วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

สาหร่าย อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สาหร่ายขนาดเล็ก

Scenedesmus sp. AARL G022 จากห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Shaker

หลอดฟลูออเรสเซนต์

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 1000 ml

กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

Spectrophotometer

Centrifuge IBA 12R (ยูไนเต็ด อินสทรูเมนต์ จำกัด)

sonicator Sonics (Vibra-cell$^{T.M.}$)

ตู้อบอุณหภูมิ 40 ^{o}C และ 60 ^{o}C

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 40 L

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

ห่วงถ่ายเชื้อ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

คีมคีบ

กระดาษกรอง GF/C

Autopipette

Heamacytometer

Chloroform

Methanol

Sodium Chloride

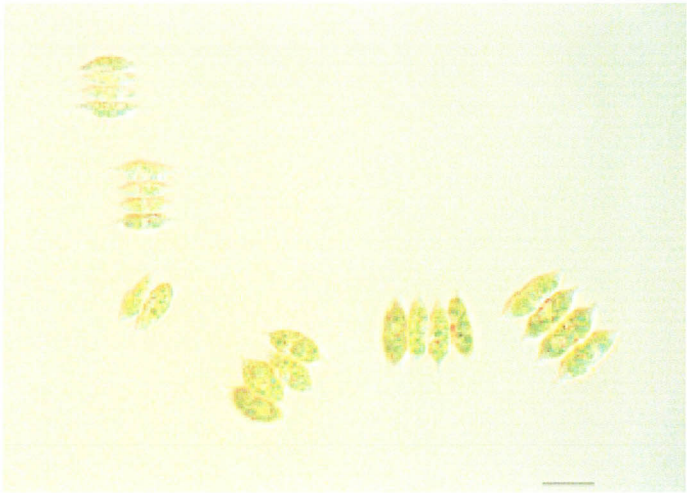
อาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร Algal Medium (AM) (ภาคผนวก)

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสาหร่ายตั้งต้น

1.1 เตรียมเชื้อตั้งต้น สาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 (ภาพที่ 3) แยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์โดยวิธีลากบนอาหารวุ้นแข็งสูตร Algal Medium (AM) ในจานเพาะเชื้อจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์

1.2 หลังจากแยกสาหร่ายจนบริสุทธิ์แล้ว นำสาหร่ายมาขยายขนาดการเพาะเลี้ยงจนได้ปริมาณมากขึ้นเพียงพอต่อการใช้เป็นหัวเชื้อ โดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวสูตร AM จนได้หัวเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร



Scale bar = 10 μm

ภาพที่ 3 สาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022

1.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงตลอดเวลา ภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์ วัดค่า OD (optical density) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 665 nm จนได้ค่า OD ที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

2.1 นำสาหร่ายตั้งต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 1. มาศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ glucose, glycerol และ sodium acetate โดยใช้อาหาร AM เสริมด้วยแหล่งคาร์บอนดังกล่าว 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01 0.02 และ 0.05 M ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และใช้การเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic ที่ใช้อาหารสูตร AM เป็น control เพาะเลี้ยงสาหร่ายใน

อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 700 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าและให้แสงตลอดเวลาภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์ (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยง สาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในแหล่งคาร์บอนต่างๆ ภายใต้สภาวะ mixotrophic

2.2 เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วันเพื่อนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 665 nm และตรวจนับเซลล์ โดยใช้ counting chamber slide แบบ haemacytometer

2.3 เมื่อการเจริญของเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ระยะ stationary phase เก็บเกี่ยวสาหร่ายปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* ตามวิธีของ Saijo (1975) อ้างโดย Renaud *et al.* (1994) หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวสาหร่ายทั้งหมด ด้วยการกรองโดยใช้กระดาษกรอง GF/C นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำไปหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (dry weight)

2.4 การคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate: μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time: t_d) (Shi *et al.* 1997)

$$\text{specific growth rate: } \mu = \frac{\ln(X_1 - X_0)}{t_1 - t_0}$$

$$\text{doubling time: } t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

โดย X_0 = มวลของสาหร่ายเริ่มต้น (g L^{-1})

X_1 = มวลของสาหร่ายที่เวลา t (g L^{-1})

t_0 = วันที่เริ่มต้น

t_1 = ช่วงวันที่ทำการเพาะเลี้ยง

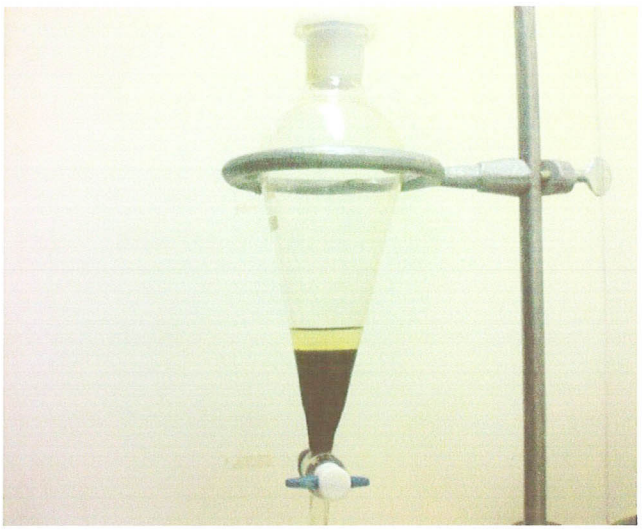
3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้วิธีการของ Bligh and Dyer (1959) (ภาพที่ 5)

3.1 นำตัวอย่างสาหร่ายแห้งมาบดเป็นผง ใส่ใน chloroform: methanol อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดชั้นตะกอนเซลล์

3.3 คำนวณหา%ไขมันในสาหร่ายขนาดเล็กโดยการย้ายส่วนใสที่ได้ใส่ในกรวยแยกสาร (ในข้อ 3.2) จากนั้นเติม sodium chloride 0.9 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า แล้ววางทิ้งไว้จนสารละลายมีการแยกชั้น จากนั้นเก็บสารละลายที่อยู่ชั้นล่างใส่ในขวดปากกว้าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำตัวอย่างที่ได้ไปชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง คำนวณหา%ไขมันที่ได้ต่อน้ำหนักสาหร่ายแห้ง



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

4. การศึกษาผลของระยะเวลาให้แสงและไม่ให้แสงในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ mixotrophic

4.1 เลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ทำให้สาหร่ายมีการเจริญได้ดี และมีการสะสมไขมันในเซลล์สูงจากการเพาะเลี้ยงในข้อ 2 มาเพาะเลี้ยงโดยใช้การควบคุมระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในที่มืด และที่สว่าง 4 สภาวะ (ภาพที่ 6) ดังนี้

4.1.1 เลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสงตลอดเวลา

4.1.2 เลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 12 ชั่วโมง ในที่มืด 12 ชั่วโมง

4.1.3 เลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมง ในที่มืด 8 ชั่วโมง

4.1.4 เลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 8 ชั่วโมง ในที่มืด 16 ชั่วโมง

4.2 ติดตามการเจริญดังข้อ 2.2 และ 2.3 และวิเคราะห์ไขมัน ดังข้อ 3.

