

## ปฏิสัมพันธ์ของฟอสฟอรัสกับเหล็ก ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Desmodesmus quadricauda*

### Interaction of Phosphorus and Iron on Growth and Lipid Production of Green Microalga, *Desmodesmus quadricauda*

สุนีรัตน์ เรืองสมบัติ<sup>1,2\*</sup> และ จันทร่า ดีมาก<sup>2</sup>  
Suneerat Ruangsomborn<sup>1,2\*</sup> and Jantra Deemak<sup>2</sup>

#### บทคัดย่อ

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของฟอสฟอรัส (P) ร่วมกับเหล็ก (Fe) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่าย *Desmodesmus quadricauda* โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (5x5) มีความเข้มข้น 5 ระดับ โดยมี P เท่ากับ 28, 142, 285, 427 และ 569 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และ Fe เท่ากับ 1, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมเหล็กต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสและเหล็กในสูตร *Chlorella* medium เป็นชุดควบคุม (285 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และ 10 มิลลิกรัมเหล็กต่อลิตร) ผลการศึกษาพบว่าฟอสฟอรัสและเหล็กมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $p = 0.01$ ) ชีวมวล ( $p = 4.00 \times 10^{-13}$ ) ปริมาณไขมัน ( $p = 8.13 \times 10^{-5}$ ) และผลผลิตไขมัน ( $p = 0.009$ ) โดยสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $0.23 \pm 0.06$  ต่อวัน) และผลผลิตชีวมวล ( $1.91 \pm 0.09$  กรัมต่อลิตร) สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี P:Fe 142:10 และ 427:20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี P:Fe 569:1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณไขมัน ผลผลิตไขมัน และกำลังการผลิตไขมัน สูงที่สุดคือ  $24.98 \pm 5.03$  เปอร์เซ็นต์  $0.41 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร และ  $45.06 \pm 5.23$  มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า P:Fe 569:1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. quadricauda* มากที่สุด เนื่องจากให้ผลผลิตไขมันที่สูงที่สุด ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถเป็นวัตถุดิบทางเลือกที่มีศักยภาพในการเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลได้

**คำสำคัญ:** ฟอสฟอรัส เหล็ก ผลผลิตไขมัน แฟคทอเรียล สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

#### Abstract

The interaction of phosphorus (P) and iron (Fe) on growth and lipid production of microalga, *Desmodesmus quadricauda* was studied. The experiments were performed as factorial design (5x5) with 5 concentrations of phosphorus 28, 142, 285, 427 and 569 mg P/l and iron 15, 10, 5, 1 and 0.2 mg Fe/l. The concentration of P and Fe in *Chlorella* medium was used as the control (285 mg P/l and 10 mg Fe/l). The result showed the interaction of phosphorus and iron on specific growth rate ( $p = 0.01$ ), biomass ( $p = 4.00 \times 10^{-13}$ ), lipid content ( $p = 8.13 \times 10^{-5}$ ) and lipid yield ( $p = 0.009$ ) of alga. The maximum specific growth rate ( $0.23 \pm 0.06$  /d) and biomass ( $1.91 \pm 0.09$  g/l) of alga were obtained with cultivated in P:Fe 142:10 and 427:2 mg/l, respectively. The alga cultivated in P:Fe 569:1 mg/l showed the maximum lipid content, lipid yield and lipid productivity of  $24.98 \pm 5.03\%$ ,  $0.41 \pm 0.06$  g/l and  $45.06 \pm 5.23$  mg/l/d, respectively. The present study showed that P:Fe 569:1 mg/l was the optimum ratio for cultivation of *D. quadricauda* because this alga gave the highest lipid yield. The result indicated that this alga could be used as an alternatively potential source for biodiesel production.

**Keywords :** phosphorus, iron, lipid yield, factorial, green microalgae

<sup>1</sup>หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

<sup>2</sup>ศูนย์วิจัยร่วมภาครัฐและเอกชน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

## คำนำ

ปัญหาด้านความผันผวนของราคาน้ำมันปิโตรเลียมและปัญหาการมีอยู่อย่างจำกัดของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Liu et al., 2012) ทำให้นักวิจัยทั่วโลกได้พยายามศึกษาหาแหล่งพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ ซึ่งมีทั้งจากแสงอาทิตย์ ลม น้ำ หรือพลังงานไฮโดรเจน แต่ด้วยมีปัญหาเรื่องภาวะโลกร้อนควบคู่ตามมา อีกโจทย์หนึ่งในการหาแหล่งพลังงานทดแทนคือต้องเป็นพลังงานที่สามารถลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกสู่ชั้นบรรยากาศได้ด้วย ซึ่งปัจจุบันแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนใหญ่มาจากการเผาผลาญเชื้อเพลิงซากฟอสซิลเป็นหลัก จึงต้องพยายามหาทางทดแทนเชื้อเพลิงในส่วนนี้ ซึ่งเชื้อเพลิงฟอสซิลในรูปเชื้อเพลิงเหลวเป็นเชื้อเพลิงที่มีความต้องการสูงเพราะนิยมใช้ในเครื่องจักรของโรงงานอุตสาหกรรมและยานพาหนะส่วนใหญ่ ดังนั้นการที่จะหาแหล่งเชื้อเพลิงมาทดแทนจึงสมควรที่จะทดแทนในรูปเชื้อเพลิงเหลวด้วยเช่นกัน ซึ่งเชื้อเพลิงทางเลือกที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบันคือไบโอดีเซล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ในอดีตผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลือง ปาล์ม สนุ่นดำและพืชน้ำมันต่างๆ เป็นต้น โดยต้องผ่านกระบวนการทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Trans-esterification) เพื่อเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล (Nigam et al., 2011) แต่ปัญหาพบว่าพืชต่าง ๆ เหล่านั้นจำเป็นต้องใช้ที่ดินที่ค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ในการเพาะปลูก จึงมีการบุกรุกพื้นที่ป่าตามมา นอกจากนี้พืชบางชนิดยังเป็นวัชพืชในการผลิตอาหารสำหรับมนุษย์ เมื่อเปลี่ยนไปเป็นแหล่งผลิตพลังงาน จึงทำให้อาหารมนุษย์มีราคาสูงมากตามมา จึงมีการต่อต้านการนำพืชเหล่านี้ไปเป็นวัตถุดิบสำหรับแหล่งพลังงาน

