

ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็กที่มีต่อการเจริญและการผลิตไขมัน
ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus dimorphus*

Effect of Nitrogen : Iron Ratio on Growth and Lipid Production of Green Alga,
Scenedesmus dimorphus

สุนีรัตน์ เรืองสมบุญ¹ และจันทรา ดีมาก²
Suneerat Ruangsomboon¹ and Jantra Deemak

บทคัดย่อ

การเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* นอกห้องปฏิบัติการ ในอาหารที่ผันแปรอัตราส่วนของไนโตรเจน (N) ต่อเหล็ก (Fe) วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (5x5) โดยมีปริมาณไนโตรเจน (KNO_3) และเหล็ก ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) อย่างละ 5 ระดับคือ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เท่า ของอาหารสูตร *Chlorella* medium (ชุดควบคุมเทียบเป็น 1.0 เท่า) พบว่าที่ N:Fe 0.5:0.1 เท่า สาหร่ายมีผลผลิตชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 3.40 ± 0.38 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ N:Fe 2.0:1.0 เท่า สาหร่ายมีปริมาณไขมันสูงที่สุดคือ 30.48 ± 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ N:Fe 2.0:2.0 เท่า สาหร่ายมีผลผลิตไขมันสูงที่สุดคือ 0.83 ± 0.05 กรัมต่อลิตร และที่ N:Fe 2.0:0.1 เท่า สาหร่ายมีกำลังการผลิตไขมันมากที่สุดเท่ากับ 22.79 ± 1.19 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ผลการทดลองแสดงว่า N และ Fe มีปฏิสัมพันธ์กันต่อการเจริญจำเพาะ ชีวมวล ปริมาณไขมัน และกำลังการผลิตไขมัน ของสาหร่าย *S. dimorphus* ซึ่งผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *S. dimorphus* มีผลผลิตไขมันสูง สามารถใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกในการนำมาเป็นแหล่งผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้

คำสำคัญ : ไนโตรเจน เหล็ก ไขมัน แฟคทอเรียล ซีเนดีสมัส ไดมอร์ฟัส

Abstract

The ratio of nitrogen (N) to iron (Fe) on growth and lipid accumulation of *Scenedesmus dimorphus* was studied during outdoor cultivation. The experiment was performed as factorial design (5x5) with 5 concentrations of nitrogen (KNO_3) and iron ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) as followed; 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 times. The concentration of N and Fe in *Chlorella* medium was used as the control (1.0 times N and Fe). The maximum biomass of *S. dimorphus* was 3.40 ± 0.38 g/L when it was cultivated in N:Fe 0.5:0.1 times. The maximum lipid content 30.48 ± 0.85 % was obtains in alga under N:Fe 2.0:1.0 times. The maximum lipid yield (0.83 ± 0.05 g/L) and lipid productivity (22.79 ± 1.19 g/L/d) were obtained in alga under N:Fe 2.0:2.0 and 2.0:0.1 times, respectively. The result showed the interaction of nitrogen and iron on specific growth rate, biomass, lipid content and lipid productivity of *S. dimorphus*. The present study indicated *S. dimorphus* is high lipid productivity, which can be used as an potential source for biodiesel production.

Keywords: nitrogen, iron, lipid, factorial, *Scenedesmus dimorphus*

¹ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

²ศูนย์วิจัยร่วมภาครัฐและเอกชน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

คำนำ

เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป ต้องใช้เวลานานในการสร้างขึ้นมาใหม่ทดแทน การใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังส่งผลให้เกิดปัญหาการเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ ซึ่งส่งผลให้ภาวะโลกร้อนมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น จึงเป็นแรงผลักดันให้นักวิจัย พยายามหาแหล่งอื่นมาทดแทนเชื้อเพลิงที่กำลังหมดไป (Liu *et al.*, 2012) โดยเชื้อเพลิงเหลวเป็นเชื้อเพลิงที่มีความต้องการสูงเพราะนิยมใช้ในเครื่องจักรของโรงงาน อุตสาหกรรมและยานพาหนะส่วนใหญ่ โดยเชื้อเพลิงทางเลือกที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบันคือไบโอดีเซล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ในอดีตผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลือง ปาล์ม สนุ่นดำและพืชน้ำมันต่างๆ เป็นต้น โดยต้องผ่านกระบวนการ ทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Trans-esterification) เพื่อเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล (Nigam *et al.*, 2011) แต่ปัญหาพบว่าพืช ต่าง ๆ เหล่านี้จำเป็นต้องใช้ที่ดินที่ค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ในการเพาะปลูก จึงมีการบุกพื้นที่ป่าตามมา นอกจากนี้ พืชบางชนิดยังเป็นวัชพืชในการผลิตอาหารสำหรับมนุษย์ เมื่อเปลี่ยนไปเป็นแหล่งผลิตพลังงานจึงทำให้อาหารมนุษย์ มีราคาสูงมากขึ้น จึงมีการต่อต้านการนำพืชเหล่านี้ไปเป็นวัตถุดิบสำหรับแหล่งพลังงาน

