

การประเมินวิธีการตรวจวัดกรดไขมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61Detection evaluation of omega-3 fatty acid in green alga *Chlorella* sp. KLSc61ณัฐนันท์ ปรีชาพลกุล¹, สุกฤต ศิริขวัญพงศ์², เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์^{1,*}Nathanan Preechaphonkul¹, Sukrit Sirikwanpong², Cherdasak Maneeruttanarungroj^{1,*}¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520²ภาควิชาโภชนาการและการกำหนดอาหาร คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพฯ 10330¹Department of Biology, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand²Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Allied Health Science, Chulalongkorn University Bangkok 10330, Thailand^{*}Corresponding author, E-mail address: cherdasak.ma@kmitl.ac.th

บทคัดย่อ

สาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 สามารถผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ได้ งานวิจัยครั้งนี้ประเมินวิธีการตรวจวัดไขมันดังกล่าวประกอบด้วย (1) เทคนิคไนล์เรดฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี (2) เทคนิคการชั่งน้ำหนัก (3) เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) และ (4) เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเปลวไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (GC-FID) ผลการทดลองพบว่า (1) ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายมีผลต่อความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด อะซิโตนและ DMSO เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ช่วงความยาวคลื่นกว้าง รองลงมาคือ DMSO 20 เปอร์เซ็นต์ (2) น้ำหนักไขมันที่มีคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายแปดสายพันธุ์ พบว่า *Chlorella* sp. KLSc61 มีค่า 1,497.70 มิลลิกรัมต่อความขุ่นเซลล์ 750 นาโนเมตร ซึ่งมีมากเป็นอันดับที่สอง (3) ผลการตรวจสอบด้วย GC-MS ยังไม่สามารถยืนยันชนิดของกรดไขมันบางชนิดได้ และ (4) พบกรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิก (ALA) และกรดไขมันดีเอชเอ (DHA) เมื่อตรวจสอบด้วย GC-FID การศึกษานี้พบว่ากรดไขมันโอเมก้า-3 ของสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำจืดเหมาะสมที่จะตรวจสอบด้วยเทคนิค GC-FID

คำสำคัญ กรดไขมันโอเมก้า-3, แก๊สโครมาโตกราฟี, สีย้อมไนล์เรด, *Chlorella* sp. KLSc61

Abstract

Fresh water green alga *Chlorella* sp. KLSc61 can produce omega-3 fatty acid. This study focuses on detection evaluation of omega-3 oil in four methods, including (1) Nile red fluorescence method, (2) conventional gravimetry method, (3) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and (4) gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID). The result showed that (1) solvent type and concentration affected wavelength during fluorescence detection. 10% acetone and DMSO resulted in the widest wavelength range for detection, followed by 20% DMSO. (2) When 8 algal oils were detected by gravimetry, the 2nd maximum chlorophyll-containing oil weight of 1,497.70 mg/OD₇₅₀ was found from *Chlorella* sp. KLSc61. (3) Lipid chromatogram was observed when detected using GC-MS, but type of some lipids could not be confirmed. (4) Alpha-linolenic acid (ALA) and DHA fatty acids were found, when detected by GC-FID. This study revealed that omega-3 oil from fresh water green algae was suitable for detection using GC-FID.

Keyword: *Chlorella* sp. KLSc61, Gas chromatography, Nile red, Omega-3 fatty acid

คำนำ

ปัจจุบันนอกจากสาหร่ายสีเขียวจะถูกใช้เป็นทางเลือกที่น่าสนใจในฐานะแหล่งน้ำมันทดแทนแล้ว ยังพบว่ามีสาหร่ายหลายสายพันธุ์ที่มีการสะสมกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เช่น *Chlorella* sp., *Chlamydomonas variabilis*, *Spirulina platensis* เป็นต้น (Tao, 2015) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำโดยการผสมสาหร่ายลงไปในการอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ (Byreddy et al., 2019) ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับผู้ทานอาหารมังสวิรัติและอาหารทางพืช (Plant-based food) (Caporgno et al., 2018) โดยทั่วไปสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก (microalgae) จะมีการสะสมไขมัน 20–50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่ในบางสายพันธุ์ก็พบการสะสมได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Chisti, 2007) โดยพบกลุ่มไขมันทั้งไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ เช่น Linoleic acid (LA), Alpha-Linolenic Acid (ALA), Eicosapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic acid (DHA) เป็นต้น หนึ่งในปัญหาของกระบวนการผลิตไขมันจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กคือการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันที่อุตสาหกรรมต้องการ กระบวนการคัดเลือกในปัจจุบันมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและเนื่องจำนวนตัวอย่างมากทำให้ใช้เวลานานในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม ซึ่งวิธีการที่รู้จักกันดีคือการสกัดไขมันและการชั่งน้ำหนัก (Gravimetry) หรือ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) ซึ่งวิธีเหล่านี้จำเป็นต้องใช้ปริมาณชีวมวลเพียงพอ และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาเทคนิคในตรวจวิเคราะห์ใหม่ที่มีความรวดเร็ว และใช้ปริมาณชีวมวลน้อยลง เช่น เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโกปี เป็นต้น