โดยสาหร่ายเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกใหม่ที่นักวิจัยได้คัดเลือกเพื่อมาแทนแหล่งพืชบกในอดีต เนื่องจากการใช้สาหร่ายเป็นแหล่งพลังงานจะไม่กระทบต่อแหล่งอาหารของมนุษย์ นอกจากนี้สาหร่ายยังเพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่ที่ไม่อุดมสมบูรณ์ก็สามารถเพาะเลี้ยงได้ เจริญเติบโตได้เร็ว (Converti et al., 2009; Liu et al., 2012) และในระหว่างที่สาหร่ายเจริญเติบโตยังดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ เข้าไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศและช่วยแก้ปัญหาภาวะเรือนกระจกได้อีกด้วย (Mandal and mallick, 2009) ปริมาณน้ำมันที่ผลิตจากสาหร่ายจะมีเปอร์เซ็นต์ประมาณ 20 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าพืชบก แต่เมื่อเทียบที่ระยะเวลาและพื้นที่การเพาะเลี้ยงหรือเพาะปลูกที่เท่ากัน สาหร่ายจะให้ชีวมวลที่สูงกว่าจึงให้ผลผลิตไขมันสูงกว่าพืชบก (Chisti, 2007)

โดยในน้ำจืดนั้น สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Desmodesmus quadricauda* ซึ่งมีชื่อพ้องคือ *Scenedesmus quadricauda* เป็นสาหร่ายที่พบได้โดยทั่วไป เพาะเลี้ยงได้ง่าย โตเร็ว เจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่กว้าง ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้สูง โดยพบว่าสาหร่ายสกุลนี้มีไขมันประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ (Singh and Gu, 2010) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพิจารณานำสาหร่ายชนิดนี้มาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไขมันและนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซล โดยปริมาณไขมันในสาหร่ายสามารถผันแปรเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ตามสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Liu et al., 2012) ทั้งทางด้านกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ หรือด้านเคมี เช่น ธาตุอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นผู้เพาะเลี้ยงจึงสามารถผันแปรปัจจัยในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สาหร่ายสามารถผลิตไขมันได้สูงขึ้นได้ ซึ่งการผันแปรด้านความเข้มข้นของธาตุอาหารจะเป็นการผันแปรที่สามารถทำได้ง่ายที่สุด (Zhila et al., 2005; 2011)

โดยธาตุอาหารฟอสฟอรัส (Phosphorus, P) เป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrient) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ sugar phosphate ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงและการหายใจ เป็นส่วนประกอบของ DNA RNA และให้สารพลังงานสูง ฯลฯ รูปของฟอสฟอรัสที่สาหร่ายสามารถดูดซึมได้คือ โมโน-ไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน และไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ, โปรตีน, RNA, DNA ของสาหร่ายลดลง ส่วนของคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้น ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป (Hu, 2004)

ส่วนเหล็ก (Iron, Fe) เป็นธาตุอาหารรอง (micronutrient) ที่จำเป็นต่อพืชมีบทบาทสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการเมตาบอลิซึม ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุ เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการหายใจ ถ้าขาดเหล็กจะทำให้การสังเคราะห์

แสงลดลงและปริมาณอาหารสะสมลดลงด้วย (Lin *et al.*, 2012) โดยสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการเหล็กที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตหรือสร้างไขมันในปริมาณที่แตกต่างกัน (Liu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010) หากระดับความเข้มข้นเหล็กมากเกินไปมักจะส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน ส่วนในสภาวะที่สาหร่ายขาดเหล็กจะส่งผลทำให้สาหร่ายไม่สามารถดึงไนโตรเจนจากอาหารไปใช้ได้ทำให้เซลล์เกิดความเครียด เซลล์สาหร่ายจะปรับตัวโดยเปลี่ยนรูปอาหารที่เก็บจากคาร์โบไฮเดรตเป็นไขมัน (Shen *et al.*, 2009) มีรายงานว่าความเข้มข้นของเหล็กที่สูงหรือต่ำเกินไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. นอกจากนี้เหล็กยังมีความสำคัญต่อการผลิตไขมันของสาหร่ายขนาดเล็กชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นไปได้ว่าระดับที่เหมาะสมของเหล็ก ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องศึกษาระดับที่เหมาะสมดังกล่าวในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ (Ren *et al.*, 2014)

