



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้  
สภาวะการเติบโตแตกต่างกัน

Biomass and Lipid Production of Marine Microalgae  
under Different Growth Conditions

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุดะโค	หัวหน้าโครงการ
นางสาวปวีณา ตปนีย์วรวงค์	ผู้ร่วมโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลิ ไพบุลย์กิจกุล	ผู้ร่วมโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รชนิมุข หิรัญส์จจาเลิศ	ผู้ร่วมโครงการ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10803014

เลขที่สัญญา 124/2560

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้

สภาวะการเติบโตแตกต่างกัน

Biomass and Lipid Production of Marine Microalgae

under Different Growth Conditions

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค

นางสาวปวีณา ตปนีย์วรวงค์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลิ ไพบุลย์กิจกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ

หัวหน้าโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ

คณะเทคโนโลยีทางทะเล

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติเลขที่สัญญา 124/2560

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ที่เอื้อเพื่อให้ใช้สถานที่ในการทดลอง พร้อมทั้งเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. นภาพร เสียดประถม และนักวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล ที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานวิจัย รวมถึงนางณิชา สิรินนธ์ธนา และ ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้คำปรึกษาการสกัดไขมัน และตรวจวัดปริมาณไขมัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะไค  
สิงหาคม 2561

## บทคัดย่อ

สาหร่าย 4 ชนิด ที่แยกได้จากบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติที่ตั้งอยู่ในจังหวัดจันทบุรี คือ *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501 *Amphora subtropica* BUUC1502 *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* นำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก พบว่าสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *Amphora subtropica* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* เติบโตได้ดีในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก ส่วนในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกพบว่าเซลล์เติบโตได้ต่ำ

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *A. subtropica* BUUC1502, *C. protothecoides* BUUC1602 และ *A. coffereformis* ในขวด 2 ลิตร พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกมีชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายมีกรดไขมัน C16:0 และ C18:1 เป็นชนิดเด่นทั้ง 2 สภาวะการเลี้ยง

ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องพบว่าสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *A. subtropica* BUUC1502, *C. protothecoides* BUUC1602 และ *A. coffereformis* ต้องใช้อัตราการเจือจางที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 1.28, 1.12, 0.73 และ 1.27 ต่อวัน ตามลำดับ

การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 50 ลิตร ในสภาวะออโตโทรฟิกภายนอกห้องปฏิบัติการ พบว่าสาหร่าย *C. protothecoides* ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดได้สูงถึง  $1013 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อนสูงถึง 23.21 และ 35.21 เปอร์เซ็นต์ในกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ

## ABSTRACT

Four different microalgae species including *Nitzschia* sp. BUUC1501, *Amphora subtropicsa* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 and *Amphora coffereformis* were isolated from aquaculture pond and natural seawater in Chanthaburi Province. Microalgae were cultured under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions. The results revealed that growth performance of microalgae under autotrophic and mixotrophic conditions were higher than under heterotrophic condition.

Marine microalgae, *Nitzschia* sp. BUUC1501, *Amphora subtropicsa* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 and *Amphora coffereformis*, were cultured in 2L Duran bottle. Total unsaturated fatty acids of autotrophic condition were higher than mixotrophic condition. Palmitic acid (16:0) and oleic acid (18:1) were dominant in both autotrophic and mixotrophic conditions.

In continuous culture, the maximum biomass productivity of *Nitzschia* sp. BUUC1501, *A. subtropicsa* BUUC1502, *C. protothecoides* BUUC1602 and *A. coffereformis* were observed when cultured with the dilution 1.28, 1.12, 0.73 and 1.27 per day, respectively.

Scaling up of *C. protothecoides* was performed in 50L photobioreactor. Cells grow under autotrophic condition. The maximum cells density was  $1013 \times 10^4$  cells/mL. Amount of monosaturated and polyunsaturated fatty acids were 23.21 and 35.21% in total fatty acids, respectively.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญตาราง	ช
บทนำ	1
เนื้อหา	9
อภิปรายผล	38
สรุปและข้อเสนอแนะ	42
ผลผลิต (Output)	43
รายงานสรุปการเงิน	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	49
ประวัตินักวิจัยพร้อมหน่วยงาน	64

## สารบัญตาราง

	หน้า
1.1 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)	3
1.2 การจำแนกสิ่งมีชีวิตตามแหล่งอาหารและพลังงาน	4
2.1 อัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของ ไดอะตอม <i>Nitzschia</i> sp. BUU1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยที่ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )	13
2.2 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นสูงสุดและผลผลิตมวล ชีวภาพของไดอะตอม <i>A. coffeaeformis</i> BUU1602 โดยตัวอักษรที่แตกต่างกัน ของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )	14
2.3 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิต มวลชีวภาพของ <i>C. prothecoides</i> BUUC1602 โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันของ ข้อมูลตามแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )	15
2.4 ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด อัตราการเติบโตจำเพาะและผลผลิตมวลชีวภาพของ ไดอะตอม <i>Amphora</i> sp. สายพันธุ์ BUUC 1502 ที่เติบโตในสภาวะแบบออโตโทร ฟิก มิกโซโทรฟิก และเฮเทอโรโทรฟิก โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลตาม แนวตั้งของตาราง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )	16
2.5 อัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของ สาหร่าย <i>Nitzschia</i> sp. BUU1501 ที่เติบโตในสภาวะแบบออโตโทรฟิกและมิกโซ โทรฟิก ในขวดแล้วปริมาตร 2 ลิตร	17
2.6 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ใน <i>Nitzschia</i> BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกัน ของข้อมูลในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )	18
2.7 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิต มวลชีวภาพของ <i>A. coffeaeformis</i> BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงขยายปริมาตรเป็น 2 ลิตร ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลตามแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )	20

2.8 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ใน <i>A. coffeaeformis</i> BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )	21
2.9 ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด อัตราการเติบโตจำเพาะ ผลผลิตมวลชีวภาพและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของสาหร่าย <i>A. subtropica</i> BUUC 1502 ที่เติบโตในสภาวะแบบออโตโทรฟิกและ มิกโซโทรฟิก ในขวดแล้วปริมาตร 2 ลิตร	23
2.10 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของไดอะตอม <i>A. subtropica</i> BUUC1502 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )	24
2.11 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของ <i>C. protothecoides</i> BUUC1602 ที่เพาะเลี้ยงขยายปริมาตรเป็น 2 ลิตร ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลตามแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )	26
2.12 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของไดอะตอม <i>C. protothecoides</i> ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )	27
2.13 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของ <i>C. protothecoides</i> ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 50 ลิตร	34
2.14 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของไดอะตอม <i>A. coffeaeformis</i> ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 50 ลิตร	37
5.1 การเติบโตของ <i>A. coffeaeformis</i> และ <i>C. protothecoides</i> ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกด้วยปริมาตรการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน	41



## สารบัญญภาพ

	หน้า
1.1 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์	2
2.1 การเลี้ยงสาหร่าย <i>Nitzschia</i> sp. BUUC1501 (A) และ <i>A. coffeaeformis</i> BUUC1601 (B) แบบต่อเนื่อง ในขวดขนาด 2 ลิตร	11
2.2 การเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ปริมาตร 50 ลิตร	11
2.3 การเติบโตของ <i>Nitzschia</i> sp. BUU1501 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก	12
2.4 การเติบโตของ <i>A. coffeaeformis</i> BUU1602 ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และวางในห้องปฏิบัติการนาน 9 วัน	13
2.5 การเติบโตของ <i>C. prothecoides</i> BUUC1602 ในสภาวะแบบออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร	14
2.6 การเติบโตของไดอะตอม <i>A. subtropicsa</i> BUUC1502 ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก	15
2.7 ความหนาแน่นเซลล์ของไดอะตอม <i>Nitzschia</i> sp. BUU1501 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน	16
2.8 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย <i>Nitzschia</i> BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (A) และมิกโซโทรฟิก (B)	19
2.9 การเติบโตของสาหร่าย <i>A. coffeaeformis</i> BUUC1601 ในสภาวะการเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกในถังเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร	20
2.10 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย <i>A. coffeaeformis</i> BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (A) และมิกโซโทรฟิก (B)	22
2.11 การเติบโตของสาหร่าย <i>A. subtropicsa</i> BUUC 1502 ในสภาวะการเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกในถังเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร	23

2.12 โคโรมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย <i>A. subtropicsa</i> BUUC1502 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (A) และมิโกโซโทรฟิก (B)	25
2.13 การเติบโตของสาหร่าย <i>C. protothecoides</i> BUUC1602 ในสภาวะออโตโทรฟิกและมิโกโซโทรฟิก ที่เลี้ยงในขวดแก้วขนาด 2 ลิตร	26
2.14 โคโรมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของ <i>C. protothecoides</i> BUUC1602 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (A) และมิโกโซโทรฟิก (B)	28
2.15 การเติบโตของ <i>Nitzschia</i> sp. BUUC1501 ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดขนาด 2 ลิตร	29
2.16 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและความหนาแน่นเซลล์สาหร่าย <i>Nitzschia</i> sp. BUUC1501	29
2.17 การเติบโตของ <i>A. coffeaeformis</i> BUUC1601 ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดขนาด 2 ลิตร	30
2.18 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและความหนาแน่นเซลล์สาหร่าย <i>A. coffeaeformis</i> BUUC1601	31
2.19 การเติบโตของไดอะตอม <i>A. subtropica</i> BUUC1502 ในขวดปริมาตร 2 ลิตร ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยปรับอัตราการเจริญระหว่าง 0.21-1.12 ต่อวัน	32
2.20 การเติบโตของสาหร่าย <i>C. protothecoides</i> ที่เพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่อง ปริมาตรขนาด 2 ลิตร	33
2.21 การเติบโตของสาหร่าย <i>C. protothecoides</i> ที่เพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ปริมาตร 50 ลิตร	33
2.22 โคโรมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของ <i>C. protothecoides</i> BUUC1602 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก	35
2.23 การเติบโตของสาหร่าย <i>A. coffeaeformis</i> ที่เพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ปริมาตร 50 ลิตร	36

2.24 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของ *A. coffeaeformis* ที่  
เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก

36

# 1. บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำกรวิจัย

จุลสาหร่ายหรือสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นพืชที่สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชชนิดอื่น ซึ่งทำให้สาหร่ายมีข้อได้เปรียบกว่าพืชชั้นสูงชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในกลุ่มของสาหร่ายน้ำเค็มซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และเซลล์ยังอุดมไปด้วยสารประกอบทางชีวเคมีหรือสารเมแทบอลิต์ที่มีคุณค่า เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน รงควัตถุและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายมีศักยภาพที่สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ได้ดี อย่างไรก็ตาม สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารดังกล่าวข้างต้นได้แตกต่างกันทั้งในรูปของชนิดและปริมาณของสารเมแทบอลิต์ ถึงแม้ว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเป็นก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) ส่งผลให้เกิดภาวะโลกร้อน แต่ก๊าซชนิดจะถูกดักจับให้ลดลงได้โดยพืชซึ่งนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง พืชชั้นสูงและรวมถึงสาหร่ายจึงสามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ร่วมกับน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างมวลชีวภาพ แต่สาหร่ายสามารถเติบโตได้ในน้ำและแบ่งตัวเป็น 2 เท่า จึงสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และยังใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชชั้นสูง ด้วยสาเหตุนี้ จึงมีการผลิตมวลชีวภาพของสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

ในปัจจุบันมีความต้องการมวลชีวภาพของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมวลชีวภาพจากสาหร่ายมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในรูปต่างๆ โดยเฉพาะการเป็นแหล่งไขมันและกรดไขมันต่างๆ เพราะมีข้อได้เปรียบกว่าพืชชั้นสูงดังที่กล่าวไว้ในข้างต้น ซึ่งได้มีการรายงานว่า มีการคัดเลือกสาหร่ายมากกว่า 100 สายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ผลิตไขมัน (Sheehan *et al.*, 1998) รวมทั้งได้มีการกระตุ้นสาหร่ายให้เพิ่มปริมาณการสะสมไขมันด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งการเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของสารอาหาร เช่น การเลี้ยงภายใต้สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic growth) ในที่มืดและใช้สารอินทรีย์คาร์บอนแทนแหล่งพลังงาน หรือการเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงในปริมาณความเข้มข้นเพื่อกระตุ้นการสร้างรงควัตถุ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ หรือการแปรผันปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนและเหล็ก เป็นต้น (Xu *et al.*, 2006; Widjaja *et al.*, 2009; Yoo *et al.*, 2010) แต่ในความเป็นจริงแล้ว จากลักษณะทางภูมิประเทศของประเทศไทยที่อยู่ในเขตร้อน จึงมีแสงแดดตลอดทั้งปี ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย ซึ่งชนิดของสาหร่ายจะมีความแตกต่างกันตามสภาวะภูมิอากาศและภูมิประเทศ ซึ่งประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายสูง โดยมีความเป็นไปได้ที่จะนำสาหร่ายน้ำเค็มเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี มีพื้นที่อยู่ใกล้กับทะเล จึงมีทั้งแหล่งน้ำเค็มธรรมชาติและยังมีพื้นที่สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้

ดังนั้นการศึกษานี้ได้นำสาหร่ายที่แยกจากแหล่งน้ำที่มีเค็ม (ความเค็มตั้งแต่ 5-35 PSU) ทั้งแหล่งน้ำธรรมชาติและบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์ภายในจังหวัดจันทบุรี และจำแนกชนิดของสาหร่าย จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีไขมันสะสมในเซลล์ปริมาณสูงเพื่อนำไปกระตุ้นในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้สาหร่ายสะสมไขมันในปริมาณที่สูงกว่าสภาวะปกติ ซึ่งผลจากการทดลองก่อนหน้านี้สามารถคัดเลือกได้ *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC 1501 *Amphora subtropicsa* BUUC 1502 *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* ซึ่งจะนำมาเลี้ยงในสภาวะที่สาหร่ายเติบโตและสะสมไขมันได้ดี โดยองค์ความรู้นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการ

ใช้ในการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซล หรือสารประกอบทางชีวเคมีอื่นๆ รวมถึงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมได้ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC 1501 *Amphora subtropicsa* BUUC 1502 *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis*

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยในปีงบประมาณ 2560 นั้นได้คัดเลือกสาหร่ายที่ให้ผลผลิตมวลชีวภาพและผลผลิตไขมันสูงอย่างน้อย 2 ชนิด ตามลำดับ มาเพาะเลี้ยงในสภาวะการเติบโต 3 รูปแบบ คือ (1) โฟโตออโตโทรฟิก (2) มิกโซโทรฟิก และ (3) เฮเทอโรโทรฟิกเพื่อวิเคราะห์ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมัน รวมทั้งองค์ประกอบกรดไขมัน และนำสาหร่ายไปเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยสภาวะที่เหมาะสม

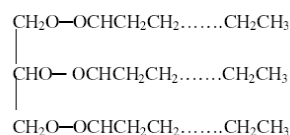
## 1.4 ทฤษฎีและแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

### 1.4.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวกับสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์มีความซับซ้อนที่แตกต่างกัน มักพบในที่ชื้นหรือแหล่งน้ำ และบนพื้นดิน ตลอดจนสภาพแวดล้อมทางน้ำ เช่นเดียวกับพืช ขึ้นสูง และที่สำคัญสาหร่ายต้องใช้ออกซิเจนประกอบหลักสำหรับสร้างมวลชีวภาพ คือ แสงแดด ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยใช้กระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยทั่วไปสาหร่ายจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ จุลสาหร่ายหรือสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) และสาหร่ายขนาดใหญ่ (macroalgae) โดยที่สาหร่ายขนาดใหญ่มีหลายเซลล์

### 1.4.2 ไขมันในสาหร่าย

ไขมัน (lipid) ชนิดของไขมันภายในเซลล์สาหร่ายมีความคล้ายคลึงกับพืชชั้นสูง ไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) (รูปที่ 1.1) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) เลซิธิน (lecithin) ฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (phosphatidyl glycerol) และฟอสโฟติดิลอินซิทอล (phosphatidyl inositol) กรดไขมันที่พบในสาหร่ายส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีคาร์บอนจำนวน 14 16 และ 20 อะตอม เป็นองค์ประกอบ การสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดกรดลิโนเลนิก (linolenic acid, C18:3) ของสาหร่ายมีปริมาณน้อยมาก ในขณะที่พืชชั้นสูงพบกรดลิโนเลนิกเป็นองค์ประกอบหลักเพราะกรดไขมันชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของคลอโรพลาสต์ ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในสาหร่ายบางชนิดแสดงดังตารางที่ 1.1 โดยชนิดของกรดไขมันที่พบในสาหร่ายจะขึ้นกับชนิดของสาหร่ายและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์

ตารางที่ 1.1 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)

ชนิดของกรดไขมัน (จำนวนคาร์บอนอะตอม: จำนวนพันธะคู่)	ชนิดของสาหร่าย				
	<i>Navicula elliculosa</i> <sup>1</sup>	<i>Cylindrothec a gracilis</i> <sup>2</sup>	<i>Nitzschia palea</i> <sup>3</sup>	<i>Skeletonema costatum</i> <sup>4</sup>	<i>Thalassiosira fluviatili</i> <sup>5</sup>
กรดไมริสติก (myristic acid, 14:0)	2.8	7.0	6.2	6.2	7.9
กรดปาล์มิติก (palmitic acid, 16:0)	9.1	16.4	22.8	11.1	23.2
กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid, 16:1)	30.8	21.3	44.7	21.7	44.8
กรดเฮกซะเดคาไดอีนอิก (hexadecadienoic acid, 16:2)	7.4	4.2	3.6	6.1	2.8
กรดเฮกซะเดคาไตรอีนอิก (hexadecatrienoic acid, 16:3)	18.3	-	1.6	11.4	6.5
กรดสเตียริก (stearic acid, 18:0)	-	1.0	-	-	0.3
กรดโอเลอิก (oleic acid, 18:1)	6.2	5.3	2.5	1.8	0.4
กรดลิโนเลอิก (linoleic acid, 18:2)	3.9	2.9	-	2.1	0.5
กรดลิโนเลนิก (linolenic acid, 18:3)	2.6	-	-	-	0.2
กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid, 20:4)	4.5	6.2	6.3	3.9	0.6
กรดอีโคซะเพนเตอีนอิก (eicosapentaenoic acid, 20:5)	14.5	24.4	12.0	30.2	8.0

ที่มา: <sup>1</sup>Kates and Volcani (1966); <sup>2</sup>de Mort *et al.* (1972); <sup>3</sup>Opute (1974); <sup>4</sup>Chuecas and Riley (1969); <sup>5</sup>Tornabene *et al.* (1974)

### 1.4.3 สถานะการเติบโตของสาหร่าย

แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สิ่งมีชีวิตนำมาใช้ในการดำรงชีวิตสามารถใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ พวกที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานจัดเป็นพวกโฟโตโทรฟ (phototroph) ส่วนพวกที่ใช้สารอาหารที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายเป็นแหล่งพลังงานจัดเป็นเคโมโทรฟ (chemotroph) สิ่งมีชีวิตที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์จะเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) แต่ถ้าใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนจัดเป็นพวกออโตโทรฟ (autotroph) ซึ่งสามารถสรุปการจำแนกสิ่งมีชีวิตตามการใช้แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 การจำแนกสิ่งมีชีวิตตามแหล่งอาหารและพลังงาน (สาโรจน์ และ ประวิทย์, 2538)

แหล่งคาร์บอน	แหล่งพลังงาน	
	เคมี	แสง
สารประกอบอินทรีย์	<b>เคโมเฮเทอโรโทรฟ</b> - สัตว์ชั้นสูง - โปรโตซัว - เห็ดรา - แบคทีเรีย	<b>โฟโตเฮเทอโรโทรฟ</b> - แบคทีเรียบางชนิด - สาหร่าย
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	<b>เคโมออโตโทรฟ</b> - แบคทีเรียบางชนิด	<b>โฟโตออโตโทรฟ</b> - พืชชั้นสูง - สาหร่าย - ไชยาโนแบคทีเรีย - แบคทีเรียบางชนิด

#### (1) สถานะการเติบโตแบบโฟโตออโตโทรฟิค (photoautotrophic growth)

เป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้แหล่งพลังงานจากดวงอาทิตย์ การเพาะเลี้ยงแบบนี้มีข้อดีคือไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเรื่องแหล่งพลังงานแสงเพราะใช้แสงจากดวงอาทิตย์ แต่การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดกลางแจ้งมีข้อเสียคือเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (สาหร่ายชนิดอื่น โปรโตซัวและแบคทีเรีย) ปัญหาที่เกิดขึ้นสามารถแก้ไขได้ โดยต้องเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดที่สามารถทนต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้เช่น สาหร่าย *Dunaliella salina* ทนต่อความเครียดเนื่องจากความเค็มสูง สาหร่าย *Spirulina* sp. สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงได้ การเติบโตของสาหร่ายในการเพาะเลี้ยงแบบเปิดมักแปรผันตามฤดูกาล ซึ่งแต่ละฤดูจะมีความเข้มแสงและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป จึงเป็นการยากที่จะควบคุมให้สภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย อย่างไรก็ตามในประเทศไทย จีน เม็กซิโกและสหรัฐอเมริกา ยังมีการผลิตสาหร่าย *Spirulina* sp. เพื่อการค้าโดยทำการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดกลางแจ้ง (Metting, 1996; Li and Qi, 1997) ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบโฟโตออโตโทรฟิคในระบบปิด (close system) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทำการพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในระบบเปิด การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดทำได้โดยเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง (photobioreactor) ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเติบโตของสาหร่าย

ได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบปิดจึงมีการนำไปใช้อย่างกว้างขวาง เช่น เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. และ *Spirulina* sp เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Borowitzka, 1999)

(2) สภาวะการเติบโตแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (photoheterotrophic growth)

การเติบโตแบบโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกหรือมิคโซโทรฟิก (mixotrophic growth) เป็นสภาวะการเติบโตที่สาหร่ายใช้แสงและใช้สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน (Vonshak *et al.*, 2000) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกมักใช้ความเข้มแสงต่ำๆ จึงสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้งเนื่องจากความเข้มแสงสูงๆ (photoinhibition) จากปัญหาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิกไม่สามารถชักนำให้เซลล์สะสมสารรงควัตถุได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดเพื่อผลิตสารรงควัตถุ จากรายงานพบว่า การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกในที่มืด สาหร่ายใช้เวลาในระยะพักเซลล์นานมากกว่า 200 ชั่วโมง อัตราการเติบโตจำเพาะ 0.0083 ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตของไฟโคไซยานิน (phycocyanin) 55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. platensis* ภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.026 ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฟโคไซยานิน 120 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Chen *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิกเพื่อผลิตชีวมวล เช่น สาหร่าย *Chlorella sorokiniana* (Lee *et al.*, 1996)

(3) สภาวะการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic growth)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกเป็นการเพาะเลี้ยงแบบระบบปิดในที่มืด และมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกมาใช้ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพสาหร่ายบางชนิดสามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกและมีศักยภาพที่จะเติบโตในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพได้ดี (Apt and Behrens, 1999) และยังสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายสะสมสร้างเมแทบอลิต์บางชนิดได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของไขมัน ซึ่ง Xu *et al.* (2006) รายงานว่าการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกสามารถกระตุ้นให้เซลล์สะสมไขมันเพิ่มขึ้นจาก 14 เป็น 52 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบราคาของอาหารเพาะเชื้อ พบว่าอาหารเพาะเชื้อของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีราคาสูงกว่าอาหารเพาะเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก นอกจากนี้ Chen *et al.* (1996) ได้อธิบายถึงปัญหาและแนวทางแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเฮเทอโรโทรฟิกดังนี้

- สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีน้อยชนิดแนวทางที่ใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นคือ คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก จากการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย พบว่ามีสาหร่ายหลายชนิดที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก เช่น สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* สามารถผลิตกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ได้ดีกว่าอีสต์และสาหร่ายชนิดอื่นด้วย (Running *et al.*, 1994) ไดอะตอม *Nitzschia alba* และไดโนแฟลกเจลเลตน้ำเค็ม *Cryptocodinium cohnii* เป็นแหล่งผลิตที่ดีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดกรดอีพีเอ (eicosapentaenoic acid, EPA) และกรดดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, DHA) ตามลำดับ (Kyle, 1996)



- การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกจะเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย หากเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่สาหร่ายมีการเติบโตได้ช้ากว่าแบคทีเรียมาก การแก้ปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (axenic culture) การเพาะเลี้ยงแบบเฮเทอโรโทรฟิกในระดับห้องปฏิบัติการไม่ค่อยประสบปัญหาการปนเปื้อน แต่หากขยายขนาดการเพาะเลี้ยงมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้ง่าย

- การเติบโตของสาหร่ายถูกยับยั้งเมื่อสารอาหารที่อยู่ในอาหารเพาะเชื้อในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์หมดลง ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์มีรายงานพบว่า การเติบโตของสาหร่าย *Chlorella protothecoides* ถูกยับยั้งด้วยสารอาหารที่มีความเข้มข้นมากเกินไป (substrate inhibition) คือเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 40 กรัมต่อลิตร (Shozen *et al.*, 2001) ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบครั้งคราว (fed-batch culture) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) เพื่อใช้ในการแก้ปัญหา

- การเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกไม่สามารถผลิตสารเมแทบอลิต์พวกรงควัตถุได้ เนื่องจากการสะสมสารรงควัตถุในเซลล์สาหร่ายจำเป็นต้องใช้แสงเป็นตัวชักนำให้เกิดการสะสม ดังนั้นหากต้องการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตสารรงควัตถุบางชนิดสามารถทำได้โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* เพื่อผลิตไฟโคไซยานิน และเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เพื่อผลิตแอสตาแซนทีน (astaxanthin) (Chen *et al.*, 1996; Ma and Chen, 2001)

