

การศึกษาปริมาณไขมันและสารสีของสาหร่ายขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงในน้ำจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม Study on Lipid and Pigment Contents of Microalgae Cultivated in Water from *Litopenaeus vannamei* Shrimp Farm

เบญจมาส เชียร์ศิลป์^{1*} ธิดาพร ขุมเงิน¹ และวชิพร มณีโชติ¹Benjamas Cheirsilp^{1*}, Thidaporn Khumngen¹ and Wageporn Maneechote¹

Received date: 1 พ.ค. 66 Revised date: 17 ก.ค. 66 Accepted date: 20 ก.ค. 66

DOI: <https://doi.org/10.55003/kmaj.2024.08.16.005>

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำจากบ่อต่างๆ ในฟาร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมให้กับกุ้ง โดยทำการศึกษาการเจริญ ปริมาณไขมัน และสารสีของสาหร่ายขนาดเล็ก ผลการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริม และผลการขยายขนาดบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. SHP ที่คัดแยกได้จากฟาร์มกุ้งให้ปริมาณสารสีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าอีกสองสายพันธุ์มาก และยังสามารถเจริญได้ดีที่สุดในน้ำทิ้งจากบ่อบำบัด เมื่อเปรียบเทียบกับบ่อเพาะเลี้ยงในน้ำจากบ่อพักน้ำและบ่อเลี้ยงกุ้ง และพบว่าการเติมยูเรียที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร และการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเลี้ยงสาหร่ายจำลองขนาด 50 ลิตร แบบเปิดและมีน้ำไหลวน ทำให้ได้สาหร่ายน้ำหนักรวมแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.19 ± 0.03 กรัมต่อลิตร โดยเซลล์สาหร่ายมีปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 44.96 ± 2.79 ปริมาณสารสีคลอโรฟิลล์เอบี และแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 11.65 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 5.45 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่าเซลล์สาหร่าย 1 กรัม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดจากค่า Radical scavenging activity เท่ากับร้อยละ 66.71 ± 0.02 ซึ่งผลจากการศึกษาคาดว่า จะเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตเซลล์สาหร่ายที่มีไขมันและสารสีสูงที่จะสามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงกุ้งต้นทุนต่ำได้

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ สาหร่ายขนาดเล็ก สารสี โปรตีน บ่อเลี้ยงกุ้ง

Abstract

This study aimed to cultivate microalgae in water from *Litopenaeus vannamei* shrimp farm to be used as supplement for shrimp. The study focused on its growth, lipid and pigment contents and effects of urea addition as nitrogen source and scale-up of microalgae cultivation. Microalga *Chlorella* sp. SHP isolated from shrimp farm showed higher pigment content and antioxidant activity than other two isolated strains. *Chlorella* sp. SHP grew best in effluent from treatment pond compared to water from reservoir pond and shrimp pond. The addition of urea at 2 g/L and the scale up in 50 L microalgae cultivation pond gave the maximum biomass of 0.19 ± 0.03 g/L, the lipid content of $44.96 \pm 2.79\%$, and the contents of chlorophyll ab and carotenoids of 11.65 mg/g and 5.45 mg/g, respectively. The antioxidant activity based on radical scavenging activity of 1 g microalgal biomass was $66.71 \pm 0.02\%$. The findings from this study could be an alternative for producing microalgae with high lipid and pigment contents, and further utilization as low-cost supplements for shrimp cultivation.

Keywords: antioxidants, microalgae, pigments, protein, shrimp pond

¹ ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศนวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพอย่างยั่งยืน คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

¹ Center of Excellence in Innovative Biotechnology for Sustainable Utilization of Bioresources, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Songkhla 90110

* Corresponding author, Email: benjamas.che@psu.ac.th

คำนำ

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวจัดเป็นพืชชั้นต่ำแต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น น้ำกร่อย น้ำเค็ม หรือในพื้นที่ที่ไม่สามารถเพาะปลูกพืชอื่นได้ ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย และยังมีค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวและขนส่งถูกกว่าเมื่อเทียบกับการปลูกพืชชนิดอื่นๆ และยังสามารถผลิตสารสีที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และสารอื่นๆ ที่มีมูลค่าสูงได้ เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น (Cichonski & Chrzanowski, 2022) สาหร่ายขนาดเล็กถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ด้านเชื้อเพลิงชีวภาพ พลังงาน เครื่องสำอาง ยา สิ่งแวดล้อม อาหารมนุษย์ และอาหารสัตว์ (Bhalamurugan et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปู และกุ้ง เพื่อช่วยเพิ่มสีและระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยความต้องการของสาหร่ายขนาดเล็กมีชีวิตในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Brown & Blackburn, 2013) ดังนั้นจึงมีการผลิตสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการใช้สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อเป็นอาหารสำหรับการเลี้ยงไร้น้ำนางฟ้า (Fairly shrimp) (Chaoruangrit et al., 2018) และมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในน้ำทิ้งสังเคราะห์เพื่อผลิตโปรตีนและสารสี (Yang et al., 2023) รวมทั้งมีงานวิจัยที่พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กสามารถบำบัดน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Nasir et al., 2023) โดยน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักมีธาตุอาหารเช่น แอมโมเนีย ไนเตรต และฟอสเฟต หลงเหลืออยู่มาก เนื่องมาจากการใช้อาหารปริมาณมากเกินไป และอาจจะมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์น้ำ เป็นต้น โดยธาตุอาหารเหล่านี้สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีสารสีและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงโดยใช้น้ำจากฟาร์มกุ้ง