ภาพที่ 6 การศึกษาช่วงเวลาการได้รับแสงและไม่ได้รับแสง สำหรับเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G 022 แบบ mixotrophic

5. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (photobioreator) และประเมินความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับนำร่อง

ในการวิจัยครั้งนี้ได้สร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตร 40 ลิตร 2 แบบ ได้แก่

ก. แบบ flat plate (ภาพที่ 7)

ข. แบบ annular หรือ column (ภาพที่ 8)

ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสองแบบนี้เป็นแบบที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพ (Posten, 2009)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

5.1 เลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ได้จากการทดลองในข้อ 2 และ 3 นำมาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้ง 2 แบบ (ภาพที่ 9)

5.2 วัดการเจริญของสาหร่ายทุก 2 วัน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 nm

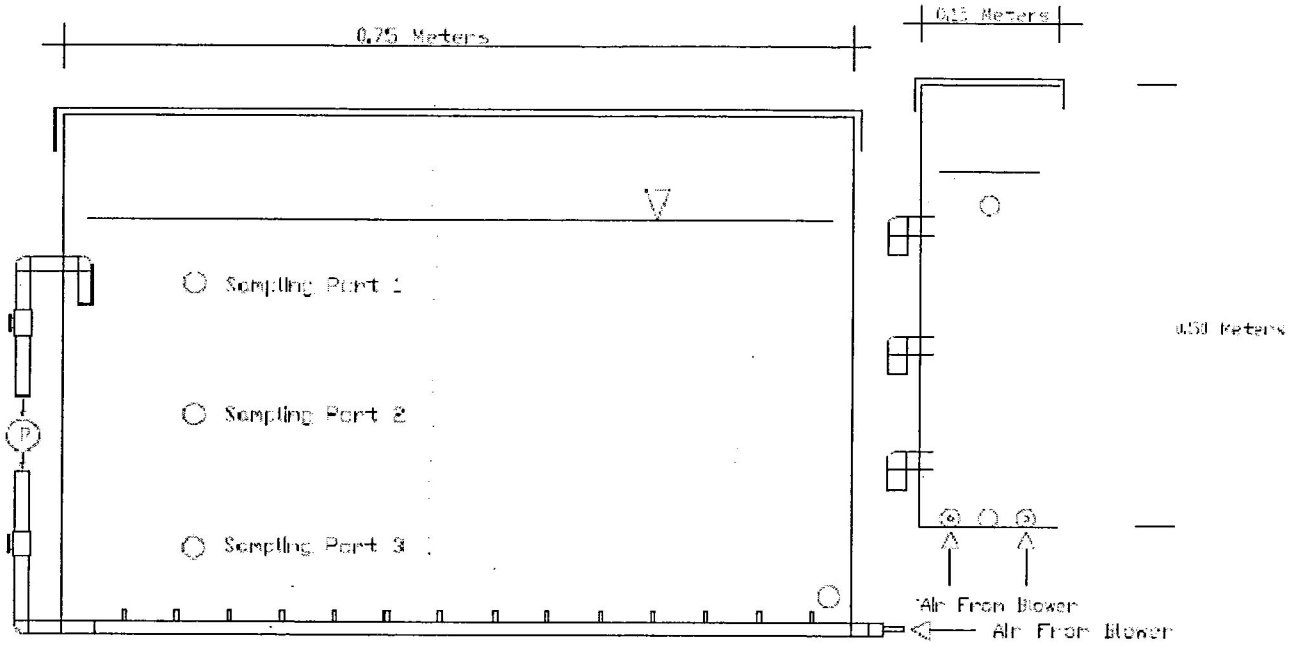
5.3 เมื่อการเจริญของเซลล์สาหร่ายเข้าสู่ระยะ stationary phase จะเก็บเกี่ยวสาหร่ายเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.3 และ 2.4

การประเมินความเป็นไปได้ในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับนำร่อง

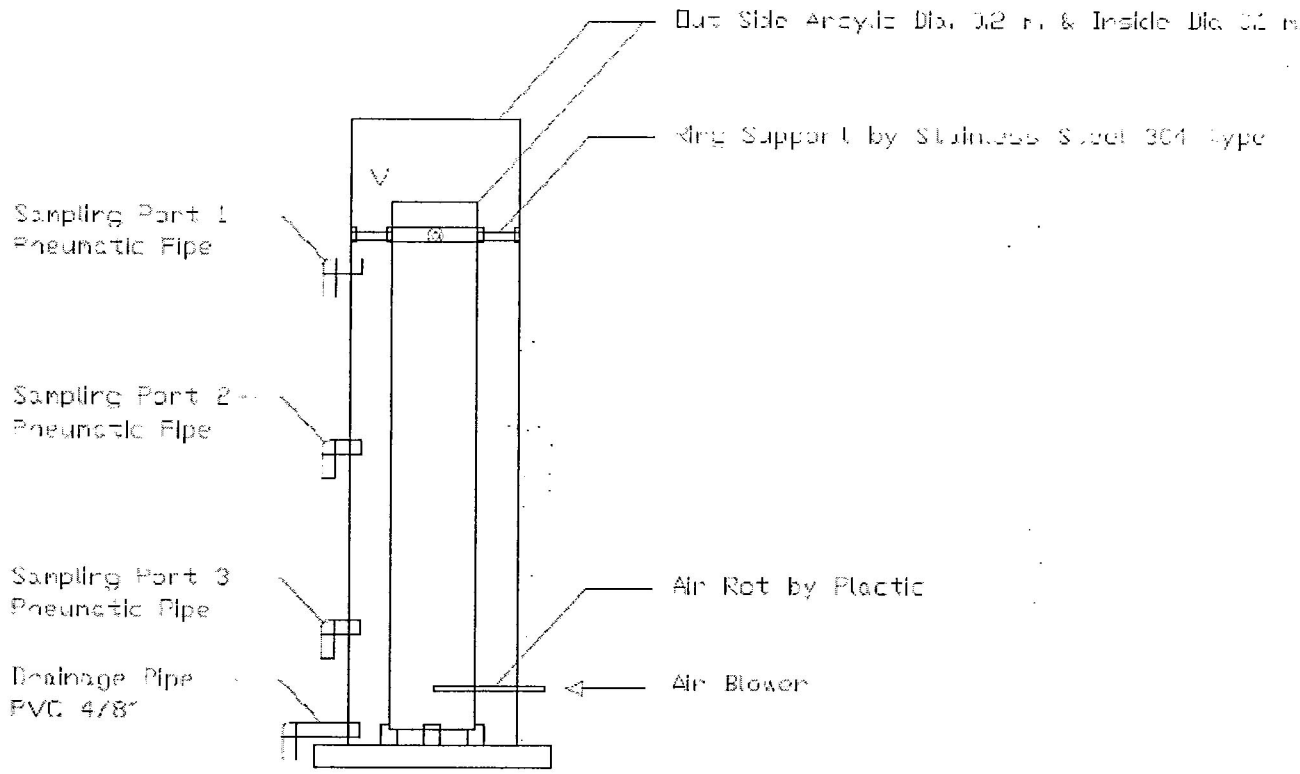
เปรียบเทียบความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ โดยคำนวณต้นทุนของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในแต่ละสภาวะ และผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

