

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากภาวะวิกฤตการณ์น้ำมันทำให้ประเทศต่างๆ ต้องหาแหล่งพลังงานทดแทน และที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในตอนนี้เห็นจะเป็นไบโอดีเซล (biodiesel) ซึ่งไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันจากจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำมันหรือลิวินินทั้งสาหร่าย ยีสต์ และเชื้อรา โดยสาหร่ายเป็นหนึ่งในแหล่งทรัพยากรชีวภาพที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นเป็นแหล่งพลังงานทดแทน เนื่องจากเจริญเติบโตเร็วและสามารถเลี้ยงในอาหารแบบง่ายๆ ในระดับการผลิตขนาดใหญ่ได้ และสาหร่ายขนาดเล็กยังมีการสะสมลิวินินสูงเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม การใช้สาหร่ายเป็นพลังงานทดแทนโดยการนำลิวินินที่สะสมในเซลล์สาหร่ายมาผลิตไบโอดีเซลโดยผ่านกระบวนการ transesterification หรือการใช้เซลล์สาหร่ายแห้งผสมโดยตรงกับน้ำมันดีเซลหรือไบโอดีเซล (Sheehan et al., 1998, Scragg et al., 2003)

สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) มีลิวินินและ fatty acids เป็นองค์ประกอบของเยื่อเซลล์เมมเบรน (membrane) บางชนิดมีน้ำมัน (oils) เป็นอาหารสะสมเก็บไว้ที่ถุงที่หุ้มเยื่อหุ้มเซลล์และบางสายพันธุ์สะสมน้ำมันไว้มากกว่า 50% ของมวลเซลล์ทั้งหมด น้ำมันจากสาหร่ายมีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันพืช สามารถนำน้ำมันออกจากเซลล์สาหร่ายโดยการบีบอัดได้ถึง 70% ของลิวินินทั้งหมด (Danielo, 2005) สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella protothecoides* เป็นสาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตทั้งแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) และไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ต่างกันจะมีการสร้างลิวินินปริมาณต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงแบบ heterotrophic มีอัตราการเจริญเร็วและให้ปริมาณลิวินินสูง (Shi et al., 2002 ; Miao et al., 2004 ; Miao and Wu, 2006) นอกจากนั้นการลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella emersonii* , *C. minutissima* จะเพิ่มปริมาณการสะสมลิวินินในเซลล์ของสาหร่ายถึง 63% และ 56% ตามลำดับ ซึ่งปริมาณลิวินินที่พบสะสมในเซลล์สาหร่ายจะสัมพันธ์โดยตรงกับค่า calorific value ซึ่งค่าดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์สาหร่าย (Illman et al., 2000)

สาหร่ายขนาดเล็กโดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียวเป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีรายงานการสะสมลิวินินสูงและเจริญอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำตามธรรมชาติและดินชุ่มน้ำ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อนำลิวินินจากสาหร่ายไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งแบบการสังเคราะห์แสงโดยใช้พลังงานแสงจากดวงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์ (photoautotrophic culture) และการเลี้ยงโดยใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (heterotrophic culture) ในสภาวะที่ไม่มีแสง มีรายงานว่า การเลี้ยงสาหร่ายแบบ heterotrophic culture นั้นสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีการสะสมลิวินินสูงภายในเซลล์ การศึกษานี้เป็นการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากตัวอย่างน้ำในบริเวณเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี และเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการผลิตลิวินินภายในเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้คาดว่าจะได้สาหร่ายที่มีการผลิตและสะสมลิวินินสูงในเซลล์ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อคัดเลือกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ผลิตลิปิดสูงจากน้ำบริเวณต่างๆ ในเขตพื้นที่เขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ดังนี้

- 1) เพื่อคัดแยกและคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากตัวอย่างน้ำจืด
- 2) เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ให้สะสมลิปิดสูงทั้งแบบสังเคราะห์แสงและแบบไม่มีแสงในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้บทความตีพิมพ์ในวารสารวิชาการที่เป็นที่ยอมรับระดับชาติหรือระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง
2. สามารถผลิตบัณฑิตระดับปริญญาตรีอย่างน้อย 1 คน
3. ข้อมูลที่ได้จากผลงานวิจัยนี้จะนำไปสู่การวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

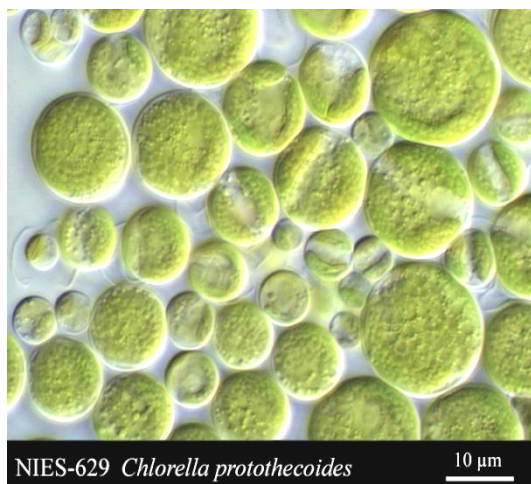
คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่ผลิตและสะสมลิปิดสูงจากตัวอย่างน้ำ ในเขตพื้นที่เขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี และพื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์ ลุ่มน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น จากนั้นศึกษาสภาวะแวดล้อมที่มีผลการเจริญและการผลิตลิปิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้

1.5 สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

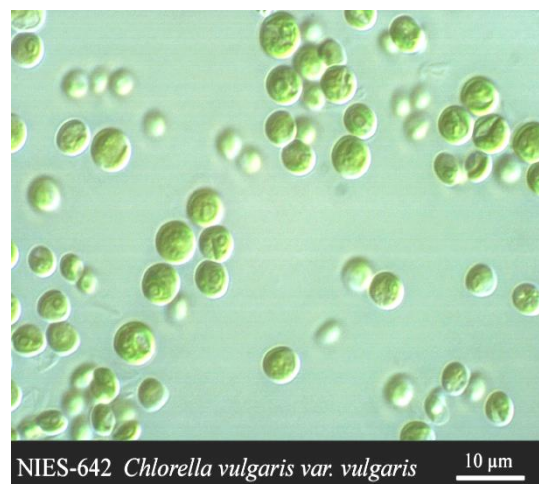
สาหร่ายขนาดเล็กที่มีรายงานการวิจัยว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งน้ำมัน bio-oils มีหลายชนิด ทั้งสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเล เช่น *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, *Spirulina platensis*, cyanobacteria, *Botryococcus* sp., *Chlorella* sp. และไดอะตอม (diatom) (Danielo, 2005) หนึ่งในกลุ่มสาหร่ายขนาดเล็กที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนคือสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสกุล *Chlorella* sp, *Nannochloropsis* sp. เนื่องจากลิปิดที่สกัดได้จากมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับน้ำมันพืช ซึ่งสามารถนำไปผลิตไบโอดีเซลได้ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อนำลิปิดในเซลล์ไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งแบบการสังเคราะห์แสงโดยใช้พลังงานแสงและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน (photoautotrophic culture) และการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในสภาวะที่ไม่มีแสง (heterotrophic culture) โดยสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กหลายสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 แบบ (Shi et al., 2002 ; Wen et al., 2002 ; Miao and Wu, 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถเจริญได้ทั้งแบบสังเคราะห์แสงและแบบไม่มีแสง

2.1 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes)

ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes) คือ คลอโรพลาสต์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b สารสีประกอบได้แก่แคโรทีน (carotene) ส่วนแซนโทฟิล (xanthophyll) ได้แก่ lutein, diatoxanthin และ neoxanthin โดยสารสีรวมอยู่ในคลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนและมีมากกว่า 1 อัน สาหร่ายสีเขียวอาจมีหรือไม่มีผนังเซลล์ ถ้าไม่มีผนังเซลล์ก็จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ pellicle, periplast อาหารสะสมเป็นแป้ง (starch) ได้แก่ true starch หรือ paramylon ซึ่งเป็นแป้งที่พบในพืชชั้นสูงอยู่ในไซโตพลาสซึมหรือคลอโรพลาสต์ จำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียวตามรูปร่างลักษณะของเซลล์ ได้ 3 Class ได้แก่ Class Chlorophyceae, Class Prasinophyceae และ Class Euglenophyceae (Harold and Michael, 1978) สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* จัดอยู่ใน Order Chlorococcales, Family Oocystaceae และ Genus *Chlorella* เซลล์อยู่เดี่ยวๆ (unicellular) หรืออยู่รวมกันเป็นกระจุก (colony) รูปร่างกลมหรือรี (spherical) ดังรูปที่ 2.1 คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยหรือเป็นแผ่นอยู่ริมเซลล์ มี chlorophyll a, b อาจมีหรือไม่มีไพเรโนอยด์ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยแบ่งเซลล์ โดยทั่วไปสาหร่ายสีเขียวต้องการไนโตรเจนในการเจริญเติบโต อาหารสะสมส่วนใหญ่คือแป้ง amylose และ amylopectin สะสมอยู่ใน pyrenoid ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ที่เหลือจะสะสมอาหารอยู่ในรูปน้ำมันและกลีเซอรอลภายในเซลล์ บางสายพันธุ์มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้สูงและมีความทนทานต่อคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูง (Harold and Michael, 1978)



(1) *Chlorella protothecoides*



(2) *Chlorella vulgaris var. vulgaris*

รูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris var. vulgaris* (ที่มา: <http://shigen.lab.nig.ac.jp/algae>)

2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

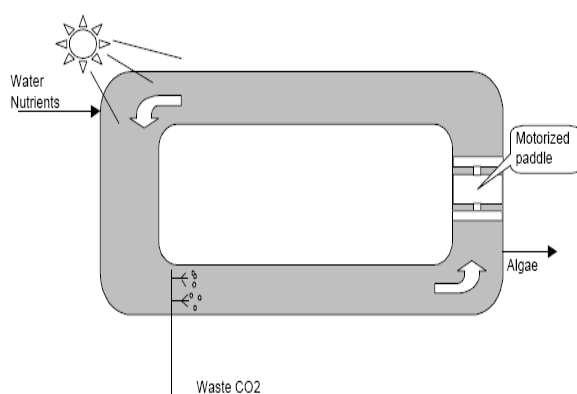
การผลิตเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กสามารถผลิตได้ 2 แบบคือ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบใช้แสง (photoautotrophic cultivation) และการเลี้ยงแบบไม่มีแสงโดยใช้อินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน หรือการเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก (heterotrophic cultivation) นอกจากนั้นยังมีการเพาะเลี้ยงแบบผสม (mixotrophic cultivation) และการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตเฮเทโรโทรฟิก (photo-heterotrophic cultivation) ดังนี้

2.2.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยการสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation)

การเจริญของสาหร่ายขนาดเล็กภายใต้การสังเคราะห์แสงนี้ต้องการแสง คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำและเกลืออนินทรีย์ อุณหภูมิควรอยู่ประมาณ $20\text{--}30^\circ\text{C}$ อาหารเลี้ยงสาหร่ายจะต้องมีสารอนินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) เหล็กเป็นส่วนประกอบ (Grobbelaar, 2004) เซลล์สาหร่ายขนาดเล็กประกอบด้วยคาร์บอนประมาณ 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Sanchez Miron et al., 2003) โดยคาร์บอนทั้งหมดนี้เปลี่ยนมาจาก CO_2 นอกจากนั้นการผลิตเซลล์สาหร่ายเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลสามารถใช้ CO_2 ที่ปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิต (Sawayama et al., 1995 ; Yun et al., 1997) เทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดใหญ่คือการเพาะเลี้ยงในระบบบ่อเปิดแบบรางคู่ (raceway pond) และเพาะเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง (photobioreactor) (Molina Grima et al., 1999)

1) ระบบบ่อเปิดแบบรางคู่ (Raceway pond)

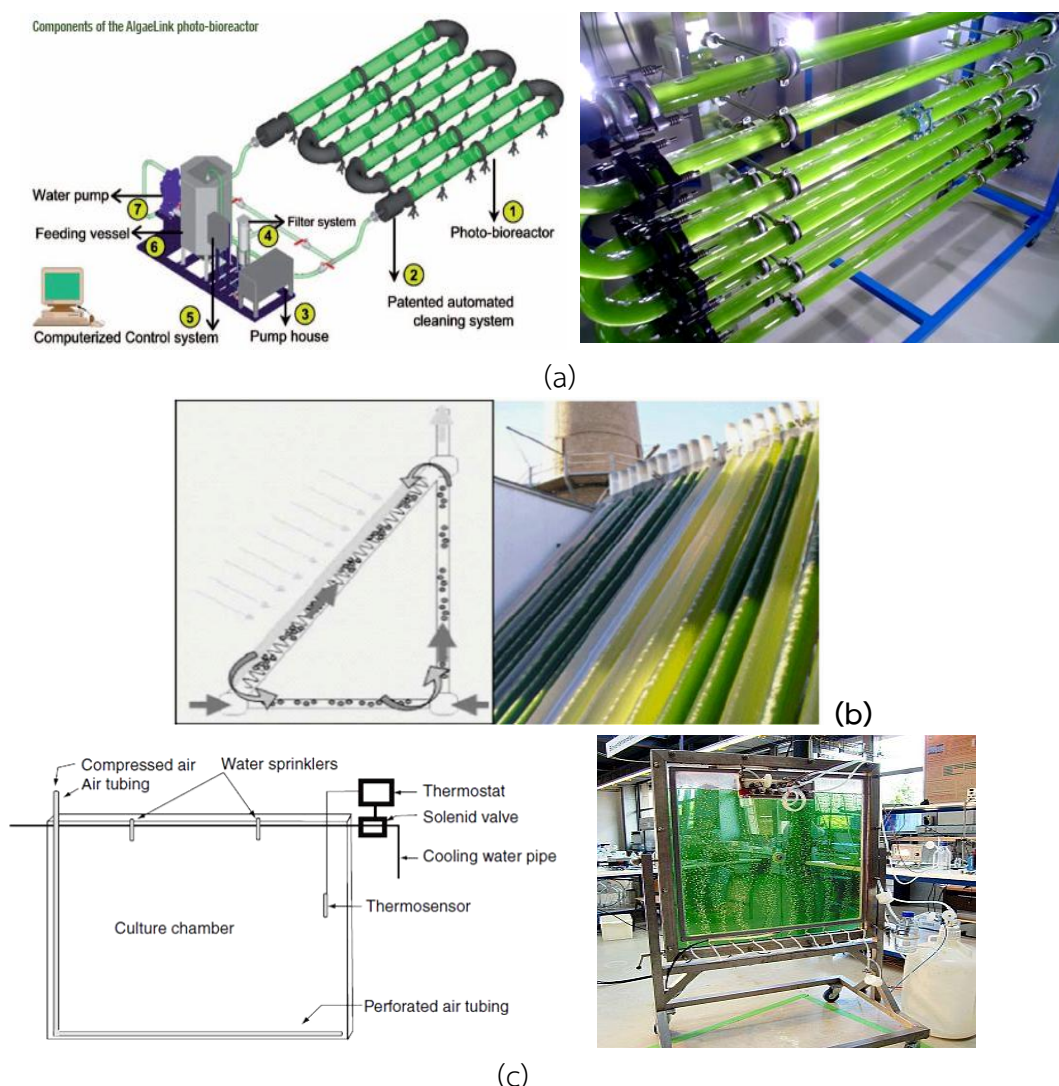
ระบบบ่อเปิดแบบรางคู่เป็นระบบที่มีการไหลเวียนของอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์สาหร่ายตลอดเวลา โดยปกติบ่อซึ่งอาจทำจากคอนกรีตหรือดินอัดแน่นจะมีความลึกประมาณ 0.3 เมตร (รูปที่ 2.2) การไหลเวียนทำโดยใช้ใบพัดและมีแผ่นกั้นเพื่อให้เกิดการผสมผสานที่ดี การเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในบ่อเปิดแบบรางคู่เริ่มดำเนินงานตั้งแต่ ค.ศ. 1950 ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่มีข้อมูลความพร้อมทั้งทางเทคนิคการสร้างบ่อและการดำเนินการเพาะเลี้ยง ส่วนปัญหาที่พบคือประสิทธิภาพการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ของสาหร่ายและการผสมผสานในบ่อค่อนข้างต่ำรวมทั้งการระบายความร้อนออกจากระบบเกิดขึ้นจากการระเหยเท่านั้น นอกจากนั้นยังมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนจากสาหร่ายและจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ส่วนข้อดีคือราคาต่ำ ก่อสร้างบ่อและดำเนินการไม่สูง ตัวอย่างการเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบนี้ เช่น การผลิตเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียในบ่อขนาดใหญ่ประมาณ 440,000 ตารางเมตร ของบริษัท Earthrise Nutritional ซึ่งใช้ในการผลิตเซลล์ของสาหร่ายกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย



รูปที่ 2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเปิดแบบรางคู่ (Sheehan et al., 1998)

2) ระบบแบบปิดในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง (closed photobioreactor (PBR) systems)

ระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสงประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในการผลิตเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ปริมาณสูง ตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง เช่น เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสงชนิดท่อ (Tubular photobioreactor ; tubular PBR) เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสงชนิดแผ่นเรียบ (flat plate photobioreactor) และแบบคอลัมน์ (column photobioreactor ; column PBR) (รูปที่ 2.3) ระบบนี้ให้ผลผลิตมวลเซลล์สูงทำให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยลดลงและใช้ได้กับสาหร่ายหลายสายพันธุ์ (ตารางที่ 2.1)



รูปที่ 2.3 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสงชนิดต่างๆ; (a): Tubular PBR, (b): Column PBR (air lift reactor), (c): Flat Plate PBR

(ที่มา <http://www.oilgae.com/ref/glos/photobioreactor.html>, <http://bioconceptsllc.com>, Schenk et al., 2008, <http://www.oilgae.com/algae/cult/pbr/typ/flp/flp.html>, http://www.kit.edu/english/55_604.php)

ตารางที่ 2.1 ข้อดีและข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบบ่อเปิดแบบรางคู่และระบบปิดในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ (Ugwu et al., 2008; Brennen and Owende, 2010)

ระบบการเพาะเลี้ยง	ข้อดี	ข้อจำกัด
ระบบบ่อเปิดแบบรางคู่ (raceway pond)	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการทำความสะอาด ใช้พื้นที่ที่ไม่สามารถปลูกพืชได้ ใช้พลังงานต่ำ บำรุงรักษาง่าย เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์	ให้ผลผลิตมวลเซลล์ต่ำ ต้องการพื้นที่สูง สาหร่ายบางสายพันธุ์เท่านั้นที่เจริญได้ การผสมผสาน การใช้แสงและ CO ₂ ต่ำ ปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นง่าย
Tubular PBR	พื้นที่รับแสงสูง ราคาต้นทุนต่ำ เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง ให้ผลผลิตมวลเซลล์สูง	สาหร่ายเจริญเกาะติดผนังท่อ ต้องการพื้นที่มากในการติดตั้งเครื่อง มีความแตกต่างของระดับ pH, DO และ CO ₂ ตามความยาวของท่อ
Flat plate PBR	ให้ผลผลิตมวลเซลล์สูง การสะสมออกซิเจนต่ำ พื้นที่รับแสงสูงและแสงผ่านได้ดี เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง	ต้องการอุปกรณ์จำนวนมากเพื่อขยาย ขนาดเพาะเลี้ยงให้ใหญ่ขึ้น ยากต่อการควบคุมอุณหภูมิ มีการเจริญเกาะติดผนังเครื่อง
Column PBR	ขนาดกะทัดรัด การถ่ายเทมวลสูง ใช้พลังงานต่ำ การผสมผสานดีเกิดแรงเฉือนต่ำ ขยายขนาดเพาะเลี้ยงได้ดี	ราคาสูงเมื่อเปรียบเทียบกับแบบบ่อเปิด เมื่อขยายขนาดเพาะเลี้ยงพื้นที่รับแสง ลดลง การสร้างค่อนข้างยุ่งยาก

ความแตกต่างของการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนต่ำมากนั้นหมายถึงมีเพียงสาหร่ายสายพันธุ์ที่เลี้ยงเท่านั้นเจริญอยู่ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสงประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในการผลิตเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ปริมาณสูง ส่วนการเลือกใช้ระบบใดในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้นต้องคำนึงถึงชนิดของสาหร่ายด้วย (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายและระบบเพาะเลี้ยง (Pulz and Gross, 2004)

สายพันธุ์สาหร่าย/กลุ่ม	วิธีการเพาะเลี้ยง
<i>Spirulina</i> , <i>Arthrospira platensis</i> /Cyanophyta	Open ponds, natural lakes
<i>Chlorella vulgaris</i> /Chlorophyta	Open ponds, basins, glass-tube, PBR
<i>Dunaliella salina</i> /Chlorophyta	Open ponds, PBR
<i>Haematococcus pluvialis</i> /Chlorophyta	Open ponds, PBR
<i>Porphyridium cruentum</i> /Rhodophyta	Tubular PBR
<i>Muriellopsis</i> sp. / Chlorophyta	Open ponds, PBR

2.2.2 การผลิตเซลล์สาหร่ายโดยการเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก

สาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ทั้งภายใต้การสังเคราะห์แสงและภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงโดยการใช้อินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เรียกว่าการเจริญแบบเฮเทอโรโทรฟิก เช่น สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อ

เจริญภายใต้สภาวะไม่มีแสงให้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่าการเจริญภายใต้สภาวะการสังเคราะห์แสงถึง 4 เท่า ดังตารางที่ 2.3 ข้อดีอีกประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ heterotrophic cultivation คือน้ำมันสาหร่ายที่สกัดได้ไม่มีส่วนประกอบ

ของคลอโรฟิลล์ การเพาะเลี้ยงใช้เวลาสั้นกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี photoautotrophic cultivation และสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้นด้วยการเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป๋อง (fed-batch fermentation) เป็นต้น ส่วนสิ่งที่น่าจะเป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแบบไม่มีแสงคือ ราคาและแหล่งของอินทรีย์คาร์บอน แต่ปัจจุบันจะเห็นว่ามีแหล่งอินทรีย์คาร์บอนราคาถูกหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ เช่น วัสดุชีวภาพประเภทแป้งราคาถูกชนิดต่างๆ น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรต่างๆ ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาล และวัสดุทางการเกษตร เช่น กากมันสำปะหลัง เป็นต้น

