รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืช และจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็ก
   กิจกรรม : การพัฒนาสาหร่ายขนาดเล็กที่มีสารสำคัญ
   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญและการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญ
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Screening of microalgae with high potential to produce important substances and the study of appropriate factors to stimulate the accumulation of important substances.

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นายนราทร สุขวิเสส กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร
นางสาวปาริชาติ อยู่แพทย์
นางสาวสุปรียา ศุขเกษม
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กและการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญ ดำเนินการทดลองที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2560 - 2562 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญที่มีประโยชน์ ดังนี้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) และ *Coelastrum* sp. (SK-KhY6) โพลีแซคคาไรด์สกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrum microporum* (A052) ไขมันสกัดได้จาก *Botryococcus* sp. (CM01-4) และโพลีเมอร์สกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Nostoc* sp. (Sm6-3) จากผลการศึกษา

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กทั้งหมด 4 สูตร คือ BBM, C-medium, BG-11 และ Modified Chu-13 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ พบว่าสูตร Modified Chu-13 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ CM01-4 สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.31×10^6 และ 6.20×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และใช้ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 และ 25 วันตามลำดับ สูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 และ A052 สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 1.29×10^6 และ 1.28×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วันเท่ากัน และสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 (N-free) เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท Sm6-3 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด 2.45×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 15 วัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอิทธิพลในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สาหร่ายไอโซเลท Sm6-3 มีการสะสมสารโพลิเมอร์ชีวภาพสุงสุดที่ 1.62 %โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สาหร่ายไอโซเลท CM01-4 มีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 39 %โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 มีการสะสมแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ได้สูงสุด 3.45 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง และสาหร่ายไอโซเลท A052 มีการสะสมพอลีแซคคาสูงสุด 6.51 %ต่อน้ำหนักแห้ง

คำหลัก: สาหร่ายขนาดเล็ก การเพาะเลี้ยง แคโรทีนอยด์ ไขมัน โพลีแซคคาไรด์ และไบโอพอลิเมอร์

Abstract

Selection of microalgae to study factors for stimulated the substances accumulation was performed at Postharvest and Processing Research and Development Division during 2017-2019. It aimed to study the optimum condition and identifying the species of microalgae with high potential for producing various important substances. The important substances can be extracted from the microalgae cells with strain identified isolate by sequence as follows bioactive substances *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) and *Coelastrum* sp. (SK-KhY6), polysaccharides from *Coelastrum microporum* (A052), lipid from *Botryococcus* sp. (CM01-4) and biopolymer from *Nostoc* sp. (Sm6-3). The results of 4 standard culture media formulas as BBM, C-medium, BG-11 and Modified Chu-13, cultured under laboratory conditions. The results revealed that Modified Chu-13 formula is suitable for culture of isolate SK-QSGMF6 and CM01-4. The highest growth rate of each isolate is 2.31×10^6 and 6.20×10^5 CFU with 15 and 25 cultivation days, respectively. The BG-11 formula is suitable for culture of isolate SK-KhY6 and A052. The highest growth rate of each isolate 1.29×10^6 and 1.28×10^6 CFU with 15 days cultivation same.

In BG-11 (N-free) formula suitable for isolate Sm6-3 give the highest growth rate of 2.45x 10^6 CFU with 15 days cultivation. In addition, studies induce to accumulate of important substances in microalgae cells by adding NaCl at the concentration of 0.1, 0.2 and 0.3 molar. The results showed that the addition of NaCl 0.1 molar is suitable for the isolate Sm6-3 the biopolymer maximum biomass was 1.62 %wt. The concentration of NaCl 0.2 molar is suitable for isolate CM01-4 Maximum fat accumulation in cells is 39% by weight. The concentration of NaCl 0.3 molar isolate SK-QSGMF6 and SK-KhY6 has accumulated carotenoids within the cells up to 3.45 and 3.56 mg/g_{dried} and isolate A052 had the highest accumulation of polysaccharides 6.51 % dry weight.

Keywords: microalgae, carotenoid, fat, polysaccharides, and biopolymer

6. คำนำ

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์ที่มีลักลักษณะเซลล์เดียวหรือกลุ่มโคโลนี แต่ไม่มีส่วนที่เป็นลำต้น รากและใบที่แท้จริง สามารถสร้างอาหารได้เองโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไปแต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่า และสามารถเจริญได้ในทุกพื้นที่ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำเค็มสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่มคือ

1. โปรคาริโอต ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน(Blue-green algae, Cyanobacteria)
2. ยูคาริโอต ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว(Chlorophyta) สาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) และไดอะตอม (Bacillariophyta) เป็นต้น

โครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก มีอาหารสะสมเป็นสารประกอบในรูปแบบต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรตซึ่งจะอยู่ในรูปของโพลีแซคคาร์ไรด์หรือแป้ง ไขมันหรือน้ำมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์ รวมทั้งมีสารสีหรือรงควัตถุ (Pigment) เป็นองค์ประกอบ กระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูงๆ จึงต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของอาหารได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน คาร์บอน ไนโตรเจน กำมะถันและฟอสฟอรัส กับจุลธาตุอื่น ๆ (Microalgae biotechnology, 2014) และระบบการเพาะเลี้ยงที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณชีวมวลวสาหร่ายที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. ระบบการเพาะเลี้ยงได้แก่ การเพาะเลี้ยงระบบบ่อเปิด และในถังปฏิกรณ์แบบปิดชนิดต่างๆ
2. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ประกอบด้วย
   - คาร์บอน ซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในวัฏจักรคาลวิน ในปฏิกิริยาที่เรียกว่า phothosynthesis dark reactions ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้แน่ใจว่ามีคาร์บอนเพียงพอจึงควรมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมให้มากเกินพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์สาหร่าย

- ไนโตรเจน โดยในชีวมวลของจุลินทรีย์สาหร่ายสามารถพบไนโตรเจนได้ในรูปของโปรตีนและนิวคลีโอไทด์ ถึงประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง โดยแหล่งไนโตรเจนสามารถได้จากธาตุอาหารหลายแหล่ง เช่น ยูเรีย กรดอะมิโน แอมโมเนียม (NH4 +) และไนเตรต (NO3-) ซึ่งไนเตรทเป็นไนโตรเจนในรูปแบบที่พบได้บ่อยที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับสาหร่าย โดยการให้แอมโมเนียมจะมีผลเสียเมื่อให้ที่ความเข้มข้นสูงเกินไปจึงนียมใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ (50 มก. /ล.) ซึ่งจะใช้กับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดเช่น สาหร่ายเกลียวทอง (Artrospira) ข้อดีของสารอาหารนี้คือช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่ไม่พึงประสงค์และเป็นปัจจัยความเครียดที่อาจทำให้การผลิตเม็ดสีในไซยาโนแบคทีเรีย

- กำมะถันและฟอสฟอรัสถึงแม้จะมีผลเล็กน้อยต่อการเพิ่มชีวมวลสาหร่าย แต่ก็ยังเป็นส่วนสำคัญเพราะฟอสฟอรัสส่วนใหญ่จะถูกส่งมาเป็นฟอสเฟตในขณะที่กำมะถันจะถูกจัดเป็นซัลเฟต ซึ่งในการเตรียมสารละลายเข้มข้น (สต็อก) สำหรับใช้เตรียมสูตรอาหาร ควรระมัดระวังเป็นพิเศษจากแอนไอออนของสารละลายเหล่านี้จะก่อให้เกิดการตกตะกอนที่ไม่ละลายในหลายแคทไอออน

- ธาตุอื่น ๆ เช่น ธาตุแมกนีเซียมและแมงกานีสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าคาร์บอนหรือไนโตรเจน เนื่องจากมีไอออนบวกอยู่ในคลอโรฟิลล์ในวงแหวน porphyrin ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้ในขั้นตอนของการสังเคราะห์ด้วยแสง

3. แหล่งของคาร์บอนไม่ว่าจะอยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือ สารประกอบคาร์บอร์เนต กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วงความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 1-5% (โดยปริมาตร) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กควรมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจากมีอิทธิพลต่อความหลากหลายของสารอนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ได้แก่ CO_2 และ HCO_3^-

4. ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ แสง ค่าความเป็นกรดด่าง ออกซิเจนค่าสัดส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัส หรืออุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีผลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

แนวทางการใช้ประโยชน์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

1. ผลิตเป็นอาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอาง

จากโครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่ายที่ประกอบไปด้วยโปรตีน มีอาหารสะสมเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตในรูปของโพลีแซคคาร์ไรด์ หรือแป้ง (starch) ไขมันในรูปของ Triacylglycerides (TAGs) หรือน้ำมัน (oils) นอกจากนั้นยังมีรงควัตถุ (pigment) ชนิดต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น ทำให้มีการนำสาหร่ายขนาดเล็กมาประยุกต์ใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีมูลค่าสูง เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเภสัชภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลายในทางการค้า เช่น การผลิตแอสตาแซนทินและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน และโพลีแซคคาไรด์

1.1 การผลิตแอสตาแซนทินและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีโปรตีน

โดยสาหร่ายสีเขียวทุกชนิดมีรงควัตถุหลักที่พบ 3 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียว แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง และไฟโคบิลินเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน โดยเฉพาะรงควัตถุที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงคือ แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ซึ่งร่างกายมนุษยไมสามารถสรางแคโรทีนอยดได้แต่จะได้รับสารชนิดนี้จากอาหารที่รับประทานเข้าไป สามารถนำไปใช้ในวงการอุตสาหกรรมด้านอาหาร เครื่องสำอาง และเวชภัณฑ์ต่างๆ ได้เช่น ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDLสามารถลดอัตราการเกิดเซลล์มะเร็ง เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ชวยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรัง ตาง ๆ เชน โรคมะเร็ง หรือโรคหัวใจแคโรทีนอยด์แบ่งออกเปน 2 กลุม คือ

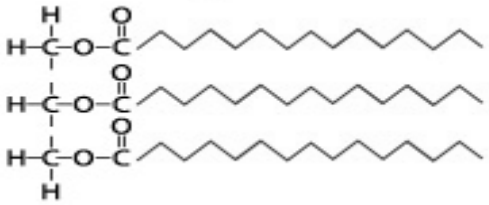
- กลุมแคโรทีน (carotene) เปนโมเลกุลที่ประกอบดวยสายไฮโดรคารบอน ทำใหเปนสารไมมีขั้วและละลายไดในไขมัน ไดแก เบตาแคโรทีน และ ไลโคพีน เปนตน
- กลุมแซนโทฟล (xanthophyll) มีอะตอมของออกซิเจนอยูในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกวาและละลายในไขมันไดนอยกวาแคโรทีนอยดกลุมแรก ไดแก ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น

โดยสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ แอสตาแซนธิน โดยสามารถออกฤทธิ์ได้เลยไม่ต้องเปลี่ยนเป็นวิตามินเอในร่างกาย มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก ซึ่งมีคะแนน ORAC สูงกว่า Vitamin C ,Alpha-Lipoic acid , Vitamin A , Vitamin E , Lycopene และ Coenzyme Q-10 (ORAC Score หรือคะแนนโอแร็ค ย่อมาจาก Oxygen Radical Absorbance Capacity) ซึ่งอาหารที่มีค่า ORAC Score สูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านทาน และลดความเสี่ยงในการเกิดโรคร้ายแรง ซึ่งมีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็งและโรคหัวใจ เป็นต้น โดยสารนี้พบได้มากในสาหร่ายสีแดง (*Haematococcus Pluvialis*) (Kim JH et al., 2011) ปัจจุบันสาหร่ายชนิดนี้จึงกลายเป็นแหล่งวัตถุดิบสำคัญในการผลิต Astaxanthin เชิงพาณิชย์ เนื่องจากให้สาร Astaxanthin ปริมาณมากที่สุด และในงานวิจัยของ Qin *et al.* (2008) ได้ศึกษาการชักนำสาหร่ายให้เกิดการสะสมสาร astaxanthin โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus obliquus* ที่สภาวะแตกต่างกัน พบว่าสายหร่ายมีการสะสมสาร astaxanthin เพิ่มสูงถึง 44.66เปอร์เซ็นต์เมื่อเพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ โดยช่วงแรกเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสและให้อากาศในอัตรา 0.6 L min^{-1}, มีความเข้มแสง 80 mmol m^{-2} s^{-1}และเพิ่มความเข้มแสงเป็น 180mmol m^{-2} s^{-1}อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเมื่อเพาะเลี้ยงจนมีปริมาณเซลล์ประมาณ 1.7×10^7 mL^{-1}เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อการเปรียบเทียบการใช้ Carotenoid ชนิดต่างๆ ในการกำจัดอนุมูลอิสระพบว่าแอสตาแซนธินมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งปฏิกิริยา Lipid peroxidation โดยพบว่าใช้ปริมาณน้อยที่สุด

1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid)

น้ำมันที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็กนั้นมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นไตรกลีเซอไรด์ พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กหลายๆสายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสมสารอาหารไว้ในรูปของไขมันหรือน้ำมัน (oils) ชนิดไม่อิ่มตัวเช่น

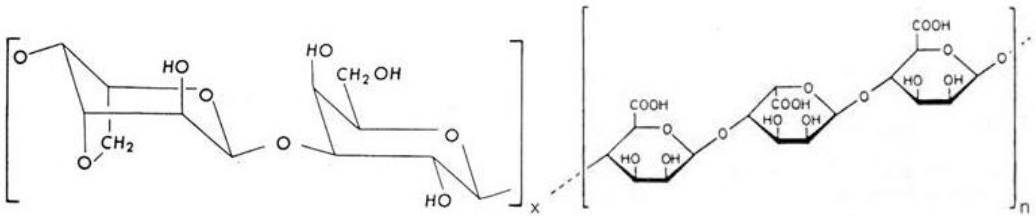
Docosahexaenoic acid (DHA) และ Eicosapentaenoic acid (EPA) และ Arachidonic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีความจำเป็นของร่างกาย สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารเสริมเพื่อสุขภาพหรือผลิตเป็นเวชภัณฑ์ชนิดต่างๆ ได้ (Brown, 2008)



Glycerol 3 Fatty acids

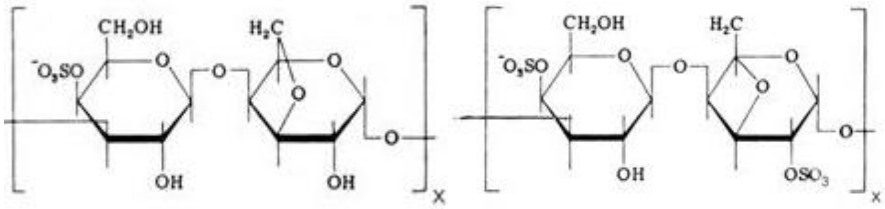
ที่มา: HR Bio Petroleum, 2008)

1.3 โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) หรือไกลแคน เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์หลายๆโมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายโพลิเมอร์ด้วยพันธะไกลโคสิดิก ซึ่งชนิดที่พบมากในพืชทั่วไป คือ แป้ง (Starch) เซลลูโลส และเพกติน โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ชนิดเดียวกันเรียกว่า โฮโมโพลีแซ็คคาไรด์ เช่น สตาร์ชเดกซ์ทริน เซลลูโลส และเพกติน แต่ถ้าเป็นคนละชนิดกันจะเรียกว่าเฮทเทอร์โรโพลิแซ็คคาไรด์ เช่น เฮมิเซลลูโลสอัลจิน (algin) และกัม (gums) เป็นต้น โพลีแซคคาไรด์ที่น้ำย่อยในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้เรียกว่า ใยอาหาร (fiber)



โครงสร้างของอะกาโรส โครงสร้างกรดอัลจินิก

ที่มา: DeMan (1990)



ชนิดแคปปา ชนิดไอโอตา

ที่มา: Whistler and Daniel (1990)

ในปัจจุบันโพลีแซคคาไรด์มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโพลีแซคคาไรด์มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถควบคุมอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (Li et. Al, 2011) ตลอดจนพบว่าสามารถเสริมสร้างหรือกระตุ้น

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Schaeffer and Krylov, 2000) สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร คือ กัม (gums) ซึ่งเป็นสารที่ให้ความข้น (thickening) ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizing) และทำให้เกิดลักษณะเป็นเจล (gelling) กัมที่สามารถสกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ เอการ์วุ้น (agar) อัลจิเนต (alginate) และคาราจีแนน (carageenan)

2. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตเป็นพลังงานทดแทน

สาหร่ายขนาดเล็กบางสายพันธุ์มีการสะสมอาหารไว้ในรูปของไขมันเป็นจำนวนมาก ซึ่งไขมันดังกล่าวจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ โดยพบว่ามีหลายสายพันธุ์มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงกว่า35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง เช่น สาหร่าย *Botryococcus braunii* มีปริมาณน้ำมัน25-80 เปอร์เซ็นต์ *Neochloris oleoabundans* มีปริมาณน้ำมัน35-65เปอร์เซ็นต์ หรือ *Schizochytrium* sp. มีปริมาณน้ำมัน 50-77 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (Chisti, 2007) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสาหร่ายขนาดเล็กมีศักยภาพในการพัฒนาสู่การผลิตไบโอดีเซล เพราะมีอัตราการให้น้ำมันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณเปอร์เซ็นต์น้ำมันกับชีวมวลที่ผลิตได้ อันเนื่องมาจากสาหร่ายขนาดเล็กมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้กว่าพืชน้ำมันอื่นๆ ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคด้านต่างๆ ดังรายงานบางส่วนต่อไปนี้

