# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืช และจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายขนาดเล็ก

   **กิจกรรม** : การพัฒนาสาหร่ายขนาดเล็กที่มีสารสำคัญ

   **กิจกรรมย่อย (ถ้ามี)** : -
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด

   **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Microalgae cultivation up-scale in open raceway pond
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**


**หัวหน้าการทดลอง** : นายนราทร สุขวิเสส กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

**ผู้ร่วมงาน** : จารุวรรณ์ รัตนสกุลธรรม กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

วุฒิพล จันทร์สระคู ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น


5. **บทคัดย่อ**


การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด ดำเนินการทดลองที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2560-2562 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิด และวิธีการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญชนิดต่างๆ คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella* sp. (SK-QSGMF6) และ *Coelastrum* sp. (SK-KhY6) โพลีแซคคาไรด์สกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrum microporum* (A052) ไขมันสกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. (KK-20) และ *Botryococcus* sp. (CM01-4) และโพลีเมอร์สกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Nostoc* sp. (Sm6-3) โดยได้ศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยเคมีเปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน และการชักนำการสะสมสารสำคัญด้วยภาวะความเค็มที่เหมาะสมกับแต่ละสายพันธุ์ เพื่อให้ได้หลักการที่ถูกต้องและสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ ผลการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6, SK-KhY6 และ A052 ด้วยอาหารสูตรปุ๋ยเคมี 16-8-8 สาหร่ายขนาดเล็กมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ $7.124 \times 10^5$, $1.26 \times 10^6$ และ $2.54 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และผลการกระตุ้นด้วยความเค็มของน้ำเลี้ยงด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ สาหร่ายไอโซเลท SK-

QSGMF6 และ SK-KhY6 ให้ปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์ 3.65 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนสาหร่ายไอโซเลท A052 ให้สารพอลีแซคคาไรด์ 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง สาหร่ายไอโซเลท CM01-4 ใช้สูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 6.755 x $10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีปริมาณไขมันในเซลล์ 41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังการถูกกระตุ้นด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สาหร่ายไอโซเลท KK-20 ใช้สูตรอาหารปุ๋ย 16-20-0 และการกระตุ้นการสะสมสารด้วยการเติม NaCl ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ได้ผลผลิตสาหร่ายมีความหนาแน่นเท่ากับ 3.50x$10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตชีวมวล 2.40 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนในรูปไขมันได้สูงสุด 3.09 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสาหร่ายสายพันธุ์ Sm6-3 ใช้สูตรอาหารปุ๋ย 8-24-24 มีอัตราการให้ผลผลิตเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตร หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ปริมาณสารสกัดโพลิเมอร์ชีวภาพ 0.33 กรัมต่อกรัมสาหร่ายสด

**คำหลัก:** สาหร่ายขนาดเล็ก การเพาะเลี้ยง แคโรทีนอยด์ ไขมัน โพลีแซคคาไรด์ และไบโอพอลิเมอร์

## Abstract

Micro-algae culture in pond up-scaled was performed at Postharvest and Processing Research and Development Division during 2017-2019. The objective of developing micro-algae farming systems on raceway pond and suitable harvesting methods for the species of micro-algae with high potential to produce various important substances. That are bioactive substances from *Coelastrella sp.* (SK-QSGMF6) and *Coelastrum* sp. (SK-KhY6), polysaccharides from *Coelastrum microporum* (A052), fat and oil from *Scenedesmus sp.* (KK-20) and B*otryococcus sp.* (CM01-4), and polymers from *Nostoc sp.* (Sm6-3). Therefore, this study was conducted to study the impacts of chemical fertilizer usage compared with standard culture media formulas and the accumulation of important substances by salinity conditions suitable for each species. The results showed that culture of SK-QSGMF6, SK-KhY6 and A052 strains with chemical fertilizer formula 16-8-8 microalgae had the highest growth rate of 7.124 x $10^5$, 1.26x$10^6$ and 2.54x$10^6$ cells/milliliter respectively. The effect of salinity in culture media from sodium chloride at 0.3 molar concentrations. The SK-QSGMF6 and SK-KhY6 strains gave carotenoid extracts 3.65 and 3.56 milligrams per gram of dry weight. Strain A052 gave total polysaccharides at 6.51% per dry weight. Isolate KK-20 uses fertilizer formula 16-20-0 and adding 0.2 mL NaCl to produce algae density of 3.50x106 cells/ milliliter, biomass yield 2.40 grams/liter and hydrocarbon content in fat form up to 3.09 %wt. Isolate Sm6-3 using fertilizer formula 8-24-24 gave yield 0.53 grams per liter and extracting biopolymer by 0.33 %wt.

