

# วิธีการทำให้เซลล์แตกเพื่อการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก

## Cells Disruption Methods for Lipid Extraction from Microalgae

ผกามาศ ชิดเชื้อ<sup>1</sup> ปติรุจ จิรกาลวงศ์<sup>3,4</sup> และ อรรอุมา ตนะดุลย์<sup>2,3,4\*</sup>

Phakamat Chitchuea<sup>1</sup>, Patiruj Jirakranwong<sup>3,4</sup> and Orn-u-ma Tanadul<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

<sup>1</sup>Program in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup>ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

<sup>2</sup>Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>3</sup>ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

<sup>3</sup>Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>4</sup>ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>4</sup>Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

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

(Received: 7 November 2016; Accepted: 9 February 2017)

**Abstract:** The efficiency of cell disruption methods was tested either in a single-step or in a two-step disruption. Single-step disruption included bead vortexing (B), microwave (M) and ultrasonic (U) whereas two-step disruption included microwave and bead vortexing (MB), microwave and ultrasonic (MU) and ultrasonic and bead vortexing (UB) by using an extraction mixture of chloroform and methanol (2:1). The results showed that isolate of microalgae, disruption method and interaction of those factors had significant effect on lipid content at 95% confident interval. The lipid content from microalgae Isolate A were 9.35, 8.32, 8.09, 8.93, 8.04 and 7.90%, while lipid content of microalgae Isolate B were 6.45, 9.00, 8.65, 7.22, 8.08 and 5.81% when microalgal cells were disrupted by B, M, U, MB, MU and UB method, respectively. This study showed that lipid content obtained from single-step disruption was higher than the two-step method from both isolates of microalgae. Cells disruption method by beads (B) was suitable for lipid extraction from microalgae Isolate A in order to obtain high lipid content and time saving. However, microwave (M) method was the most suitable for microalgae isolate B because it yielded high oil content simple, convenient, fast and safe method.

**Keywords:** Cell disruption, microalgae, lipid

**บทคัดย่อ:** ทดสอบประสิทธิภาพวิธีทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วยวิธีแบบขั้นตอนเดียว ได้แก่ bead vortexing (B), microwave (M) และวิธีการ ultrasonic (U) และทำให้เซลล์แตกแบบสองขั้นตอน ได้แก่ microwave และ bead vortexing (MB), microwave และ ultrasonic (MU) และวิธีการ ultrasonic และ bead vortexing (UB) โดยใช้สารสกัดที่เป็นส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล (2:1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์สาหร่าย วิธีทำให้เซลล์แตก และปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์สาหร่ายและวิธีทำให้เซลล์แตกมีผลต่อปริมาณของน้ำมันที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ปริมาณน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายไอโซเลท A มีค่าเท่ากับ 9.35, 8.32, 8.09, 8.93, 8.04 และ 7.90% ขณะที่สาหร่ายไอโซเลท B ให้ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 6.45, 9.00, 8.65, 7.22, 8.08 และ 5.81% เมื่อใช้วิธีการ B, M, U, MB, MU และวิธี UB ตามลำดับ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการทำให้เซลล์แตกแบบขั้นตอนเดียวให้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าการทำให้เซลล์แตกแบบสองขั้นตอนจากสาหร่ายทั้งสองไอโซเลท การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเม็ดปิด (B) เป็นวิธีการที่เหมาะสมแก่การนำไปใช้สกัดน้ำมันจากสาหร่ายไอโซเลท A เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำมันสูงและประหยัดเวลาในการสกัด อย่างไรก็ตามการใช้ไมโครเวฟเป็นวิธีที่เหมาะสมกับสาหร่ายไอโซเลท B เพราะนอกจากให้น้ำมันสูงและยังเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็วและปลอดภัย