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้น้ำจากฟาร์มกุ้งโดยเน้นสายพันธุ์ที่มีปริมาณไขมันและสารสีสูงเพื่อประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์น้ำได้ โดยงานวิจัยเริ่มจากการคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการเจริญเติบโต การผลิตไขมัน สารสี และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จากนั้นจึงศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม การเติมยูเรียเพื่อเพิ่มแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงจำลองขนาด 50 ลิตร ซึ่งคาดว่าจะได้สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์น้ำได้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายยังคาดว่าจะสามารถช่วยบำบัดน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Bioremediation) และนำไปสู่การลดของเสียตามแนวทาง Zero waste ได้ต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระสูง

ทำการศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. SHP ที่แยกได้จากแหล่งน้ำในฟาร์มกุ้ง เปรียบเทียบกับ *Chlamydomonas* sp. WP1 และ *Scenedesmus* sp. WP2 ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ Bioprocess engineering คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Modified Chu 13 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีการให้แสง 3,000 ลักซ์ ฟันอากาศด้วยเครื่องฟันอากาศที่อัตราการไหล 0.02 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (volume per volume per minute, vvm) กวนด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็ว 300 รอบต่อนาที (Maneechote & Cheirsilp, 2021) โดยทำการเลี้ยงสายพันธุ์ละ 3 ขั้ว เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวัดค่าความขุ่นและค่าพีเอช และเมื่อครบกำหนดเวลาการเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง สารสี และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เลือกสาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้สารมูลค่าสูงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในแหล่งน้ำจากฟาร์มกุ้ง

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ในแหล่งน้ำจากฟาร์มกุ้ง 3 แหล่งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ได้แก่ น้ำจากบ่อบำบัด น้ำก่อนเข้าบ่เลี้ยงกุ้ง น้ำจากบ่เลี้ยงกุ้ง และน้ำทิ้งจากบ่บำบัด ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 5 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น เลือกแหล่งน้ำที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดี

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบระบบเปิดในตู้กระจกและการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ในแหล่งน้ำจากฟาร์มกุ้งที่เหมาะสม ทำการเลี้ยงแบบระบบเปิดในตู้กระจกขนาด 4 ลิตร ใช้ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ทำการศึกษผลของการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม โดยมีชุดควบคุมเป็นตัวอย่างน้ำที่ไม่มีการเติมยูเรีย และชุดการทดลองที่มีการเติมยูเรีย 1, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ในสภาวะแสงจากธรรมชาติ (3000-9000 ลักซ์) ฟ่นอากาศด้วยเครื่องฟ่นอากาศที่อัตราการไหล 0.02 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันและวัดค่าต่างๆ เช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น เลือกปริมาณยูเรียที่เหมาะสม

การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบระบบเปิดในบ่อจำลอง

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ในแหล่งน้ำจากฟาร์มกุ้งที่เหมาะสม มาเลี้ยงในบ่อระบบเปิดขนาดความจุ 50 ลิตร มีระบบการไหลเวียนน้ำผ่านปั๊มและท่อ ดังแสดงใน Figure 1 ทำการเติมยูเรียที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยในบ่อนี้ ใช้การไหลวนของน้ำผ่านท่อเป็นตัวช่วยในการให้อากาศ และใช้พลังงานแสงจากแสงอาทิตย์ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันและวัดค่าต่างๆ เช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น

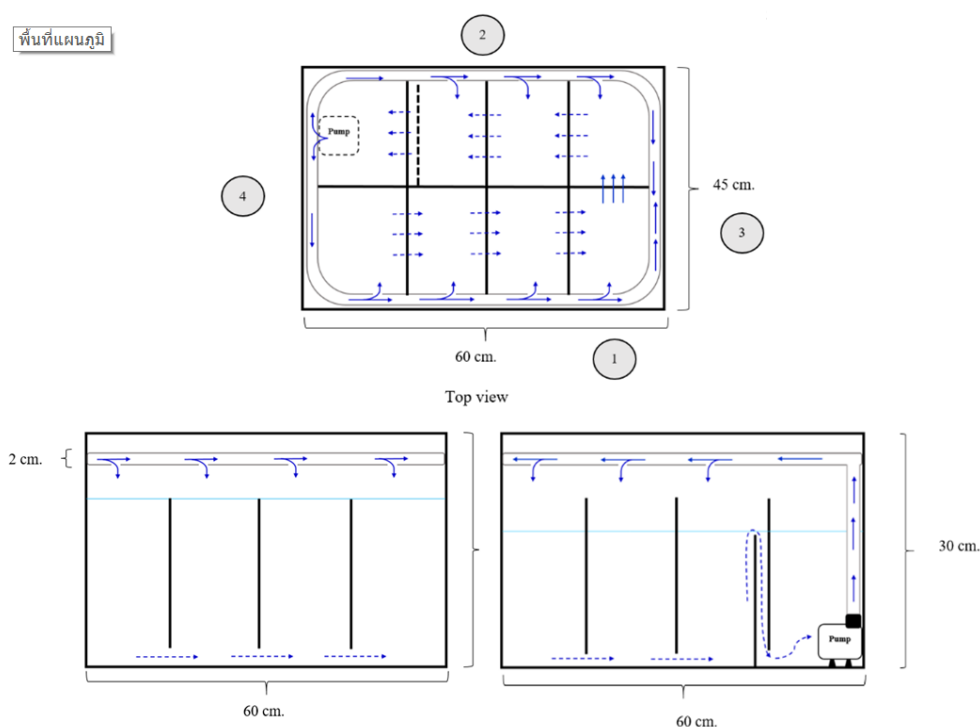


Figure 1 Top view and side view of microalgae cultivation pond model. Dashes line represent water flow input for water pump and solid lines represent water flow output from water pump through water pipe set on the top of pond model.