ตารางที่ 2.3 ปริมาณองค์ประกอบของเซลล์สาหร่าย *Chlorella protothecoides* เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ photoautotrophic cultivation และ heterotrophic cultivation (Xu et al., 2006)

Component (%)	photoautotrophic cultivation	heterotrophic cultivation
Protein	52.64	10.28
Lipid	14.57	55.20
Carbohydrate	10.62	15.43
Ash	6.36	5.93
Moisture	5.39	1.96
Others	10.42	11.20

2.2.3 การเพาะเลี้ยงแบบผสมหรือมิกโซโทรฟิก

การเพาะเลี้ยงแบบนี้ใช้สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (CO₂) เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแหล่งพลังงานได้จากแสงและสารอินทรีย์ การเพาะเลี้ยงแบบนี้สาหร่ายเจริญได้ทั้งแบบใช้แสงและไม่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน เมื่อใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนผ่านกระบวนการหายใจจะได้ CO₂ และสาหร่ายตรึง CO₂ กลับไปใช้เพื่อสังเคราะห์แสงได้ โดยทั่วไปอัตราการเจริญของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบนี้จะสูงกว่าแบบสังเคราะห์แสงแต่ต่ำกว่าแบบเฮเทโรโทรฟิก เมื่อเพาะเลี้ยง *Spirulina* sp. แบบมิกโซโทรฟิก อัตราการเจริญสูงกว่าแบบสังเคราะห์แสงและแบบเฮเทโรโทรฟิก

2.2.4 การเพาะเลี้ยงแบบโฟโตเฮเทโรโทรฟิก

การเพาะเลี้ยงแบบนี้เกิดเมื่อสาหร่ายใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานและใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ความแตกต่างของการเพาะเลี้ยงแบบโฟโตเฮเทโรโทรฟิกและแบบมิกโซโทรฟิก คือ แบบแรกต้องการแสง ส่วนแบบที่สองมีแสงหรือไม่ก็ได้ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบนี้มีการใช้น้อยเนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนและเครื่องมือราคาสูง

จากข้อมูลที่กำลังมาจะเห็นว่าสาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ในสภาวะเฮเทโรโทรฟิกจะเจริญได้ดีและให้ปริมาณเซลล์และลิปิดสูงเมื่อเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก แต่เกิดการปนเปื้อนง่ายและการใช้สารอินทรีย์คาร์บอนทำให้ต้นทุนสูงจึงต้องใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก เช่น ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม

เกษตร เป็นต้น ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบสังเคราะห์แสงมีมากที่สุดโดยมุ่งใช้ CO₂ จากโรงงานอุตสาหกรรม (flue gas) เพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก ส่วนข้อมูลวิจัยการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิกและโฟโตเฮเทโรโทรฟิกมีน้อยอาจมาจากต้นทุนสูง ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

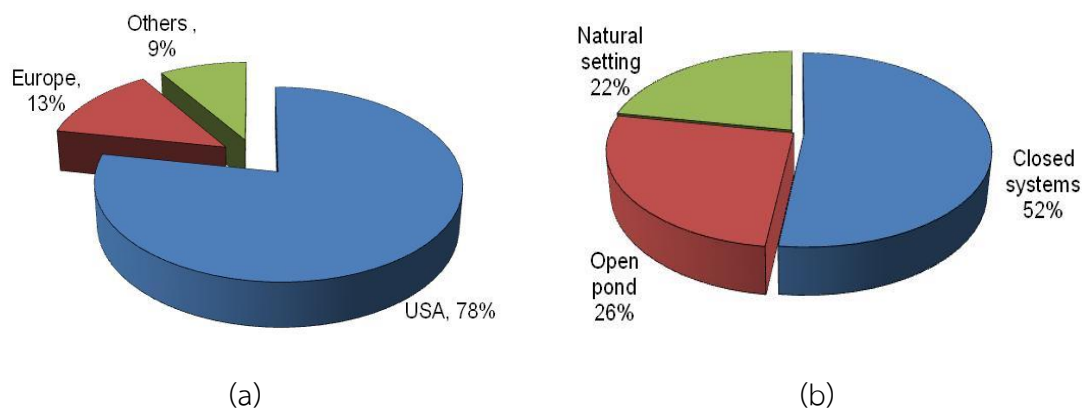
ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบความแตกต่างของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะต่าง ๆ (Chen et al., 2011)

สภาวะการเพาะเลี้ยง	แหล่งพลังงาน	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณเซลล์	ระบบเพาะเลี้ยง	ราคา	อุปสรรคการขยายขนาดผลผลิต
Photoautotrophic cultivation	แสง	สารอินทรีย์ (CO ₂)	ต่ำ	บ่อเปิด ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง	ต่ำ	ปริมาณมวลเซลล์ต่ำ ต้นทุนสูง ควบคุมการระเหยน้ำยาก
Heterotrophic cultivation	สารอินทรีย์	สารอินทรีย์	สูง	ถังหมักทั่วไป	ปานกลาง	การปนเปื้อนสารอาหารราคาสูง
Mixotrophic cultivation	แสงและสารอินทรีย์	สารอินทรีย์และอินทรีย์	ปานกลาง	ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง	สูง	การปนเปื้อนเครื่องมือและสารอาหารราคาสูง
Photoheterotrophic cultivation	แสง	สารอินทรีย์	ปานกลาง	ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง	สูง	การปนเปื้อนเครื่องมือและสารอาหารราคาสูง

2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายตามภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก

Piccola (2009) รายงานสถานการณ์การพัฒนาการผลิตน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพของสหภาพยุโรป (EU) โดย UK Carbon Trust ลงทุน 26 ล้านปอนด์เพื่อผลิตสาหร่ายโดยวางแผนตั้งโรงงานเพาะเลี้ยงสาหร่ายในแอฟริกาเหนือ และในปี ค.ศ. 2009 ให้ทุนวิจัย 8 ล้านปอนด์แก่โครงการ Algae Biofuel Challenge (ABC) ซึ่งโครงการ ABC ดำเนินงาน 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 มีเป้าหมายพัฒนาการวิจัยและศึกษาพื้นฐาน ส่วนระยะที่ 2 มีเป้าหมายเพื่อผลิตน้ำมันสาหร่ายในระดับใหญ่ รัฐบาลประเทศสกอตแลนด์ให้เงินสนับสนุน 6 ล้านยูโรแก่โครงการ BioMara เพื่อวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล (seaweed) ให้เจริญเร็วและมีปริมาณมวลเซลล์สูง บริษัท Aurantia ของประเทศสเปนและบริษัท Green Fuel Tech of Massachusetts ของประเทศสหรัฐอเมริการ่วมมือกันผลิตน้ำมันสาหร่ายในปี 2007 ด้วยทุนจำนวน 92 ล้านดอลลาร์ และมีเป้าหมายตั้งโรงงานในพื้นที่ 100 เฮกตาร์เพื่อผลิตเซลล์สาหร่าย 25,000 ตัน/ปี โดยใช้ CO₂ จากโรงงานผลิตปูนซีเมนต์ที่ตั้งอยู่ใกล้เคียงกันที่เมือง Jerez

ในประเทศสเปน ข้อมูลการพัฒนาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายส่วนใหญ่จะอยู่ที่สหรัฐอเมริกา (รูปที่ 2.4) สำหรับข้อมูลการผลิตสาหร่ายในภูมิภาคต่างๆ ของโลกแสดงดังตารางที่ 2.5 (Singh and Gu, 2010)



รูปที่ 2.4 ร้อยละของบริษัทที่ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายของภูมิภาคต่างๆ ของโลก (a) และ เทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่าย (b) (ดัดแปลงจาก Singh and Gu, 2010)

ตารางที่ 2.5 บริษัทผู้เพาะเลี้ยงและผลิตเซลล์สาหร่ายตามภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก (Singh and Gu, 2010)

บริษัท	ภูมิภาค	รายละเอียด
การเพาะเลี้ยงด้วยระบบบ่อเปิด		
LiveFuels, Menlo Park California	USA	ผลิต green crude oil จากสาหร่ายเพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับโรงกลั่น มีเป้าหมายผลิต bio-crude-oil ภายในปี 2010
PetroSun, Scottsdale, Arizona	USA	เป้าหมายผลิตน้ำมันสาหร่าย 4.4 ล้านแกลลอน/ปี และเซลล์สาหร่าย 110 ล้านปอนด์/ปี พัฒนาการผลิตน้ำมันเครื่องบินจากสาหร่าย (algae-to-jet)
การเพาะเลี้ยงในระบบปิด (closed systems)		
Solazyme, Inc., San Francisco	USA	ผลิตน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กแบบเฮเทโรโทรฟิก เป็นต้นแบบผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายชื่อ "Solodiesel"
Inventure Chemical Technology, Seattle	USA	บริษัททำงานภายใต้ลิขสิทธิ์การผลิตน้ำมันเครื่องบินจากสาหร่าย (algae-to-jet fuel)
Solix Biofuels, Fort Collins, Colorado	USA	ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายขนาดเล็ก เป้าหมายตั้งโรงงานใกล้ New Belgian Brewery โดยใช้ CO ₂ จากการผลิตเบียร์มาเพาะเลี้ยง
Aurora Biofuels	USA	ใช้สาหร่ายที่ปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อผลิตไบโอดีเซลภายใต้ลิขสิทธิ์ที่พัฒนาโดย University of California, Berkley

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและสะสมลิปิดของสาหร่ายขนาดเล็ก

2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium/nutrients)

การเพาะเลี้ยงไดอะตอมต้องการ Silicate เพื่อใช้ในการสร้างผนังชั้นนอกของเซลล์ นอกจากนี้สารอาหารที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีทั้ง trace metals และวิตามิน เช่น ไทอะมีน (thiamin, B1), cyanocobalamin (B12) และไบโอติน (biotin) ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงสาหร่าย เช่น Walne medium และ Guillard's F/2 medium นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงในระดับใหญ่อาจใส่เฉพาะธาตุอาหารที่จำเป็นและเติมปุ๋ยหมักที่ใช้ในการเกษตรหรือปุ๋ยเคมีก็ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนต่ำจะทำให้เซลล์สามารถผลิตลิปิดได้สูงขึ้น ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิคนั้นสิ่งสำคัญคืออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่า C/N ratio สูงจะทำให้เซลล์สะสมลิปิดได้สูง (Illman et al, 2000)

2.4.2 แสง (light)

แสงมีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้การสังเคราะห์แสง โดยทำหน้าที่เปลี่ยน CO₂ ไปเป็นสารอินทรีย์ (organic matter) โดยปริมาณความเข้มของแสง คุณภาพของสเปกตรัมและระยะเวลาในการรับแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยเฉพาะความเข้มของแสงมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายมากที่สุด ซึ่งปริมาณความต้องการแสงขึ้นอยู่กับปริมาตรของบ่อเลี้ยงหรือขนาดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสงและความหนาแน่นของสาหร่าย โดยแหล่งของแสงอาจมาจากแสงแดดหรือแสงหลอดฟลูออเรสเซนต์ การใช้แสงจากแหล่งอื่นนอกเหนือจากแสงแดดควรให้แสงอย่างน้อย 18 ชั่วโมง/วัน (Molina Grima et al, 1999; Sawayama et al, 1995; Chisti, 2007)

2.4.3 ค่าความเป็นกรด ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH)

ระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอยู่ที่ 7-9 การให้คาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงอาจทำให้ pH ขึ้นถึง 9

2.4.4 การกวน (agitation)

การกวนทำให้เกิดการผสมผสานอย่างทั่วถึงระหว่างเซลล์สาหร่ายและอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อป้องกันการตกตะกอนและเพื่อให้เซลล์สาหร่ายได้รับแสงในปริมาณเท่าๆกันทุกส่วน และเพื่อป้องกันการสะสมความร้อนในระบบโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง นอกจากนี้ยังเป็นการลดสะสมออกซิเจนในระบบการเพาะเลี้ยง (Pulz, 2001)

2.4.5 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอยู่ระหว่าง 20-24 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมอาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่ายส่วนใหญ่สาหร่ายสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 16-17 °C (Kessler, 1985; Chelf, 1990)

2.4.6 ความเค็ม (salinity)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลต้องการเกลือในการเจริญเติบโต ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีการเติมเกลือลงไปด้วย โดยปกติจะใช้น้ำทะเลในการเพาะเลี้ยงโดยเจือจางด้วยน้ำประปาให้มีค่าความเค็มหรือปริมาณเกลืออยู่ที่ 20-24 g/L (Chang and Yang, 2003; Chisti, 2007)

2.5 น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oil)

สาหร่ายขนาดเล็กมีลิปิดและกรดไขมันเป็นองค์ประกอบของเยื่อเซลล์เมมเบรน บางชนิดมีน้ำมัน (bio-oil) เป็นอาหารสะสมเก็บไว้ที่ถุงที่หุ้มเยื่อหุ้มเซลล์ สาหร่ายไดอะตอม (diatom) และ cyanobacteria มีการสะสมลิปิดสูงมากกว่า 30% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และบางสายพันธุ์สะสมน้ำมันไว้มากกว่า 50% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Danielo, 2005) โดยสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีการสะสมลิปิดต่างกัน เช่น *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris*, *Spirogyra* sp., *Euglena gracilis* และ *Spirulina maxima* มีสะสมลิปิด 16-40%, 14-22%, 11-21%, 14-20% และ 6-7% โดยน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ดังตารางที่ 2.6 (Becker, 1994) Miao และคณะ (2004) รายงานว่าน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides*, *Microcystis aeruginosa* มีค่า saturated fraction ของ alkane ที่เหมือนกันกับน้ำมันดีเซลนอกจากนั้นยังมีปริมาณออกซิเจนต่ำและมีค่าความร้อนสูงที่ 29 MJ/kg ความหนาแน่นที่ 1.16 kg/l

สาหร่ายขนาดเล็กที่มีรายงานการวิจัยว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งน้ำมันมีหลายชนิด ทั้งสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเล เช่น *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, *Spirulina platensis* สาหร่ายสีเขียวในสกุล *Chlorella* สาหร่ายกลุ่มไดอะตอม แต่ไดอะตอมมีความทนทานต่อการแปรผันของอุณหภูมิต่ำกว่าสาหร่ายสีเขียวสกุล *Chlorella* (Danielo, 2005) สาหร่ายขนาดเล็กสะสมลิปิดและกรดไขมันที่เซลล์เมมเบรนโดยเป็นแหล่งพลังงานสะสม ตารางที่ 2.7 แสดงปริมาณลิปิดที่พบในสาหร่ายชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2.6 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสายพันธุ์ต่างๆ ในรูปน้ำหนักแห้ง (%)

สายพันธุ์ของสาหร่าย	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	กรดนิวคลีอิก
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

ที่มา : Becker, (1994)

ตารางที่ 2.7 ปริมาณน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็กบางชนิด (Chisti, 2007)

สาหร่ายขนาดเล็ก	ปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

การสะสมลิปิดในสาหร่ายเกิดขึ้นในช่วงที่สภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงมีความเครียด เช่น ภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ acetyl-CoA carboxylase (ACCase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีไบโอตินเป็นส่วนประกอบ (biotin-containing enzyme) ทำหน้าที่ในการคาตาไลต์ในระยะเริ่มต้นของการสร้างกรดไขมัน (Ratledge, 2004) ไขมันหรือน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กมีคุณสมบัติเป็นไตรกลีเซอไรด์เช่นเดียวกับกับน้ำมันพืช โดยมีจำนวนคาร์บอนอยู่ระหว่าง 12-22 อะตอมต่อโมเลกุล ดังตารางที่ 2.8 (Chelf, 1990; Ratledge, 1991) แต่แตกต่างจากน้ำมันพืชตรงที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างยิ่งยวด (polyunsaturated fatty acids : PUFAs) ซึ่งประกอบด้วยพันธะคู่ 4 คู่หรือมากกว่า (Belarbi et al., 2000) ตัวอย่างเช่น eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) ซึ่งมีพันธะคู่ 5 พันธะ และ docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) ซึ่งมีพันธะคู่ 6 พันธะ กรดไขมันและเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl esters : FAME) ที่มีพันธะคู่ 4 คู่หรือมากกว่ามีความเป็นไปได้สูงในการออกซิเดชันในระหว่างการรักษาและเป็นสาเหตุหนึ่งในการลดการยอมรับในการใช้ไบโอดีเซลจากสาหร่าย น้ำมันพืชบางชนิดก็มีปัญหาเช่นเดียวกันนี้ ตัวอย่างเช่น น้ำมันจากเมล็ดแรมปีส่วนประกอบของกรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid : C18:2n-6) ซึ่งมีพันธะคู่ 2 พันธะและกรดลิโนเลนิก (linolenic acid : C18:3n-3) ซึ่งมีพันธะคู่ 3 พันธะ อย่างไรก็ตามกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้มีความเสถียรต่อการออกซิเดชันมากกว่า DHA และ EPA (Belarbi et al., 2000; Ratledge, 2004)

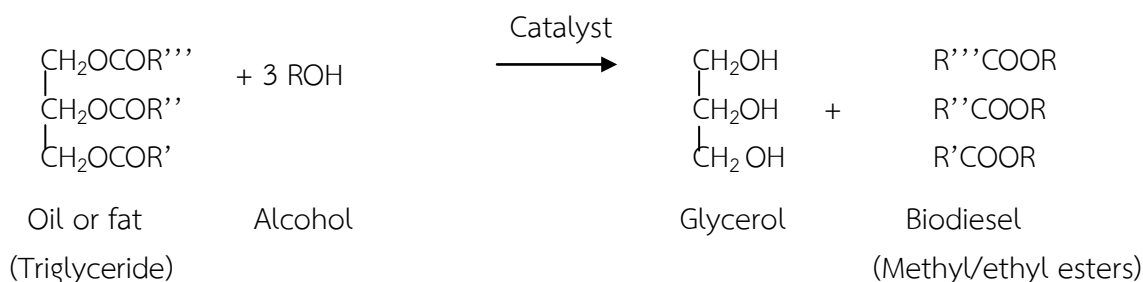
ตารางที่ 2.8 ชนิดของกรดไขมันที่พบในสาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอและขาดไนโตรเจน (Chelf, 1990)

สายพันธุ์สาหร่าย	อาหารที่มีไนโตรเจนเพียงพอ	อาหารที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	16:0, 16:4, 18:1, 18:3	16:0, 18:1, 18:3
<i>Botryococcus braunii</i>	16:0, 18:1, 18:2, 18:3	16:0, 18:1, 18:3, 20:5
<i>Dunaliella salina</i>	14:0/14:1, 16:0, 16:3, 16:4, 18:2, 18:3	16:0, 16:3, 18:1, 18:2, 18:3
<i>Isochrysis</i> sp.	14:0/14:1, 16:0, 16:1, 18:1, 18:3, 18:4, 22:6	14:0/14:1, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 22:6

2.6 การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากน้ำมันสำหรับขนาดเล็ก

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพแหล่งพลังงานทดแทน (renewable energy) หรือเชื้อเพลิงทางเลือก (alternative energy) ที่มีคุณสมบัติในการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลและไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศจึงเป็นเชื้อเพลิงที่ดีในการช่วยบรรเทาภาวะโลกร้อน (Lang et al., 2001; Antolin et al., 2002) อย่างไรก็ตามราคาน้ำมันไบโอดีเซลในปัจจุบันยังคงสูงอันเนื่องมาจากราคาของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต รัฐบาลของประเทศต่างๆ จึงมีนโยบายส่งเสริมการปลูกพืชน้ำมันเพื่อลดต้นทุนของวัตถุดิบของการผลิตไบโอดีเซล แต่การปลูกพืชน้ำมันนั้นต้องการพื้นที่ในการเพาะปลูกสูง ด้วยเหตุนี้นักวิจัยของหลายๆ ประเทศจึงได้ให้ความสนใจไปที่การใช้น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กมากขึ้นทั้งนี้เพราะข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กคือ ต้องการพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย เจริญเร็วและไม่ขึ้นกับฤดูกาล นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารแบบง่ายๆ ในระดับการผลิตขนาดใหญ่ได้ (Woft et al., 1985; Sawayama et al., 1999) การใช้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นพลังงานทดแทนทำได้โดยการนำไขมันหรือน้ำมันในเซลล์มาผลิตเป็นเชื้อเพลิงไบโอดีเซลโดยผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) หรือการใช้เซลล์สาหร่ายขนาดเล็กผสมโดยตรงกับน้ำมันดีเซลหรือไบโอดีเซล (Sheehan et al., 1998; Illman et al., 2000; Scragg et al., 2003)

ไบโอดีเซล หมายถึง เชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตจากไขมันสัตว์ น้ำมันจากเมล็ดพืช นำมาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (รูปที่ 2.5) โดยทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอลและมีตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟริกภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูงเพื่อเปลี่ยนไขมันหรือน้ำมันให้เป็นไบโอดีเซลชนิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl ester: FAME) หรือเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid ethyl ester: FAEE) ขึ้นอยู่กับประเภทของแอลกอฮอล์ที่ใช้และมีกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) เป็นผลพลอยได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล



รูปที่ 2.5 กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Fukuda et al., 2001)

ปัจจุบันการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลในทางอุตสาหกรรมนั้นผลิตมาจากน้ำมันจากพืชและไขมันสัตว์เป็นส่วนใหญ่ ส่วนการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กที่ผ่านมานั้นนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง (Belarbi et al., 2000) จากข้อมูลการวิจัยถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ปริมาณร้อยละ 50 ของน้ำมันดีเซลที่ใช้ในระบบขนส่งของสหรัฐอเมริกา ต้องการพื้นที่ในการเลี้ยงสาหร่ายเพียงร้อยละ 1 ถึง 3 ของพื้นที่ทั้งหมดที่ใช้ในการปลูกพืชน้ำมัน ดังตารางที่ 2.9 (Chisti, 2007) และตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.9 เปรียบเทียบแหล่งที่มาของไบโอดีเซลในสหรัฐอเมริกา (Chisti, 2007)