**คำสำคัญ:** การทำให้เซลล์แตก สาหร่ายขนาดเล็ก น้ำมัน

## คำนำ

นอกเหนือจากการนำสาหร่ายไปใช้ในการเลี้ยงไก่ไข่ (มนัสนันท์ และคณะ, 2558) ในปัจจุบันสาหร่ายได้รับความนิยมจากนักวิจัยในการนำมาเป็นส่วนประกอบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสำหรับอนาคต รองมาจากข้าวโพดและถั่วเหลือง เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กนั้นสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น (รัตนภรณ์, 2555) เพราะเลี้ยงได้ง่าย สามารถผลิตเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ (Sheehan *et al.*, 1998, Scragg *et al.*, 2003) ปริมาณน้ำมันที่ได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์และสภาวะในการเพาะเลี้ยง ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงก็มีด้วยกันหลายรูปแบบ ได้แก่ การเลี้ยงแบบให้แสงและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และการเลี้ยงแบบให้แสงและสารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (Chisti, 2007)

วิธีการทำให้เซลล์แตกเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันอย่างยิ่ง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของผนังเซลล์ โดยส่วนใหญ่ผนังเซลล์จะประกอบด้วยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต บางชนิดประกอบด้วยซิลิเกต (silicate) โปรตีน ไชมัน มิวโคเพปไทด์ (mucopolypeptide)

และเซลลูโลส (cellulose) เป็นต้น โดยสาหร่ายบางชนิดมีผนังเซลล์ 2 ชั้น บางชนิดไม่มีผนังเซลล์ มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (plasmalemma) ที่ประกอบด้วยสารโปรตีนที่เรียกว่า "เพลลิเคิล (pellicle)" บางชนิดมีเปลือกหุ้มเซลล์หรือลอรिका (lorica) (สรวิศ, 2543) จะเห็นได้ว่าสาหร่ายนั้นมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นหากเลือกใช้วิธีทำให้เซลล์แตกที่เหมาะสมกับลักษณะโครงสร้างของเซลล์สาหร่ายแล้วจะทำให้สามารถสกัดน้ำมันซึ่งอยู่ในเซลล์ออกมาได้ในปริมาณมาก และไม่ค่าใช้จ่ายเกินความจำเป็น ซึ่งวิธีการทำให้เซลล์แตกสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ตัวทำละลายในการสกัด (superior solvent extraction method) การใช้คลื่นเสียงกระตุ้นให้เกิดการสั่น (ultrasonic) การใช้คลื่นรังสีไมโครเวฟ (microwave) การใช้เม็ดปิดบีบอัดเซลล์ (bead vortexing) การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (enzymatic extraction) และการใช้เทคนิคออสโมซิสโดยอาศัยความต่างของความดัน (osmotic shock) เป็นต้น (Ranjith Kumar *et al.*, 2015) ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาวิธีการทำให้เซลล์แตกที่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากจังหวัดราชบุรี ซึ่งมีลักษณะโตไว และสะสมชีวมวลได้สูง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### สายพันธุ์สาหร่าย สภาวะการเจริญเติบโตและการเตรียมตัวอย่าง

เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. จำนวน 2 ไอคอสเลท ที่เก็บตัวอย่างจากบึงในตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2558 และคัดแยกในห้องปฏิบัติการ ให้ชื่อเป็นไอโคสเลท A และ B นำมาเพาะเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว ด้วยอาหารสูตร TAP (Harris, 1989) ใน bioreactor ขนาด 700 มิลลิลิตร ในสภาวะให้แสงด้วยหลอด fluorescent ชนิด cool white ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บเกี่ยวสาหร่ายโดยการปั่นเหวี่ยง นำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dry) ซึ่งตัวอย่างสาหร่ายปริมาณ 20 มิลลิกรัม ลงใน conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เติม Folch solvent (chloroform: methanol; 2:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสกัดน้ำมันด้วยวิธีการต่าง ๆ จากนั้นเติม 0.9% NaCl 1.2 มิลลิลิตร ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และเก็บของเหลวส่วนล่างไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันตามวิธีที่รายงานโดย Tanadul *et al.* (2014)