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ต้องการเปรียบเทียบเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโกปี เทคนิคการชั่งน้ำหนักและเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3 ในสาหร่าย *Chlorella* sp. KLS61 โดยเทคนิคการชั่งน้ำหนักมีการเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กเบื้องต้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สาหร่ายสีเขียวในการทดลอง

Chlorella sp. KLS61 คัดแยกโดย (Laokua et al., 2022), *Tetraspora* sp. CU2551 คัดแยกโดย เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ และคณะ (2554) (Maneeruttanarungroj et al., 2010), *Chlorella* sp. KLS59 คัดแยกโดย ธนพร ศิริวัฒนามงคล และคณะ (2559) (Sirawattanamongkol et al., 2020), สาหร่ายสีเขียวรหัส A1 G1 P1 CUJR06 คัดแยกโดย ณัฐวิภา เหล่าเกื้อ และคณะ (2561) (ยังไม่เผยแพร่) และสาหร่ายสีเขียวรหัส Shell คัดแยกโดย รัชณีกร กลิ่นสาดี และคณะ (2565) (ยังไม่เผยแพร่)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายด้วยอาหารเหลวสูตร TAP (Tris-Acetate-Phosphate) (Gorman et al., 1965) โดยการนำโคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก มาลงอาหารเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ประมาณ 1–2 โคโลนี ป่มในสภาวะเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0 เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโกปี

การวัดการเรืองแสงของไขมันด้วยการย้อมสีไนล์เรด (Alemán-Nava et al., 2016) ทำการเตรียมตัวอย่างในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรจำนวน 4 หลอด ดังนี้ (1) สารละลายเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (2) DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (3) อะซิโตน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ (4) DMSO และ เอทานอลชนิดละ 1 มิลลิลิตร ต่อมาเติมเซลล์สาหร่ายที่มีความขุ่นเริ่มต้นที่มี $OD_{750} = 0.2$ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเป็นสองหลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (ไม่เติมไนล์เรด) และตัวอย่างที่เติมไนล์เรดเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มมืดเป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์โดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ (Fluorescence spectrophotometer)

การวิเคราะห์โดยเทคนิคการชั่งน้ำหนัก

ทำการศึกษาโดยใช้สาหร่ายทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. KLSc61, *Tetraspora* sp. CU2551, *Chlorella* sp. KLSc59, A1, G1, P1, CUJR06 และ Shell หลังจากทำการเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเจือจางลงในอาหารสูตร TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยคำนวณให้ความขุ่นเริ่มต้นความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 6 นาที แล้วนำมาเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการแตกเซลล์ด้วย sonicating probe เป็นเวลา 10 นาที (Pulse on 1.0 off 1.0 min) จากนั้นนำของเหลวทั้งหมดมาเติมคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 0.5:0.5:1 เทของผสมลงกรวยแยก เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารแยกชั้นแล้วไซ้ชั้นคลอโรฟอร์มลงในปิเปตที่ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นไว้แล้ว นำไประเหยโดยใช้ความร้อนแล้วเป่าด้วยไนโตรเจน (Archer et al., 2019) จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักสุดท้าย

การวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

น้ำมันแห้งที่ได้จากการการชั่งน้ำหนักนำไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเบส (Base-catalyzed transesterification) โดยทำการเติมสารละลายเฮกเซน 1 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่อง vortex mixture 1 นาที เติมโซเดียมเมททอกไซด์ความเข้มข้น 25% v/v ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเปิดส่วนใสหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่อง spin-down เป็นเวลา 5 นาที ทำการเปิดส่วนใส vial ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วิเคราะห์ไขมันโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer, MS) โดยใช้คอลัมน์ HP-5 50 m.×0.25 mm. i.d.×0.25 μm split ratio ที่ 10:1 อุณหภูมิคอลัมน์ 50 °C 3 นาที จากนั้นเร่งขึ้นไป 140 °C 5 นาที และสู่ 250 °C 42 นาที โดยอัตราเพิ่มคือ 20 °C ต่อนาที ในส่วน MS จะสแกนหามวลในช่วง 30–500 amu. อุณหภูมิ 230 °C โดยมี solvent delay 4 min ส่วน Quadrupole ตั้งอุณหภูมิที่ 150 °C ในส่วนของเฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (Gas-chromatography flame Ionization Detector, FID) ใช้คอลัมน์ DB-23 30 m.×0.25 mm. i.d. × 0.25 μm split ratio ที่ 10:1 อุณหภูมิคอลัมน์ 50 °C 0.5 นาที จากนั้นเร่งขึ้นไป 150 °C ด้วยอัตราเพิ่ม 25 °C ต่อนาที จากนั้นเพิ่มเป็น 174 °C โดยอัตราเพิ่มคือ 2.3 °C ต่อนาที และสู่ 220 °C เป็นเวลา 3 นาทีโดยอัตราเพิ่มคือ 2.0 °C ต่อนาที อัตราไหลฮีเลียมรวม 13.8 มล.ต่อนาที ความดัน 82.2 kPa ใช้อุณหภูมิ FID 50 °C อัตราไหล H₂ Air make up เป็น 32 200 และ 24 มล.ต่อนาที ตามลำดับโดยใช้ไนโตรเจนแก๊ส ระบุชนิดกรดไขมันโดยใช้สารมาตรฐาน (Supelco 37 Component FAME Mix) และวิเคราะห์ปริมาณไขมันแบบ percent relative amount

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ไขมันโอเมก้า-3 โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปี

ทำการศึกษาค่าผลของตัวทำละลายที่มีผลต่อการย้อมสีโดยใช้ไนล์เรด เป็นสารที่ใช้สำหรับการตรวจวัดไขมันเบื้องต้น ทำการศึกษาค่าผลของสารเคมี 4 สภาวะ ได้แก่ 1) เอทานอลเข้มข้น 20% 2) DMSO เข้มข้น 20% 3) อะซิโตนเข้มข้น 20% และ 4) DMSO เข้มข้น 10% กับอะซิโตนเข้มข้น 10% ที่มีผลต่อการซึมผ่านของผนังเซลล์เข้าไปจับกับไขมันภายในเซลล์สำหรับ *Chlorella* sp. KLS61 จาก Fig.1 พบว่าตัวทำละลายในแต่ละสภาวะมีผลต่อค่าการเรืองแสงของสีย้อมไนล์เรดจากฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัม 1) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 20% มี $\lambda_{\text{emission}}$ เท่ากับ 706 นาโนเมตร และ $\lambda_{\text{excitation}}$ เท่ากับ 540 นาโนเมตร ให้ค่าสัญญาณ อยู่ที่ 6.9×10^3 A.U. 2) สภาวะที่มีความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 20% มี $\lambda_{\text{emission}}$ เท่ากับ 700 นาโนเมตร และ $\lambda_{\text{excitation}}$ เท่ากับ 514 นาโนเมตร ให้ค่าสัญญาณ อยู่ที่ 5.4×10^3 A.U. 3) สภาวะที่มีความเข้มข้นของอะซิโตนเท่ากับ 20% มี $\lambda_{\text{emission}}$ เท่ากับ 710 นาโนเมตร และ $\lambda_{\text{excitation}}$ เท่ากับ 526 นาโนเมตร ให้ค่าสัญญาณ อยู่ที่ 6.9×10^3 A.U. 4) สภาวะที่มีความเข้มข้น 10% DMSO และ 10% อะซิโตน มี $\lambda_{\text{emission}}$ เท่ากับ 696 นาโนเมตร และ $\lambda_{\text{excitation}}$ เท่ากับ 506 นาโนเมตร ให้ค่าสัญญาณอยู่ที่ 5.1×10^3 A.U. เมื่อพิจารณาจาก Fig.1 พบว่า บริเวณที่เป็นสีแดงคือช่วงที่มีค่าสัญญาณสูงสุด โดยสภาวะมีช่วงกว้างที่สุดคือ 10% DMSO และ 10% อะซิโตน รองลงมาคือ 20% DMSO, 20% อะซิโตน และสุดท้าย 20% เอทานอล ตามลำดับ เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องสเปกโตรฟลูออเรสเซนซ์ มีค่าการดูดกลืนแสงและค่าการเรืองแสงในช่วง $\lambda_{\text{emission}}$ เท่ากับ 680 นาโนเมตร และ $\lambda_{\text{excitation}}$ เท่ากับ 490 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับช่วงความยาวคลื่นของ DMSO เข้มข้น 20% และให้ค่าสัญญาณที่สูงกว่า 10% DMSO และ 10% อะซิโตน เมื่อเทียบค่าสัญญาณที่จุดเดียวกัน ดังนั้นจึงเลือก DMSO เข้มข้น 20% มาวิเคราะห์หือทธิพลของเซลล์ต่อไป