ด้วยสาเหตุนี้ นักวิจัยทั่วโลกจึงพยายามหาแหล่งวัตถุดิบแหล่งใหม่ซึ่งไม่กระทบต่อมนุษย์ โดยพบว่า สาหร่ายขนาดเล็กเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่ที่ไม่อุดมสมบูรณ์ก็สามารถเพาะเลี้ยงได้ สาหร่ายเจริญเติบโตได้เร็ว (Converti *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012) นอกจากนี้ในระหว่างที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายยังดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งสามารถช่วยลดปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศและช่วยแก้ปัญหาภาวะเรือนกระจกได้อีกด้วย (Mandal and Mallick, 2009) และ ยังพบว่าแม้ปริมาณน้ำมันที่ผลิตจากสาหร่ายจะมีเปอร์เซ็นต์ประมาณ 20 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าพืชบก แต่เมื่อ เทียบที่ระยะเวลาและพื้นที่การเพาะเลี้ยงหรือเพาะปลูกที่เท่ากัน สาหร่ายจะให้ชีวมวลที่สูงกว่าจึงให้ผลผลิตไขมันสูง กว่าพืชบก (Chisti, 2007)

สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Scenedesmus dimorphus* เป็นสาหร่ายที่พบในแหล่งน้ำจืดโดยทั่วไป มีการ เจริญเติบโตได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย จึงทนต่อการเปลี่ยนแปลง ของสิ่งแวดล้อมได้สูง โดยพบรายงานว่าสาหร่ายสกุลนี้มีไขมันประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ (Singh and Gu, 2010) โดยปริมาณไขมันในสาหร่ายสามารถผันแปรเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ตามสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Liu *et al.*, 2012) ทั้งทางด้านกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ หรือด้านเคมี เช่น ธาตุอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยไนโตรเจน (N) ซึ่งเป็น ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) มีหน้าที่ช่วยในการสร้างรงควัตถุ กรดนิวคลีอิก ช่วยในการทำงานเอนไซม์ นั้น พบว่าสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการไนโตรเจนที่จะทำให้มีปริมาณไขมันในสาหร่ายสูงสุดในปริมาณที่ แตกต่างกัน (Converti *et al.*, 2009; Hsieh and Wu, 2009) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าสาหร่ายสกุล *Scenedesmus* สามารถสะสมปริมาณไขมันภายในเซลล์ได้มากเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่นสภาวะการขาดไนโตรเจน (Chen *et al.*, 2012) โดยการขาดไนโตรเจนในอาหารจะมีผลต่อปริมาณไขมันเนื่องจากมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งทำให้เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์น้ำมันทำงานได้ดีขึ้น (Shen *et al.*, 2009)

ส่วนเหล็ก (Fe) ซึ่งเป็นธาตุอาหารรอง (Micronutrients) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุ การขนส่ง อิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการหายใจ ถ้าขาดเหล็กจะทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงและปริมาณ อาหารสะสมลดลงด้วย (Lin *et al.*, 2012) โดยสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการเหล็กที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต หรือสร้างไขมันในปริมาณที่แตกต่างกัน (Liu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010)

สาหร่ายมีความต้องการทั้งไนโตรเจนและเหล็กในการเจริญเติบโต โดยพบว่าได้มีการศึกษาระดับที่เหมาะสม ของไนโตรเจนหรือของเหล็กต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิด *S. dimorphus* นี้ไว้แล้ว (จิรรัตน์ และ สุรินทร์, 2556; วัฒน และ สุรินทร์, 2556) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ของธาตุอาหารสองชนิดนี้ต่อสาหร่าย ดังนั้นการ ศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาปฏิสัมพันธ์ของไนโตรเจนและเหล็กที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่าย

S. dimorphus เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้สำหรับเป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซลต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงห้วเชื้อสาหร่าย

เพาะเลี้ยงห้วเชื้อสาหร่าย *S. dimorphus* strain KMITL ที่คัดแยกโคลนนี้เดี่ยวมาจากบ่อเลี้ยงปลา ด้วยอาหารสูตร *Chlorella* medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 0.5 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อใช้สาหร่ายเป็นห้วเชื้อในการศึกษาขั้นต่อไป

2. ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร *Chlorella* medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้อาหารสูตรปกตินี้เป็นชุดควบคุม เทียบปริมาณไนโตรเจนและเหล็กในสูตรปกติเป็น 1.0 เท่า และทำการผันแปรปริมาณไนโตรเจนและเหล็กในอาหารนี้ อย่างละ 5 ระดับ ใช้แผนการทดลองแบบ Factorial (5×5) โดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจน (KNO_3) 5 ระดับคือ 0.1, 0.5, 1.0 (ชุดควบคุม), 1.5 และ 2.0 เท่า หรือเทียบเท่ากับ KNO_3 ที่ 0.125, 0.625, 1.250 (ชุดควบคุม), 1.875, 2.50 กรัมต่อลิตร และผันแปรเหล็ก ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 5 ระดับคือ 0.1, 0.5, 1.0 (ชุดควบคุม), 1.5 และ 2.0 เท่า หรือเทียบเท่ากับ FeSO_4 ที่ 0.005, 0.025, 0.050 (ชุดควบคุม), 0.075, 0.10 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ได้รับแสงและอุณหภูมิตามธรรมชาติ โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงมีความเข้มแสงในช่วงเวลากลางวันเฉลี่ย 20.45 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิรอบวันเฉลี่ย 29-33 องศาเซลเซียส (วัดในรอบวันทุกสองชั่วโมง และหาค่าเฉลี่ยต่อวัน) เพาะเลี้ยงจนเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (ประมาณ 30 วัน, Fig. 1C N:Fe 1.0:1.0 เท่า) วิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (ชีวมวล) ทุก 2 วัน โดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายที่สิ้นสุดการทดลอง ตามวิธีของ Bligh and Dyer (1959) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติและปฏิสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดด้วยวิธี ANOVA: two factor with replication และ ANOVA: single factor โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel 2013 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

สาหร่าย *S. dimorphus* ที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับอัตราส่วนของ N:Fe แตกต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงในความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ต่างกัน 5 ระดับ โดยลดลงจากสูตรปกติ 0.1 และ 0.5 เท่า และเพิ่มจากสูตรปกติ 1.5 และ 2.0 เท่า พบว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.09 ± 0.00 ต่อวัน ในสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 1.0:0.1 เท่า โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของ N:Fe 0.1:0.1, 0.1:0.5, 0.1:1.5, 1.5:0.1, 1.5:0.5, 1.5:1.5, 1.5:2.0, 2.0:0.5, 2.0:1.0, 2.0:2.0 เท่า ($p < 0.05$) (Table 1)

ในทุกชุดการทดลอง สาหร่ายมีการเจริญเติบโต (ชีวมวล) เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น และมีการผันแปรของชีวมวลค่อนข้างสูง ในชุดที่ได้รับไนโตรเจน 0.1 เท่า และผันแปรเหล็กในระดับต่าง ๆ ทุกระดับ (Figure 1A) โดยที่สิ้นสุดการทดลองพบว่าสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 0.5:0.1 เท่า มีชีวมวลสูงที่สุดเท่ากับ 3.40 ± 0.38 กรัมต่อลิตร (Figure. 1B, Table 1) แต่พบว่าน้ำหนักสูงสุดของชุดการทดลองนี้จะพบในวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนัก 3.82 ± 0.32 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงว่าสาหร่ายในชุดการทดลองนี้เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ ที่ 28 วันของการเพาะเลี้ยง และที่ 30 วัน คือสาหร่ายเข้าสู่ระยะการตาย น้ำหนักของสาหร่ายจึงลดลง โดยการควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้คงที่ที่ 0.5 เท่า และผันแปรเหล็ก พบว่าเมื่อเหล็กมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น สาหร่ายมีแนวโน้มที่จะมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าปริมาณเหล็กนั้นอาจมากเกินไป ไม่สมดุลกับปริมาณไนโตรเจน

Table 1 Biomass and lipid production of *S. dimorphus* cultured in *Chlorella* medium under different N:Fe ratios.