แหล่งของน้ำมัน	ผลผลิตน้ำมัน (ลิตร/ เฮกตาร์)	พื้นที่ที่ต้องการ (ล้านเฮกตาร์) ¹	ร้อยละของพื้นที่การ เพาะปลูกในสหรัฐอเมริกา ¹
สบู่ดำ	1892	140	77
มะพร้าว	2689	99	54
ปาล์มน้ำมัน	5950	45	24
สาหร่ายขนาดเล็ก ²	136,900	2	1.1
สาหร่ายขนาดเล็ก ³	58,700	4.5	2.5

¹ เพื่อใช้ในระบบขนส่งครั้งหนึ่งสำหรับเชื้อเพลิงที่ใช้ต้องการทั้งหมดในสหรัฐอเมริกา

² น้ำมันสาหร่ายร้อยละ 70 ของน้ำหนักเซลล์ (จากการทดลองในการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง)

³ น้ำมันสาหร่ายร้อยละ 30 ของน้ำหนักเซลล์ (จากการทดลองในการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสง)

ตารางที่ 2.10 เปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลโดยประมาณของพืชต่างๆ และสาหร่ายขนาดเล็ก (Smith et al., 2009)

วัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล	พื้นที่ที่ต้องการเพื่อผลิต น้ำมันให้เพียงพอต่อความ ต้องการทั้งหมดของโลก (10 ⁶ hectare)	% พื้นที่ที่ต้องการ เทียบกับพื้นที่ ทั้งหมดของโลก	% พื้นที่ใช้ เพาะปลูกได้ของ พื้นที่ทั้งหมด
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	5,100	34	258
เมล็ดแรรพ์ (rape seed)	4,100	27	207
สบู่ดำ	2,600	17	130
น้ำมันปาล์ม	820	5.5	41
สาหร่ายขนาดเล็ก (10 g/m ² /day, 30% TAG*)	410	2.7	21 ^a
สาหร่ายขนาดเล็ก (50 g/m ² /day, 50% TAG)	49	0.3	2.5 ^a

*TAG= triacylglycerol หรือไตรกลีเซอไรด์หรือน้ำมันที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล, ^a = พื้นที่ในการสร้างบ่อหรือถังเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2.6 การยอมรับไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก

เพื่อการยอมรับไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายของผู้บริโภค ไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายจะต้องมีมาตรฐานเดียวกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากแหล่งอื่นๆ ในสหรัฐอเมริกาได้กำหนดมาตรฐานไบโอดีเซลตาม The ASTM Biodiesel Standard D6751 ส่วนในสหภาพยุโรปมาตรฐานน้ำมันไบโอดีเซลแบ่งออกเป็น 2 มาตรฐานตามลักษณะการใช้ น้ำมันคือ Standard EN 14214 เป็นมาตรฐานไบโอดีเซลเพื่อการใช้กับยานยนต์และ Standard EN 14213 เป็นมาตรฐานไบโอดีเซลที่ใช้เพื่อเป็นเชื้อเพลิงให้ความร้อน (Knothe, 2006) น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กมีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างยั่งยืน (polyunsaturated fatty acids) ซึ่งมีพันธะคู่ 4 คู่หรือมากกว่า (Belarbi et al., 2000) เช่น eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) มีพันธะคู่ 5 พันธะ และ docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) มีพันธะคู่ 6 พันธะ กรด

ไขมันและเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีพันธะคู่ 4 คู่หรือมากกว่าอาจเกิดการออกซิเดชันในระหว่างเก็บรักษาและเป็นสาเหตุหนึ่งที่จะลดการยอมรับไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก น้ำมันพืชบางชนิดก็มีปัญหาเช่นเดียวกันเช่น น้ำมันเมล็ดเรพ (rape seed หรือ canola) มีส่วนประกอบของกรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid : C18:2n-6) ซึ่งมีพันธะคู่ 2 พันธะและกรดลิโนเลนิก (linolenic acid : C18:3n-3) ซึ่งมีพันธะคู่ 3 พันธะ อย่างไรก็ตามกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้มีความเสถียรต่อการออกซิเดชันมากกว่ากรดไขมันชนิด DHA และ EPA สหภาพยุโรปได้กำหนดค่าไอโอดีน (iodine value) ซึ่งเป็นค่าแสดงปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมัน ซึ่งต้องไม่เกิน 120 และ 130 กรัมไอโอดีนต่อ 100 กรัมไบโอดีเซลสำหรับมาตรฐานไบโอดีเซลของ Standard EN 14214 และ EN 14213 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กที่มีพันธะคู่มากกว่า 4 พันธะนั้นอาจมีปัญหาในการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ตามมาตรฐานไบโอดีเซลของยุโรป แต่เหตุผลนี้ไม่ใช่ข้อจำกัดในใช้น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กเนื่องจากสามารถลดจำนวนพันธะคู่ลงได้ด้วยการทำปฏิกิริยาไฮโดรเจนเนชันบางส่วน (partial catalytic hydrogenation) ซึ่งเป็นเทคนิคเดียวกับการใช้ผลิตเนยเทียมจากน้ำมันพืช (Dijkstra, 2006) สำหรับมาตรฐานไบโอดีเซลชนิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในประเทศไทยกำหนดโดยกรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน พ.ศ. 2550 เช่น มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 96.5, ค่าซีเทน (cetane number) ไม่ต่ำกว่า 51 เสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่ 100°C (oxidation stability at 100°C) ไม่ต่ำกว่า 6 ชั่วโมง, ค่าความเป็นกรด (acid value) ไม่สูงกว่า 0.50 mgKOH/g, ค่าไอโอดีน (iodine value) ไม่สูงกว่า 120 กรัมไอโอดีน/100 กรัมเป็นต้น (กระทรวงพลังงาน, 2550)

2.7 การลดต้นทุนในการผลิตน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก

การลดต้นทุนการผลิตน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การนำเทคนิคทางชีววิธีมาใช้ในกระบวนการแยกและสกัดน้ำมันโดยจะมีกากเซลล์ซึ่งประกอบด้วยไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและสารอาหารอื่นๆ เป็นผลพลอยได้ (Sanchez Miron et al., 2003) ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับอาหารสัตว์และบางส่วนนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตแก๊สชีวภาพแบบไร้อากาศ (Mata-Alvarez et al., 2000; Raven and Gregersen, 2007) นอกจากนั้นวิธีการลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายที่สำคัญคือ การปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง ความทนทานต่ออุณหภูมิสูงซึ่งจะช่วยลดต้นทุนสำหรับระบบหล่อเย็น นอกจากนั้นยังรวมถึงการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถเจริญได้ดีและให้น้ำมันหรือลิกนินสูงเมื่อใช้แหล่งอินทรีย์คาร์บอนราคาถูกในกรณีที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้อากาศหรือแบบเฮเทโรโทรฟิก และการหาแหล่งอินทรีย์คาร์บอนราคาถูก อื่นๆ เช่น การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (agricultural residues) และของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร (agro-industrial waste) เป็นต้น รวมทั้งการพัฒนาและออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแสงเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบสังเคราะห์แสง (Roessler et al., 1994; Dunahay et al., 1996; Carvalho et al., 2006; Courchesne et al., 2009)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Miao and Wu (2006) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* ที่เพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบเฮเทโรโทรฟิกโดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะไม่มีแสงพบว่าเซลล์สาหร่ายให้ปริมาณลิกนินสูงถึง 55% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อนำน้ำมันสาหร่ายที่สกัดโดย

ใช้เอทิลเอสเตอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl esters: FAMES) โดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันพบว่ากรดไขมันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเปลี่ยนน้ำมันสาหร่ายไปเป็นไบโอดีเซลโดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลคืออัตราส่วนโมลเมทานอลต่อน้ำมันสาหร่ายที่ 56:1 ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา 100% ของน้ำหนักน้ำมันสาหร่าย อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่ 4 ชั่วโมง

Xu และคณะ (2006) เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (corn powder hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสเมื่อเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป๋องพบว่าให้ปริมาณเซลล์สูง 15.5 g/L เวลา 184 ชั่วโมง และมีการสะสมลิปิดสูงถึง 55.2% โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันคือกรดโอเลอิก (oleic acid) กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันสาหร่าย *Chlorella protothecoides* โดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน คือ fatty acid methyl esters (FAMES) ซึ่งได้ปริมาณของ FAMES สูงกว่า 80% และประกอบด้วย oleic acid methyl esters สูงถึง 60.84% นอกจากนี้ยังมี octadecadienoic acid methyl ester, octadecanoic acid methyl ester ซึ่งเป็น methyl ester ที่มีคาร์บอน 18 อะตอม และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและไบโอดีเซลตามมาตรฐานของ ASTM biodiesel standard

Li และคณะ (2007) รายงานการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกด้วยการหมักแบบกะป๋องโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเซลล์ให้ปริมาณลิปิด 46.1%, 48.7%, และ 44.3% โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5, 750 และ 11,000 ลิตรตามลำดับ และเมื่อนำลิปิดมาผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าให้ปริมาณไบโอดีเซลสูงถึง 98.15% ของปริมาณลิปิดหรือน้ำมันที่ใช้ในการผลิต

Widjaja และคณะ (2009) รายงานการศึกษาการเพิ่มผลผลิตลิปิดในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris* ภายใต้สภาวะการสังเคราะห์แสงพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบการสะสมของลิปิดส่วนใหญ่เป็นชนิดไตรกลีเซอไรด์สูงกว่ากรดไขมันอิสระ และพบการสะสมลิปิดสูงสุดเมื่อการเจริญเริ่มลดลงเป็นผลมาจากปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงหรือไนโตรเจนเริ่มขาดแคลน

Umdu และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* ผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าเมื่อใช้ $\text{CaO}/\text{Al}_2\text{O}_3$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาผลผลิตไบโอดีเซลเพิ่มจาก 23% เป็น 97.5% เมื่อใช้อัตราส่วนโมลของเมทานอลต่อลิปิดที่ 30

Xiong และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตเซลล์สาหร่าย *Chlorella protothecoides* เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการหมักแบบกะป๋องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร พบว่าได้ปริมาณเซลล์ 16.8 g/L ระยะเวลาการหมัก 184 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป๋องแบบเดิม และปริมาณเซลล์ 51.2 g/L ระยะเวลาการหมัก 167 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป๋องแบบปรับปรุง ปริมาณลิปิดเท่ากับ 57.8, 55.2 และ 50.3% โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะป๋องแบบเดิม และแบบกะป๋องปรับปรุง ตามลำดับ และเมื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าอัตราการเปลี่ยนน้ำมันไปเป็นไบโอดีเซลสูงถึง 98% และไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีสมบัติใกล้เคียงกับมาตรฐานไบโอดีเซลของสหรัฐอเมริกา

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KKU-S2 ด้วยการหมักแบบกะ (batch heterotrophic fermentation) ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอน

เซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูง 47% โดยน้ำหนักแห้ง และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดที่ผลิตได้เมื่อใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าประกอบด้วยกรดไขมันคือ กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และ กรดปาล์มิติก (C16:0) เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืชซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพเพื่อการผลิตไบโอดีเซล (Leesing et al., 2009) นอกจากนั้นสาหร่าย *Chlorella* sp. KKU-S2 ยังสามารถใช้กลีเซอรอล โซลอส กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Leesing et al., 2011, Leesing and Nontaso, 2010)

Leesing et al. (2010) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. KKU-S2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าว (rice straw hydrolysate) น้ำตาลที่ได้จากการย่อยชานอ้อย (sugarcane bagasse hydrolysate) และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยหญ้าแฝก (vetiver grass hydrolysate) พบว่าสาหร่ายเจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 แหล่ง

สาหร่ายขนาดเล็กมีการผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์โดยองค์ประกอบหลักของลิปิดที่พบเป็น ไตรกลีเซอไรด์ซึ่งอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ ภายในเซลล์ (microdroplet oils) ปริมาณลิปิดที่สะสมภายในเซลล์และคุณสมบัติของลิปิดขึ้นกับชนิดสายพันธุ์ของสาหร่ายและสภาวะในการเพาะเลี้ยง น้ำมันหรือลิปิดจากสาหร่ายมีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันพืชโดยสามารถนำน้ำมันออกจากเซลล์สาหร่ายโดยการบีบอัดได้ถึง 70% ของลิปิดทั้งหมด สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีการสะสมลิปิดต่างกัน เช่น *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella vulgaris*, *Spirogyra* sp., *Euglena gracilis* และ *Spirulina maxima* สะสมลิปิด 16-40%, 14-22%, 11-21%, 14-20% และ 6-7% ตามลำดับ (Becker, 1994) การเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบเฮเทโรโทรฟิคนั้นส่วนใหญ่มักพบการสะสมลิปิดของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไป เช่น น้ำตาล กลีเซอรอล โพลีแซคคาไรด์ และจำกัดปริมาณสารอาหารอื่นๆ โดยทั่วไปคือไนโตรเจน หรือกล่าวได้ว่าค่าอัตราส่วนปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) มีผลต่อการสะสมลิปิดในเซลล์สาหร่าย โดยค่า C/N ratio ต่ำมีผลทำให้ลิปิดที่ผลิตโดยสาหร่ายมีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) อยู่ในปริมาณสูง (Papanikolaou et al, 2001) เมื่ออัตราส่วนของ C/N ratio ต่ำเซลล์จะมีการเจริญมากกว่าการผลิตลิปิด แต่ในช่วงของการผลิตลิปิดเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นลิปิดจึงต้องการอัตราส่วนของ C/N ratio สูง (Turcotte and Kosaric, 1989)

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* เป็นสาหร่ายที่สามารถเจริญทั้งแบบ photoautotrophic cultivation และ heterotrophic cultivation ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ต่างกันจะมีการสร้างลิปิดปริมาณต่างกัน โดยการเจริญแบบเฮเทโรโทรฟิคมีอัตราการเจริญเร็วและให้ปริมาณลิปิดสูง (Shi et al., 2002 ; Wen et al., 2002 ; Miao et al., 2004 ; Miao and Wu, 2006, Xu et al, 2006) สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเจริญเร็วและผลิตลิปิดหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด Eicosapentaenoic acid (EPA : polyunsaturated fatty acid) ได้สูงในสภาวะ heterotrophic fermentation ด้วยการหมักแบบกะป๋อง (fed-batch fermentation) (Wen and Chen, 2003) สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* เมื่อเจริญภายใต้สภาวะ heterotrophic cultivation ในอาหารที่มีน้ำตาลจากการย่อยแป้งข้าวโพด (corn powder hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป๋องพบว่าให้ปริมาณเซลล์สูง 15.5 g/L เวลา 184 ชั่วโมง และมีการสะสมลิปิดสูงถึง 55.2% โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันคือ oleic acid, linoleic acid, cetane acid และไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันสาหร่าย *Chlorella protothecoides* โดยวิธี transesterification คือ fatty acid methyl esters (FAMES) ซึ่งได้ปริมาณของ FAMES สูงกว่า 80% และประกอบด้วย oleic acid methyl esters สูงถึง 60.84%

นอกจากนี้ยังมี octadecadienoic acid methyl ester, octadecanoic acid methyl ester ซึ่งเป็น methyl ester ที่มีคาร์บอน 18 อะตอม และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและไบโอดีเซลตามมาตรฐานของ ASTM biodiesel standard (Xu et al, 2006)

การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิกด้วยการหมักแบบกะป้อนเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเซลล์ให้ปริมาณลิปิด 46.1%, 48.7%, และ 44.3% โดยน้ำหนักแห้งเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5.0, 750 และ 11,000 ลิตรตามลำดับ และเมื่อนำลิปิดที่ผลิตได้มาผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าให้ปริมาณไบโอดีเซลสูงถึง 98.15% ของปริมาณลิปิดหรือน้ำมันที่ใช้ในการผลิต (Li et al., 2007) การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็กด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันพบว่าเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดคือ กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) จะเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายโดยพบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน 56 :1 ที่อุณหภูมิ 30°C ระยะเวลาเกิดปฏิกิริยา (retention time) 4 ชั่วโมงจะสามารถลดค่า specific gravity ของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ลงจาก 0.912 เป็น 0.8637 kg/L ซึ่งเป็นค่าตามมาตรฐาน ASTM biodiesel standard (Miao and Wu, 2006)

การผลิตเซลล์สาหร่าย *Chlorella protothecoides* เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลโดยเพาะเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร พบว่าได้เซลล์ 16.8 g/L ในเวลา 184 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป้อนแบบเดิม และปริมาณเซลล์ 51.2 g/L ในเวลา 167 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป้อนแบบปรับปรุง ปริมาณลิปิดเท่ากับ 55.2% และ 50.3% โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนแบบเดิมและแบบกะป้อนปรับปรุงตามลำดับ และเมื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าอัตราการเปลี่ยนน้ำมันไปเป็นไบโอดีเซลสูงถึง 98% (Xiong et al., 2008)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KCU-S2 แบบเฮเทโรโทรฟิกด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในอาหาร BG-11 ที่มีกลูโคส 50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน 0.5 g/L (C/N ratio 280) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 8 วัน เซลล์ให้ปริมาณลิปิด 47% โดยน้ำหนักเซลล์แห้งและให้ปริมาณมวลเซลล์ 6.26 g/L องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดกรดปาล์มติก (C16:0) กรดโอเลอิก (C18:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดลิโนเลอิก (C18:2) เช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช (Leesing and Nontaso, 2010)

การศึกษาการผลิตและสกัดลิปิดจากเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่าเมื่อนำอบเซลล์ที่ 60°C มาสกัดลิปิดด้วยตัวทำละลายพบว่าได้ปริมาณลิปิดสูงและไตรกลีเซอไรด์ไม่เปลี่ยนเป็นสารประกอบอื่นๆ (Widjaja et al., 2009) การใช้คลื่นเสียงอัลตราโซนิคร่วมกับตัวทำละลายพบว่าสามารถสกัดลิปิดออกจากเซลล์สาหร่าย *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* ได้ในปริมาณสูง (Converti et al., 2009) การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดลิปิดจากสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus* sp., *Scenedesmus* sp. พบว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟด้วยเครื่อง microwave ในการทำให้เซลล์แตกก่อนการสกัดลิปิดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดลิปิดออกจากเซลล์สาหร่าย (Lee et al., 2009)

Leesing et al. (2011) ศึกษาการผลิตลิปิดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KCU-S2 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิกเมื่อใช้กลูโคส 50g/L เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 พบว่าให้ผลผลิตลิปิด (volumetric lipid productivity) 0.374g/L/d อัตราการผลิตลิปิดจำเพาะ

(specific rate of lipid production) เท่ากับ 0.112g/L/d และเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนให้อัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.237g/L/d

Leesing and Kookkhunthod (2011) ศึกษาการผลิตลิปิดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KKU-S2 ด้วยการหมักแบบกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า

Leesing et al. (2012) ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KKU-S2 เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (agricultural residue hydrolysates) คือ ชานอ้อย (sugarcane bagasses hydrolysate) ฟางข้าว (rice straw hydrolysates) และใบหญ้าแฝก (vetiver grass hydrolysates) ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงใน vetiver grass hydrolysate สาหร่ายเจริญเร็วและให้ปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิปิดสูง

Leesing et al. (2012) ศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบผสม (mixed culture) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. KKU-S2 และยีสต์ *Torulaspora maleeae* Y30 อัตราการเจริญสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยว (monoculture) โดยให้ปริมาณมวลเซลล์ 7.33g/L และลิปิด 0.808g/L อัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.115g/L/d

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

ฟลาสก์ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร
หลอดทดลองขนาด 16x150 และ 20x150 มิลลิลิตร
ตู้เพาะเลี้ยงสำหรับให้แสงพร้อมหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์
ลูบเชื้อ และตะเกียบปูนเสน
ปิเปตขนาด 5, 10 มิลลิลิตร
ไมโครปิเปตขนาด 200-1000 μL
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
เครื่องบ่มแบบ (Shaker)
เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
เครื่องชั่ง (Balance)
ตู้อบแห้ง (Hot air oven)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายรูป
เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลว Bristol medium และ อาหารแข็ง Bristol agar (ภาคผนวก)

3.1.3 สารเคมี

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (ภาคผนวก)
สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณลิปิดโดยวิธี Know and Rhee (ภาคผนวก)

3.2 การคัดแยกและคัดเลือกสายเชื้อขนาดเล็ก

เก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณต่างๆ ในเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ในเดือนมกราคม 2554 จำนวน 7 ตัวอย่าง นำตัวอย่างน้ำมาคัดแยกสายเชื้อโดยเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน (Enrichment technique) ในอาหาร Bristol's medium (mg/L): NaNO_3 250, K_2HPO_4 75, KH_2PO_4 175, CaCl_2 25, NaCl 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75, FeCl_2 0.3, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, H_3BO_3 0.2, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.06, pH 7.0) โดยกรองตัวอย่างน้ำผ่านแผ่นกรอง MF นำตะกอนเซลล์สายเชื้อที่ได้จากการกรองใส่ลงในอาหาร Bristol's medium ปริมาตร 200mL ในฟลาสก์ 500mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก บ่มเป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ 3.2) จากนั้นนำสายเชื้อที่เจริญในอาหารมากรองผ่านกระดาษกรองและแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) ด้วยเทคนิคการขีดลาก (cross streak technique) บนจานอาหาร Bristol's medium บ่มภายใต้แสงไฟจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน (รูปที่ 3.3) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวเพื่อแยกให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาบนผิวหน้าอาหารแข็ง (Bristol's medium agar slant) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำในพื้นที่โครงการ อพ. สธ. เขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี



Bristol's medium 200mL ในฟลาสก์ 500mL ก่อนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย



รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนสาหร่ายในอาหาร Bristol's medium ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก บ่มเป็นเวลา 14 วัน

3.3 การคัดเลือกสาหร่ายที่เจริญเร็วและผลิตลิปิดได้สูง

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ภายใต้การสังเคราะห์แสง (Photoautotrophic cultivation) และแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คัดเลือกสาหร่ายที่มีการเจริญและผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาต่อไป

3.3.1 การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ภายใต้การสังเคราะห์แสง (Photoautotrophic cultivation) (รูปที่ 3.3) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ในฟラスก์ขนาด 500mL ปริมาตรอาหาร 250mL บ่มภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.3.2 การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (Heterotrophic cultivation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ในฟラスก์ขนาด 500mL ปริมาตรอาหาร 200mL โดยมีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าด้วย magnetic stirrer plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-14 วัน (รูปที่ 3.4) จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

(1) วัดการเจริญของสาหร่ายโดยการวัดค่าความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่น 680 nm และวัดน้ำหนักแห้ง (cell dry weight, CDW)

(2) ปริมาณลิปิดโดยวิธีของ Know and Rhee (1986) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มติก

(3) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี DNS (1959) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส



รูปที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดเลือกได้ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ให้อากาศผ่านเครื่องให้อากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์



รูปที่ 3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดเลือกได้ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบกวนผสม ด้วยแท่งแม่เหล็กด้วยเครื่อง magnetic stirrer plate ที่อุณหภูมิห้อง

3.4 การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและผลผลิตของสาหร่ายที่คัดเลือกได้

3.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลทที่คัดเลือกได้ด้วยการสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) โดยศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนคือ NaNO_3 และยูเรีย ต่อการเจริญและการผลผลิตของสาหร่ายที่คัดเลือกได้ บ่มภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยพ่นให้อากาศผ่านเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก เป็นเวลา 12 วัน

3.4.2 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันปริมาณกลูโคสที่ค่าต่างๆ คือ 20, 30, 40, 50g/L บ่มแบบกวนผสมบนเครื่อง magnetic stirrer plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

การตรวจวิเคราะห์โดย วัดการเจริญของสาหร่ายด้วยการวัดน้ำหนักแห้ง (cell dry weight), ปริมาณลิพิดโดยวิธีของ Know and Rhee ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

4.1 การคัดแยกและคัดเลือกสายเชื้อขนาดเล็ก

เก็บตัวอย่างน้ำจาก จำนวน 7 ตัวอย่าง นำตัวอย่างน้ำจำนวน 7 ตัวอย่างที่เก็บบริเวณต่างๆ ในเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ในเดือนมกราคม 2554 มาคัดแยกสายเชื้อโดยเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน (Enrichment technique) ในอาหาร Bristol's medium (mg/L): NaNO_3 250, K_2HPO_4 75, KH_2PO_4 175, CaCl_2 25, NaCl 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75, FeCl_2 0.3, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, H_3BO_3 0.2, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.06, pH 7.0) โดยกรองตัวอย่างน้ำผ่านแผ่นกรอง GF/C นำตะกอนเซลล์สายเชื้อที่ได้จากการกรองใส่ลงในอาหาร Bristol's medium ปริมาตร 200mL ในพลาสติก 500mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก เป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ 4.1) จากนั้นนำสายเชื้อที่เจริญในอาหารมากรองผ่านกระดาษกรองชนิด GF/C ด้วยเครื่องกรองแบบทีเรีย (Millipore vacuum filtration) (รูปที่ 4.2) และแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) ด้วยเทคนิคการขีดลาก (cross streak technique) บนจานอาหาร Bristol's medium บ่มภายใต้แสงไฟจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ 4.3)

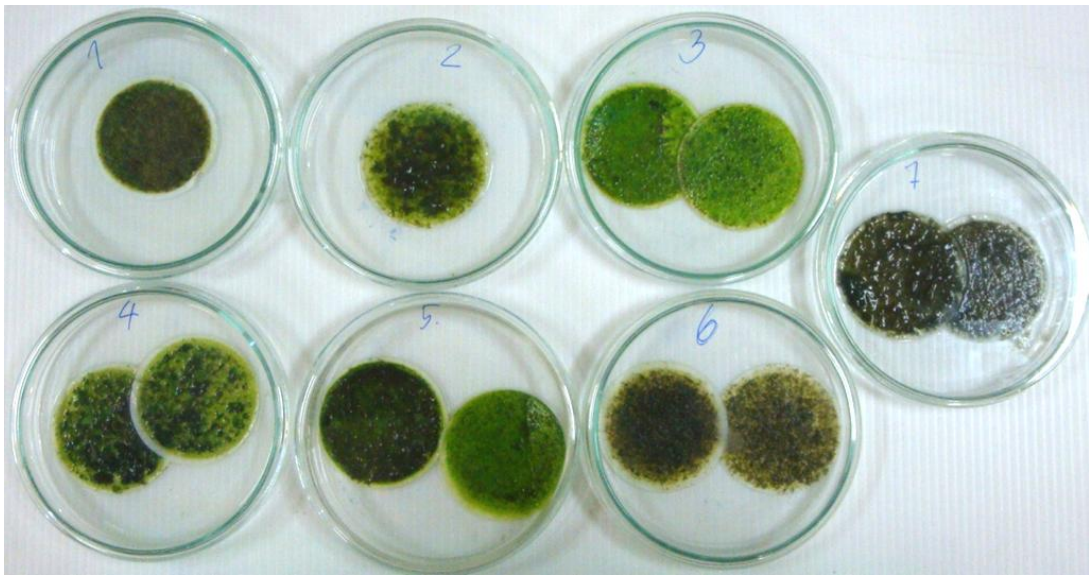


(a) การเพาะเลี้ยงภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

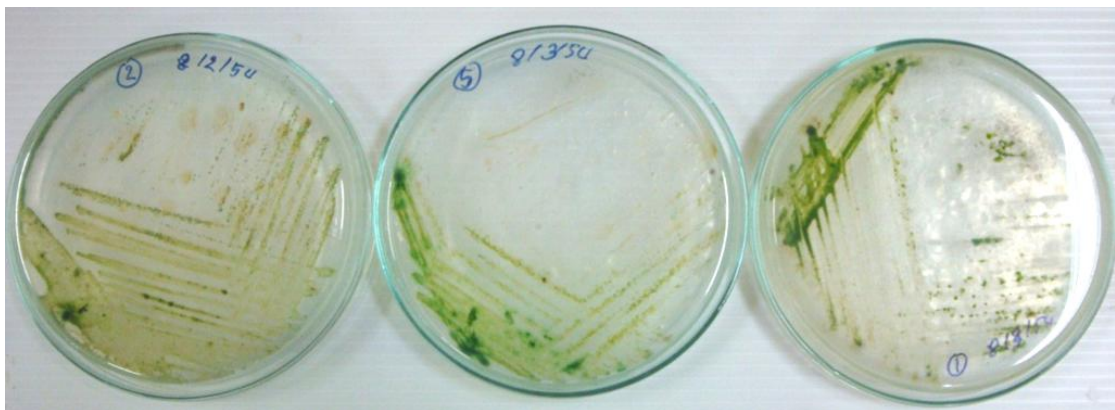
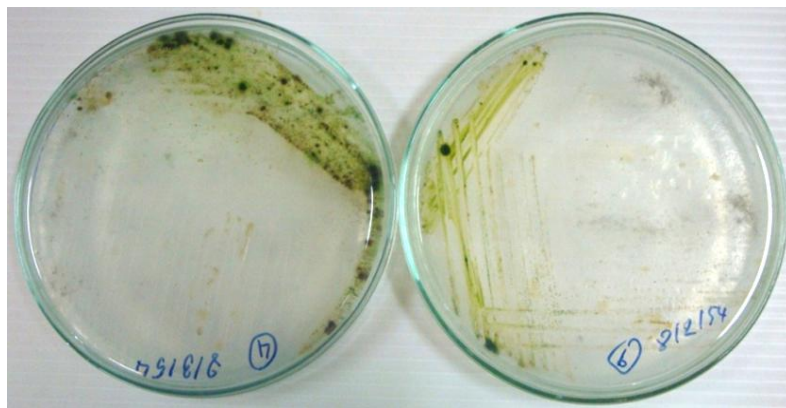


(b) สายเชื้อเจริญภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

รูปที่ 4.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนสายเชื้อในอาหาร Bristol's medium ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก บ่มเป็นเวลา 14 วัน



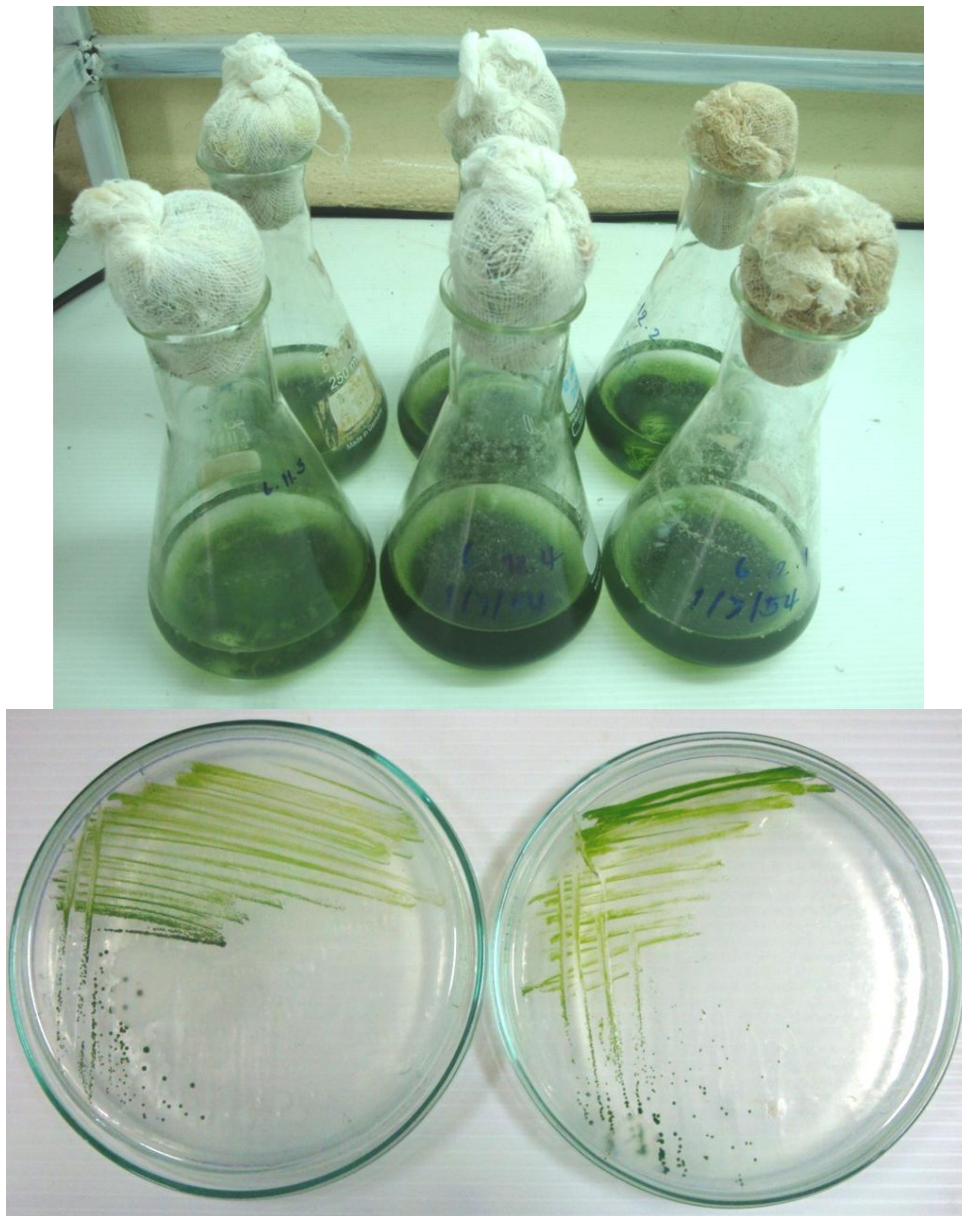
รูปที่ 4.2 เซลล์สาหร่ายที่ผ่านการกรองบนกระดาษกรอง ชนิด GF/C



รูปที่ 4.3 การแยกสาหร่ายด้วยวิธี cross streak technique บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol's medium

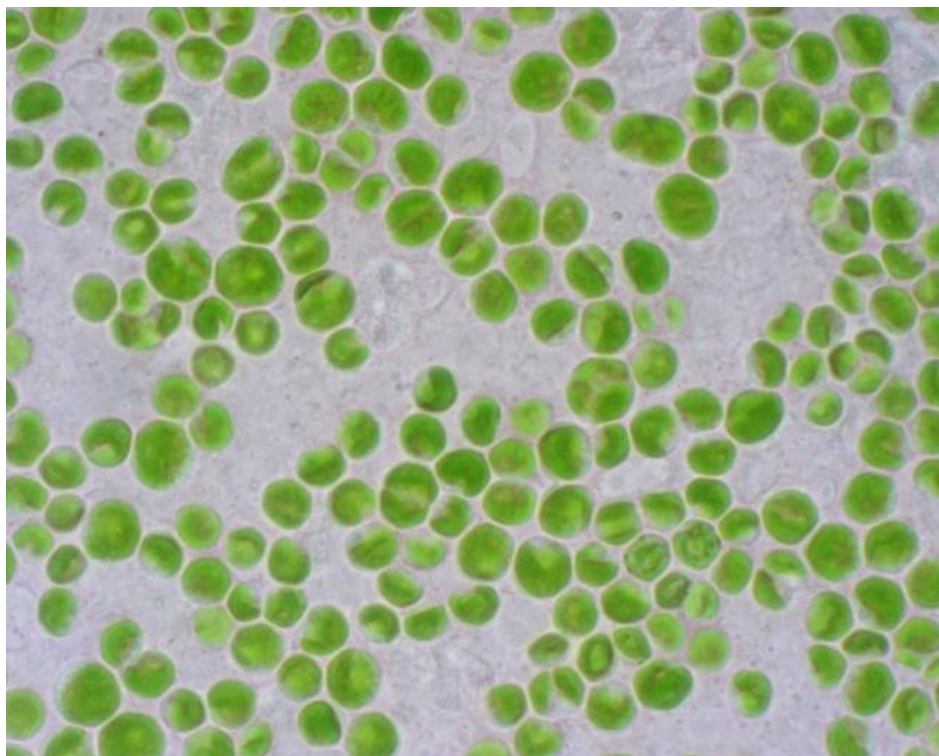
การศึกษาในขั้นต่อมาเป็นการแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยเทคนิค cross streak บนผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ Bristol's medium และเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Bristol medium (รูปที่ 4.4) บ่มภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิห้อง จากการทดลองเบื้องต้นสามารถแยกสาหร่ายบริสุทธิ์ได้จำนวน 6 ไอโซเลต จากนั้นเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายบนผิวหน้าอาหารแข็งชนิดเอียง

(agar slant) แต่เมื่อมีการถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้งพบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจำนวนเพียง 3 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้เร็ว คือ ไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 ดังนั้นการศึกษาในขั้นต่อไปจึงเลือกศึกษาในสาหร่ายจำนวน 3 ไอโซเลทดังกล่าว

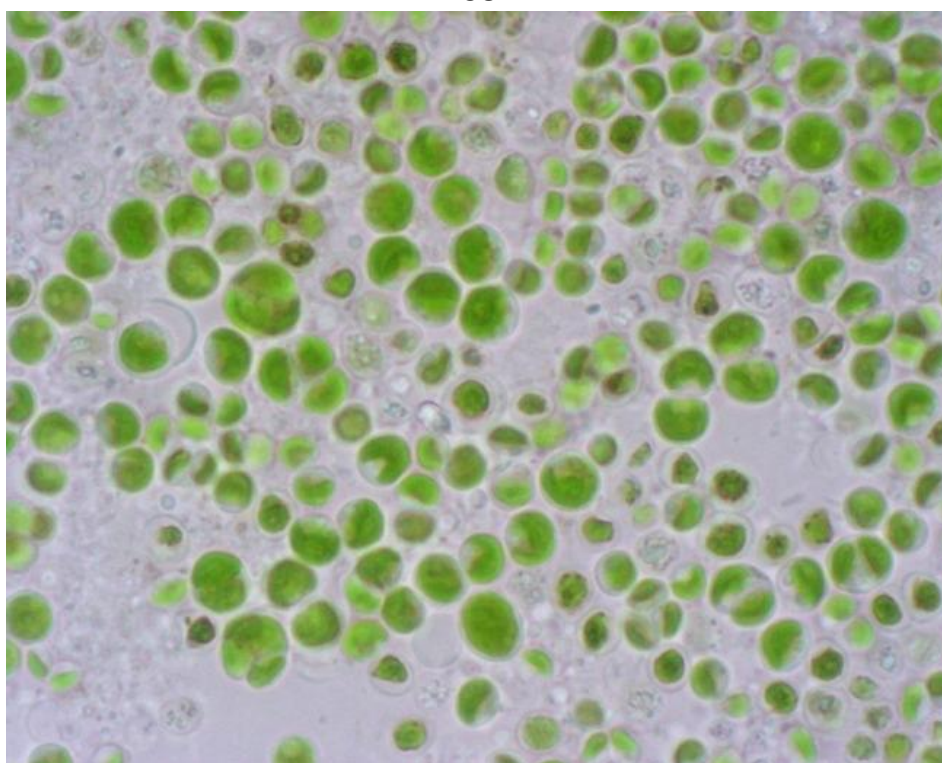


รูปที่ 4.4 การแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเหลว ในฟลาสก์ขนาด 250mL ปริมาตรอาหาร 100mL

ผลการแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากตัวอย่างน้ำจืดที่เก็บจากเขื่อนสิรินธร พบว่าได้สาหร่ายจำนวน 6 ไอโซเลท และเมื่อศึกษาโครงสร้างรูปร่างของเซลล์สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก (Microalgae) ที่คัดแยกได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Light Microscope) ด้วยเทคนิค wet mount พบว่าสาหร่ายที่คัดแยกส่วนใหญ่ได้มีรูปร่างของเซลล์กลม ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.5

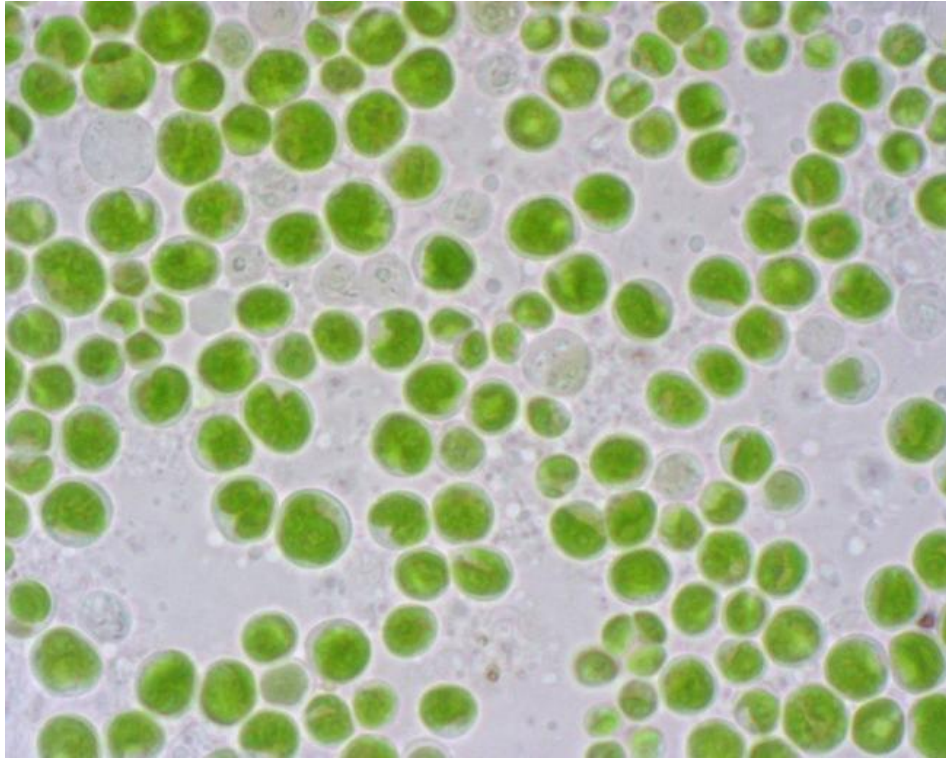


MSU1

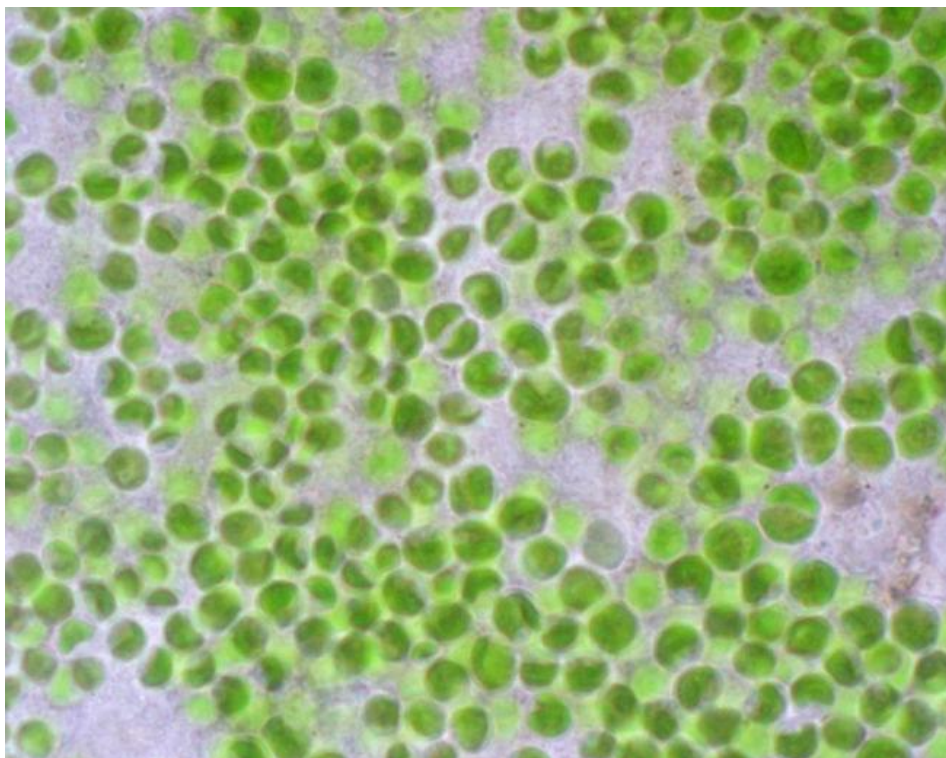


MSU2

รูปที่ 4.5 รูปร่างของเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Light Microscope) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (1000X); M= Microalgae, S=Sirindhorn Dam, U=Ubol Ratchathani