### วิธีการทำให้เซลล์สาหร่ายแตก

ทำให้เซลล์แตกแบบขั้นตอนเดียว 3 วิธี ได้แก่ bead vortexing (B), microwave (M), ultrasonic (U), และทำให้เซลล์แตกแบบสองขั้นตอน 3 วิธี ได้แก่ microwave และ bead vortexing (MB), microwave และ ultrasonic (MU) และวิธี ultrasonic และ bead vortexing (UB) ซึ่งมีรายละเอียดแต่ละวิธีดังนี้

ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี B นำเม็ดบีด (glass bead) จำนวน 110 เม็ดใส่ลงในตัวอย่างที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นนำไป vortex (Vortex Mixer, KMC-1,300V, 200V/50Hz) ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำเม็ดบีดออกและทำการสกัดน้ำมันต่อไป การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Mให้นำตัวอย่างสาหร่ายเข้า microwave (Samsung, ME711K 800W 20L) โดยใช้กำลังไฟฟ้าที่ 300 วัตต์ เป็นเวลา 3

วินาที จำนวน 20 ครั้ง และทำการสกัดน้ำมันต่อไป การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี U นำตัวอย่างเข้าเครื่อง ultrasonic (Omni-Ruptor 4,000, 20 kHz) ที่มีความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ ที่ความแรง 40 วัตต์ pulse 40% เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง และทำการสกัดน้ำมันต่อไป

ส่วนการทำให้เซลล์แตกแบบสองขั้นตอนมีวิธีการทำเหมือนการสกัดแบบขั้นตอนเดียวแต่ทำเพิ่มอีกหนึ่งขั้นตอนตามชื่อของแต่ละวิธี จากนั้นนำตัวอย่างไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

### การวิเคราะห์น้ำมันจากเซลล์สาหร่าย

ใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้จากวิธีการข้างต้นลงใน polypropylene flat bottom microplate 30 ไมโครลิตร และหยอด lipid standards ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน plate ปริมาณ 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการระเหย Folch solvent ออกจากตัวอย่างด้วย heating block ที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เมื่อทำการระเหยสารละลายครบกำหนดเวลาแล้ว เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. sulfuric acid) 100 ไมโครลิตร แล้วผสมสารให้เข้ากันด้วย pipette ขึ้นและลง 10 ครั้ง จากนั้นนำใส่ลงใน heating block นาน 20 นาทีและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากตั้งทิ้งไว้แล้วนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer-plate reader (SPECTRO star Nano, BMG Lab Tech) เพื่อวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง background

หลังจากทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงแล้ว เติมกรดวานิลลิน-ฟอสฟอริก (vanillin-phosphoric acid) 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วย pipette ขึ้นและลง 5 ครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงอีกครั้งและคำนวณหาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสุทธิด้วยการหักลบกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสง background

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จัดตั้งทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial in CRD)

ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่หนึ่งคือวิธีการทำให้เซลล์แตกประกอบด้วย 6 วิธี และปัจจัยที่สองคือสายพันธุ์สาหร่ายจำนวน 2 สายพันธุ์ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้วิธี analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีแบบพหุคูณ (least significant difference: LSD) โดยใช้โปรแกรม R จากผลการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ

### ผลการทดลองและวิจารณ์

ศึกษาปริมาณน้ำมันจากตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กไอโซเลท A และ B ด้วยวิธีทำให้เซลล์แตกแบบขั้นตอนเดียว ได้แก่วิธี B, M และ U และการทำให้เซลล์แตกแบบสองขั้นตอน ได้แก่วิธี MB, MU และวิธี UB ผลการทดลองพบว่าวิธีทำให้เซลล์แตก ไอโซเลทของสาหร่าย และปฏิสัมพันธ์ของวิธีการทำให้เซลล์แตกและไอโซเลทของสาหร่ายมีผลทำให้ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของสาหร่ายในแต่ละไอโซเลทโดยไม่คำนึงถึงวิธีการทำให้เซลล์แตกพบว่า สาหร่ายขนาดเล็กไอโซเลท A ให้ปริมาณน้ำมัน 8.44% สูงกว่าปริมาณน้ำมันจากสาหร่ายไอโซเลท B ที่ให้น้ำมันเท่ากับ 7.53% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกแบบขั้นตอนเดียวและการทำให้เซลล์แตกแบบสองขั้นตอนทั้ง 6 วิธี โดยไม่คำนึงถึงไอโซเลทของสาหร่ายนั้น ๆ พบว่าการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M ให้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี U, MU, MB, B และวิธี UB โดยให้น้ำมันเท่ากับ 8.66, 8.27, 8.08, 8.07, 7.90 และ 6.93% ตามลำดับ และพบว่าวิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M, U, MU และ MB มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อย่างไรก็ตามการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M นั้นให้ปริมาณน้ำมันสูงที่สุดจาก 4 วิธีข้างต้น และยังมีข้อดีเหนือวิธีการอื่น ๆ คือ เป็นวิธีการทำให้เซลล์แตกแบบขั้นตอนเดียว ใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อนหาได้ง่าย สะดวก รวดเร็วและปลอดภัย วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุด เหมาะสำหรับการสกัดน้ำมันจาก