## 1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wang *et al.* (2014) ได้ศึกษาผลผลิตชีวมวล ไขมันรวมทั้งหมด องค์ประกอบของกรดไขมันของไดอะตอมน้ำเค็มสายพันธุ์ *Chaetoceros muelleri* ในที่สภาวะที่มีระดับของคาร์บอนไดออกไซด์ต่างกัน โดยมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ 0.12 กรัม/ลิตร ( $1 \times 10^6$  เซลล์) เลี้ยงในอาหารเติมอากาศธรรมดาและอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03% 10% 20% และ 30% พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 10% โดยให้ชีวมวลเท่ากับ 1.059 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.868 ต่อวัน และผลผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.272 กรัมต่อลิตรต่อวัน และคลอโรฟิลล์ที่เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสง พบว่าในระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 10% พบปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุดเท่ากับ 1.658 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ไขมันรวมวิเคราะห์โดยวิธีคำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 10% ให้ไขมันรวมมากที่สุด โดยมีน้ำหนักแห้งของเซลล์เท่ากับ 43.43% องค์ประกอบของกรดไขมันวิเคราะห์โดยวิธี GC-MS พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 10% มีกรดไขมันสูงสุดที่ 84.82% และกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ในระดับต่ำมาก 10.26-16.76% แต่องค์ประกอบหลักของกรดไขมันที่มีลักษณะเด่นคือ C14-C18 เป็นพื้นฐานของกรดไขมันทั้งหมดมากกว่า 92% โดยสรุปแล้วลักษณะเด่นของกรดไขมันที่มีห่วงโซ่สั้นและร้อยละของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำ มีความสำคัญกับศักยภาพในการผลิตไบโอดีเซลได้ ซึ่งการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่เติมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10% สาหร่ายมีการเติบโตได้ดีโดยให้ผลผลิตชีวมวล ไขมันรวม และกรดไขมันได้ผลดีที่สุดซึ่งจะส่งผลถึงศักยภาพในการนำไปผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพต่อไป

Li *et al.* (2014) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chodatella* sp. โดยเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสภาวะมิโครโทรฟิกที่เลี้ยงในน้ำที่มาจากฟาร์มเลี้ยงหมู พบว่าสาหร่ายมีองค์ประกอบกรดไขมันที่คล้ายคลึงกัน แต่อัตราการเติบโตจำเพาะผลผลิตเซลล์และผลผลิตไขมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิโครโทรฟิกจะสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิก เท่ากับ 1.74, 14 และ 5.6 เท่า ตามลำดับ

Das *et al.* (2011) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Nannochloropsis* sp. ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน) และมิโครโทรฟิก (ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน) และแปรผันความยาวคลื่นแสงที่ให้ระหว่างการเพาะเลี้ยง คือ แสงสีแดง เขียวและน้ำเงิน พบว่าการใช้แสงสีน้ำเงินส่งผลให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิโครโทรฟิกมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.64 และ 0.66 ต่อวัน ตามลำดับ และเซลล์จะมีองค์ประกอบกรดไขมันที่แตกต่างกันตามความยาวคลื่นแสงที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย ส่วนปริมาณกรดไขมันก็แตกต่างกันด้วยโดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีเขียวภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิโครโทรฟิกมีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดเท่ากับ 20.54 และ 15.11% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

Abreu *et al.* (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* โดยใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมนมเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะมิโครโทรฟิกที่แตกต่างกัน ได้แก่ (1) ชุดควบคุมเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ โฟโตออโตโทรฟิก แหล่งคาร์บอนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (2) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิโครโทรฟิก มีแหล่งคาร์บอนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และสารละลายผงซีเอสเวย์ที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซต (10 กรัมต่อลิตรแกล็กโทส) (3) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิโครโทรฟิก มีแหล่งคาร์บอนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และสารละลายผงซีเอสเวย์ที่ผ่านการไฮโดรไลเซต (5 กรัมต่อลิตรกลูโคส + 5 กรัมต่อลิตรกาแล็กโทส) (4) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิโครโทรฟิก มีแหล่งคาร์บอนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ กลูโคส (5 กรัมต่อลิตร) และกาแล็กโทส (5 กรัมต่อลิตร) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้จะทำการวัดอัตราการเติบโตจำเพาะ ความเข้มข้นมวลชีวภาพ และผลผลิตมวลชีวภาพ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าการเพาะเลี้ยงในแบบ (3) และ (4) ให้อัตราการเติบโตจำเพาะ ความเข้มข้นมวลชีวภาพ และผลผลิตมวลชีวภาพที่สูงใกล้เคียงกัน และสูงที่สุด ซึ่งอัตราการเติบโตจำเพาะ เท่ากับ 0.43 และ 0.47 ต่อวัน ความเข้มข้นมวลชีวภาพ เท่ากับ 3.58 และ 2.24 กรัมต่อลิตรและผลผลิตมวลชีวภาพ เท่ากับ 0.75 และ 0 กรัมต่อลิตรต่อวัน

Rai *et al.* (2013) ได้เพาะเลี้ยง *Chlorella pyrenoidosa* ภายใต้สภาวะมิโครโทรฟิก โดยใช้ acetate และ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ พบว่าสามารถผลิตมวลชีวภาพและไขมันของสาหร่ายได้มากกว่าสภาวะออโตโทรฟิกถึง 6 และ 32 เท่า ตามลำดับ การเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มี acetate และ glycerol สามารถสะสมไขมันได้ 13.5 และ 17.3% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิก โดยเซลล์จะมีกรดไขมัน palmitic acid (C-16) และ oleic acid (C-18) สูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิก ซึ่งกรดไขมันดังกล่าวถือว่าเป็นกรดไขมันที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพที่จะนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

Chu *et al.* (2015) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง *Chlorella pyrenoidosa* โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งสาลี ซึ่งน้ำเสียที่ใช้จะผ่านกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน ทำการเพาะเลี้ยงกลางแจ้งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบให้แสง (photobioreactor) 2 รูปแบบ คือแบบแบทช์ (batch culture) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) พบว่า *C. pyrenoidosa* สามารถปรับตัวเข้ากับน้ำเสียที่ผ่านการย่อยสลายได้ และยังเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในถังปฏิกรณ์ แต่ในการเพาะเลี้ยงกลางแจ้งจะมีการเปลี่ยนแปลงฤดูกาลของสภาพแวดล้อมทำให้ส่งผลต่อการเติบโตของมวล

ชีวภาพ (biomass) และการผลิตไขมัน ดังนั้นจึงได้ดำเนินการเพาะเลี้ยงกลางแจ้งในระยะยาว พบว่าความเข้มข้นของมวลชีวภาพ และผลผลิตในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะแตกต่างกันตามระยะเวลาในการบำบัดหรือระยะเวลาที่กักเก็บน้ำเสียในระบบ (HRTs) โดยระยะเวลาในการบำบัดที่ 4 วัน ของฤดูร้อนจะให้ผลผลิตไขมัน ผลผลิตมวลชีวภาพ และความเข้มข้นของมวลชีวภาพค่อนข้างสูง เท่ากับ  $43.37 \pm 743$  มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน  $342.6 \pm 12.8$  มิลลิกรัมต่อลิตร และ  $1.29-1.62$  กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Juntilla *et al.* (2015) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตมวลชีวภาพและไขมันของสาหร่ายที่คัดแยกจากห้องถ้ำ คือ *Chlorella sorokiniana* ภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก โดยการเพาะเลี้ยงจะมีการเติมอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ (1) อาหารที่มีการเติมกลูโคสในความเข้มข้น 50% (2) อาหารที่มีการจำกัดไนโตรเจน 50% และเติมกลูโคส 1.0 กรัมต่อลิตร และใช้เทคนิคการย้อมไนล์เรด (Nile red) ในการตรวจสอบปริมาณไขมันภายในเซลล์ พบว่าผลผลิตมวลชีวภาพ ปริมาณไขมัน และอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ  $687.5$  มิลลิกรัมต่อลิตร,  $146.37$  มิลลิกรัมต่อลิตร และ  $1.602$  ต่อวัน ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตมวลชีวภาพ ปริมาณไขมัน และอัตราการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นกลูโคสที่เพิ่มขึ้น สำหรับอาหารที่มีการจำกัดไนโตรเจน และเติมกลูโคสนั้นทำให้ผลผลิตมวลชีวภาพ ปริมาณไขมัน และอัตราการเจริญเติบโตจะลดลง ดังนั้นการศึกษานี้จึงสามารถนำ *Chlorella sorokiniana* ที่แยกจากห้องถ้ำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะмикโซโทรฟิกที่ใช้อาหารที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

Lin and Wu (2015) ได้เพาะเลี้ยง *Chlorella sp.* Y8-1 ภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก โดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น fructose, glucose, glycerol, sucrose และ xylose พบว่าสาหร่ายเติบโตได้ดีและมีไขมันสะสมสูงถึง 35.5% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก และยังพบว่ากรดไขมันชนิดเด่นที่พบในสาหร่าย *Chlorella sp.* Y8-1 คือ palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2) และ linolenic acids (C18:3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สาหร่ายชนิดนี้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ ทั้งนี้สามารถเพาะเลี้ยงขยายปริมาณได้โดยการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก

Smith *et al.* (2015) ได้ศึกษาการเติบโตแบบмикโซโทรฟิกของสาหร่าย *Micractinium inermum* ที่สาหร่ายเติบโตด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกับจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารอินทรีย์คาร์บอน จึงถือเป็นการสร้างมวลชีวภาพจากการเติบโตแบบออโตโทรฟิกร่วมกับแบบмикโซโทรฟิก โดยในการศึกษานี้ได้ใช้ acetate เป็นแหล่งคาร์บอนในการเติบโตแบบмикโซโทรฟิก พบว่าสาหร่าย *M. inermum* มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงกว่าผลรวมของอัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก ถึง 1.74 เท่า

Shishlyannikov *et al.* (2016) พบว่าไดอะตอม *Synedra acus* จะเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะмикโซโทรฟิกที่มี glycerol 80 mM และพบว่ากรดไขมัน palmitic และ stearic จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเซลล์เติบโตเข้าสู่ระยะคงที่

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้สาหร่ายสำหรับผลิตมวลชีวภาพ จำนวน 2 ชนิด และได้สาหร่ายสำหรับผลิตไขมัน จำนวน 2 ชนิด โดยทราบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการสะสมไขมันของสาหร่ายดังกล่าว

1.6.2 ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยสามารถนำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการหรือวารสาร และ  
หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

## 2. เนื้อเรื่อง

### 2.1 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1: การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ (Batch culture) ในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก

ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC 1501 *Amphora subtropicsa* BUUC 1502 *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารปริมาตร 90 มล. เติมหิวเชื้อไดอะตอมปริมาตร 10 มล. ทั้งนี้สภาวะการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองมี 3 สภาวะ แต่ละสภาวะทดลอง 3 ซ้ำ ดังนี้

(1) สภาวะการเจริญเติบโตแบบออโตโทรฟิกโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตรของกิลลาร์ด หรือ F/2 (Guillard, 1973) อาหารดังกล่าวเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ วางขวดเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ  $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดเวลาด้วยความเข้มแสงประมาณ 4,300 ลักซ์

(2) สภาวะการเจริญเติบโตแบบมิกโซโทรฟิกจะเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร F/2 ผสมอาหารสูตร Nutrient broth (NB medium) ที่มีส่วนประกอบของเปปโตเน ยีสต์สกัดและเนื้อสกัดในปริมาณ 5, 2 และ 1 ก./ล. ตามลำดับ (Bridson, 1995) และเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในรูปสารอินทรีย์ 10 ก./ล. (ชมพูนุท และคณะ, 2544) วางขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิและให้แสงตลอดเวลาเช่นเดียวกับสภาวะแบบออโตโทรฟิก

(3) สภาวะการเจริญเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรเดียวกับสภาวะมิกโซโทรฟิก แต่วางขวดเลี้ยงสาหร่ายในที่มืดและอุณหภูมิ  $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส

ในระหว่างการทดลองเพาะเลี้ยงได้ติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับเซลล์บนสไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) จากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/มล.) และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของไดอะตอม ( $\mu$ ) รายงานในหน่วยต่อวัน ด้วยสมการ  $\frac{\ln(N_2 - N_1)}{(t_2 - t_1)}$  โดยที่  $N_1$  คือ ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/มล.) ณ เวลา  $t_1$  (วัน) และ  $N_2$  คือ ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/มล.) ณ เวลา  $t_2$  (วัน) และคำนวณหาผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอม (เซลล์/ล./วัน) ตามสมการ  $\frac{N_2 - N_1}{t_2 - t_1}$   $N_1$  คือ ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น (เซลล์/มล.) ณ วันแรกของการทดลอง หรือ  $t_1$  (วัน) และ  $N_2$  คือ ความหนาแน่นเซลล์ (เซลล์/ล.) ณ วันที่ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด หรือ  $t_2$  (วัน)

การทดลองที่ 2 : การขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก

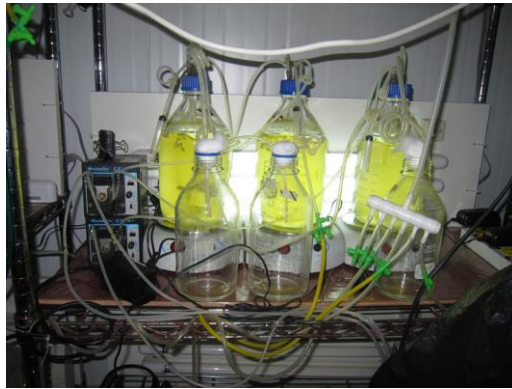
ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *Amphora subtropicsa* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและสภาวะแบบมิกโซโทรฟิก โดยทำการเลี้ยงสภาวะละ 3 ซ้ำ สาเหตุที่เลือกใช้สภาวะดังกล่าวเนื่องจากเซลล์สามารถเติบโตได้ดี ในขณะที่สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกเซลล์เติบโตได้น้อย ทดลองเลี้ยงสาหร่ายในขวดปริมาตร 2 ลิตร ใช้หิวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรการเลี้ยง เติมลงในอาหารเหลวสูตรกิลลาร์ด F/2 ในสภาวะการเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกและใช้

อาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB ร่วมกับกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้อากาศที่ผ่านการกรองด้วยไส้กรองขนาด 0.2 ไมครอน และให้แสงความเข้ม 4,300 ลักซ์ ตลอดเวลา ทำการติดตามการเติบโตด้วยการนับจำนวนในไตกล้องจุลทรรศน์

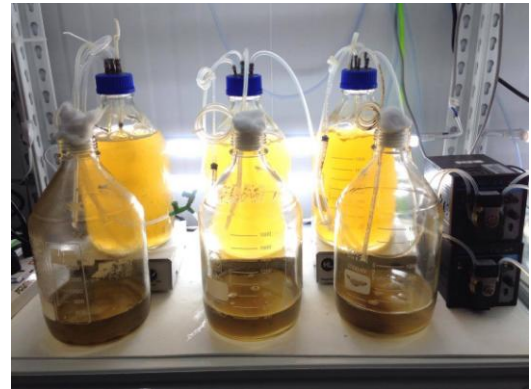
ในวันสุดท้ายของการทดลองได้นำเซลล์แห้ง 50 มก. มาสกัดไขมันตามวิธีของ Folch *et al.* (1957) โดยใช้สารละลายผสม Chloroform:Methanol เมื่อได้สารละลายไขมันจะนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator (รุ่น R-210, Buchi) ฟันด้วยก๊าซไนโตรเจนและซังน้ำหนักรักษาหน้าหน้าไขมัน จากนั้นละลายไขมันด้วยสารละลายผสม Chloroform:Methanol ที่ผสม BHT แล้วทำการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (tranesterification) ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Christie (2003) และนำสารละลายไประเหยและเป่าแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน จากนั้นละลายกรดไขมันด้วย n-hexane ปริมาตร 1 มล. นำสารละลายกรดไขมันไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (รุ่น 7890A, Agilent) ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดเป็น Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์รุ่น 19091N-133, HP-INNOWAX (Agilent) ฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร แบบ split (5:1) อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม 1.1 มล./นาที อุณหภูมิจุดฉีดสาร 240 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ detector 260 องศาเซลเซียส โดยเริ่มต้นที่ 35 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้นาน 0.5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 170 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที และคงอุณหภูมิไว้ 3 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 240 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียส/นาที คงไว้ 3 นาที รวมเวลาวิเคราะห์ 86.5 นาที จำแนกชนิดกรดไขมันโดยเปรียบเทียบกับ Retention Time ของกรดไขมันมาตรฐาน 37 Component FAME Mix (Supelco)

### การทดลองที่ 3: การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

ทำการเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *Amphora subtropicsa* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร (ภาพที่ 2.1) เลี้ยงด้วยอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 ที่เตรียมจากน้ำความเค็ม 30 พีเอสยู ให้อากาศร่วมกับการปั่นกววนและแสงความเข้ม 8,000 ลักซ์ ทำการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องจนสาหร่ายมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้น จึงทำการเริ่มระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยมีการเติมอาหารเพาะเชื้อให้กับสาหร่ายตลอดเวลา ในขณะที่เดียวกันก็มีการนำผลผลิตของสาหร่ายออกจากระบบตลอดเวลาเช่นกัน อาหารเพาะเชื้อจะถูกเติมด้วยปั้มน้ำรีดสายและผลผลิตจะไหลออกด้วยแรงดันอากาศจากในขวด เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่เป็นเวลา 5-6 วัน จะทำการปรับอัตราการเจือจางขึ้น ติดตามการเติบโตของสาหร่ายด้วยการนับจำนวนในไตกล้องจุลทรรศน์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดทุกวัน



(A)



(B)

ภาพที่ 2.1 การเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. BUUC1501 (A) และ *A. coffeaeformis* BUUC1601 (B) แบบต่อเนื่อง ในขวดขนาด 2 ลิตร

การทดลองที่ 4: การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 50 ลิตร

ทำการศึกษาการเติบโตของสาหร่าย 2 ชนิด คือ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUUC1601 ในระบบการเลี้ยงแบบแบตช์ ในสภาวะอโตโทรฟิกที่ใช้อาหารสูตรกลลาร์ด F/2 ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีเอชยู ปริมาตร 50 ลิตร โดยเติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบโปร่งแสงที่ทำมาจากท่อ acrylic จากนั้นเติมเชื้อสาหร่ายประมาณ 5-10% ต่อปริมาตรอาหาร มีการให้อากาศผ่านการกรองไส้กรองขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอนและแสงตลอดเวลา (ภาพที่ 2.2) สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงคือให้แสง 8000 ลักซ์ตลอดเวลา และมีอุณหภูมิระหว่างเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.2 การเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ปริมาตร 50 ลิตร

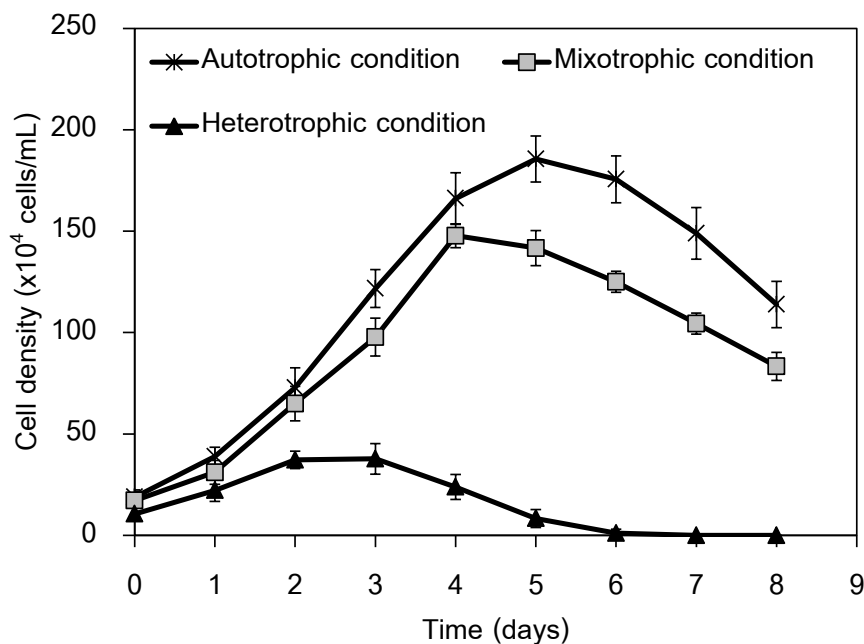
## 2.2 ผลการทดลอง

### 2.2.1 การเติบโตของสาหร่ายการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบคทีเรียในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก

#### สาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC 1501

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก นาน 8 วัน ภาพที่ 2.3 พบว่า ไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUUC1501 สามารถเติบโตได้ทั้ง 3 สภาวะ และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงทั้ง 3 สภาวะ พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ทันทีโดยไม่ต้องพบว่ามีเซลล์อยู่ในระยะพัก (lag growth phase) และให้เซลล์สูงสุดได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน โดยให้เซลล์สูงสุด  $185.46 \times 10^4$  เซลล์/มล. ในขณะที่ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิกใช้เวลาเพียง 4 และ 3 วัน ตามลำดับ เซลล์เติบโตได้เร็วและให้เซลล์สูงสุด  $147.47$  และ  $37.78 \times 10^4$  เซลล์/มล. ตามลำดับ เห็นได้ว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิกมีเซลล์สูงสุดต่ำกว่าสภาวะออโตโทรฟิก เซลล์ไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าสภาวะมิกโซโทรฟิก

ตารางที่ 2.1 พบว่าไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกส่งเสริมเซลล์ให้เจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกันและให้เซลล์สูงสุดได้สูงกว่าสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) และเช่นเดียวกัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงด้วยสภาวะมิกโซโทรฟิกมีค่า 0.65 ต่อวัน ซึ่งใกล้เคียงกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสภาวะออโตโทรฟิกที่มีค่า 0.55 ต่อวัน ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยสภาวะมิกโซโทรฟิกและออโตโทรฟิกให้ผลผลิตมวลชีวภาพมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) โดยมีค่าสูงกว่า 3.02 และ 3.00 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไดอะตอมที่เจริญเติบโตแบบมิกโซโทรฟิกให้ผลผลิตได้ใกล้เคียงกับสภาวะออโตโทรฟิก



ภาพที่ 2.3 การเติบโตของ *Nitzschia* sp. BUUC1501 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก

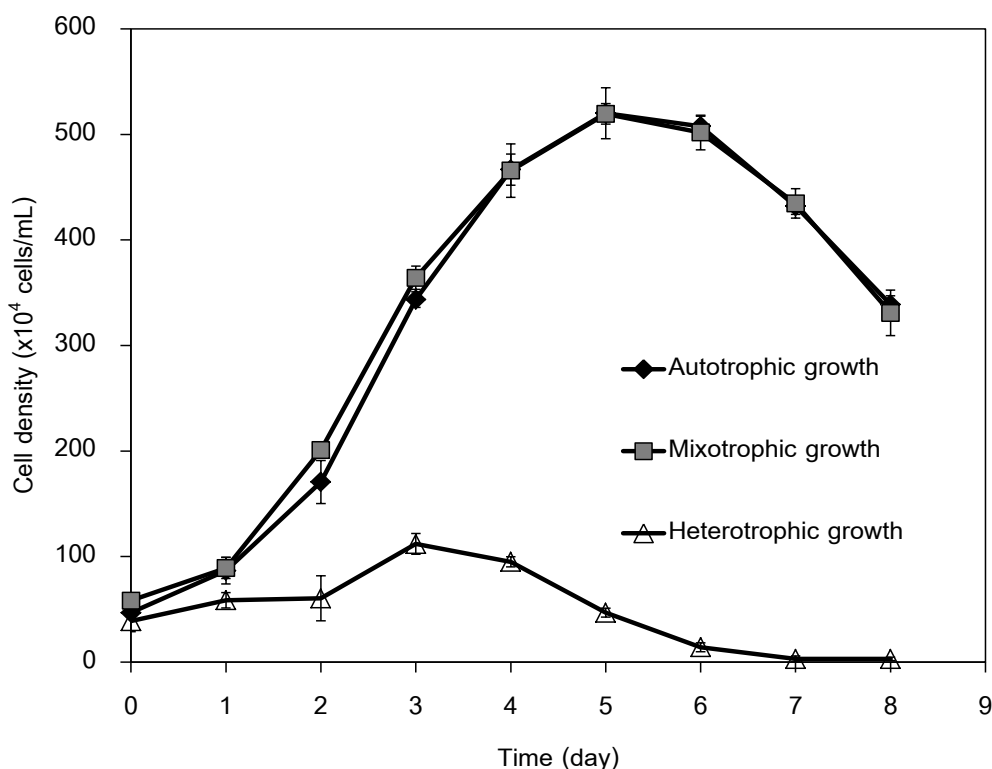


**ตารางที่ 2.1** อัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUU1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยที่ตัวอักษรที่ต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

สภาวะการเพาะเลี้ยง	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ cells/mL)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ( $\times 10^7$ cells/L/day)
Autotrophic	$0.55 \pm 0.04^{ab}$	$185.46 \pm 8.57^a$	$37.09 \pm 1.71^a$
Mixotrophic	$0.65 \pm 0.10^a$	$147.47 \pm 10.88^b$	$36.87 \pm 2.72^a$
Heterotrophic	$0.43 \pm 0.14^b$	$37.78 \pm 7.53^c$	$12.29 \pm 2.51^b$

**สำหรับ *A. coffeaeformis* BUU1602**

จากภาพที่ 2.4 แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงไดอะตอมในสภาวะออโตโทรฟิกและมิคโซโทรฟิกมีการเติบโตได้ดีและมีการเติบโตที่ใกล้เคียงกัน โดยในสภาวะออโตโทรฟิกมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $323.69 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะมิคโซโทรฟิกมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด  $329.46 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกถึง 6.7 เท่า เช่นเดียวกับอัตราการเติบโตจำเพาะและค่าผลผลิตมวลชีวภาพที่พบว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิคโซโทรฟิก มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางที่ 2.2)



