ผลของสายพันธุ์และสูตรอาหารต่อประสิทธิภาพการผลิตลิพิด ในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสกุล *Chlorella*

Effects of Algal Strains and Culture Media on Lipid Productivity in Green Microalgae, Genus *Chlorella*

ปติรุจ จิรกาลวงศ์[1, 2] วีระพันธุ์ สรีดอกจันทร์[3] และ อรอุมา ตนะดุลย์[1, 2, 3*]

Patiruj Jirakranwong[1, 2], Weeraphan Sridokchan[3] and Orn-u-ma Tanadul[1, 2, 3*]

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[1]Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[2]Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[3]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[3]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

**Corresponding author: Email: agromt@ku.ac.th*

(Received: 1 August 2017; Accepted: 4 December 2017)

Abstract: The effects of microalgae strains, culture media and interaction of microalgae strain and culture media were investigated on their specific growth rate, biomass yield, biomass productivity, lipid content and lipid productivity. Three strains of microalgae named 6-4, 208 and 209 were enriched in three different growth media (TAP, BG11 and N8 medium). The result showed that microalgae strain had statistically significant effect on lipid content and productivity. Microalgae strain 6-4 showed the highest lipid content 8.33% and lipid productivity 1.39 g/L/d. Culture media had significant effect on all parameter (specific growth rate, biomass, biomass productivity, lipid content and lipid productivity). TAP culture medium showed the highest specific growth rate, biomass yield and biomass productivity at 0.17 /d, 1.11 g/L and 0.12 g/L/d, respectively. However, the lipid content and lipid productivity from microalgae culturing by TAP and BG11 were not statistically significant difference. The interaction of microalgae strain and culture media were statistically significant effect on specific growth rate, lipid content and lipid productivity. Microalgae strain 6-4 culturing in TAP media showed the highest lipid content 10.55% and lipid productivity 1.76 g/L/d. Due to the fact that lipid productivity is a key factor for biofuel production therefore microalgae strain 6-4 culturing in TAP medium should be considered.

Keywords: Culture media, microalgae, lipid productivity

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: การทดสอบอิทธิพลของสายพันธุ์สาหร่าย สูตรอาหารเพาะเลี้ยง และปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลผลิตชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิด โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 6-4, 208 และ 209 ในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ TAP, BG11และ N8 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์สาหร่ายมีผลต่อปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ผลิตลิพิดได้สูงสุดที่ 8.33 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพการผลิตลิพิด 1.39 กรัมต่อลิตรต่อวัน สูตรอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อทุกตัวแปร (อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลผลิตชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิด) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารสูตร TAP ทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล และประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลสูงที่สุดเท่ากับ 0.17 ต่อวัน 1.11 กรัมต่อลิตร และ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม ปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร TAP และ BG11 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร TAP มีปริมาณลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 10.5 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพการผลิตลิพิด 1.76 กรัมต่อลิตรต่อวัน เนื่องจากประสิทธิภาพการผลิตลิพิดเป็นปัจจัยหลักในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ดังนั้นสาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร TAP ควรได้รับการพิจารณา