สาหร่ายขนาดเล็ก นอกจากนี้การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M ยังให้ปริมาณน้ำมันที่สูงกว่าวิธี B และ UB ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอีกด้วยว่าวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟเป็นวิธีการสกัดที่ง่ายที่สุดและมีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในสาหร่าย และยังสามารถปรับระดับความแรงหรือกำลังของเครื่องได้อย่างง่ายดาย ไม่ยุ่งยาก อีกทั้งสามารถนำไปปรับใช้ในการสกัดน้ำมันจากพืชและไขมันสัตว์ได้ (Mahesar *et al.*, 2008; Viro *et al.*, 2008)

เนื่องมาจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน จึงทำให้สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์นั้นมีวิธีที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกแตกต่างกันไป สำหรับสาหร่ายไอโซเลท A พบว่าการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี B เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ให้น้ำมันเท่ากับ 9.35% ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำมันสูงกว่าวิธีการ M, U, MU และ UB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยให้ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 8.32, 8.09, 8.04 และ 7.90% ตามลำดับ (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำมันที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ B กับวิธี MB มีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อคำนวณระยะเวลาและขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกแล้ว การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี B นั้น เป็นวิธีที่เสร็จในขั้นตอนเดียวและใช้เวลาน้อยกว่าการสกัดด้วยวิธี MB จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมแก่การเลือกไปใช้ในการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายไอโซเลท A แต่ในขณะที่เดียวกันวิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี B ไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุดสำหรับสาหร่ายไอโซเลท B เนื่องมาจากการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี B ให้ประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ อาจจะเนื่องมาจากองค์ประกอบของผนังเซลล์สาหร่ายที่แตกต่างกันจึงทำให้สาหร่ายทั้ง 2 ไอโซเลทมีวิธีที่เหมาะสมแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายไอโซเลท B พบว่า การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M ให้ปริมาณน้ำมัน 9.00% สูงกว่าวิธี U, MU, MB, B และวิธี UB ที่ให้ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 6.65, 8.08, 7.22, 6.45 และ 5.81% ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M ให้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าวิธี MU, MB, B และวิธี UB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

Table 1. Effect of cell disruption methods and isolate of microalgae on lipid content

Treatment	Lipid content (%)
Method	
B	7.90 ± 1.88 <sup>b</sup>
M	8.66 ± 0.94 <sup>a</sup>
U	8.27 ± 0.59 <sup>ab</sup>
MB	8.10 ± 1.10 <sup>ab</sup>
MU	8.08 ± 0.56 <sup>ab</sup>
UB	6.93 ± 1.25 <sup>c</sup>
F test	*
Isolate	
A	8.44 ± 0.77 <sup>a</sup>
B	7.53 ± 1.43 <sup>b</sup>
F test	*
Method*Isolate	
BA	9.35 ± 0.44 <sup>a</sup>
BB	6.45 ± 1.60 <sup>fg</sup>
MA	8.32 ± 1.12 <sup>bcd</sup>
MB	9.00 ± 0.66 <sup>ab</sup>
UA	7.90 ± 0.46 <sup>de</sup>
UB	8.65 ± 0.45 <sup>abcd</sup>
MBA	8.93 ± 0.37 <sup>abc</sup>
MBB	7.22 ± 0.88 <sup>ef</sup>
MUA	8.08 ± 0.51 <sup>cde</sup>
MUB	8.09 ± 0.65 <sup>cde</sup>
UBA	8.04 ± 0.32 <sup>de</sup>
UBB	5.81 ± 0.60 <sup>g</sup>
F test	*