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่ายและการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

นำตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน แล้วนำตะกอนเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 60

องศาเซลเซียส จนแห้งหรือประมาณ 48-72 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่ง คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นทำการสกัดไขมันโดยการเติมสารผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอล (อัตราส่วน 2:1 ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร บดตะกอนเซลล์ให้ละเอียดผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วนใสเก็บไว้ ทำการสกัดซ้ำ จากนั้นนำสารละลายที่สกัดทั้งหมดไประเหย แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำไปชั่งน้ำหนักแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณไขมัน (Maneechote & Cheirsilp, 2021)

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ตามวิธีของ Sartory (1982) อ้างโดย (Maneechote & Cheirsilp, 2021) โดยนำตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์สาหร่ายเติมสารละลายอะซิโตนร้อยละ 90 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดตะกอนเซลล์ให้ละเอียดผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วนใสเก็บไว้ นำสารละลายใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มคำนวณปริมาณสารสี

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสาหร่ายขนาดเล็ก

ทำการสกัดสารจากสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเอทานอลร้อยละ 95 (โดยปริมาตร) อัตราส่วน 1:10 แล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บสารละลายส่วนใสใส่ขวดแล้วทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอทานอล ออกจนหมด จะได้สารสกัดเข้มข้น นำสารสกัดที่ได้มาผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย DPPH (0.5 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล) เก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรใช้เอทานอลเป็น blank และใช้ BTH เป็นสารละลายมาตรฐาน) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Choochote et al., 2014)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

จากการศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. SHP ที่แยกได้จากแหล่งน้ำในฟาร์มกุ้ง เปรียบเทียบกับ *Chlamydomonas* sp. WP1 และ *Scenedesmus* sp. WP2 ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ Bioprocess engineering โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว Modified Chu 13 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีการให้แสง 3,000 ลักซ์ พ่นอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศที่อัตราการไหล 0.02 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อเวลา ผลการทดลองแสดงดัง Figure 2 พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas* sp. WP1 และ *Scenedesmus* sp. WP2 มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วในช่วงห้าวันแรก และใกล้เคียงกันทั้งสองสายพันธุ์ ในขณะที่สาหร่าย *Chlorella* sp. SHP มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าสาหร่ายสองสายพันธุ์แรก สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอช พบว่าในช่วงวันแรกมีค่าอยู่ในช่วง 8-9 และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 10-11 ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้ HCO_3^- ที่แตกตัวมาจาก NaHCO_3 ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเจริญทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น (Poza-Carrion et al., 2001) หลังจากวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงค่าพีเอชจะเริ่มลดลงซึ่งอาจเกิดจากสาหร่ายเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase หรือมีบางเซลล์เริ่มแตก และองค์ประกอบภายในเซลล์ละลายออกมาในน้ำหมักทำให้ค่าพีเอชเริ่มลดลง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้งสามสายพันธุ์จนครบเวลา 5 วัน แล้วทำการเก็บเกี่ยวตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่ น้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) ปริมาณสารสี (pigment) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย แสดงดัง Figure 2f พบว่า *Chlamydomonas* sp. WP1 และ *Scenedesmus* sp. WP2 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงเท่ากับ 0.63 ± 0.17 และ 0.71 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า *Chlorella* sp. SHP (0.55 ± 0.15 กรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่สกัดได้จากเซลล์แห้งของสาหร่ายขนาดเล็กนี้ พบว่าสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์เป็นสาหร่ายไขมันสูง คือ มีปริมาณไขมันที่สกัดได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์ให้ปริมาณใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำมาคำนวณเป็นร้อยละของไขมัน พบว่า *Chlorella* sp. SHP มีร้อยละไขมันสูงกว่า *Chlamydomonas* sp. WP1 และ *Scenedesmus* sp. WP2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) Figure 2g แสดงปริมาณสารสี (pigments) ประกอบไปด้วย คลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll a), คลอโรฟิลล์บี (Chlorophyll b), คลอโรฟิลล์เอบี (Chlorophyll ab) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) พบว่า *Chlorella* sp. SHP มีปริมาณสารสีต่างๆ สูงกว่าสาหร่ายอีกสองสายพันธุ์ ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ไปวิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay ที่วัดค่า O.D. ที่ 517 นาโนเมตรแล้วคำนวณออกมาเป็นค่า Radical scavenging activity (%) พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP มี Radical scavenging activity สูงถึงร้อยละ 32.34 ± 0.17 ซึ่งมากกว่า *Chlamydomonas* sp. WP1 (ร้อยละ 8.47 ± 0.17) และ *Scenedesmus* sp. WP2 (ร้อยละ 7.04 ± 0.17) จึงแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Choochote et al. (2014) ที่ทำการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย *Chlorella* sp. E53 และ *Chlorella* sp. ED53 พบว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical scavenging activity) สูงถึงร้อยละ 68.18 และ 58.98 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Safafar et al. (2015) ที่พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ที่ร้อยละ 28-34 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารสีที่วัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP มีความสัมพันธ์กับค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสาหร่าย *Chlorella* หลายสายพันธุ์มีปริมาณของสารสีสูงทั้งกลุ่มคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ และมีการรายงานว่าสารกลุ่มแคโรทีนอยด์นั้นเป็นคุณสมบัติของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Markou and Nerantzis, 2013) จึงเป็นไปได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากจากสาหร่ายอาจมาจากสารสีในกลุ่มของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ ดังนั้นจึงเลือกสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP

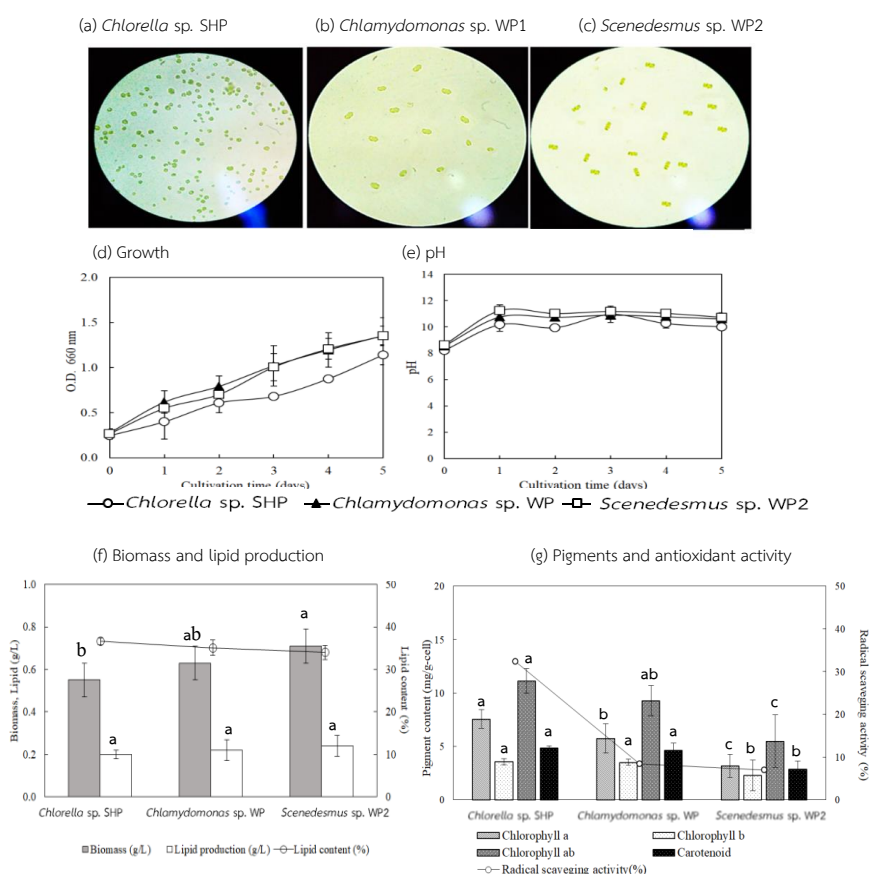


Figure 2 Screening of microalgae for biomass, lipids and pigments production. Different letters on the bars indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

การศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กในแหล่งน้ำจากฟาร์มกุ้ง

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะศึกษาการใช้ น้ำจากบ่อกุ้งเป็นอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยในฟาร์มกุ้งจะมีบ่อน้ำหลักๆ อยู่สามบ่อด้วยกันคือ บ่อพักน้ำ (Reservoir pond water, RPW) บ่อเลี้ยงกุ้ง (Shrimp pond water, SPW) และบ่อบำบัดน้ำหลังการเลี้ยงกุ้ง (Treatment pond water, TPW) ดังแสดงใน Figure 3a-c สำหรับ Table 1 แสดงค่าซีไอดี ปริมาณไนโตรเจน ความเค็ม และค่าพีเอชของน้ำจากบ่อทั้งสาม จะเห็นได้ว่าบ่อบำบัดน้ำหลังการเลี้ยงกุ้งมีสีเขียวซึ่งเป็นแหล่งที่ทำการแยกสายพันธุ์ *Chlorella* sp. SHP มีสีเขียว แสดงให้เห็นถึงความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารที่สาหร่ายสามารถใช้ในการเจริญได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่พบว่าน้ำทั้งจากบ่อบำบัดมีค่าสูงสุดที่ 8.0 ± 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าค่าซีไอดีของทั้งสามบ่อมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 51-65 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าพีเอชที่เป็นต่างในช่วง 7.73-8.03 สำหรับความเค็มพบว่าบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณเกลือสูงสุดที่ร้อยละ 2.52 ± 0.07 ในขณะที่บ่อพักน้ำและบ่อบำบัดน้ำมีปริมาณเกลือใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 2 ซึ่งการใช้ น้ำเค็มในการเลี้ยงสาหร่ายมีข้อดีคือ สามารถยับยั้งกลุ่มเชื้อโรคและ zooplankton ที่มีโอกาสปนเปื้อนเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเปิด (Bacellar Mendes and Vermelho, 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่พบว่าน้ำที่จากบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณค่า orthophosphate ที่เพียงพอต่อการเจริญของสาหร่าย (Nasir et al., 2023)

จากการศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ในตัวอย่างน้ำที่ไม่ผ่านการปรับค่าพีเอช และไม่ผ่านฆ่าเชื้อเพื่อกำหนดสภาวะในการเลี้ยงให้เหมือนสภาวะจริง ทำการศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กที่เลี้ยงในน้ำจากบ่อต่างๆ ในฟาร์มกุ้ง ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีการให้แสง 3,000 ลักซ์ ฟนอากาศด้วยเครื่องฟนอากาศที่อัตราการไหล 0.02 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที กวนด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็ว 300 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงดัง Figure 3d-g พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ที่เลี้ยงในน้ำทั้งจากบ่อบำบัดน้ำมีอัตราการเจริญเร็วที่สุดในช่วงสองวันแรกของการเลี้ยง จากนั้นจะเริ่มมีการเจริญน้อยลงในวันที่สี่ของการเลี้ยง และพบว่าค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยก่อนจะเริ่มลดลงในวันที่ 3 โดยสาเหตุที่สาหร่ายหยุดการเจริญน่าจะมาจากการขาดสารอาหารที่ต้องใช้ในการเจริญ โดยเฉพาะปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ในการสร้างเซลล์และแบ่งตัว (Yang et al., 2023) ในการศึกษาตอนต่อไปจึงศึกษาผลของการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มการเจริญของสาหร่าย หลังจากเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP จนครบระยะเวลา 5 วัน แล้วทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำทั้งจากบ่อบำบัดให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 0.24 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ($P < 0.05$) รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งและบ่อพักน้ำ ซึ่งให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.20 ± 0.02 และ 0.17 ± 0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณไขมันพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ที่เลี้ยงในตัวอย่างจากบ่อบำบัดน้ำมีร้อยละของการสะสมไขมันเท่ากับ 28.7 ดังแสดงใน Figure 3f โดยไขมันจากสาหร่ายสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ (Ruangsomboon, 2020) เมื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณสารสี พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ที่เลี้ยงในตัวอย่างน้ำทั้งจากบ่อบำบัดน้ำมีปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์สูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงจากแหล่งน้ำอีกสองแหล่งดังแสดงใน Figure 3g ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนที่สูงกว่าเนื่องจากสาหร่ายต้องใช้ไนโตรเจนในการสร้างสารสี (Yang et al., 2023) และจากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (% Radical scavenging activity) ของสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ที่เลี้ยงในน้ำทั้งจากบ่อบำบัด พบว่ามีค่าสูงถึงร้อยละ 59.55 ± 1.52

Table 1 Characterization of water from shrimp farm ponds

Water source	COD (mg/L)	Total nitrogen (mg/L)	Salinity (% NaCl w/v)	pH
Reservoir pond water	65.50 ± 5.50^a	4.00 ± 1.00^b	1.10 ± 0.83^a	7.73 ± 0.02^b
Shrimp pond water	61.50 ± 7.50^a	5.00 ± 2.00^{ab}	2.52 ± 0.07^a	7.63 ± 0.03^b
Treatment pond water	51.50 ± 18.50^a	8.00 ± 1.00^a	2.06 ± 1.00^a	8.03 ± 0.11^a

Different superscript letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

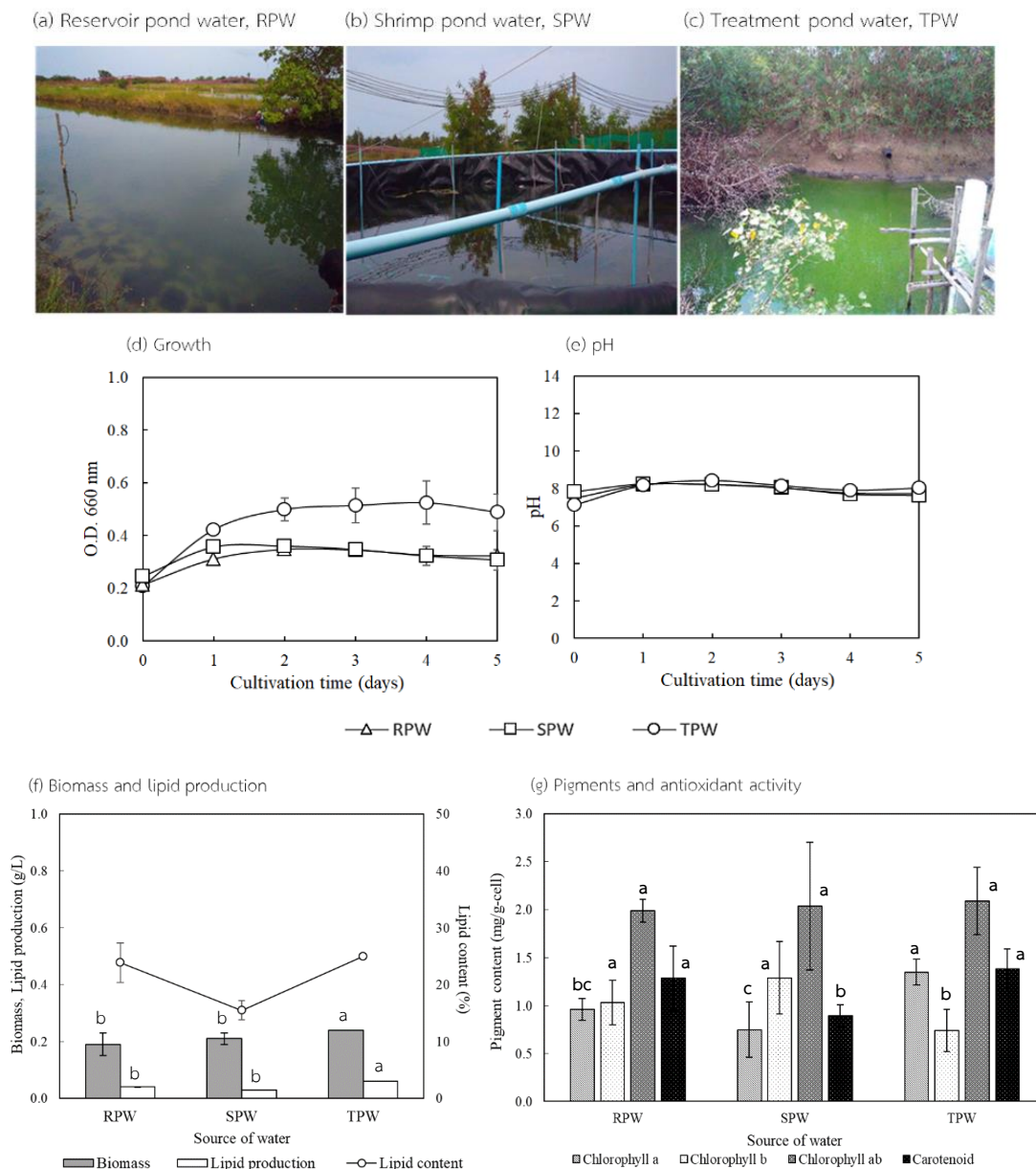


Figure 3 Cultivation of microalgae in reservoir pond water (RPW), shrimp pond water (SPW) and treatment pond water (TPW) for biomass, lipids and pigments production. Different letters on the bars indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

การศึกษาผลของการเติมยูเรียในน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

ในการทดลองนี้ศึกษาผลของการเติมยูเรียในน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กเนื่องจากยูเรียเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีราคาถูก โดยในการทดลองนี้จะทำการขยายขนาดการผลิตเป็น 1 ลิตร และเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิด ใช้แสงธรรมชาติ โดยมีชุดควบคุมที่ไม่เติมยูเรีย เปรียบเทียบกับชุดการทดลองมีการเติมยูเรียที่ความเข้มข้น 1, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดัง Figure 4 พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมยูเรียที่ 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตรให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่เติมและเติมยูเรียเพียง 1 กรัมต่อลิตรให้อัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า ส่วนค่าพีเอชพบว่ามีความสูงขึ้นเล็กน้อยในช่วงสองวันแรก จากนั้นค่าพีเอชจะเริ่มลดลงเล็กน้อยและคงที่ เมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP จนครบเวลา 6 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ที่เลี้ยงใน

น้ำที่เติมยูเรีย 2 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณน้ำหนัเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.85 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงใน Figure 4c

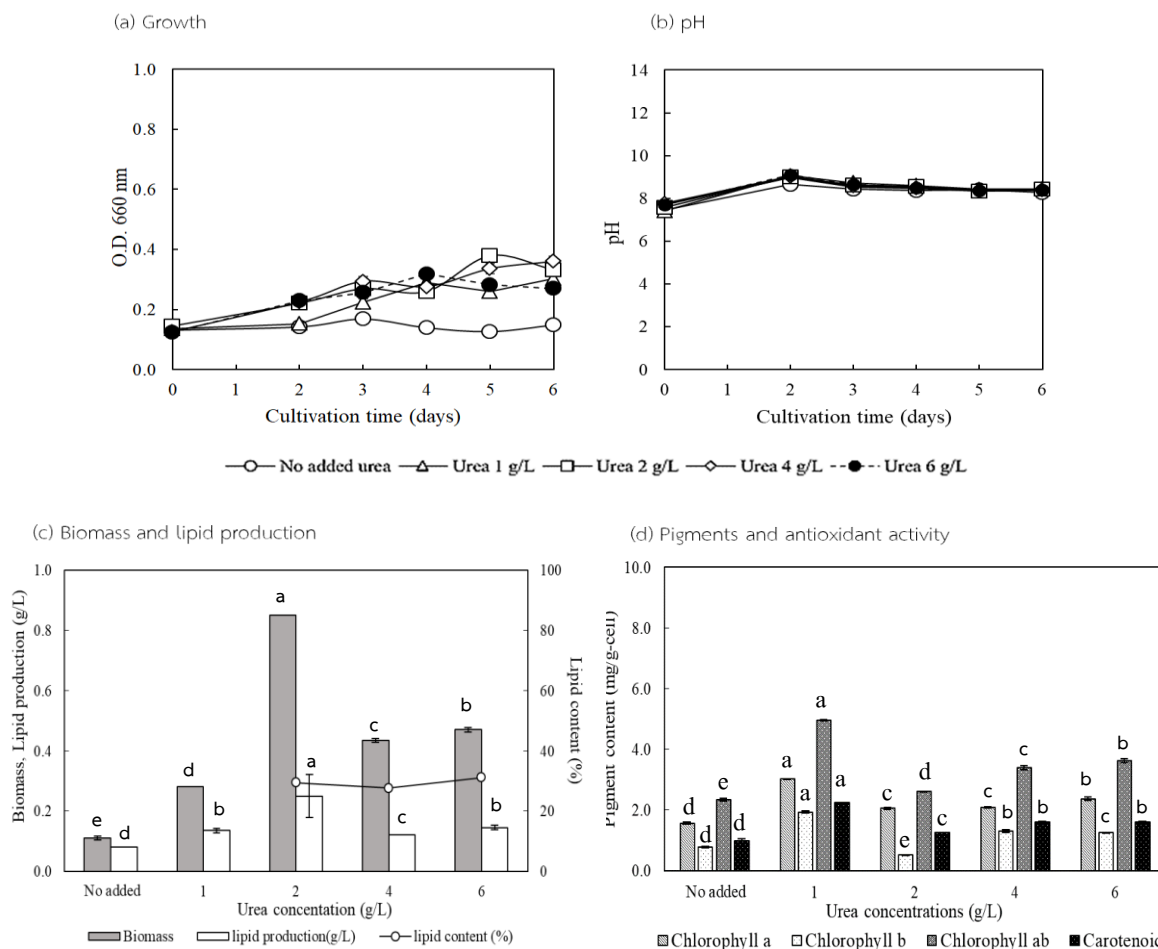


Figure 4 Effect of urea addition on biomass, lipids and pigments production. Different letters on the bars indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันพบว่าสาหร่ายจากชุดการทดลองที่เติมยูเรีย 2 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณไขมันสูงที่สุด ($P < 0.05$) และคิดเป็นร้อยละของการสะสมไขมันที่ร้อยละ 29-31 สำหรับชุดการทดลองที่ไม่เติมและเติมยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถวัดปริมาณไขมันและคำนวณร้อยละของการสะสมไขมันได้เนื่องจากมีปริมาณเซลล์แห้งน้อยเกินไปที่จะสกัดน้ำมันได้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสี พบว่าชุดการทดลองที่เติมยูเรียจะให้ปริมาณสารสีสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมยูเรีย แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมที่สุดในการเติมลงไปในตัวอย่งน้ำทิ้ง คือ 2 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำตัวอย่างสาหร่ายไปวัดฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่าให้ค่าที่สูงเช่นกัน โดยมี Radical scavenging activity เท่ากับร้อยละ 66.71 ± 0.02

การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแบบระบบเปิดในบ่อเลี้ยงจำลองที่มีระบบน้ำไหลวน

ทำการศึกษาการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ในตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดในฟาร์มกุ้งที่มีการเติมยูเรียลงไป 2 กรัมต่อลิตร ในบ่อเลี้ยงจำลองที่มีระบบน้ำไหลวน ดังแสดงใน Figure 1 โดยการเลี้ยงในสภาวะที่เป็นระบบเปิดเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้งานจริงในฟาร์มกุ้ง เพราะการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดมีข้อดี คือ เพาะเลี้ยงง่าย การบำรุงรักษาง่าย และมีค่าใช้จ่ายในการลงทุนต่ำ มีการใช้แสงจากธรรมชาติ โดยมีการใช้ปั้มน้ำขึ้นไปตามท่อน้ำด้านบนที่มีรูพ่นน้ำในตำแหน่งที่ตรงกับแต่ละช่อง เพื่อให้เกิดการไหลวนของน้ำและเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งน้ำและสาหร่ายจะถูกดูดขึ้นมาและหมุนเวียนไปเรื่อยๆ แบบนี้ สาหร่ายก็จะได้รับอากาศเพิ่มขึ้นจากการที่ไหลออกมาจากท่อลงมาด้านล่างอีกครั้งอีกทั้งทำให้เกิดการตีกวนของน้ำจากแรงดันน้ำที่ออกมาจากท่อ

ด้านบน และด้านล่างของบ่อเลี้ยงจำลองยังมีการเจาะเป็นรูตรงแผ่นกันเพื่อให้น้ำเกิดแรงดันและเกิดการไหลเวียนได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงดัง Figure 5 พบว่าค่าสาหร่ายมีการเจริญจนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และค่าพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อทำการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP จนครบระยะเวลา 7 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายที่ได้เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ที่มีอยู่ในสาหร่าย พบว่ามีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.19 ± 0.03 กรัมต่อลิตร มีปริมาณไขมันที่สูงถึงร้อยละ 44.96 ± 2.79 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอบี และแคโรทีนอยด์เท่ากับ 11.65 ± 2.50 และ 5.45 ± 0.89 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทดลองในบ่อเลี้ยงจำลองที่มีระบบไหลเวียนน้ำสามารถช่วยป้องกันการตกตะกอนของสาหร่ายระหว่างการเลี้ยงได้ แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ไม่ได้พ่นอากาศซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้ได้ปริมาณเซลล์สาหร่ายน้อยมาก

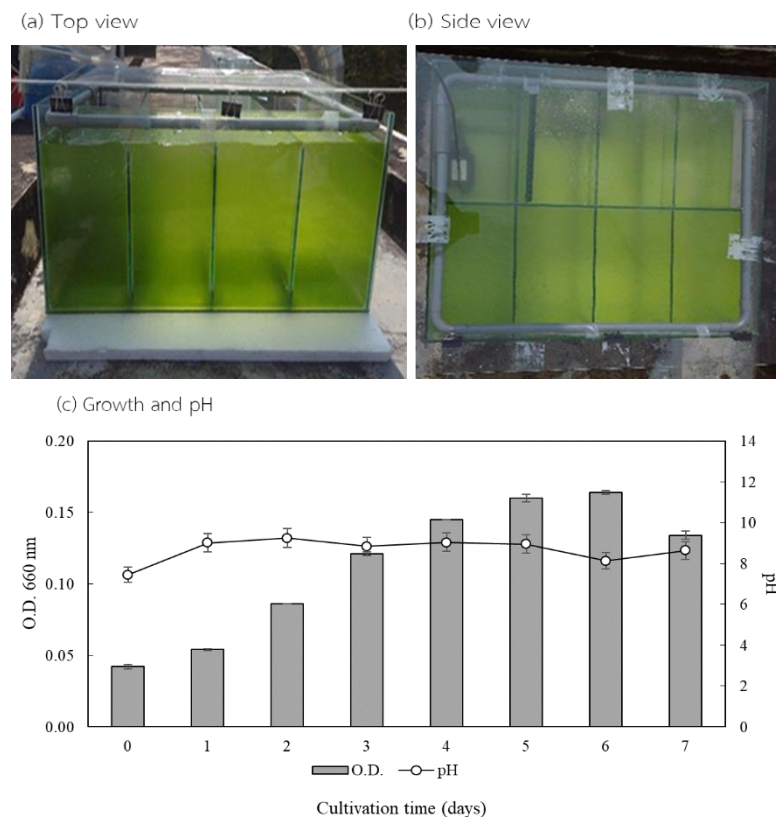


Figure 5 Microalgae cultivation mode (a) top view, (b) side view and (c) growth and pH.

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP ที่คัดแยกได้จากฟาร์มกุ้งสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดร้อยละ 59.55 ± 1.52 และพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. SHP สามารถเจริญได้ดีที่สุดในน้ำที่จางจากบ่อบำบัดในฟาร์มกุ้ง และพบว่าการเติมยูเรียที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเพิ่มขึ้นถึง 0.85 ± 0.0 กรัมต่อลิตร และมีค่า Radical scavenging activity สูงถึงร้อยละ 66.71 ± 0.02 และจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในบ่อเลี้ยงจำลองที่มีระบบน้ำไหลวนแบบระบบเปิด พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้และช่วยลดปัญหาการตกตะกอนของสาหร่ายได้ดี ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในน้ำที่จางจากบ่อบำบัดจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งให้ปริมาณไขมัน และสารสีสูงถือเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตเป็นอาหารเสริมสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมทั้งยังถือเป็นการบำบัดน้ำทิ้งและใช้ประโยชน์ของเสียอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการวิจัยถ่ายทอดเทคโนโลยี/องค์ความรู้ และนวัตกรรมจากผลการวิจัย ภายใต้ทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใต้รหัสโครงการวิจัย AGRO52-STP60

เอกสารอ้างอิง

- Bacellar Mendes, L. B., & Vermelho, A. B. (2013). Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. **Biotechnology for Biofuels**, 6, 152.
- Bhalamurugan, G. L., Valerie, O., & Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. **Environmental Engineering Research**, 23(3), 229-241.
- Brown, M. R., & Blackburn, S. I. (2013). Live Microalgae as Feeds in Aquaculture Hatcheries. In Allan, G., & G. Burnell, **Advances in Aqua-culture Hatchery**, pp. 117-157. Woodhead Publishing.
- Chaouangrit, L., Tapaneeyaworawong, P., Powtongsook, S., & Sanoamuang, L. (2018). Alternative microalgal diets for cultivation of the fairy shrimp *Branchinella thailandensis* (Branchiopoda: Anostraca). **Aquaculture International**, 26(1), 37-47.
- Choochote, W., Suklampoo, L., & Ochaikul, D. (2014). Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, 26, 43-48.
- Cichonski, J., & Chrzanowski, G. (2022). Microalgae as a source of valuable phenolic compounds and carotenoids. **Molecules**, 27(24), 8852.
- Maneechote, W., & Cheirsilp, B., (2021). Stepwise-incremental physicochemical factors induced acclimation and tolerance in oleaginous microalgae to crucial outdoor stresses and improved properties as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**, 328, 124850.
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advance**, 31, 1532-1542.
- Nasir, N. M., Jusoh, A., Harun, R., Ibrahim, N. N. L. N., Rasit, N., Ghani, W. A. W. A. K., & Kurniawan, S. B. (2023). Nutrient consumption of green microalgae, *Chlorella* sp. during the bioremediation of shrimp aquaculture wastewater. **Algal Research**, 72, 103110.
- Poza-Carrión, C., Fernández-Valiente, E., Piñas, F. F., & Leganés, F. (2001). Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain UAM206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability. **Journal of Plant Physiology**, 158(11), 1455-1461.
- Ruangsomboon, S. (2020). **Microalgae Cultivation and Utilizations**. Department of Fisheries Science, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
- Safafar, H., Van Wagenen, J., Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine Drugs**, 13(12), 7339-7356.
- Yang, R., Wang, Q., Luo, X., & Wei, D. (2023) High-efficient nitrate conversion to protein and chlorophylls from synthetic wastewater by mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa*. **Algal Research**, 71, 103025.