สาหร่ายมีความต้องการฟอสฟอรัสและเหล็กเพื่อช่วยในการดำรงชีวิต โดยหากสาหร่ายได้รับความเข้มข้นของธาตุอาหารทั้งสองชนิดที่เหมาะสมต่อสาหร่าย สาหร่ายก็จะมีการเจริญเติบโตที่ดี หรือสร้างไขมันได้ในปริมาณมาก โดยในสาหร่าย *D. quadricauda* นั้น เป็นสาหร่ายที่พบได้ในแหล่งน้ำจืดทั่วไป เพาะเลี้ยงได้ง่าย มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว แต่ยังไม่มีการรายงานการศึกษาถึงระดับฟอสฟอรัสหรือเหล็กที่เหมาะสมที่สุดเอาไว้ โดยจากทฤษฎีพบว่าธาตุอาหารทั้งสองชนิดนี้น่าจะทำงานเสริมกันเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังนั้นการหาความเข้มข้นของธาตุอาหารที่เหมาะสมจึงควรหาในลักษณะของอัตราส่วนที่เหมาะสมของธาตุอาหารทั้งสองชนิด ซึ่งศึกษาได้ในรูปแบบของการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของธาตุอาหารสองชนิดนี้ต่อสาหร่าย การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ของฟอสฟอรัสร่วมกับเหล็กที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่าย *D. quadricauda* เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้สำหรับเป็นแหล่งวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซลต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่าย

เพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่าย *D. quadricauda* ที่คัดแยกโคลนีเดี่ยวมาจากบ่อเลี้ยงปลา และทำการจำแนกชนิดโดยวัดขนาดเซลล์และศึกษารูปร่างภายนอกตามหนังสือของ Philipose (1967) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร *Chlorella* medium (Vonshak and Maske, 1982) ซึ่งเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 0.5$  องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อใช้สาหร่ายเป็นหัวเชื้อในการศึกษาขั้นต่อไป

### 2. ผลของอัตราส่วนฟอสฟอรัสต่อเหล็ก ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร *Chlorella* medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้อาหารสูตรปกตินี้เป็นชุดควบคุม เทียบปริมาณฟอสฟอรัสและเหล็กในสูตรปกติเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และทำการผันแปรปริมาณฟอสฟอรัสและเหล็กในอาหารนี้ อย่างละ 5 ระดับ ใช้แผนการทดลองแบบ Factorial ( $5 \times 5$ ) โดยใช้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 5 ระดับคือ 10, 50, 100 (ชุดควบคุม), 150 และ 200 เปอร์เซ็นต์ หรือเทียบเท่ากับ 28, 142, 285, 427 และ 569 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และผันแปรเหล็ก ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 5 ระดับคือ 10, 50, 100 (ชุดควบคุม), 150 และ 200 เปอร์เซ็นต์ หรือเทียบเท่ากับ 15, 10, 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมเหล็กต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 0.5$  องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เพาะเลี้ยงจนเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (ประมาณ 30 วัน) วิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (ชีวมวล) ทุก 2 วัน โดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายที่สิ้นสุดการทดลอง ตามวิธีของ Bligh and Dyer (1959) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติและปฏิสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมด

ด้วยวิธี ANOVA: two factor with replication และ ANOVA: single factor โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel 2013 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. ปฏิสัมพันธ์ของฟอสฟอรัสและเหล็ก ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

สาหร่าย *D. quadricauda* ที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับอัตราส่วนของ P:Fe แตกต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงใน ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ต่างกัน 5 ระดับ โดยมีระดับในสูตรอาหารปกติคือ 285 (ชุดควบคุม) มิลลิกรัม ฟอสฟอรัสต่อลิตร และผันแปรความเข้มข้นโดยลดลงและเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมอีกอย่างละสองระดับ (ความเข้มข้น ของเหล็กทำเช่นเดียวกันกับฟอสฟอรัส) ผลพบว่าสาหร่ายมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate,  $\mu$ ) สูงที่สุดเท่ากับ  $0.23 \pm 0.06$  ต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี P:Fe 142:10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของ P:Fe เกือบทุกชุดการทดลอง ยกเว้นที่ P:Fe 28:5, 28:20, 285:10, 427:5, 427:10, 569:1 และ 569:20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 1)

สาหร่ายมีชีวมวลหรือน้ำหนักแห้ง (biomass) เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง และพบว่าส่วนใหญ่เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 28 วัน (Fig. 1) โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของ P:Fe 427:20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ  $1.82 \pm 0.18$  กรัมต่อลิตร (Figure 1D, Table 1) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่มี ความเข้มข้นของ P:Fe เกือบทุกชุดการทดลอง ยกเว้นที่ P:Fe 142:15, 142:20, 285:5, 569:1 และ 569:5 มิลลิกรัม ต่อลิตร โดยการควบคุมปริมาณฟอสฟอรัสให้คงที่ที่ 142 มิลลิกรัมต่อลิตร และผันแปรเหล็ก พบว่าสาหร่ายมีแนวโน้ม เจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเหล็กเพิ่มมากขึ้น (Figure 1B) และพบว่าฟอสฟอรัสและเหล็กมีปฏิสัมพันธ์ ร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $p = 0.01$ ) และชีวมวล ( $p = 4.00 \times 10^{-13}$ ) ของสาหร่าย *D. quadricauda*