\*Significant difference at ( $P < 0.05$ )

95% แต่มีค่าไม่แตกต่างกันกับการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี U อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M และวิธี U แตกต่างกันอย่างมาก โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี M ใช้เวลาน้อยกว่า 5 นาที อีกทั้งยังเป็นเครื่องมือที่หาซื้อได้ง่าย ราคาถูก เมื่อเทียบกับการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี U ซึ่งใช้เวลามากถึง 40 นาที และเครื่องอัลตราโซนิกยังมีราคาที่สูงกว่าด้วย ดังนั้นวิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยไมโครเวฟ จึงเหมาะสมแก่การนำไปใช้ในการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายไฮโซเลท B ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Prabakaran and Ravindran (2011)

ที่ได้รายงานว่าคุณภาพในการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายและวิธีที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตก และจากการทดลองของ Lee *et al.* (2010) ที่ได้สกัดน้ำมันจากสาหร่ายพันธุ์ *Botryococcus sp.* และ *Chlorella vulgaris* โดยใช้ bead beating ที่ความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที พบว่า *Botryococcus sp.* มีประสิทธิภาพมากพบปริมาณน้ำมันถึง 28.1% ในขณะที่ *C. vulgaris* มีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าพบปริมาณน้ำมันเพียง 7.9%

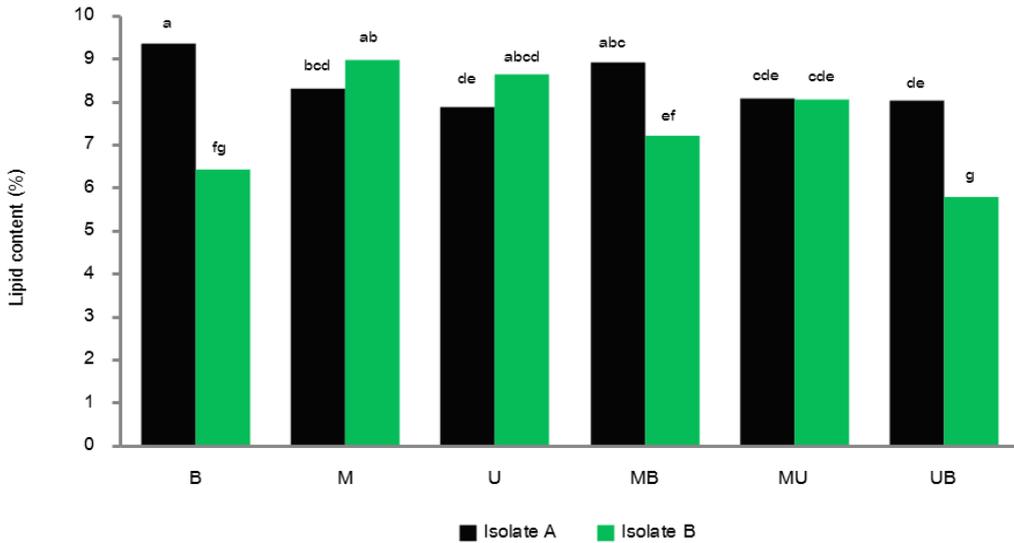


Figure 1. Lipid content according to interaction between microalgal isolates and disruption methods; bead vortexing (B), microwave (M), ultrasonic (U), microwave and bead vortexing (MB), microwave and ultrasonic (MU) and ultrasonic and bead vortexing (UB). The different letters above the bars indicate a significant difference at the 95% confidence level