N (Times)	Fe (Times)	μ (/day)	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Lipid yield (g/L)	Lipid productivity (mg/L/d)
0.1	0.1	0.04±0.01 ^{ab}	1.48±0.41 ^a	18.00±0.08 ^{cde}	0.21±0.01 ^a	8.00±1.26 ^{abcd}
	0.5	0.04±0.01 ^{ab}	1.24±0.12 ^a	16.38±0.04 ^{bc}	0.20±0.00 ^a	6.19±0.76 ^{ab}
	1.0	0.05±0.00 ^{abc}	1.91±0.08 ^a	12.75±0.05 ^a	0.25±0.00 ^{ab}	6.45±0.19 ^{abc}
	1.5	0.03±0.00 ^a	2.43±0.42 ^{ab}	12.27±0.11 ^a	0.27±0.00 ^{ab}	3.90±0.14 ^a
	2.0	0.05±0.00 ^{abc}	1.73±0.11 ^a	12.56±0.01 ^a	0.23±0.00 ^a	6.40±0.15 ^{abc}
0.5	0.1	0.07±0.00 ^{abc}	3.40±0.38 ^b	14.90±0.13 ^b	0.50±0.00 ^{abcd}	10.32±0.19 ^{abcde}
	0.5	0.06±0.00 ^{abc}	2.30±0.23 ^{ab}	17.62±0.14 ^{cde}	0.38±0.01 ^{ab}	10.23±0.52 ^{abcde}
	1.0	0.06±0.00 ^{abc}	2.14±0.08 ^{ab}	17.03±0.40 ^{cd}	0.36±0.00 ^{ab}	10.39±0.21 ^{abcde}
	1.5	0.07±0.00 ^{abc}	2.00±0.36 ^{ab}	17.29±0.66 ^{cde}	0.33±0.02 ^{ab}	12.22±0.36 ^{abcdef}
	2.0	0.05±0.00 ^{abc}	1.91±0.25 ^a	17.46±0.60 ^{cde}	0.34±0.01 ^{ab}	9.57±0.59 ^{abcde}
1.0	0.1	0.09±0.00 ^c	2.26±0.38 ^{ab}	21.89±0.15 ^{hi}	0.48±0.05 ^{ab}	20.59±1.10 ^{fg}
	0.5	0.07±0.01 ^{abc}	2.49±0.39 ^{ab}	22.85±0.57 ⁱ	0.60±0.04 ^{ab}	17.00±1.28 ^{efg}
	1.0	0.07±0.00 ^{abc}	2.73±0.47 ^{ab}	21.92±0.54 ^{hi}	0.66±0.04 ^{ab}	15.88±1.11 ^{defg}
	1.5	0.05±0.00 ^{abc}	2.48±0.43 ^{ab}	21.88±0.15 ^{hi}	0.60±0.03 ^{ab}	12.00±0.71 ^{abcdef}
	2.0	0.06±0.00 ^{abc}	2.98±0.19 ^{ab}	21.04±0.15 ^{ghi}	0.66±0.00 ^{ab}	12.23±0.43 ^{abcdef}
1.5	0.1	0.04±0.01 ^{ab}	2.05±0.30 ^{ab}	19.14±0.29 ^{efg}	0.40±0.02 ^{ab}	6.91±1.25 ^{abc}
	0.5	0.05±0.01 ^{ab}	2.39±0.23 ^{ab}	20.30±0.09 ^{fgh}	0.49±0.02 ^{abcd}	9.27±1.16 ^{abcde}
	1.0	0.07±0.00 ^{abc}	2.16±0.23 ^{ab}	18.62±0.04 ^{def}	0.40±0.01 ^{ab}	12.20±0.58 ^{abcdef}
	1.5	0.04±0.00 ^{ab}	1.91±0.13 ^a	17.98±0.06 ^{cde}	0.33±0.00 ^{ab}	7.29±0.61 ^{abc}
	2.0	0.04±0.00 ^{ab}	2.57±0.22 ^{ab}	18.59±0.15 ^{def}	0.46±0.01 ^{abc}	6.92±0.60 ^{abcd}
2.0	0.1	0.08±0.00 ^{bc}	1.80±0.31 ^a	29.21±0.54 ^{jk}	0.56±0.04 ^{bcde}	22.79±1.19 ^g
	0.5	0.05±0.00 ^{ab}	2.76±0.70 ^{ab}	28.19±0.49 ^j	0.78±0.12 ^{de}	12.77±1.36 ^{abcdef}
	1.0	0.05±0.00 ^{ab}	2.61±0.08 ^{ab}	30.48±0.85 ^k	0.78±0.02 ^{de}	14.88±0.92 ^{bcdefg}
	1.5	0.05±0.00 ^{abc}	3.37±0.42 ^b	27.74±0.38 ^j	0.75±0.03 ^{cde}	15.16±1.61 ^{cdefg}
	2.0	0.04±0.00 ^{ab}	3.05±0.29 ^b	27.43±0.40 ^j	0.83±0.05 ^e	12.22±0.49 ^{abcdef}

Values are mean ± S.D. within the same column, significant differences are indicated by different superscripts ($p < 0.05$).