Qin (2005) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ในอาหารสูตร Modified Chu 13 ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0.15 โมลาร์ และความเข้มข้นแสง 60 วัตต์ต่อตารางเมตร ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตดีที่สุด และ Dayananda *et al*. (2007) ได้ศึกษาชนิดของสูตรอาหารที่มีต่อการเจริญและสะสมน้ำมันของสาหร่าย โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะแบบให้แสง16:8 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า modified Chu 13 medium และ BG11 ให้ปริมาณการสะสมน้ำมันสูง โดยพบว่าโพแทสเซียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ชีวมวล 1.2 กรัมต่อลิตร และสะสมน้ำมันได้ 30-35เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในขณะเดียวกันเมื่อใช้ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ชีวมวลของสาหร่าย 0.9 กรัมต่อลิตร และสะสมน้ำมันได้ 28-35เปอร์เซ็นต์โดยพบว่าสาหร่ายจะผลิตกรดไขมัน ที่มีสายคาร์บอนยาวขนาดน้อยกว่า C_{20}

Miao and Wu (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella protothecoides* โดยใช้อาหารสูตร Basal medium ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค และเฮทเทอโรโทรฟิค พบว่าในสภาวะเฮทเทอโรโทรฟิค สาหร่ายมีการสะสมน้ำมันสูงถึง 55.2 เปอร์เซ็นต์โดยมากกว่าสภาวะออโตโทรฟิคประมาณ 4 เท่า (14.57 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำไปศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล คือ เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันที่ 56:1 โมลาร์ ทำให้ได้ Crude lipid ออกมาจากเซลล์สาหร่ายเป็นปริมาณสูงถึง 55.2เปอร์เซ็นต์

Rao *et al*. (2007) ได้ใช้อาหารสูตร Modified Chu 13 ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ตลอดระยะการเพาะเลี้ยง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์2เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)ให้ผลผลิตชีวมวลได้สูงที่สุดคือ 2 กรัมต่อลิตร มีน้ำมันสะสมสูงถึง 14-28เปอร์เซ็นต์โดยพบว่ามีปริมาณกรดไขมันชนิดปาลมิติกและโอเลอิกเพิ่มขึ้น 2.5-3 เท่า

Hossain *et al*.(2008) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Oedogonium* sp. และ *Spirogyra* sp. ทำการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายโดยใช้เฮกเซน : อีเทอร์อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา24ชั่วโมง พบว่าสาหร่าย*Oedogonium* sp. มีน้ำมันมากกว่าสาหร่าย *Spirogyra*sp. คือ 9.2 เปอร์เซ็นต์และ 7.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นทำการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันพบว่าสาหร่าย *Oedogonium* sp. สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์มากกว่าผลได้ของไบโอดีเซลจากสาหร่าย *Spirogyra*sp.92 เปอร์เซ็นต์

Converti *et al. (*2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของไนโตรเจนในการชักนำให้มีการสะสมน้ำมันในสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* โดยใช้อาหารสูตร Guillard ที่อุณหภูมิ 15 20 และ 25 องศาเซลเซียสลดไนโตรเจน ($NaNO_3$) ลงจาก 0.30 กรัมต่อลิตร เหลือ 0.15 กรัมต่อลิตร และ 0.075 กรัมต่อลิตร สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารสูตร Bold's Basal medium (BBM) ที่อุณหภูมิ 25,30 และ 35 องศาเซลเซียสลดไนโตรเจน ($NaNO_3$) ลงจาก 1.50 กรัมต่อลิตร เหลือ 0.75 กรัมต่อลิตร และ 0.375 กรัมต่อลิตร พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการชักนำให้สาหร่าย *N. oculata* มีการสะสมน้ำมันคือ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำมัน 14.92 เปอร์เซ็นต์และความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 0.075 กรัมต่อลิตร ทำให้มีปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้น 7.88 เปอร์เซ็นต์ เป็น 15.86 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สาหร่าย *C. vulgaris* อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำมัน 14.71เปอร์เซ็นต์และความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 0.375 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นจาก 5.90 เปอร์เซ็นต์ เป็น 15.86 เปอร์เซ็นต์

3. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตโพลิเมอร์และพลาสติกชีวภาพ

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นหัวข้อที่มีการพูดถึงกันอย่างกว้างขวางและเป็นประเด็นหลักในการพัฒนาวัสดุสำหรับการใช้งานในอนาคตอันใกล้ซึ่งแบ่งตามแหล่งกำเนิดวัตถุดิบได้ 2 ประเภทคือพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีและพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบมวลชีวภาพ ปัจจุบันพลาสติกประเภทหลังกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งโดยนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักธุรกิจและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกำลังตื่นตัวในการคิดค้นหาวัตถุดิบมวลชีวภาพ (biomass) ในการผลิตพลาสติกชนิดใหม่ เช่นกลุ่มพอลิแลคติก (PLA) หรือพอลิแลคไทด์กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) และกลุ่มพอลิไฮดรอกซีบิวไทเรต (PHB) เป็นต้น การนำสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการผลิต Poloy-3-hydroxybutyrate (PHB) ซึ่งเป็นส่วนกระกอบที่พบในเซลล์ชั้นในของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอตเป็นส่วนใหญ่ โดยคุณสมบัติที่สำคัญของ PHB

คือมีความสามารถทนความร้อนได้สูงไม่ละลายน้ำและสามารถย่อยสลายได้ ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักจากแบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียหรือที่รู้จักกันในชื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) โดยสายพันธุ์ในกลุ่มนี้ที่มีนักวิจัยได้ทำการศึกษาได้แก่ สายพันธุ์ *Nostoc* sp. (Sabbir และ Tasneem, 2016) การผลิตเม็ด PHB ใน *Nostoc muscorum* NCCU- 442 และ *Rhodopseudomonas* sp. (Pietro et. al., 2018) เป็นต้น รวมทั้งการศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมยกตัวอย่างเช่น ผลการศึกษาของ Khanna และ Srivastava (2005) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลกลูโคส กรดแลกติก กากน้ำตาล กลีเซอรอล กรดอะซิติก ไซโลส กรดโปรไพโอนิก แป้ง และน้ำตาลแลคโตสพบว่าน้ำตาลฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอนนที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ Ralstonia eutropha สามารถผลิต PHAs ได้สูงสุด Stein buchyl (1991) ได้ศึกษาศักยภาพการผลิต PHAs จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ต่างกัน จะมีศักยภาพในการผลิต PHAs ได้ต่างกัน ซึ่งมีองค์ประกอบของ PHAs ที่แตกต่างกันด้วย

ทั้งนี้ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อให้มีผลผลิตชีวมวลและสารสำคัญในปริมาณที่สูงๆนั้น จะต้องทำการเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาวะการชักนำ (Stress condition) ที่เหมาะสมเพื่อให้สาหร่ายขนาดเล็กเกิดการสะสมสารสำคัญบางชนิดไว้ในเซลล์เพิ่มขึ้น โดยปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำ ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาการให้แสง ความเข้มของแสง ความเป็นกรดด่าง ปริมาณไนโตรเจนในสารอาหาร ตลอดจนระดับความเค็มในอาหารที่ใช้ทำการเพาะเลี้ยง เป็นต้น นอกจากนั้นจะต้องมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์สาหร่ายให้มีศักยภาพในการเจริญเติบโตที่ดี รวดเร็ว และมีการสะสมสารชนิดต่างๆที่ต้องการในระดับที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดงานวิจัยของ ประยูร เอ็นมาก และคณะ (2557) จากโครงการวิจัยระหว่างปีงบประมาณ 2554 – 2557 ได้รวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติตามรายภาคของประเทศไทยได้หลากหลายสายพันธุ์ จึงได้มีการนำมาคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญอื่นๆ เช่น การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสี แคโรทีนอยด์ โพลีแซคคาไรด์ กรดไขมัน และโพลิเมอร์ชีวภาพ เพื่อนำมาพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและการชักนำด้วยสภาวะความเค็มของน้ำที่ใช้ทำการเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปสู่การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการนำไปผลิตให้ได้ปริมาณที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3), แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2$.4H2O), กรดซิตริก, ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4), ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$), กรดบอริก (H_3BO_3), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$), คอปเปอร์ซัลเฟต$CuSO_4$, โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH), แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$), โคบอลต์ (II) คลอไรด์ ($CoCl_2$), กรดไฮโดรคลอริก (HCl), โซเดียม