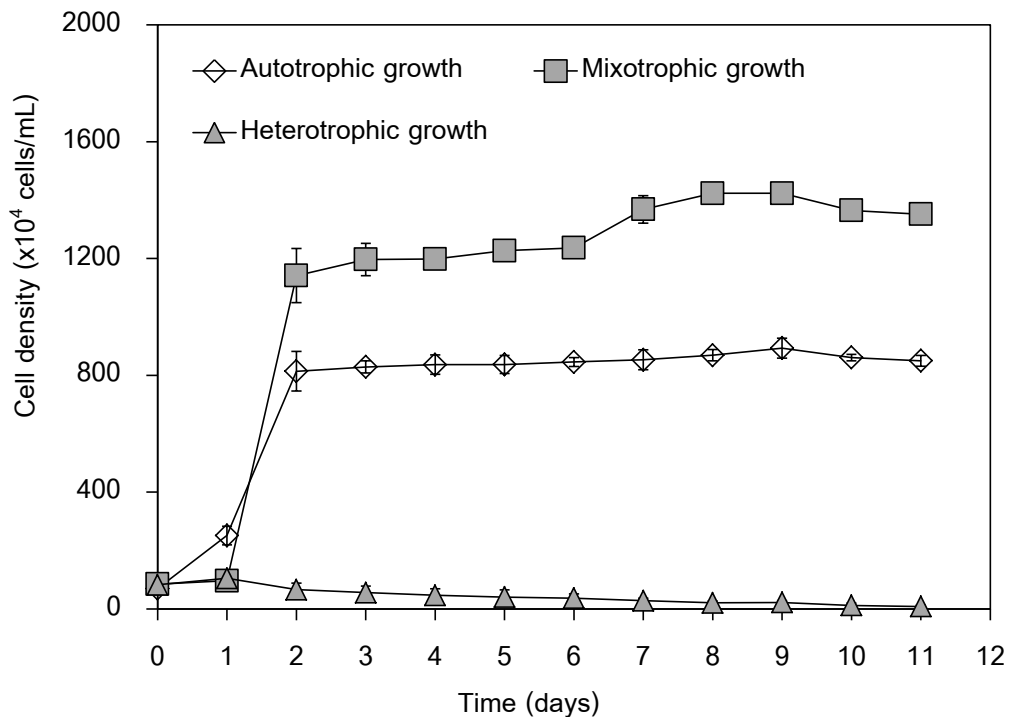
**ภาพที่ 2.4** การเติบโตของ *A. coffeaeformis* BUU1602 ในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกันโดยเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และวางในห้องปฏิบัติการนาน 9 วัน

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นสูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอม *A. coffeaeformis* BUU1602 โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

สถานะที่เลี้ยงไดอะตอม	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ( $\times 10^7$ เซลล์/ลิตร/วัน)
ออโตโทรฟิก	$0.54 \pm 0.05^A$	$323.69 \pm 11.01^A$	$90.83 \pm 10.11^A$
มิคโซโทรฟิก	$0.56 \pm 0.03^A$	$329.46 \pm 8.44^A$	$92.22 \pm 3.25^A$
เฮเทอโรโทรฟิก	$0.36 \pm 0.18^B$	$48.05 \pm 8.12^B$	$24.07 \pm 4.9^B$

**สาหร่าย *Chlorella protothecoides* BUUC1602**

จากภาพที่ 2.5 และตารางที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงด้วยสถานะออโตโทรฟิก มิคโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิกมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $893.33 \times 10^4$ ,  $1,200.55 \times 10^4$  และ  $105.0 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เลี้ยงภายใต้สถานะออโตโทรฟิกและมิคโซโทรฟิกช่วยส่งเสริมเซลล์เติบโตได้ดีใกล้เคียงกัน ( $p \geq 0.05$ ) ซึ่งทั้ง 2 สถานะ ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดได้สูงกว่าการเลี้ยงภายใต้สถานะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



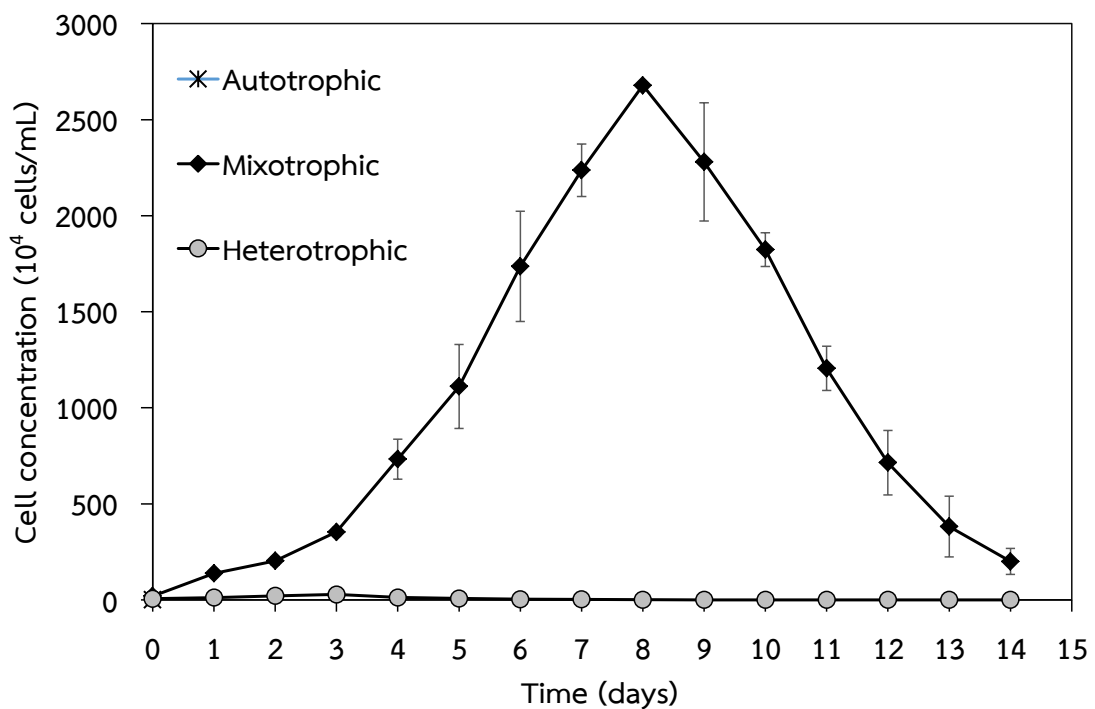
ภาพที่ 2.5 การเติบโตของ *C. protothecoides* BUUC1602 ในสถานะแบบออโตโทรฟิก มิคโซโทรฟิก และเฮเทอโรโทรฟิก โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของ *C. prothecoides* BUUC1602 โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลตามแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

สภาวะการเพาะเลี้ยง	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ( $\times 10^7$ เซลล์/ลิตร/วัน)
Autotrophic	1.22 <sup>a</sup> ( $\pm 0.017$ )	893.33 <sup>a</sup> ( $\pm 34.27$ )	371.94 <sup>a</sup> ( $\pm 14.68$ )
Mixotrophic	1.89 <sup>a</sup> ( $\pm 0.115$ )	1,200.55 <sup>a</sup> ( $\pm 20.29$ )	436.39 <sup>a</sup> ( $\pm 79.87$ )
Heterotrophic	0.81 <sup>b</sup> ( $\pm 0.096$ )	105.0 <sup>b</sup> ( $\pm 25.61$ )	22.22 <sup>b</sup> ( $\pm 32.38$ )

**สำหรับ *Amphora subtropicsa* BUUC1502**

ไดอะตอม *Amphora* สามารถเติบโตได้ดีที่สุดในสภาวะมิกโซโทรฟิก มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2678.8 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2.6) ซึ่งมีค่าสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะพบว่าสภาวะการเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิกมีอัตราการเติบโตจำเพาะที่มากที่สุดคือ  $0.81 \pm 0.03$  ต่อวัน และมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงสภาวะออโตโทรฟิกและสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และสภาวะการเติบโตแบบมิกโซโทรฟิกให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงถึง  $332.4 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน มีค่ามากกว่าสภาวะออโตโทรฟิกและสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก โดยผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอมที่เติบโตแบบมิกโซโทรฟิกมีค่าสูงกว่าแบบออโตโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิกถึง 14.76 และ 44.19 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 2.4)



ภาพที่ 2.6 การเติบโตของไดอะตอม *A. subtropicsa* BUUC1502 ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก

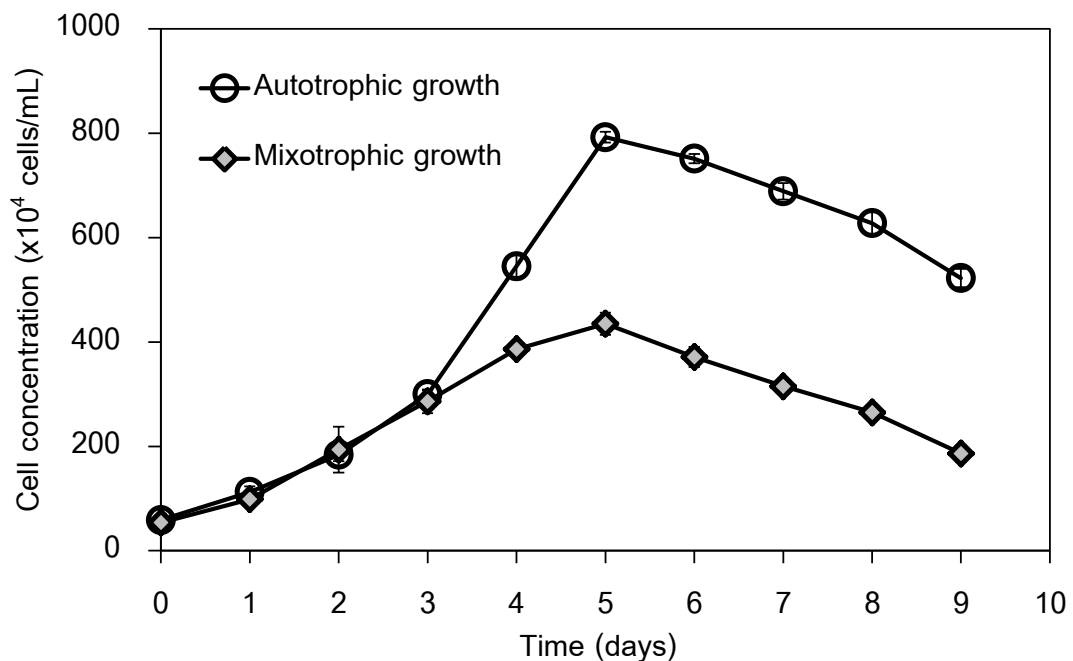
ตารางที่ 2.4 ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด อัตราการเติบโตจำเพาะและผลผลิตมวลชีวภาพของ ไดอะตอม *Amphora* sp. สายพันธุ์ BUUC 1502 ที่เติบโตในสภาวะแบบออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิก และเฮเทอโรโทรฟิก โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลตามแนวตั้งของตาราง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

สภาวะการเลี้ยง	ความหนาแน่น เซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเติบโต จำเพาะ (ต่อวัน)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ( $\times 10^7$ เซลล์ต่อลิตรต่อวัน)
Autotrophic	133.6 $\pm$ 2.64 <sup>b</sup>	0.47 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	22.52 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
Mixotrophic	2678.8 $\pm$ 14.52 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	332.4 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>
Heterotrophic	12.6 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>	0.45 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	7.4 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>

### 2.2.2 การเติบโต ปริมาณไขมันและองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายที่การเพาะเลี้ยง ในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก

#### สาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC 1501

ไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก ด้วยปริมาตร 2 ลิตร พบว่าสามารถเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ (log phase) ได้โดยที่ไม่มีระยะพักเซลล์ (lag phase) (ภาพที่ 2.7) และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกมีอัตราการเติบโตสูงกว่า สภาวะมิกโซโทรฟิก ( $P \leq 0.05$ ) รวมถึงผลผลิตมวลชีวภาพไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงแบบสภาวะออโตโทรฟิกมีค่าสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก ( $P \leq 0.05$ ) ประมาณ 2.2 เท่า (ตารางที่ 2.5)



ภาพที่ 2.7 ความหนาแน่นเซลล์ของไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUUC1501 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

**ตารางที่ 2.5** อัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของสาหร่าย *Nitzschia* sp. BUU1501 ที่เติบโตในสภาวะแบบออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก ในขวดแล้วปริมาตร 2 ลิตร

สภาวะการเพาะเลี้ยง	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ cells/mL)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ( $\times 10^7$ cells/L/day)
Autotrophic	$0.57 \pm 0.07^a$	$792.50 \pm 10.60^a$	$451.73 \pm 29.15^a$
Mixotrophic	$0.47 \pm 0.04^a$	$435.12 \pm 22.32^b$	$204.51 \pm 11.18^b$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

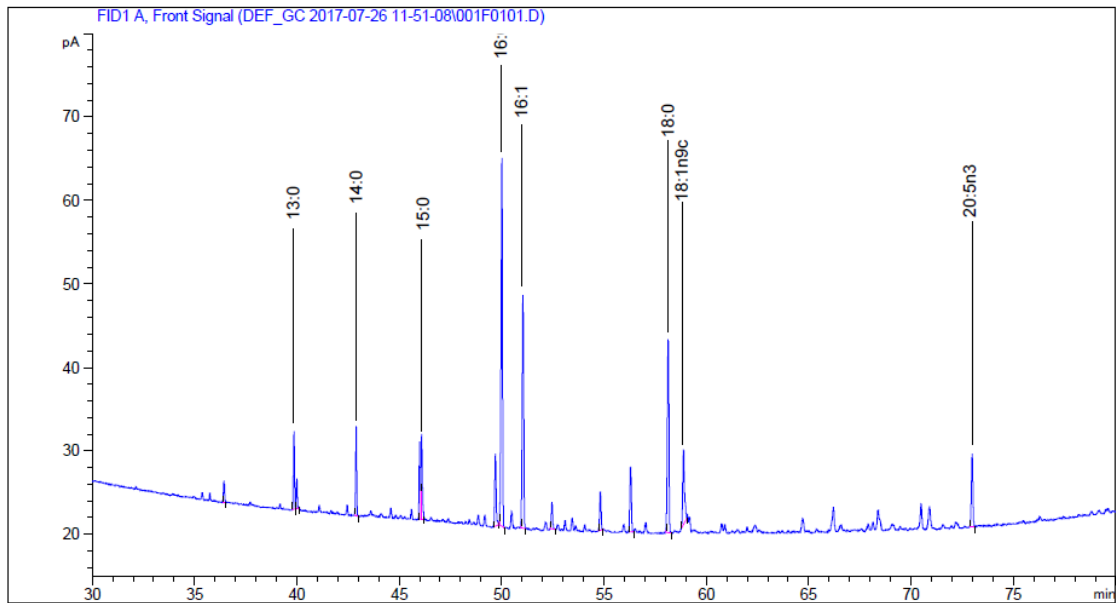
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันในไดอะตอมสุดท้ายของการเลี้ยง พบว่าไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิกมีไขมัน  $26.73 \pm 1.02\%$  ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกที่มีปริมาณ  $18.83 \pm 0.58$  เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ( $P < 0.05$ )

จากตารางที่ 2.6 แสดงให้เห็นว่าไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFAs) 72.56 และ 71.41% ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 มี palmitic acid (16:0) สูงกว่ากรดไขมันอิ่มตัวชนิดอื่น การเพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิกมีชนิดและปริมาณรวมของกรดไขมันเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids, MUFAs) สูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิก ( $P < 0.05$ ) และพบว่า EPA (20:5n3) จะมีเฉพาะในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกเท่านั้น ซึ่ง EPA เท่านั้น (ภาพที่ 2.8)

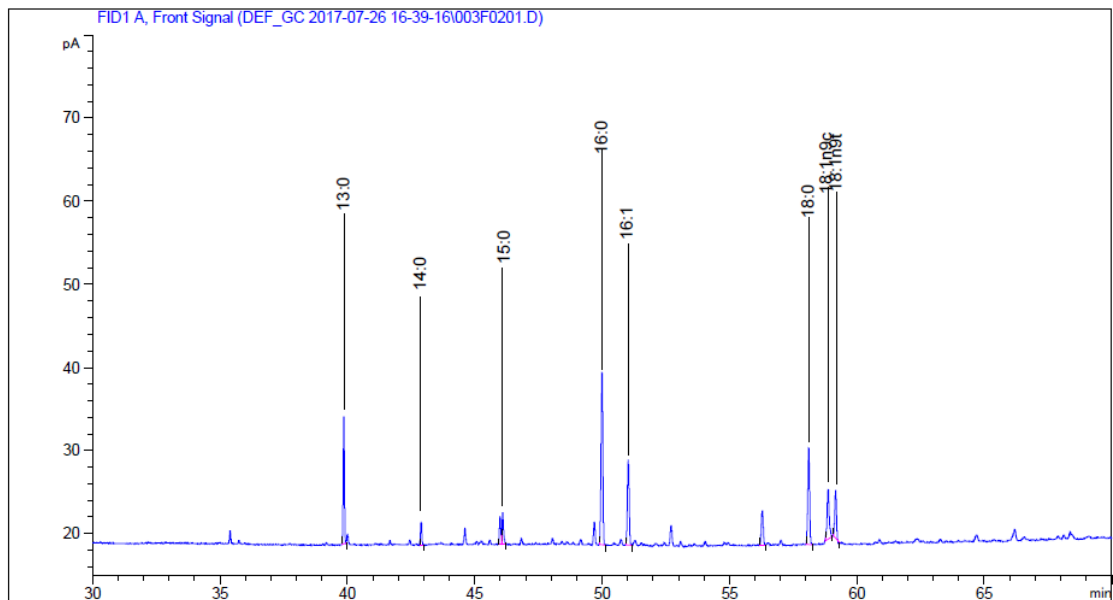
ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ใน *Nitzschia* BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

Fatty acid	Autotrophic growth	Mixotrophic growth
<u>Saturated fatty acid</u>		
13:0 (Tridecylic acid)	6.55±0.36 <sup>a</sup>	20.88±0.75 <sup>b</sup>
14:0 (Myristic acid)	7.90±0.52 <sup>b</sup>	3.67±0.05 <sup>a</sup>
15:0 (Pentadecanoic acid)	7.78±0.66 <sup>b</sup>	5.05±0.17 <sup>a</sup>
16:0 (Palmitic acid)	33.00±2.38 <sup>b</sup>	26.78±0.43 <sup>a</sup>
18:0 (Stearic acid)	17.33±0.98 <sup>a</sup>	15.03±0.22 <sup>a</sup>
<u>Monounsaturated fatty acid</u>		
16:1 (Palmitoleic acid)	20.97±1.50 <sup>b</sup>	13.36±0.11 <sup>a</sup>
18:1n9c (Oleic acid)	2.09±3.61 <sup>a</sup>	7.79±0.12 <sup>a</sup>
18:1n9t (Elaidic acid)	ND	7.45±0.28
<u>Polyunsaturated fatty acid</u>		
20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	4.38±3.82	ND
SFAs	72.56±4.90 <sup>a</sup>	71.41±0.32 <sup>a</sup>
MUFAs	23.06±2.11 <sup>a</sup>	28.59±0.17 <sup>b</sup>
PUFAs	4.38±3.82	ND

หมายเหตุ: ND คือ ไม่สามารถตรวจวัดได้



A

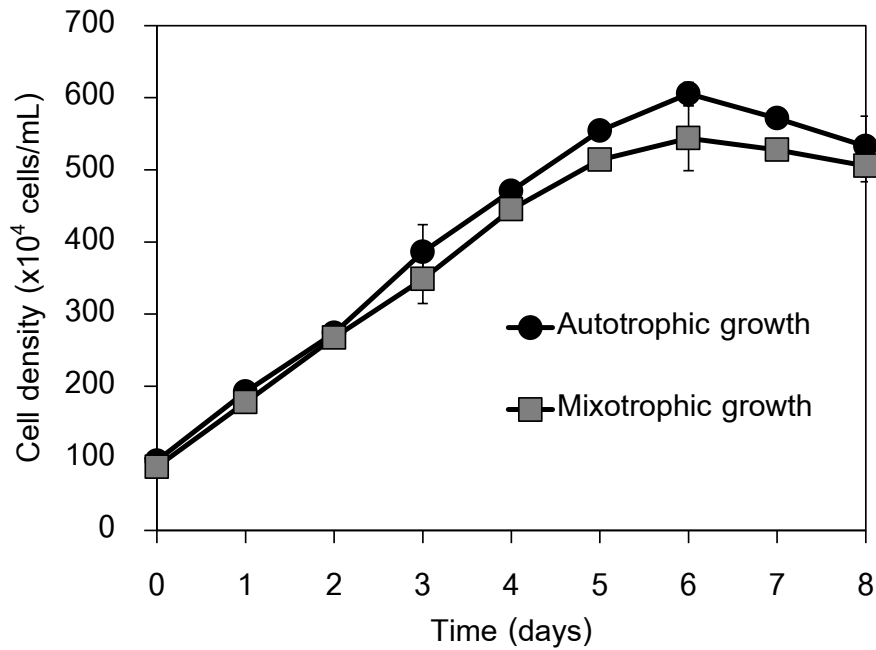


B

ภาพที่ 2.8 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิค (A) และมิคโซโทรฟิค (B)

สาหร่าย *Amphora coffeaeformis* BUUC1601 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคและมิคโซโทรฟิค

สาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ในสภาวะการเลี้ยงแบบออโตโทรฟิคและมิคโซโทรฟิคในถังเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร มีการเติบโตและผลผลิตมวลชีวภาพที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 2.9 และ ตารางที่ 2.7)



ภาพที่ 2.9 การเติบโตของสาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ในสภาวะการเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกในถังเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร

ตารางที่ 2.7 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของ *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงขยายปริมาตรเป็น 2 ลิตร ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลตามแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

สภาวะการเพาะเลี้ยง	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ( $\times 10^7$ เซลล์/ลิตร/วัน)
Autotrophic	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	605.56 $\pm$ 15.89 <sup>a</sup>	84.38 $\pm$ 3.85 <sup>a</sup>
Mixotrophic	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	543.75 $\pm$ 40.91 <sup>a</sup>	79.92 $\pm$ 9.56 <sup>a</sup>

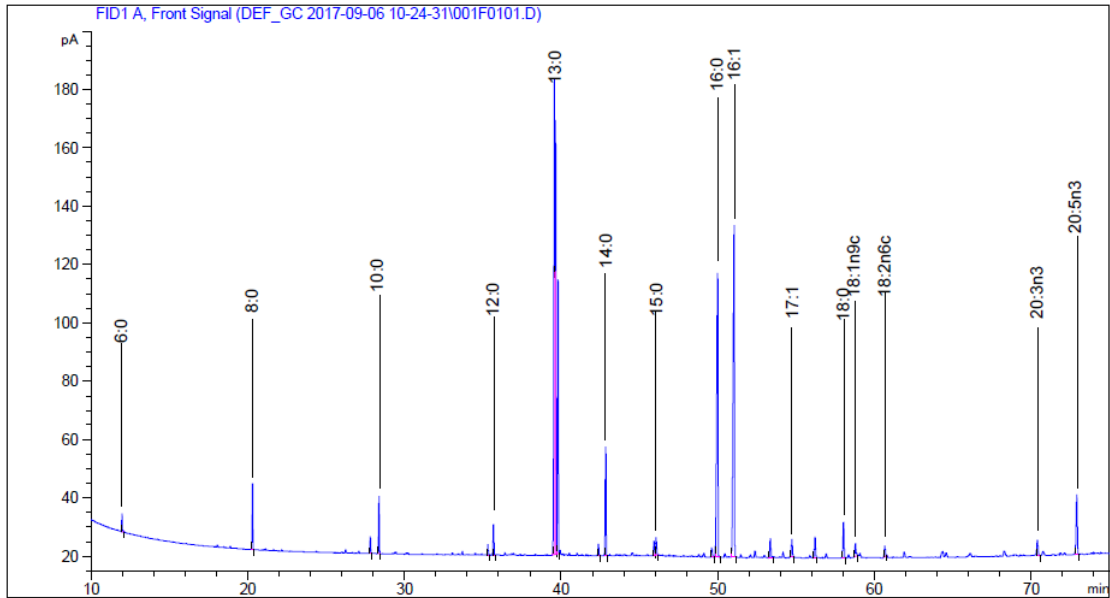
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

สาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก มีไขมัน 23.72 $\pm$ 1.52 และ 22.13 $\pm$ 1.78 เปอร์เซ็นต์ในน้ำหนักแห้ง และมีองค์ประกอบกรดไขมันดังแสดงในภาพที่ 2.10 และตารางที่ 2.8 ที่พบว่ากรดไขมันที่พบในเซลล์ทั้งที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก คือ Caproic acid, Caprylic acid, Capric acid, Lauric acid, Tridecylic acid, Myristic acid, Pentadecylic acid, Palmitic acid, Stearic acid, Palmitoleic acid และ Oleic acid ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด คือ Heptadecenoic acid, Linoleic acid, Eicosatrienoic acid และ Eicosapentaenoic acid จะพบเฉพาะในเซลล์ที่เติบโตในสภาวะออโตโทรฟิกเท่านั้น ทั้งนี้สัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสภาวะมิกโซโทรฟิกมีค่าสูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิก

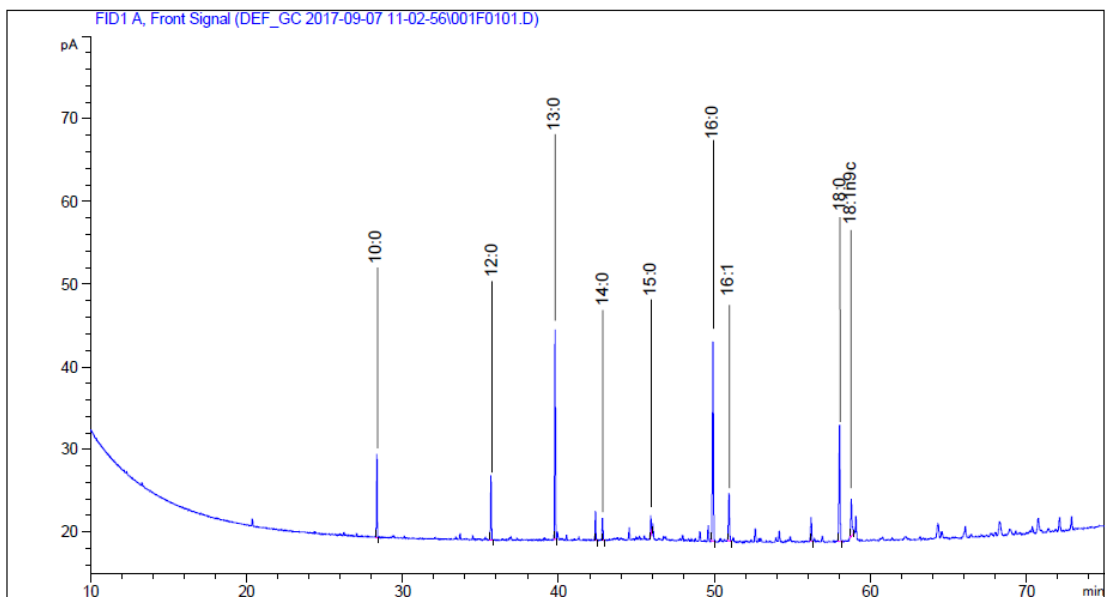


ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ใน *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