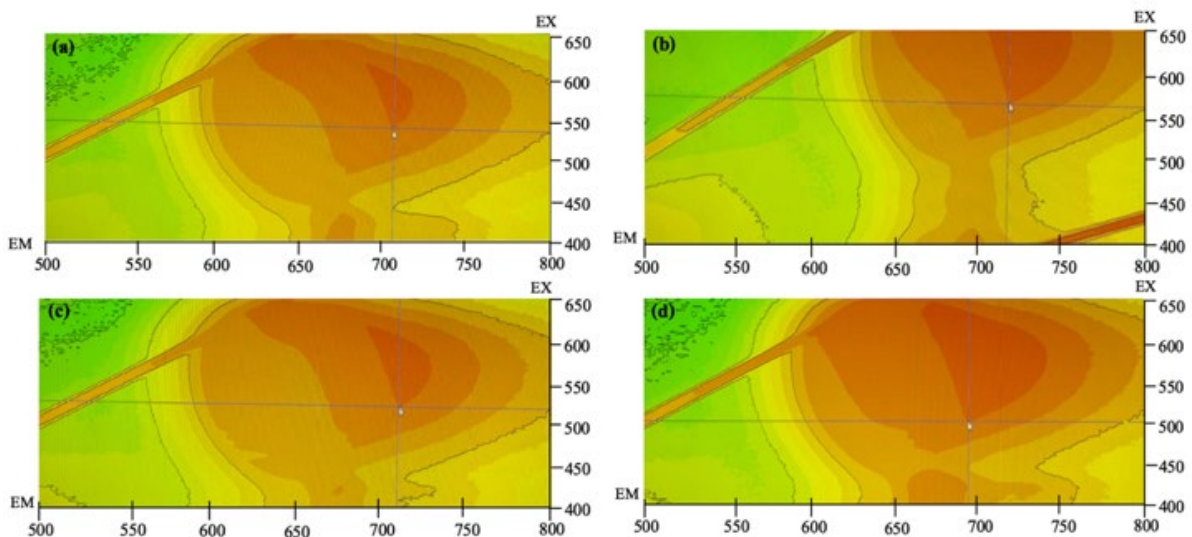


Fig. 1 effect of cell suspended in organic solvent to fluorescent emission/excitation of Nile red-stained in green microalgae *Chlorella* sp. KLS61 under different solvents, including a) 20% ethanol, b) 20% DMSO, c) 20% acetone d) 10% DMSO and 10% acetone (EM is emission wavelength and EX is excitation wavelength)

การศึกษาก่อนหน้าของสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* และ *Tisochrysis lutea* ได้ทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น λ_{ex} เท่ากับ 570 นาโนเมตร และ λ_{em} เท่ากับ 670 นาโนเมตร โดยมีความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (Balduyck *et al.*, 2015) ในรายงาน Chen *et al.*, (2009) ทำการศึกษาในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่าช่วงที่เหมาะสมในการวัดค่าฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่น λ_{ex} เท่ากับ 530 นาโนเมตร และ λ_{em} เท่ากับ 575 นาโนเมตร อยู่ในช่วงความขุ่นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.01–0.08 ดังนั้นจึงทำการวัดค่าสัญญาณในช่วง ความขุ่นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.01–0.15 ผลการทดลองดัง Fig.2 เห็นได้ว่า ค่าสัญญาณสูงสุดอยู่ที่ค่าความขุ่น 0.02–0.04 และ 0.10 มีค่าเท่ากับ 2.45×10^5 A.U. ค่าต่ำสุดมีค่าความขุ่น 0.15 มีค่าเท่ากับ 2.08×10^5 A.U. จากกราฟจะเห็นได้ว่าค่าสัญญาณมีการขึ้นลง ไม่เสถียร ในการประเมินไขมันโดยใช้สีย้อมนั้นเป็นวิธีการที่รวดเร็ว แต่ต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ โดยปัญหาของการใช้เทคนิคอาจจะเป็นที่การซึมผ่านของสีย้อมเข้าสู่เซลล์ ซึ่งความหนาและองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันของสาหร่าย (Alemán *et al.*, 2016) ดังนั้นการใช้สีย้อมในการวิเคราะห์ไขมันโอเมก้า-3 เบื้องต้นของสาหร่าย *Chlorella* sp. KLSc61 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโคปี อาจจะต้องใช้ความยาวคลื่นที่ตรงกับฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมสเปกตรัมจึงจะสามารถวัดค่าที่ถูกต้องได้อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจวัดนี้ยังไม่มีความจำเพาะต่อไขมันโอเมก้า-3