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

## 6. คำนำ

สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์ที่มีลักลักษณะเซลล์เดียวหรือกลุ่มโคโลนี แต่ไม่มีส่วนที่เป็นลำต้น รากและใบที่แท้จริง สามารถสร้างอาหารได้เองโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไปมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยสามารถเจริญได้ในทุกพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำเค็ม โครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่ายมีอาหารสะสมเป็นสารประกอบในรูปแบบต่างๆ มากมาย ได้แก่ โปรตีนคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะอยู่ในรูปของโพลีแซคคาร์ไรด์ หรือแป้ง (Starch) ไขมันหรือน้ำมัน (Oils) ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) รวมทั้งสารสีหรือรงควัตถุ (pigment) เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอโรฟิลด์ (chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และไฟโคบิลิน (phycobilin) เป็นต้น

แคโรทีนอยด์ ที่สามารถสกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็กแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ได้แก่ เบต้าแคโรทีนและไลโคพีน เป็นต้น และกลุ่มแซนโทฟิล (xanthophyll) มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่าแคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นต้น จากคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี ทำให้การนำสาหร่ายขนาดเล็กมาประยุกต์ใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีมูลค่าสูงเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอางได้

พอลีแซ็คคาไรด์ หรือ ไกลแคน เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์หลายๆโมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายโพลิเมอร์ด้วยพันธะไกลโคสิดิก มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถควบคุมอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย สามารถเสริมสร้างหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้มีการนำไปวิจัยและพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและงานวิจัย คือ กัม (gums) ซึ่งเป็นสารที่ให้ความข้น (thickening) ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizing) และทำให้เกิดลักษณะเป็นเจล (gelling) กัมที่สามารถสกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ เอการ์วุ้น (agar) อัลจิเนต (alginate) และคาราจีแนน (carageenan)

นอกจากนั้นแล้วสาหร่ายขนาดเล็กยังสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นพลังงานชีวภาพได้ในหลายรูปแบบ เช่น การผลิตไฮโดรเจน เอทานอล และที่นักวิจัยกำลังให้ความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย เนื่องจากในเซลล์ของสาหร่ายหลายสายพันธุ์มีการสะสมอาหารไว้ในรูปของไขมันเป็นจำนวนมาก ซึ่งไขมันดังกล่าวมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นไตรกลีเซอไรด์เช่นเดียวกันกับพืชน้ำมันทั่วๆไป แต่จะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์และยังพบว่ามีสาหร่ายขนาดเล็กหลายๆสายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสมสารอาหารไว้ในรูปของไขมันหรือน้ำมัน (oils) ชนิดไม่อิ่มตัวเช่น Docosahexaenoic acid (DHA) และ Eicosapentaenoic acid (EPA) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีความจำเป็นของร่างกายที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพได้

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพสามารถแบ่งตามแหล่งกำเนิดวัตถุดิบได้ 2 ประเภทคือพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีและพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบมวลชีวภาพ ได้แก่