คำสำคัญ: สูตรอาหารเพาะเลี้ยง สาหร่ายขนาดเล็ก ประสิทธิภาพการผลิตลิพิด

คำนำ

ปัจจุบันได้มีการนำพลังงานจากฟอสซิลมาใช้เป็นจำนวนมากจึงมีการคาดการณ์ว่าในอนาคตนั้นจะเกิดวิกฤติทางด้านพลังงานขึ้น จึงมีการหาพลังงานอื่น ๆ มาทดแทน เช่นพลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงานความร้อนใต้พิภพ และพลังงานจากเชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กนั้นถูกจัดว่าเป็นแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพในยุคที่ 3 รองจากพืชอาหารที่ให้แป้ง น้ำตาล และน้ำมันในยุคที่หนึ่ง และแหล่งวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส เช่น หญ้าและไม้โตเร็ว และเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในยุคที่สอง เหตุผลหลักที่สาหร่ายถูกพัฒนาให้มาแทนที่เชื้อเพลิงชีวภาพในยุคที่ 1 และ 2 นั้น เนื่องจากหนึ่งสาหร่ายที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนไม่ใช่พืชอาหารของมนุษย์จึงสามารถแก้ปัญหาราคาพืชอาหารที่สูงขึ้น และการขาดแคลนพืชอาหารได้ และสองสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำกร่อย หรือแม้กระทั่งในน้ำเสียจึงทำให้ลดปัญญาการแก่งแย่งพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์และน้ำในการผลิตไม้หรือหญ้าโตเร็วดังเช่นการผลิตวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสในยุคที่ 2 ได้ นอกเหนือจากนี้สาหร่ายขนาดเล็กนั้นยังสามารถดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใช้ในการเจริญเติบโตจึงเป็นการช่วยลดสภาวะโลกร้อนได้อีกด้วย

สาหร่ายขนาดเล็กถือเป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีศักยภาพในการแทนที่เชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมได้ ซึ่งแตกต่างกับพืชน้ำมันชนิดอื่น เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สาหร่ายบางสายพันธุ์สามารถเพิ่มชีวมวลได้ถึง 2 เท่า ภายในเวลา 24 ชั่วโมง สาหร่ายสะสมน้ำมันได้ 20-50% ของน้ำหนักแห้ง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Chisti, 2007) สาหร่ายมีช่วงอายุการเจริญเติบโตที่สั้น เก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลายครั้งในหนึ่งปี ทำให้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ได้จากพืชพลังงานอื่น ๆ กับสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่า น้ำมันที่ได้จากพืชพลังงานนั้นจะมีปริมาณที่น้อยกว่าน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก ยกตัวอย่างเช่น ปาล์มน้ำมันให้น้ำมันได้ 5,950 ลิตรต่อเฮกตาร์ ในขณะที่สาหร่ายขนาดเล็กให้น้ำมันสูงถึง 58,700-136,900 ลิตรต่อเฮกตาร์ (Chisti, 2007) ปัจจัยหลักสำหรับการผลิตไบโอดีเซลนอกเหนือจากสายพันธุ์สาหร่ายแล้ว ประสิทธิภาพการผลิตลิพิดนับว่าเป็นลักษณะที่สำคัญอย่างยิ่ง (Griffiths and Harrison, 2009) ซึ่งประสิทธิภาพการผลิตลิพิดจะขึ้นอยู่กับปริมาณลิพิดที่สาหร่ายสามารถสะสมได้ และผลผลิต

ชีวมวล ซึ่งพารามิเตอร์ทั้งสองนี้จะผันแปรตามปริมาณธาตุอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วย (Mata *et al*., 2010; Pittman *et al*., 2011) โดยทั่วไปแล้วสาหร่าย *Chlorella* sp. มักจะใช้อาหารสูตร BG11 ในการเพาะเลี้ยง (Leu and Lin, 2013) อย่างไรก็ตาม Sharma *et al*., (2016) เลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella* sp. 1 และ *Chlorella* sp. 2 ด้วยอาหารสูตร BG11, BBM, Fog และ M4N พบว่าอาหารสูตร BG11 นั้นเป็นสูตรอาหารที่ประหยัดและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดสำหรับ *Chlorella* sp. Hamedi *et al*. (2012) รายงานว่าอาหารสูตร N8 นั้นทำให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ผลิตน้ำมันได้ในปริมาณที่สูง ในขณะที่ Miazek *et al*. (2014) รายงานว่า *Chlorella sorokiniana* ที่เลี้ยงในอาหาร TAP มีอัตราการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตชีวมวลที่สูง

จะเห็นได้ว่าไม่มีสูตรอาหารใดที่จำเพาะเจาะจงกับสาหร่ายสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับสาหร่ายก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์สาหร่าย สูตรอาหาร และปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลผลิตชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดในสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp.