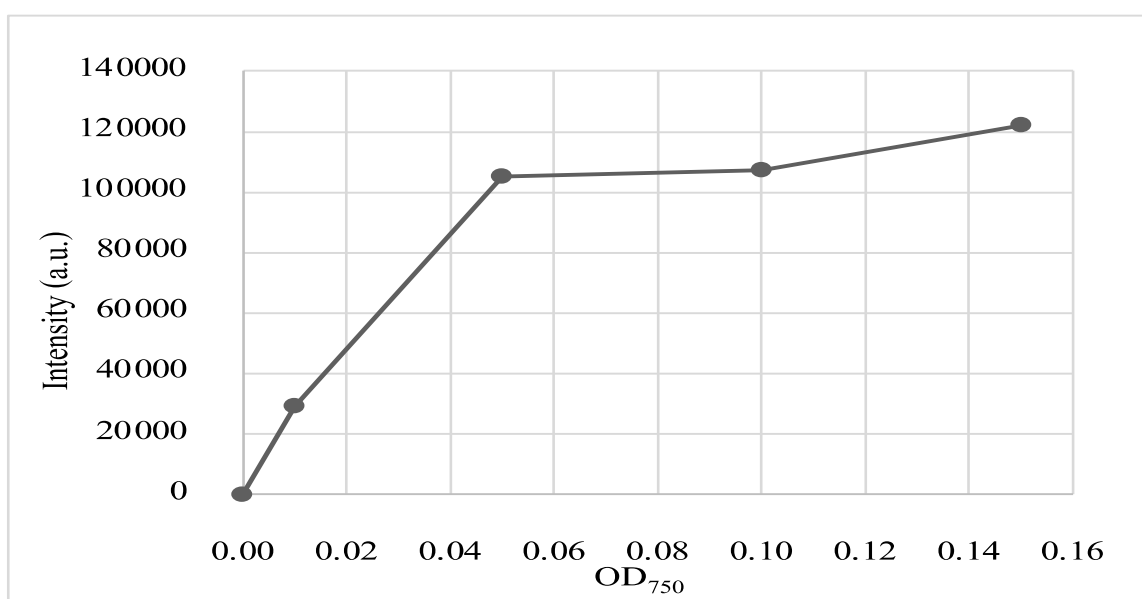


Fig. 2 effect of cell concentration on fluorescent intensity of green microalgae *Chlorella* sp. KLSc61.

Fluorescence determination excitation and emission wavelengths were 680 nm and 490 nm, respectively

ผลการศึกษารวิเคราะห์ไขมันโอเมก้า-3 โดยการชั่งน้ำหนัก (Gravimetry)

ผลการศึกษารวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยการชั่งน้ำหนักดัง Fig.3 สาหร่ายที่มีน้ำหนักสูงสุดสามอันดับแรก คือ *Tetraspora* sp. CU2551 คิดเป็น 2,017.70 มิลลิกรัมต่อความขุ่นเซลล์ *Chlorella* sp. KLSc61 คิดเป็น 1,497.70 มิลลิกรัมต่อความขุ่นเซลล์ และ สาหร่าย Shell คิดเป็น 1424.10 มิลลิกรัมต่อความขุ่นเซลล์ ในการทดลองเป็นการชั่งน้ำหนักไขมันรวมซึ่งยังคงมีคลอโรฟิลล์ปนเปื้อนอยู่ การศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อน้ำหนักแห้งในสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 0.17–4.36 เปอร์เซ็นต์ (Piorreck *et al.*, 1984) โดยมีปริมาณไขมันรวมต่อน้ำหนักแห้งอยู่ที่ 20 – 50 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานสาหร่าย 43 สายพันธุ์ในสกุล *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. มีปริมาณไขมันต่อ

น้ำหนักแห้ง 20 – 51 % โดยสาหร่ายที่ให้ปริมาณสูงสุดคือ *Chlorella pyrenoidosa* เท่ากับ 51 % (Liu et al., 2011) หากคิดจากการคำนวณพบว่าปริมาณไขมันของ *Chlorella* sp. KLSc61 อยู่ในช่วง 29.95–74.86 % น้ำหนักแห้ง เมื่อทำการหักเปอร์เซ็นต์สูงสุดคลอโรฟิลล์จะมีปริมาณไขมันเท่ากับ 25.59–70.53 %

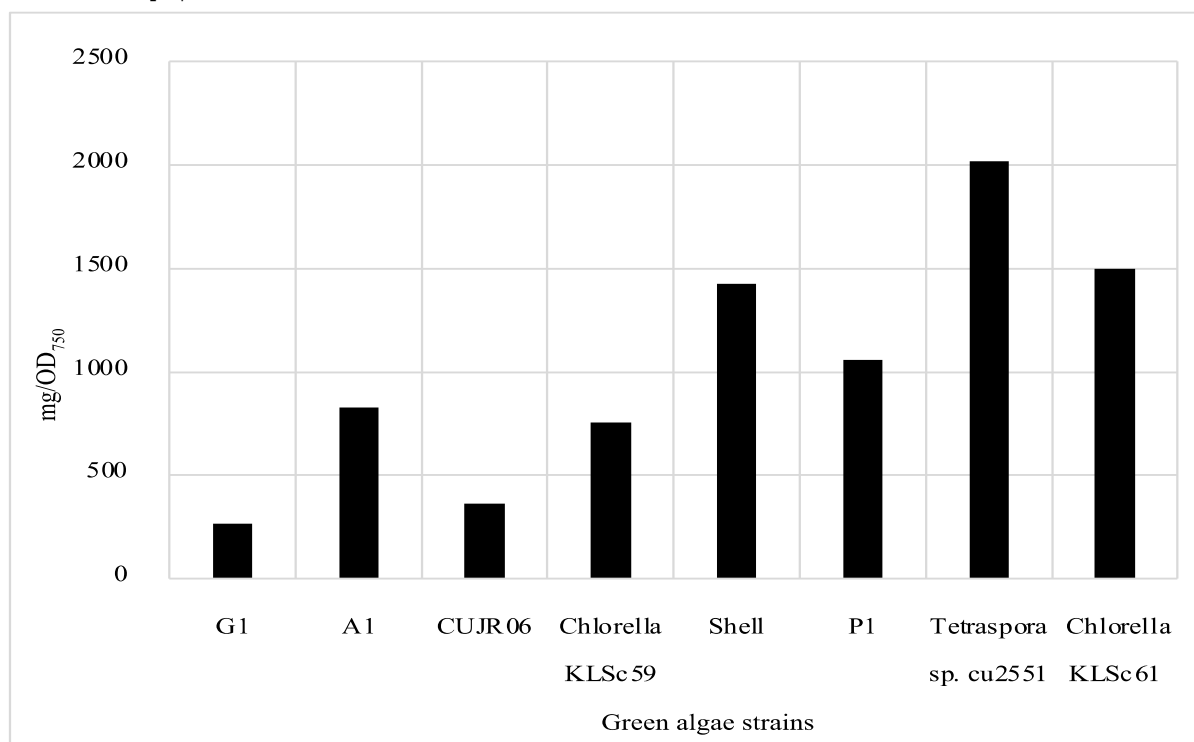


Fig. 3 Lipid content of 8 green microalgae determined by conventional gravimetry ($n = 1$)

ผลการศึกษารววิเคราะห์ไขมันโอเมก้า-3 โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันในสาหร่าย ต้นแบบของสาหร่ายอ้างอิงมาจากวิถีของ *Arabidopsis thaliana* (Hallmann et al., 2019) โดยเส้นทางการสังเคราะห์ไขมันจะเริ่มจากปริมาณ malonyl-CoA จาก Acetyl-CoA โดยใช้เอนไซม์ ACCase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้น malonyl-CoA จะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ไขมัน (Fatty acid synthesis, FAS) ซึ่งจะได้ไขมัน C16:0 และ C18:0 ถูกเก็บไว้ในคลอโรพลาสต์ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการต่อสายโซ่คาร์บอนและการเพิ่มพันธะคู่ จากการศึกษาพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กมีเส้นทางการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3 ทาง $\Delta 6$ -pathway โดยเปลี่ยนกรดไขมันโอเมก้า-6 ไปเป็นโอเมก้า-3 โดยใช้เอนไซม์ $\Delta 15$ desaturase $\Delta 17$ desaturase และคาดว่าจะมีเอนไซม์ $\Delta 19$ desaturase อีกหนึ่งเอนไซม์ จาก Table 1 แสดงผลการวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปคโตรมิเตอร์ (GC-MS) พบว่าเจอกรดไขมันทั้งหมด 4 ชนิด พบกรดไขมันปาล์มติก (C16:0) เป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือ (C18:1) และพบกรดไขมันไลโนเลอิกซึ่งคาดว่าจะสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันโอเมก้า-3 ได้ แต่ไม่พบกรดไขมันสเตียริก (C18:0) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ควรจะมีเนื่องจากเส้นทางการสังเคราะห์จึงคาดว่าจะเกิดจากคอแลนที่ใช้ในการตรวจวัดคือ HP-5 เหมาะสำหรับการสารประกอบฟีนอลิกและกรดไขมันแต่อาจจะไม่เหมาะสำหรับการตรวจวัดกรดไขมันที่ถูกเอสเทอร์ฟิเคชันแล้ว ดังนั้นจึงได้นำตัวอย่างไปวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออนไนเซชัน (GC-FID) ซึ่งมีสารมาตรฐานในการเทียบเวลา (retention time) ได้ผลการทดลองดัง Table 2 ตรวจพบกรดไขมันปาล์มติกและกรดไขมันสเตียริก นอกจากนี้ยังตรวจพบกรดไขมันแอลฟา-ไลโนเลอิก (ALA) และกรดไขมันดีเอชเอ (DHA) ซึ่งเป็นกลุ่มของโอเมก้า-3 มีสัดส่วนเท่ากับ 40.63 และ 3.11 เปอร์เซ็นต์ (percent relative amount) ตามลำดับ