Fatty acid	Autotrophic growth	Mixotrophic growth
<u>Saturated fatty acid</u>		
6:0 (Caproic acid)	1.35±0.15 <sup>a</sup>	3.56±0.04 <sup>b</sup>
8:0 (Caprylic acid)	3.40±1.67 <sup>a</sup>	15.05±0.16 <sup>b</sup>
10:0 (Capric acid)	4.10±0.23 <sup>a</sup>	10.47±1.14 <sup>b</sup>
12:0 (Lauric acid)	2.32±0.18 <sup>a</sup>	6.23±0.07 <sup>b</sup>
13:0 (Tridecylic acid)	21.47±4.69 <sup>a</sup>	25.80±2.28 <sup>a</sup>
14:0 (Myristic acid)	7.97±0.77 <sup>b</sup>	1.96±0.55 <sup>a</sup>
15:0 (Pentadecylic acid)	1.28±0.13 <sup>a</sup>	2.78±0.20 <sup>b</sup>
16:0 (Palmitic acid)	19.52±0.99 <sup>a</sup>	17.31±4.68 <sup>a</sup>
18:0 (Stearic acid)	2.80±0.24 <sup>a</sup>	9.87±2.67 <sup>b</sup>
<u>Monounsaturated fatty acid</u>		
16:1 (Palmitoleic acid)	26.95±4.48 <sup>b</sup>	3.84±1.53 <sup>a</sup>
17:1 (Heptadecenoic acid)	1.51±0.21	ND
18:1n9c (Oleic acid)	1.10±0.17 <sup>a</sup>	3.14±0.83 <sup>b</sup>
<u>Polyunsaturated fatty acid</u>		
18:2n6c (Linoleic acid)	0.96±0.14	ND
20:3n3 (Eicosatrienoic acid)	1.28±0.19	ND
20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	5.12±0.78	ND
<b>SFAs</b>	<b>61.42</b>	<b>83.15</b>
<b>MUFAs</b>	<b>29.57</b>	<b>6.98</b>
<b>PUFAs</b>	<b>7.37</b>	<b>ND</b>



A

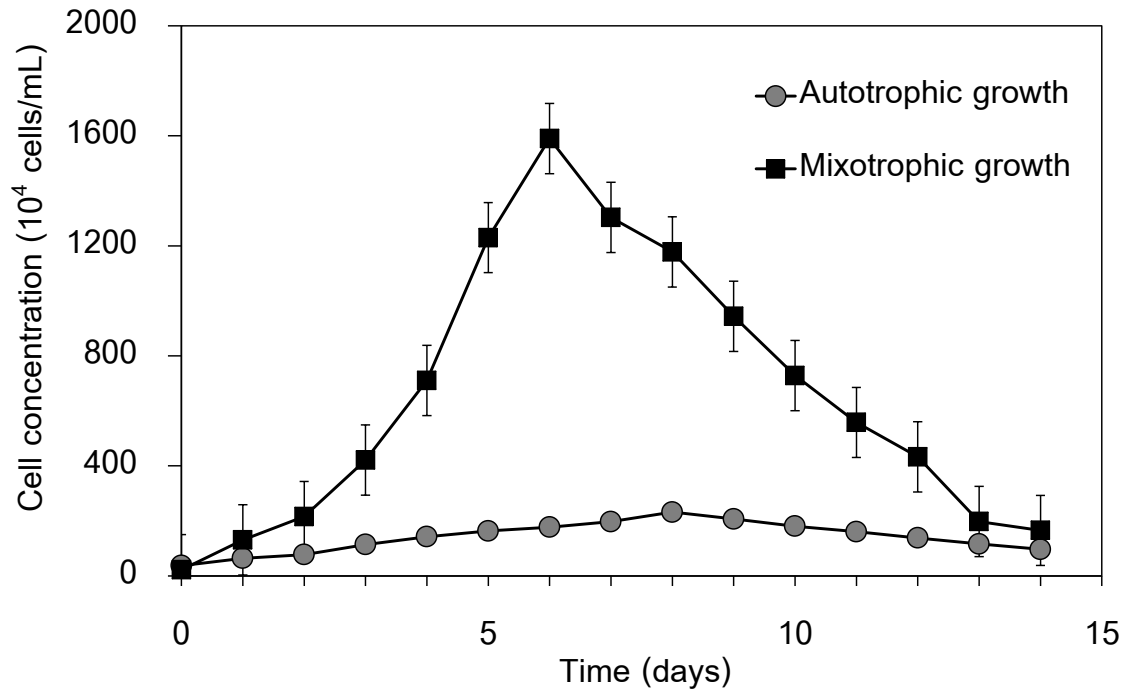


B

ภาพที่ 2.10 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย *A. coffeaeformis* BUUC1601 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (A) และมิกโซโทรฟิก (B)

#### สาหร่าย *A. subtropica* BUUC1502

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. subtropica* BUUC1502 ในสภาวะออโตโทรฟิก เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงแบบออโตโทรฟิกมีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $37.2 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ  $231.8 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 8 ของการทดลอง ส่วนสาหร่าย *Amphora* sp. สายพันธุ์ BUUC 1502 ที่เติบโตในสภาวะการเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิกมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุด  $1,590.4 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 การเติบโตของสาหร่าย *A. subtropicsa* BUUC 1502 ในสภาวะการเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกในถังเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร

ตารางที่ 2.9 พบว่าสาหร่าย *A. subtropicsa* BUUC 1502 สามารถเติบโตได้ดีที่สุดในสภาวะมิกโซโทรฟิก ซึ่งสูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) โดยมีค่ามากกว่า ถึง 12 เท่า และอัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิกเท่ากับ  $0.74 \pm 0.04$  ต่อวัน และสูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เช่นเดียวกับผลผลิตมวลชีวภาพที่ได้จากสภาวะการเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิก ที่ให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงถึง  $196.03 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมีค่ามากกว่าสภาวะออโตโทรฟิก ( $P \leq 0.05$ ) ถึง 8.06 เท่า

ตารางที่ 2.9 ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด อัตราการเติบโตจำเพาะ ผลผลิตมวลชีวภาพและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของสาหร่าย *A. subtropicsa* BUUC 1502 ที่เติบโตในสภาวะแบบออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก ในขวดแก้วปริมาตร 2 ลิตร

สภาวะการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ผลผลิตมวลชีวภาพ ( $\times 10^7$ เซลล์ต่อลิตรต่อวัน)
Autotrophic	$231.8 \pm 2.57^a$	$0.28 \pm 0.02^a$	$24.33 \pm 0.19^a$
Mixotrophic	$1590.4 \pm 3.28^b$	$0.74 \pm 0.04^b$	$196.03 \pm 0.08^b$

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

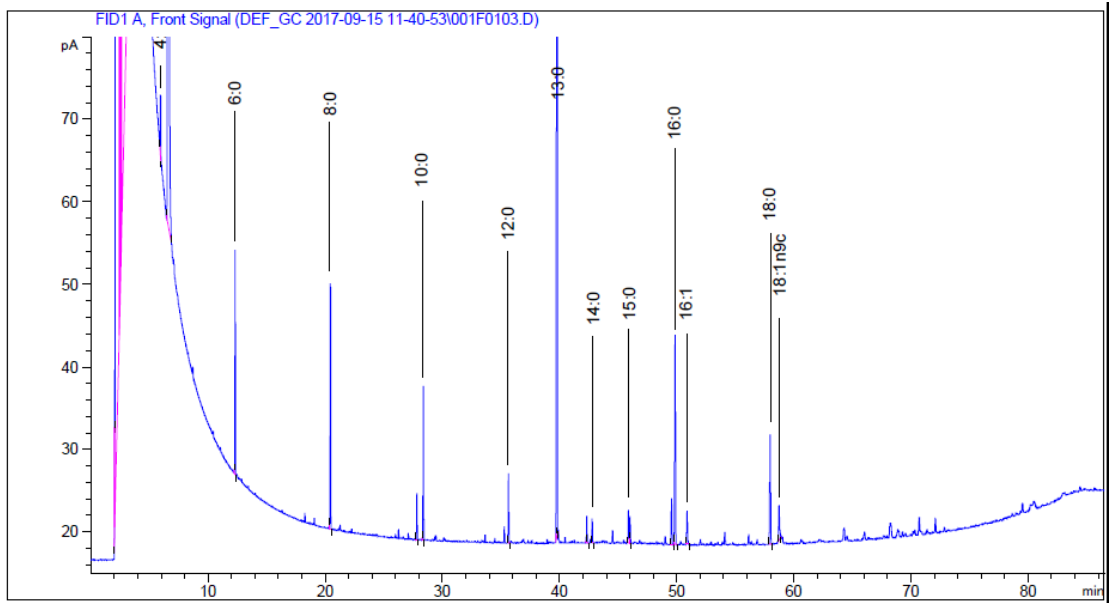
สาหร่าย *A. subtropicsa* ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิกมีไขมัน  $18.97 \pm 3.38$  เปอร์เซ็นต์ในน้ำหนักแห้งสาหร่าย ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิก ( $12.35 \pm 0.69$  เปอร์เซ็นต์ในน้ำหนักแห้งสาหร่าย) กรดไขมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในทั้ง 2 สภาวะมีชนิดกรดไขมันชนิดเด่นที่คล้ายคลึง

กัน (ตารางที่ 2.10 และ ภาพที่ 2.12) แต่ Myristoleic acid พบเฉพาะเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสภาวะออโตโทรฟิก และไม่พบกรดไขมันไม่อิ่มเชิงซ้อน แต่พบกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว

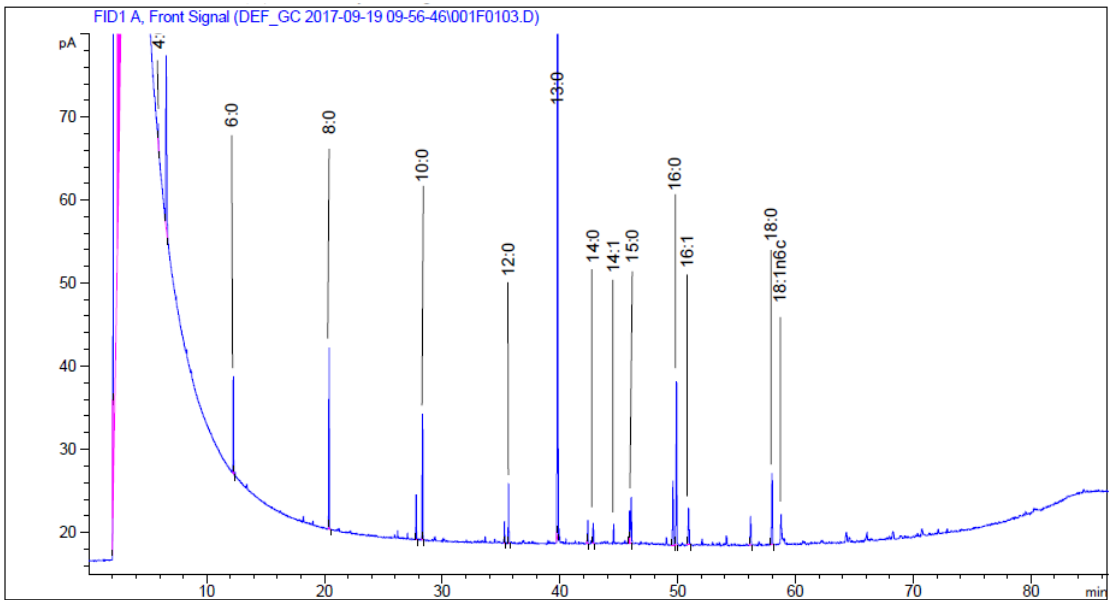
**ตารางที่ 2.10** องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของไตอะตอม *A. subtropicsa* BUUC1502 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

Fatty acid	Autotrophic growth	Mixotrophic growth
<u>Saturated fatty acid</u>		
6:0 (Caproic acid)	6.56±2.37 <sup>b</sup>	3.34±0.10 <sup>a</sup>
8:0 (Caprylic acid)	7.53±2.61 <sup>a</sup>	7.22±0.08 <sup>a</sup>
10:0 (Capric acid)	4.70±1.63 <sup>a</sup>	5.22±0.02 <sup>a</sup>
12:0 (Lauric acid)	2.17±0.76 <sup>a</sup>	2.50±0.04 <sup>a</sup>
13:0 (Tridecylic acid)	56.38±19.58 <sup>a</sup>	58.67±3.40 <sup>a</sup>
14:0 (Myristic acid)	0.82±0.28 <sup>a</sup>	0.82±0.10 <sup>a</sup>
15:0 (Pentadecylic acid)	1.36±0.52 <sup>a</sup>	2.41±0.69 <sup>a</sup>
16:0 (Palmitic acid)	9.84±3.47 <sup>a</sup>	9.72±0.19 <sup>a</sup>
18:0 (Stearic acid)	5.60±2.01 <sup>a</sup>	4.60±0.11 <sup>a</sup>
<u>Monounsaturated fatty acid</u>		
14:1 (Myristoleic acid)	1.27±0.57	ND
16:1 (Palmitoleic acid)	1.49±0.53 <sup>a</sup>	2.05±0.25 <sup>a</sup>
18:1n9c (Oleic acid)	2.29±0.82 <sup>a</sup>	3.46±0.45 <sup>a</sup>
<b>SFAs</b>	<b>94.95</b>	<b>94.49</b>
<b>MUFAs</b>	<b>5.05</b>	<b>5.51</b>
<b>PUFAs</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

หมายเหตุ: ND คือ ไม่สามารถตรวจวัดได้



A

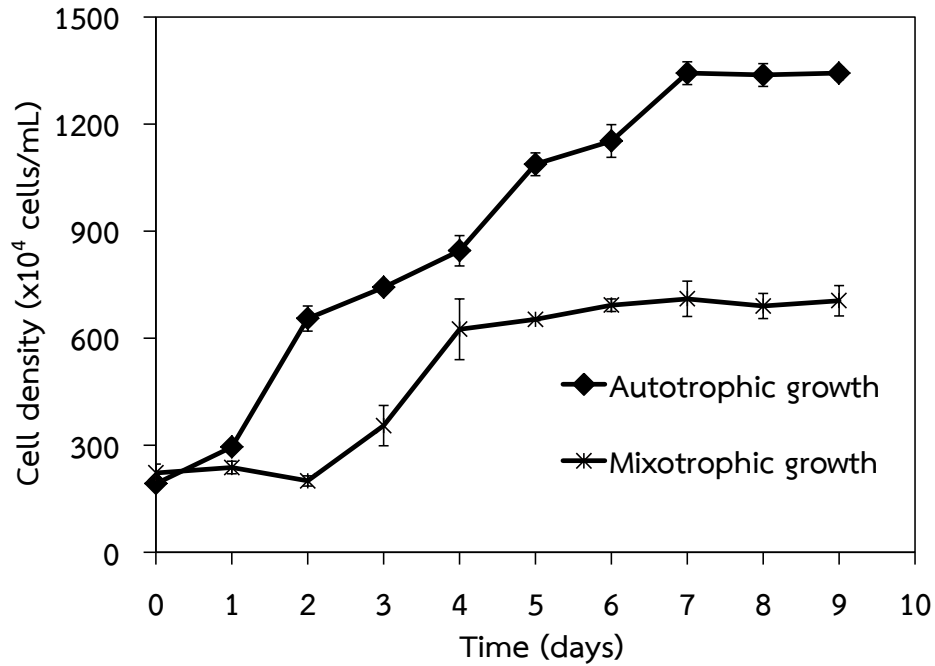


B

ภาพที่ 2.12 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย *A. subtropica* BUUC1502 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (A) และมิโกโซโทรฟิก (B)

**สาหร่าย *Chlorella protothecoides* BUUC1602**

จากการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิโกโซโทรฟิก พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกมีการเติบโตได้ดีกว่าสภาวะมิโกโซโทรฟิก (ภาพที่ 2.13) เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่าย *C. protothecoides* ในสภาวะออโตโทรฟิกและมิโกโซโทรฟิกที่นำมาเพาะเลี้ยงภายในขวด 2 ลิตร เป็นเวลา 9 วัน ดังตารางที่ 2.11 พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิโกโซโทรฟิก ( $p \leq 0.05$ ) ถึง 1.9 และ 6.9 เท่า ตามลำดับ



ภาพที่ 2.13 การเติบโตของสาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 ในสภาวะออโตโทรฟิกและมิโกโซโทรฟิก ที่เลี้ยงในขวดแก้วขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 2.11 การเปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดและผลผลิตมวลชีวภาพของ *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เพาะเลี้ยงขยายปริมาณเป็น 2 ลิตร ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลตามแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

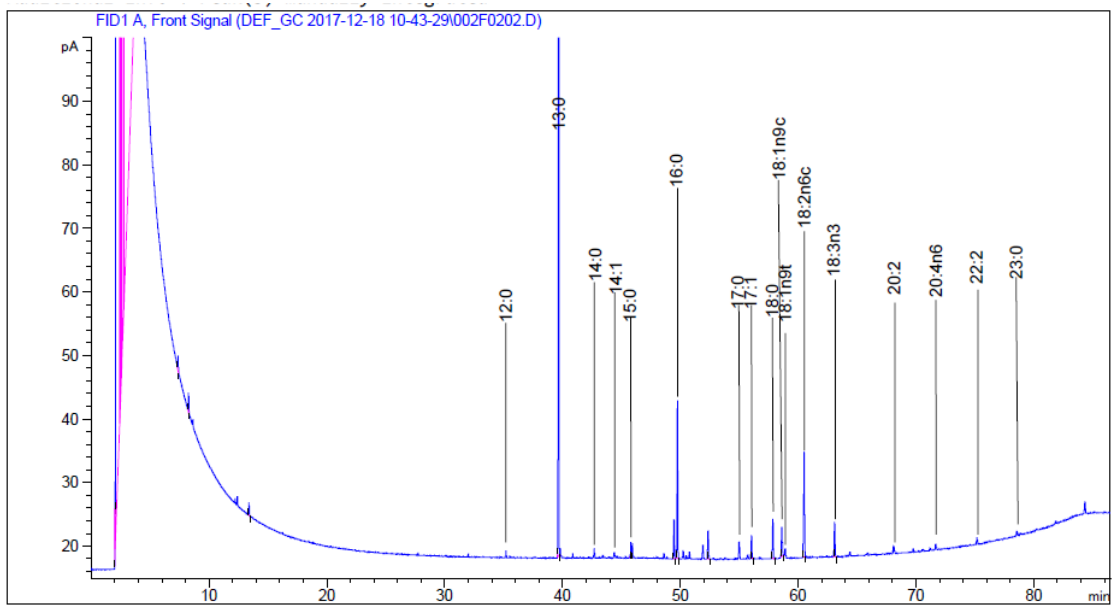
สภาวะการเพาะเลี้ยง	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (x10 <sup>4</sup> เซลล์/มิลลิลิตร)	ผลผลิตมวลชีวภาพ (x10 <sup>7</sup> เซลล์/ลิตร/วัน)
Autotrophic	0.56±0.075 <sup>a</sup>	1,342.5±31.81 <sup>a</sup>	781.80±23.86 <sup>a</sup>
Mixotrophic	0.16±0.065 <sup>b</sup>	705.42±20.0 <sup>b</sup>	112.86±22.22 <sup>b</sup>

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

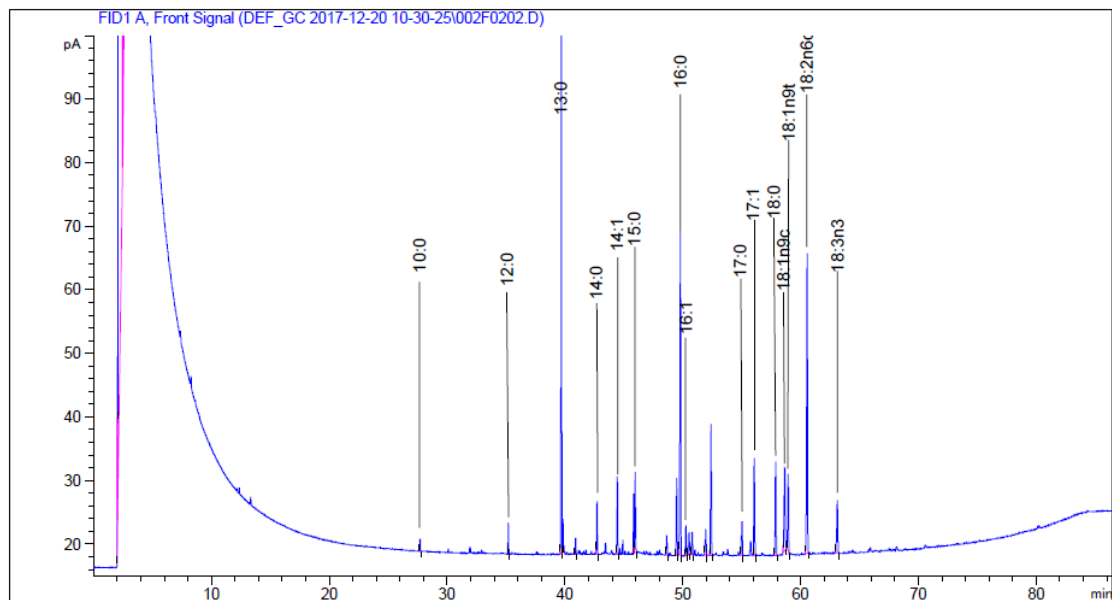
การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกส่งเสริมให้เซลล์สะสมไขมันได้ดีกว่าสภาวะมิคโซโทรฟิก โดยมีปริมาณไขมันเท่ากับ  $9.51 \pm 0.11$  และ  $4.53 \pm 1.21$  เปอร์เซ็นต์ในน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ตารางที่ 2.12 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะมิคโซโทรฟิกมีการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ดีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก แต่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายชนิดที่พบเฉพาะในสภาวะออโตโทรฟิกเท่านั้น คือ 20:2, 20:4n6 และ 22:2

**ตารางที่ 2.12** องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของโคอะตอม *C. protothecoides* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน โดยอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

Fatty acid	Autotrophic growth	Mixotrophic growth
<u>Saturated fatty acid</u>		
12:0	$0.40 \pm 0.02^a$	$1.19 \pm 0.38^b$
13:0	$55.68 \pm 0.32^b$	$19.16 \pm 14.87^a$
14:0	$0.72 \pm 0.03^a$	$2.92 \pm 0.56^b$
15:0	$0.59 \pm 0.12^a$	$4.81 \pm 0.91^b$
16:0	$14.14 \pm 0.10^b$	$5.37 \pm 1.06^a$
17:0	$1.52 \pm 0.10^a$	$2.54 \pm 0.49^b$
18:0	$3.83 \pm 0.03^a$	$7.24 \pm 1.39^b$
23:0	$0.53 \pm 0.10$	ND
<u>Monounsaturated fatty acid</u>		
14:1	$0.62 \pm 0.05^a$	$4.81 \pm 0.93^b$
16:1	ND	$2.13 \pm 0.40$
17:1	$2.17 \pm 0.01^a$	$7.24 \pm 1.43^b$
18:1n9c	$2.92 \pm 0.04^a$	$7.57 \pm 1.42^b$
18:1n9t	$0.71 \pm 0.16^a$	$5.60 \pm 1.12^b$
<u>Polyunsaturated fatty acid</u>		
18:2n6c	$10.35 \pm 0.05^a$	$24.65 \pm 4.79^b$
18:3n3	$3.36 \pm 0.04^a$	$4.76 \pm 0.74^a$
20:2	$1.01 \pm 0.10$	ND
20:4n6	$0.70 \pm 0.09$	ND
22:2	$0.76 \pm 0.05$	ND
<b>SFAs</b>	<b>77.41</b>	<b>43.23</b>
<b>MUFAs</b>	<b>6.42</b>	<b>25.23</b>
<b>PUFAs</b>	<b>16.17</b>	<b>4.76</b>



A



B

ภาพที่ 2.14 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของ *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก (A) และมิโซโทรฟิก (B)

### 2.2.3 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง

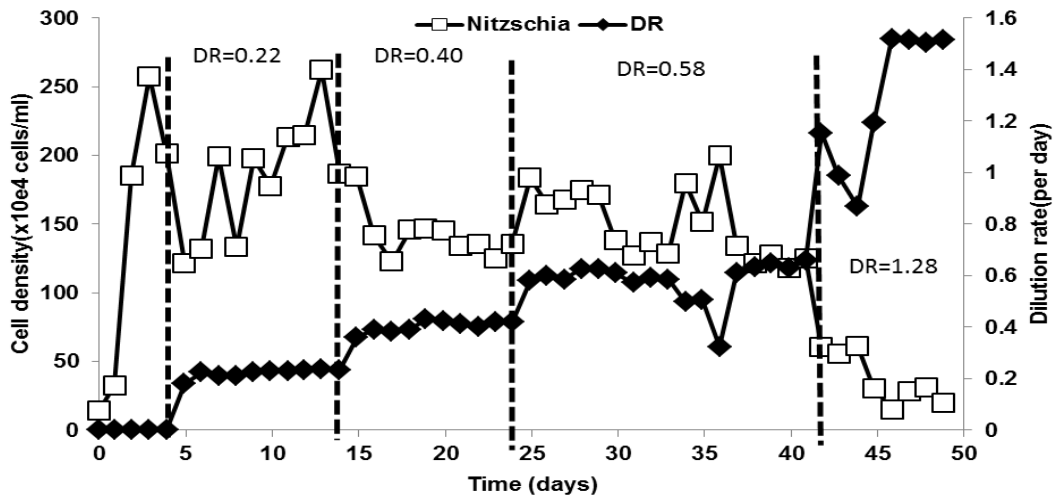
#### สาหร่าย *Nitzschia* sp. BUUC1501

การเติบโตของสาหร่าย *Nitzschia* sp. BUUC1501 (ภาพที่ 2.15) ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 41 วัน โดยได้เลี้ยงแบบแบทช์ก่อนเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์  $201.39 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นในวันที่ 5-14 ของการเลี้ยง ได้ปรับเป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยมีการเติมอาหารเข้าสู่ขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอัตราการเจือจางเฉลี่ย  $0.22 \pm 0.02$  ต่อวัน พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ  $183.92 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