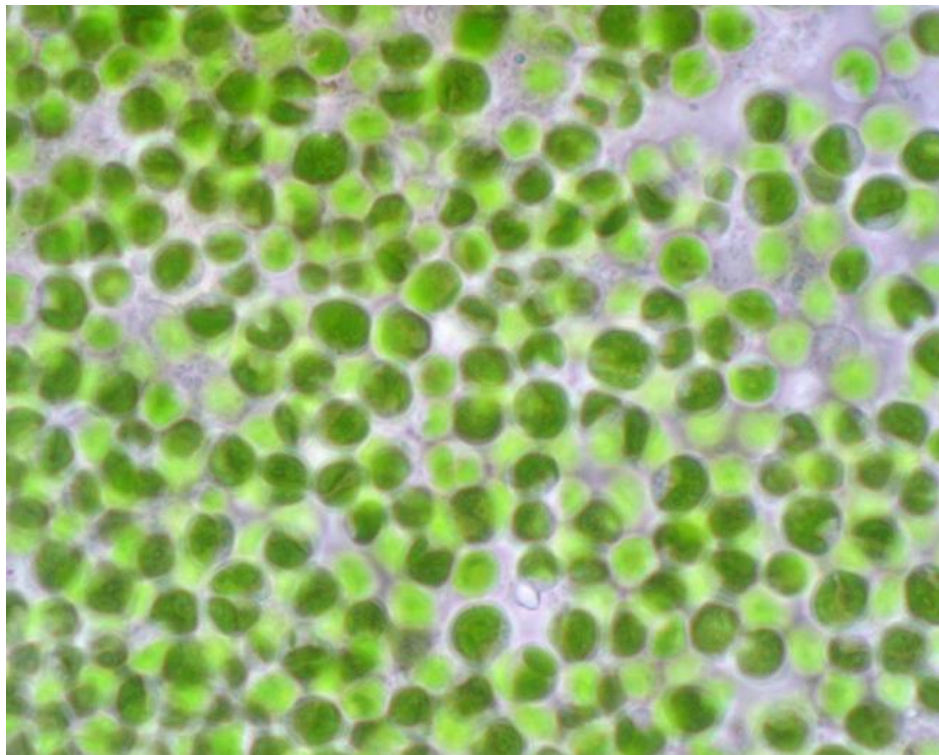


MSU3

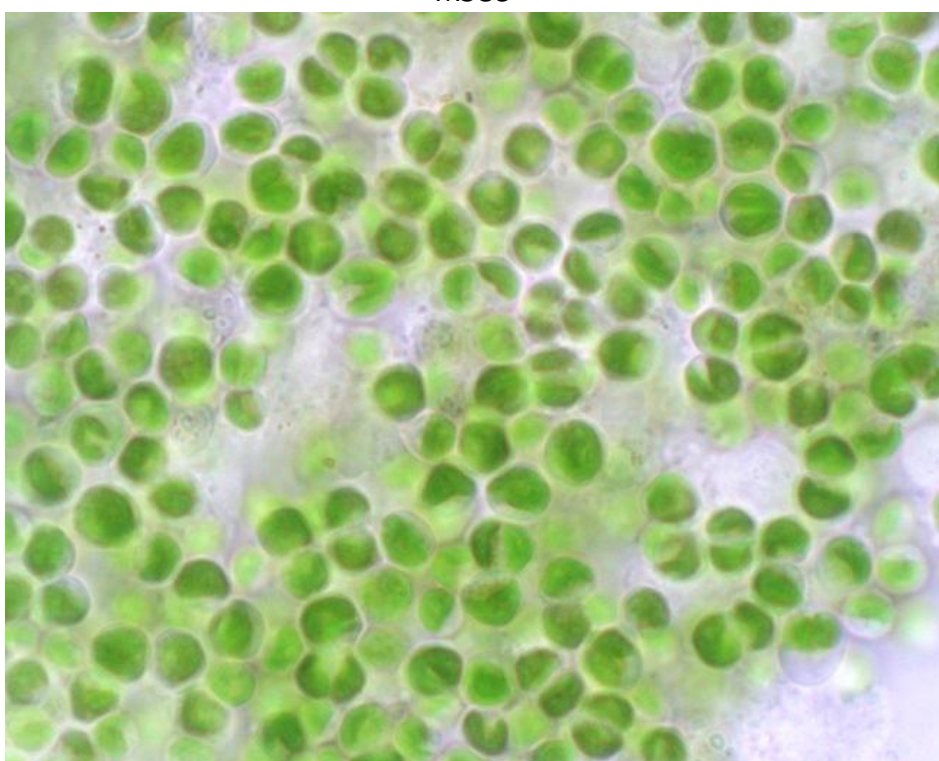


MSU4

รูปที่ 4.5 รูปร่างของเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Light Microscope) ที่กำลังขยาย 1000เท่า (1000X); M= Microalgae, S=Sirindhorn Dam, U=Ubol Ratchathani (ต่อ)



MSU5



MSU6

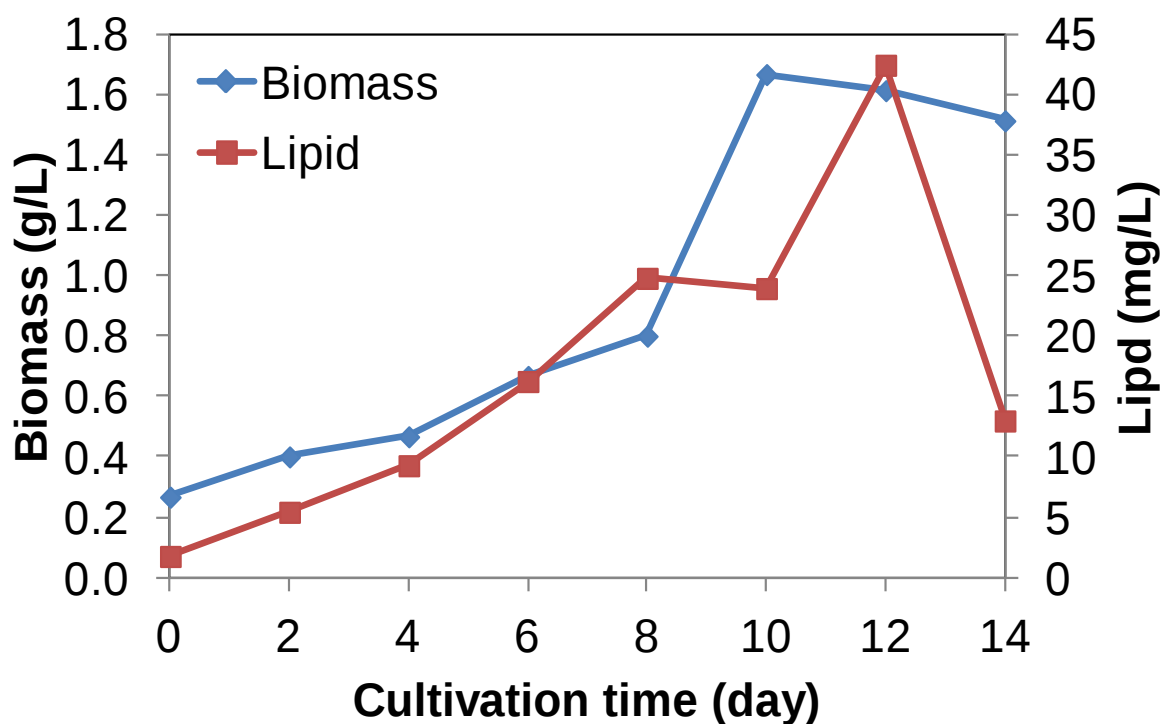
รูปที่ 4.5 รูปร่างของเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Light Microscope) ที่กำลังขยาย 1000เท่า (1000X); M= Microalgae, S=Sirindhorn Dam, U=Ubol Ratchathani (ต่อ)

4.3 การคัดเลือกสาหร่ายที่เจริญเร็วและผลิตลิพิดได้สูง

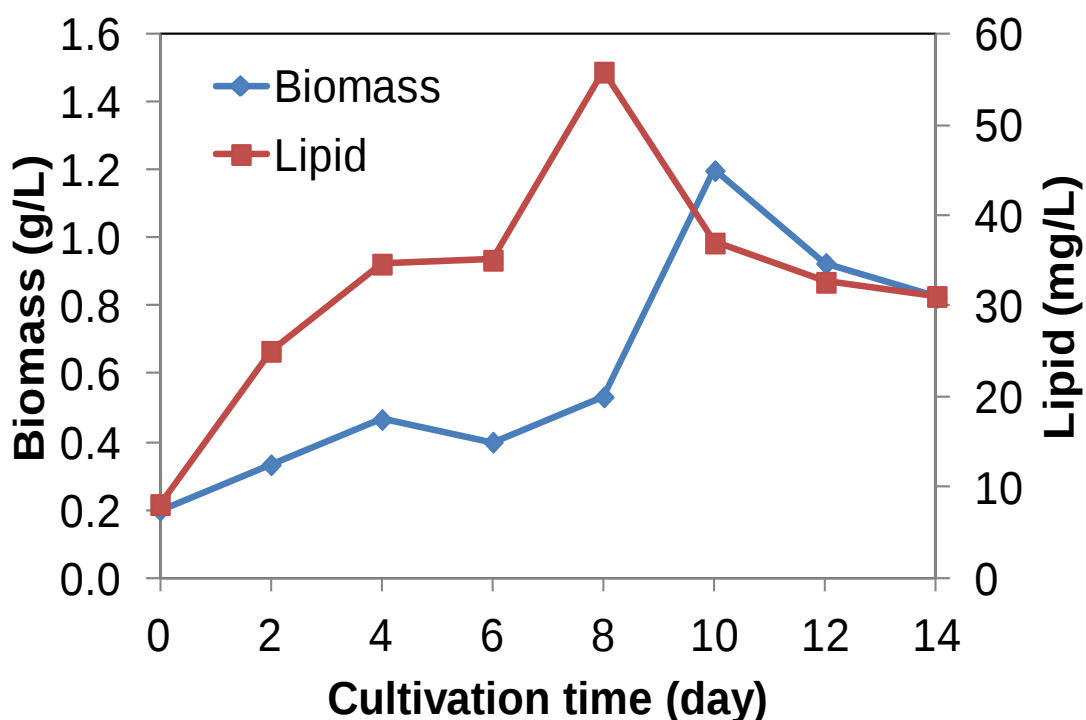
การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 คือไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3, ภายใต้การสังเคราะห์แสง (Photoautotrophic cultivation) และแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คัดเลือกสาหร่ายที่มีการเจริญและผลิตลิพิดสูงเพื่อศึกษาต่อไป

4.3.1 การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ภายใต้การสังเคราะห์แสง (Photoautotrophic cultivation) คือไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ในฟลาสก์ขนาด 500mL ปริมาตรอาหาร 250mL และมีโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) 3g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากอากาศผสมเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6-4.8

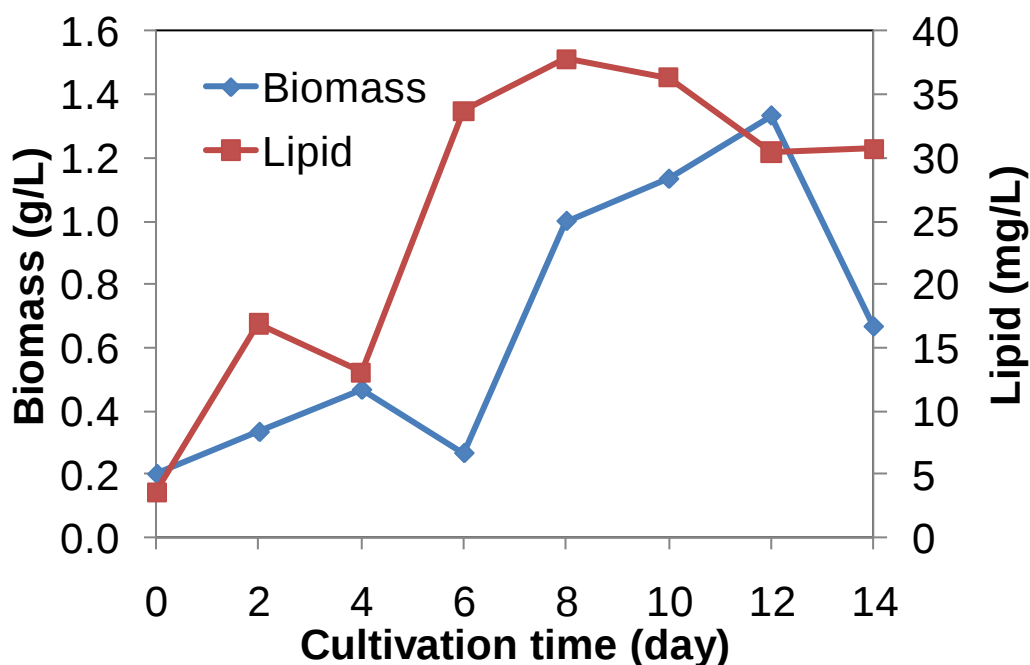
จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์ สาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลทมีการเจริญสูงสุดในระหว่างวันที่ 10-12 ของการเพาะเลี้ยงและเริ่มลดลงในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยสาหร่าย MSU1 ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.667 g/L ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และปริมาณลิพิดสูงสุด 42.44 mg/L ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่าย MUS2 ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.2 g/L ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงและปริมาณลิพิดเท่ากับ 55mg/L ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนสาหร่าย MSU3 ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.133 g/L ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และให้ปริมาณลิพิดสูงสุด 36 mg/L ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

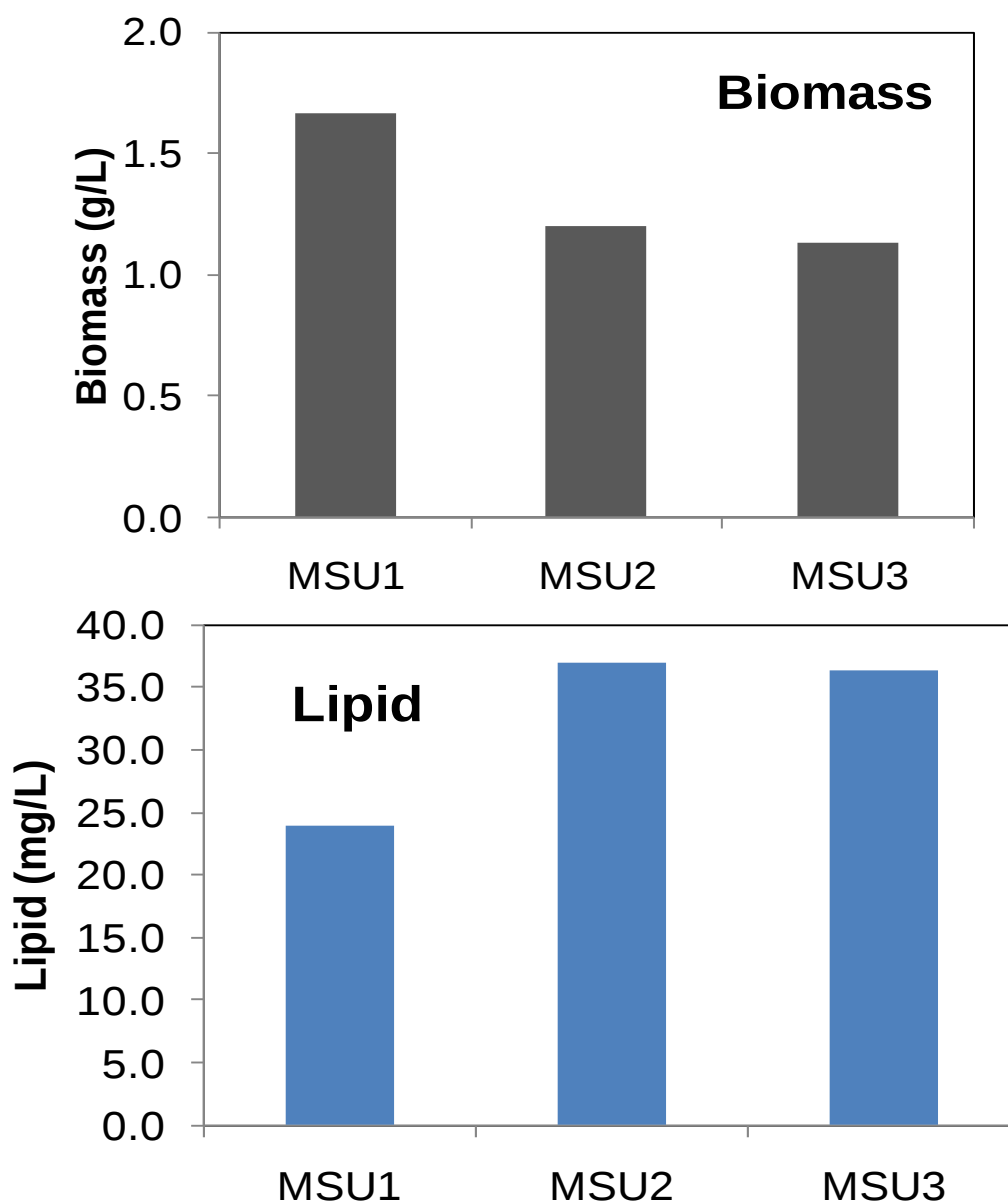


รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลทคือ MSU1, MSU2, MSU3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง สาหร่ายไอโซเลท MSU1 ให้มวลเซลล์สูงสุดที่ 1.667 g/L แต่ให้ลิปิด 23.942 mg/L ส่วนสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 1.2g/L และลิปิด 37.003mg/L และสาหร่ายไอโซเลท MSU3 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 1.133g/L และลิปิด 36.354mg/L เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิปิดพบว่าสาหร่ายไอโซเลท MSU1 ให้อัตราการผลิตลิปิดสูงสุดที่ 3.700 mg/L/d ในขณะที่สาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU2 ให้อัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 2.394 และ 3.635 mg/L/d ตามลำดับ ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.1

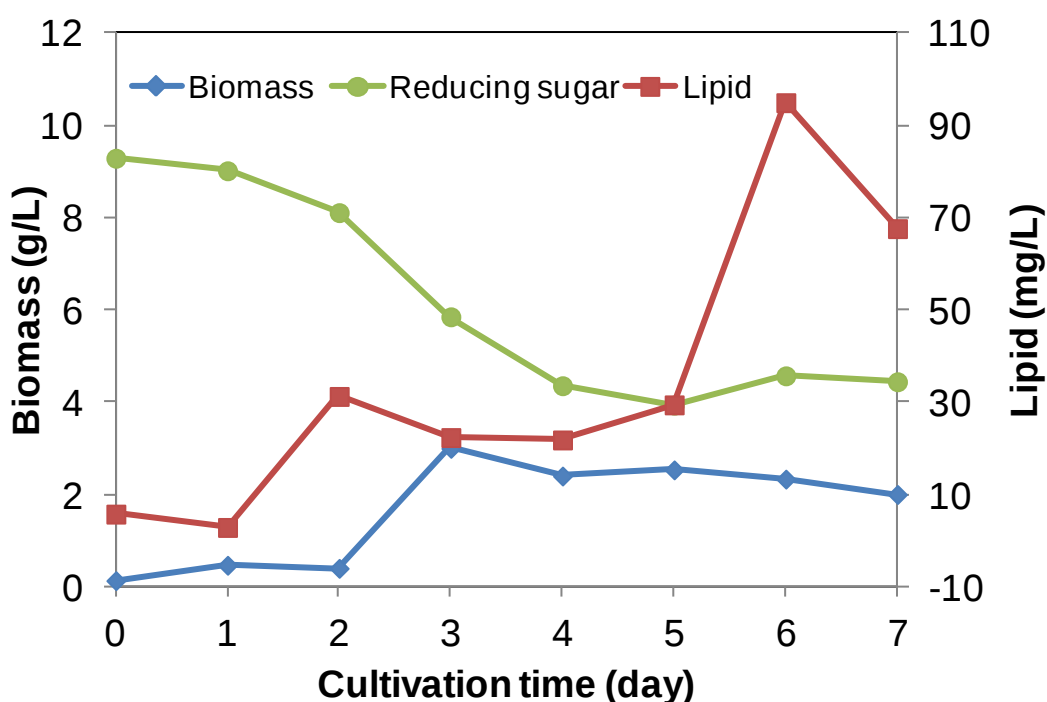


รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิปิดของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU2 และ MSU3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 10 วันของการเพาะเลี้ยง

