chandra, K. M. & Chandra, G. B. (2012). Growth, total lipid content and fatty acid profile of a native strain of the freshwater oleaginous microalgae *Ankistrodesmus falcatus* (Ralf) grown under salt stress condition. *International Research Journal of Biological Sciences, 1*(8), 27-35.

Jeong, H., Lee, J. & Cha, M. (2013). Energy efficient growth control of microalgae using photobiological methods. *Renew. Energy*, *54*, 161-165.

Kilham, S. S., Kreeger, D. A., Goulden, C. E. & Lynn, S. G. (1997). Effect of nutrient limitation on biochemical constituents *of Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology*, *38*, 591-596.

Kudahettige, N. P., Pickova, J. & Gentili, F. G. (2018). Stressing Algae for Biofuel Production: Biomass and Biochemical Composition of *Scenedesmus dimorphus* and *Selenastrum minutum* Grown in Municipal Untreated Wastewater. *Frontiers in Energy Research*, *6*(132), 1-10.

Lamaisri, C., Punsuvon, V., Chanprame, S., Arunyanark, A., Srinives, P. & Liangsakul, P. (2015). Relationship between fatty acid composition and biodiesel quality for nine commercial palm oils. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, *37*(4), 389-395.

Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y. & Oh, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, *101*, S75–S77.

Lepage, G. & Roy, C. C. (1986). Direct Transesterification of All Classes of Lipids in a One-Step Reaction. *Journal of Lipid Research*, *27*(1), 114-120.

Marika, T., Anne, N., Kalle, V., Anne, O., Silja, Kostia. Martin, R. (2017). Culturing of *Selenastrum* on diluted composting fluids; conversion of waste to valuable algal biomass in presence of bacteria. *Bioresour. Technol*, *238*, 205-213.

Mori, C. C., Bagatini, I. L., da Silva, T. G., Parrish, C. C. & Vieira, A. A. H. (2018). Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae) *Phytochemistry*, 151, 9-16.

Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D. Pereira, S. A., Druzian, J. I., Souza, C. O., Vich, D. V., Carvalho, G. C. & Nascimento, M. A. (2013). Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenerg. Res.*, *6*, 1-13.

Ouyang, Y., Zhao, Y., Sun, S., Hu, C. & Ping, L. (2015). Effect of light intensity on the capability of different microalgae species for simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction. *International Biodeterioration & Biodegradation 104*, 157-163.

Peerapornpisal, Y. (2013). Freshwater algae in Thailand. Chiang Mai: Department of biology, Faculty of science, Chiang Mai University. (in Thai)

Pérez, L., Cancela,A., Maceiras, R., Salgueiro, J. L. & Sánchez, A. (2015) Selenastrum capricornutum: harvesting and oil extraction, for biodiesel production. *Eur. J. Sustain. Dev.*, *4*, 97-102.

Rocha, G. S., Parrish, C. C., Lombardi, A. T. & Melão, M. da G. G. (2018) Biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Chlorophyceae) acclimated to different phosphorus concentrations. *Journal of Applied Phycology*, *30*, 2167-2177.

Sadvakasova, A. K., Akmukhanova, N. R., Bolatkhan, K., Zayadan, B. K., Usserbayeva, A. A., Bauenova, M. O., Akhmetkaliyeva, A. E. & Allakhverdiev, S. I. (2019). Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production. International journal of hydrogen energy, *44*, 5844-5853.

Salim, M. A. (2013). The growth of *Ankistrodesmus* sp. in response to CO_2 induction. *Journal of Asian Scientific Research*, *3*(1), 75-84.

Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*, 277-286.

Singh, J. and Sai, G. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 2596-2610.

Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., & Bux, F. (2015). Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface *methodology. Biochemical Engineering Journal*, *94*, 22–29.

Song, M., Pei, H., Hua, W. & Maa G. (2013). Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel Production. *Bioresour. Technol.*, *141*, 245–251.

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, B. G. (1971). Purification and properties of unicellular blue green algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, *35*, 171-205.

Xiao, M., Shin, H-J. & Dong, Q. (2013). Advances in cultivation and processing techniques for microalgal biodiesel: a review. *J. Chem. Eng.*, *30*(12), 2119-2126.

Xiaodong, D., Yajun, L. & Xiaowen, F. (2009). A promising feedstock for biodiesel. *African Journal of Microbiology Research*, *3*(13), 1008-1014.

Xin, L., Hong-ying, Ke, H. G. and Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol*, *101*, 5494-5500.

Yee, W. (2016). Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, *32*(4), 1-11.

Zhang, S., Liu, P-h., Yang, X., Hao, Z-d., Zhang, L., Luo, N. & Shi, J. (2014). Isolation and identification by 18S rDNA sequence of high lipid potential microalgal species for fuel production in Hainan Dao. *Biomass and Bioenergy*, *66*, 197-203.