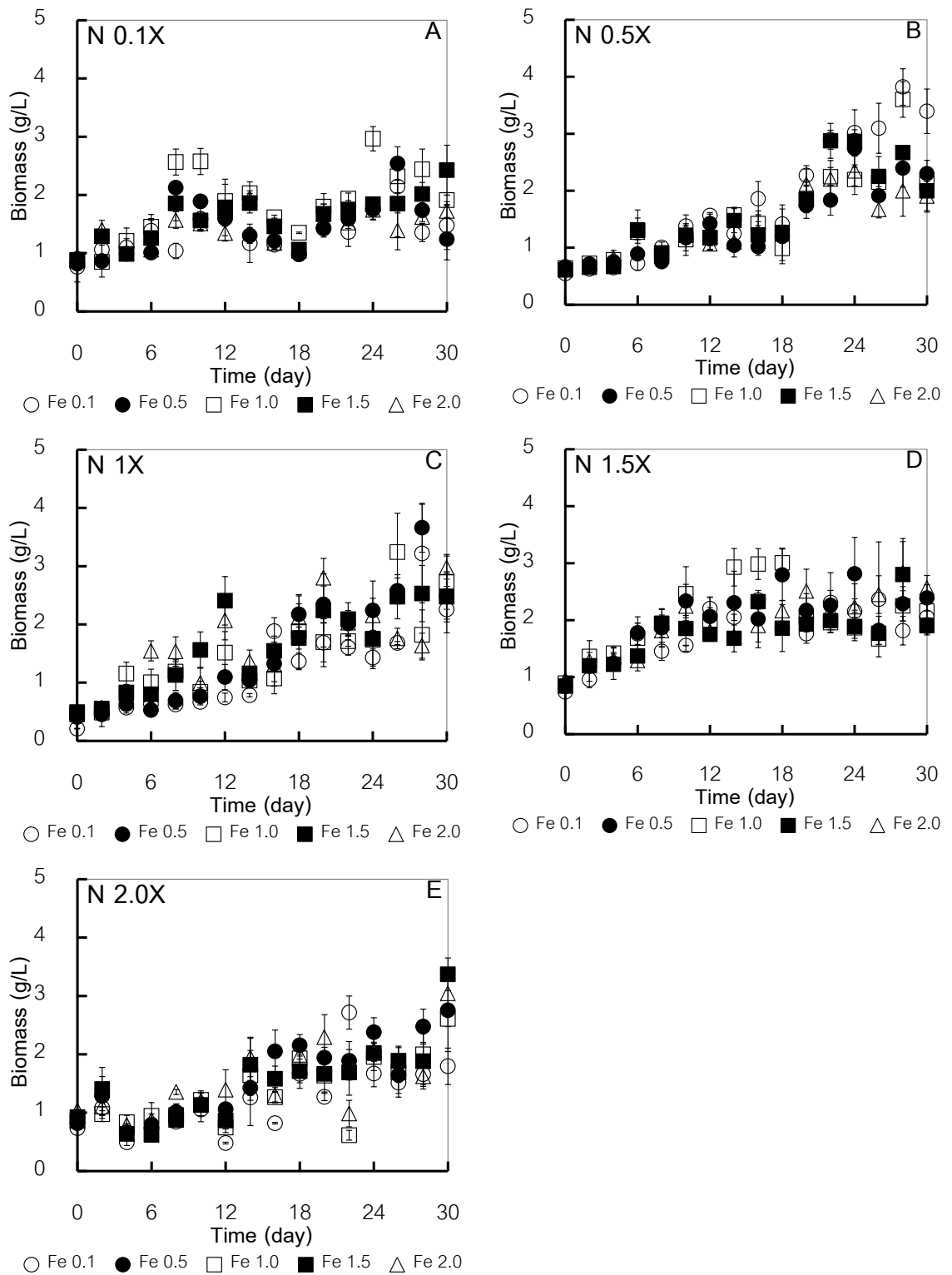


Figure 1 Biomass of *S. dimorphus* cultured in *Chlorella* medium under various N:Fe ratio.

จากการทดลองนี้พบว่า การผันแปรอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อเหล็กส่งผลให้สาหร่ายชนิดนี้มีชีวมวลสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ภายใต้ความเข้มข้นแสง ระยะเวลารับแสง อุณหภูมิ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมือนกันกับการทดลองนี้ โดยผันแปรไนโตรเจนหรือเหล็กในสูตรอาหารเพียงอย่างเดียว โดยหากผันแปรไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวสาหร่ายจะมีชีวมวลสูงที่สุดเพียง 1.6 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ที่ระดับไนโตรเจน 2.0 เท่า (จิรรัตน์ และ สุนีรัตน์, 2556) และหากมีการผันแปรเหล็กอย่างเดียว พบว่ามีชีวมวลสูงที่สุด 1.4 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ที่ระดับเหล็ก 2.0 เท่า (วิวัฒนา และ สุนีรัตน์, 2556)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราส่วนของ N:Fe ที่ต่างกัน มีผลทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ต่างกัน โดยที่ระดับไนโตรเจน 0.5 เท่า และเหล็ก 0.1 เท่า ของสูตรอาหารปกติ ส่งผลให้สาหร่ายมีชีวมวลสูงสุด ซึ่งแสดงว่าระดับนี้คือระดับที่เหมาะสมต่อสาหร่ายชนิดนี้ โดยปกติแล้วเหล็กเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญมากต่อสาหร่ายขนาดเล็ก ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบพื้นฐานของเอนไซม์ต่างๆ เข้าร่วมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงในระบบแสง 2 การขาดเหล็กทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายทอดอิเล็กตรอน การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ ดังนั้นอัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจึงมีค่าต่ำ สาหร่ายจึงมีการเจริญเติบโตลดลง (Terry and Abadia, 1986) เหล็กมีอิทธิพลต่อการใช้ในไนโตรเจนของสาหร่าย และเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ของเซลล์สาหร่าย ภาวะการขาดหรือมีปริมาณธาตุเหล็กมากเกินไปของในเซลล์สาหร่ายมีผลทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายลดลง (Lin *et al.*, 2012) แม้พบว่าที่ระดับเหล็ก 0.1 เท่า คือระดับที่ต่ำสุด แต่สาหร่ายกลับมีการเจริญเติบโตดีที่สุด แสดงว่าไนโตรเจนมีอิทธิพลร่วมกับเหล็กต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายอย่างชัดเจน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายต่ำที่สุด เมื่อสาหร่ายได้รับไนโตรเจนต่ำสุดคือ 0.1 เท่า (Figure 1A) ทั้งนี้เนื่องจากไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบหลักของ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เอนไซม์และกรดอะมิโน ซึ่งเป็นส่วนประกอบในคลอโรพลาสต์ที่ทำหน้าที่สร้างคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย (Neill *et al.*, 2003) การขาดไนโตรเจนจะมีผลทำให้การสร้างกรดอะมิโนมีปริมาณลดลง โดยกรดอะมิโนบางชนิดมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยตรงต่อสาหร่าย เช่นกรดอะมิโนไกลซีนซึ่งทำหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยรวมตัวกับ Succinyl-Coenzyme A เกิดการสังเคราะห์ delta-Aminolevulinic acid จนได้สารคลอโรฟิลล์ เอ การขาดไนโตรเจนอาจทำให้ปริมาณไกลซีนลดลง โดยอาจจะส่งผลต่อความสามารถในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ ของเซลล์สาหร่าย ทำให้เซลล์สาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลง การสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง สาหร่ายจึงมีการเจริญเติบโตลดลง (Lewin, 1962) การขาดไนโตรเจนจึงทำให้ชีวมวล มีปริมาณลดลง