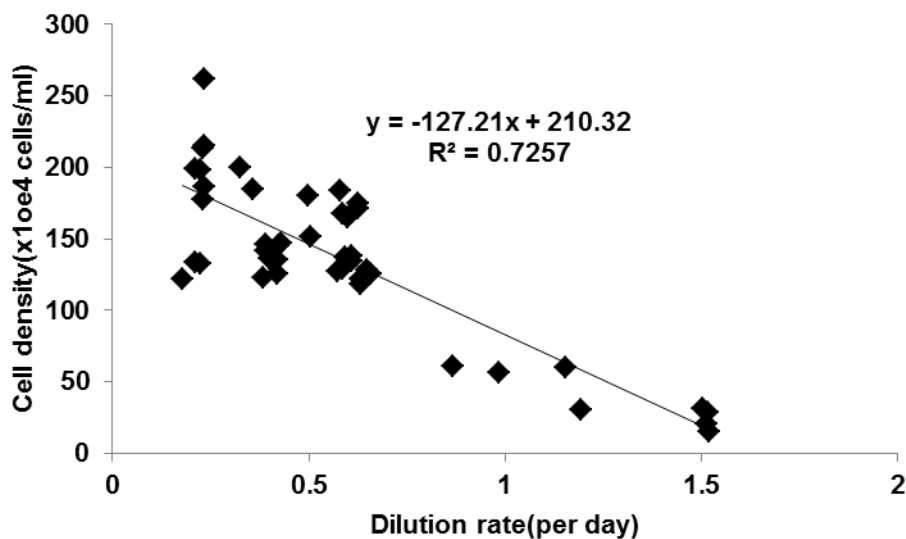


เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นเป็น  $0.40 \pm 0.02$  ต่อวัน ในระหว่างวันที่ 15-24 ของการเลี้ยง พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ  $141.75 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นในวันที่ 25-41 ของการเลี้ยง การเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นอีกเป็น  $0.58 \pm 0.08$  ต่อวัน สาหร่ายมีความหนาแน่น  $150.00 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ณ อัตราการเจือจางขึ้นเป็น  $1.28 \pm 0.27$  ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ  $37.73 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางแสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นเซลล์มีแนวโน้มลดลงดังแสดงในภาพที่ 2.16 เมื่อคำนวณผลผลิตเซลล์ที่อัตราการเจือจาง 0.22, 0.40, 0.58 และ 1.28 ต่อวัน มีผลผลิตเท่ากับ 40.74, 57.14, 87.15 และ  $48.35 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ โดยที่อัตราการเจือจาง 0.58 ต่อวัน สามารถให้ผลผลิตมวลชีวภาพสาหร่ายได้สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจือจาง 0.58 ต่อวัน เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. BUUC1501 แบบต่อเนื่อง การเติบโตของสาหร่าย *Nitzschia* sp. BUUC1501 (ภาพที่ 2.16)



ภาพที่ 2.15 การเติบโตของ *Nitzschia* sp. BUUC1501 ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดขนาด 2 ลิตร



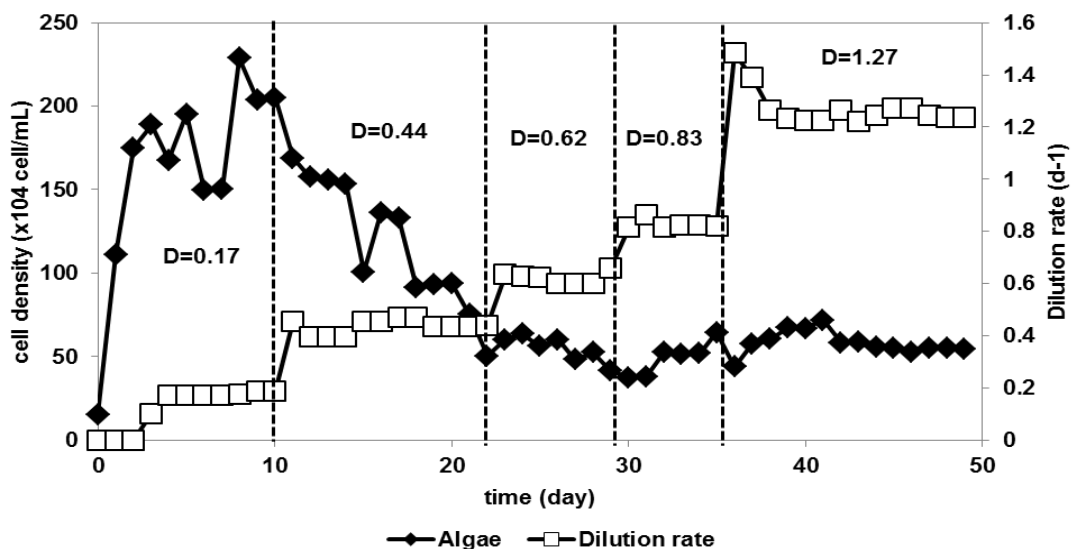
ภาพที่ 2.16 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและความหนาแน่นเซลล์สำหรับ *Nitzschia* sp. BUUC1501

**สำหรับ *Amphora coffeaeformis* BUUC1601**

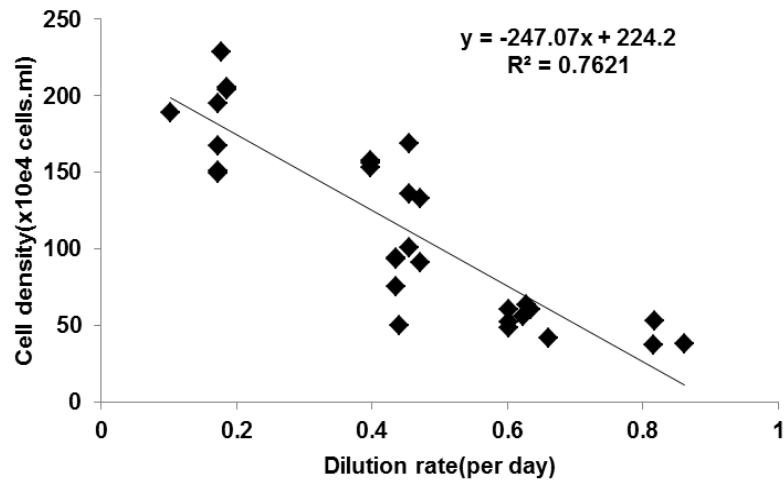
เมื่อเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร โดยเลี้ยงภายใต้สภาวะอโตโทรฟิก ที่มีการให้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลลาร์ด F/2 ตลอดเวลาด้วยเครื่องปั๊มแบบรีดสาย โดยทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน

เริ่มต้นด้วยระบบการเลี้ยงแบบแบทช์ตั้งแต่วันที่ 0-2 ของการเลี้ยง เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตสูงสุดหรือเข้าสู่ระยะเติบโตแบบทวีคูณแล้วจึงทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (ภาพที่ 2.17) โดยวันที่ 3-10 ของการเลี้ยง จะปรับอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.17 ต่อวัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $186.21 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์  $31.19 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน และในวันที่ 11-22 ของการเลี้ยงได้เพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.44 ต่อวัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์ลดลง โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $117.44 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์  $51.33 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ในวันที่ 23-29 ของการเลี้ยงได้ปรับอัตราการเจือจางเป็น 0.62 ต่อวัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์ลดลงมาก โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $54.57 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์  $33.90 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน และเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นเป็น 0.83 ต่อวัน ในวันที่ 30-35 ของการเลี้ยง พบว่าความหนาแน่นเซลล์ใกล้เคียงกัน โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $49.17 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์  $40.69 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน

หลังจากนั้นในวันที่ 36-50 ได้เพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1.27 ต่อวัน พบว่าความหนาแน่นเซลล์ยังคงใกล้เคียงกัน โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $57.39 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ผลผลิตเซลล์  $73.00 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ดังในภาพที่ 2.18 และเมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์และอัตราการเจือจางพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นความหนาแน่นเซลล์มีแนวโน้มลดลง ดังภาพที่ 2.18



ภาพที่ 2.17 การเติบโตของ *A. coffeaeformis* BUUC1601 ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดขนาด 2 ลิตร

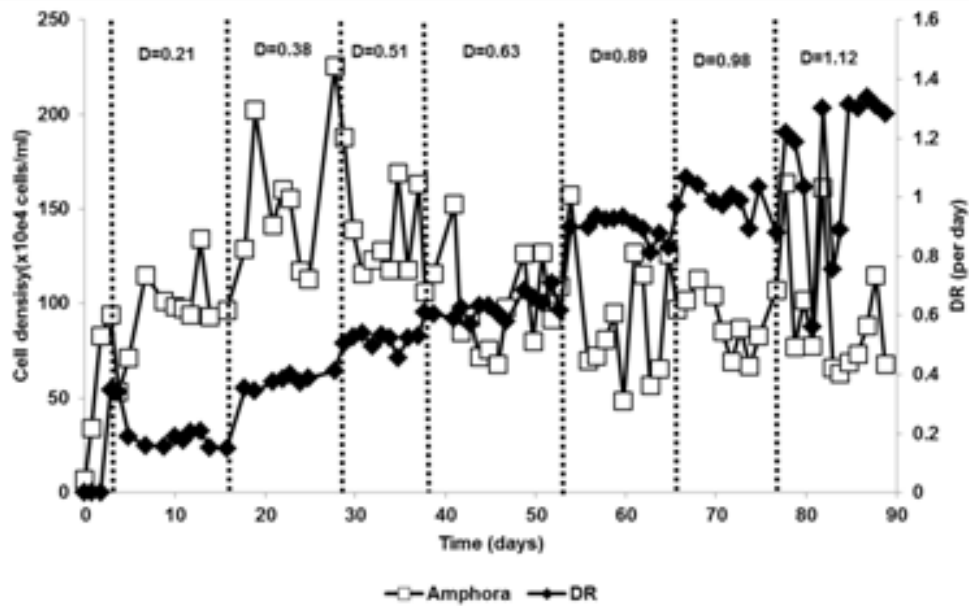


ภาพที่ 2.18 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางและความหนาแน่นเซลล์สำหรับ *A. coffeaeformis* BUUC1601

#### สำหรับ *A. subtropica* BUUC1502

ก่อนเริ่มการเลี้ยงแบบต่อเนื่องสำหรับมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $82.95 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจาง 0.21 ต่อวัน ได้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $95.23 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการปรับอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 0.38, 0.51, 0.63, 0.89, 0.98 และ 1.12 ต่อวัน พบว่าแนวโน้มความหนาแน่นเซลล์ไดอะตอมแสดงได้ดังภาพที่ 1.19 ซึ่งการเพิ่มอัตราการเจือจางส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยมีค่าใกล้เคียงกัน ( $P \geq 0.05$ ) ในขณะที่ปริมาณผลผลิตเซลล์ที่ได้กลับพบว่าหากเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอัตราการเจือจางต่ำ (0.21 ต่อวัน) พบว่าผลผลิตเซลล์ต่ำที่สุด ( $P \leq 0.05$ )

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอัตราการเจือจางที่ 0.38-0.98 ต่อวัน พบว่าผลผลิตเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน ( $P \geq 0.05$ ) และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอัตราการเจือจาง 1.12 ต่อวัน มีปริมาณผลผลิตเซลล์เท่ากับ  $105.20 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอัตราการเจือจางอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมกับการเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 แบบต่อเนื่อง คือ 1.12 ต่อวัน รวมถึงสามารถเลี้ยงได้เป็นระยะเวลาสั้น ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ต่อเนื่องได้นานถึง 90 วัน

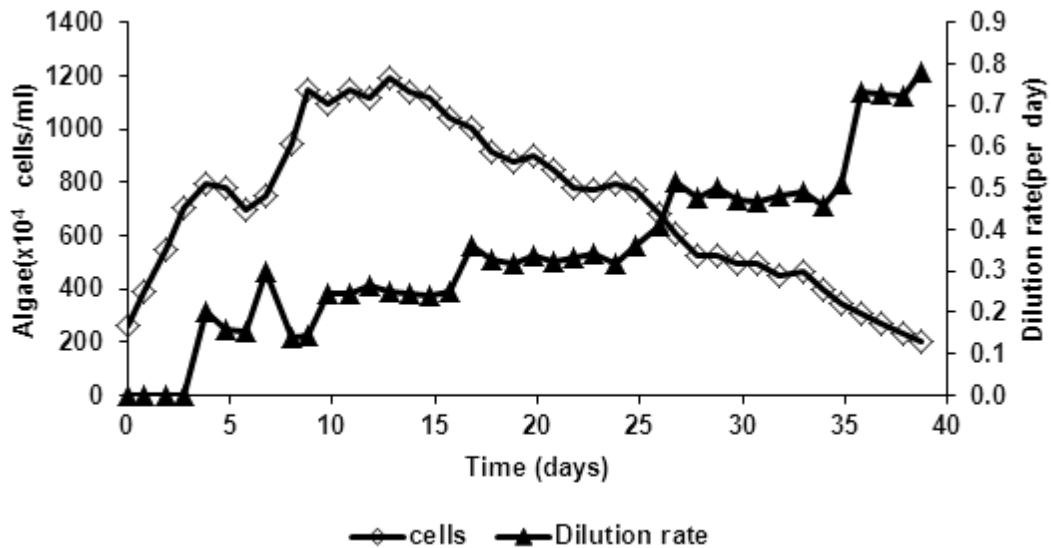


ภาพที่ 2.19 การเติบโตของไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในขวดปริมาตร 2 ลิตรภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยปรับอัตราการเจือจางระหว่าง 0.21-1.12 ต่อวัน

#### สาหร่าย *C. protothecoides*

เมื่อการเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องขวดแก้วปริมาตรขนาด 2 ลิตร โดยมีการให้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกิลลาร์ด F/2 ตลอดเวลาด้วยเครื่องปั๊มแบบรีดสาย ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 39 วัน เริ่มด้วยระบบการเลี้ยงแบบแบทช์ตั้งแต่วันที่ 0-2 ของการเลี้ยง เมื่อสาหร่ายมีการเติบโตสูงสุดหรือเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบทวีคูณ จึงเริ่มทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในวันที่ 3 ของการเลี้ยง โดยในวันที่ 3-16 ของการเลี้ยง ทำการเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจางเฉลี่ย  $0.20 \pm 0.06$  ต่อวัน มีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น เท่ากับ  $399.54 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์เท่ากับ  $198.34 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน

ในวันที่ 17-25 ของการเลี้ยงได้เพิ่มอัตราการเจือจางเป็น  $0.33 \pm 0.04$  ต่อวัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์ลดลง โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $851.42 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์  $285.19 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ในวันที่ 26-35 ของการเลี้ยง ได้ปรับอัตราการเจือจางเป็น  $0.48 \pm 0.05$  ต่อวัน พบว่าสาหร่ายมีความหนาแน่นเซลล์ลดลง โดยมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $498.08 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์  $238.00 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน และเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางให้สูงขึ้นเป็น  $0.73 \pm 0.06$  ต่อวัน ในวันที่ 36-39 ของการเลี้ยง พบว่าความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $252.78 \pm 9.27 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตเซลล์  $183.81 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ดังภาพที่ 2.20

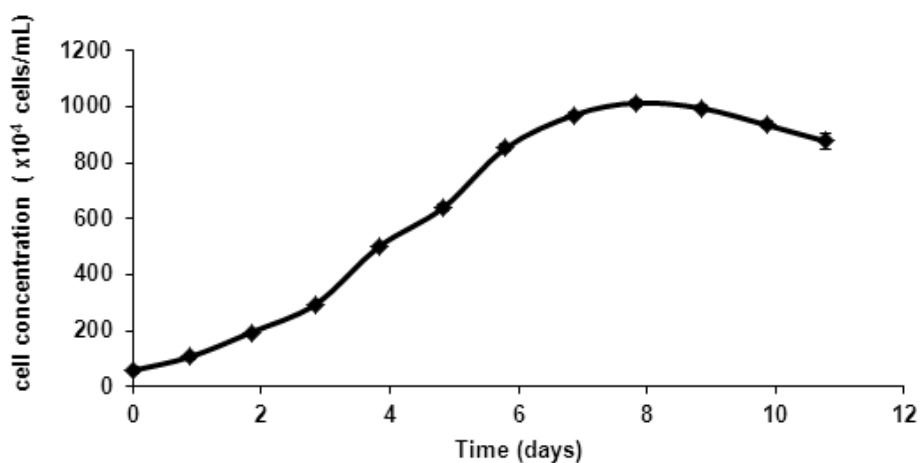


ภาพที่ 2.20 การเติบโตของสาหร่าย *C. protothecoides* ที่เพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่อง ปริมาตรขนาด 2 ลิตร

#### 2.2.4 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตซ์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 50 ลิตร ภายใต้สภาวะออตโทโรฟิก

##### สาหร่าย *C. protothecoides*

เมื่อทำการขยายปริมาตรการเลี้ยงสาหร่าย *C. protothecoides* ในสภาวะออตโทโรฟิก ถึงปฏิกรณ์ปริมาตรขนาด 50 ลิตร นอกห้องปฏิบัติการที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 11 วัน ภาพที่ 2.21 พบว่าสาหร่าย *C. protothecoides* มีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ  $58.61 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการเพิ่มจำนวนขึ้นจนมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ  $1013.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะในวันที่ 0 ถึง 1 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.60 ต่อวัน

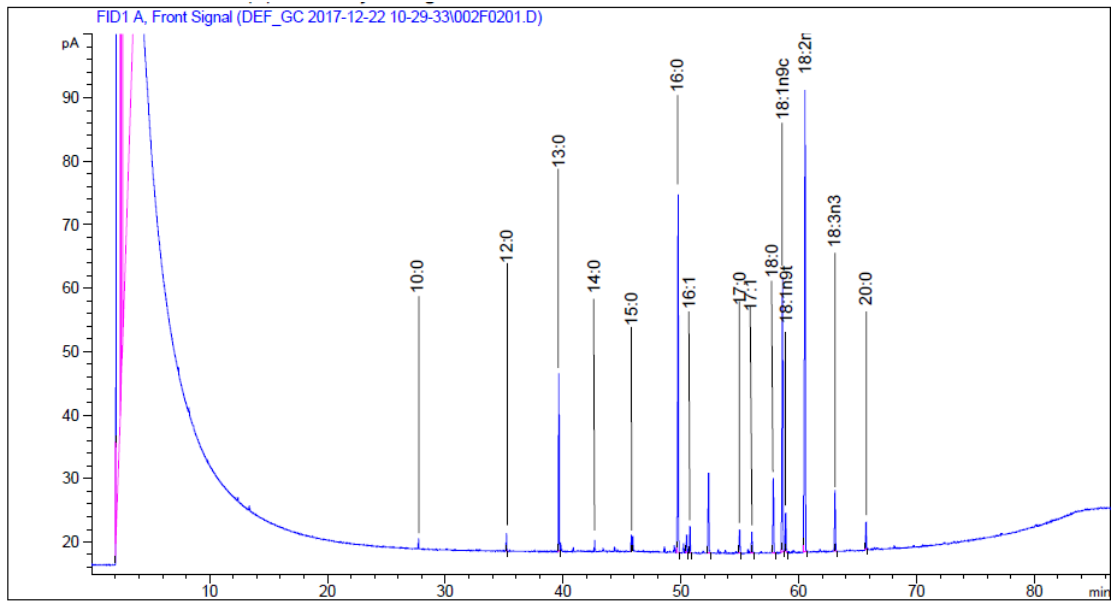


ภาพที่ 2.21 การเติบโตของสาหร่าย *C. protothecoides* ที่เพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตซ์ในถังปฏิกรณ์ปริมาตร 50 ลิตร

*C. protothecoides* มีปริมาณไขมัน 9.39 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และภาพที่ 2.22 แสดงให้เห็นองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย *C. protothecoides* ที่พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในถัง 50 ลิตร ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันอิ่มตัว โดยพบว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด 18:1n9 และ 18:2n6 เป็นชนิดเด่นที่สะสมในปริมาณสูง (ตารางที่ 2.13)

ตารางที่ 2.13 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของ *C. protothecoides* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 50 ลิตร

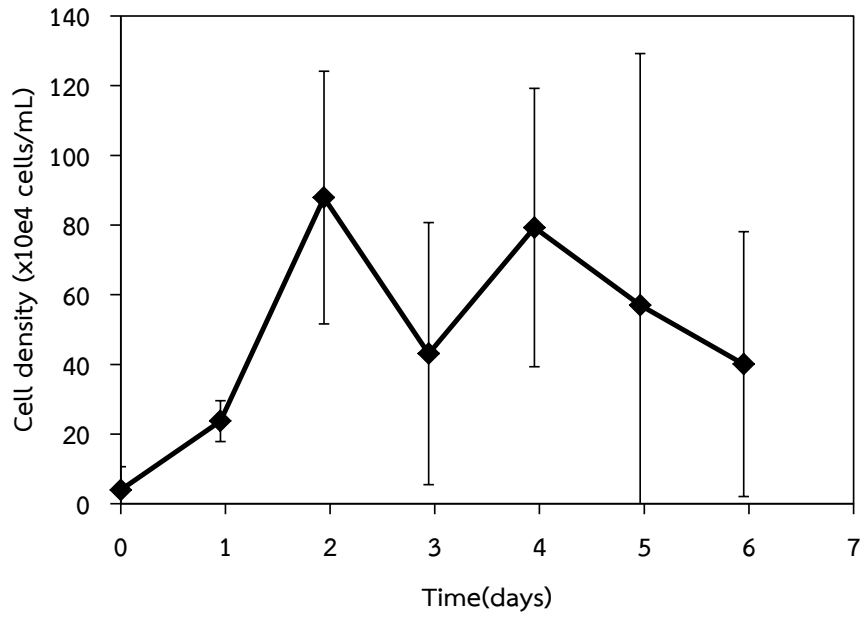
Fatty acid	%in total fatty acids
<u>Saturated fatty acid</u>	
10:0	0.46±0.03
12:0	0.76± 0.02
13:0	9.08±7.28
14:0	0.55±0.05
15:0	0.63±0.10
16:0	22.12±1.80
17:0	1.40±0.06
18:0	5.31±0.59
20:0	1.68±0.16
<u>Monounsaturated fatty acid</u>	
16:1	1.57±0.10
17:1	0.91±0.38
18:1n9c	18.35±1.85
18:1n9t	2.36±0.20
<u>Polyunsaturated fatty acid</u>	
18:2n6c	31.34±3.08
18:3n3	3.88±0.35
SFAs	<b>41.98</b>
MUFAs	<b>23.21</b>
PUFAs	<b>35.21</b>



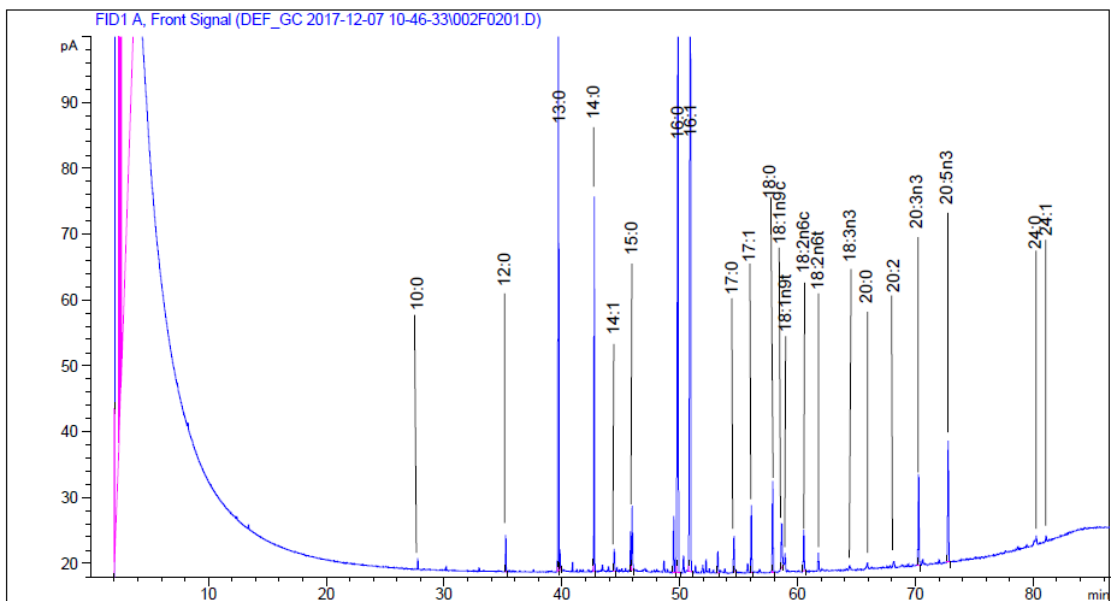
ภาพที่ 2.22 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของ *C. protothecoides* BUUC1602 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก

#### สำหรับ *A. coffeaeformis*

จากการขยายปริมาตรการเลี้ยง *A. coffeaeformis* ในถังปฏิกรณ์ขนาด 50 ลิตร พบว่าภายใน 3 วัน จะมีเซลล์สูงสุด  $87.88 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.59 ต่อวัน (ภาพที่ 2.23) และไดอะตอมมีไขมันสะสมถึง 16.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันพบว่าไดอะตอมมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนหลายชนิด คือ 18:2n6c, 18:2n6t, 18:3n3, 20:2, 20:5n3 และ 22:2 อย่างไรก็ตาม ไดอะตอมชนิดนี้มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว (ภาพที่ 2.24 และตารางที่ 2.14)



ภาพที่ 2.23 การเติบโตของสาหร่าย *A. coffeaeformis* ที่เพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตชีในถังปฏิกรณ์ปริมาตร 50 ลิตร



ภาพที่ 2.24 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบกรดไขมันของ *A. coffeaeformis* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก



ตารางที่ 2.14 องค์ประกอบกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันในกรดไขมันทั้งหมด) ของโตอะตอม *A. coffeaeformis* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 50 ลิตร

Fatty acid	%in total fatty acids
<u>Saturated fatty acid</u>	
10:0	0.89±0.49
12:0	0.97± 0.14
13:0	19.62±0.89
14:0	7.94±0.10
15:0	2.08±0.26
16:0	23.47±0.08
17:0	1.00±0.06
18:0	2.94±0.11
20:0	0.72±0.36
24:0	0.62±0.09
<u>Monounsaturated fatty acid</u>	
14:1	0.71±0.05
16:1	25.63±0.19
17:1	2.30±0.21
18:1n9c	1.61±0.08
18:1n9t	0.39±0.03
24:1	0.21±0.01
<u>Polyunsaturated fatty acid</u>	
18:2n6c	1.31±0.03
18:2n6t	0.59±0.04
18:3n3	0.36±0.15
20:2	0.50±0.14
20:5n3	2.88±0.03
22:2	3.81±0.16
SFAs	<b>60.27</b>
MUFAs	<b>30.84</b>
PUFAs	<b>9.45</b>

### 3. อภิปรายผล

#### 3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ (Batch culture) ในสภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก

จากการทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. BUUC1501, *Amphora subtropica* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก พบว่าสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *C. protothecoides* BUUC1602 และ *A. coffereformis* มีการเติบโตได้ดีเมื่อเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก ทั้งนี้เนื่องจากโดยปกติแล้วสาหร่ายจะมีการเติบโตโดยสร้างอาหารเองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและตรึงสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนผ่านกระบวนการ Calvin-Benson cycle ซึ่งเป็นสภาวะการเติบโตแบบออโตโทรฟิก (autotrophic growth) นอกจากนี้ยังมีเซลล์เติบโตแบบภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมด้วย ซึ่งเป็นการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิก หรือเรียกว่ามิกโซโทรฟิก (mixotrophic growth) (Chen and Zhang, 1997) จึงพบว่าสาหร่ายดังกล่าวเติบโตได้ดี โดยในงานวิจัยนี้มีการเติมกลูโคสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้แก่สาหร่าย อาจกล่าวได้ว่าการที่สาหร่ายเติบโตได้ดีในสภาวะมิกโซโทรฟิกเพราะมีการสร้างอาหารเองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและยังสามารถดูดซึมกลูโคสในอาหารเลี้ยงสาหร่ายไปใช้ในการเติบโตร่วมด้วย สาหร่าย *C. protothecoides* BUUC1602 เติบโตได้ดีมากเมื่อเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก ทั้งนี้เพราะในสภาวะมิกโซโทรฟิกจะให้สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่จากอาหารสูตร NB โดยมี (1) โปรตีน (protien) ที่มาจาก Peptone และสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาชีวเคมีที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม (2) กรดอะมิโน (amino acid) ที่ได้จาก Peptone และสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์แบบทวีคูณ และเร่งการขยายของขนาดเซลล์ (3) สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ เช่น ATP (adenosine triphosphate) ที่ได้จากการสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับสาหร่าย (Liang et al., 2009)

*Nitzschia* sp. BUUC1501, *A. subtropica* BUUC1502, *C. protothecoides* BUUC1602 และ *A. coffereformis* สามารถเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic growth) โดยการดูดซึม (assimilation) สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนในที่มีด โดยเซลล์นำสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ ทั้งนี้พบลักษณะการเจริญเติบโตแบบนี้ในสาหร่ายเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น และไดอะตอมที่องน้ำและสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* เป็นหนึ่งในชนิดที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (Lowrey et al., 2015) แต่สาหร่ายทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้มีการเติบโตได้ดีถ้าเมื่อเพาะเลี้ยงไดอะตอมในสภาวะแบบเฮเทอโรโทรฟิก สาเหตุอาจเป็นเพราะเซลล์สามารถเติบโตได้จากการดูดซึมสารอาหารไปใช้เท่านั้น ไม่สามารถสร้างอาหารได้เองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง อุปสรรคที่สำคัญคือราคาของแหล่งของอินทรีย์คาร์บอนสูง แต่ปัจจุบันจะเห็นว่า มีแหล่งอินทรีย์คาร์บอนราคาถูกหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ เช่น วัสดุชีวภาพ ประเภทแป้งราคาถูกชนิดต่างๆ น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรต่างๆ ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลและวัสดุทางการเกษตร เช่น กากมันสำปะหลัง เป็นต้น (Lassing, 2010)

### 3.2 การขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบคทีเรียในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก

เนื่องจากสาหร่ายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองเติบโตได้ดีในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก แต่ไม่สามารถเติบโตได้ดีในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิก ดังนั้นจึงขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ลิตร โดยทดลองเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก พบว่าไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUU1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคมีอัตราการเติบโตสูงกว่าสภาวะมิกโซโทรฟิก รวมถึงผลผลิตมวลชีวภาพไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงแบบสภาวะออโตโทรฟิคมีค่าสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก ส่วนไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 และ *A. coffereformis* ที่เลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกกลับเติบโตได้ใกล้เคียงกัน แต่ *C. protothecoides* BUUC1602 กลับเติบโตได้ดีมากเมื่อเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิกเช่นเดียวกับหลายงานวิจัยที่พบว่าไดอะตอม *Synedra acus* และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* เติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก (Shishlyannikov et al., 2014; Li et al., 2014) ทั้งนี้เพราะการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิกในงานวิจัยนี้ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 ก./ล. คิดเป็น 4 ก.คาร์บอน/ล. ซึ่งกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เซลล์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรง จึงส่งเสริมให้เซลล์เติบโตได้ดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ แต่หากมีความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจมีผลยับยั้งการเติบโตของไดอะตอมได้ (Morales-Sánchez et al., 2013) ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอนาคต

สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิคมักมีการสะสมไขมันที่แตกต่างกัน โดยไดอะตอมสามารถสะสมไขมันได้สูงกว่า *C. protothecoides* BUUC1602 ซึ่ง *Nitzschia* sp. BUU1501 ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิกสะสมไขมันได้สูงที่สุด 26.73 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก เซลล์ได้รับคาร์บอนทั้งสารอินทรีย์ (กลูโคส) และสารอนินทรีย์ (ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์) ในขณะที่สภาวะออโตโทรฟิกเซลล์มีแหล่งคาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพียงอย่างเดียว จึงส่งผลให้เซลล์ที่เติบโตในสภาวะมิกโซโทรฟิคนำคาร์บอนไปสร้างมวลชีวภาพและสะสมในรูปไขมันได้รวดเร็ว (Bhatnagar et al., 2010)

สาหร่ายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFAs) สูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เช่นเดียวกับไดอะตอม *Chaetoceros gracilis* ที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเติบโตจนถึงระยะตาย (Pratiwi et al., 2009)

ไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 มี palmitic acid (16:0) สูงกว่ากรดไขมันอิ่มตัวชนิดอื่น ทั้งนี้เป็นลักษณะเฉพาะของสาหร่ายในกลุ่ม Bacillariophyceae หรือไดอะตอมที่มักพบกรดไขมันชนิดนี้สะสมในเซลล์สูงที่สุด เพื่อทำหน้าที่เกี่ยวกับการสะสมพลังงานของไดอะตอม โดยกรดไขมันชนิดนี้จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในระยะที่มีปริมาณสารอาหารลดลง (Mansour et al., 2003) การเพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิคมักมีชนิดและปริมาณรวมของกรดไขมันเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids, MUFAs) สูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง oleic acid (18:1n9c) ที่มีความสำคัญในการเริ่มสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน หรือ PUFAs ด้วยกระบวนการ desaturation และ elongation และมักพบว่าหากปริมาณ oleic acid ลดลงก็จะพบ PUFAs เพิ่มขึ้น (Pratiwi et al., 2009) แต่ในงานวิจัยนี้พบว่า EPA (20:5n3) จะมีเฉพาะในเซลล์ *Nitzschia* BUUC1501 และ *A. coffereformis* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากไดอะตอมเติบโตได้ดีในสภาวะนี้ ดังนั้นไดอะตอมจะผลิตออกซิเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก ซึ่งออกซิเจนมีความจำเป็นในกระบวนการ desaturation และ elongation เพื่อ

สร้างกรดไขมันในกลุ่ม **W-3** ซึ่งรวมถึง EPA ด้วย (Wen and Chen, 2003) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มบางชนิดจะพบเฉพาะในเซลล์สาหร่ายทุกชนิดที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกเท่านั้น และสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้พบว่ามีการไขมัน palmitic acid (16:0) และ oleic acid (18:1) ซึ่งเป็นชนิดที่เป็นตัวบ่งชี้คุณสมบัติในการใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลได้ (Rai *et al.*, 2013; Juntala *et al.*, 2015))

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าจึงเห็นได้ว่าแต่ละสภาวะการเติบโตที่กล่าวในข้างต้นมีแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ส่งผลให้มีกระบวนการเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกันด้วย (Lowrey *et al.*, 2015) หลายงานวิจัยจึงพบว่าการสร้างสารประกอบทางชีวเคมีของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจะมีปริมาณและชนิดต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญเติบโตหรือสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง

### 3.3 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่อง

การเติบโตของ *A. subtropica* BUUC1502, *C. protothecoides*, *Nitzschia* BUUC1501 และ *A. coffereformis* ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าการปรับเพิ่มอัตราการเจือจางส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยมีค่าลดลง ในขณะที่ปริมาณผลผลิตเซลล์ที่ได้กลับเพิ่มสูงขึ้น และการเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อให้กับสาหร่ายอย่างต่อเนื่องทำให้สาหร่ายเติบโตได้ตลอดเวลาและให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงแบบแบทช์ (James and Al-Khars, 1990) นอกจากนี้ให้ผลผลิตที่สูงแล้วการเลี้ยงแบบต่อเนื่องยังสามารถสร้างเป็นระบบอัตโนมัติให้ลดแรงงานลงได้ และยังให้สาหร่ายคงที่ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณเนื่องจากควบคุมการเติบโตได้ (Marchetti *et al.*, 2012)

ทั้งนี้อัตราการเจือจางที่เหมาะสมกับการเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 แบบต่อเนื่อง คือ 1.12 ต่อวัน โดยอัตราการเจือจางที่ได้นี้สูงกว่าการเลี้ยงไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* แบบต่อเนื่อง ซึ่งอัตราการเจือจางที่เหมาะสมกับการเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* เท่ากับ 0.80 ต่อวัน (มะลิวัลย์ และ สรวิต, 2549) ทั้งนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเพาะเลี้ยงที่ทำให้สาหร่ายเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณตลอดเวลา ปริมาณธาตุอาหารในระบบคงที่ มีการแปรปรวนระหว่างการเลี้ยงน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ใช้เวลาในการดูแลรักษาน้อย (Wynn-Edwards *et al.*, 2014) รวมถึงสามารถเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ต่อเนื่องได้นานถึง 90 วัน

สาหร่าย *C. protothecoides* ที่เลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 39 วัน ด้วยอัตราการเจือจางตั้งแต่ 0.20 - 0.73 ต่อวัน เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นความหนาแน่นเซลล์จะลดลง ซึ่งเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ชะล้างเซลล์ออกจากระบบ (Washout) (Shozen *et al.*, 2001) แต่การทดลองในครั้งนี้เพิ่มอัตราการเจือจางสูงสุด 0.73 ต่อวัน ก็ยังไม่พบสภาวะการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ และยังให้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ  $248.96 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และผลผลิตเซลล์เท่ากับ  $181.04 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ซึ่งแสดงว่าสามารถปรับอัตราการเจือจางให้สูงกว่านี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Wen *et al.* (2014) ที่ศึกษาการเลี้ยงสาหร่าย *C. pyrenoidosa* XQ-20044 แบบต่อเนื่องด้วยอัตราการไหลตั้งแต่ 0.48-1.44 ต่อวัน พบว่าที่อัตราการเจือจางสูงสุด 1.44 ต่อวัน สามารถให้ผลผลิตสาหร่ายสูงขึ้นเช่นกัน

เมื่อเลี้ยงสาหร่าย *A. coffeaeformis* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 50 วัน โดยมีการปรับอัตราการเจือจางตั้งแต่ 0.17-1.70 ต่อวัน พบว่าอัตราการเจือจางสูงถึง 1.27 ต่อวัน ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด  $57.39 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีผลผลิตเซลล์สูงสุด  $73.00 \times 10^7$

เซลล์ต่อลิตรต่อวัน แสดงว่ายังสามารถปรับอัตราการเจริญให้สูงกว่านี้ได้เนื่องจากที่อัตราการเจริญ 1.27 ต่อวัน ซึ่งสูงสุดในการทดลองนี้สาหร่ายยังสามารถผลิตเซลล์ได้สูง ส่วนสาหร่าย *Nitzschia* BUUC1501 มีอัตราการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ คือ 1.28 ต่อวัน จากผลการทดลองสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงไดอะตอมสายพันธุ์ *Nitzschia* sp. แบบต่อเนื่องด้วยน้ำทะเลลึกพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลให้เพิ่มขึ้น ผลผลิตของไดอะตอมก็สูงขึ้นเช่นกัน (Fukami et al., 1997)

### 3.4 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 50 ลิตร

เมื่อเลี้ยง *A. coffeaeformis* ในสภาวะอโตโทรฟิก ปริมาตร 50 ลิตร โดยไม่มีการปั่น กวนพบว่าได้ความหนาแน่นเซลล์ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในขวด 1 และ 2 ลิตร (ตารางที่ 5.1) อาจเนื่องจากการให้อากาศเพียงอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการกวนผสมภายในถังอย่างทั่วถึง และพบไดอะตอมเติบโตอยู่บนผิวของถังเลี้ยง (wall growth) จึงทำให้แสงไม่สามารถส่องผ่านลงสู่ น้ำเลี้ยงได้อย่างทั่วถึง ทั้งนี้ลักษณะการเติบโตของไดอะตอมที่ผนังจะมีทั้งที่กระจายในมวลน้ำและที่ เกาะติดบนพื้นผิวรอบถังเลี้ยง สิ่งนี้เป็นข้อพิจารณาที่จะต้องออกแบบระบบการเลี้ยงให้แตกต่างจาก สาหร่ายทั่วไปเพื่อให้สามารถทำให้เซลล์ไดอะตอมแขวนลอยอยู่ในมวลน้ำได้

ส่วนสาหร่าย *C. protothecoides* กลับพบว่าการขยายปริมาตรการเลี้ยงเป็น 50 ลิตร เซลล์เติบโตได้ดีใกล้เคียงกับการเลี้ยงปริมาตร 2 ลิตร แสดงให้เห็นว่า *C. protothecoides* มี ศักยภาพในการเลี้ยงกลางแจ้งด้วยปริมาตรสูงๆ ได้ และยังให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงอีกด้วย ทั้งนี้ โดยทั่วไปจะพบว่าสาหร่าย *Chlorella* ชนิดที่เป็นน้ำจืดจะเติบโตได้และเลี้ยงเพื่อประโยชน์ทางการค้า ได้ แต่สาหร่าย *C. protothecoides* ที่ได้จากการทดลองนี้เป็นสาหร่ายน้ำเค็ม ซึ่งน่าสนใจมากเพราะ สามารถเลี้ยงได้โดยใช้น้ำทะเลเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่าย ดังนั้นในบริเวณที่มีพื้นที่อยู่ติดกับทะเลจึง น่าจะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงขยายปริมาตรสาหร่ายเพื่อผลิตมวลชีวภาพและไขมันได้

ตารางที่ 5.1 การเติบโตของ *A. coffeaeformis* และ *C. protothecoides* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะอโตโทรฟิกด้วยปริมาตรการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

ชนิดสาหร่าย	ปริมาตรเพาะเลี้ยง (ลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
<i>A. coffeaeformis</i>	1	0.54	323
	2	0.34	605
	50	1.59	87
<i>C. protothecoides</i>	1	1.22	893
	2	0.56	1342
	50	0.60	1013

## 4. สรุปและข้อเสนอแนะ

### 4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 สาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *Amphora subtropicsa* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* เติบโตได้ดีในสภาวะออโตโทรฟิกและมิโครโทรฟิก ส่วนในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกพบว่าเซลล์เติบโตได้ต่ำ

4.1.2 สาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *A. subtropicsa* BUUC1502, *C. protothecoides* BUUC1602 และ *A. coffereformis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกมีชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะมิโครโทรฟิก แต่ทั้ง 2 สภาวะการเลี้ยง พบว่ามีกรดไขมัน C16:0 และ C18:1 เป็นชนิดเด่น

4.1.3 เมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *A. subtropicsa* BUUC1502, *C. protothecoides* BUUC1602 และ *A. coffereformis* แบบต่อเนื่อง พบว่ามีอัตราการเจริญงอกงามที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 1.28, 1.12, 0.73 และ 1.27 ต่อวัน ตามลำดับ

4.1.4 สาหร่าย *C. protothecoides* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 50 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิกภายนอกห้องปฏิบัติการ ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุดได้สูงถึง  $1013 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

### 4.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากสาหร่ายมุกชนิดเติบโตได้ดีในสภาวะมิโครโทรฟิก จึงควรมีศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์คาร์บอนที่นำมาใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มศักยภาพการเติบโตของสาหร่ายให้สูงขึ้น

### 4.3 แนวทางการวิจัยในอนาคต

ผลิตสาหร่าย *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501, *Amphora subtropicsa* BUUC1502, *Chlorella protothecoides* BUUC1602 และ *Amphora coffereformis* และนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ผสมในอาหารสัตว์น้ำ เป็นต้น

## 5. ผลผลิต (Output)

### 5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

(1) มะลิวัลย์ คุณะโค, ปวีณา ตปนีวรวงค์, ณิชยา สิรินนท์ธนา, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, รชนิมุข หิรัญสังจาเลิศ, ชลีย์ ไพบุลย์กิจกุล และ สรวิต เผ่าทองสุข. 2561. การเติบโตและองค์ประกอบกรดไขมันของไดอะตอมท้องถิ่น *Nitzschia* BUUC1501 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิโกโซโทรฟิก. แก่นเกษตร, 46(1): 968-973.

(2) ปวีณา ตปนีวรวงค์, ประรณนา ปานทอง, ปารีชาติ ชุมทอง, มะลิวัลย์ คุณะโค, รชนิมุข หิรัญสังจาเลิศ, ชลีย์ ไพบุลย์กิจกุล และ สรวิต เผ่าทองสุข. 2561. การเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบต่อเนื่องของไดอะตอมท้องถิ่น *Amphora subtropica* BUUC1502 ที่แยกจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว. ในเล่มเต็ม การประชุมวิชาการระดับชาติ “วลัยลักษณ์วิจัย” ครั้งที่ 10 วันที่ 27-28 มีนาคม 2561. 1-7.

### 5.2 การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

### 5.3 ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

ไม่มี

### 5.4 ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ไม่มี

## รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย รหัสโครงการ 2560A10803014 เลขที่สัญญา 124/2560

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ผลผลิตมวลชีวภาพและไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะการเติบโต  
แตกต่างกัน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เดือนตุลาคม 2559 – 30 เดือนกันยายน 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 เดือนตุลาคม 2559 – 30 เดือนกันยายน 2560

### รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 170,500 บาท เมื่อ 23 พฤศจิกายน 2559

งวดที่ 2 (40%) 136,400 บาท เมื่อ 23 สิงหาคม 2560

งวดที่ 3 (10%) 34,100 บาท เมื่อ -

รวม 341,000 บาท

### รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	34,000	34,000	0
2. ค่าจ้าง	90,000	90,000	0
3. ค่าวัสดุ	150,900	150,900	0
4. ค่าใช้สอย	32,000	32,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าดำเนินโครงการ 10%	34,100	34,100	0
รวม	341,000	341,000	0

.....  
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

วันที่ 30 สิงหาคม 2561



## เอกสารอ้างอิง

- ชมพูนุท ชัยรัตน์ สรวีศ เฝ้าทองสุข และ สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล. 2546. การเติบโตของ ไดอะตอม *Amphora delicatissima* ในที่มีดภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 25(2): 205-212.
- มะลิวัลย์ คุณะโค และ สรวีศ เฝ้าทองสุข. 2549. ผลของอัตราการเจือจางและความเข้มแสงต่อการเติบโตของไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงแผ่นแบน. วารสารสงขลานครินทร์ 28: 965-975.
- สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคา. 2538. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 251 หน้า.
- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J. and Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 191, 395-398.
- Apt, K. E. and Behrens, P. W. 1999. Commercial Development in Microalgal Biotechnology. *Journal of Phycology* 35: 215-226.
- Bhatnagar, A., Bhatnagar, M., Chinnasamy, S. and Das, K. 2010. *Chlorella minutissima* – a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161: 523–536.
- Bridson, E. Y. 1995. *The Oxoid Manual*. 7ed. London: Unipath Limited. P. 166.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fomenters. *Journal of Biotechnology* 70: 313-321.
- Chen, F., Zhang, Y. and Guo, S. 1996. Growth and Phycocyanin Formation of *Spirulina platensis* in Photobioreactor Culture. *Biotechnology Letters* 18(5): 603-608.
- Chen F. and Zhang, Y. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb Technol* 20: 221–224.
- Christie, W. W. 2003. *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. 3rd editions. The Oily Press, Bridgewater, UK. 416.
- Chuecas, L. and Riley, J. P. 1969. Component Fatty Acids of the Total Lipids of Some Marine Phytoplankton. *Journal of Marine Biology Assn U.K.* 49: 97-116.
- Das, P., Lei, W., Aziz, S.S. and Obbard, J.P. 2011. Enhanced algae growth in both Phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology* 102: 3883–3887.
- de Mort, C. T., Lowry, R., Tinsley, I. and Phinney, H. K. 1972. The Biochemical Analysis of Estuarine Phytoplankton Species. I. Fatty Acid Composition. *Journal of Phycology* 8: 211-216.

- Folch, J., M. Lees and G.H.S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.
- Fukumi, K., Nishimura, S., Okusa, M., Asada, M. and Nishijima, T. (1997). Continuous culture with deep seawater of a benthic food diatom *Nitzschia* sp. *Hydrobiologia*, 358: 245-249.
- Guillard, R. R. L. 1973. Method for Microflagellates and Nanoplankton. In Stein, J. R. (ed). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. New York: Cambridge University. pp. 69-89.
- James, C. M., and Al-Khars, A. M. 1990. An intensive continuous culture system using tubular photoreactors for producing microalgae. *Aquaculture*, 87: 381-393.
- Jutila, D. J., Bautista, M. A., and Bautista, W. (2015). Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions. *Bioresource Technology*, 191, 395-398.
- Kates, M. and Volcani, B. E. 1966. Lipid Component of Diatom. *Biochem. Biophys. Acta* 166: 264-278.
- Kyle, D. J. 1996. Production and Use of Single Cell Oil Which is Highly Enriched in Docosahexaenoic Acid. *Lipid Technology* 2: 106-112.
- Lee, Y. K., Dimg, S. Y., Hoe, C. H. and Low, C. S. 1996. Mixotrophic Growth of *Chlorella sorokiniana* in Outdoor Enclose Photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 8: 163-169.
- Leesing, R., Subinam, P. and Papone, T. (2010). Microalgal oil production from agricultural residue hydrolysates under heterotrophic cultivation. *Proceeding of the Lignobiotech One Symposium: 1<sup>st</sup> Symposium on Biotechnology Applied Lignocelluloses*. 28 March-1 April 2010, Reims, France
- Li, Y-R., Tsaia, W-T., Hsu, Y-C., Xie, M-Z., Chen, J-J. 2014. Comparison of Autotrophic and Mixotrophic Cultivation of Green Microalgal for Biodiesel Production. *Energy Procedia* 52: 371-376.
- Li, D. M. and Qi, Y. Z. 1997. Spirulina Industry in China: Present Status and Future Prospects. *Journal of Applied Phycology* 9: 25-28.
- Li, T., Zheng, Y. and Chen, S. 2014. Mixotrophic Cultivation of a *Chlorella sorokiniana* Strain for Enhanced Biomass and Lipid Production. *Biomass and Bioenergy* 66: 204-213.
- Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y. (2009). Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella vulgaris* under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions. *Biotechnol Lett.* 31(7): 1043–1049.
- Lin, T-S. and Wu, J-Y. 2016. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology* 184: 100–107.

- Lowrey, J., Brooks, M. S. and McGinn, P. J. 2015. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. *J Appl Phycol* 27:1485–1498
- Ma, R. Y. N. and Chen, F. 2001. Induction of Astaxathin Formation by Reactive Oxygen Species in Mixotrophic Culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnology Letters* 23: 519-523.
- Mansour, M.P., Volkman, J.K. and Blackburn, S.I. 2003. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. In batch culture. *Phytochemistry* 63:145-153.
- Marchetti, J., G. Bougaran, L. Le Dean, C. Megrier, E. Lukomska, R. Kass, E. Olivo, R. Baron, R. Robert, and J. P. Cadoret. (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, 326-329: 106-115.
- Metting, F. B. 1996. Biodiversity and Application of Microalgae. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 477-489.
- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Kyndt, J. and Martinez, A. 2013. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. *Biotechnology for Biofuels* 6(100):1-12.
- Opute, F. I. 1974. Lipid and Fatty-Acid Composition of Diatom. *Journal of Expl. Bot.* 25: 823-835.
- Pratiwi, A. R., Syah, D., Hardjito, L., Panggabean, L. M. G., Suhartono, M. T. 2009. Fatty Acid Synthesis by Indonesian Marine Diatom, *Chaetoceros gracilis*. *HAYATI Journal of Biosciences* 16(4): 151-156.
- Rai., M. P., Nigam, S. and Sharma, R. 2013. Response of growth and fatty acid compositions of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application. *Biomass and Bioenergy* 58: 251-257.
- Running, J. A., Huss, R. J. and Olson, P. T. 1994. Heterotrophic Production of Ascorbic Acid by Microalgae. *Journal of Applied Phycology* 6: 99-104.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. and Roessor, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Office of Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae. Prepared for the U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, by National Renewable Energy Laboratory, July (1998).
- Shishlyannikov. S. M., Klimenkov, I. V., Bedoshvili, Y. D., Mikhailov, I. S. and Gorshkov, A. G. 2016. Effect of mixotrophic growth on the ultrastructure and fatty acid composition of the diatom *Synedra acus* from Lake Baikal. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 21: 1-15.

- Shozen, K., I. Umeda, T. Nakashima, and A. Honma. (2001). Continuous cultivation of a diatom, *Chaetoceros ceratosporum*, in deep-sea water pumped from toyama bay. *IOA Newsletter*, 12(4).
- Smith, R.T., Bangert, K., Wilkinson, S. J. and Gilmour, D. J. 2015. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass Bioenergy* 82: 73-86.
- Tornabene, T. G., Kates, M. and Volcani, B. E. 1974. Sterol, Aliphatic Hydrocarbons and Fatty Acids of A Nonphotosynthetic Diatom *Nitzschia alba*. *Lipids* 9: 279-284.
- Vonshak, A., Cheung, S. M. and Chen, F. 2000. Mixotrophic Growth Modifies the Response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) Cell to Light. *Journal of Applied Phycology* 36: 675-679
- Wang, X-W., Liang, J-R., Lou, C-S., Chen, C-P. and Gao, Y-H. 2014. Biomass, Total Lipid Production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in Response to Different CO<sub>2</sub> Levels. *Bioresource Technology* 161: 124-130.
- Wen, Z.Y. and Chen, F. 2000. Production Potential of Eicosapentaenoic Acid by the Diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnol. Lett.* 22: 727-733.
- Widjaja, A., Chien, C-C. and Ju, Y-H. 2009. Study of Increasing Lipid Production from Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40: 13-20.
- Wynn-Edwards, C., King, R., Kawaguchi, S., Davidson, A., Wrigh, S., Nichols, PD and Virtue, P. 2014.. Development of a continuous phytoplankton culture system for ocean acidification experiments. *Water* 6: 1860-1872.
- Yoo, C., Jun, S-Y., Lee J-Y., Ahn, C-Y. and Oh, H-M. 2010. Selection of Microalgae for Lipid Production under High Levels Carbon Dioxide. *Bioresource Technology* 101: 571-574.
- Xu, H., Miao, X. and Wu, Q. 2006. High Quality Biodiesel Production from a Microalga *Chlorella protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters. *Journal of Biotechnokogy* 126: 499-507.