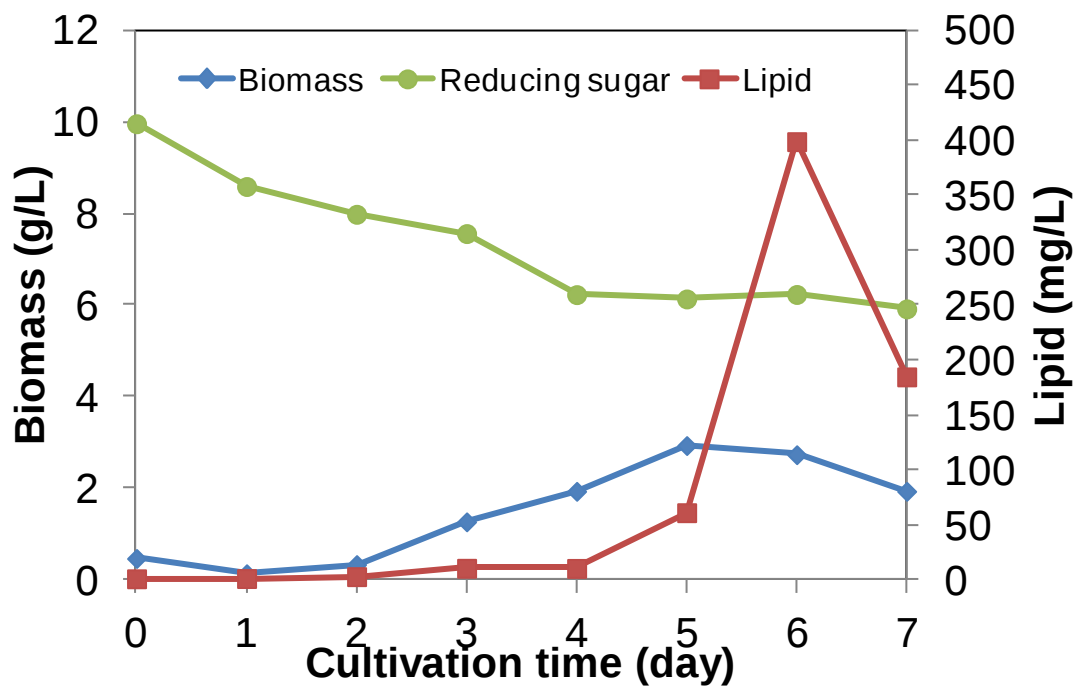
ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณมวลเซลล์ (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (mg/L) และอัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate, mg/L/d) ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 ในอาหาร Bristol medium ภายใต้สภาวะการสังเคราะห์แสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

สาหร่ายขนาดเล็ก	Biomass (g/L)	Lipid (mg/L)	Lipid production rate (mg/L/d)
MSU1	1.667	23.942	2.394
MSU2	1.200	37.003	3.700
MSU3	1.133	36.354	3.635

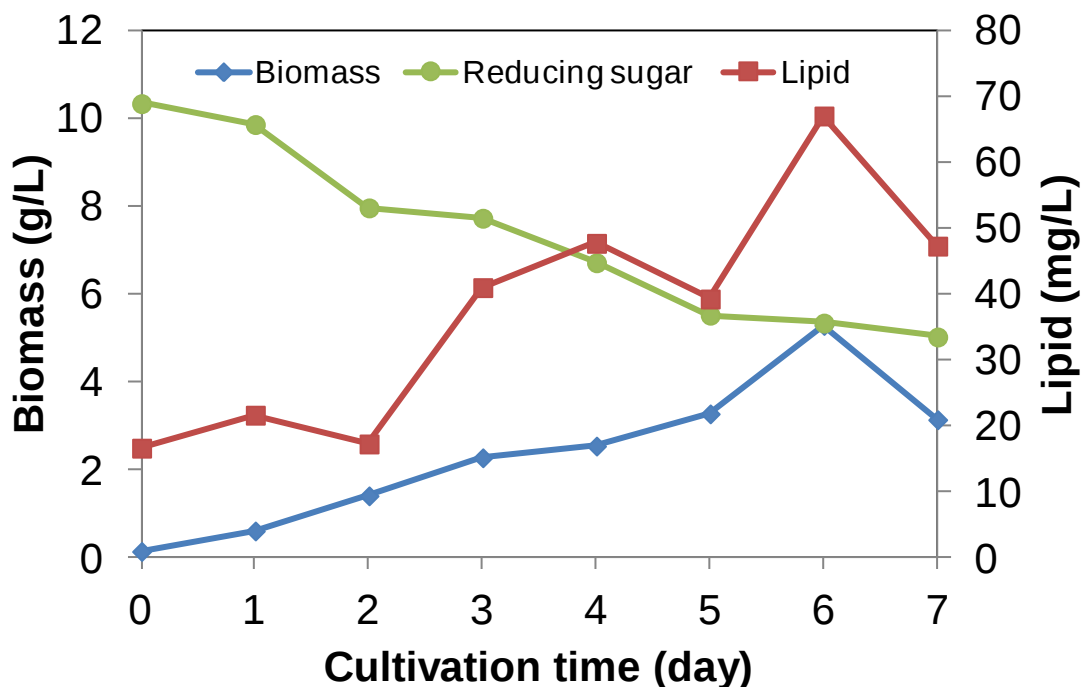
4.3.2 การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (Heterotrophic cultivation) การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่าย ไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ในฟลาสก์ขนาด 500mL ปริมาตรอาหาร 200mL โดยมีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน และมีโซเดียมไนเตรท (NaNO_3) 3g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าด้วย magnetic stirrer plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.10-4.12



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) น้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) และลิปิด (lipid) ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

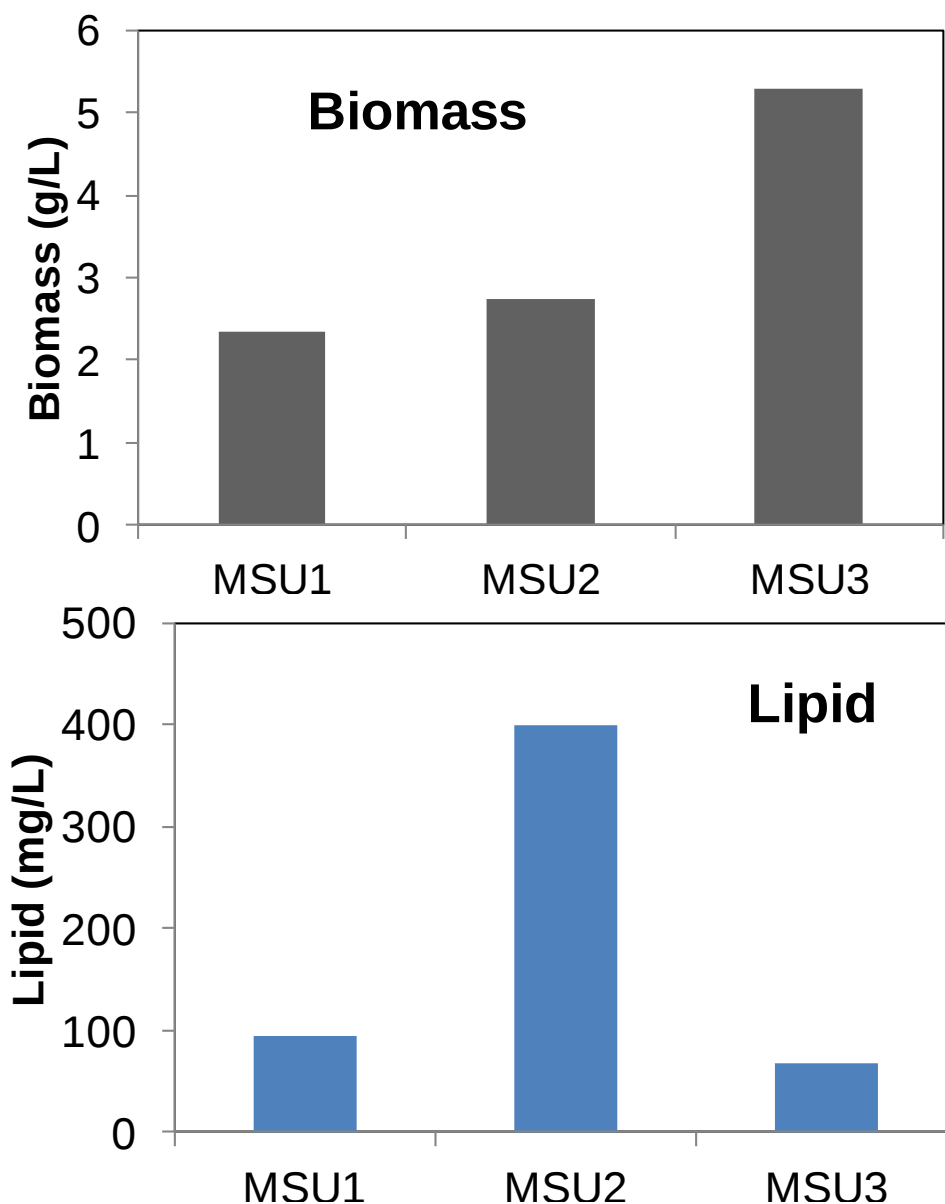


รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) และลิพิด (lipid) ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) และลิพิด (lipid) ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลทคือ MSU1, MSU2, MSU3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก สำหรับไอโซเลท MSU1 ให้มวลเซลล์สูงสุดที่ 2.333g/L และลิปิด 94.90mg/L ส่วนสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 2.73g/L และลิปิด 398.86mg/L และสำหรับไอโซเลท MSU3 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 5.28g/L และลิปิด 67.0mg/L เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิปิดพบว่าสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้อัตราการผลิตลิปิดสูงสุดที่ 66.48 mg/L/d ในขณะที่สาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU3 ให้อัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 15.82 และ 11.17 mg/L/d ตามลำดับ ผลการศึกษา ดังรูปที่ 4.13 และตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิปิดของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU2 และ MSU3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เพื่อการเจริญ (consumed sugar, g/L) ปริมาณมวลเซลล์ (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (mg/L) อัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate, mg/L/d) และ Yield ($Y_{x/s}$) ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 ในอาหาร Bristol medium ที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน

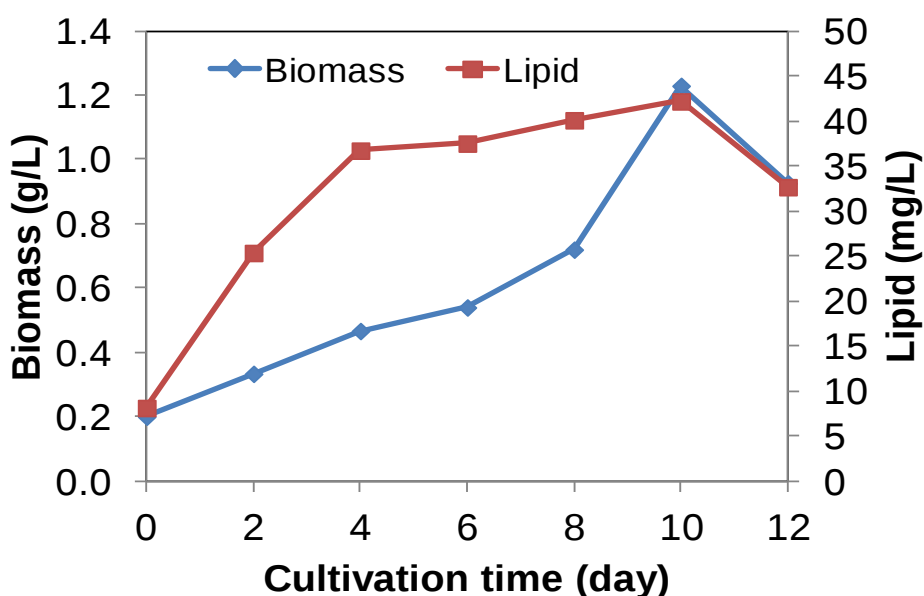
สาหร่าย	Consumed Sugar (g/L)	Biomass (g/L)	Lipid (mg/L)	Lipid production rate (mg/L/d)	$Y_{x/s}$
MSU1	4.71	2.333	94.90	15.82	0.495
MSU2	3.73	2.73	398.86	66.48	0.733
MSU3	5.00	5.280	67.00	11.17	1.056

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาดำเนินการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลท คือ MSU1, MSU2, MSU3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสงและแบบเฮเทอโรโทรฟิก พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกสาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลทเจริญเร็วและให้ทั้งปริมาณเซลล์และลิปิดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Xu และคณะ (2006) ที่รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* ภายใต้การสังเคราะห์แสงและภายใต้สภาวะไม่มีแสงโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณลิปิด 14.57% และ 55.6% โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KKU-S2 พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกให้ทั้งผลผลิตมวลเซลล์และลิปิดสูงกว่าแบบสังเคราะห์แสง (Leesing et al., 2011) โดยจากผลการศึกษาดังกล่าวจึงคัดเลือกสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ซึ่งให้อัตราการผลิตสูงสุดเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

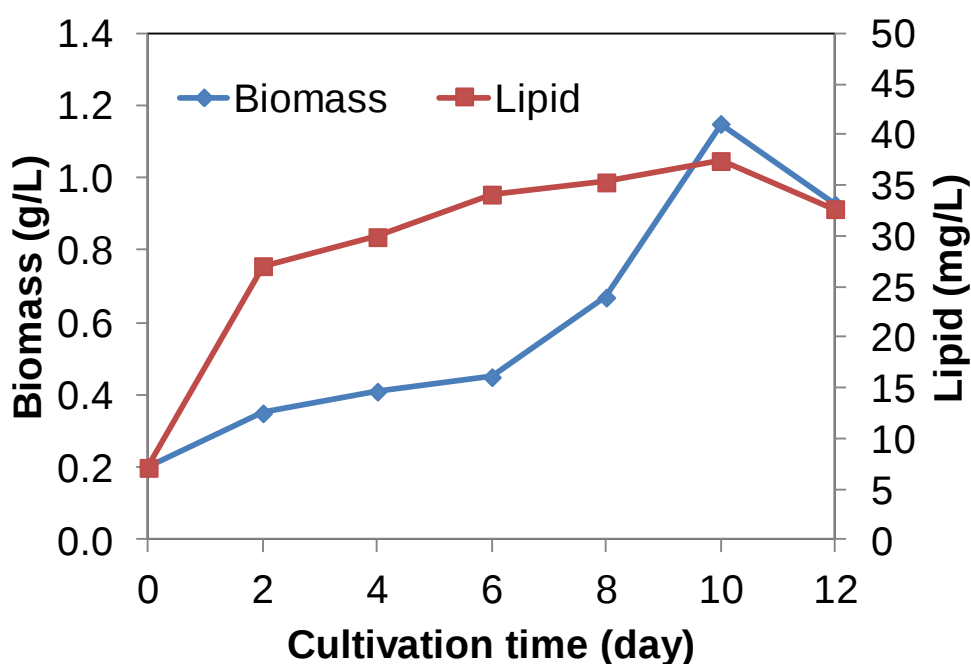
4.4 การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและผลิตลิปิดของสาหร่ายที่คัดเลือกได้

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ที่พบว่าให้อัตราการผลิตลิปิดสูงกว่าไอโซเลท WSU1, WSU3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของสาหร่ายไอโซเลท MSU2

4.4.1 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตลิปิดของสาหร่ายด้วยเพาะเลี้ยงด้วยการสังเคราะห์แสง โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหาร Bristol medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน 2 ชนิดคือ NaNO_3 และยูเรีย (urea) ในฟลาสก์ขนาด 500mL ปริมาตรอาหาร 250mL ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ 3.0 g/L บ่มภายใต้แสงที่อุณหภูมิห้องโดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยการพ่นอากาศผสมผ่านเครื่องพ่นอากาศ เป็นเวลา 12 วัน จากการศึกษาพบว่าการเจริญของสาหร่ายในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันเป็นไปในทิศทางเดียวกันโดยการผลิตและสะสมลิปิดของเซลล์จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 และสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายไอโซเลท MSU2 สามารถใช้ทั้ง NaNO_3 และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญได้ ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.14-4.16

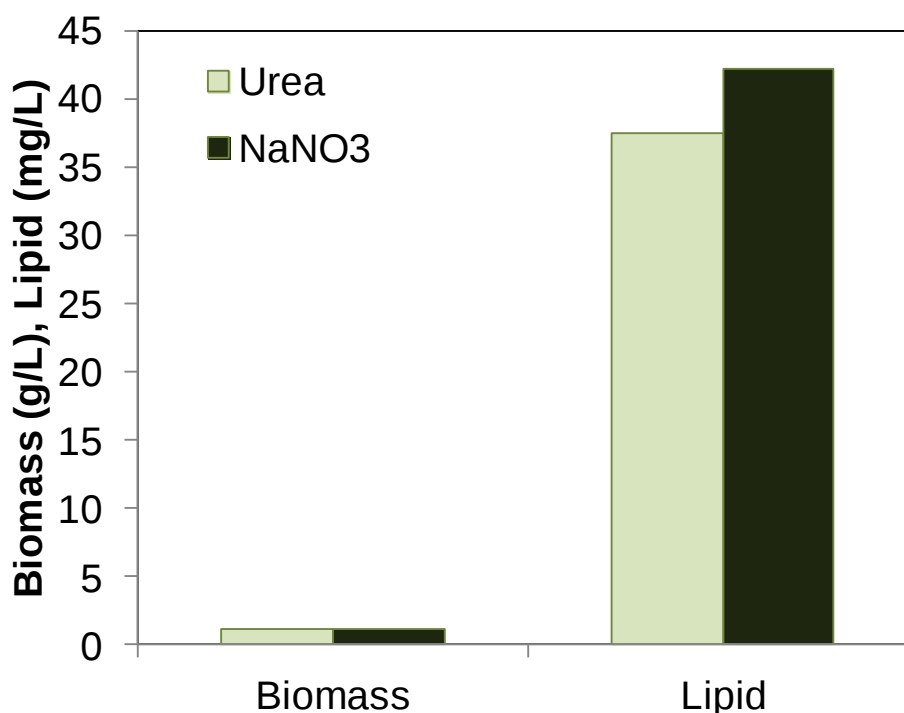


รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เมื่อมี NaNO_3 3.0 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน



รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เมื่อมียูเรีย (urea) 3.0 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน

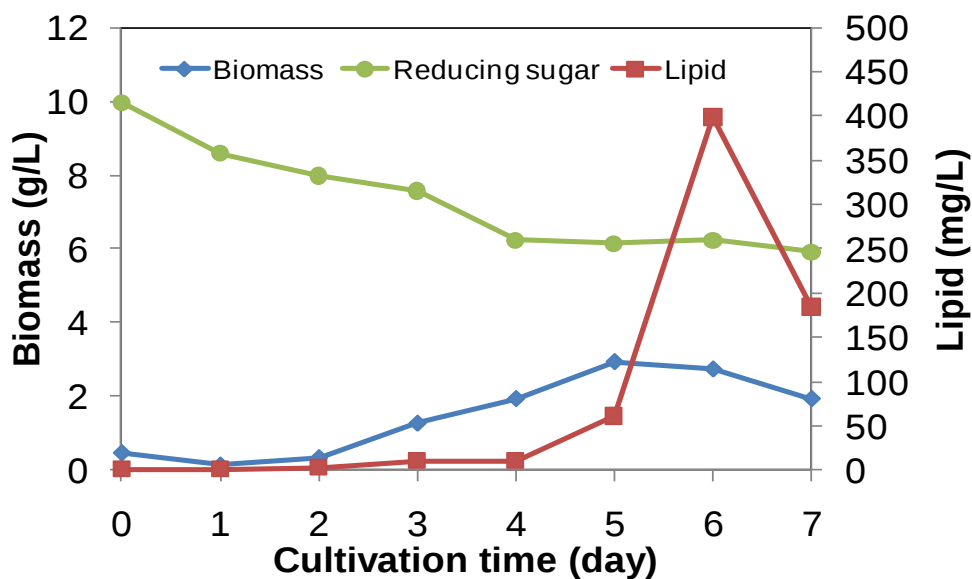
จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.23 g/L และลิปิด 42.2mg/L ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.15 g/L และลิปิด 37.41mg/L ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยไนโตรเจนทั้ง 2 แหล่งมีความแตกต่างกันมากนัก ดังนั้นจึงเลือกใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขั้นต่อไป



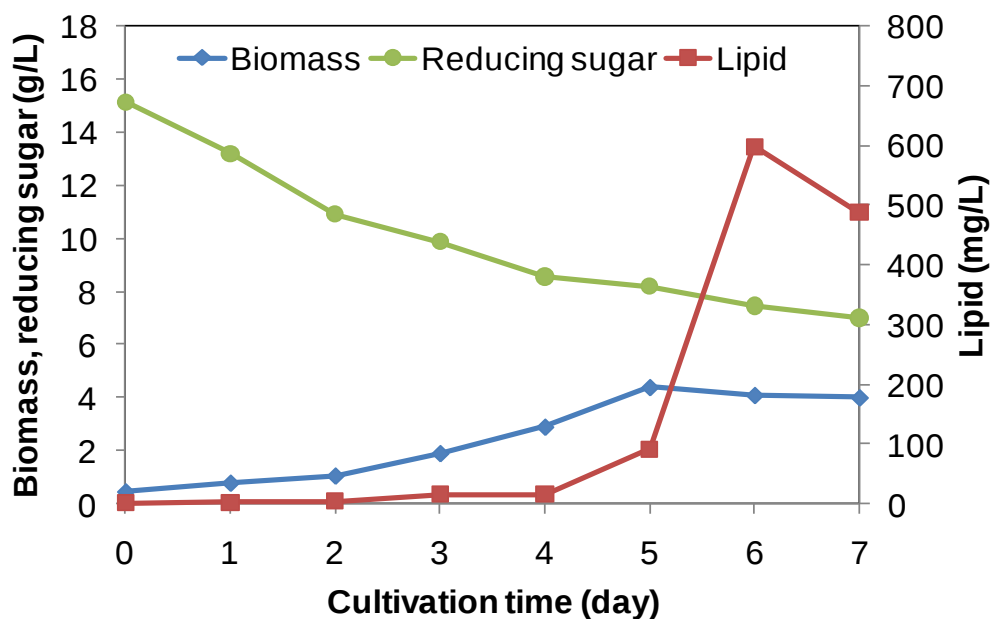
รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิปิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เมื่อมียูเรีย (urea) และ NaNO_3 3.0 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยพ่นให้อากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

4.4.2 การศึกษาผลของปริมาณกลูโคสต่อการผลิตลิปิดของสาหร่ายด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหาร Bristol medium ที่มี NaNO_3 3.0g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ในฟลาสก์ขนาด 500mL ปริมาตรอาหาร 250mL แปรผันปริมาณกลูโคสที่ค่าต่างๆ บ่มด้วยการกวนบน stirrer plate ที่อุณหภูมิห้อง ในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 7 วัน

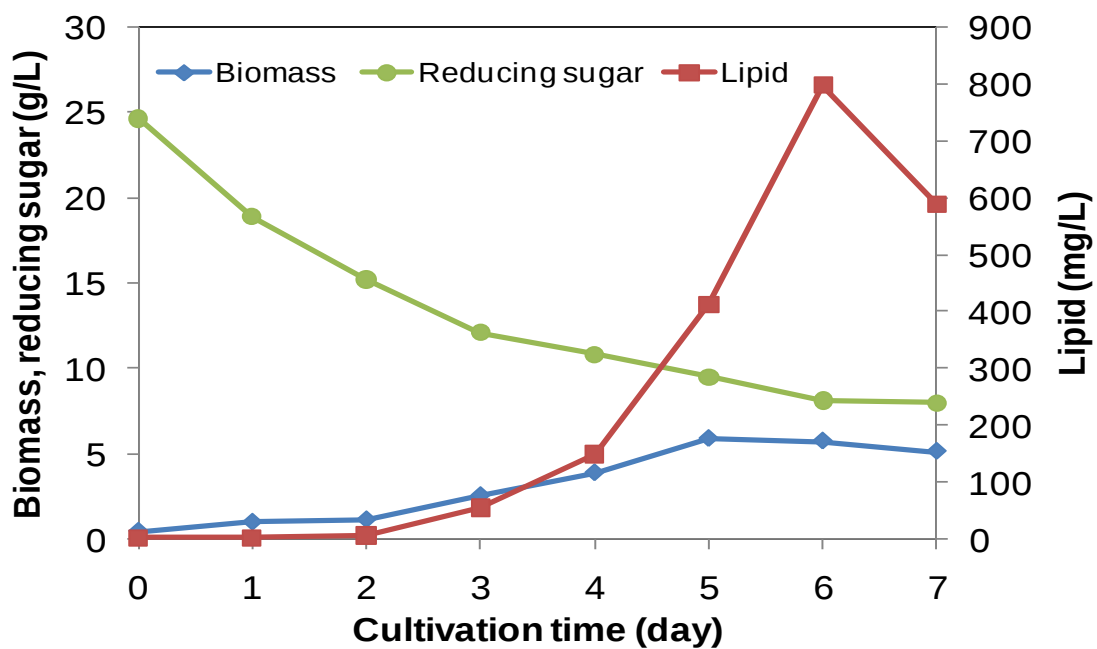
จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญได้ในกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ สาหร่ายขนาดเล็ก ไอโซเลท MSU2 มีการเจริญอย่างรวดเร็วตามปริมาณการลดลงของกลูโคสโดยสาหร่ายขนาดเล็กเจริญสูงสุดหรือเข้าสู่ช่วงปลายของการเจริญระยะ exponential phase หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ผลการศึกษาวิจัยดังรูปที่ 4.17-4.19



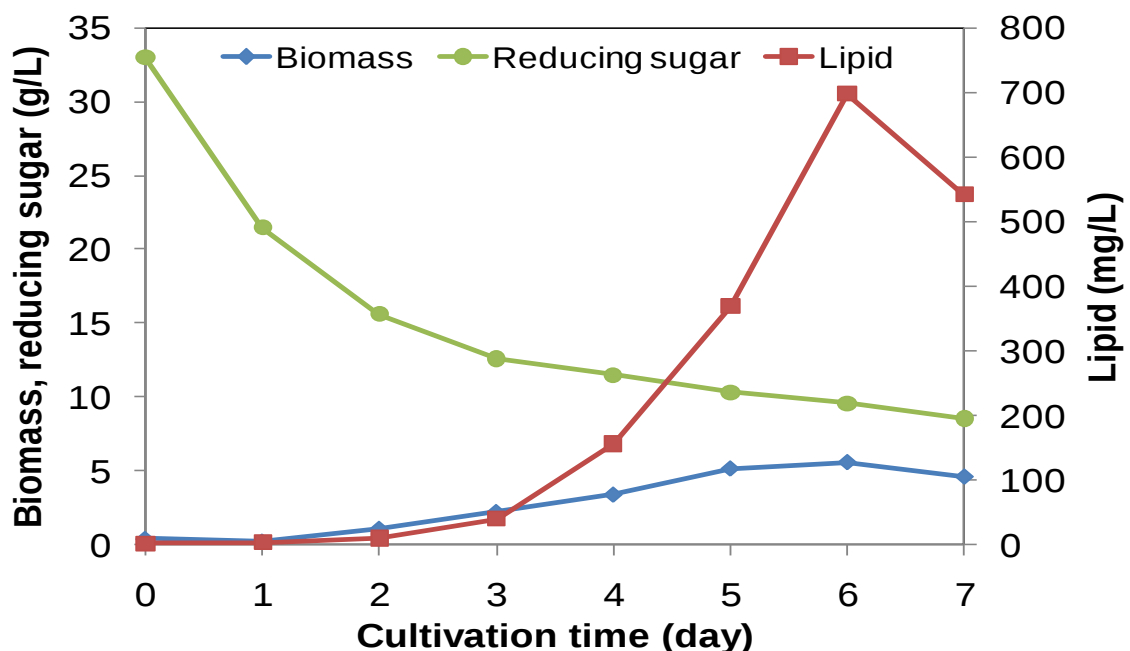
รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เมื่อมี NaNO_3 3.0 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนและกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic cultivation) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เมื่อมี NaNO_3 3.0 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนและกลูโคส 30g/L เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic cultivation) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.19 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เมื่อมี NaNO_3 3.0 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนและกลูโคส 40g/L เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic cultivation) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) และลิพิด ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium เมื่อมี NaNO_3 3.0 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนและกลูโคส 50g/L เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic cultivation) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก ให้มวลเซลล์สูงสุดที่ 5.72 g/L และปริมาณลิปิด 797.72mg/L เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 40 g/L เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 20, 30, 50 g/L ให้ปริมาณมวลเซลล์ 2.73, 4.52, 5.56 g/L ตามลำดับ และปริมาณลิปิด 398.86, 598.29, 698.01 เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิปิดพบว่าอัตราการผลิตลิปิดสูงสุดที่ 132.954mg/L/d ในอาหารที่มีกลูโคส 40g/L แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการเจริญ (Yx/s) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 30g/L ให้ค่า Yx/s สูงสุดที่ 0.587 ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (Biomass) ลิปิด (lipid) น้ำตาลรีดิคส์ที่ใช้ (consumed sugar) อัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) และค่า Yx/s ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท MUS2 ในอาหาร Bristol medium ที่มีกลูโคสค่าต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

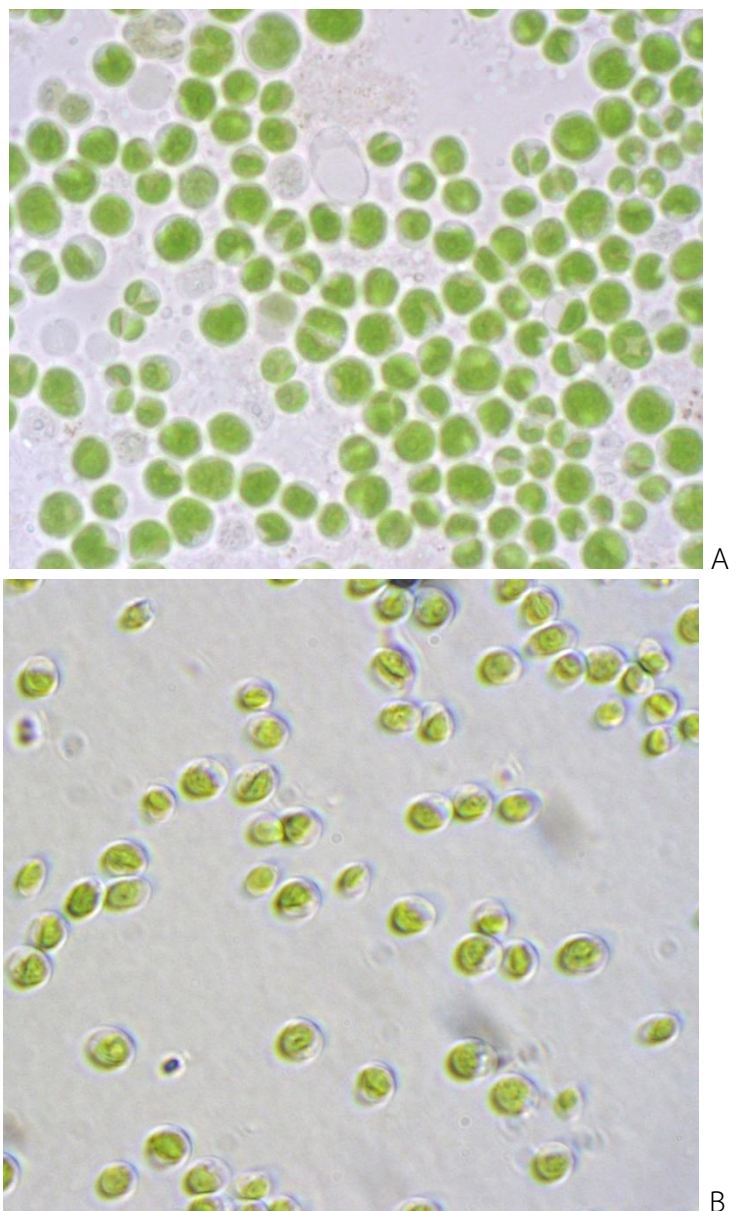
Glucose (g/L)	Biomass (g/L)	Lipid (mg/L)	Consumed sugar (g/L)	Lipid production rate (mg/L/d)	Y _{x/s}
20	2.73	398.86	6.700	66.477	0.408
30	4.52	598.29	7.700	99.716	0.587
40	5.72	797.72	16.520	132.954	0.346
50	5.56	698.01	23.440	116.335	0.237

ผลการศึกษาวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Miao et al. (2004) ที่รายงานว่าในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella protothecoides* ภายใต้สภาวะเฮเทโรโทรฟิกเมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งอินทรีย์คาร์บอนและลดแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนหรือที่ค่า C/N ratio สูง พบว่าสาหร่าย *Chlorella protothecoides* ให้ปริมาณลิปิดสูงขึ้นและสูงมากกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้การสังเคราะห์แสงถึง 4 เท่า

จากผลการศึกษาจะเห็นว่าสาหร่ายขนาดเล็กไอโซเลท MSU2 สามารถเจริญได้ทุกค่าของปริมาณกลูโคส โดยปริมาณกลูโคสสูงจะเหมาะสำหรับการผลิตลิปิดมากกว่าการเจริญหรือการเพิ่มปริมาณเซลล์ จากผลการศึกษาของ Turcotte and Kosaric (2004), Hassan et al. (1996) และ Papanikolaou et al. (2004) ซึ่งสรุปว่าค่า C/N ratio ต่ำหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคสต่ำและปริมาณไนโตรเจนสูงนั้นเหมาะต่อการเจริญหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ในช่วงของการผลิตลิปิดนั้นเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นลิปิดจึงต้องการกลูโคสสูง นอกจากนั้นการกีดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการกีดการเจริญของจุลินทรีย์โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนหรือที่ค่า C/N ratio สูงนั้นเซลล์จะลดการใช้ NADPH ในการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเจริญและเมื่อเซลล์มีการสะสม NADPH มากขึ้นจะส่งเสริมให้เซลล์มีการสังเคราะห์ลิปิดสูงขึ้น ซึ่งการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอมจำนวน 1 โมลต้องการ NADPH จำนวน 16 โมล โดยจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ลิปิดต้องมีสมบัติดังนี้ คือ มีความสามารถในการผลิต acetyl-CoA ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน และมีความสามารถในการผลิต NADPH มากเพียงพอเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Yamane et al., 1997; Johnson and Schroeder, 1996; Ratledge, 2004) ผลการศึกษาในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กไอโซเลท MSU2 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสสูงสุดที่ 40 g/L พบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญและผลิตลิปิดต่ำลงอาจเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำไม่เพียงพอต่อการส่งเสริมการเจริญอีกทั้งยังมีผลของการยับยั้งการเจริญเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสที่สูง

เกินไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 โดยพบว่าการเจริญลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 120 g/L (Li et al., 2007) และสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* sp. KKU-S2 เจริญและผลิตลิปิดลดลงเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสสูงกว่า 90g/L (Leesing and Nontaso, 2010)

เมื่อศึกษาโครงสร้างของเซลล์สาหร่ายไอโซเลท MSU2 ที่เพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสงและแบบเฮเทโรโทรฟิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000x พบว่าเซลล์สาหร่ายประกอบด้วยเม็ดน้ำมัน (oil droplet) ภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 แสดงรูปร่างของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กไอโซเลท MSU2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Bristol, A: ภายใต้การสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cell), B: ภายใต้สภาวะเฮเทโรโทรฟิก (heterotrophic cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000x

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการแยกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจากตัวอย่างน้ำจืดที่เก็บจากพื้นที่เขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี ในเดือนมกราคม 2554 จำนวน 7 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน (enrichment) ในอาหาร Bristol medium และเทคนิคการซีดลากบนผิวหน้าอาหารแข็งสามารถแยกสาหร่ายบริสุทธิ์ได้จำนวน 6 ไอโซเลท โดยกำหนดชื่อเป็น MSU1, MSU2, MSU3, MSU4, MSU5, MSU6 ตามลำดับ โดยสาหร่ายที่เจริญเร็วเมื่อมีการถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้ง ไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 และการคัดเลือกสาหร่ายเบื้องต้นพบว่าไอโซเลท MSU1, MSU2, MSU3 สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในสภาวะสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) และภายใต้สภาวะไม่มีแสงหรือเฮเทโรโทรฟิก (heterotrophic cultivation) เมื่อนำสาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลทมาคัดเลือกสาหร่ายที่สามารถเจริญและสะสมลิพิดได้สูงด้วยการเพาะเลี้ยงภายใต้การสังเคราะห์แสงและสภาวะไม่มีแสงหรือเฮเทโรโทรฟิก พบว่าสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้ปริมาณลิพิดสูงสุดภายใต้การเพาะเลี้ยงทั้ง 2 แบบ

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ไอโซเลทคือ MSU1, MSU2, MSU3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง สาหร่ายไอโซเลท MSU1 ให้มวลเซลล์สูงสุดที่ 1.667 g/L แต่ให้ลิพิด 23.942 mg/L ส่วนสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 1.2g/L และลิพิด 37.003mg/L และสาหร่ายไอโซเลท MSU3 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 1.133g/L และลิพิด 36.354mg/L เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิพิดพบว่าสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้อัตราการผลิตลิพิดสูงสุดที่ 3.700 mg/L/d ในขณะที่สาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU3 ให้อัตราการผลิตลิพิดเท่ากับ 2.394 และ 3.635 mg/L/d ตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก สาหร่ายไอโซเลท MSU1 ให้มวลเซลล์สูงสุดที่ 2.333g/L และลิพิด 94.90mg/L ส่วนสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 2.73g/L และลิพิด 398.86mg/L และสาหร่ายไอโซเลท MSU3 ให้ปริมาณมวลเซลล์ 5.28g/L และลิพิด 67.0mg/L เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิพิดพบว่าสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ให้อัตราการผลิตลิพิดสูงสุดที่ 66.48 mg/L/d ในขณะที่สาหร่ายไอโซเลท MSU1, MSU3 ให้อัตราการผลิตลิพิดเท่ากับ 15.82 และ 11.17 mg/L/d ตามลำดับ

เมื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสงพบว่าเมื่อใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.23 g/L และลิพิด 42.2mg/L ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.15 g/L และลิพิด 37.41mg/L ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นที่ค่าต่างๆ กลูโคสต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของสาหร่ายไอโซเลท MSU2 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทโรโทรฟิก ให้มวลเซลล์สูงสุดที่ 5.72 g/L และปริมาณลิพิด 797.72mg/L เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 40 g/L เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 20, 30, 50 g/L ให้ปริมาณมวลเซลล์ 2.73, 4.52, 5.56 g/L ตามลำดับ และปริมาณลิพิด 398.86, 598.29, 698.01 เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิพิดพบว่าอัตราการผลิตลิพิดสูงสุดที่ 132.954mg/L/d ในอาหารที่มีกลูโคส 40g/L แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการเจริญ ($Y_{x/s}$) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 30g/L ให้ค่า $Y_{x/s}$ สูงสุดที่ 0.587

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาจะเห็นว่าปริมาณเซลล์และลิปิดที่ผลิตโดยสาหร่ายไฮโซเลท MSU2 ที่คัดเลือกได้ยังไม่สูงมากนักอาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น การผลิตลิปิดจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กด้วยการสังเคราะห์แสงในการศึกษาครั้งนี้ทำให้อากาศธรรมดาโดยไม่มีการให้คาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มเติมดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปควรศึกษาการเพิ่มหรือการเติมปริมาณการให้คาร์บอนไดออกไซด์เนื่องจากภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสงการเพิ่มแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ปริมาณลิปิดจากสาหร่ายสูงขึ้นโดยคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้สามารถนำมาจาก Flue gas จากโรงงานอุตสาหกรรมหรือการเลี้ยงเชื้อแบบบูรณาการระหว่างสาหร่ายและยีสต์โดยนำ CO₂ จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเชื่อมต่อเข้ากับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์ CO₂ ทดแทนการปล่อยสู่บรรยากาศได้อีกทางหนึ่ง (Paungbut and Leesing, 2012) ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกนั้นควรศึกษาถึงชนิดของแหล่งอินทรีย์คาร์บอนราคาถูกทดแทนกลูโคสเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น ผลผลิตและวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร (agro-industry waste) เช่น กากน้ำตาล น้ำกากสำ (distillery slop) น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาลหรือโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร หรือการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (agricultural residues) เช่น ฟางข้าว หญ้าแห้ง ชานอ้อย และกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลพลอยหรือของเสียเหลือทิ้งที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซล เพื่อศึกษาศักยภาพของวัตถุดิบเหล่านี้ที่มีอยู่ปริมาณสูงในการใช้ผลิตลิปิดหรือน้ำมันจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำสำหรับผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นแนวทางในการแข่งขันกับวัตถุดิบกลุ่มน้ำมันพืชที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

นอกจากนั้นควรศึกษาการถึงสภาวะต่างๆ และกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เช่น การเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนหรือแบบกึ่งกะ (fed-batch cultivation) ที่มีรายงานว่า เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณเซลล์และลิปิดสูงขึ้น (Wen et al, 2002; Shi et al, 2002; Xu et al, 2006) นอกจากนี้อาจศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงแบบผสม (mixed culture) ระหว่างสาหร่ายที่คัดเลือกได้และยีสต์ไขมันสูงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกซึ่งมีรายงานว่าให้ปริมาณมวลเซลล์และลิปิดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว (Leesing et al, 2012, Papone et al, 2012) รวมทั้งการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่พบในลิปิดที่ผลิตได้และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายที่ผลิตได้ เป็นต้น

1. กรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน. (2550). มาตรฐานไบโอดีเซล. <http://www.doeb.go.th>
2. Antolin, G., Tinaut, F.V., Briceno, Y., Castano, V., Perez, C., Ramirez, A.I. (2002). Optimization of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresour. Technol.* 83:111-114.
3. Aresta, M., Dibenedetto, A., Barberio, G., (2005). Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: development of computing software for an LCA study. *Fuel Processing Technology* 86: 1679-1693.
4. Becker, E.W., (1994). Chemical composition. Application of algae. In Becker, E.W. (ed) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press London. Pp. 177-195.
5. Berlarbi, E.H., Molina Grima, E., Chiti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentanoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microbiol. Technol.* 26:516-259.
6. Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 557–577.
7. Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22:1490-1506.
8. Chang, E.H., Yang, S.S. (2003). Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 43-52.
9. Chelf, P. (1990). Environment control of lipid and biomass production in two diatom species. *J. Appl. Phycol.* 2:121-129.
10. Chen, C.H., Kuei-Ling Yeh, K-L., Aisyah, R., Lee, D-J., Chang, J-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* 102: 71–81.
11. Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.
12. Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48:1148-1151.
13. Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B., Lan, C.Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J. Biotechnol.* 141:31-41.

14. Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., Dias, S.S., Roessler, P.G. (1996). Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57: 223-231.
15. Danielo, O., (2005). An algae-based fuel. *Biofuture*, No.225/May.
16. Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92:405-416.
17. Hassan, M., Blanc, P.J., Grangerf, M.L., Pareilleux, A., Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochem.* 31: 355-361.
18. Harold, C.B., Michael, J.W. (1978). Division Chlorophycophyta. In *Introduction to the Algae*. Prentice-Hall Press, USA, pp. 63-244.
19. Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 631-635.
20. Johnson, E.A., Schroeder, W.A. (1996). Microbial carotenoids. In: Fiechter, A., editor. *Advances in Biochemistry Engineering Biotechnology*. New York: Springer, p. 119-178.
21. Kessler, E. (1985). Upper limits of temperatue for growth in *Chlorella* (Chlorophyceae). *PlantSyst. Evol.* 151:67-71.
22. Kwon, D.Y., Rhee, J.S. (1986). A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. *J Am. Oil Chem. Soc.* 63:89-92
23. Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J., Hertz, P.B., (2001). Preparation and characterization of bio-diesel from various bio-iols. *Bioresour. Technol.* 80: 53-62.
24. Lee, J-Y, Yoo, C., Jun, S-Y, Ahn, C-Y, Oh, H-M. (2009). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technol.* In press
25. Leasing, R., Nontaso, N. (2008). Isolation and cultivation of oleaginous green microalgae for lipid production. *Proceeding of the Second International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS)*, 2-3 October 2008, Hanoi, Vietnam.
26. Leasing, R., Samhadthai, S., Nontaso, N. (2009). Microalgal oil production by green microalgae under heterotrophic cultivation. *Proceeding of The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products*. 26-28 August 2009, Khon Kaen, Thailand.
27. Leasing, R., Subinnam, P., Papone, T. (2010). Microalgal oil production from agricultural residue hydrolysates under heterotrophic cultivation. *Proceeding of the Lignobiotech One Symposium: 1st Symposium on Biotechnology Applied Lignocelluloses*. 28 March-1 April 2010, Reims, France.