**สรุป**

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันโดยไมค์นึ่งถึงวิธีในการทำให้เซลล์แตก พบว่า สาหร่ายไอโซเลท A ให้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าสาหร่ายไอโซเลท B อย่างมีนัยสำคัญ และวิธีทำให้เซลล์แตกมีปฏิสัมพันธ์กับไอโซเลทของสาหร่ายส่งผลให้ ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องมาจากสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบของผนังเซลล์และโครงสร้างหลายแบบ วิธีการที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกจากสาหร่ายไอโซเลท A คือ วิธีการใช้เม็ดปัด ซึ่งให้ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 9.35% สูงกว่าวิธีอื่น ๆ ในขณะที่วิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยไมโครเวฟเหมาะสมสำหรับสาหร่ายไอโซเลท B ที่ให้ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 9.00% จะเห็นได้ว่าวิธีการทำให้เซลล์แตกที่ดีที่สุดกับสาหร่ายสายพันธุ์หนึ่งอาจจะไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุดกับสาหร่ายอีกสายพันธุ์ ดังนั้นทุก ๆ ครั้งในการคัดแยกสาหร่ายสายพันธุ์ใหม่ ๆ จึงจำเป็นต้องศึกษา และคัดเลือกวิธีการทำให้เซลล์แตกที่เหมาะสมกับ

สาหร่ายสายพันธุ์นั้น ๆ เพื่อให้ได้น้ำมันสูงที่สุด ประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่ายมากที่สุด อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาวิธีการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยคำนึงถึงต้นทุน เวลา และปริมาณน้ำมันเป็นหลัก

**กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณทุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนอุดหนุนวิจัยพืชไร่มา 2560 ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย ขอขอบคุณ ผศ.ดร. จินตนา อันอาตม์งาม และ ผศ.ดร. ชัยณรงค์ รัตนกริษา กุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการศึกษาค้นคว้า

## เอกสารอ้างอิง

- มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี อดิณฎญา ปานทอง และ วรางคณา กิจพิพิธ. 2558. ผลของการเสริมสาหร่าย *Schizochytrium* sp. ในอาหารไก่ไข่ต่อการย่อยได้ปรากฏของโภชนะ สมรรถภาพการผลิต และคุณภาพของไข่ไก่. วารสารเกษตร 31(2): 107-120.
- รัตนภรณ์ ลีสิงห์. 2555. การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ผลิตลิปิดสูงจากตัวอย่างน้ำจืดในพื้นที่เขื่อนสิรินธรจังหวัดอุบลราชธานี. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 44 หน้า.
- สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543. สาหร่าย: ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 356 หน้า.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25(3): 294-306.
- Harris, E.H. 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, San Diego, 780 p.
- Lee, J.Y., C. Yoo, S.Y. Jun, C.Y. Ahn and H.M. Oh. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technol. 101(1): S75-S77.
- Mahesar, S.A., S.T.H. Sherazi, K. Abro, A. Kandhro, M.I. Bhangar, F.R. van de Voort and J. Sedman. 2008. Application of microwave heating for the fast extraction of fat content from the poultry feeds. Talanta 75(5): 1240-1244.
- Prabakaran, P. and A.D. Ravindran. 2011. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. Letters in Applied Microbiology 53(2): 150-154.
- Ranjith Kumar, R., P. Hanumantha Rao and M. Arumugam. 2015. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. Front. Energy Res. 2(61): doi: 10.3389/fenrg.2014.00061.
- Scragg, A.H., J. Morrison and S.W. Shales. 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. Enzyme Microb. Technol. 33(7): 884-889.
- Sheehan, J., T. Dunahay, J. Bebbemann and P. Roessler. 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
- Tanadul, O., J.S. VanderGheynst, D.M. Beckles, A.L.T. Powell and J.M. Labavitch. 2014. The impact of elevated CO<sub>2</sub> concentration on the quality of algal starch as a potential biofuel feedstock. Biotechnol. Bioeng. 111(7): 1323-1331.
- Virof, M., V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni and F. Chemat. 2008. Microwave-integrated extraction of total fats and oils. Journal of Chromatography A 1196-1197: 57-64.