ภาคผนวก

การเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบต่อเนื่องของไดอะตอมท้องน้ำ *Amphora subtropica* BUUC1502 ที่แยกจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว

ปวีณา ตบเนียนวงศ์<sup>1,2\*</sup>, ปราภานา ปานทอง<sup>1,2</sup>, ปารีชาติ ชุมทอง<sup>1,2</sup>, มะลิวัลย์ คุตะโค<sup>3</sup>,  
รชนิมุข หิรัญสังจาเลิศ<sup>3</sup>, ชลิ ไพบูลย์กิจกุล<sup>3</sup> และ สรวิต เฟ้าทองสุข<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

<sup>2</sup>ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

<sup>3</sup>คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี 22170

paveena.tap@biotec.or.th

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเติบโตของไดอะตอมท้องน้ำ *Amphora subtropica* BUUC1502 ซึ่งแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว ในจังหวัดจันทบุรี ทำการแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค single cell isolation และแยกให้ไดโคไลนเดี่ยวอีกครั้งบนอาหารแข็งที่เตรียมจากอาหารสูตรกลลาร์ด F/2 ก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรกลลาร์ด F/2 ที่มีความเค็ม 30 พีเอสยู เมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมในระบบแบบกะพบว่า *A. subtropica* BUUC1502 ที่เลี้ยงในขวดปริมาตร 1 ลิตร มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $1.29 \pm 0.28$  ต่อวัน และมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยสูงสุด  $204.72 \pm 37.33 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าความหนาแน่นเซลล์สูงสุดที่ได้จากการขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงเป็น 5, 10 และ 50 ลิตร ( $P < 0.05$ ) เมื่อทำการศึกษาการเติบโตของไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดแก้วปริมาตร 2 ลิตร โดยปรับอัตราการเจือจางขึ้นจาก 0.21 ถึง 1.12 ต่อวัน โดยสามารถเลี้ยงแบบต่อเนื่องได้นานถึง 90 วัน พบว่าแต่ละระดับอัตราการเจือจางมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) แต่ผลผลิตเซลล์มีค่า  $105.20 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจาง 1.12 ต่อวัน ซึ่งให้ผลผลิตเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจาง ณ ระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

คำสำคัญ: ไดอะตอมท้องน้ำ, *Amphora*, การคัดแยกเซลล์, การเลี้ยงแบบกะ, การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

## บทนำ

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) มีการแพร่กระจายทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยมีความหลากหลายมากกว่า 200,000 สายพันธุ์ [1] และสาหร่ายหลายชนิดถูกนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับมนุษย์ อาหารสัตว์ ยารักษาโรคและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อีกมากมาย นอกจากนี้จากความต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้นและการลดลงของแหล่งพลังงานในธรรมชาติ ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่ายขนาดเล็กอย่างกว้างขวางเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตเป็นแหล่งพลังงาน รวมถึงการพยายามใช้สาหร่ายลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงานอุตสาหกรรมและนำเซลล์ไปผลิตพลังงานอย่างยั่งยืน [2] โดยเหตุผลในการเลือกสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้ผลิตเป็นพลังงานทดแทน เนื่องจากมีปริมาณน้ำมันสูงกว่าพืชทั่วไป ให้ผลผลิตสูงเมื่อเทียบกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ใช้พื้นที่น้อยกว่าการปลูกพืช และสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ รวมถึงใช้น้ำเสียหรือน้ำทิ้งในการเพาะเลี้ยงมาเลี้ยงสาหร่ายได้โดยตรงจึงถือเป็นการช่วยลดปริมาณของเสียในน้ำทิ้งก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ [3] ทั้งนี้สาหร่ายหลายชนิดที่แยกได้จากธรรมชาติและมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.KMN3 ที่มีปริมาณไขมันสูงถึง 20% แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาหร่ายขนาดเล็กที่จะนำมาผลิตเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานหรือสารที่มีมูลค่าสูงได้ในอนาคต [4] นอกจากนี้ยังสามารถพบสาหร่ายในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งโดยทั่วไปจะมีปริมาณธาตุอาหารสูง จึงพบได้ทั้งไซยาโนแบคทีเรียและไดอะตอม [5] ทั้งนี้ไดอะตอมเป็นสาหร่ายที่นำสนใจสำหรับนำมาใช้ประโยชน์เพราะเซลล์ของไดอะตอมมีปริมาณไขมัน กรดไขมันและสารสีโดยเฉพาะฟูโคแซนทิน (Fucoxanthin) ซึ่งเป็นสารสีที่มีมูลค่าสูงในปริมาณมาก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิตมวลชีวภาพ

ของสาหร่ายสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ จึงมีความสำคัญ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วรูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเป็นแบบกะ (Batch culture) ซึ่งเป็นการเลี้ยงให้สาหร่ายเติบโตในระยะทวีคูณ (Exponential growth phase) และเก็บเกี่ยวผลผลิตเพียงครั้งเดียว เพราะปริมาณสารอาหารเป็นปัจจัยจำกัดการเติบโตของสาหร่าย ส่วนอีกหนึ่งรูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ความน่าสนใจในการนำมาเพาะเลี้ยงสาหร่ายคือแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) เป็นการเพาะเลี้ยงที่ทำให้สาหร่ายมีการเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณตลอดเวลา โดยมีการเติมสารอาหารเข้าสู่ระบบเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง จึงสามารถเก็บผลผลิตได้อย่างต่อเนื่อง และยังช่วยลดเวลาในการทำความสะอาด ข่าเชื้อและเตรียมระบบเพาะเลี้ยงอีกด้วย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกสาหร่ายกลุ่มไดอะตอมน้ำเค็มที่เติบโตในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสามารถนำมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณได้ง่ายในสภาวะห้องปฏิบัติการและในโรงเพาะฟัก โดยนำไดอะตอมมาเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบต่อเนื่อง เพื่อทราบถึงรูปแบบการเพาะเลี้ยงที่สามารถส่งเสริมการเติบโตและผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอม ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปเป็นแนวทางการเพาะเลี้ยงไดอะตอมเพื่อนำเซลล์ไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

## วิธีการวิจัย

### การคัดแยกไดอะตอมที่ใช้ในการทดลอง

ไดอะตอมท้องน้ำถูกคัดเลือกเซลล์เพื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยพงษ์ธร (2558) [6] จากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ตั้งอยู่ในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (พิกัด 12.57 N, 102.01 E) และน้ำในบ่อมีปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนเตรต ฟอสเฟตและซิลิเกต เท่ากับ 0.19, 0.01 และ 0.3 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร, 0.01 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และ 1.18 มิลลิกรัมซิลิเกตต่อลิตร ตามลำดับ ความเค็ม 25 พีเอสยู ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 8.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ pH เท่ากับ 8.28 ทำการตรวจสอบลักษณะของไดอะตอมภายใต้ Scanning Electron Microscope (SEM) และใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยนำไดอะตอมมาสกัด DNA ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sambrook [7] จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วน 18S RNA gene ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis และนำ PCR product ที่ได้ไปทำใหบริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit จากนั้นทำการโคลนและสกัดพลาสมิดด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit แล้วทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดไดอะตอม

### การเพาะเลี้ยงไดอะตอมในระบบแบบกะ

ทำการศึกษาการเติบโตของไดอะตอมในระบบการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาณแตกต่างกัน คือ 1, 5, 10 และ 50 ลิตร ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตร 1, 5 และ 10 ลิตร ทำในขวดแก้ว ที่บรรจุอาหารสูตรกลลาร์ด F/2 ความเค็ม 30 พีเอสยู ให้อากาศที่ผ่านการกรองด้วยไส้กรองขนาด 0.2 ไมครอน และแสงความเข้ม 5,500 ลักซ์ จากหลอด LED ตลอดเวลา ซึ่งการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตร 1 และ 5 ลิตร มีการให้อากาศร่วมกับการใช้เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) แต่ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 10 ลิตร ให้อากาศเพียงอย่างเดียว โดยทำการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการเลี้ยงไดอะตอม ปริมาตร 50 ลิตร จะทำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสงที่สร้างจากท่ออะคลิลิคใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 98 เซนติเมตร และทำการเลี้ยงในโรงเพาะฟักที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและให้แสงความเข้ม 8,500 ลักซ์ และเติมอากาศตลอดเวลา ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ และติดตามการเติบโตของด้วยการนับจำนวนด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอม [8]

### การเพาะเลี้ยงไดอะตอมแบบต่อเนื่อง

ทำการทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยใช้อาหารเพาะเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับการเลี้ยงแบบแบทช์ในสภาวะห้องปฏิบัติการ โดยการเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเลี้ยงที่มีการเติมอาหารให้กับไดอะตอมตลอดเวลา ในขณะที่เดียวกันไดอะตอมในขวดเลี้ยงก็ถูกนำออกจากขวดเลี้ยงด้วยแรงดันอากาศจากในขวดเลี้ยงออกสู่ขวดเก็บผลผลิต โดยก่อนเริ่ม

การเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะทำการเลี้ยงแบบแบทช์เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้ไดอะตอมเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นจนเข้าสู่ระยะทวีคูณ (log growth phase) จึงเริ่มทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยใช้ปั้มน้ำรีดสาย (Masterflex C/L model 77120-62) ในการควบคุมอัตราการไหลของอาหารเพาะเชื้อในระบบ เมื่ออัตราการเจริญและความหนาแน่นเซลล์คงที่จึงทำการปรับอัตราการเจริญขึ้น โดยปรับอัตราการเจริญเป็น 7 ระดับ คือ ตั้งแต่ 0.2-1.1 ต่อวัน เพื่อให้ทราบถึงอัตราการเจริญที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมและอัตราการเจริญที่ทำให้ไดอะตอมเกิดสภาวะการชะล้างเซลล์ออกจากระบบ อัตราการเจริญคำนวณได้จาก  $D = F/V$  โดยที่  $D$  = อัตราการเจริญ (ต่อวัน),  $F$  = อัตราการไหลของระบบ (ลิตรต่อวัน) และ  $V$  = ปริมาตรของการเลี้ยง (ลิตร) [9] ติดตามการเติบโตของสาหร่ายด้วยການนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวัดปริมาณผลผลิตที่ได้ ทั้งนี้ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะมีอัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอมเท่ากับอัตราการเจริญ [9]

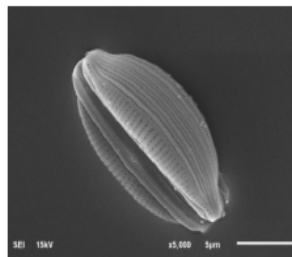
#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบและวิเคราะห์ความแปรปรวนของความหนาแน่นเซลล์สูงสุด อัตราการเติบโตจำเพาะ และผลผลิตมวลชีวภาพของไดอะตอม โดยใช้การวิเคราะห์แบบ One-Way Anova ด้วยโปรแกรม SPSS version 15

#### ผลและอภิปรายผล

##### การคัดแยกไดอะตอมที่ใช้ในการทดลอง

จากการคัดแยกไดอะตอมจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำในจังหวัดจันทบุรี และจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาพบว่าเป็นไดอะตอม *Amphora subtropica* สายพันธุ์ BUUC1502 โดยมีค่า identity 99% จัดอยู่ในคลาส Bacillariophyceae ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับภาพถ่ายที่ได้จากกล้อง SEM (รูปที่ 1) พบว่าเซลล์ไดอะตอมเป็นไดอะตอมในกลุ่มเพนเนตไดอะตอม ด้านหลังและด้านท้องเซลล์มีรูปร่างคล้ายแผ่นเส้นหรือจุดบนเปลือก [10] โดยการฟุ้งกระจายของตะกอนและมวลน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจะเป็นการเพิ่มปริมาณในเตรตและซิลิเกตในมวลน้ำ จึงสามารถพบสาหร่ายในกลุ่มไดอะตอม เช่น *Nitzschia longissima*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros simplex* และ *Thalassiosira anguste* และไดอะตอมเหล่านี้มีความสำคัญต่อห่วงโซ่อาหารในทะเล [11,12] และอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำได้ [13] *A. subtropica* BUUC1502 เป็นไดอะตอมท้องน้ำ (Benthic diatom) มีโครงสร้างของเปลือกเป็นซิลิกา [11] การใช้ประโยชน์ไดอะตอมท้องน้ำคือใช้เป็นอาหารของลูกหอยเป่าอ้อในระยะโพสลาวาเนื่องจาก *Amphora* มีลักษณะยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุ [14] และไดอะตอม *Amphora* มีไขมันและโปรตีนสูง 7.11 และ 18.50% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อนำไดอะตอมไปเลี้ยงหอยเป่าอ้อจึงส่งผลให้ลูกหอยมีอัตราการเติบโตได้ตั้งแต่ 50±3 ไมครอนต่อวัน [15]



รูปที่ 1 ลักษณะภายใต้ Scanning Electron Microscope ของไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งขาว

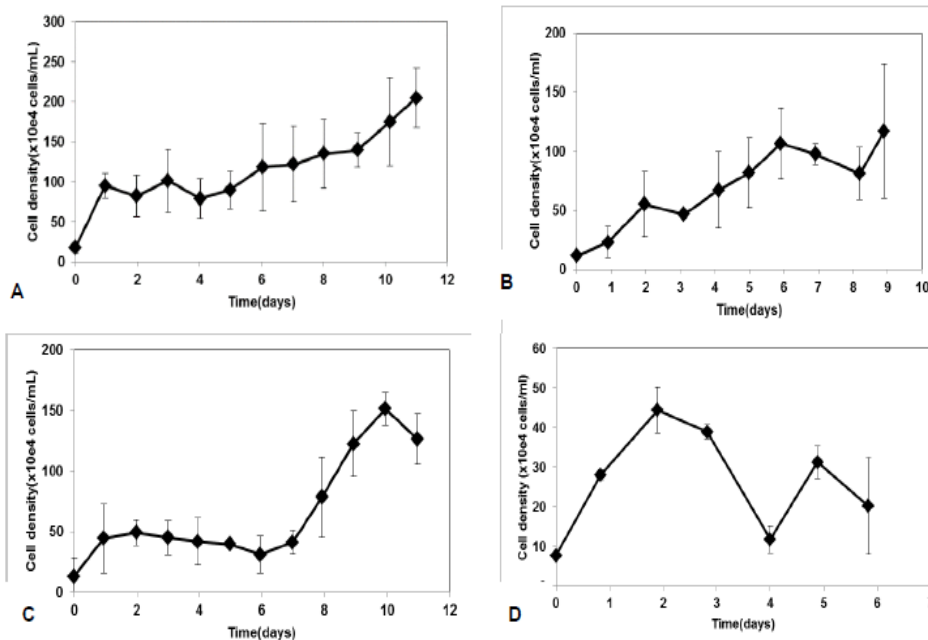
##### การเติบโตของไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในระบบแบบกะ

จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 แบบแบทช์ในขนาด 1, 5, 10 และ 50 ลิตร พบว่าไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ย  $17.74 \pm 6.99 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจากนั้นเซลล์สามารถเติบโตได้โดยไม่พบเข้าสู่วัยพัก (Lag growth phase) ทั้งในการเพาะเลี้ยงปริมาณ 1 ลิตร พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย  $204.72 \pm 37.32 \times 10^4$  เซลล์ต่อ



มิลลิเมตร ในวันที่ 11 ของการเลี้ยง (รูปที่ 1A) เมื่อขยายปริมาตรการเลี้ยงในขวดแก้วเป็น 5 ลิตร ไดอะตอมมีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย  $117.17 \pm 56.79 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร ส่วนการเลี้ยงในขวดพลาสติกขนาด 10 ลิตร ที่มีการให้อากาศเพียงอย่างเดียวไม่มีการปนกววน พบว่ามีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย  $151.54 \pm 13.61 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร และการขยายปริมาตรการเพาะเลี้ยงเป็น 50 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสงที่สร้างจากพลาสติกใสในโรงเพาะพักที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ พบว่าเซลล์เติบโตเพิ่มขึ้นจาก  $6.86 \pm 1.50 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร เป็น  $44.42 \pm 5.78$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร ภายใน 2 วัน และมีอัตราการเติบโตจำเพาะในวันที่ 0-2 เท่ากับ  $1.22 \pm 0.03$  ต่อวัน (รูปที่ 2B-D)

การเพาะเลี้ยงแบบกะในขวดปริมาตร 1 ลิตร ให้ความหนาแน่นเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตร 5, 10 และ 50 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ตารางที่ 1) เนื่องจากในขวดปริมาตร 1 ลิตร ไดอะตอมน่าจะสามารถรับแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าปริมาตรการเลี้ยงที่ใหญ่ขึ้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงอาจเป็นปัจจัยหลักสำหรับการเติบโตของไดอะตอม [16] ส่วนอัตราการเติบโตจำเพาะกลับพบว่าทุกปริมาตรการเลี้ยงมีค่าไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 1) ไดอะตอมมักมีอัตราการการเติบโตจำเพาะที่ค่อนข้างกว้างขึ้นอยู่กับชนิดและวิธีการเพาะเลี้ยง เช่น ไดอะตอม *Nitzschia sigma*, *Navicula arenaria*, *Amphiprora palusa* และ *Nitzschia dissipata* มีค่าเท่ากับ 1.23, 0.55, 0.24 และ 0.27 ต่อวัน ตามลำดับ [17] ส่วนไดอะตอม *Amphiprora* sp. และ *Thalassiosira antarctica* มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.41 และ 0.60 ต่อวัน ตามลำดับ [18] ทั้งนี้เมื่อทำการขยายปริมาตรการเลี้ยงขึ้นเป็น 50 ลิตร โดยไม่มีการปนกววนพบว่ามีความหนาแน่นเซลล์ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในขวด 1, 5 และ 10 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) อาจเนื่องจากการให้อากาศเพียงอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการกวนผสมภายในถังอย่างทั่วถึง และพบไดอะตอมเติบโตอยู่บนผิวของถังเลี้ยง (wall growth) จึงทำให้แสงไม่สามารถส่องผ่านลงสู่เซลล์ไดอะตอมได้อย่างทั่วถึง ทั้งนี้ลักษณะการเติบโตของไดอะตอมท้องถิ่นจะมีทั้งที่กระจายในมวลน้ำและที่เกาะติดบนพื้นผิวของถังเลี้ยง สิ่งนี้เป็นข้อพิจารณาที่จะต้องออกแบบระบบการเลี้ยงให้แตกต่างจากสาหร่ายทั่วไปเพื่อให้สามารถคงเซลล์ไดอะตอมให้แขวนลอยอยู่ในมวลน้ำได้ [19] แต่จากลักษณะการเติบโตที่ยึดเกาะพื้นผิวของไดอะตอมท้องถิ่น จึงได้มีการนำไดอะตอมท้องถิ่นมาทำการเลี้ยงด้วยอวนของสัตว์ทะเล เช่น หอยเป่าอื้อ ซึ่งมีรายงานว่าฟิล์มของไดอะตอมท้องถิ่นจะกระตุ้นการลงเกาะและกระบวนการ metamorphosis ของสัตว์น้ำได้ [20]



รูปที่ 2 การเติบโตของไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในปริมาตร 1 ลิตร (A), 5 ลิตร (B), 10 ลิตร (C) และ 50 ลิตร (D) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

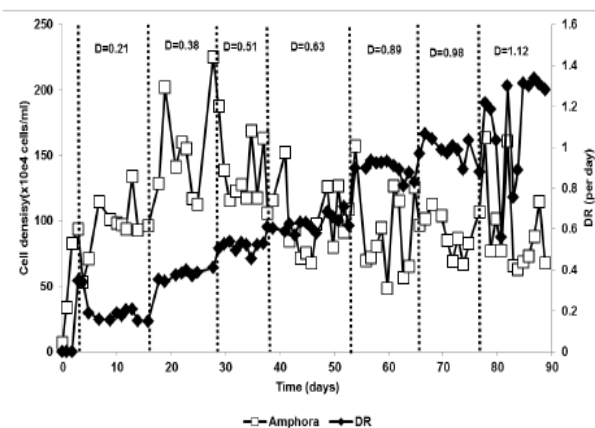
ตารางที่ 1 ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยสูงสุดและอัตราการเติบโตจำเพาะของ *A. subtropica* BUUC1502 ที่ปริมาตรการเลี้ยงต่างๆ ในระบบการเลี้ยงแบบแบทช์

ปริมาตรการเลี้ยง (ลิตร)	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยสูงสุด ( $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
1	204.72 $\pm$ 37.32 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
5	137.61 $\pm$ 31.52 <sup>b</sup>	1.34 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>
10	156.27 $\pm$ 13.01 <sup>ab</sup>	1.80 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>
50	44.42 $\pm$ 5.78 <sup>c</sup>	1.22 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

### การเติบโตของไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

จากการศึกษาการเติบโตของ *A. subtropica* BUUC1502 ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าก่อนเริ่มการเลี้ยงแบบต่อเนื่องมีความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $82.95 \pm 6.56 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มเลี้ยงด้วยอัตราการเจือจาง 0.21 ต่อวัน ได้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย  $95.23 \pm 20.63 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการปรับอัตราการเจือจางขึ้นเป็น 0.38, 0.51, 0.63, 0.89, 0.98 และ 1.12 ต่อวัน พบว่าแนวโน้มความหนาแน่นเซลล์ไดอะตอมแสดงได้ดังภาพที่ 3 ซึ่งการเพิ่มอัตราการเจือจางส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยมีค่าใกล้เคียงกัน ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 2) ในขณะที่ปริมาณผลผลิตเซลล์ที่ได้กลับพบว่าหากเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอัตราการเจือจางต่ำ (0.21 ต่อวัน) พบว่าผลผลิตเซลล์ต่ำที่สุด ( $P < 0.05$ ) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอัตราการเจือจางที่ 0.38-0.98 ต่อวัน พบว่าผลผลิตเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน ( $P > 0.05$ ) และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอัตราการเจือจาง 1.12 ต่อวัน มีปริมาณผลผลิตเซลล์เท่ากับ  $105.20 \pm 7.12 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอัตราการเจือจางอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมกับการเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 แบบต่อเนื่อง คือ 1.12 ต่อวัน โดยอัตราการเจือจางที่ได้นี้สูงกว่าการเลี้ยงไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* แบบต่อเนื่อง ซึ่งอัตราการเจือจางที่เหมาะสมกับการเลี้ยงไดอะตอม *C. calcitrans* เท่ากับ 0.80 ต่อวัน [21] ทั้งนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเพาะเลี้ยงที่ทำให้สาหร่ายเติบโตอยู่ในระยะที่ควบคุมตลอดเวลา ปริมาณธาตุอาหารในระบบคงที่ มีการแปรปรวนระหว่างการเลี้ยงน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ใช้เวลาในการดูแลรักษาน้อย [22] รวมถึงสามารถเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถเลี้ยงไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ต่อเนื่องได้นานถึง 90 วัน



รูปที่ 3 การเติบโตของไดอะตอม *A. subtropica* BUUC1502 ในขนาดปริมาตร 2 ลิตรภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยปรับอัตราการเจือจาง (dilution rate, DR) ระหว่าง 0.21-1.12 ต่อวัน

ตารางที่ 2 แสดงความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยและผลผลิตของ *A. subtropica* BUUC1502 ในระบบการเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ระดับอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

อัตราการเจือจาง (ต่อวัน)	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ย ( $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิเมตร)	ผลผลิตของไดอะตอม ( $\times 10^7$ เซลล์ต่อลิตรต่อวัน)
0.21 $\pm$ 0.03	106.22 $\pm$ 13.08 <sup>a</sup>	21.89 $\pm$ 3.82 <sup>b</sup>
0.38 $\pm$ 0.03	155.40 $\pm$ 53.61 <sup>a</sup>	58.97 $\pm$ 22.31 <sup>ab</sup>
0.51 $\pm$ 0.06	140.11 $\pm$ 39.84 <sup>a</sup>	70.82 $\pm$ 12.87 <sup>ab</sup>
0.63 $\pm$ 0.11	99.88 $\pm$ 22.41 <sup>a</sup>	62.28 $\pm$ 9.67 <sup>ab</sup>
0.89 $\pm$ 0.06	92.10 $\pm$ 49.36 <sup>a</sup>	79.20 $\pm$ 41.73 <sup>ab</sup>
0.98 $\pm$ 0.02	91.28 $\pm$ 53.59 <sup>a</sup>	89.97 $\pm$ 53.60 <sup>ab</sup>
1.12 $\pm$ 0.26	93.58 $\pm$ 35.59 <sup>a</sup>	105.20 $\pm$ 7.12 <sup>a</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของข้อมูลในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

#### สรุปผลการวิจัย

เมื่อจัดจำแนกสกุลตามลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าไดอะตอมที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำในจังหวัดจันทบุรี พบว่าเป็นไดอะตอมที่น้ำสกุล *Amphora subtropica* สายพันธุ์ BUUC1502 สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและนอกห้องปฏิบัติการ โดยในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแทชในขวดแก้ว 1 ลิตร มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเฉลี่ย  $204.72 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตร 5, 10 และ 50 ลิตร ถึง 1.49, 1.31 และ 4.6 เท่า ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องพบว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสม คือ 1.12 ต่อวัน เพราะสามารถให้ผลผลิตไดอะตอมได้ดีที่สุดโดยมีผลผลิตสูงสุด  $105.20 \times 10^7$  เซลล์ต่อลิตรต่อวัน ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้เพื่อผลิตมวลชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ต่อไปได้ในอนาคต

#### กิตติกรรมประกาศ

งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 124/2560

#### บรรณานุกรม

- [1] MD Guiry and GM Guiry. *AlgaeBase*. World-wide Electronic Publication. National University of Ireland, Galway. 2014.
- [2] AK Minhas, P Hodgson, CJ Barrow, B Sashidhar and A Adholeya. The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. *Bioresource Technol.* 2016, 211, 556-565.
- [3] AE Abomohra, M El-Sheekh and D Hanelt. Screening of marine microalgae isolated from the hypersaline Bardawil lagoon for biodiesel feedstock. *Renew. Energ.* 2017, 101, 1266-1272.
- [4] M Tale, S Ghosh, B Kapadnis and S Kale. 2014. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresource Technol.* 2014, 169, 328-335.
- [5] P Kwan Soon and S Hyun Woung. Studies on phyto-and-zooplankton composition and its relation to fish productivity in a west coast fish pond ecosystem. *J. Environ. Biol.* 2007, 28(2), 415-422.