อุปกรณ์และวิธีการ

สายพันธุ์ สูตรอาหาร และการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 6-4 ที่คัดเลือกได้จากอำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี สายพันธุ์ 208 และ 209 ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ขนาด 700 มิลลิลิตร ด้วยอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร Tris Acetate Phosphate; TAP (Harris, 1989) อาหารสูตร BG11 (blue-green medium) (Stanier *et al*., 1971) และ อาหารสูตร N8 (Mandalam and Palsson, 1998) ในสภาวะให้แสง 16 ชั่วโมง และมืด 8 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยการหาน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 1) ทุกวันเป็นเวลานาน 7 วัน คำนวณน้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดังสมการ 1 และ 2

น้ำหนักแห้ง (g/L) = น้ำหนักกระดาษกรองและเซลล์ (g) - น้ำหนักกระดาษกรอง (g)
-----สมการที่ 1

ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ = $(\ln X2 - \ln X1) / t$
-----สมการที่ 2

เมื่อ $X1$ และ $X2$ คือ น้ำหนักแห้งในวันแรกและวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ

t คือ จำนวนวันของการเพาะเลี้ยง

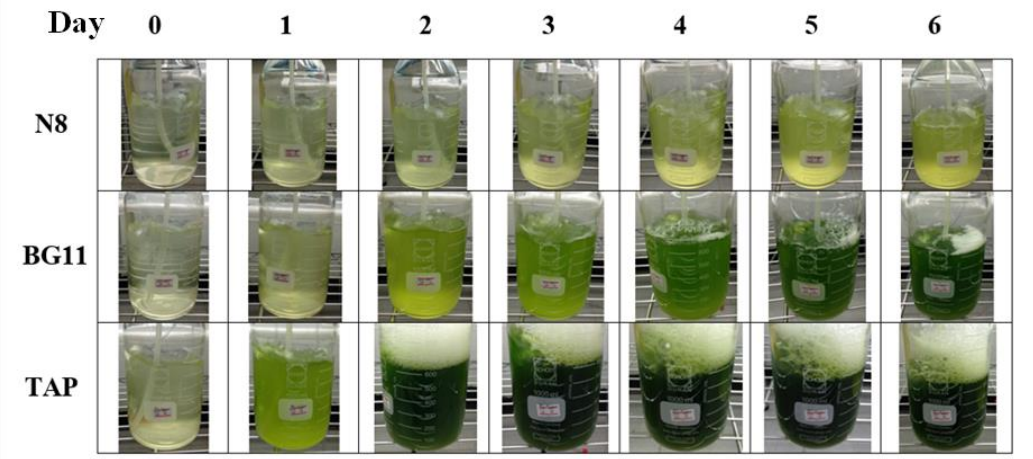

Figure 1. Growth of microalgae strain 6-4 when grown in N8, BG11 and TAP media from day 0 to day 6 of culturing

การเก็บเกี่ยวสาหร่าย และสกัดลิพิด

เก็บเกี่ยวสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที ล้างตัวอย่างสาหร่ายด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer สกัดลิพิดตามวิธีที่รายงานโดย ผกามาศ และคณะ (2560) โดยนำตัวอย่างสาหร่ายที่ทำให้แห้งด้วย freeze dryer ปริมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสาร folch solvent (คลอโรฟอร์ม : เมทานอล; 2:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้สารผสมกัน จากนั้นนำเข้าเครื่องอัลตราโซนิค ที่ความถี่ 20 kHz ระดับพลังงานที่ 40 วัตต์ ระยะเวลา 10 นาที จำนวนหลอดละ 4 รอบ จากนั้นเติม 0.9% โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมสารด้วยเครื่อง vortex นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนที่ใส ที่ความเร็ว 5000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการดูดของเหลวชั้นล่างสุดเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณลิพิด

การวิเคราะห์ลิพิด

วิเคราะห์ปริมาณลิพิดตามวิธีที่รายงานโดย Tanadul *et al*. (2014) โดยนำตัวอย่างลิพิดที่ได้จากการสกัดลิพิดด้วยเครื่องอัลตราโซนิคปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน PCR plate ตัวอย่างละสามหลุม และหยด lipid standards ความเข้มข้น 2 มิลลิตรกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 3 หลุมเช่นกัน จากนั้นทำการระเหยสาร folch solvent ออกจากตัวอย่างด้วย heating block ที่ 90 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวอย่างจะแห้ง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วย multiple pipette ผสมสารให้เข้ากันจำนวน 10 ครั้ง จากนั้นนำไปใส่ใน heating block ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer-plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หลังจากนั้นเติมกรดวานิลลิน-ฟอสโฟริก ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจำนวน 5 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรอีกหนึ่งครั้ง ทำการคำนวณหาปริมาณลิพิดโดยการหักลบของค่าการดูดกลืนแสงก่อนเติมกับค่าการดูดกลืนแสงหลังกรดวานิลลิน-ฟอสโฟริกจะได้เป็นค่าการดูดกลืนแสงสุทธิแทนค่าลงในสมการเส้นตรง lipid standard

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial in CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่หนึ่งคือสายพันธุ์สาหร่าย จำนวน 3 สายพันธุ์ และปัจจัยที่สองคือสูตรอาหารจำนวน 3 สูตร วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้วิธี analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม R (package agricolae) จากผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลผลิตชีวมวล และประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 6-4, 208 และ 209 ในอาหาร 3 สูตร คือ อาหารสูตร TAP, BG11 และอาหารสูตร N8 (ภาพที่ 1) และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตด้วยวิธีหาน้ำหนักแห้งดังภาพที่ 2 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลของสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.09-0.12 ต่อวัน 0.56-0.69 กรัมต่อลิตร และ 0.05-0.06 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) (ตารางที่ 1)

อย่างไรก็ตาม พบว่าสูตรอาหารทั้งสามสูตรมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลของสาหร่ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอาหารสูตร TAP มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดที่ 0.17 ต่อวัน มีผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลสูงที่สุดที่ 1.11 กรัมต่อวัน และ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) อาหารสูตร BG11 มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

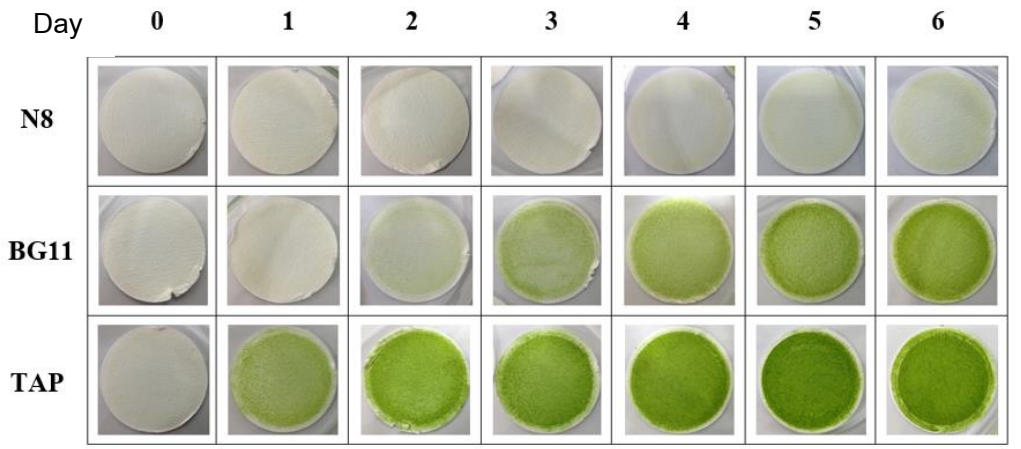

Figure 2. Biomass determination of microalgae strain 6-4 when grown in N8, BG11 and TAP media from day 0 to day 6 of culturing

Table 1. Effect of algal strains, media and interaction of algal strains and media on specific growth rate, biomass yield, biomass productivity, lipid content and lipid productivity

Treatment	Specific growth rate (/d)	Biomass yield (g/L)	Biomass productivity (g/L/d)	Lipid content (%)	Lipid productivity (g/L/d)
St.					
6-4	0.12 ± 0.08	0.69 ± 0.50	0.06 ± 0.01	8.33 ± 2.11^{a}	1.39 ± 0.35 ^{a}
208	0.10 ± 0.08	0.56 ± 0.36	0.05 ± 0.01	6.95 ± 2.07^{b}	1.15 ± 0.34 ^{b}
209	0.09 ± 0.04	0.59 ± 0.36	0.05 ± 0.01	3.16 ± 0.78^{c}	0.52 ± 0.13 ^{c}
F test	NS	NS	NS	***	***
Med.					
TAP	0.17 ± 0.04 ^{a}	1.11 ± 0.27^{a}	0.12 ± 0.04 ^{a}	6.09 ± 3.43^{ab}	1.01 ± 0.57^{ab}
N8	0.04 ± 0.02 ^{c}	0.38 ± 0.04^{b}	0.01 ± 0.00 ^{b}	5.70 ± 2.86^{b}	0.95 ± 0.47^{b}
BG11	0.10 ± 0.07 ^{b}	0.36 ± 0.09^{b}	0.03 ± 0.01 ^{b}	6.66 ± 2.23^{a}	1.10 ± 0.37^{a}
F test	***	***	***	*	*
St.*Med.					
6-4*TAP	0.15 ± 0.04^{ab}	1.28 ± 0.47	0.13 ± 0.07	10.55 ± 1.23^{a}	1.76 ± 0.20^{a}
6-4*N8	0.03 ± 0.01^{c}	0.40 ± 0.03	0.01 ± 0.00	6.02 ± 0.40^{c}	1.00 ± 0.06^{c}
6-4*BG11	0.18 ± 0.08^{a}	039 ± 0.06	0.04 ± 0.01	8.41 ± 0.91^{b}	1.40 ± 0.15^{b}
208*TAP	0.20 ± 0.06^{a}	1.04 ± 0.08	0.12 ± 0.03	4.31 ± 0.29^{d}	0.72 ± 0.04^{d}
208*N8	0.05 ± 0.03^{c}	0.37 ± 0.06	0.02 ± 0.01	8.78 ± 0.64^{b}	1.46 ± 0.10^{b}
208*BG11	0.04 ± 0.01^{c}	0.27 ± 0.05	0.01 ± 0.00	7.77 ± 0.57^{b}	1.29 ± 0.09^{b}
209*TAP	0.15 ± 0.00^{ab}	1.01 ± 0.09	0.10 ± 0.00	3.41 ± 0.39^{de}	0.56 ± 0.06^{de}
209*N8	0.04 ± 0.01^{c}	0.36 ± 0.02	0.01 ± 0.00	2.29 ± 0.63^{e}	0.38 ± 0.10^{e}
209*BG11	0.09 ± 0.00^{bc}	0.40 ± 0.09	0.03 ± .000	3.79 ± 0.20^{d}	0.63 ± 0.03^{d}
F test	*	NS	NS	***	***

Data in the column followed by different letter are significantly different based on Duncan's multiple range test

*Significant difference at (P< 0.05); **Significant difference at (P< 0.01); ***Significant difference at (P< 0.001)

เท่ากับ 0.10 ต่อวัน ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตร N8 ที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.04 ต่อวัน และจะเห็นได้ว่าทั้งอาหารสูตร N8 และ BG11 ให้ผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลของสาหร่ายไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร TAP นอกจากจะได้รับพลังงานจากแสงแล้วยังได้รับพลังงานจากอะซิเตทซึ่งเป็นแหล่งพลังงานจากคาร์บอนแหล่งหนึ่งจึงทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและสะสมชีวมวลได้มากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG11 และ N8 สอดคล้องกับรายงานของ Miazek *et al*. (2014) ที่เติมอะซิเตท 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงและพบว่า *Chlorella sorokiniana* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นถึง 3.6 เท่า

เมื่อพิจารณาถึงปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดังตารางที่ 1 พบว่าสายพันธุ์สาหร่ายมีปฏิสัมพันธ์กับสูตรอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ สาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ที่เลี้ยงในอาหาร TAP และ BG11และสาหร่ายสายพันธุ์ 208 และ 209 ที่เลี้ยงในอาหาร TAP มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.15, 0.18, 0.20 และ 0.15 ต่อวัน (ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตร TAP เหมาะแก่การเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาถึงปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารที่มีผลต่อผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล พบว่า มีผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารไม่มีผลต่อผลผลิตชีวมวล และประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล (ตารางที่ 1)

ผลของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารต่อปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิด

นอกเหนือจากการเจริญเติบโตที่เร็ว และการสะสมชีวมวลที่สูงแล้วนั้น การสะสมลิพิดในเซลล์สาหร่ายและประสิทธิภาพการผลิตลิพิดนับเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งปัจจัยหนึ่งสำหรับการใช้สาหร่ายเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล พบว่า สายพันธุ์สาหร่าย สูตรอาหาร และปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารมีผลต่อปริมาณลิพิดและประสิทธิภาพการผลิตลิพิดในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังตารางที่ 1 กล่าวคือ สาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 มีปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 8.33 เปอร์เซ็นต์ และ 1.39 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) รองมาคือสายพันธุ์ 208 เท่ากับ 6.95 เปอร์เซ็นต์ และ 1.15 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) และสายพันธุ์ 209 มีปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดต่ำที่สุดเท่ากับ 3.16 เปอร์เซ็นต์ และ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) และพบว่า ปัจจัยของสูตรอาหารยังมีผลต่อปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ อาหารสูตร BG11 มีผลทำให้สาหร่ายผลิตลิพิด และมีประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงกว่าอาหารสูตร N8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหาร พบว่าปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารมีผลต่อปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร TAP มีปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงที่สุดเท่ากับ 10.55 เปอร์เซ็นต์ และ 1.76 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) รองมาคือสาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG11 และสาหร่ายสายพันธุ์ 208 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร N8 และ BG11 Wang *et al*. (2014) พบว่าสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F-Si ให้อัตราการเจริญเติบโต และการสะสมลิพิดสูง Gour *et al*. (2014) เลี้ยง *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda* และ *Scenedesmus dimorphus* ในอาหารสูตรต่าง ๆ และพบว่าสาหร่ายทั้งสามสายพันธุ์เจริญเติบโต และสะสมลิพิดได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 ที่เติมยูเรีย 0.1% เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร BG11 ปกติ และได้สรุปว่า สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนจากยูเรียได้ดี Sharma *et al*. (2016) วิเคราะห์ผลผลิตชีวมวล และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดของสาหร่าย *Chlorella* sp. จำนวนห้าสายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG11, BBM Fog และ M4N พบว่าโดยรวมอาหารสูตร BG11 เป็นสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพทั้งทางด้านการให้ผลผลิตและต้นทุน และพบว่า *Chlorella vulgaris* มีปริมาณลิพิดและประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงสุดเท่ากับ 15.57% และ 0.012 กรัมต่อลิตรต่อวัน (ตามลำดับ) เมื่อเลี้ยงในอาหาร

สูตร BBM แต่เมื่อเติมกลีเซอรอล 14.13 มิลลิโมลาร์ในอาหาร พบว่า *C. vulgaris* สามารถเพิ่มปริมาณลิพิดและประสิทธิภาพการผลิตลิพิดเป็น 24.32% และ 0.05 กรัมต่อลิตรต่อวัน และสรุปว่าประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมกลีเซอรอล เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าสายหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร TAP มีปริมาณลิพิดเท่ากับ 10.55% แต่มีประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงสุดถึง 1.76 กรัมต่อลิตรต่อวัน แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ 6-4 ยังมีการสะสมลิพิดที่ต่ำ ซึ่งสามารถพัฒนาได้หลายวิธี เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยการก่อการกลายพันธุ์ให้มีการสร้างลิพิดเพิ่มขึ้น การเพิ่มแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในอาหาร หรือการสร้างสภาวะเครียดให้แก่สาหร่ายโดยการกำจัดธาตุอาหาร เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ต้นทุนในการผลิตถือเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การเลือกสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนอินทรีย์เป็นส่วนประกอบอาจจะทำให้ต้นทุนในการเลี้ยงสาหร่ายเพิ่มขึ้น การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ชนิดอื่นที่มีราคาถูกกว่า หรือการนำอาหารกลับมาใช้ใหม่ในระบบการเพาะเลี้ยงควรได้รับพิจารณา