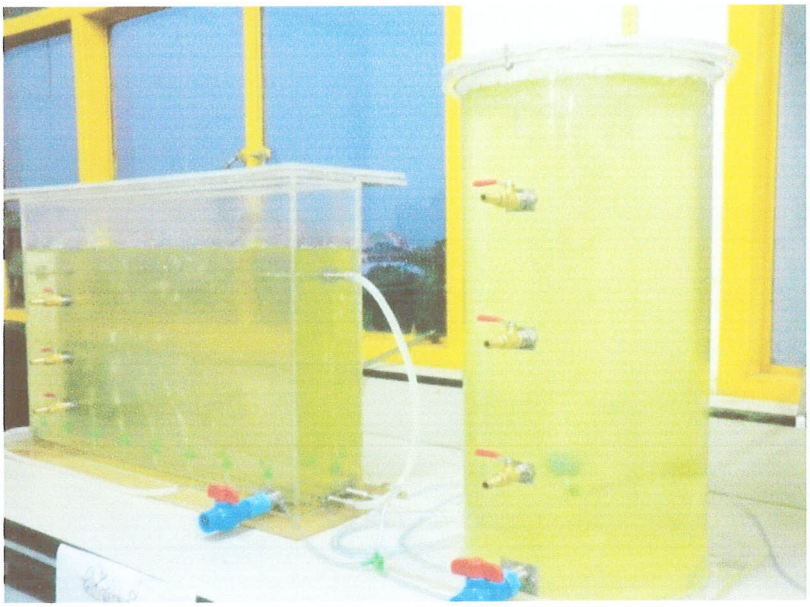
นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างของแต่ละทรีตเมนต์ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$



ภาพที่ 7 แบบจำลองถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ flat plate



ภาพที่ 8 แบบจำลองถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ แบบ annular หรือ column



ภาพที่ 9 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 40 ลิตร

ผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

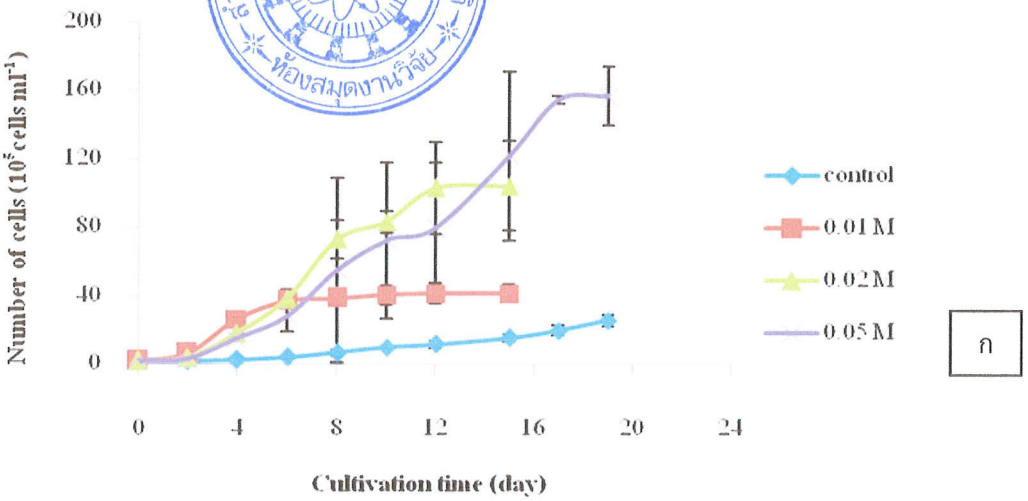
การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในอาหารสูตร AM ที่มี glucose, glycerol และ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน ใน flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 700 มิลลิลิตร โดยเขย่าและมีการให้แสงตลอดเวลาภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์

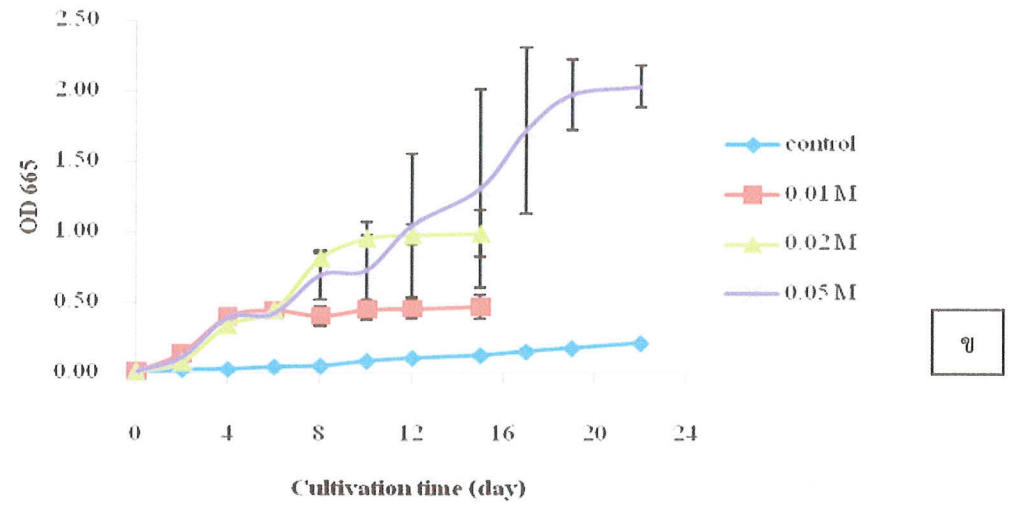
1.1 การใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน

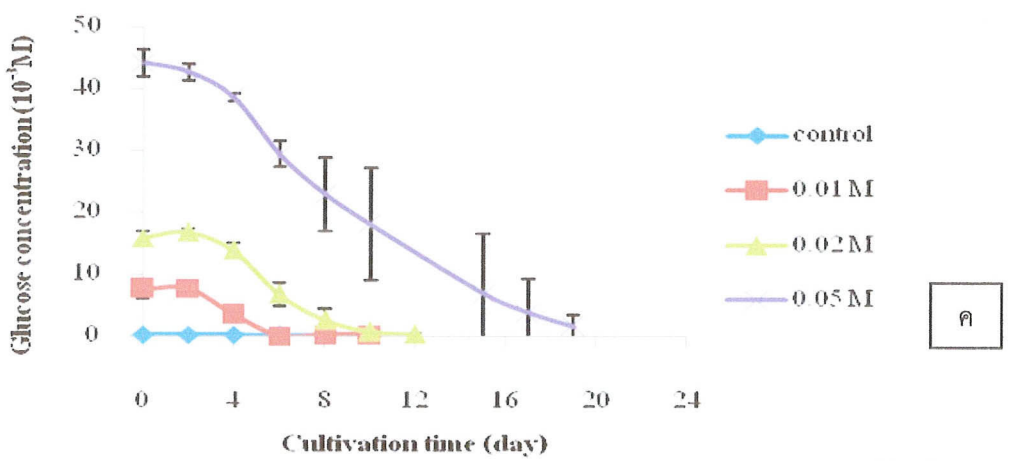
จากการทดลอง ใช้ glucose ความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.05 M เป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1.643\pm0.068\times10^{5}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน glucose ความเข้มข้น 0.05 M (ภาพที่ 10 ก และตารางที่ 4) มีความหนาแน่นของเซลล์สูง และมีระยะ Exponential phase ประมาณ 18 วัน ซึ่งนานกว่าการเพาะเลี้ยงด้วย glucose ความเข้มข้น 0.02 และ 0.01 M ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการวัดค่าการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยการเพาะเลี้ยงด้วย glucose ความเข้มข้น 0.05 M มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 2.029 ± 0.148 และรองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงด้วย glucose ความเข้มข้น 0.02 และ 0.01 M ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.991 ± 0.163 และ 0.472 ± 0.085 ตามลำดับ (ภาพที่ 10 ข)

การศึกษาปริมาณน้ำตาล glucose ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 10 ค) พบว่า สาหร่ายสามารถใช้ glucose ความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.05 ที่เติมในอาหารหมดในวันที่ 6, 10 และ 19 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วย glucose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เหล่านั้นเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase และเมื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ทั้งหมดเมื่อเข้าสู่ stationary phase พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วย glucose ความเข้มข้น 0.05 M ให้ชีวมวลสูงที่สุด รองลงมาคือ 0.02 และ 0.01 M ($P<0.05$) โดยให้ปริมาณชีวมวล เท่ากับ 2.781 ± 0.859, 1.072 ± 0.061, 0.348 ± 0.013 $g.L^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic โดยใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน มีเซลล์ขนาดใหญ่กว่าการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic (ภาพที่ 11) จากเซลล์ปกติมีขนาดประมาณ 10 μm เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี glucose เซลล์มีขนาดเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า คือ มีขนาดประมาณ 20 μm







ภาพที่ 10 ค่าเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 แบบ mixotrophic โดยใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน

ก. ความหนาแน่นของเซลล์

ข. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

ค. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสระหว่างการเพาะเลี้ยง

Scale bar =10 μm

ภาพที่ 11 *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic และ phototrophic
(ซ้าย) เพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic โดยใช้ 0.05 M glucose เป็นแหล่งคาร์บอน
(ขวา) เพาะเลี้ยงแบบ phototrophic

การศึกษาปริมาณไขมัน พบว่า การเติม glucose ความเข้มข้น 0.05 M ทำให้ได้ผลผลิตไขมันสูงกว่า 0.01 M และ control ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากการเติม glucose ความเข้มข้น 0.02 M ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามการเติม glucose ทั้ง 3 ระดับ ทำให้สาหร่ายมีการสะสมไขมันในเซลล์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่การเติม glucose ที่ระดับ 0.05 และ 0.02 M ช่วยส่งเสริมให้สาหร่ายมีการสะสมไขมันในเซลล์สูงกว่า control ($P<0.05$) ดังที่แสดงไว้ใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชีวมวลและไขมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ใน glucose ความเข้มข้นต่างๆ

		Biomass	Lipid yield	
		yield ($g.L^{-1}$)	($mg.L^{-1}$)	(% dw)
Phototrophic (AM)	control	0.16±0.018d	22.550±6.116b	13.492±3.407a
Glucose	0.01 M	0.348±0.013c	38.605±8.565b	11.070±2.180ab
	0.02 M	1.072±0.061b	74.092±13.574ab	6.774±3.574b
	0.05 M	2.781±0.859a	233.678±35.339a	8.428±1.563b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

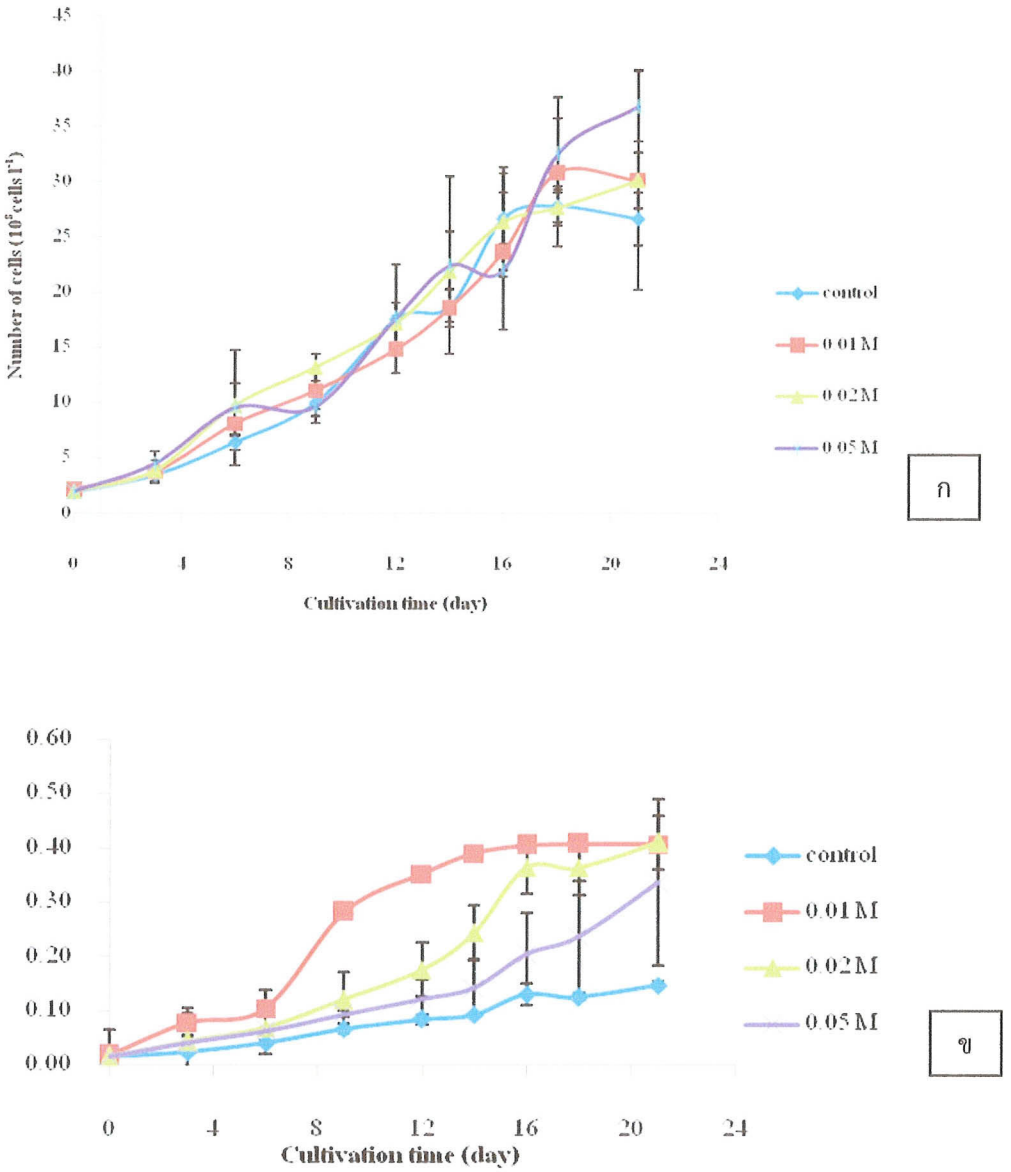
1.2 การใช้ glycerol **เป็นแหล่งคาร์บอน**