6 การประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย" ครั้งที่ 10 วันที่ 27-28 มีนาคม 2561 วิทยาลัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

- [6] พงษ์ธร เจนจัดการ. การแยกและการเติบโตของสาหร่ายน้ำเค็มจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในบริเวณจังหวัดจันทบุรี. ปรินญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา, 2558.
- [7] J Sambrook. And WD Russell. Molecular cloning: a laboratory manual cold spring harbor, cold spring harbor laboratory. 3, New York, USA. 2001.
- [8] EW Becker. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, UK. 1994.
- [9] JE Bailey and DF Oillis. Biochemical Engineering Fundamental. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill. Singapore. 1986.
- [10] ลัดดา วงศ์รัตน์. แพลงก์ตอนพืช. 2539. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 851.
- [11] KE Nass, T van der Meeren, and DL Aksnes. Plankton succession and responses to manipulations in a marine basin for larval fish rearing. Mar. Ecol. Prog. Ser. 1991, 74, 161-173.
- [12] Y Chen. The biomass and total lipid and content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. Food Chem. 2012, 131, 211-219.
- [13] CT Enright, GF Newkirk, JS Craigie and JD Castell. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 1986, 96, 1-13.
- [14] T Kawamura, T Saibo, H Takami and Y Yamashita. Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 1995, 194, 189-199.
- [15] G Courtois de Vicose, MP Viera, S Huchette and MS Izquierdo. Improving nursery performance of *Haliotis tuberculata coccinea*: Nutritional value of four species of benthic diatoms and green macroalgae germings. Aquaculture 2012, 334-337, 124-131.
- [16] E Sakshaug and O Holm-Hansen. Photoadaptation in Antarctic phytoplankton: variations in growth rate, chemical composition and P versus I curves. J. Plankton Res. 1986, 8, 459-473.
- [17] W Admiraal. Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatom in culture. Marine Biology 1977, 39, 1-9.
- [18] M Gilstad and E Sakshaug.. Growth rates often diatom species from the Barents Sea at different irradiances day lengths. Mar. Ecol. Prog. Ser. 1990, 64,169-173.
- [19] FR Silva-Aciaries and CE Riquelme. Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. Aquacultural Eng. 2008, 38, 26-35.
- [20] B Zhao, S Zhang and P Qian. Larval settlement of the silver-or goldlip pearl oyster *pinctada maxima* (Jamenson) in response to natural biofilm and chemical cues. Aquaculture 2003, 220, 883-901.
- [21] มะลิวัลย์ คุดะโค และ สรวิต เผ่าทองสุข. ผลของอัตราการเจือจางและความเข้มแสงต่อการเติบโตของไดอะตอม *Chaetoceros calcitrans* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปทรงแผ่นแบน. วารสารสงขลานครินทร์ 2549, 28, 965-975.
- [22] C Wynn-Edwards, R King, S Kawaguchi, A Davidson, S Wrigh, PD Nichols and P Virtue. Development of a continuous phytoplankton culture system for ocean acidification experiments. Water 2014, 6, 1860-1872.

# การเติบโตและองค์ประกอบกรดไขมันของไดอะตอมท้องน้ำ *Nitzschia* BUUC1501 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิคโซโทรฟิก

## Growth and fatty acid compositions of a benthic diatom *Nitzschia* BUUC1501 cultured under autotrophic and mixotrophic conditions

มะลิวัลย์ กุดะโค<sup>1\*</sup>, ปวีณา ตปนียวรวงศ์<sup>2,3</sup>, นิษา สिरนนท์ธนา<sup>4</sup>, จันทรจรัส วัฒนะโชติ<sup>4</sup>,  
 รชนิมุข หิรัญสังจาเลิศ<sup>1</sup>, ชลี ไพบูลย์กิจกุล<sup>1</sup> และ สรวิต เผ่าทองสุข<sup>2,3</sup>

Maliwan Kutako<sup>1\*</sup>, Paveena Tapaneeyaworawong<sup>2,3</sup>, Nisa Siranonthana<sup>4</sup>,  
 Janjarus Watanachote<sup>4</sup>, Rachanimuk Hiransuchalert<sup>1</sup>, Chalee Paibulkichakul<sup>1</sup>  
 and Sorawit Powtongsook<sup>2,3</sup>

**บทคัดย่อ:** จากการเพาะเลี้ยงไดอะตอมท้องน้ำ *Nitzschia* sp. สายพันธุ์ BUUC1501 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกด้วยอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) และสภาวะมิคโซโทรฟิกที่ใช้อาหาร F/2 ผสมอาหาร Nutrient broth และกลูโคส 10 ก./ล. ปริมาตรเลี้ยง 2 ล. ให้แสง 4,300 ลักซ์ ตลอดเวลา ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่เติบโตภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกสามารถให้ผลผลิตมวลชีวภาพ  $451.73 \pm 29.15 \times 10^7$  เซลล์/ล./วัน ซึ่งสูงกว่าสภาวะมิคโซโทรฟิก (P<0.05) แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิคโซโทรฟิกมีปริมาณไขมัน  $26.73 \pm 1.02\%$  ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ในสภาวะออโตโทรฟิก (P<0.05) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวพบในเซลล์ที่เติบโตในสภาวะมิคโซโทรฟิก 28.59% ของกรดไขมันทั้งหมด และสูงกว่าเซลล์ที่เติบโตในสภาวะออโตโทรฟิก (P<0.05) ในขณะที่ กรดไขมันเชิงซ้อนชนิด eicosapentaenoic acid พบเฉพาะในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิก โดยมีปริมาณ 4.38% ของกรดไขมันทั้งหมด

**คำสำคัญ:** ไดอะตอมท้องน้ำ *Nitzschia* sp., สภาวะออโตโทรฟิก, สภาวะมิคโซโทรฟิก, การเติบโต, กรดไขมัน

**ABSTRACT:** Cultivation of a benthic diatom *Nitzschia* BUUC1501 was performed under autotrophic and mixotrophic conditions. Autotrophic condition was performed using Guillard's F/2 medium (Guillard, 1973). Mixotrophic culture medium was standard F/2 medium supplemented with nutrient broth and 10 g/L glucose. Both autotrophic and mixotrophic cultures were conducted in 2L bottle and incubated under continuous 4300 Lux illumination. With autotrophic condition, the maximum biomass productivity was  $451.73 \pm 29.15 \times 10^7$  cells/L/day. This productivity was significantly higher than mixotrophic condition (P<0.05). Under mixotrophic condition, the lipid content was  $26.73 \pm 1.02\%$  of dry weight which was significantly higher than autotrophic cultivation. Total monounsaturated fatty acids of mixotrophic cultivation (28.59% in total fatty acids) was significantly higher than autotrophic cultivation (P<0.05). Moreover, eicosapentaenoic acid of 4.38% in total fatty acids was found only in autotrophic cultivation.

**Keywords:** *Nitzschia* sp., autotrophic condition, mixotrophic condition, growth, fatty acids

<sup>1</sup> คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

Faculty of Marine Technology, Burapha University Chanthaburi Campus

<sup>2</sup> ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

<sup>3</sup> ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

National Center of Genetic Engineering and Biotechnology

<sup>4</sup> สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Institute of Marine Science, Burapha University

\* Corresponding author: maliwan@buu.ac.th

## บทนำ

ไดอะตอม (diatom) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำหรับ่ายเซลล์เดียวที่ดำรงชีวิตคล้ายกับพืชโดยสร้างอาหารเองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านกระบวนการ Calvin-Benson cycle เรียกกระบวนการเติบโตแบบนี้ว่าแบบออโตโทรฟิค (autotrophic growth) ไดอะตอมท้องน้ำ (benthic diatom) สามารถเติบโตในที่มืดได้ด้วย โดยดูดซึมสารอินทรีย์คาร์บอนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน เป็นรูปแบบการเติบโตแบบเฮเทอโรโทรฟิค (heterotrophic growth) และไดอะตอมที่เติบโตภายใต้สภาวะที่มีทั้งแสงและสารอินทรีย์คาร์บอนเรียกว่าการเติบโตแบบมิกโซโทรฟิค (mixotrophic growth) ซึ่งแต่ละรูปแบบการเติบโตของไดอะตอมมีแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน เซลล์จึงมีกระบวนการเมแทบอลิซึมแตกต่างกัน ส่งผลให้การเติบโตและสารประกอบทางชีวภาพภายในเซลล์มีความแตกต่างกันได้ (Lowrey et al., 2015) ทั้งนี้ไดอะตอมจะสร้างพลังงานและอาหารสะสมในรูปของไขมัน ไดอะตอมจึงถือเป็นแหล่งของกรดไขมัน โดยเฉพาะในกลุ่มกรดไขมันเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) เช่น eicosapentaenoic acid หรือ EPA (20:5n3) ที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมนต่างๆ เช่น prostaglandins และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและภูมิแพ้ตนเอง นอกจากนี้ยังมีผลต่อพัฒนาการและการเติบโตของสัตว์น้ำ (Wah et al., 2015)

ไดอะตอมท้องน้ำ *Nitzschia* BUUC1501 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เป็นหนึ่งในไดอะตอมที่สามารถเติบโตได้ทั้งสภาวะออโตโทรฟิค มิกโซโทรฟิคและเฮเทอโรโทรฟิค แต่ไดอะตอมเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิค รองลงมาคือสภาวะมิกโซโทรฟิค (มะลิวัลย์ และคณะ, 2559) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทดลองขยายปริมาณการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคและมิกโซโทรฟิค เป็น 2 ล. เพื่อให้

ความเข้มแสงเท่ากับการทดลองในขวดรูปชมพู่เพื่อติดตามการเติบโต ปริมาณไขมันและองค์ประกอบกรดไขมันของไดอะตอม เพราะการทดลองในขวดรูปชมพู่ นั้นยังไม่ทราบข้อมูลปริมาณไขมันและกรดไขมันในไดอะตอม ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จะนำไปเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงไดอะตอมดังกล่าวสำหรับเป็นแหล่งกรดไขมันเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

## วิธีการศึกษา

### การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคและมิกโซโทรฟิค

เพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ที่แยกได้จากบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ในขวดแก้วที่มีบรรจุอาหาร 2 ล. เติมหิวเชื้อไดอะตอม 10% ของปริมาตรการเลี้ยง วางขวดเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ  $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส เติมหิวเชื้อที่ผ่านไส้กรองรูพรุน 0.22 ไมครอน และให้แสง 4,300 ลักซ์ ตลอดเวลา ทดลองเพาะเลี้ยงไดอะตอมให้มีรูปแบบการเติบโตที่แตกต่างกัน 2 สภาวะ คือ (1) สภาวะการเติบโตแบบออโตโทรฟิค โดยเพาะเลี้ยงไดอะตอมด้วยอาหารสูตรของกิลลาร์ด หรือ F/2 (Guillard, 1973) อาหารดังกล่าวเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt และผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ และ (2) สภาวะการเติบโตแบบมิกโซโทรฟิค ที่เพาะเลี้ยงไดอะตอมในอาหารสูตร F/2 ผสมอาหารสูตร Nutrient broth (NB medium) ที่มีส่วนประกอบของเปปโตนิเยสส์สกัดและเนื้อสกัดในปริมาณ 5, 2 และ 1 ก./ล. ตามลำดับ (Bridson, 1995) และกลูโคส 10 ก./ล. (ชมพูนุท และคณะ, 2544) อาหารเตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt และผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับสภาวะออโตโทรฟิค แต่ละสภาวะการทดลองทำ 3 ขั้ว ตลอดการทดลอง 9 วัน ได้นับเซลล์ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด นำค่าที่ได้ไปคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะของไดอะตอม (specific growth rate,  $\mu$ ) ในหน่วยต่อวัน ดังนี้  $\mu = (\ln C_2 - \ln C_1) / (t_2 - t_1)$  โดยที่  $C_2$  และ  $C_1$  คือจำนวนเซลล์ ( $\times 10^4$  เซลล์/มล.) ณ เวลา  $t_2$  และ  $t_1$  (วัน)

ตามลำดับ และคำนวณผลผลิตเซลล์ (biomass productivity,  $P_{\max}$ ) ในหน่วยเซลล์/ล./วัน ดังนี้  $P_{\max} = C_{\max} \times \mu_{\max}$  โดยที่  $C_{\max}$  คือ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ( $\times 10^4$  เซลล์/มล.) (Contreras Gomez et al., 1998) ซึ่งวันสุดท้ายของการทดลองได้เก็บเซลล์มาปั่นเหวี่ยง และทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer (รุ่น Beta 1-8 LO plus, Martin Christ)

### การวิเคราะห์ปริมาณไขมันและองค์ประกอบกรดไขมันของไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501

นำเซลล์แห้ง 50 มก. มาสกัดไขมันตามวิธีของ Folch et al. (1957) โดยใช้สารละลายผสม Chloroform:Methanol เมื่อได้สารละลายไขมันจะนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator (รุ่น R-210, Buchi) พันด้วยก๊าซไนโตรเจนและชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักไขมัน จากนั้นละลายไขมันด้วยสารละลายผสม Chloroform:Methanol ที่ผสม BHT แล้วทำการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (tranesterification) ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Christie (2003) และนำสารละลายไประเหยและเป่าแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน จากนั้นละลายกรดไขมันด้วย n-hexane ปริมาตร 1 มล. นำสารละลายกรดไขมันไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (รุ่น 7890A, Agilent) ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดเป็น Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์รุ่น 19091N-133, HP-INNOWAX (Agilent) ฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร แบบ split (5:1) อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม 1.1 มล./นาที อุณหภูมิจุดฉีดสาร 240 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ detector 260 องศาเซลเซียส โดยเริ่มต้นที่ 35 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้ 0.5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 170 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที และคงอุณหภูมิไว้ 3 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 240 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียส/นาที คงไว้ 3 นาที รวมเวลาวิเคราะห์ 86.5 นาที จำแนกชนิดกรดไขมันโดยเปรียบเทียบกับ Retention Time ของกรดไขมันมาตรฐาน 37 Component FAME Mix (Supelco)

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลการเติบโตจำเพาะ ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด ผลผลิตมวลชีวภาพและปริมาณกรดไขมันของไดอะตอม ด้วยวิธี T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P \leq 0.05$ ) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 15

### ผลการศึกษาและวิจารณ์

#### การเติบโตของไดอะตอมที่องน้ำ *Nitzschia* BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิก

ไดอะตอม *Nitzschia* sp. BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกและมิกโซโทรฟิกสามารถเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณ (log phase) ได้โดยที่ไม่มีระยะพักเซลล์ (lag phase) (Figure 1) และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิกมีอัตราการเติบโตสูงกว่าสภาวะมิกโซโทรฟิก ( $P \leq 0.05$ ) รวมถึงผลผลิตมวลชีวภาพไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงแบบสภาวะออโตโทรฟิกมีค่าสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิก ( $P \leq 0.05$ ) (Table 1) ประมาณ 2.2 เท่า ซึ่งแตกต่างจากหลายงานวิจัยที่พบว่าไดอะตอม *Synedra acus* และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* เติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก (Shishlyannikov et al., 2014; Li et al., 2014) ทั้งนี้เพราะการเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิกในงานวิจัยนี้ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 ก./ล. คิดเป็น 4 ก.คาร์บอน/ล. ซึ่งกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เซลล์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรง จึงส่งเสริมให้เซลล์เติบโตได้ดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ แต่หากมีความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจมีผลยับยั้งการเติบโตของไดอะตอมได้ (Morales-Sánchez et al., 2013) ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในขนาด

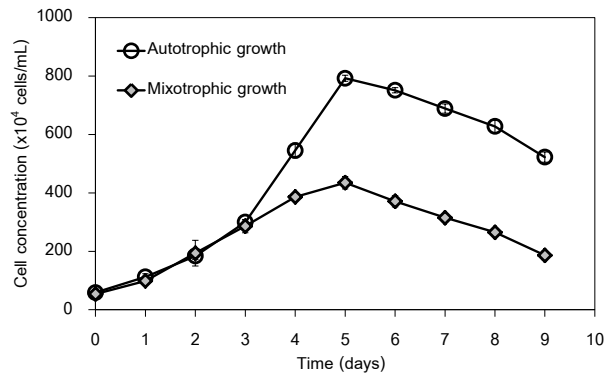


Figure 1 Density of *Nitzschia* sp. BUU1501 under different conditions

Table 1 Specific growth, maximum cell density and biomass productivity of *Nitzschia* sp. BUU1501 under autotrophic and mixotrophic conditions. Values are mean  $\pm$  standard deviation of three replicate cultures. Different letters in column represent significant differences at  $P \leq 0.05$ .

Growth condition	Specific growth rate (day <sup>-1</sup> )	Maximum cell density (x10 <sup>4</sup> cells/mL)	Biomass productivity (x10 <sup>7</sup> cells/L/day)
Autotrophic growth	0.57 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	792.50 $\pm$ 10.60 <sup>a</sup>	451.73 $\pm$ 29.15 <sup>a</sup>
Mixotrophic growth	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	435.12 $\pm$ 22.32 <sup>b</sup>	204.51 $\pm$ 11.18 <sup>b</sup>
P-value	0.2290	0.0086	0.0081

### การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501

วิเคราะห์ปริมาณไขมันในไดอะตอมในวันที่ 9 ของการเลี้ยง ซึ่งสาหร่ายที่เติบโตในระยะพัก (lag phase) ระยะทวีคูณ (log phase) ระยะคงที่ (stationary phase) และระยะตาย (death phase) จะมีปริมาณไขมันเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ เพราะปริมาณสารอาหารลดลง เซลล์จึงสะสมพลังงานและอาหารไว้ในรูปของไขมัน (Pratiwi et al., 2009) ไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ที่เพาะเลี้ยงแบบมิกโครโทรฟิคมีไขมัน 26.73 $\pm$ 1.02% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคที่มีปริมาณ 18.83 $\pm$ 0.58% ของน้ำหนักแห้ง ( $P \leq 0.05$ ) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งการเพาะเลี้ยงไดอะตอมภายใต้สภาวะมิกโครโทรฟิค เซลล์ได้รับคาร์บอนทั้งสารอินทรีย์ (กลูโคส) และสารอนินทรีย์ (ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์) ในขณะที่สภาวะออโตโทรฟิค เซลล์มีแหล่งคาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เพียงอย่างเดียว จึงส่งผลให้เซลล์ที่เติบโตในสภาวะมิกโครโทรฟิคนำคาร์บอนไปสร้างมวลชีวภาพและสะสมในรูปไขมันได้รวดเร็ว (Bhatnagar et al., 2010)

จาก Table 2 แสดงให้เห็นว่า ไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิคและมิกโครโทรฟิคมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFAs) 72.56 และ 71.41% ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เช่นเดียวกับไดอะตอม *Chaetoceros gracilis* ที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเติบโตจนถึงระยะตาย (Pratiwi et al., 2009) และผลการทดลองพบว่าไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 มี palmitic acid (16:0) สูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดอื่น ทั้งนี้เป็นลักษณะเฉพาะของสาหร่ายในกลุ่ม Bacillariophyceae หรือไดอะตอมที่มักพบกรดไขมันชนิดนี้สะสมในเซลล์สูงสุด เพื่อทำหน้าที่เกี่ยวกับการสะสมพลังงานของไดอะตอม โดยกรดไขมันชนิดนี้จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในระยะที่มีปริมาณสารอาหารลดลง



(Mansour et al., 2003) การเพาะเลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิคมีชนิดและปริมาณรวมของกรดไขมันเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids, MUFAs) สูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิค ( $P \leq 0.05$ ) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง oleic acid (18:1n9c) ที่มีความสำคัญในการเริ่มสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน หรือ PUFAs ด้วยกระบวนการ desaturation และ elongation และมักพบว่าหากปริมาณ oleic acid ลดลงก็จะพบ PUFAs

เพิ่มสูงขึ้น (Pratiwi et al., 2009) แต่ในงานวิจัยนี้พบว่า EPA (20:5n3) จะมีเฉพาะในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิคเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากไดอะตอมเติบโตได้ดีในสภาวะนี้ ดังนั้นไดอะตอมจะผลิตออกซิเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะมิกโซโทรฟิคซึ่งออกซิเจนมีความจำเป็นในกระบวนการ desaturation และ elongation เพื่อสร้างกรดไขมันในกลุ่ม  $\omega$ -3 ซึ่งรวมถึง EPA ด้วย (Wen and Chen, 2003)

**Table 2** Percentage of fatty acid in total fatty acids of *Nitzschia* BUUC1501 cultured under different conditions. Values with different letters in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Fatty acid	Autotrophic growth	Mixotrophic growth	P-value
<u>Saturated fatty acid</u>			
13:0 (Tridecylic acid)	6.55±0.36 <sup>b</sup>	20.88±0.75 <sup>a</sup>	0.0000
14:0 (Myristic acid)	7.90±0.52 <sup>a</sup>	3.67±0.05 <sup>b</sup>	0.0001
15:0 (Pentadecanoic acid)	7.78±0.66 <sup>a</sup>	5.05±0.17 <sup>b</sup>	0.0023
16:0 (Palmitic acid)	33.00±2.38 <sup>a</sup>	26.78±0.43 <sup>b</sup>	0.0111
18:0 (Stearic acid)	17.33±0.98 <sup>a</sup>	15.03±0.22 <sup>a</sup>	0.1690
<u>Monounsaturated fatty acid</u>			
16:1 (Palmitoleic acid)	20.97±1.50 <sup>a</sup>	13.36±0.11 <sup>b</sup>	0.0009
18:1n9c (Oleic acid)	2.09±3.61 <sup>a</sup>	7.79±0.12 <sup>a</sup>	0.0525
18:1n9t (Elaidic acid)	ND	7.45±0.28	ND
<u>Polyunsaturated fatty acid</u>			
20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	4.38±3.82	ND	ND
SFAs	72.56±4.90 <sup>a</sup>	71.41±0.32 <sup>a</sup>	0.0034
MUFAs	23.06±2.11 <sup>b</sup>	28.59±0.17 <sup>a</sup>	0.0890
PUFAs	4.38±3.82	ND	ND

Remark: ND was not detected.

### สรุป

การเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Nitzschia* BUUC1501 ในขวดปริมาตร 2 ลิ. พบว่าเซลล์ให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะออโตโทรฟิค โดยให้ผลผลิตมวลชีวภาพสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิค 2.2 เท่า แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิคมีไขมันและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสะสมสูงกว่าสภาวะออโตโทรฟิค ส่วนกรดไขมันชนิด eicosapentaenoic acid พบเฉพาะในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะออโตโทรฟิคเท่านั้น

### คำขอบคุณ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 124/2560

## เอกสารอ้างอิง

- ชมพูนุท ชัยรัตน์, สรวิต เผ่าทองสุข และสมเกียรติ ปิยะธีรฉัตรวิรุณกุล. 2546. การเติบโตของไดอะตอม *Amphora delicatissima* ในที่มีได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก. วารสารสงขลานครินทร์ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 25(2): 205-212.
- มะลิวัลย์ คุณตะโค, สมเกียรติ แวนมณี, ปวีณา ตบเนียนวงศ์, สุรเชษฐ์ บุญธนาอินย และสรวิต เผ่าทองสุข. 2560. การเติบโตแบบออโตโทรฟิก มิกโซโทรฟิกและเฮเทอโรโทรฟิกของไดอะตอมท้องถิ่น *Nitzschia* sp. BUUC1501. แก่นเกษตร. 45(ฉบับพิเศษ 1): 915-920.
- Bhatnagar, A., M. Bhatnagar, S. Chinnasamy, and K. Das. 2010. *Chlorella minutissima*-a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. Appl. Biochem. Biotechnol. 161: 523-536.
- Bridson, E.Y. 1995. The Oxoid Manual. 7 ed. Unipath Limited, London.
- Christie, W. W. 2003. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. 3rd editions. The Oily Press, Bridgewater, UK. 416 pp.
- Contreras Gómez, A., F. García Camacho, J. Merchuk, and E. Molina Grima. 1998. Interaction between CO<sub>2</sub>-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. Biotechnol. Bioengng. 60: 318-325.
- Folch, J., M. Lees, and G.H.S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry. 226: 497-509.
- Guillard, R. R. L. 1973. Method for Microflagellates, and Nanoplankton. In: Stein, J. R. (ed). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University, New York.
- Li, Y-R., W-T. Tsai, Y-C. Hsu, M-Z., Xie and J-J. Chen. 2014. Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. Energy Procedia. 52: 371-376.
- Lowrey, J., M.S. Brooks, and P.J. McGinn. 2015. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. J Appl Phycol. 27:1485-1498
- Mansour, M.P., J.K. Volkman, and S.I. Blackburn. 2003. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. In batch culture. Phytochemistry. 63:145-153.
- Morales-Sánchez, D., R. Tinoco-Valencia, J. Kyndt, and A. Martinez. 2013. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. Biotechnology for Biofuels. 6(100): 1-12.
- Shishlyannikov, S.M., I.V. Klimenkov, Y.D. Bedoshvili, I.S. Mikhailov and A.G. Gorshkov. 2014. Effect of mixotrophic growth on the ultrastructure and fatty acid composition of the diatom *Synedra acus* from Lake Baikal. J Biol Res (Thessalon).21(1): 15-21.
- Wah, N.B., A.L. Ahmad, D.C.J. Chieh, and A.T.S. Hwai. 2015. Changes in lipid profiles of a tropical benthic diatom in different cultivation temperature. Asian Journal of Applied Science and Engineering. 4(2): 91-101.
- Zhi-You, W., and F. Chen. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. Biotechnology Advances.21(4): 273-294.

## ประวัตินักวิจัยพร้อมหน่วยงาน

**นางมะลิวัลย์ คุดะโค**

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

**นางสาวปวีณา ตปนียวรงค์**

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**นายชลิ ไพบูลย์กิจกุล**

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

**นางรชนิมุข หิรัญส์จจาเลิศ**

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี