อภิปรายผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะ mixotrophic

โครงการวิจัยนี้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะ mixotrophic พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมคาร์บอน ชนิดต่างๆ ได้แก่ glucose, glycerol และ sodium acetate จะมีชีวมวล และปริมาณกรดไขมันสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะควบคุม คือสภาวะ phototrophic ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ mixotrophic สาหร่ายสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่เป็น phototrophic และ heterotrophic แหล่งพลังงานได้รับจากทั้งแสงและสารอินทรีย์ โดยใช้ทั้งคาร์บอนอินทรีย์และคาร์บอนอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ขณะที่การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ phototrophic สาหร่ายจะใช้เพียงแสง และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ (Chun *et al.*, 2011) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Scarsella *et al.* (2010) ซึ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง 3 แบบ คือ autotrophic, mixotrophic และ heterotrophic พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic สาหร่ายมีการเจริญได้ดีที่สุด และเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Heredia-Arroyo *et al.* (2011) ซึ่งได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* เพื่อสะสมไขมัน ทำการเพาะเลี้ยงแบบ autotrophic แบบ heterotrophic และแบบ mixotrophic พบว่าชีวมวลของสาหร่ายดังกล่าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic จะมีปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่นๆ

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีการเติม glucose ทั้งนี้เนื่องจาก glucose เป็นแหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายขนาดเล็ก และจุลินทรีย์หลายๆ กลุ่ม นำไปใช้ได้ง่ายที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ในอาหารที่มี glucose จะพบว่ามีอัตราการเจริญและการหายใจสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารอื่นๆ (เช่น น้ำตาล, น้ำตาลฟอสเฟส, กรดอินทรีย์ เป็นต้น) อย่างชัดเจน เนื่องจาก glucose จะให้พลังงานสูงกว่าสารอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากัน เช่น กลูโคสให้พลังงาน ~ 2.8 kJ/mol ขณะที่ acetate ให้พลังงาน ~ 0.8 kJ/mol (Perez-Garcia *et al.*, 2010)

ในการทดลองนี้ยังพบว่า เซลล์ของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic โดยใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน มีขนาดใหญ่กว่าการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic สอดคล้องกับงานวิจัยของ Heredia-Arroyo *et al.* (2011) ที่พบว่า *Chlorella vulgaris* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวเช่นเดียวกัน เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา เนื่องจาก glucose มีผลโดยตรงต่อกระบวนการใช้คาร์บอนในเมแทบอลิซึม ขนาดของเซลล์ ความหนาแน่นของสารต่างๆ ที่สะสมอยู่ในเซลล์ เช่น แป้งและไขมัน รวมทั้งโปรตีน คลอโรฟิลล์ RNA และวิตามิน

ปริมาณ glucose ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0.01 0.02 และ 0.05 M ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณ 1.8 3.6 และ 9 $g.L^{-1}$ ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของ glucose ที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 0.05 M ดังนั้น หากต้องการทราบความเข้มข้นของ glucose มากที่สุดที่สาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 จะเจริญได้ ควรจะต้องมีการทดลองต่อไป เพื่อทราบความเข้มข้นสูงที่สุดที่สาหร่ายดังกล่าวจะเจริญได้ เนื่องจากปริมาณ หรือความเข้มข้นของ glucose จะส่งผลต่อการเจริญของสาหร่าย หากมีปริมาณมากเกินไป จะมีผลยับยั้งการเจริญได้ สำหรับปริมาณ glucose ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กนั้นยังคงมีความผันแปร ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย ยกตัวอย่างรายงานของ Heredia-Arroyo *et al.* (2011) พบว่าปริมาณของ glucose ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus acutus* คือ 10 $g.L^{-1}$ และ 1 $g.L^{-1}$ ตามลำดับ ส่วน *Chlorella saccharophila* จะเจริญได้ดีในอาหารที่มี glucose 2.5 $g.L^{-1}$ หากความเข้มข้นมากกว่า 25 $g.L^{-1}$ จะยับยั้งการเจริญของสาหร่ายดังกล่าว ขณะที่สาหร่าย *C. sorokiniana* จะไม่เจริญในอาหารที่มี glucose มากกว่า 5 $g.L^{-1}$ ขณะที่ Shi *et al.* (1999) พบว่า *Chlorella protothecoides* จะให้ชีวมวลสูงที่สุดในอาหารที่มี glucose ถึง 85 $g.L^{-1}$ ส่วนสาหร่ายสีแดง *Galdieria sulphuraria* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี glucose หรือ fructorse 166 $g.L^{-1}$ (0.9 M) (Schmidt *et al.*, 2005)

สำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้ glycerol และ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณชีวมวล และผลผลิตไขมันที่ได้จาก *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณน้อยกว่าการใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้ glycerol และ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอน มีแนวโน้มใกล้เคียงกัน ขณะที่งานวิจัยของ Heredia-Arroyo *et al.* (2011) ซึ่งได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* เพื่อสะสมไขมัน พบว่าชีวมวลของ *C. vulgaris* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ mixotrophic จะมีปริมาณมากกว่า

การเพาะเลี้ยงแบบอื่นๆ และพบว่าการใช้ acetate เป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้สาหร่ายมีการเจริญดีกว่าการใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน

สาหร่ายขนาดเล็กที่นิยมใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน แม้จะมี glucose อยู่ด้วยก็ตาม จะเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่อยู่ในบริเวณที่มีแรงดันออสโมติกสูงกว่าปกติ เช่น น้ำทะเล หรือน้ำที่มีเกลือปะปนอยู่ เนื่องจาก glycerol จัดเป็น osmoticum ซึ่งหมายถึง สารที่สามารถช่วยรักษาสมดุลออสโมติกภายในเซลล์ได้ (Richmond, 1986) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาการใช้ glycerol โดย *Scenedesmus* sp. AARL G022 ซึ่งสาหร่ายในจีนัสนี้ยังไม่มีรายงานถึงความสามารถในการใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายที่มีรายงานว่าสามารถใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน และมีอัตราการเจริญสูง รวมถึงมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีวเคมีบางประการที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงนั้น ยังมีจำนวนชนิดไม่มากนัก เช่น *Nannochloropsis* sp., *Rhodomonas reticulate* และ *Cyclotella* สาหร่ายเหล่านี้แสดงแนวโน้มในการใช้ glycerol ในการเจริญได้ดีกว่าใช้ glucose หรือ acetate แต่ทั้งนี้ต้องมีการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมบางประการ เช่น มีการเติมไนเตรทเพิ่มในอาหารเพาะเลี้ยง (Wood *et al.*, 1999) สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าสาหร่าย *Agmenellum quadruplicatum, Goniotrichium elegans, Navicula pelliculosa* และ *Nostoc* sp. จะใช้เพียง glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง และปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์จากภายนอกเข้าสู่ระบบเพาะเลี้ยง (Perez-Garcia *et al.*, 2010)

สาหร่ายขนาดเล็กที่เจริญในสภาวะ heterotrophic สามารถใช้กรดคาร์บอกซิลิกละลายน้ำ(dissolved carboxylic acids) หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่นกรด acetic, citric, fumaric, glycolic, lactic, malic, pyruvic และ succinic เป็นต้น (Bollman and Robinson, 1977) สำหรับ acetate หรือ acetic acid นั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์รวมทั้งสาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดนิยมใช้ แต่ต้องมีปริมาณไม่สูงนัก เนื่องจาก acetate ในปริมาณสูงจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ได้ รวมถึงการใช้ sodium หรือ potassium acetate ซึ่งจะทำ alkali ions เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่า pH ในระบบเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นได้ แม้ว่าในระบบจะมี pH buffer ก็ตาม ทั้งนี้ความสามารถในการเจริญของสาหร่ายในแหล่งอาหารที่มี acetate ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายด้วยเช่นกัน เช่น *Chlamydomonas mundane* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี acetate (Wood *et al.*, 1999) ส่วน *Euglena gracillis* strain L เจริญได้ดีเมื่อมี acetate และแสงเพียงพอ ซึ่งตรงกันข้ามกับ *E. gracillis* var. *bacillaris* ที่จะใช้ acetate ได้ดีในภาวะที่ไม่มีแสง และมีความเข้มข้นไม่เกิน 5 $g.L^{-1}$ (Cook, 1968) ขณะที่งานวิจัยของ Vazhappilly and Chen (1998) พบว่า *Crypthecodinium cohnii* เจริญได้ในสภาวะ heterotrophic ที่มี acetate 1 $g.L^{-1}$ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ

Combres *et al.* (1994) ได้รายงานว่า *Scenedesmus obliquus* เจริญในอาหารที่มี acetate เข้มข้นสูงสุด 20 mM สำหรับงานวิจัยนี้พบว่า การเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในอาหารที่มี sodium acetate ความเข้มข้น 0.01 0.02 และ 0.05 M ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณ 0.82 1.64 และ4.10 $g.L^{-1}$ ตามลำดับ ให้ผลผลิตชีวมวลและกรดไขมันไม่แตกต่างกันในอาหารทั้ง 3 ความเข้มข้น จึงมีแนวโน้มว่าสาหร่าย *Scenedesmus* sp. AARL G022 สามารถเจริญในอาหารที่มี sodium acetate ในความเข้มข้นที่สูงกว่าที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้

2. การศึกษาผลของระยะเวลาให้แสงและไม่ให้แสงในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ mixotrophic

แสงเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญของสาหร่าย โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงในสภาวะ phototrophic, mixotrophic และ photoheterotrophic ซึ่งต้องการใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน ปกติสาหร่ายจะมีการหายใจในเวลากลางคืน และใช้ไขมันที่สะสมอยู่ในเซลล์เป็นแหล่งพลังงาน ในสภาวะธรรมชาติจะพบว่าในเวลากลางคืนปริมาณไขมันในสาหร่ายจะลดลง 15 – 20% (Chini Zittelli *et al.*, 1999) ความต้องการระยะเวลาของการไม่มีแสงและมีแสงในช่วงวัน (dark : light cycle) จะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย การได้รับปริมาณแสงที่ไม่เหมาะสม จะส่งผลต่อกิจกรรมภายในเซลล์ของสาหร่ายได้ ช่วงการไม่มีแสงและมีแสงดังกล่าวจึงมีผลต่อจึงการเจริญและการสะสมไขมันของสาหร่าย (Chun *et al.*, 2011) เช่น งานวิจัยของ Lee and Lee (2001) พบว่า การเพาะเลี้ยง *Chlorella kessleri* ในน้ำเสียสังเคราะห์ ในสภาวะที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ได้รับแสง 12 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายในความเข้มข้นที่น้อยกว่าการได้รับแสงตลอดเวลา สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบ mixotrophic โดยให้แสงตลอดเวลา และการให้แสง 16 ชั่วโมง ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง จะได้ชีวมวลสูงที่สุด เท่ากับ 4.0372±0.364 และ 3.5589±0.109 $g.L^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับปริมาณผลผลิตไขมันของสาหร่ายที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมง สลับกับการไม่ได้รับแสง 8 ชั่วโมง มีปริมาณผลผลิตไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 396.347±11.601 $g.L^{-1}$ ดังนั้นหากต้องเลือกสภาวะการให้แสงที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการขยายระดับการเพาะเลี้ยง การให้แสง 16 ชั่วโมง ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมงจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เมื่อเทียบการให้แสงตลอดเวลา แม้จะได้ชีวมวลของสาหร่ายที่ใกล้เคียงกัน แต่สภาวะแรกจะให้ปริมาณผลผลิตไขมันสูงกว่า

3. การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 40 ลิตร

การศึกษาเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงขนาด 40 ลิตร 2 แบบ คือถังเพาะเลี้ยงแบบ flat plate และแบบ column ซึ่งเป็นแบบที่นิยมใช้ทั่วไป และใช้ในการเพาะเลี้ยงในระดับใหญ่เชิงพาณิชย์ (Posten, 2009; Kunjapur and Eldridge, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ phototrophic เนื่องจากการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะ heterotrophic และ mixotrophic จะพบปัญหาการปนเปื้อนสูง โดยเฉพาะจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายเรื่องที่ได้เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะต่างๆ เช่น Scarsella *et al.* (2010), Perez-Garcia *et al.* (2010), Heredia-Arroyo *et al.* (2011) เป็นต้น

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นเวลาประมาณ 45 วัน พบว่าการเจริญของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงแบบ flat plate เร็วกว่าถังเพาะเลี้ยงแบบ column และได้ปริมาณชีวมวล และผลผลิตไขมันที่ได้สูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากถังเพาะเลี้ยงแบบ flat plate มีความเหมาะสมต่อการเจริญของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ซึ่งมีความต้องการแสงปริมาณมากในการเจริญ สอดคล้องกับรายงานของ Posten (2009) และ Brennan and Owende (2010) ที่กล่าวว่า สาหร่ายที่เจริญในถังเพาะเลี้ยงแบบ flat plate จะมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงดีกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในถังแบบ column

4. การคำนวณต้นทุนค่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาจากผลการคำนวณที่ได้จะพบว่า *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ mixotrophic ที่ใช้ glucose เข้มข้น 0.05 M จะมีต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่ำที่สุด คือ ต้นทุนชีวมวล เท่ากับ 817.39 บาทต่อกิโลกรัม ต้นทุนไขมัน เท่ากับ 9,729.20 บาทต่อกิโลกรัม สาเหตุที่ต้นทุนของการใช้ glycerol และ sodium acetate เป็นแหล่งคาร์บอนมีราคาสูงกว่าการใช้ glucose มากเนื่องจากในการทดลองนี้ใช้สารเคมีที่เป็น analytical grade ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงและมีราคาสูง แต่ในท้องตลาดยังมีสารดังกล่าวที่มีความบริสุทธิ์ต่ำกว่า analytical grade คือ ระดับ commercial grade และ food grade จะมีราคาต่ำกว่าเช่น glycerol ราคาเพียง 75 บาทต่อกิโลกรัม และ sodium acetate ราคาเพียง 50 บาทต่อกิโลกรัม ซึ่งการใช้สารเคมีในระดับดังกล่าวสามารถช่วยลดต้นทุน glycerol และ sodium acetate ลงได้อีกประมาณ 20 และ 30 เท่า ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ควรจะต้องมีการทดลองเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันความสามารถของสาหร่ายในการใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน

การทดลองเพาะเลี้ยง *Scenedesmus* sp. AARL G022 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนมากกว่าสองแหล่งขึ้นไป เพื่อเพิ่มผลผลิตทั้งชีวมวล และไขมัน (Perez-Garcia *et al.*, 2010) นับได้ว่าเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก เช่น corn powder hydrolysate (CPH) (Xu *et al.*, 2006) น้ำทิ้งจากการเกษตรกรรม หรือโรงงานอุตสาหกรรม (Cantrell *et al.*, 2008; de-Bashan and Bashan, 2010) เป็นต้น

แม้ว่าต้นทุนผลผลิตของสาหร่ายจากการวิจัยในครั้งนี้ จะยังถือได้ว่ามีราคาสูง แต่ทำให้ได้ทราบถึงศักยภาพของ *Scenedesmus* sp. AARL G022 ที่สามารถเจริญในสภาวะ mixotrophic และใช้ glucose, glycerol และ acetate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ผลการวิจัยที่ได้จะเป็นความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ของประเทศไทยเพื่อนำไปผลิตน้ำมันชีวภาพ ใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน หรือพลังงานทางเลือกได้ต่อไป