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเพิ่มหรือลดปริมาณไนโตรเจนหรือเหล็ก ในการศึกษาครั้งนี้กับอดีต ไม่สามารถทำการเปรียบเทียบได้โดยตรง เนื่องจากการศึกษาในเรื่องธาตุอาหารกับการเจริญเติบโตหรือการผลิตไขมันของสาหร่ายในอดีตส่วนใหญ่จะทำการผันแปรความเข้มข้นธาตุอาหารเพียงประเภทเดียว เช่น การศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้น มีรายงานว่าขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย บางชนิดเจริญเติบโตได้ดีแม้ในไนโตรเจนมีความเข้มข้นต่ำ แต่บางชนิดจะโตได้ดีเมื่อไนโตรเจนมีความเข้มข้นสูง เช่นการศึกษาของ Converti *et al.* (2009) ที่ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยให้ NaNO_3 ที่ 1.500 - 0.375 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายนี้มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทดลองกับสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* โดยผันแปร NaNO_3 ที่ 0.075-0.300 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ไนโตรเจนเข้มข้นสูงสุด ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้นของเหล็กต่างกัน 4 ระดับที่ 3.07-24.6 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ระดับเหล็กต่ำสุด (Wang *et al.*, 2010)

2. ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อการผลิตไขมันของสาหร่าย

สาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 2.0:1.0 เท่า ให้ปริมาณไขมัน (Lipid content) สูงสุด 30.48 ± 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลองยกเว้นที่ N:Fe 2.0:0.1 เท่า เท่านั้น ซึ่งพบว่าในสาหร่ายชนิดนี้หากทำการผันแปรไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (โดยปัจจัยในการเพาะเลี้ยงอื่นๆ เหมือนกับการทดลองนี้ทุกประการ) จะทำให้ได้ไขมันสูงสุดเท่ากับ 25.72 ± 0.66 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ที่ระดับไนโตรเจน 2.0 เท่า (จิรรัตน์ และ สุณีรัตน์, 2556) หรือหากผันแปรเหล็กอย่างเดียวจะได้ไขมันสูงสุดเท่ากับ 26.13 ± 1.19 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ที่ระดับเหล็ก 2.0 เท่า (วัฒนา และ สุณีรัตน์, 2556) แสดงให้เห็นว่าหากอัตราส่วน N:Fe เหมาะสม ย่อมให้ไขมันสูงกว่าการผันแปรธาตุอาหาร N หรือ Fe เพียงอย่างเดียว

ส่วนผลผลิตไขมัน (lipid yield) ในการศึกษาครั้งนี้พบมากที่สุดเท่ากับ 0.83 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ในสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 2.0:2.0 เท่า โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดที่ได้รับ N 2.0 เท่า ส่วนกำลังการผลิตไขมัน (lipid productivity) พบมากที่สุด 22.79 ± 1.19 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ในสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 2.0:0.1 เท่า

จากผลการทดลองพบว่าควรเลือกเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ระดับ N:Fe 2.0:2.0 เท่า เพราะทำให้ได้ผลผลิตไขมันต่อการเพาะเลี้ยงต่อหนึ่งลิตรมากที่สุด หรืออาจใช้ N ที่ 2.0 เท่า ส่วน Fe ใช้ได้ทุกระดับตั้งแต่ 0.1-2.0 เท่า เนื่องจากผลผลิตไขมันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และจากการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ N ต่อ Fe พบว่าธาตุอาหารทั้งสองชนิดมีอิทธิพลร่วมกันต่อการเจริญเติบโตจำเพาะ ($p = 0.048$), ชีวมวล ($p = 0.035$), ปริมาณไขมัน ($p = 0.000$) และกำลังการผลิตไขมัน ($p = 0.000$) ของสาหร่าย *S. dimorphus*

ซึ่งการศึกษานี้ในไนโตรเจนสูงให้ไขมันที่สูง ซึ่งให้ผลการศึกษาต่างจากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ผันแปรไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว โดยได้มีรายงานการศึกษาไว้ว่าการลดปริมาณไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะทำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณไขมัน เช่นการศึกษาของ Hsieh and Wu (2009) ทำการเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็ก *Chlorella* sp. โดยผันแปรไนโตรเจน (ยูเรีย) ที่ 0.025 – 0.200 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายที่ได้รับไนโตรเจนต่ำสุดจะให้ปริมาณไขมันสูงสุดคือ 0.661 กรัมต่อกรัมสาหร่ายแห้ง เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวที่ช้าลง ซึ่งเกิดจากสารอาหารที่ไม่เพียงพอทำให้เซลล์เลือกที่จะสะสมอาหารในรูปของไขมัน เพราะเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์ไขมันสามารถทนต่อการขาดไนโตรเจนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้การขาดไนโตรเจนยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้ดีขึ้น เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกลไกการสังเคราะห์ไขมันคือ Diacylglycerol transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน Diacylglycerol เป็น Triacylglyceride (TAG) ดังนั้นโมเลกุลคาร์บอนที่ได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์หรือสารอินทรีย์จึงถูกชักนำให้เปลี่ยนไปเป็นไขมันมากกว่าคาร์โบไฮเดรต ทำให้สามารถพบปริมาณไขมันสูงในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Xin et al., 2010b) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าปริมาณน้ำมันมีค่าสูงสุด พบในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารมีไนโตรเจนสูงสุด 2.0 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของเหล็กเข้ามาส่งผลร่วมกับไนโตรเจนในการผลิตไขมันของสาหร่าย

ในการศึกษาครั้งนี้ปริมาณเหล็กปานกลางหรือที่ 1.0 เท่า ให้ผลผลิตไขมันสูง ส่วนรายงานการศึกษาของ Liu et al. (2008) ซึ่งทำการทดลองเลี้ยง *Chlorella vulgaris* โดยได้รับความเข้มข้นของเหล็กแตกต่างกัน $0 - 1.2 \times 10^{-5}$ โมลต่อลิตร พบว่าสาหร่ายนี้ที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับเหล็ก 1.2×10^{-5} โมลต่อลิตร หรือได้รับเหล็กสูงที่สุด มีไขมันสูงกว่าระดับอื่นถึง 56.6 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะทั่วไปแล้วความเข้มข้นเหล็กที่สูงมักมีผลให้เกิดการกระตุ้นการสะสมน้ำมันของสาหร่าย แต่ในกรณีที่ระดับความเข้มข้นเหล็กที่มากเกินไป มักจะส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน ในสภาวะที่สาหร่ายขาดเหล็ก จะส่งผลทำให้สาหร่ายไม่สามารถดึงไนโตรเจนจากอาหารไปใช้ได้ทำให้เซลล์เกิดความเครียด เซลล์สาหร่ายจะปรับตัวโดยเปลี่ยนรูปอาหารที่เก็บจากคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำมัน (Shen et al., 2009) การศึกษาของ Lin et al. (2012) พบว่าสาหร่าย *Scenedesmus rubescens* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นเหล็ก

(Fe²⁺) ต่ำ (0.05-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีปริมาณน้ำมันสูงมากกว่าเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นเหล็กสูง (5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเหล็กที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายด้วยเช่นกัน

ปริมาณน้ำมันที่พบในสาหร่ายขนาดเล็กเป็นหนึ่งในดัชนีชี้วัดที่สำคัญมาก เนื่องจากเป็นดัชนีที่สามารถใช้ในการประเมินศักยภาพของสาหร่ายขนาดเล็กในฐานะแหล่งผลิตไบโอดีเซลได้ (Shen *et al.*, 2009) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันจากการศึกษานี้กับการทดลองอื่นๆ ซึ่งปรากฏใน Table 2 พบว่า *S. dimorphus* จากการศึกษานี้ นับว่าเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ในอนาคต และรายงานผลการทดลองในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าไนโตรเจนมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับเหล็กต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของ *S. dimorphus* ดังนั้นจึงควรมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในอัตราส่วนของ N:Fe ที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มผลผลิตไขมันของสาหร่ายได้

Table 2 Comparison of lipid content of *Scenedemus dimorphus* with other *Scenedemus* strains reported in the literature.

Strain	Lipid content (%)	Reference
<i>S. dimorphus</i> KMITL	30.48±0.85	This study
<i>S. dimorphus</i> KMITL	25.72±0.66	Jirarat and Suneerat (2013)
<i>S. dimorphus</i> KMITL	26.13 ± 1.19	Wattana and Suneerat (2013)
<i>S. dimorphus</i> KMITL	25	Ruangsomboon <i>et al.</i> (2012)
<i>Scenedemus</i> sp. LX1	53	Xin <i>et al.</i> (2010b)
<i>Scenedemus</i> sp. LX1	31-33	Xin <i>et al.</i> (2010a)
<i>Scenedemus</i> sp. LX1	35	Xin <i>et al.</i> (2011)
<i>S. dimorphus</i> EPS-5	8	Ho <i>et al.</i> (2012)
<i>S. dimorphus</i> CNW-N	22	Ho <i>et al.</i> (2012)
<i>S. dimorphus</i> SJTE-3	15-24	Tang <i>et al.</i> (2011)
<i>S. rubescens</i>	21-27	Lin and Lin (2011)

สรุป

ไนโตรเจนและเหล็กมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่อ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ชีวมวล, ปริมาณไขมัน และกำลังการผลิตไขมัน ของสาหร่าย *S. dimorphus* โดยระดับ N:Fe ที่ทำให้สาหร่ายมีชีวมวลและผลผลิตไขมันสูงสุดคือ 0.5:0.1 และ 2.0:2.0 เท่า ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (A118-59-064)

เอกสารอ้างอิง

- จิรรัตน์ พรหมนารถ และสุนิรัตน์ เรืองสมบุญ. 2556. ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus*. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 7: 92-101.
- วัฒนา นุชชอและ และสุนิรัตน์ เรืองสมบุญ. 2556. ผลของความเข้มข้นของเหล็กที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus*. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 7: 14-24.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Phys. 37: 911-917.
- Chen, Z., Y. Gong, X. Fang and H. Hu. 2012. *Scenedesmus* sp. NJ-1 isolated from Antarctica: a suitable renewable lipid source for biodiesel production. World J. Microbiol. Biotechnol. 28:3219-3225.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25: 294-306.
- Converti, A., A.A. Casazza, E.Y. Ortiz, P. Perego and M.D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem. Eng. Process. 48: 1146-1151.
- Ho, SH., CY. Chene and JS. Chang. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresour. Technol. 113: 244-252.
- Hsieh, C.H. and W.T. Wu. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. Bioresour. Technol. 100: 3921-3926.
- Lewin, R.A. 1962. Physiology and Biochemistry of Algae. Academic press inc. (London) LTD. New York. 929.
- Lin, Q. and J. Lin. 2011. Biomass and oil productivity of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga, a promising candidate for biodiesel production. Bioresour. Technol. 102: 1615-1621.
- Lin, Q., N. Gu and J. Lin. 2012. Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. Bioresour. Technol. 112: 242-247.
- Liu, J., C. Yuan, G. Hu and F. Li. 2012. Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. Appl. Biochem. Biotechnol. 166: 2127-2137.
- Liu, Z.Y., G.C. Wang and B.C. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresour. Technol. 99: 4717-4722.
- Mandal, S. and N. Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84: 281-291.
- Neill, S.J., R. Desikan and J.T. Hancock. 2003. Nitric oxide signalling in plants. New Phytologist. 159:11-35.
- Nigam, S., M.P. Rai and R. Sharma. 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. American J. Biochem. Biotechnol. 7: 124-129.
- Ruangsomboon, S., M. Ganmanee and S. Choochote. 2013. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. J. Appl. Phycol. 25: 867-874.
- Shen, Y., Z. Pei, W. Yuan and E. Mao. 2009. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. Int. J. Agric. & Biol. Eng. 2:51-57.
- Singh, J. and S. Gu. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renew. Sustain. Energ. Reviews. 14:2596-2610.
- Tang, D., W. Han, P. Li, X. Miao and J. Zhong. 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. Bioresour. Technol. 102: 3071-3076.
- Terry, N. and J. Abadia. 1986. Function of iron in chloroplasts. J. Plant Nutrition. 9: 609-646.
- Wang, C., H.N. Kong, X.Z. Wang, H.D. Wu, Y. Lin and S.B. He. 2010. Effects of Iron on Growth and Intracellular Chemical Contents of *Microcystis aeruginosa*. Biomed. Environ. Sci. 23: 48-52.

- Xin, L., H. Hong-ying and Z. Yu-ping. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol.* 102: 3098-3102.
- Xin, L., H. Hong-Ying and Y. Jia. 2010a. Lipid accumulation and nutrients removal properties in secondary effluent of a newly-isolated freshwater microalga *Scenedesmus* sp.LX1. *New Biotechnol.* 27: 59-63.
- Xin, L., H. Hong-ying, G. Ke and S. Ying-Xue. 2010b. 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.