กลุ่มพอลิแลคติก (Polylactic Acid, PLA) หรือพอลิแลคไทด์ (Polylactide) กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Poly-hydroxyalkanoates, PHAs) และ กลุ่มพอลิไฮดรอกซีบิวไทเรต (Poly hydroxybutyrate, PHB) ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่าไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) มีการสะสมโพลิเมอร์ชนิดนี้ไว้ภายในเซลล์เช่นเดียวกัน ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกใหม่ในการนำมาผลิตเป็นโพลิเมอร์หรือพลาสติกชีวภาพได้ โดยผลจาการศึกษาค้นคว้าวิจัยพบว่าโพลิเมอร์กลุ่ม PHB เป็นส่วนกระกอบที่พบในเซลล์ชั้นใน (intracellular) ของเซลล์สาหร่ายชนิดนี้ ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของPHB คือมีความสามารถทนความร้อนได้สูงไม่ละลายน้ำและสามารถย่อยสลายได้ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักจากแบคทีเรีย

กระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้ผลผลิตชีวมวลสูงๆ นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ระบบการเพาะเลี้ยงได้แก่ การเพาะเลี้ยงระบบบ่อเปิด และในถังปฏิกรณ์แบบปิดชนิดต่างๆ
2. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม และธาตุอาหารอื่นๆ เป็นต้น
3. แหล่งของคาร์บอน ไม่ว่าจะอยู่ในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือสารประกอบคาร์บอร์เนต โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กจะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วงความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 1-5% (โดยปริมาตร) และการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเนื่องจากมีอิทธิพลต่อปริมาณสารอนินทรีย์คาร์บอนในรูปต่างๆ ได้แก่ $CO_2$ และ $HCO_3^-$
4. ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ แสง ค่าความเป็นกรดด่าง ออกซิเจน ค่าสัดส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัส หรืออุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีผลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็ก

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดในการออกแบบสิ่งก่อสร้างเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จะใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยง เช่น การเตรียมหัวเชื้อ การเพาะเลี้ยงและวิธีการเก็บเกี่ยว ที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือก เพื่อผลิตชีวมวลสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสำคัญต่างๆ ซึ่งได้ศึกษาควบคู่กับงานวิจัยเรื่องการคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารสำคัญ และการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญ ด้วยระดับความเค็มของน้ำที่ใช้ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาวะชักนำ (Stress condition) ทำให้สาหร่ายมีการปรับตัวภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เกิดเป็นสารสำคัญสะสมไว้ในเซลล์เพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้หลักการที่ถูกต้อง สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ มีเทคโนโลยีในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในแต่ละสภาพพื้นที่และสิ่งแวดล้อมนั้นๆ มีเทคโนโลยีที่ง่ายและเหมาะสมกับเกษตรกรไทย เพื่อที่สามารถถ่ายทอดสู่กลุ่มเกษตรกรเป็นการสร้างงานและสร้างอาชีพใหม่โดยเฉพาะในพื้นที่ดินเค็มที่ไม่สามารถใช้ประโยชน์จากพื้นที่เหล่านั้น รวมทั้งผู้ประกอบการที่สนใจนำไปพัฒนาต่อยอดในเชิงพาณิชย์ลดการนำเข้าวัตถุดิบที่มีราคาสูงจากต่างประเทศได้

**7. วิธีดำเนินการ**

**- อุปกรณ์**

1. อุปกรณ์เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ หลอดไฟฟูออเรสเซนส์ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องวัดความเข้มของแสง ปั๊มอากาศ เครื่องวัดจำนวนเซลล์ หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัดความดัน

2. อุปกรณ์เก็บเกี่ยวและสกัดสาร ได้แก่ ผ้ากรอง 20 ไมครอน เครื่องปั่นผสม อ่างควบคุมอุณหภูมิ ตู้อบ เครื่องปั่นความเร็วสูง เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน หลอดทดลองและเครื่องแก้ว
3. อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณสารสกัดจากสาหร่าย ได้แก่ เตาเผา เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน TLC HPLC เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไฟเบอร์ เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
4. สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ $KNO_3$, $MnCl_2$, Citric acid, $K_2HPO_4$, $ZnSO_4$, $H_3BO_3$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, KOH, $CaCl_2$, $CoCl_2$, HCl $Na_2MoO_4$, Fe citrate เป็นต้น
5. สารเคมีสำหรับการสกัดแคโรทีนอยด์ ได้แก่ เมทานอล กรดซัลฟูริก เฮกเซน เอทานอล เป็นต้น
6. สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ได้แก่ acetonitrile methanol tetrahydrofuran Heptane

**- วิธีการ**

**1. การออกแบบระบบและการจัดการการเพาะเลี้ยง**

1.1 ออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงขยายขนาดในบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ

ทดสอบระบบของบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ (Raceway pond) การติดตั้งใบพัด (paddle wheel) ในบ่อเพาะเลี้ยงแต่ละขนาด โดยการปรับเปลี่ยนพูเลย์สายพานเพื่อให้ได้ความเร็วรอบที่เหมาะสม

1.2 การเตรียมกล้าเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์จาก Stock culture ของห้องปฏิบัติการสาหร่าย

นำสาหร่ายขนาดเล็กในแต่ละกลุ่มที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสี โพลีแซคคาไรด์ ไขมัน และโพลีเมอร์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐานในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ความเข้มแสงประมาณ 2,500 ลักซ์ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายโดยเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง โดยใช้อัตราส่วนหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก 1 ลิตร ที่ค่าความขุ่นของเซลล์สาหร่าย 0.3 ต่อน้ำเพาะเลี้ยง 100 ลิตร สำหรับบ่อเพาะเลี้ยงขยายขนาดแบบเปิด

**2. การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการ**

2.1 การพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีและอัตราการใช้เพื่อทดแทนสูตรอาหารมาตรฐาน

ด้วยการศึกษาการใช้ปุ๋ยเคมีทั่วไป 2 สูตร คือ 16-8-8 และ 15-15-15 และอัตราส่วนของปริมาณปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงคือ 1/10, 1/50, 1/100 และ 1/500 เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตกับสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ CM01-4 โดยทำการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ในห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์ อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียสโดยทุกกรรมวิธีจะเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน แล้วเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในแต่ละกรรมวิธี เพื่อหาอัตราส่วนการใช้ปุ๋ยเคมีต่อน้ำเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

2.2 การพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

คัดเลือกอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยงที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.1 เพื่อนำไปศึกษาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐานที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ SK-KhY6, A052, KK-20 และ Sm6-3

**3. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด**

คัดเลือกสูตรอาหารและอัตราการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์จากการทดลองในข้อ 2 มาศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดในภาชนะขนาด 500 ลิตร โดยใช้สภาวะที่ได้จากการทดลอง ภายใต้สภาวะออโตโทรฟิค โดยใช้แสงจากธรรมชาติ ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก มีวิธีการดังต่อนี้

1) วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็ก ในการทดลองในครั้งนี้ใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้ Heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ของสาหร่าย (ยุวดี, 2546)
2) การศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (Early stationary phase) แล้วนำมาศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวโดยใช้เครื่องปั่นแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติ

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

**8. ผลการทดลองและวิจารณ์**

**1. การออกแบบระบบและการจัดการการเพาะเลี้ยง**

**1.1 ออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงขยายขนาดในบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ**

รูปแบบบ่อเพาะเลี้ยงแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ (Raceway pond) และใบพัดมอเตอร์ (paddle wheel) เพื่อให้เกิดการไหลเวียนน้ำบ่อเพื่อให้สาหร่ายได้รับแสงและอากาศอย่างสม่ำเสมอ และป้องกันการตกตะกอนของเซลล์สาหร่ายในระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อใช้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด ที่ความจุบ่อปริมาตรต่างๆ ได้แก่ บ่อปริมาตร 500 ลิตร จำนวน 6 บ่อ ปริมาตร 5,000 ลิตร จำนวน 2 บ่อ และปริมาตร 10,000 ลิตร จำนวน 1 บ่อ (ภาพที่ 1) โดยมีรายละเอียดอุปกรณ์ดังนี้