จากการทดลองนี้พบว่าการผันแปรอัตราส่วนของฟอสฟอรัสต่อเหล็กให้เหมาะสมส่งผลให้สาหร่ายชนิดนี้มี ชีวมวลสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรปกติ (P:Fe 285:10) ถึง 1.6 เท่า ซึ่งแสดงว่าอาหาร สูตร *Chlorella* medium ปกติ ที่ระบุไว้ว่าเหมาะสมสำหรับสาหร่ายสีเขียวโดยทั่วไปนั้น (Vonshak and Maske, 1982) เป็นสูตรอาหารที่เลี้ยงให้สาหร่ายสีเขียวทั่วไปเจริญเติบโตได้ แต่ไม่ใช่ระดับที่เจริญเติบโตดีที่สุดสำหรับ *D. quadricauda* ดังนั้นเมื่อทำการแยกหัวเชื้อสาหร่ายสกุลหรือชนิดใหม่มาได้ จึงควรมีการปรับความเข้มข้นของธาตุ อาหารจากสูตรปกติที่นิยมใช้ทั่วไป เพื่อหาระดับธาตุอาหารที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายชนิดนั้น ๆ จะทำให้ได้ผลลัพธ์ คือชีวมวลของสาหร่ายที่สูงที่สุด

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราส่วนของ P:Fe ที่ต่างกัน มีผลทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ต่างกัน โดยที่ P:Fe 427:20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้สาหร่ายมีชีวมวลสูงสุด ซึ่งแสดงว่าระดับนี้คือระดับที่เหมาะสมต่อสาหร่าย ชนิดนี้ ซึ่งเป็นระดับเหล็กสูงที่สุดและเป็นระดับฟอสฟอรัสที่มากกว่าชุดควบคุม เปอร์เซนต์ โดยปกติแล้วฟอสฟอรัส ช่วยในการสังเคราะห์แสงและเป็นแหล่งพลังงาน จึงทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้รวดเร็วมากขึ้น ส่วนเหล็กเป็นธาตุอาหารที่ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบพื้นฐานของเอนไซม์ต่างๆ เข้าร่วมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วย แสงในระบบแสง 2 (PS II) โดยเป็นส่วนประกอบของ ferredoxin การขาดเหล็กทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายทอด อิเล็กตรอน การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ ดังนั้นอัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจึงมีค่าต่ำ สาหร่ายจึงมีการ เจริญเติบโตลดลง (Terry and Abadia, 1986) นอกจากนี้เหล็กยังมีอิทธิพลต่อการใช้ในโตรเจนของสาหร่ายและเป็น หนึ่งในองค์ประกอบที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ของเซลล์สาหร่าย