โมลิบเดรต (Na_2MoO_4) และเฟอริก ซิเตรต (Fe citrate) เป็นต้น

2. สารเคมีสำหรับการสกัดแคโรทีนอยด์ ได้แก่ เมทานอล กรดซัลฟูริก เฮกเซน เอทานอล
3. สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ได้แก่ อะซีโตไนไตร์ เมทานอล เตตระไฮโดรฟูแรน และเฮบเทน
4. สารเคมีสำหรับการสกัดโพลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ คลอโรฟอร์ม และกรดซัลฟูริก
5. สารเคมีสำหรับย้อมเซลล์ ได้แก่ สีซูดาน แบลค บี และสีไนโกรซิน
6. เครื่องเขย่าและให้แสงด้วยหลอดไฟฟูออเรสเซนส์
7. เครื่องชั่งละเอียด
8. เครื่องวัดความเข้มของแสง
9. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
10. ตู้อบลมร้อน KOTTERMANN 2736
11. ไมโครเวฟ
12. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า Magnetic Multistirrer, SBS A-08 Series B
13. แผ่น TLC
14. เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer, Shinadzu: รุ่น UV-2600
15. เครื่องสกัดสารโดยใช้ความดัน (Supercritical fluid extraction, SFE: รุ่น
16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัดความดัน (ยี่ห้อ: HIRAYAMA, รุ่น HICLAVE HVA-110)
17. กล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ: OLYMPUS รุ่น: BX40)
18. ปั๊มอากาศ (ยี่ห้อ: HAILEA รุ่น: ACO380)
19. เครื่องปั่นเหวี่ยง (ยี่ห้อ: HETTICH ZENTRIFUGEN รุ่น: MIKRO 22R)
20. ตู้เขี่ยเชื่อ Laminar Flow Class II (รุ่น: HVB90s)

- วิธีการ

1. ศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญชนิดต่าง ๆ

2.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายตั้งต้น (Starter culture)

นำสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการโดยเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ให้แสงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เมื่อมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.3 เพื่อส่งจำแนกและระบุชนิดของสายพันธุ์ : ทดสอบโดย ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตแคโรทีนอยด์และสารสี

1) นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจากข้อ 2.1 มาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายจำนวน ด้วยสูตรอาหาร Modified Chu-13 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร
2) นำตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงมาอบแห้ง แล้วทำการสกัดตัวทำละลายอินทรีย์
3) วิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 nm

2.3 การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไขมัน

1) นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจากข้อ 2.1 มาตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่าย ด้วยสีซูดาน แบลค บี
2) ศึกษาปริมาณหยดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า
3) คัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณหยดไขมันสูงเพื่อไปศึกษาคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กไปศึกษาสูตรอาหารตามกรรมวิธี ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตต่อไป

2.4 การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตโพลีแซคคาไรด์

1) นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจากข้อ 2.1 มาตรวจสอบการสะสมโพลีแซคคาไรด์ภายในเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่ายแบบเนกาทีฟ โดยใช้สีไนโกรซิน (Nigrosin)
2) ดูลักษณะวงใสๆ (capsule) อยู่รอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
3) คัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณวงใสๆ (capsule) ไปศึกษาสูตรอาหารตามกรรมวิธีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตต่อไป
4) วิธีการสกัดโพลีแซคคาร์ไรด์

ใช้เซลล์สาหร่ายแห้ง 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดพอลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำร่วมกับการใช้ autoclave (assisted by autoclaving) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาส่วนสารละลายใส มาตกตะกอนด้วยเอทานอล จะได้ตะกอนของโพลีแซคคาไรด์ (total polysaccharides extract, TPE)

2.5 การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพ

1) นำเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจากข้อ 2.1 มาตรวจสอบการสะสมโพลีเมอร์ชีวภาพภายในเซลล์ด้วยวิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่ายด้วยสีซูดาน แบลค บี
2) ดูลักษณะการย้อมติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า
3) คัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กไปศึกษาสูตรอาหารตามกรรมวิธีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตต่อไป

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและอิทธิพลในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

3.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต

นำหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2 มาศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu-13

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหารมาตรฐาน BG-11

กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหารมาตรฐาน BBM

กรรมวิธีที่ 4สูตรอาหารมาตรฐาน C-Medium

ทำการเพาะเลี้ยงสภาวะแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียสโดยทุกกรรมวิธีจะเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตต่อเนื่องแล้วเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในแต่ละกรรมวิธี

3.2 การศึกษาอิทธิพลในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์จากผลการทดลองข้อ 3.1 มาศึกษาปัจจัยการกระตุ้นด้วยสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์

กรรมวิธีที่ 2 เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

กรรมวิธีที่ 3 เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

กรรมวิธีที่ 4 เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1) เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มต่างๆ จากข้อ 3.1 เมื่อเซลล์สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด จึงเติมโซเดียมคลอไรด์ตามกรรมวิธี
2) เก็บตัวอย่างทุก 5 วัน จนครบ 15 วัน โดยปั่นตกตะกอนตัวอย่างสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที
3) อบให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
4) วัดปริมาณสารสำคัญชนิดต่างๆในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละกลุ่ม

การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก มีวิธีการดังต่อนี้

1) วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก ในการทดลองในครั้งนี้ใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้ Heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ของสาหร่าย (ยุวดี, 2546)

2) วิธีการวัดค่าความขุ่นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก ทำการวัดค่าความขุ่นของสาหร่ายขนาดเล็กด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

3) วิธีการวัดน้ำหนักของเซลล์แห้ง เก็บตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหลี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที ล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ (ลัดดา, 2540) นำค่าที่ได้ทั้ง 3 วิธีไปคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

- จำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก
- น้ำหนักของเซลล์สาหร่ายแห้ง
- ปริมาณน้ำมันหรือไขมัน โดยใช้วิธีการสกัดทางเคมี
- ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด
- ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ทั้งหมด
- ปริมาณโพลิเมอร์ชีวภาพทั้งหมด

- ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2562
- สถานที่ดำเนินงาน กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญชนิดต่าง ๆ

1.1 สาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตสารสีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สายพันธุ์สาหร่ายที่คัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาปริมาณสารให้สีประกอบด้วย สีเขียวหรือสารคลอโรฟิลล์ สีส้มหรือสารแคโรทีนอยด์ และสีฟ้าหรือสารไฟโคบิลิน โดยเบื้องต้นสารสีเขียวหรือคลอโรฟิลล์สามารถสกัดได้จากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กเพราะสารนี้เป็นองค์ประกอบของเซลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์เพื่อการเจริญเติบโต แต่สารสีส้มหรือสารแคโรทีนอยด์และสีฟ้าหรือสารไฟโคบิลิน จะพิจารณาจากสีของโคโลนีที่สามารถเปลี่ยนแปลงสีได้เองหรือการสะสมไว้ภายในเซลล์ที่ต้องสกัดออกจากเซลล์สาหร่ายหลังการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยสามารถคัดแยกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารสีเขียวและสีส้มออกมาได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SK-QSGMF6, NM-PM1-3 และ SK-KhY6 (Figure 1) นอกจากนี้ยังพบว่ามีสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกจากรากอากาศของปรงคือ ไอโซเลท SP6-1 ซึ่งเป็นสาหร่ายจำพวกไซยาโนแบคทีเรียหรือกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมฟ้า (Figure 2) สามารถทำการเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดสารสีสีฟ้าหรือไฟโคบิลินได้

นอกจากนี้สารแคโรทีนอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารสีส้มแล้ว ยังมีองค์ประกอบของสารต่างๆ ได้แก่ ไลโคปีน ลิวทีน เบต้าแคโรทีน ซีแซนทิน และแอสต้าแซนทิน รวมตัวกันเป็นกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ที่มีความสามารถเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อีกทางหนึ่ง โดยกลุ่มสารนี้จะสะสมอยู่ภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กตั้งแต่สีของโคโลนียังเป็นสีเขียวจนสีของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือแดงทั้งโคโลนี ได้นำชีวมวลสาหร่ายซึ่งสามารถคัดเลือกได้ 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SK-QSGMF6, NM-PM1-3, SK-KhY6 และ CM01-4 มาสกัดสารสำคัญออกจากเซลล์ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract) มาวิเคราะห์ค่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) โดยใช้วิธี DPPH assay (ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Brand-Williams et al., 1995) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสาหร่าย SK-QSGMF6, NM-PM1-3 และ SK-KhY6 มีค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 10.60, 9.63, 13.78 และ 5.00 miligram eq Trolox /100 g. ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ไปพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของกลุ่มสารแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

1.2 สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตโพลีแซคคาไรด์

ผลการย้อมสีเซลล์สาหร่ายแบบเนกาทีฟโดยใช้สีไนโกรซิน (Nigrosin) พบว่าสาหร่ายไอโซเลท A052 พบว่ามี ลักษณะวงใสๆอยู่ รอบเซลล์ในปริมาณสูง (Figure 3) จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้ไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตโพลีแซคคาไรด์ต่อไป

1.3 สาหร่ายที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไขมัน

โดยการตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์จะใช้วิธีการย้อมสีเซลล์สาหร่ายด้วยสีซูดาน แบลค บี เพื่อศึกษาปริมาณหยดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเซลล์ของสาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ ไอโซเลท CM01-4 และ BR52-1 จากลักษณะเซลล์ตามปกติที่หยดไขมันภายใน เมื่อถูกย้อมสีด้วยสีซูดานแบลคบีแล้วจะพบเป็นจุดสีดำอยู่ในเซลล์ (Figure 4) หลังทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลภายใต้สภาวะแบบออโตโทรปิกและนำไปสกัดน้ำมันโดยดัดแปลงจากวิธีของ Liu et al. (2007) แบบ *In-situ* acidic transesterification จากเซลล์เปียก (Wet algal biomass) แล้วนำมาศึกษาลักษณะของโครมาโตแกรมของไขมันที่สกัดได้ด้วยเทคนิค TLC (Figure 5) ผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายไอโซเลท CM01-4 มีค่าใกล้เคียงกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน FAME จากข้อมูลดังกล่าวจึงได้เลือกไอโซเลท CM01-4 สำหรับการศึกษาการผลิตกรดไขมันต่อไป

1.4 สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพ

สาหร่ายไอโซเลท SM6-3 เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากรากคอรัลลอยด์ของปรง มีรูปร่างเป็นกลุ่มเซลล์มาเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย trichome ประกอบด้วย vegetative cell และ heterocyst cell เรียงสลับหรือ

อยู่ปลายสุดของเส้นสาย เมื่อนำเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์นี้มาย้อมด้วยสีซูดาน แบลค บี (ดัดแปลงจาก Burdon, 1946) แล้วใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า พบว่ามีเม็ดสีน้ำเงินเข้ม หรือจุดดำภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก (Figure 6) โดยสายพันธุ์นี้ได้จากการทดลองเรื่องการผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ (ประยูร และคณะ, 2558) ซึ่งจะนำมาศึกษาขยายผลทางด้านปัจจัยด้านอาหารและผลต่อการสะสมสารโพลีเมอร์ชีวภาพ

1.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่าย

ผลการจำแนกเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กหลังการคัดแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท SK-QSGMF6, SK-KhY6, A052, CM01-4 และ Sm6-3 คือ *Coelastrella* sp., *Coelastrum* sp., *Coelastrum microporum, Botryococcus* sp. และ *Nostoc* sp. ตามลำดับ (Table 1)

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กและการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญ

2.1 สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสี

สายพันธุ์สาหร่ายที่คัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาปริมาณสารสีเขียวหรือ 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ซึ่งผลแสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 (Figure 7) พบว่าสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีด้วยกัน 2 สูตรอาหาร คือสูตร BG-11 และ Modified Chu 13 มีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 2.33×10^6 และ 2.31×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 13 และ 15 วัน ตามลำดับ ส่วนผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 (Figure 8) พบว่าสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคือ BG-11 มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 1.29×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 วัน ส่วนอาหารสูตร Modified Chu 13 และ C medium สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันที่ประมาณ 1.03×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเท่ากัน 13 วัน ในขณะที่อาหารสูตร BBM มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 0.72×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 11 วัน

จากผลการทดลองข้างต้นจึงได้คัดเลือกวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ด้วยสูตรอาหาร Modified Chu 13 และไอโซเลท SK-KhY6 ด้วยสูตรอาหาร BG-11 เพื่อใช้ศึกษาปัจจัยการกระตุ้นด้วยสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยการเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือมีการสะสมสารแคโรทีนอยด์ไว้ภายในเซลล์มากขึ้น โดยในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 จะเติมเกลือหลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน ส่วนสาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 จะเติมเกลือหลังการเพาะเลี้ยง 11 วัน และทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อเนื่องอีก 15 วัน หลังจากการเก็บชีวมวลสาหร่ายและทำการอบแห้งเพื่อสกัดสารแคโรทีนอยด์ ซึ่งจากผลการสกัดพบว่าสารสกัดแคโรทีนอยด์ล์มที่ได้จากพบว่าการเติม Nacl ในน้ำเพาะเลี้ยงสาหลายทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นมทำให้มีปริมาณสารแคโรที

นอยด์สะสมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด 0.3 โมลาร์ สามารถกระตุ้นสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ให้มีการสะสมแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ได้สูงสุด 3.45 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งตามลำดับ (Table 2) ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่เติม NaCl และเติมที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ ทั้ง 2 สายพันธุ์

2.2 สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตโพลีแซคคาไรด์

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท A052 (Figure 8) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคือ BG-11 มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 1.28×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 15 วัน ในขณะที่ Modified Chu 13, BBM และ C medium มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 1.18×10^6, 0.97×10^6 และ 1.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15, 21 และ 27 วันตามลำดับ จึงเลือกวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 มาศึกษาการกระตุ้นการสะสมสารด้วยสภาวะความเค็มด้วยการเติมเกลือหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้ในอาหารสูตร BG-11 หลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องหลังการเติม NaCl อีก 15 วัน ผลการสกัดโพลีแซคคาไรด์ (TPE) จากตัวอย่างสาหร่ายอบแห้ง พบว่าสามารถสกัด TPE จากสาหร่ายที่ถูกกระตุ้นด้วย NaCl 0.3 โมลาร์ ได้ TPE สูงสุดคือ 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่เติม NaCl และเติมที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 โมลาร์ โดยที่ระดับความเข้มข้น NaCl สูงขึ้นจะทำให้สารสกัด TPE สูงขึ้นตามลำดับ โดยถ้าเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ถูกกระตุ้นสามารถสกัด TPE ได้เพียง 4.12 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้นมากกว่า 58 เปอร์เซ็นต์ (Table 2)

2.3 สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไขมัน

ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท CM01-4 (Figure 9) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคือ Modified Chu 13 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 6.02×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 25 วัน รองลงมาคือสูตร BG-11 และ BBM มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ3.13×10^5 และ 2.23×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 และ 23 วันตามลำดับ ในขณะที่สูตร C medium มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด และผลการศึกษาปัจจัยการกระตุ้นด้วยสภาวะความเค็มหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้ด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13 เป็นระยะเวลา 25 วัน และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องหลังการเติม NaCl อีก 15 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 0.2 โมลาร์ หลังการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเพียง 10 วัน สามารถกระตุ้นให้สาหร่ายมีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Table 3) ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่เติม NaCl และเติมที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 โมลาร์

2.4 สาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพ

จากลักษณะเซลล์ของสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกันในรากปรงแบบเอนโดไฟต์ (endophyte) ทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (N_2-fixation) (Tikhonovich และ Provorov, 2007) ดังนั้นจึงปรับปรุงสูตรอาหาร BG-11 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีการเติมไนโตรเจนลงไปเรียกสูตรอาหารใหม่ว่า BG-11 N Free ซึ่งผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท SM6-3 (Figure 10) สูตรอาหาร BG-11 N-Free มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 2.45×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 15 วัน ในขณะที่ BBM, C medium และ Modified Chu 13 มีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดคือ 1.75×10^6, 1.67×10^6 และ 1.50×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 19, 25 และ 23 วันตามลำดับ จึงเลือกวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร BG-11 N-Free มาศึกษาการกระตุ้นด้วยสภาวะความเค็มหลังจากเริ่มการเพาะเลี้ยงสาหร่ายครบ 15 วัน และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องหลังการเติม NaCl อีก 15 วัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 0.2 โมลาร์ หลังการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเพียง 10 วัน สามารถสกัดสารโพลิเมอร์ชีวภาพได้ปริมาณสุงสุดที่ 1.62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด โดยที่ผลการสกัดสารโพลิเมอร์ชีวภาพจากสาหร่ายที่ยังไม่เติม NaCl สามารถสกัดได้เพียง 1.13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด หรือเพิ่มขึ้น 43.36 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่เติม NaCl และเติมที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 โมลาร์

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่ผ่านการคัดแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SK-QSGMF6, SK-KhY6, A052, CM01-4 และ Sm6-3 สามารถจำแนกสายพันธุ์ออกมาได้ทั้งหมดคือ *Coelastrella* sp., *Coelastrum* sp., *Coelastrum microporum, Botryococcus* sp. และ *Nostoc* sp. ตามลำดับ โดยแต่ละสายพันธุ์มีศักยภาพในการผลิตสารสำคัญดังนี้ สายพันธุ์ที่ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 สายพันธุ์ที่ให้สารโพลีแซคคาไรด์คือไอโซเลท A052 สายพันธุ์ที่ให้กรดไขมันคือไอโซเลท CM01-4 และสายพันธุ์ที่ให้สารโพลีเมอร์ชีวภาพคือไอโซเลท SM6-3

การทดสอบการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารทั้ง 4 ชนิด คือ Modified Chu-13, BG-11, BBM และ C-Medium ภายใต้สภาวะแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส พบว่าสูตรอาหาร Modified Chu 13 เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ CM01-4 เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด 2.31×10^6 และ 6.02×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 15 และ 25 วัน ตามลำดับ สูตรอาหาร BG-11 เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 และ A052เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด 1.29×10^6 และ 1.28×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 9 และ 15 วันตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร BG-11 N Free ที่ดัดแปลงจากสูตร BG-11 เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SM6-3 เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด

2.45×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 15 วัน

การทดสอบการกระตุ้นด้วยสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงหลังการเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในสภาวะความเค็มมีผลต่อการกระตุ้นการสะสมสารในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ที่ต่างกัน โดยที่ระดับความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 15 วัน สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ให้สารแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 3.45 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งตามลำดับ และสาหร่ายไอโซเลท A052 ให้สารพอลีแซคคาไรด์ได้สูงที่สุด 58 เปอร์เซ็นต์ (6.51%/DCW.) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 10 วัน สาหร่ายไอโซเลท CM01-4 มีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 39 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และที่ระดับความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 10 วัน สาหร่ายไอโซเลท Sm6-3 สามารถสกัดสารโพลิเมอร์ชีวภาพได้สามารถสกัดสารโพลิเมอร์ชีวภาพได้ปริมาณสุงสุดที่ 1.62 เปอร์เซ็นต์จากน้ำหนักสด

จากข้อมูลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ ทั้งสูตรอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและปัจจัยด้านสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญเพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตแล้ว ยังสามารถที่จะพัฒนาและดัดแปลงสูตรอาหารดังกล่าวด้วยการปรับอัตราส่วนฐานอาหารเฉพาะบางตัวเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแตสเซียม หรือธาตุอาหารเสริมที่สำคัญ รวมทั้งระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการกระตุ้นแสงสีต่างๆ และก๊าซคาร์บอนไดร์ออกไซด์ เป็นต้น เพื่อกระตุ้นให้สเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมีการสังเคราะห์สำคัญบางตัวที่นักวิจัยสนใจต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศไทย และได้เทคโนโลยีสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่เพิ่มอัตราการผลิตชีวมวลสะสมสารสำคัญไว้ภายในเซลล์สาหร่ายได้สูง สามารถนำไปต่อยอดและพัฒนางานวิจัยในด้านการผลิตผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็กให้ที่มีศักยภาพสูงเทียบเท่ากลุ่มพืชอาหารอื่นๆที่มีมูลค่าสูง เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอาง บรรจุภัณฑ์ชีวภาพ ตลอดจนพลังงานชีวภาพ ช่วยลดการนำเข้าวัตถุดิบและเทคโนโลยีที่มีราคาสูงจากต่างประเทศได้

11. เอกสารอ้างอิง

ประยูร เอ็นมาก วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร และศุภมาศ กลิ่นขจร. 2557. การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายกลุ่ม Chlorophyta. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2557. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 302-322.

ประยูร เอ็นมาก ศิริพร เต็งรัง โกเมศ สัตยาวุธ ศุภมาศ กลิ่นขจร และกนกศักดิ์ ลอยเลิศ. 2558. การผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2558. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 637-651.

ยุวดี พีรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาศะบุตร. 2546. คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 5. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงตอนพืช. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิ่วมโนมนต์ กาญจนภาชน์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 343 หน้า.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advance. 25: 294-306.

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. and Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification.* 48(6), 1146-1151.

Dayananda C., Sarada R., Kumar V., Ravishankar G.A. 2007. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. Electronic Journal of Biotechnology. ISSN: 0717-3458 Vol.10 (1). 14.

Hossain, A. B. M. S., Salleh, A., Boyce, A. N., Chowdhury, P., and Naqiuddin, M. 2008. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 4(3). 250-254.

Kim JH, Chang MJ, and Choi HD. 2011. Protective effects of Haematococcus astaxanthin on oxidative stress in healthy smokers. *J Med Food.* 14. 1469-1475.

Miao and Wu. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97 (6): 841-846.

Microalgae biotechnology. 2014. Microalgae and its metabolites. Available: https://w3.ual.es/~jfernand/MBio70411204/Lesson1/Indice.html [24 February 2020].

Qin, J. 2005. Bio-hydrocarbons from algae: impacts of temperature, light and salinity on algae growth. Available: https://rirdc.infoservices.com.au/downloads /05-025. [10 January 2020].

Qin S., Liu G.X., and Hu Z.Y. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochemistry*, 43, 795–802

Sabbir A. and Tasneem F. 2016. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening Optimization and Characterization. *PLoS One.* 11(6): e0158168.

Pietro C., Maurizia S., Patrizia C., Norma M. and Andrea L. 2018. Photofermentative Poly-3-Hydroxybutyrate Production by Rhodopseudomonas sp. S16-VOGS3 in a Novel Outdoor 70-L Photobioreactor. *Sustainability*, 10**,** 3133.

Rao R., Sarada A.R. and Ravishankar G.A. 2007. Influence of CO_2 on growth and hydrocarbon productions *in Botryococcus braunii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(3): 414-419.

Schaeffer, D.J. and V.S. Krylov. 2000. Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45 (3): 208-227.

12. ภาคผนวก

Table 1 Details of microalgae, Characteristics of cell, species identification and storage locations.

Isolate of microalgae	Characteristics of cell	Details of storage locations and species identification
SK-QSGMF6		Location: Mangrove forest of Queen Sirikit Park, Samut songkhram Division: Chlorophyta Family: *Coelastrella sp.* Size of cell: 5 – 10 µm
SK-KhY6		Location: Khlong Yang Reservoir, Sa Kaeo Division: Chlorophyta Family: *Coelastrum* sp. Size of cell : 5 µm
A052		Location: Bueng Si Fai Reservoir, Phichit Division: Cyanophyta Family : *Coelastrum microporum* Size of cell: 10-15 µm

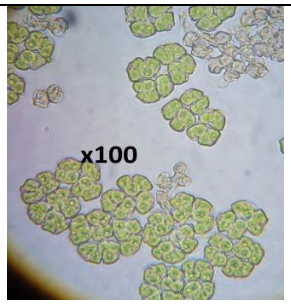
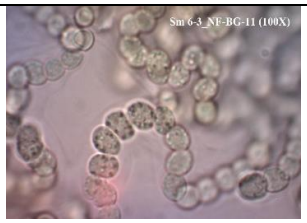
Isolate of microalgae	Characteristics of cell	Details of storage locations and species identification
CM01-4		Location: Mae Hea Reservoir, Chiang Mai Division: Chlorophyta Family: *Botryococcus* sp. Size of cell: 20 – 30 μm
SM6-3		Coralloid roots of *Cycas* sp. at Kasetsart University Bangken Kampus Division: Cyanophyta Family: *Nostoc* sp.

Table 2 The influence of concentration of NaCl in culture media to accumulate substance after 15 days of cultuvation.

Conc. of NaCl (Molar)	Isolate of microalgae and substance		
	SK-QSGMF6	SK-KhY6	A052
	Tatal Carotenoods (mg/g_{dried})		(TPE, %DCW)
0	1.89d	2.55d	4.11d
0.1	2.63c	2.81c	4.75c
0.2	2.97b	3.18b	5.02b
0.3	3.45a	3.56a	6.51a

Table 3 The influence of concentration of NaCl in culture media to accumulate substance after 10 days of cultuvation.

Conc. of NaCl (Molar)	Isolate of microalgae and substance	
	CM01-4 (%wt)	SM6-3 (%wt)
0	29bc	1.50b
0.1	31b	1.62a
0.2	39a	1.23d

0.3	25c	1.34c

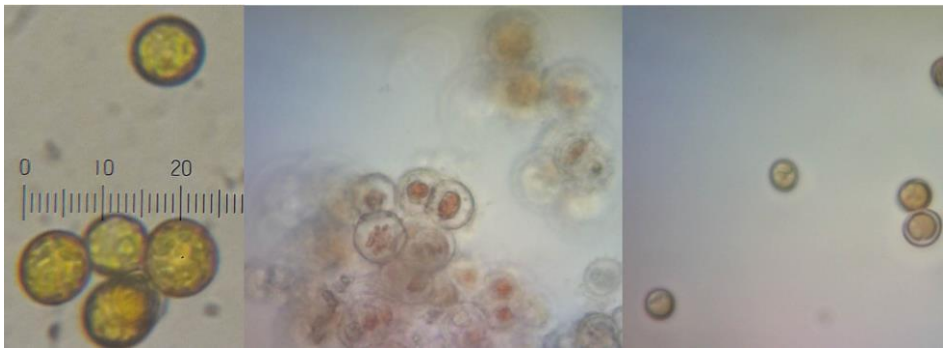


Figure 1 Morphology of microalgae isolate Left**:** SK-QSGMF6 Middle: NM-PM1-3 Right: SK-KhY6

Figure 2 (left) Coralloid roots of *Cycas* sp. (middle) The locating of coralloid roots (right) Morphology of Cyanobacteria isolated SP6-1

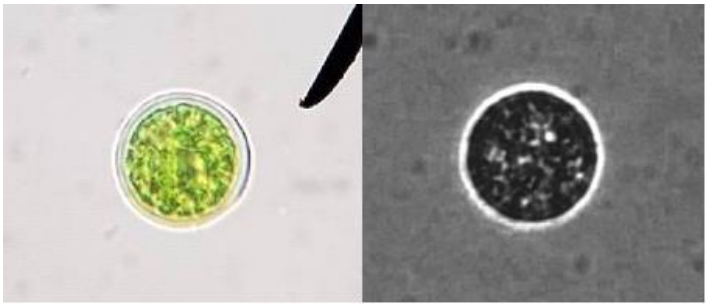


Figure 3 (Left) Morphology of microalgae Isolate A052 (Right) nigrosin staining.

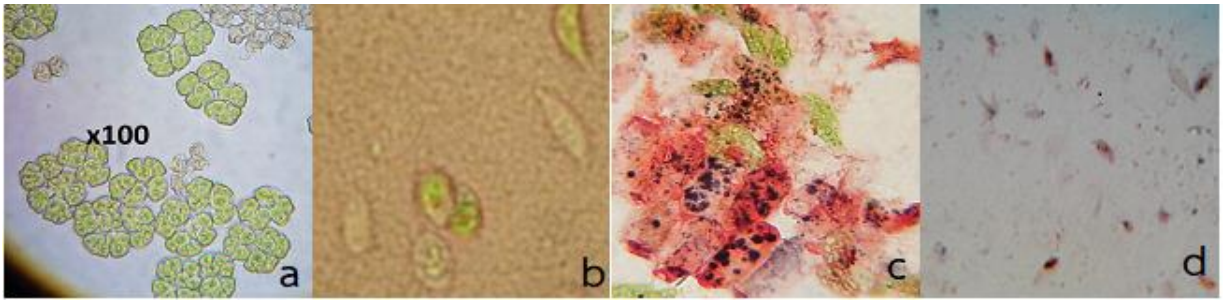


Figure 4 Morphology of microalgae (a) isolate CM01-4 and (b) isolate BR52-1 and after using Sudan Black B staining (c) Isolate CM01-4 and (d) BR52-1.

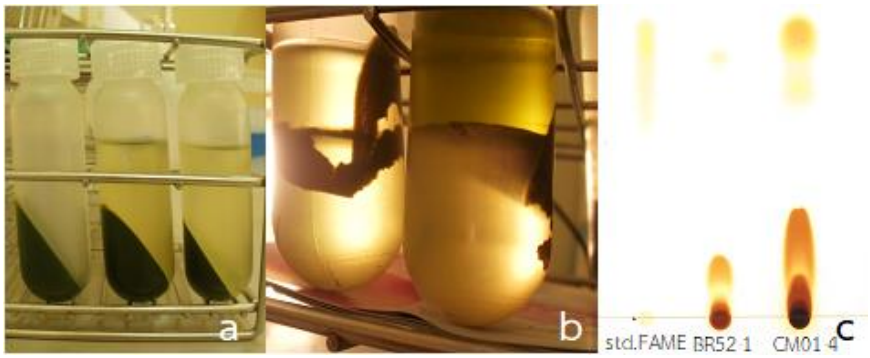


Figure 5 (a) Biomass of of microalgae by centrifuge (b) Oil extraction with sulfuric acid from cell of microalgae (c) Chromatograms on TLC of fatty acid.

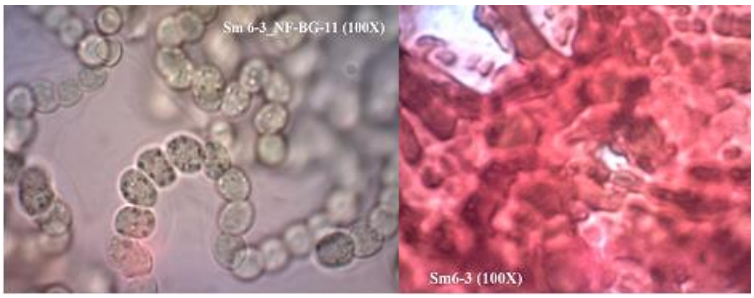


Figure 6 (Left) Morphology of Cyanobacteria isolated SM6-3 (Right) using Sudan Black B staining.

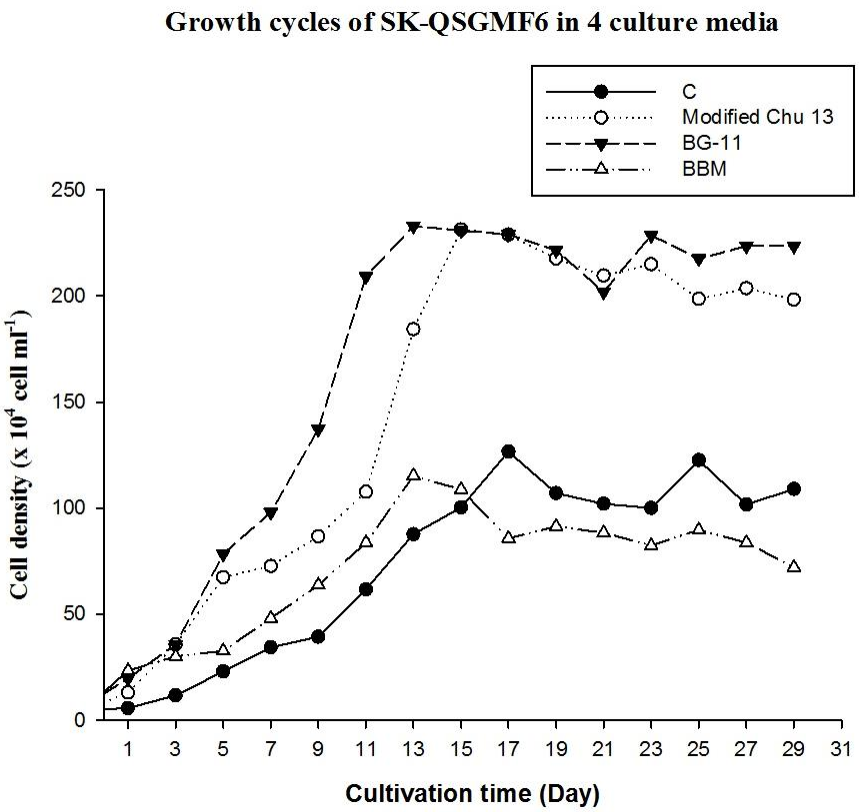


Figure 7 Growth profile of SK-QSGMF6 under autotrophic cultivation

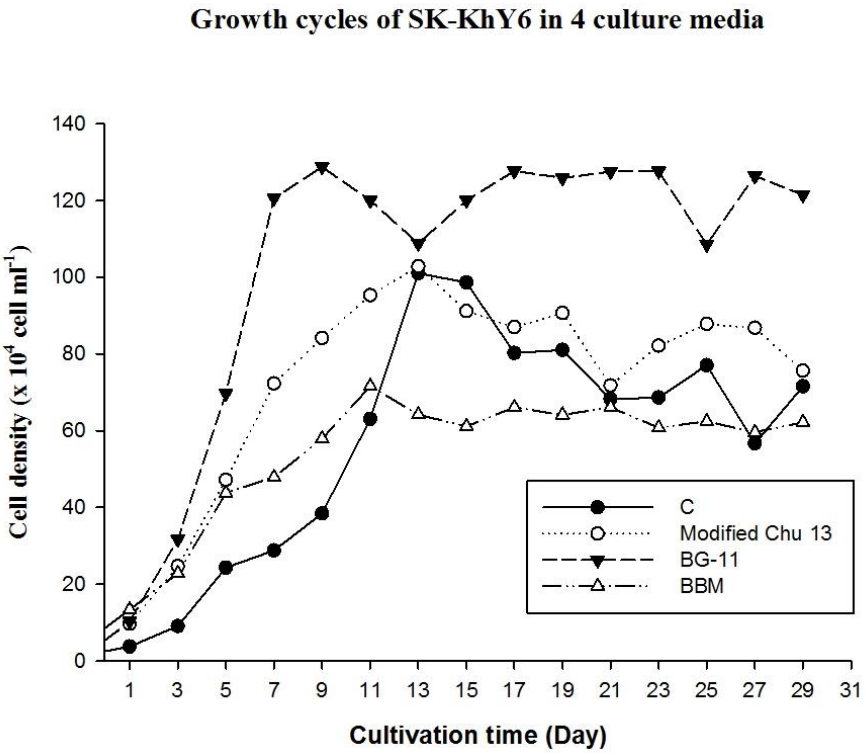


Figure 8 Growth profile of SK-KhY6 under autotrophic cultivation.

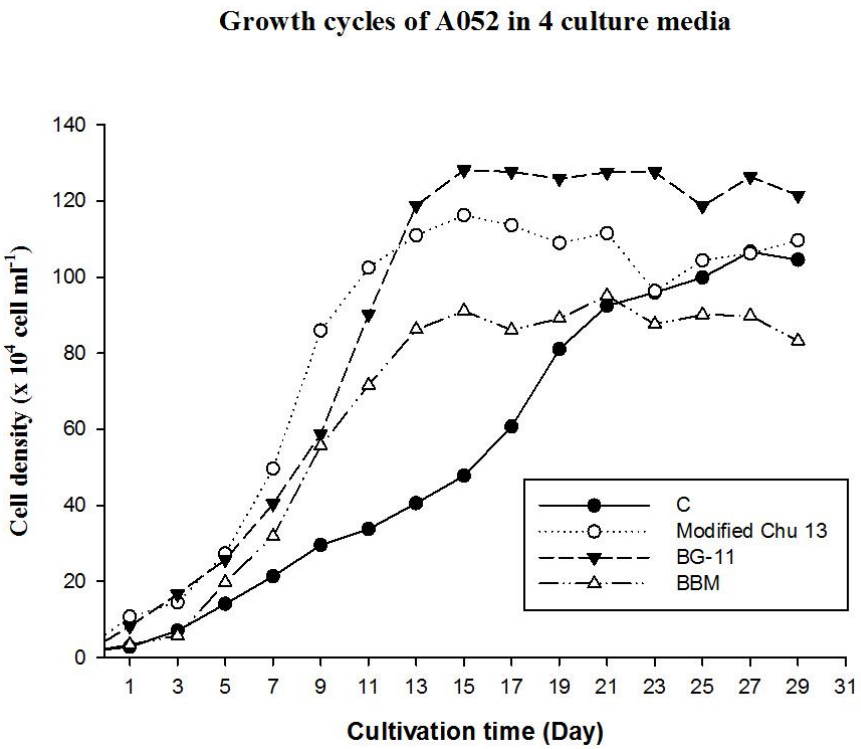


Figure 9 Growth profile of A052 under autotrophic cultivation.

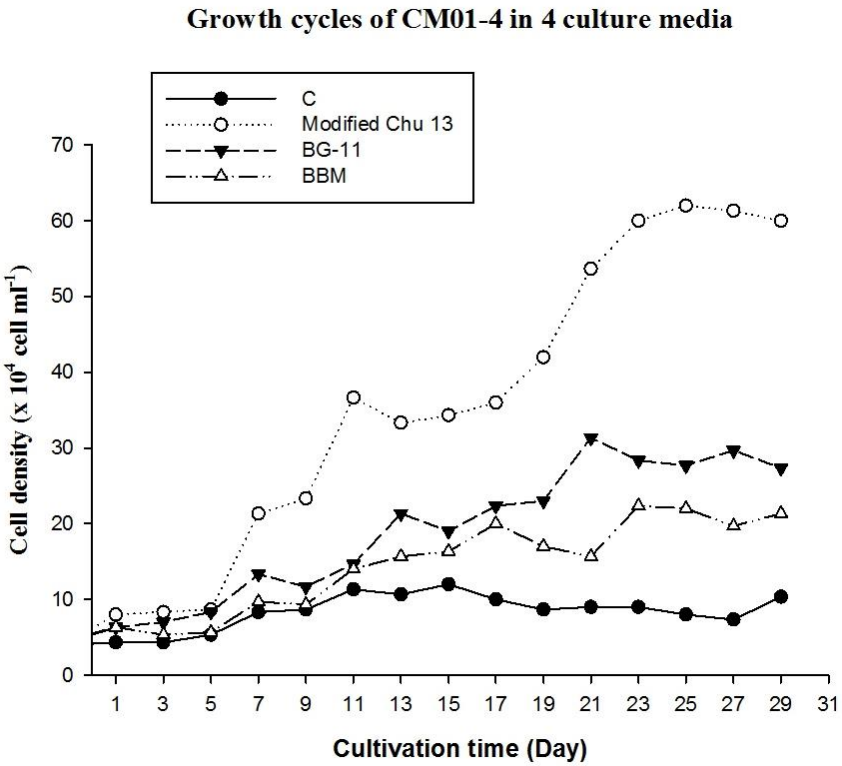


Figure 10 Growth profile of CM01-4 under autotrophic cultivation.

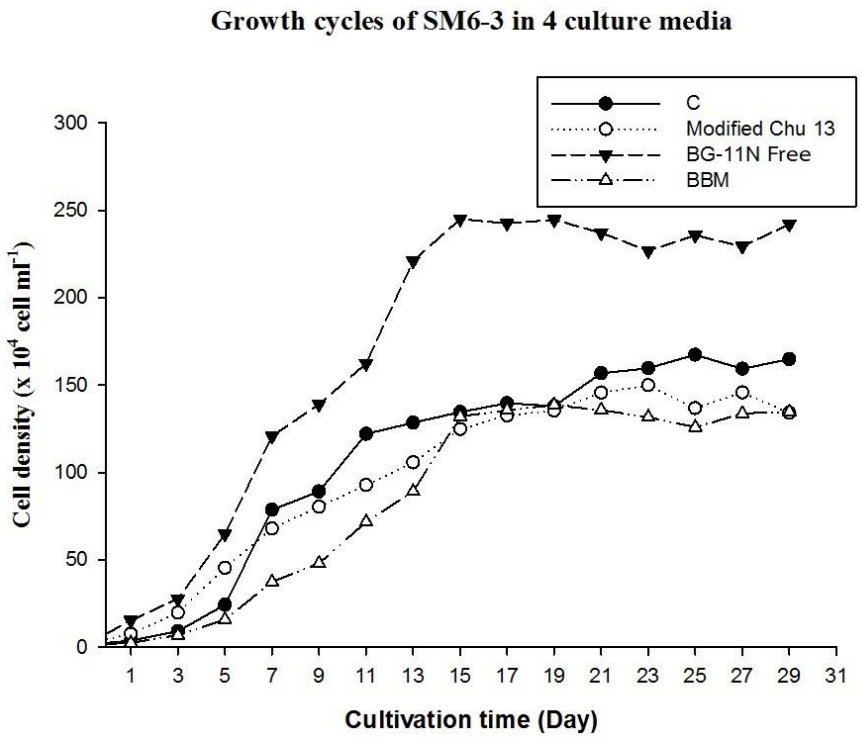


Figure 11 Growth profile of SM6-3 under autotrophic cultivation.

MEDIA PREPARATION

1. Modified Chu 13 medium

Reagent	Stock Solution 200 ml	Culture media
CaCl2.2H2O	2.16 g	5 ml.L^{-1}
citric acid	4 g	5 ml.L^{-1}
K2HPO4	1.6 g	5 ml.L^{-1}
ferric citrate	0.4 g	5 ml.L^{-1}
MgSO4.7H2O	4 g	5 ml.L^{-1}
KNO3	8 g	5 ml.L^{-1}
Trace metals		1 ml.L^{-1}

Trace metals	Stock Solution 100 ml
CoCl2.6H2O	2.16 g
H3BO3	4 g
MnCl2.4H2O	1.6 g
Na2MoO4.6H2O	0.4 g

CuSO4.5H2O	4 g
ZnSO4.7H2O	8 g

2. BG-11 medium

Reagent	Stock Solution	Culture media
$NaNO_3$	150 $g.L^{-1}$	10 $ml.L^{-1}$
K_2HPO_4	30 $g.L^{-1}$	1 $ml.L^{-1}$
$MgSO_4.7H_2O$	75 $g.L^{-1}$	1 $ml.L^{-1}$
$CaCl_2.2H_2O$	36 $g.L^{-1}$	1 $ml.L^{-1}$
citric acid	6 $g.L^{-1}$	1 $ml.L^{-1}$
ferric citrate	6 $g.L^{-1}$	1 $ml.L^{-1}$
$Na_2EDTA.2H_2O$	1 $g.L^{-1}$	1 $ml.L^{-1}$
Na_2CO_3	20 $g.L^{-1}$	1 $ml.L^{-1}$
Trace metals		1 $ml.L^{-1}$
F/2 vitamins		1 $ml.L^{-1}$

Trace metals	Stock Solution 1000 ml
H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2.4H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222 g
$Na_2MoO_4.6H_2O$	0.39 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.079 g
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.494 g

3. BBM medium

Reagent	Stock Solution 400 ml	Culture media
$NaNO_3$	10 g	10 $ml.L^{-1}$
K_2HPO_4	1 g	10 $ml.L^{-1}$
$MgSO_4.7H_2O$	3 g	10 $ml.L^{-1}$
$CaCl_2.2H_2O$	1 g	10 $ml.L^{-1}$
NaCl	1 g	10 $ml.L^{-1}$
EDTA Solution	EDTA 5g/KOH 3.1g	1 $ml.L^{-1}$
H_3BO_3	1.142g/100ml	1 $ml.L^{-1}$
Trace metals		1 $ml.L^{-1}$

Trace metals	Stock Solution 250 ml
$ZnSO_4.7H_2O$	2.205 g
$MnCl_2.4H_2O$	0.36 g
MoO_3	0.1775 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.3925 g
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.1225 g

4. Modified Chu 13 medium

Reagent	Stock Solution	Culture media
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	3.75 g/250 ml	10 $ml.L^{-1}$
Biotin	0.005 g/ 50ml	10 $ml.L^{-1}$
b-glycerophodphate.$5H_2O$	1.25 g/250 ml	10 $ml.L^{-1}$
Tris buffer	12.5 g/250 ml	10 $ml.L^{-1}$
$MgSO_4.7H_2O$	1 g/250 ml	10 $ml.L^{-1}$
KNO_3	2.5 g/250 ml	10 $ml.L^{-1}$

vitamin B_1	10 $ml.L^{-1}$
vitamin B_{12} *(Thiamine)*	10 $ml.L^{-1}$
PIV metal	3 $ml.L^{-1}$
Agar	15 $g.L^{-1}$

PIV metal	Stock Solution 100 ml
CoCl2.6H2O	0.004
H3BO3	0.0196
MnCl2.4H2O	0.0036
Na2MoO4.6H2O	0.0003
CuSO4.5H2O	0.1
ZnSO4.7H2O	0.022