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ 6-4, 208 และ 209 ในอาหารสามสูตรได้แก่ TAP, N8 และ BG11 พบว่า สายพันธุ์สาหร่ายมีผลต่อปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 มีปริมาณลิพิดและประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงที่สุด รองมาคือสายพันธุ์ 208 และ 209 (ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาถึงสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พบว่า สูตรอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล ปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารสูตร TAP ทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลสูงที่สุด และอาหารสูตร BG11 ทำให้สาหร่ายมีปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล และประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสาหร่ายสายพันธุ์ 6-4 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร TAP มีปริมาณลิพิด และประสิทธิภาพการผลิตลิพิดสูงที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนอุดหนุนวิจัยพืชไร่นา 2561 ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย ขอขอบคุณ รศ.ดร. นิรันดร์ จันทวงศ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สาหร่ายในการทดลอง ผศ.ดร. ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกเข็ง และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ผกามาศ ชิดเชื้อ ปติรุจ จิรกาลวงศ์ และ อรอุมา ตนะดุลย์. 2560. วิธีการทำให้เซลล์แตกเพื่อการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก. วารสารเกษตร 33(2): 185-191.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25(3): 294-306.

Gour, R.S., A. Kant and R.S. Chauhan. 2014. Screening of microalgae for growth and lipid accumulation properties. Journal of Algal Biomass Utilization 5(1): 38-46.

Griffiths, M.J. and S.T.L. Harrison. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology 21(5): 493-507.

Hamedi, S., M.A. Mahdavi and R. Gheshlaghi. 2012. Lipid content and biomass production *of Chlorella vulgaris* is affected by growth

conditions. pp. 65-68. *In*: Proceeding of the Second Iranian Conference on Renewable Energy and Distributed Generation. IEEE, Tehran.

Harris, E.H. 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, San Diego, 780 p.

Leu, J.Y and Y.H. Lin. 2013. Optimization of nutritional compositions of growth medium for *Chlorella* sp. FJ3 growth kinetics in batch and continuous-flow photoreactors. Environmental Technology 34(20): 2841-2851.

Mandalam, R.K. and B.O. Palsson. 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. Biotechnology and Bioengineering 59(5): 605-611.

Mata, T.M., A.A. Martins and N.S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14(1): 217-232.

Miazek, K., D. Goffin, A. Richel and C. Remacle. 2014. Growth of Chlorella in the presence of organic carbon: a photobioreactor study. *In*: Proceeding of International Procesni Technika, Prague, Czech Republic, pp. 5-10.

Pittman, J.K., A.P. Dean and O. Osundeko. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technology 102(1): 17-25.

Sharma, A.K., P.K. Sahoo, S. Singhal and A. Patel. 2016. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. 3 Biotech 6(2): 116. doi: 10.1007/s13205-016-0434-6.

Stanier, R.Y., R. Kunisawa, M. Mandel and G. Cohen-Bazire. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). Bacteriological Reviews 35(2): 171-205.

Tanadul, O., J.S. van der Gheynst, D.M. Beckles, A.L.T. Powell and J.M. Labavitch. 2014. The impact of elevated CO_2 concentration on the quality of algal starch as a potential biofuel feedstock. Biotechnology and Bioengineering 111(7): 1323-1331.

Wang, W., F. Han, Y. Li, Y. Wu, J. Wang, R. Pan and G. Shen. 2014. Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors. Bioresource Technology 170: 395-403.