เมื่อนับจำนวนเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 ด้วยhaemacytometer พบว่า การใช้ glycerol ความเข้มข้น 0.05, 0.02 และ 0.01 M ความหนาแน่นของเซลล์มีค่าใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic (control) (ภาพที่ 12 ก) แต่เมื่อศึกษาการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร พบว่า การใช้ glycerol ทั้ง 3 ความเข้มข้น ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายมีค่าสูงกว่าค่าที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic (ภาพ 12 ข) ซึ่งเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วงวันที่ 16 ถึงวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ทั้งหมด พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วย glycerol ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

การศึกษาปริมาณไขมันในเซลล์ของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 พบว่าการใช้ glycerol ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ไม่ส่งผลต่อผลผลิตไขมันและปริมาณไขมันสะสมในรวมทั้งไม่มีความแตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ชีวมวลและไขมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ใน glycerolความเข้มข้นต่างๆ

		Biomass	Lipid yield	
		yield ($g.L^{-1}$)	($mg.L^{-1}$)	(% dw)
Phototrophic (AM)	control	0.123	17.581	14.490
glycerol	0.01 M	0.259	42.097	16.252
	0.02 M	0.382	62.742	16.427
	0.05 M	0.468	67.903	14.502



ภาพที่ 12 ค่าเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 แบบ mixotrophic โดยใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน

ก ความหนาแน่นของเซลล์ ข ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

1.3 การใช้ sodium acetate **เป็นแหล่งคาร์บอน**

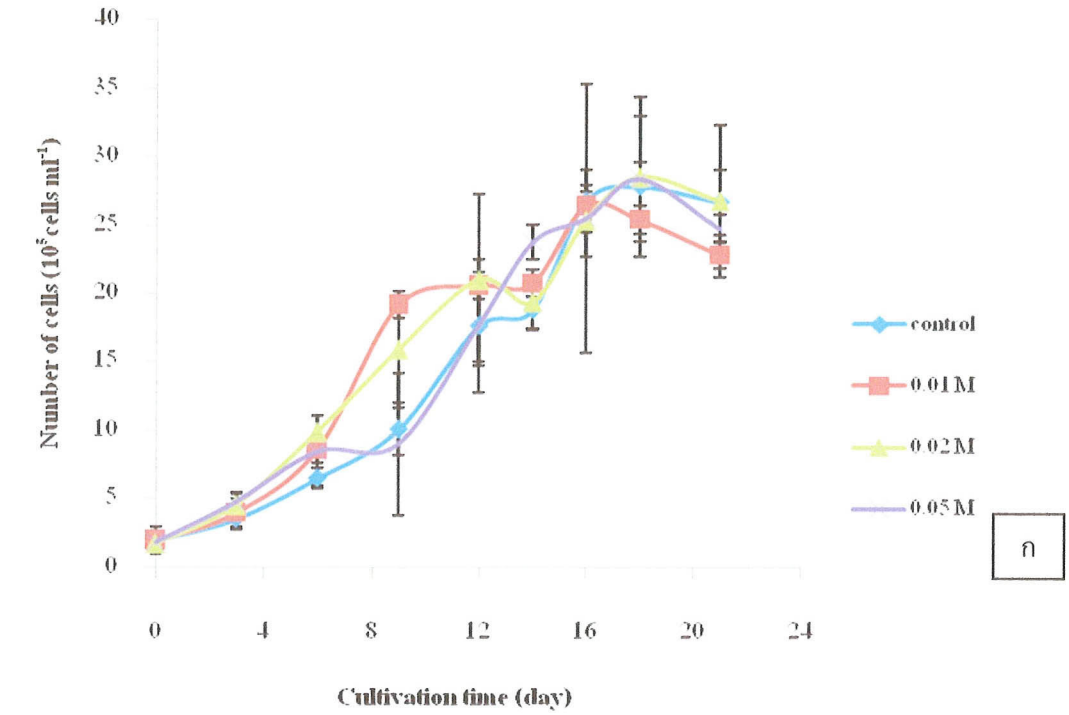
เมื่อเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 โดยใช้ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า จากการวัดอัตราการเจริญของเซลล์ด้วยการนับเซลล์ พบว่า *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม sodium acetate มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic (ภาพที่ 13 ก) แต่พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยด้วย sodium acetate ความเข้มข้น 0.05 M มีแนวโน้มในการส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาพที่ 13 ข) ส่วนปริมาณชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วย sodium acetate พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วย sodium acetate ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6)

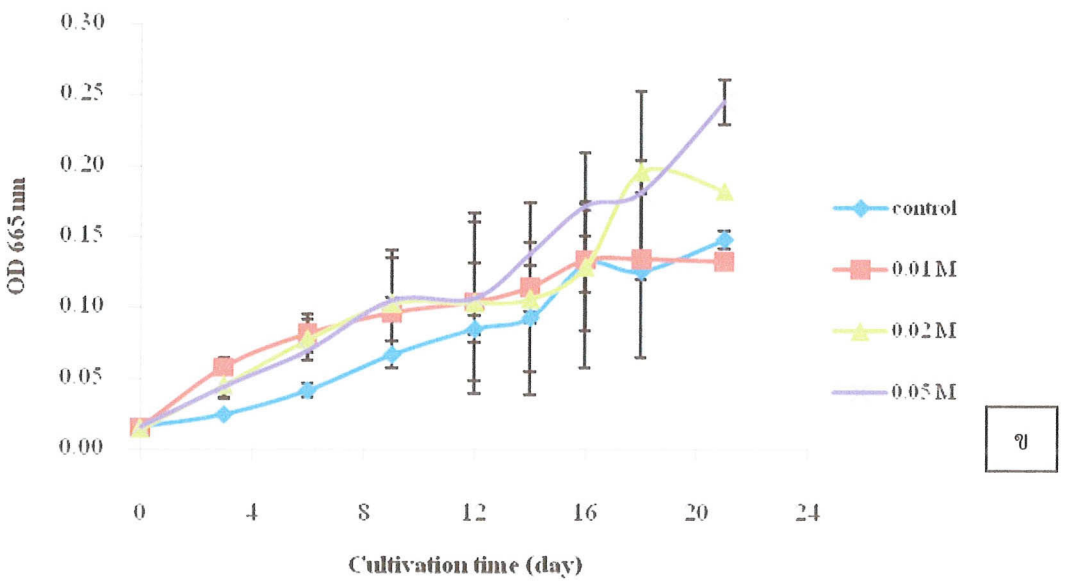
การศึกษาปริมาณไขมันในเซลล์ของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 พบว่า การใช้ glycerol ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ไม่ส่งผลต่อผลผลิตไขมันและปริมาณไขมันสะสมในรวมทั้งไม่มีความแตกต่างขาก control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ชีวมวลและไขมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ใน sodium acetate ความเข้มข้นต่างๆ

		Biomass	Lipid yield	
		yield ($g.L^{-1}$)	($mg.L^{-1}$)	(% dw)
Phototrophic (AM)	control	0.123±0.015a	17.581±2.125b	14.490±0.981a
Sodium	0.01 M	0.246 ±0.109a	33.387±1.507a	13.892±10.948a
acetate	0.02 M	0.250± 0.051a	31.694±0.070a	12.676±6.272a
	0.05 M	0.300±0.056a	35.726±1.973a	12.079 ±0.798a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%





ภาพที่ 13 แสดงค่าเจริญของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 แบบ mixotrophic โดยใช้ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน

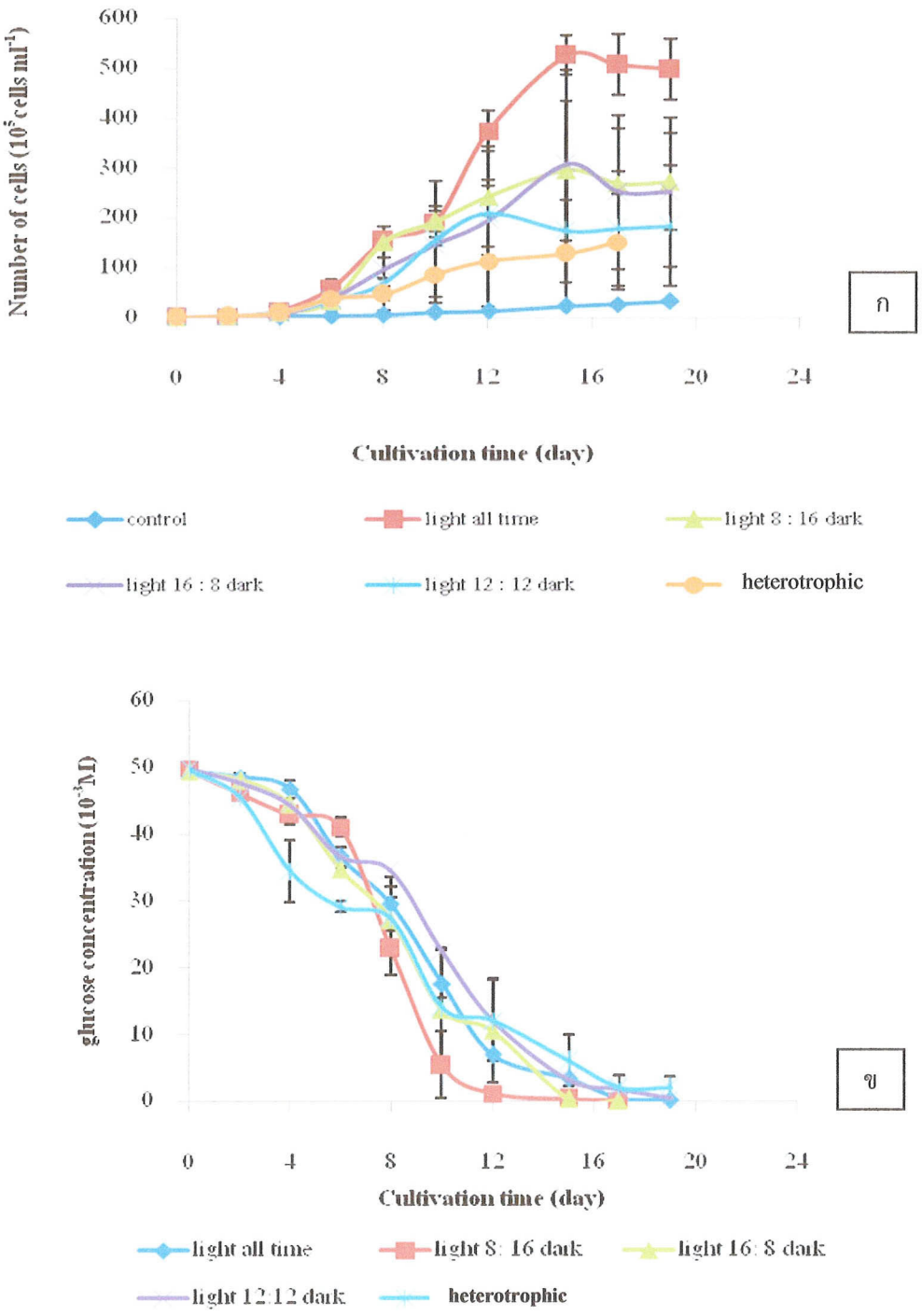
ก. ความหนาแน่นของเซลล์ ข. ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

เมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน การศึกษาครั้งนี้พบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 เพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพ ได้แก่ glucose โดยความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตทั้งชีวมวล และปริมาณไขมันสูงที่สุด คือ glucose 0.05 M ซึ่งทำให้สาหร่ายมีชีวมวล 2.781±0.859 $g.L^{-1}$ และไขมันในเซลล์ มีค่าสูงที่สุดถึง 233.678±35.33 $mg.L^{-1}$ แต่การใช้ glycerol และ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายมี%ไขมันในเซลล์ประมาณ 12 – 16 % สูงกว่าการใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีประมาณ 8 – 11 %

2. การศึกษาผลของระยะเวลาให้แสงและไม่ให้แสงในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ mixotrophic

เพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 โดยใช้ glucose ความเข้มข้น 0.05 M เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อศึกษาสภาวะการได้รับแสงที่เหมาะสมเพื่อให้สาหร่ายมีการสะสมไขมันในเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 3 สภาวะ 6 การทดลอง ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic (control) การเพาะเลี้ยงแบบ heterotrophic และการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic ที่แบ่งช่วงการให้แสงออกเป็น 4 แบบ คือ ก. ให้แสงตลอดเวลา ข. ให้แสง 8 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 16 ชั่วโมง ค. ให้แสง 16 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง ง. ให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงแบบ mixotrohpic ที่มีการให้แสงตลอดเวลา จะมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด เท่ากับ 52.44 $x10^{5}$ $cell.mL^{-1}$ และรองลงมาคือ การให้แสง 8 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 16 ชั่วโมง และการให้แสง 16 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง ซึ่งมีอัตราการเจริญของเซลล์ใกล้เคียงกัน ($P<0.05$) ส่วนการเพาะเลี้ยงโดยการให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง จะมีปริมาณเซลล์น้อยกว่า ตามด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ heterotrophic และ phototrophic ซึ่งมีอัตราการเจริญที่ต่ำลงมาตามลำดับ ($P<0.05$) (ภาพ 14 ก) และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ประมาณวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 14 ค่าเจริญของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในการเพาะเลี้ยงที่สภาวะแสงแบบต่างๆ
ก. ความหนาแน่นของเซลล์ ข. ปริมาณน้ำตาล glucose ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

เมื่อการวัดปริมาณน้ำตาล glucose ที่ใช้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะการได้รับแสงที่ต่างกัน พบว่า การเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ด้วย glucose ความเข้มข้น 0.05 M ที่ได้รับแสงตลอดเวลา จะมีปริมาณกลูโคสเหลือในระบบการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าการควบคุมแสงในสภาวะอื่นๆ ตั้งแต่ช่วงวันที่ 8 จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 14 ข)

และพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบ mixotrophic โดยให้แสงตลอดเวลา และการให้แสง 16 ชั่วโมง ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง มีปริมาณชีวมวลสูงที่สุด เท่ากับ 4.0372±0.364 และ 3.5589±0.109 g. L^{-1} ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากการทดลองพบว่าผลผลิตไขมันของสาหร่ายที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมง สลับกับการไม่ได้รับแสง 8 ชั่วโมง มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 396.347±11.601 g.L^{-1} ($P<0.05$) รองลงมาคือสภาวะที่ได้รับแสงตลอดเวลา มีไขมันสะสะในเซลล์เท่ากับ 297.292±51.203 mg.L^{-1} ($P<0.05$) โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงทั้งสองแบบนี้ ให้ผลผลิตไขมันสูงกว่า สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic และ heterotrophic ($P<0.05$) อีกด้วย อย่างไรก็ตามสภาวะการให้แสงที่ต่างกันไม่มีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์สาหร่าย ($P>0.05$) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ชีวมวลและไขมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในการเพาะเลี้ยงที่สภาวะแสงแบบต่างๆ

	Biomass yield	Lipid yield	
	(g.L^{-1})	(mg.L^{-1})	(% dw)
photrophic	0.1426±0.014c	22.571±0.842d	15.982±2.297a
heterotrophic	1.9389±0.875b	158.041±10.891c	9.217±4.721b
Mixotrophic			
ให้แสงตลอดเวลา	4.0372±0.364a	297.292±51.203b	7.471±1.841b
ให้แสง 8 ชั่วโมง ในที่มืด 16 ชั่วโมง	2.1198±0.518b	185.000±91.923c	8.449 ±2.269b
ให้แสง 16 ชั่วโมง ในที่มืด 8 ชั่วโมง	3.5589±0.109a	396.347±11.601a	11.155±0.127b
ให้แสง 12 ชั่วโมง ในที่มืด 12 ชั่วโมง	1.5620±0.574b	129.156±58.426c	8.426 ±2.291b

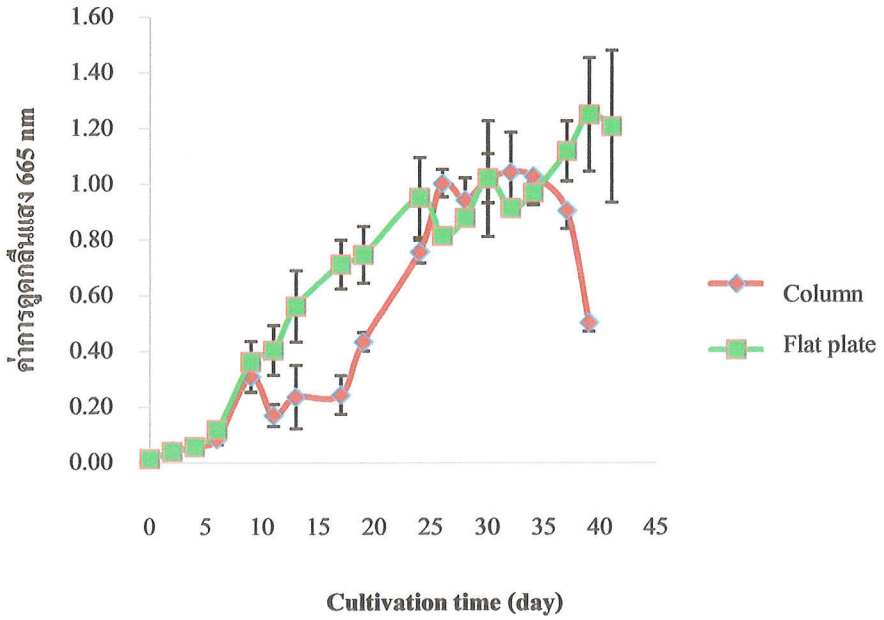
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 40 ลิตร

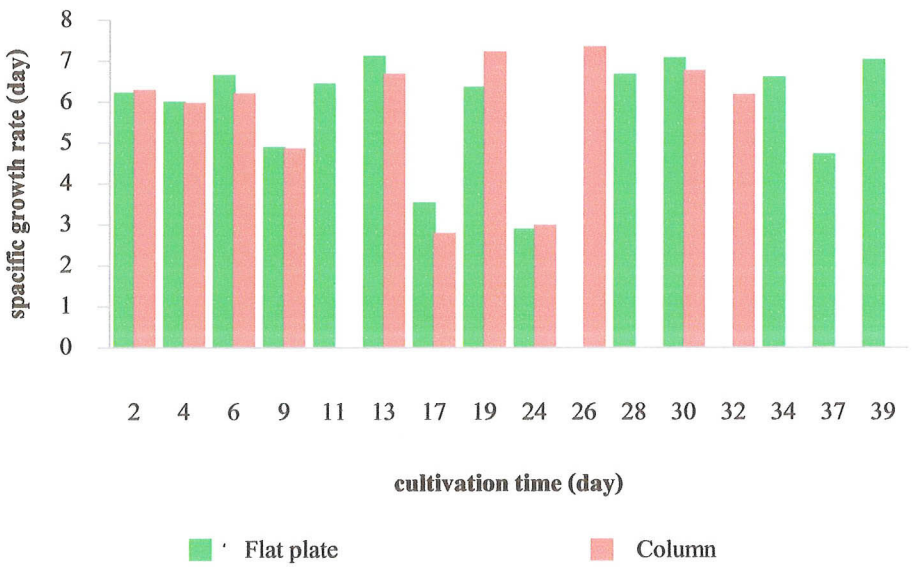
การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 40 ลิตร 2 ถังเพาะเลี้ยงที่มีรูปทรงแตกต่างกัน คือถังเพาะเลี้ยงแบบ flat plate และแบบ column ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic เนื่องจากการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะอื่นๆ (heterotrophic และ mixotrophic) จะพบปัญหาการปนเปื้อนสูง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นเวลาประมาณ 45 วัน พบว่าการเจริญของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงแบบ flat plate เจริญเร็วกว่าถังเพาะเลี้ยงแบบ column ในถังเพาะเลี้ยงแบบ flat plate เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ exponential ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 15) โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.136 ต่อวัน และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าต่ำที่สุด เท่ากับ 0.097 ต่อวัน ซึ่งพบในวันที่ 12 – 13 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 16 และ 17) ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดในระหว่างการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 1.250 ในวันที่ 39 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ได้น้ำหนักเซลล์เท่ากับ 0.533±0.079 g L^{-1} และให้ปริมาณไขมันเท่ากับ 107.84 g.L^{-1} คิดเป็น 20.220 %ของน้ำหนักแห้ง

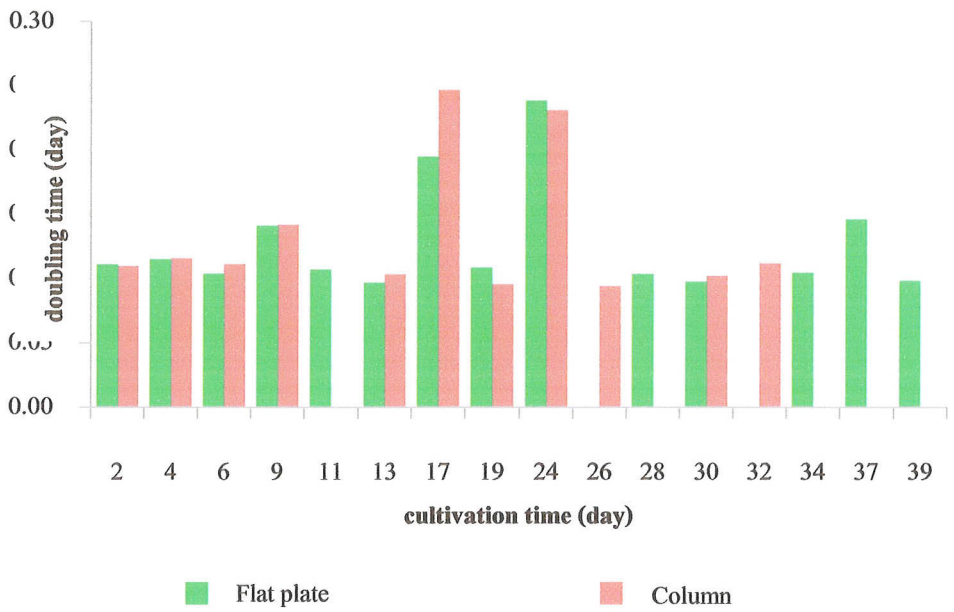
การเจริญของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในถังเพาะเลี้ยงแบบ column พบว่าเซลล์มีการเจริญช้ากว่า แต่เซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 7.358 ต่อวัน และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าต่ำที่สุด เท่ากับ 0.094 ต่อวัน ในวันที่ 26-27 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4.7 และ 4.8) เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ได้น้ำหนักเซลล์เท่ากับ 0.453±0.151 g.L^{-1} และให้ปริมาณไขมันเท่ากับ 53.584 g.L^{-1} คิดเป็น 11.82 %ของน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 15 การเจริญของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic โดยใช้อาหาร AM เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 16 อัตราการเจริญจำเพาะของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic โดยใช้อาหาร AM เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 17 ระยะเวลาที่เซลล์ *Scenedesmus* sp. AARL G022 เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ในการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic โดยใช้อาหาร AM เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง

4. การคำนวณต้นทุนค่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

ทำการเปรียบเทียบต้นทุนค่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในสภาวะ phototrophic และ mixotrophic ซึ่งมีต้นทุนดังนี้ (ตารางที่ 8 และ 9)

ตารางที่ 8 ต้นทุนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง แบบ phototrophic สูตร AM

สารเคมี	ราคา/ หน่วย	ปริมาณที่ใช้ ($g.L^{-1}$)	ราคา ($baht.L^{-1}$)
$NaNO_3$	348baht/500g	1	0.6960
$NHCl_4$	270baht/500g	0.05	0.0270
$MgSO_4.7H_2O$	270baht/500g	0.513	0.2770
$CaCl_2$	192baht/500g	0.058	0.0223
$FeCl_3$	540baht/500g	0.003	0.0032
K_2HPO_4	336baht/500g	0.25	0.1680
		รวม	1.1935

ตารางที่ 9 ต้นทุนของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic

สารเคมี	ราคา/ หน่วย	ปริมาณที่ใช้		ราคา (baht.L^{-1})
		M	($g.L^{-1}$)	
Glucose	120baht/1000g	0.01	1.8	0.216
		0.02	3.6	0.432
		0.05	9	1.08
Glycerol	1650 baht/1261g	0.01	0.92	0.110
		0.02	1.84	0.221
		0.05	4.60	0.552
Sodium acetate	1600 baht/1000g	0.01	0.82	1.312
		0.02	1.64	2.624
		0.05	4.10	6.56

เมื่อนำต้นทุนอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในแต่ละสภาวะ ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน นำมาคำนวณเปรียบเทียบกับผลผลิตชีวมวล และไขมันที่ได้ แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลผลิตและต้นทุนในส่วนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

การทดลอง	ต้นทุนอาหาร ($Baht.L^{-1}$)	ผลผลิต ($g.L^{-1}$)		ต้นทุนผลผลิต ($Baht.kg^{-1}$)	
		biomass	lipid	biomass	lipid
Phototrophic (AM)	1.193	0.167	0.023	7,149.44	52,926.83
AM + 0.01M glucose	1.409	0.348	0.039	4,052.72	36,510.81
AM + 0.02M glucose	1.625	1.072	0.074	1,515.88	21,938.94
AM + 0.05M glucose	2.273	2.781	0.234	817.39	9,729.20
AM + 0.01M glycerol	1.160	0.259	0.0421	9,087.34	55,909.45
AM + 0.02M glycerol	2.320	0.382	0.0627	9,198.27	56,003.00
AM + 0.05M glycerol	5.801	0.468	0.0679	14,944.66	103,001.34
AM + 0.01M sodium acetate	1.312	0.246	0.033	10,184.96	75,044.18
AM + 0.02M sodium acetate	2.624	0.250	0.032	15,270.00	120,448.67
AM + 0.05M sodium acetate	6.560	0.300	0.036	25,845.00	217,026.82

เมื่อพิจารณาจากผลการคำนวณที่ได้จะพบว่า *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ mixotrophic ที่ใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่ำกว่าการใช้ glycerol และ acetate เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการใช้ glucose เข้มข้น 0.05 M จะมีต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่ำที่สุดในการผลิตชีวมวล และไขมัน เท่ากับ 817.39 บาทต่อกิโลกรัม และ 9,729.20 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