เห็นได้ว่าการศึกษากาการวิเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3 โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแบบเฟลมไอออนในเซชันให้ผลการทดลองที่ละเอียดมากกว่าเนื่องจากคอลัมน์ที่มีความเป็นขั้วและมักใช้ในการวิเคราะห์ไขมันในการศึกษาที่ผ่านมา อีกทั้งยังมีสารมาตรฐาน ที่ครอบคลุมการตรวจวัดกรดไขมันโอเมก้า-3 (ALA, EPA และ DHA) ซึ่งเป็นการตรวจวัดที่ให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือมากกว่าเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปคโตรมิเตอร์

Table 1 Relative proportion of fatty acids detected in *Chlorella* sp. KLSc61 over 7 days by GC-MS ($n = 1$)

No.	Common name	Systematic name	Abbreviation	Aera	% Aera
1	Palmitic acid	Hexadecanoic acid	C16:0	1,000,722	55.38
2	Palmitoleic acid	9-hexadecatrienoic acid	C16:1	137,084	7.59
3	Oleic acid	9-Octadecenoic	C18:1	377,595	20.90
4	Linoleic acid	cis-9,12-Octadecadienoic	C18:2	291,493	16.13
sum of corrected area				1,806,894	100

Table 2 Relative proportion of fatty acids detected in *Chlorella* sp. KLSc61 over 7 days by GC-FID ($n = 3$).

The result was express as mean \pm standard deviation

Peak	Common name	Systematic name	Abbreviation	Area	%Aera
1	Caproic acid	Hexanoic acid	C6:0	5,385.33	2.11 \pm 0.50
2	Caprylic acid	Octanoic acid	C8:0	5,318.67	2.15 \pm 0.74
3	Capric acid	Decanoic acid	C10:0	4,072.67	1.62 \pm 0.48
4	Undecylic acid	Undecanoic acid	C11:0	4,534.33	1.43 \pm 0.78
5	Lauric acid	Dodecanoic acid	C12:0	2,565.67	1.00 \pm 0.25
6	Myristic acid	Tetradecanoic acid	C14:0	1,399.00	0.40 \pm 0.39
7	Pentadecylic acid	Pentadecanoic acid	C15:0	6,681.67	2.08 \pm 1.59
8	Palmitic acid	Hexadecanoic acid	C16:0	42,097.33	16.10 \pm 2.75
9	Palmitoleic acid	9-hexadecenoic acid	C16:1	4,406.67	1.73 \pm 0.46
10	Margaric acid	Heptadecanoic acid	C17:0	14,894.67	4.43 \pm 3.67
11	Heptadecenoic acid	cis-10-Heptadecenoic acid	C17:1	5,812.00	2.16 \pm 0.30
12	Stearic acid	Octadecanoic acid	C18:0	4,955.33	1.83 \pm 0.55
13	Oleic acid	cis-9-octadecenoic acid	C18:1-cis	5,561.33	2.09 \pm 0.65
14	Linoleic acid	cis-9,12-octadecadienoic acid	C18:2-cis	32,353.00	11.91 \pm 0.99
15	α -Linolenic acid	9,12,15-octadecatrienoic acid	C18:3 n3	108,294.67	40.63 \pm 6.09
16	Erucic acid	13-docosenoic acid	C22:1	10,430.00	3.14 \pm 2.97
17	Docosadienoic acid	13,16-docosadienoic acid	C22:2	2,874.67	1.07 \pm 0.53
18	Docosahexaenoic acid (DHA)	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	C22:6 n3	10,524.67	3.11 \pm 3.16
19	Nervonic acid	Z)-tetracos-15-enoic acid	C24:1	2,409.67	1.01 \pm 0.45
Total				274,571.33	100.00

สรุป

จากการประเมินวิธีการวัดกรดไขมันโอเมก้า-3 ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KLSc61 จากทั้งสองวิธีพบว่า การตรวจวัดโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแบบเฟลมไอออนในเซชันสามารถตรวจวัดกรดไขมันโอเมก้า-3 ได้แก่ กรดไขมันแอลฟา-ไลโนเลอิก (ALA) และกรดไขมันดีเอสเอ (DHA) ซึ่งเป็นกลุ่มของโอเมก้า-3 เนื่องจากชนิดของคอลัมน์มีความจำเพาะต่อตัวอย่าง และมีสารมาตรฐานมาเป็นตัวเปรียบเทียบ สำหรับการตรวจวัดโดยการย้อมด้วยไนล์โรดและการซึ่งน้ำหนักเป็นการศึกษาปริมาณไขมันเบื้องต้นสำหรับแยกเพื่อสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีปริมาณไขมันสูงเท่านั้น แต่ไม่สามารถ

วิเคราะห์ได้ว่าไขมันนั้นประกอบได้ด้วยกรดไขมันชนิดใดบ้าง ซึ่งสุดท้ายต้องนำมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีในการระบุกรดไขมันโอเมก้า- 3ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ และ ผศ.ดร. สุกฤต ศิริขวัญพงศ์ ที่คอยให้คำปรึกษา ความรู้และให้ความช่วยเหลือตลอดมา ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการการทดลองและเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการให้คำปรึกษาและให้เครื่องมือในการวิเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรเมทรีและแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแมสสเปคโตรมิเตอร์

เอกสารอ้างอิง

- Alemán-Nava, G. S., Cuellar-Bermudez, S. P., Cuaresma, M., Bosma, R., Muylaert, K., Ritmann, B. E., Parra, R. 2016. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Methods.* 128: 74–79. doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.011
- Archer, L., Mc Gee, D., Paskuliakova, A., McCoy, G. R., Smyth, T., Gillespie, E., Touzet, N. 2019. Fatty acid profiling of new Irish microalgal isolates producing the high-value metabolites EPA and DHA. *Algal Res.* 44: 101671. doi.org/10.1016/j.algal.2019.101671
- Balduyck, L., Veryser, C., Goiris, K., Bruneel, C., Muylaert, K., Foubert, I. 2015. Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent. *J. Microbiol. Methods.* 118: 152–158. doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.009
- Byreddy, A. R., Yoganantharjah, P., Gupta, A., Gibert, Y., Puri, M. 2019. Suitability of novel algal biomass as fish feed: accumulation and distribution of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid in zebrafish. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 188: 112–123. doi:10.1007/s12010-018-2906-0
- Caporgno, M.P., Mathys, A. 2018. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Front. Nutr.* 5: 58. doi.org/10.3389/fnut.2018.00058
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Methods:* 77: 41–47. doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294–306. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Gorman, D.S., Levine, R.P. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 54: 1665–1669. 10.1073/pnas.54.6.1665
- Hallmann, A., & Rampelotto, P. H. (Eds.). 2019. *Grand Challenges in Algae Biotechnology*. Springer International Publishing.

- Laokua, N., Rittayan, N., Kornrawudaphikasama, Y., Klinsalee, R., Tonawut, Y., Preechaphonkul, N. & Maneeruttanarungroj, C. 2022. Optimal conditions for maximized H₂ yield from a new green algal strain *Chlorella* sp. KLSc61. J Appl Phycol. 34: 1909–1919. doi.org/10.1007/s10811-022-02779-y
- Liu, A. Y., Wei, C.H.E.N., Zheng, L.L., Song, L.R. 2011. Identification of high-lipid producers for biodiesel production from forty-three green algal isolates in China. Prog. Nat. Sci. 21: 269–276. doi.org/10.1016/S1002-0071(12)60057-4
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. 2010. A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. Int. J. Hydrog. Energy. 35: 13193–13199. doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.096
- Piorreck, M., Baasch, K.H., Pohl, P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytochem. 23: 207–216. 10.1016/S0031-9422(00)80304-0
- Sirawattanamongkol, T., Maswanna, T., & Maneeruttanarungroj, C. 2020. A newly isolated green alga *Chlorella* sp. KLSc59: potential for biohydrogen production. J. Appl. Phycol. 32: 2927–2936. doi.org/10.1007/s10811-020-02140-1