28. Leasing, R., Kookkhunthod, S. (2011). Heterotrophic growth of *Chlorella* sp. KKU-S2 for lipid production using molasses as a carbon substrate. Proceedings of the International Conference on Food Engineering and Biotechnology (ICFEB2011), May 28-29, 2011, Bangkok, Thailand, pp 87-91.
29. Leasing, R., Kookkhunthod, S., Nontaso, N. (2011). Microalgal lipid production by microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology 76 2011, April 27-29, 2011, Venice, Italy, pp 441-444.
30. Leasing, R., Baojungharn, R., Papone, T. (2012). Microbial Oil Production by Mixed Culture of Microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2 and Yeast *Torulaspora maleeae* Y30. World Academy of Science, Engineering and Technology 64 2012: 1055-1058.
31. Leasing, R., Nontaso, N. (2010). Microalgal oil production by green microalgae under heterotrophic cultivation. KKU Research Journal, 15 (9): 787-793.
32. Leasing, R., Kookkhunthod, S., Subinnam, P. (2012). Heterotrophic microalgal oil production by *Chlorella* sp. KKU-S2 using agricultural residues hydrolysates as carbon substrate. KKU Science Journal 40 (supplement): 237-242.
33. Mata-Alvarez, J., Mace, S., Llabres, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. Bioresour. Technol. 74:3-16.
34. Miao, X., Wu, Q., (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresour. Technol. 97: 841-846.
35. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 426-428.
36. Molina Grima, E., Acien Fernandez, F.G., Garcia Camacho, F., Chisti, Y. (1999). Photobioreactors : light regime, mass transfer, and scaleup. J. Biotechnol. 70:231-247.
37. Piccolo, A. (2009). Algae oil production and its potential in the Mediterranean region 1st EMUNI Research Souk 2009 (EMUNI ReS 2009). The Euro-Mediterranean Student Research Multi-conference Unity and Diversity of Euro-Mediterranean Identities, 9 June 2009.
38. Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:287-293.
39. Sanchez Miron, A., Ceron Garcia, M.C., Contreras Gomez, A. Garcia Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y. (2003). Shere stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum trocornutum* in guasi steady state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochem. Eng. J. 16:287-297.
40. Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y., Yokoyama, S.Y., (1995). CO₂ fixation and oil production through microalga. Energy Convers Manage. 36: 729-731.

41. Scragg, A.H., Morrison, J., Shales, S.W., (2003). The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 884-889.
42. Sheehan, J., Dunahay, T., Bebermann, J., Roessler, P., (1998). A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program- Biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy's Office of fuels development. Colorado, USA.
43. Shi, X.M., Jiang, Y., Chen, F., (2002). High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnol. Prog.* 18, 723-727.
44. Singh, J., Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 2596-2610.
45. Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Biores Technol.* 95: 287-291.
46. Papone, T., Kookkhuntod, S., Leasing, R. (2012). Microbial Oil Production by Monoculture and Mixed Cultures of Microalgae and Oleaginous Yeasts using Sugarcane Juice as Substrate. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 64 2012: 1127-1131.
47. Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815.
48. Raven, R.P.J.M., Gregersen, K.H. (2007). Biogas plants in Denmark: successes and setbacks. *Renew. Sustain Energy Rev.* 11:116-132.
49. Roessler, P.G., Brown, L.M., Dunahay, T.G., Heacox, D.A., Jarvis, E.E., Schneider, J.C. (1994). Genetic engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. *ACS Symp. Ser.* 566:255-270.
50. Turcotte, A., Kosaric, N. (1989). The effect of C/N ratio on lipid production by *Rhodospiridium toruloides* ATCC10788. *Biotechnol. Lett.* 9: 637-642.
51. Vicente, G., Martinez, M., Aracil, J., 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour. Technol.* 92, 297-305.
52. Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* 99:4021-4028.
53. Umdu ES, Tuncer M, Seker E. (2009) Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts. *Bioresour Technol* 100:2828-2831.
54. Wen, Z.Y., Jiang, Y., Chen, F., (2002). High cell density culture of the diatom *Nitzschin laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development. *Process Biochem.* 37:1447-1453.

55. Wen, Z-Y., Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by a. microalgae. *Biotechnology Advances* 21: 273-294.
56. Widjaja, A., Chien, C-C, Ju, Y-H. (2009). Study of increasing lipid production from freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Insitute Chemical Engineers.* 40 :13-20.
57. Yamane, Y.M., Higashida, K., Nakashimada,Y., Kakizono, T., Nisho, N. (1997). Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyme* in batch and fed-batch culture: kinetic and stoichiometric analysis. *Environ. Microbiol.* 63: 4471-4478.
58. Yun, Y.S., Lee, S.B., Park, J.M., Lee, C.I., Yang, J.W. (1997). Carbondioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69:451-455.
59. Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q. (2008) High-density fermentation of microalgae *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:29-36.
60. Xu, H., Miao, X., Wu, Q., (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126:499-507.
61. Zhu, M., Zhou, P.P., Yu, L.J., 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresour. Technol.* 84, 93.

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (mg/L)

NaNO ₃	250
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
CaCl ₂	25
NaCl	25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
FeCl ₂	0.3
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
H ₃ BO ₃	0.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.06

ปรับ pH 7.0 ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อ

เติมวุ้น (agar) 15 g/L สำหรับอาหาร Bristol agar

2. การวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง (dry weight method)

อบกระดาศกรองหรืออลูมิเนียมฟอยล์ที่พับเป็นรูปกระทง อบที่ 90 °C นาน 4 ชม. นำไปทำให้เย็นในโอบแห้ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด ปิเปตสารแขวนลอยเชื้อ (suspension) ของเชื้อลงในหลอด centrifuge ปริมาตร 5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ถ่ายสารแขวนลอยเชื้อลงในกระทงจากนั้นนำไปอบที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 ชม. ทำให้เย็นในโอบแห้งแล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือ น้ำหนักของเซลล์จุลินทรีย์ต่ออาหาร 5 mL

3. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ DNS (Miller, 1959)

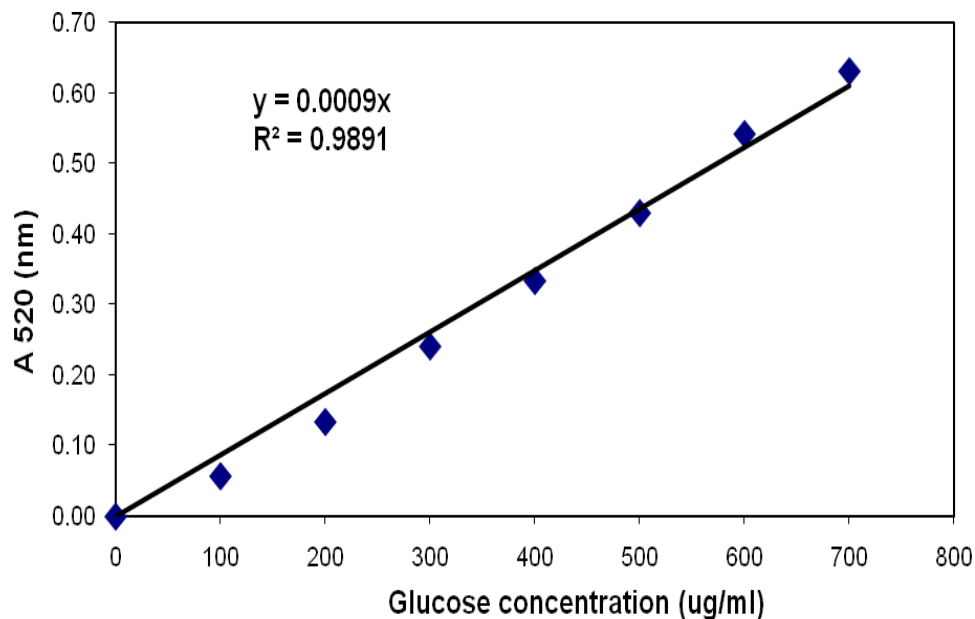
สารเคมี

1. 2 N NaOH
2. DNS solution : เตรียมโดยละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 g ใน 50 mL ของ 2 N NaOH โดยค่อยๆ เติมและคนจนละลาย จากนั้นเติม Sodium potassium tetrates (Rochelle salt) 7.5 g คนจนละลายเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 mL เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการทดลอง

1. ดูตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลมา 0.1-1.0 mL ใส่ลงในหลอดแก้ว ใช้น้ำกลั่นเป็น blank เติม DNS solution 1 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และปิดปากหลอดในระหว่างต้ม ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในอ่างน้ำเย็น
2. เติมน้ำ 10 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และนำค่าไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส อ่านค่าความเข้มข้นของกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน ซึ่ง

ได้จากการทดลองวิธีเดียวกันโดยใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 $\mu\text{g/mL}$



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

4. การวิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธีวัดสี Colorimetric method: Know and Rhee

สารเคมี

1. สารละลาย Copper reagent

ซึ่ง cupric acetate 25 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 mL ปรับ pH 6.1 ด้วย pyridine ปรับปริมาตรเป็น 500 mL ด้วยน้ำกลั่น กรองก่อนเก็บไว้ใช้ (สารละลายคงตัวได้ 2 ปี ในที่ไม่มีแสง)

2. สารละลาย 1.5 M KOH ใน ethanol 80%

ซึ่ง KOH 84.165 g ละลายใน ethanol 80% (absolute ethanol 99.1%, 80 mL+ 20 mL น้ำกลั่น) ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 mL

3. สารละลาย 2.5 M HCl

การเตรียม Cell suspension ของจุลินทรีย์

โดยซึ่งเซลล์น้ำหนักเปียกมา 1 g ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปรับปริมาตรเป็น 10 mL จะได้สารแขวนลอยเซลล์ 0.1 g/mL

การสกัดลิพิดจากเซลล์จุลินทรีย์

1. การสกัดลิพิดทำได้โดยการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์และสกัดลิพิดออกจากเซลล์โดยการซาฟอนนิฟิเคชันด้วย 1.5 M KOH ในเอทานอล 80% ทำโดยนำ cell suspension มา 1 mL ใส่ในหลอดจุกเกลียวขนาด 20 mL เติม 1.5 M KOH ในเอทานอล 80% จำนวน 4 mL ปิดจุกให้แน่น ต้มให้เดือด 2 ชั่วโมง

2. เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลง เติม 2.5 M HCl จำนวน 6 mL และ isooctane 5 mL เขย่าอย่างแรง 200-300 ครั้ง/นาที เพื่อสกัดไขมันอิสระออกมาอยู่ในชั้นของ isooctane เพื่อนำไปหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric method

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดด้วยวิธี Colorimetric method

สารละลายกรดไขมันมาตรฐาน (stock solution) : 10 mg/mL โดยชั่งกรดไขมันปาล์มิติก 1.0 g ละลายใน isooctane ปรับปริมาตรเป็น 100 mL

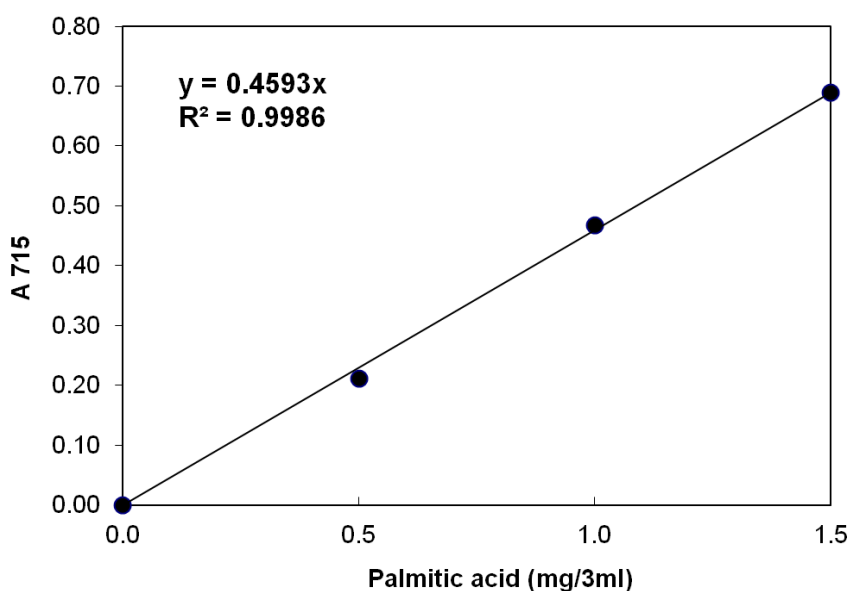
1. ทำเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายกรดปาล์มิติก 10.0 mg/mL นำมาเจือจางด้วย isooctane ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง

ความเข้มข้นของสารละลายกรด ปาล์มิติก (mg/3 mL solution)	ปริมาตร stock standard (mL)	ปริมาตรของ isooctane (mL)
0.5	0.15	2.85
1.0	0.30	2.70
1.5	0.45	2.55
2.0	0.60	2.40

2. ปิเปตแต่ละระดับความเข้มข้นมา 3 mL เติม copper reagent 1.0 mL ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 715 nm ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

3. การหาปริมาณกรดไขมันในเซลล์จุลินทรีย์

ทำโดยปิเปตสารละลายสกัดไขมันจากจุลินทรีย์ในข้อ 3. (การสกัดลิปิดจากเซลล์จุลินทรีย์) มา 3 mL ทำปฏิกิริยากับ copper reagent 1.0 mL ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 715 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve)



รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของกรดปาล์มิติก (palmitic acid) สำหรับการวัดวิเคราะห์ปริมาณลิปิดด้วยวิธีวัดสี (Colorimetric method) ตามวิธีของ Know and Rhee (1986)

5. ขั้นตอนการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงสาหร่าย



รูปที่ ก-3 การเก็บตัวอย่างน้ำในพื้นที่โครงการ อพ. สธ. เชื้อนสีรินธร จังหวัดอุบลราชธานี



Bristol's medium 200mL ในพลาสติก 500mL ก่อนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย



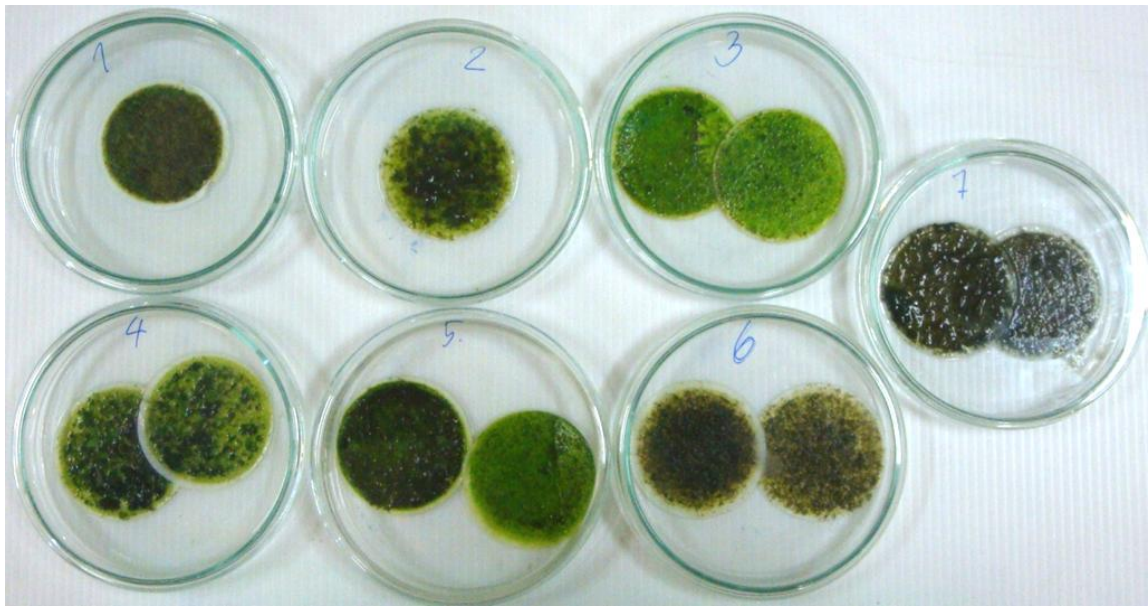
การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนสาหร่ายในอาหาร Bristol's medium ที่ฟั่น ให้อากาศ ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

รูปที่ ก-4 การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนสาหร่ายในอาหาร Bristol's medium ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยฟั่นให้อากาศด้วยเครื่องฟั่นอากาศขนาดเล็ก บ่มเป็นเวลา 14 วัน

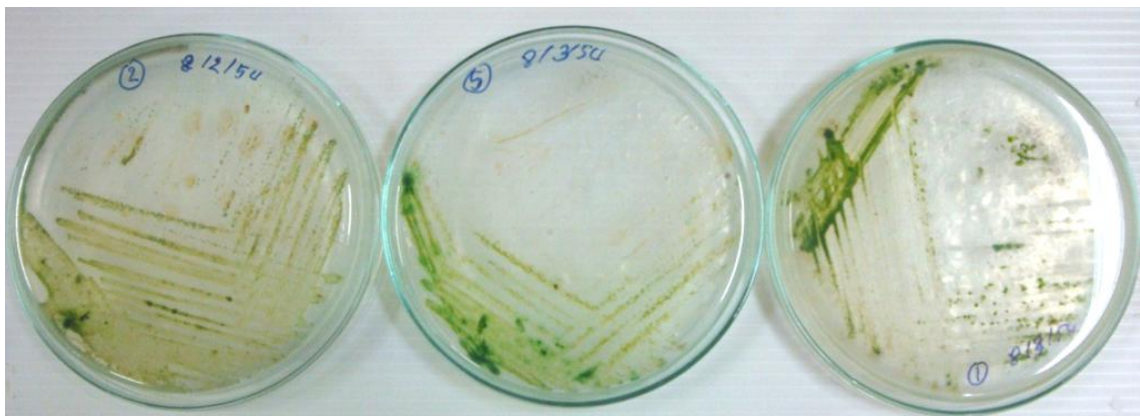
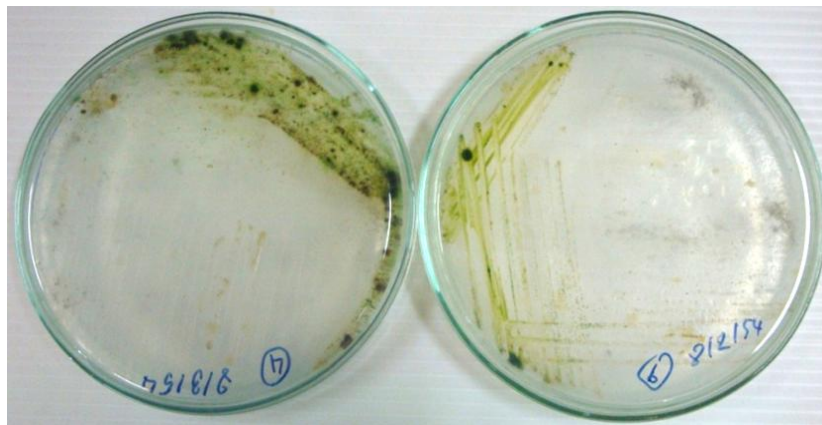


รูปที่ ก-5 การเจริญเพิ่มจำนวนสาหร่ายในอาหาร Bristol's medium ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยฟั่นให้อากาศด้วยเครื่องฟั่นอากาศขนาดเล็ก ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 14 วัน



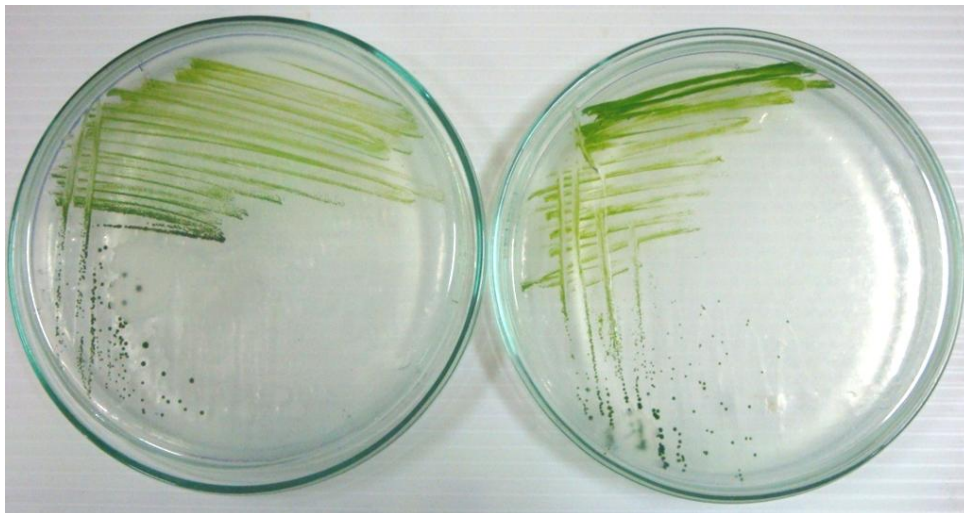


รูปที่ ก-6 เซลล์สาหร่ายจากตัวอย่างการเพิ่มจำนวนโดยการกรอบบนกระดาดากรอง MF



รูปที่ ก-7 การแยกสาหร่ายด้วยวิธี cross streak technique บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol's medium





(ก)



รูปที่ ก-8 สำหรับบริสุทธิ์ที่แยกด้วยเทคนิค cross streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก) และการเก็บรักษา สำหรับบริสุทธิ์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยง (agar slant) (ข)



วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง



วันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง

รูปที่ ก-9 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดเลือกได้ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (Photoautotrophic cultivation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่อุณหภูมิห้องโดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยการพ่นอากาศผสมผ่านเครื่องพ่นอากาศขนาดเล็ก



วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย



วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

รูปที่ ก-10 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดเลือกได้ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสง (heterotrophic cultivation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bristol medium ที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบกวนผสม ด้วยแท่งแม่เหล็กด้วยเครื่อง magnetic stirrer plate ที่อุณหภูมิห้อง