**Table 1** Biomass and lipid production of *D. quadricauda* cultured in *Chlorella* medium under different P:Fe ratios.

| P (mg/l) | Fe (mg/l) | $\mu$ (/day)               | Biomass (g/l)             | Lipid content (%)           | Lipid yield (g/l)             | Lipid productivity (mg/l/d) |
|----------|-----------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 28       | 1         | 0.11±0.01 <sup>ab</sup>    | 0.73±0.08 <sup>a</sup>    | 22.89±2.26 <sup>de</sup>    | 0.17±0.02 <sup>abcdefgh</sup> | 25.50±0.58 <sup>bc</sup>    |
|          | 5         | 0.16±0.01 <sup>abcde</sup> | 0.73±0.08 <sup>a</sup>    | 14.26±0.12 <sup>abc</sup>   | 0.10±0.01 <sup>abc</sup>      | 22.74±1.52 <sup>abc</sup>   |
|          | 10        | 0.12±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.30±0.07 <sup>def</sup>  | 15.16±0.25 <sup>abcd</sup>  | 0.20±0.01 <sup>bcdefgh</sup>  | 18.60±1.27 <sup>ab</sup>    |
|          | 15        | 0.12±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.30±0.11 <sup>def</sup>  | 15.35±0.12 <sup>abcd</sup>  | 0.20±0.02 <sup>bcdefgh</sup>  | 18.32±2.17 <sup>ab</sup>    |
|          | 20        | 0.16±0.02 <sup>abcde</sup> | 1.25±0.06 <sup>cdef</sup> | 12.70±1.08 <sup>abc</sup>   | 0.16±0.01 <sup>abcdefg</sup>  | 19.76±2.77 <sup>ab</sup>    |
| 142      | 1         | 0.15±0.00 <sup>abcd</sup>  | 1.36±0.08 <sup>efg</sup>  | 17.81±5.50 <sup>bcd</sup>   | 0.24±0.08 <sup>fgh</sup>      | 26.26±8.27 <sup>bc</sup>    |
|          | 5         | 0.13±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.11±0.04 <sup>bcd</sup>  | 11.91±0.51 <sup>abc</sup>   | 0.13±0.01 <sup>abcdef</sup>   | 15.31±1.05 <sup>ab</sup>    |
|          | 10        | 0.23±0.06 <sup>e</sup>     | 1.27±0.03 <sup>cdef</sup> | 10.87±0.15 <sup>abc</sup>   | 0.14±0.00 <sup>abcdef</sup>   | 24.78±6.36 <sup>bc</sup>    |
|          | 15        | 0.12±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.71±0.04 <sup>hi</sup>   | 10.32±0.19 <sup>abc</sup>   | 0.18±0.00 <sup>abcdefgh</sup> | 12.62±1.07 <sup>ab</sup>    |
|          | 20        | 0.13±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.75±0.04 <sup>hi</sup>   | 10.00±0.20 <sup>abc</sup>   | 0.17±0.01 <sup>abcdefgh</sup> | 12.72±0.91 <sup>ab</sup>    |
| 285      | 1         | 0.13±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.43±0.09 <sup>efgh</sup> | 17.58±3.36 <sup>abcde</sup> | 0.26±0.07 <sup>gh</sup>       | 22.56±2.23 <sup>abc</sup>   |
|          | 5         | 0.15±0.01 <sup>abcd</sup>  | 1.75±0.10 <sup>hi</sup>   | 13.29±0.24 <sup>abc</sup>   | 0.24±0.01 <sup>efgh</sup>     | 19.84±1.70 <sup>ab</sup>    |
|          | 10        | 0.19±0.02 <sup>bcd</sup>   | 1.14±0.13 <sup>bcd</sup>  | 10.42±0.14 <sup>abc</sup>   | 0.12±0.01 <sup>abcde</sup>    | 19.67±1.99 <sup>ab</sup>    |
|          | 15        | 0.15±0.02 <sup>abcd</sup>  | 0.99±0.10 <sup>abcd</sup> | 17.75±8.74 <sup>bcd</sup>   | 0.16±0.01 <sup>abcdefg</sup>  | 22.67±8.18 <sup>abc</sup>   |
|          | 20        | 0.15±0.03 <sup>abcd</sup>  | 0.97±0.02 <sup>abcd</sup> | 8.84±0.19 <sup>a</sup>      | 0.09±0.02 <sup>ab</sup>       | 13.39±2.62 <sup>ab</sup>    |
| 427      | 1         | 0.13±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.23±0.10 <sup>cdef</sup> | 18.50±3.48 <sup>cde</sup>   | 0.29±0.07 <sup>fgh</sup>      | 25.73±6.59 <sup>bc</sup>    |
|          | 5         | 0.22±0.03 <sup>de</sup>    | 1.22±0.07 <sup>cdef</sup> | 15.02±0.40 <sup>abcd</sup>  | 0.18±0.01 <sup>abcdefgh</sup> | 33.16±5.57 <sup>c</sup>     |
|          | 10        | 0.19±0.03 <sup>bcd</sup>   | 0.93±0.09 <sup>abc</sup>  | 12.38±0.33 <sup>abc</sup>   | 0.11±0.01 <sup>abcd</sup>     | 23.14±3.33 <sup>abc</sup>   |
|          | 15        | 0.11±0.01 <sup>a</sup>     | 1.19±0.08 <sup>bcd</sup>  | 13.42±0.13 <sup>abc</sup>   | 0.16±0.01 <sup>abcdefg</sup>  | 15.04±0.72 <sup>ab</sup>    |
|          | 20        | 0.11±0.01 <sup>ab</sup>    | 1.82±0.18 <sup>i</sup>    | 12.70±1.18 <sup>abc</sup>   | 0.23±0.02 <sup>defgh</sup>    | 14.33±0.64 <sup>ab</sup>    |
| 569      | 1         | 0.19±0.03 <sup>cde</sup>   | 1.66±0.07 <sup>ghi</sup>  | 24.98±5.03 <sup>e</sup>     | 0.41±0.06 <sup>i</sup>        | 45.06±5.23 <sup>d</sup>     |
|          | 5         | 0.14±0.01 <sup>abc</sup>   | 1.55±0.08 <sup>fghi</sup> | 17.92±0.31 <sup>bcd</sup>   | 0.28±0.01 <sup>h</sup>        | 24.99±2.51 <sup>bc</sup>    |
|          | 10        | 0.14±0.03 <sup>abc</sup>   | 1.35±0.33 <sup>efg</sup>  | 15.60±0.11 <sup>abcd</sup>  | 0.21±0.05 <sup>cdefgh</sup>   | 22.48±5.33 <sup>abc</sup>   |
|          | 15        | 0.12±0.03 <sup>abc</sup>   | 0.87±0.04 <sup>ab</sup>   | 9.31±0.13 <sup>ab</sup>     | 0.08±0.00 <sup>a</sup>        | 10.92±2.21 <sup>a</sup>     |
|          | 20        | 0.18±0.03 <sup>abcde</sup> | 1.30±0.02 <sup>def</sup>  | 12.83±0.33 <sup>abc</sup>   | 0.17±0.00 <sup>abcdefgh</sup> | 22.90±3.97 <sup>abc</sup>   |

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

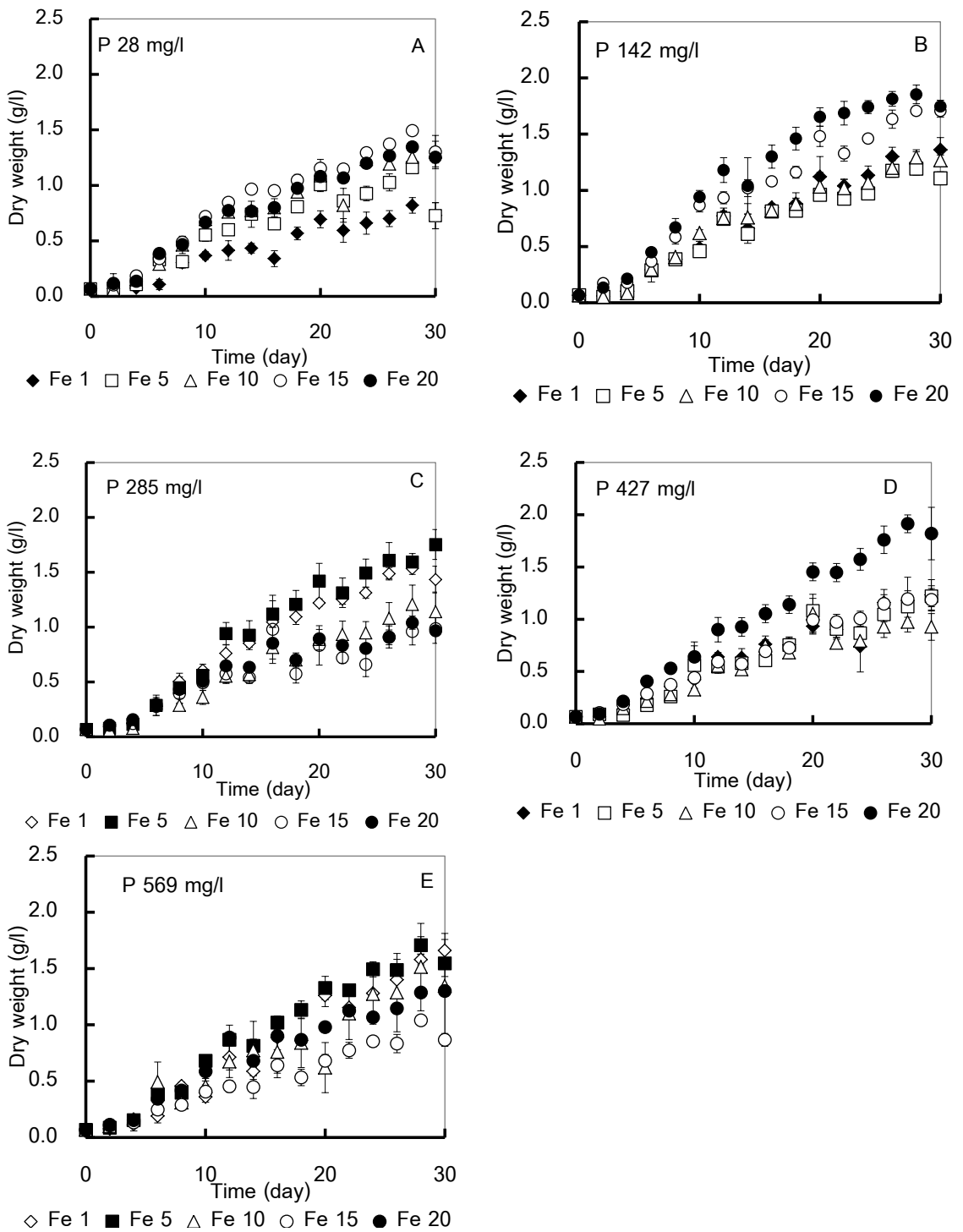


Figure 1. Dry weight of *D. quadricauda* cultured in *Chlorella* medium under various P:Fe ratios

ภาวะการขาดหรือมีปริมาณธาตุเหล็กมากเกินไปของในเซลล์สาหร่ายมีผลทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายลดลง (Lin et al., 2012) ซึ่งเห็นได้ว่าหน้าที่ของฟอสฟอรัสและเหล็กนั้นทำงานเสริมกันต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งพิสูจน์ได้ชัดเจนจากการทดลองนี้ซึ่งทั้งฟอสฟอรัสและเหล็กมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. quadricauda* อย่างชัดเจน

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเพิ่มหรือลดปริมาณฟอสฟอรัสหรือเหล็ก ในการศึกษาครั้งนี้กับรายงานการศึกษาของนักวิจัยท่านอื่นในอดีต ไม่สามารถทำการเปรียบเทียบได้โดยตรงเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการผันแปรของฟอสฟอรัสต่อเหล็กไว้ โดยการทดลองที่ใกล้เคียงคือการทดลองเลี้ยง *S. dimorphus* ในอาหารที่ผันแปรระดับไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด 104.0 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ในอาหารที่มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 240:45 มิลลิกรัมต่อลิตร และต่ำสุดเท่ากับ 34.6 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ในอาหารที่ไม่มีทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Chu et al., 2014)

โดยการศึกษาในเรื่องธาตุอาหารกับการเจริญเติบโตหรือการผลิตไขมันของสาหร่ายในอดีตส่วนใหญ่จะทำการผันแปรความเข้มข้นธาตุอาหารเพียงประเภทเดียว โดยการศึกษาที่เคยมีรายงานไว้ได้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายแต่ละชนิดมีแนวโน้มความต้องการฟอสฟอรัสและเหล็กแตกต่างกัน และการผันแปรธาตุอาหารทีละชนิดก็ให้ผลแตกต่างจากการผันแปรธาตุอาหารร่วมกัน เช่นการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* และ *Botryococcus braunii* KMITL 2 ที่ความเข้มข้นฟอสฟอรัสที่ 22- 444 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีชีวมวลสูงสุดคือ  $1.35 \pm 0.01$  และ  $1.91 \pm 0.03$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระดับฟอสฟอรัสเข้มข้นสูงสุด (Ruangsomboon et al., 2012, 2013) และการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ในอาหารที่มีเหล็ก 0-0.12 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นเหล็กเพิ่มขึ้น แต่จะมีระดับที่เหมาะสมระดับหนึ่งที่ทำให้มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด หากสูงหรือต่ำกว่านั้น จะทำให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายลดลง (Ren et al., 2014) ซึ่งแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. dimorphus* ในอาหารที่มีปริมาณความเข้มข้นของเหล็กที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 9- 45 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นเหล็กสูงสุดมีชีวมวลสูงสุด  $1.75 \pm 0.001$  กรัมต่อลิตร (Ruangsomboon et al., 2013)

## 2. ปฏิสัมพันธ์ของฟอสฟอรัสร่วมกับเหล็ก ต่อการผลิตไขมันของสาหร่าย

สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของ P:Fe 569:1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณไขมัน (lipid content) มากที่สุด เท่ากับ  $24.98 \pm 5.03$  เปอร์เซ็นต์ (Table 1) โดยสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่นๆ ยกเว้น ชุดการทดลองที่ได้รับ P:Fe 28:1, 142:1, 285:1, 285:15, 427:1 และ 569:5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วชุดทดลองที่ได้รับเหล็กปริมาณต่ำ สาหร่ายจะมีไขมันสะสมสูง ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณธาตุเหล็กไม่เพียงพอต่อความต้องการของสาหร่ายชนิดนี้เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต สาหร่ายจึงอยู่ในภาวะเครียดจึงมีการสะสมไขมันสูง ซึ่งยืนยันได้โดยพิจารณาจากค่าผลผลิตชีวมวลจะพบว่าสาหร่ายที่ได้รับเหล็กสูงสุด จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่จะมีปริมาณไขมันต่ำกว่าชุดสาหร่ายที่ได้รับเหล็กต่ำที่สุด

โดยการที่ธาตุเหล็กต่ำส่งผลให้สาหร่ายดูดซึมไนโตรเจนมาใช้ได้น้อย จึงส่งผลให้สาหร่ายมีไขมันสูงได้อีกปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวที่ช้าลง ซึ่งเกิดจากสารอาหารที่ไม่เพียงพอทำให้เซลล์เลือกที่จะสะสมอาหารในรูปของไขมัน เพราะเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์ไขมันสามารถทนต่อการขาดไนโตรเจนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้การขาดไนโตรเจนยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้ดีขึ้น เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกลไกการสังเคราะห์ไขมันคือ Diacylglycerol transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน Diacylglycerol เป็น Triacylglyceride (TAG) ดังนั้นโมเลกุลคาร์บอน ที่ได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์หรือสารอินทรีย์จึงถูกชักนำให้เปลี่ยนไปเป็นไขมันมากกว่าคาร์โบไฮเดรต ทำให้สามารถพบปริมาณไขมันสูงในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Xin et al., 2010b)

นอกจากนี้สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี P:Fe 569:1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังมีผลผลิตไขมัน (lipid yield) และ กำลังการผลิตไขมัน (lipid productivity) สูงที่สุดอีกด้วย โดยมีค่าเท่ากับ  $0.41 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร และ  $45.06 \pm 5.23$  มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลองที่เหลือ ทั้งนี้เป็นเพราะสาหร่ายที่ได้รับ P:Fe ระดับนี้มีปริมาณไขมันสูงที่สุด จึงส่งผลให้ผลผลิตไขมันและกำลังการผลิตไขมันสูงที่สุดนั่นเอง โดยพบว่าฟอสฟอรัสและเหล็กมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่อปริมาณไขมัน ( $p = 8.13 \times 10^{-5}$ ) และผลผลิตไขมัน ( $p = 0.009$ ) ของสาหร่าย *D. quadricauda* โดยฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นสูงที่สุดและเหล็กความเข้มข้นต่ำสุด ส่งผลให้สาหร่ายมีไขมันสูงที่สุด ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากเมื่อมีธาตุเหล็กต่ำสาหร่ายจะมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ ทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายลดลง (Lin et al., 2012; Terry and Abadia, 1986) สาหร่ายอยู่ในภาวะเครียด จึงมีการสะสมอาหารในรูปของไขมันมากกว่ารูปของคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน (Xin et al., 2010b)

การศึกษาอัตราส่วนของ P:Fe ต่อไขมันของสาหร่าย *D. quadricauda* หรือสาหร่ายชนิดอื่นๆ นั้นยังไม่พบมีรายงานไว้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาที่ละปัจจัยธาตุอาหาร โดยพบมีรายงานการศึกษาระดับฟอสฟอรัส 22 - 444 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อสาหร่าย *S. dimorphus* และ *B. braunii* KMITL 2 พบว่าสาหร่าย *S. dimorphus* มีปริมาณไขมันสูงสุดคือ  $19.4 \pm 0.20$  เปอร์เซ็นต์ ที่ฟอสฟอรัสระดับต่ำที่สุด ส่วนสาหร่าย *B. braunii* KMITL 2 มีปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ  $54.69 \pm 3.13$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงในฟอสฟอรัสที่ระดับความเข้มข้นที่ 222 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ruangsomboon et al., 2012, 2013) การทดลองเลี้ยง *S. dimorphus* ในอาหารที่ผันแปรระดับไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส พบว่าสาหร่ายมีกำลังการผลิตไขมันสูงสุด 24.2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ในอาหารที่มี ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 0:45 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chu et al., 2014) ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ในอาหารที่มีเหล็ก 0 - 0.12 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีปริมาณไขมันสูงสุดที่ 43.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสาหร่ายได้รับเหล็กที่ความเข้มข้น 0.0012 กรัมต่อลิตร (Ren et al., 2014) ส่วนสาหร่าย *S. dimorphus* ที่ได้รับเหล็กเพิ่มขึ้น 2 เท่า จากสูตรอาหารปกติ จะมีไขมันสูงที่สุด  $26.13 \pm 1.19$  เปอร์เซ็นต์ (วัฒนา และ สุนิรัตน์, 2556) ซึ่งจากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่ต่างชนิดกัน มีระดับของฟอสฟอรัสและเหล็กที่กระตุ้นให้สาหร่ายมีปริมาณไขมันได้สูงที่สุดแตกต่างกัน

ดัชนีที่สามารถใช้ในการประเมินศักยภาพของสาหร่ายขนาดเล็ก ในฐานะแหล่งผลิตไบโอดีเซลได้นั้นพิจารณาจากปริมาณไขมันที่มีในสาหร่าย (Shen et al., 2009) ดังนั้นการพิจารณาคัดเลือกสาหร่ายเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล นอกจากพิจารณาเรื่องการเพาะเลี้ยงได้ง่ายแล้วต้องพิจารณาถึงปริมาณไขมันที่สาหร่ายชนิดนั้นมีด้วยเช่นกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบสาหร่าย *D. quadricauda* (*Scenedesmus quadricauda*) จากการศึกษารังนี้กับสาหร่ายในสกุลใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงาน ซึ่งแสดงไว้ใน Table 2 พบว่า *D. quadricauda* จากการศึกษานี้มีปริมาณไขมันอยู่ในช่วง 8.84-24.98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่า *S. dimorphus* สายพันธุ์ EPS-5 และ CNW-N แต่ยังคงต่ำกว่าบางสายพันธุ์ จึงนับว่าเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ในอนาคต แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มปริมาณไขมันในสาหร่ายให้สูงกว่านี้ เช่นการทดลองศึกษาปฏิสัมพันธ์ของธาตุอาหารชนิดอื่นเช่นไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส หรือไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Scenedesmus* sp. ในรูปแบบที่แตกต่างกันคือ ออโตโทรฟิก (autotrophic) และ มิกโซโทรฟิก (mixotrophic) นั้นส่งผลต่อปริมาณไขมันในสาหร่ายด้วย (Li et al., 2014) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษารังนี้ต่อการผลิตน้ำมันของ *D. quadricauda* ด้วย ต่อไปในอนาคต

**Table 2** Lipid contents for some species of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* in pass studies.

| Algae                      | Lipid content (%) | References                        |
|----------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| <i>D. quadricauda</i>      | 8.84-24.98        | This study                        |
| <i>S. dimorphus</i> KMITL  | 25                | Ruangsomboon <i>et al.</i> (2013) |
| <i>Scenedesmus</i> sp. LX1 | 53                | Xin <i>et al.</i> (2010b)         |
| <i>Scenedesmus</i> sp. LX1 | 31-33             | Xin <i>et al.</i> (2010a)         |
| <i>Scenedesmus</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

ฟอสฟอรัสและเหล็กมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ชีวมวล ปริมาณไขมัน และผลผลิตไขมัน ของสาหร่าย *D. quadricauda* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี P:Fe 427:20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้สาหร่ายมีผลผลิตชีวมวลสูงสุดที่  $1.82 \pm 0.18$  กรัมต่อลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี P:Fe 569:1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้สาหร่ายมีไขมันสูงสุดเท่ากับ  $24.98 \pm 5.03$  เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี P:Fe 569:1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้มากที่สุด เนื่องจากมีผลผลิตไขมันสูงสุดคือ  $0.41 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (A118-59-064)

### เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25: 294-306.
- Chu, F.F., P.N. Chu, X.F. Shen, P.K.S. Lam and R.J. Zeng. 2014. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. Bioresour. Technol. 152: 241-246.
- 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, S.H., C.Y. Chene and J.S. Chang. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresour. Technol. 113: 244-252.
- Hu, Q. 2004. Environmental effects on cell composition. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell, Victoria, pp 83-93.

- Li, Y.R., W.T. Tsai, Y.C. Hsu, M.Z. Xie and J.J. Chen. 2014. Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energ. Proc.* 52: 371-376.
- 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.
- 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.
- Philipose, M.T. 1967. Chlorococcales. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
- Ren, H.Y., B.F. Liu, F. Kong, L. Zhao, G.J. Xie and N.Q. Ren. 2014. Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresour. Technol.* 169: 763-767.
- Ruangsomboon, S. 2012. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresour. Technol.* 109: 261-265.
- 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. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresour. Technol.* 102: 3071-3076.
- Terry, N. and J. Abadia. 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutrition.* 9: 609-646.
- Vonshak, A. and H. Maske. 1982. Algae: growth techniques and biomass production, in: Coombs, J., Hall, D.O. (Eds.), *Techniques in Bioproducity and Photosynthesis*. Pergamon Press, Oxford, pp. 66-77.
- 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 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 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, 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.
- Zhila, N.O., G.S. Kalacheva and T.G. Volova. 2005. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *J. Appl. Phycol.* 17:309-315.
- Zhila, N.O., G.S. Kalacheva and T.G. Volova. 2011. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J. Appl. Phycol.* 23:47-52.