1.1.1 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดความจุ 500 ลิตร มีรายละเอียดดังนี้

ก. บ่อคอนกรีตเสริมเหล็ก ขนาด 1.3 x 2.8 x 0.6 เมตร จำนวน 6 บ่อ

ข. ใบพัดสแตนเลส (Paddle Wheel) จำนวน 6 ชุด

ค. มอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1.5 kw. ทดรอบเฟืองโซ่ 30-50 rpm. จำนวน 6 ชุด

1.1.2 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดความจุ 5,000 ลิตร มีรายละเอียดดังนี้

ก. บ่อคอนกรีตเสริมเหล็ก ขนาด 2.4 x 6.9 x 0.6 เมตร จำนวน 2 บ่อ

ข. ใบพัดสแตนเลส (Paddle Wheel) จำนวน 2 ชุด

ค. มอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1.5 kw. ทดรอบเฟืองโซ่ 30-50 rpm. จำนวน 2 ชุด

1.1.3 บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดความจุ 10,000 ลิตร มีรายละเอียดดังนี้

ก. บ่อคอนกรีตเสริมเหล็ก ขนาด 2.4 x 13.0 x 0.6 เมตร จำนวน 1 บ่อ

ข. ใบพัดสแตนเลส (Paddle Wheel) จำนวน 2 ชุด

ค. มอเตอร์ไฟฟ้าขนาด 1.5 kw. ทดรอบเฟืองโซ่ 30-50 rpm. จำนวน 2 ชุด

จากการทดสอบก่อนการเพาะเลี้ยงจริง พบว่าวัสดุผิวของบ่อซีเมนต์จะมีรูพรุนอาจทำให้การเพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อนของสาหร่ายขนาดเล็กแต่ละสายพันธุ์ได้ เพราะเซลล์สาหร่ายสามารถเข้าไปเจริญเติบโตในรูพรุนนั้นได้ ดังนั้นจึงแก้ไขด้วยการเคลือบไฟเบอร์กลาสที่ผิวบ่อด้านในเพิ่มเติม พร้อมทั้งติดตั้งวัสดุคลุมบ่อชนิดโปร่งแสง (ภาพที่ 2) เพื่อหลีกเลี่ยงปริมาณน้ำฝนซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่เป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

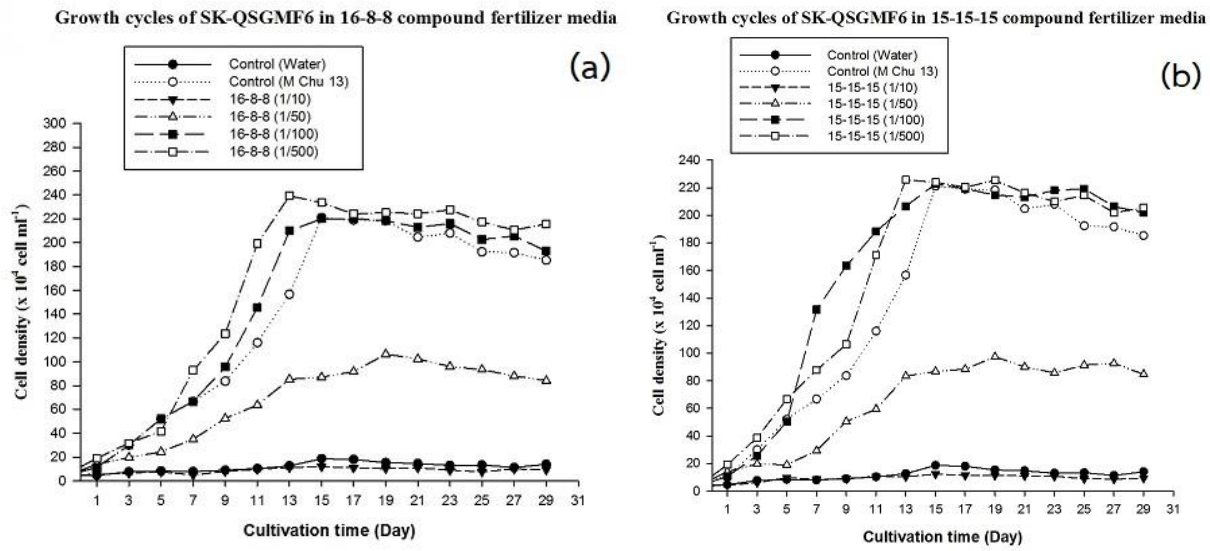
**ภาพที่ 1** บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเปิด (Raceway open pond) ขนาดต่าง ๆ

**ภาพที่ 2** เคลือบบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยไฟเบอร์กลาสและติดตั้งวัสดุโปร่งแสงคลุมบ่อ

**2. การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการ**

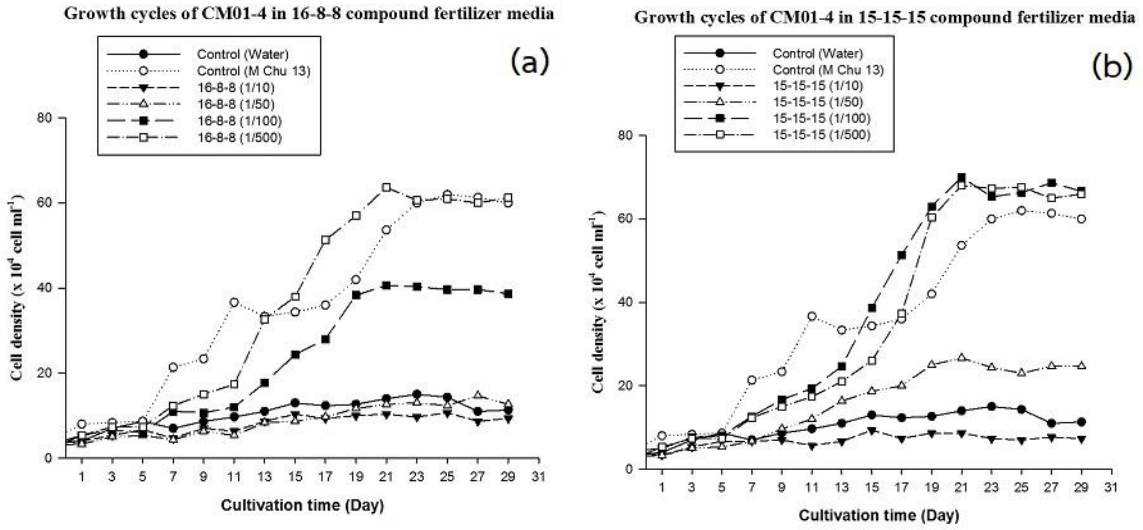
2.1 การพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีและอัตราการใช้เพื่อทดแทนสูตรอาหารมาตรฐาน

ผลการทดลองใช้ปุ๋ยเคมีทั่วไป 2 สูตร คือ 16-8-8 และ 15-15-15 เป็นอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายและปรับอัตราส่วนการให้ปุ๋ยต่อน้ำเพาะเลี้ยงคือ 1/10, 1/50, 1/100 และ 1/500 เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตกับสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 โดยหลังการเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน ได้ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายดัง ภาพที่ 3




**ภาพที่ 3** แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 โดยใช้ปุ๋ยสูตร 16-8-8 และ 15-15-15 ในอัตราส่วนต่าง ๆ

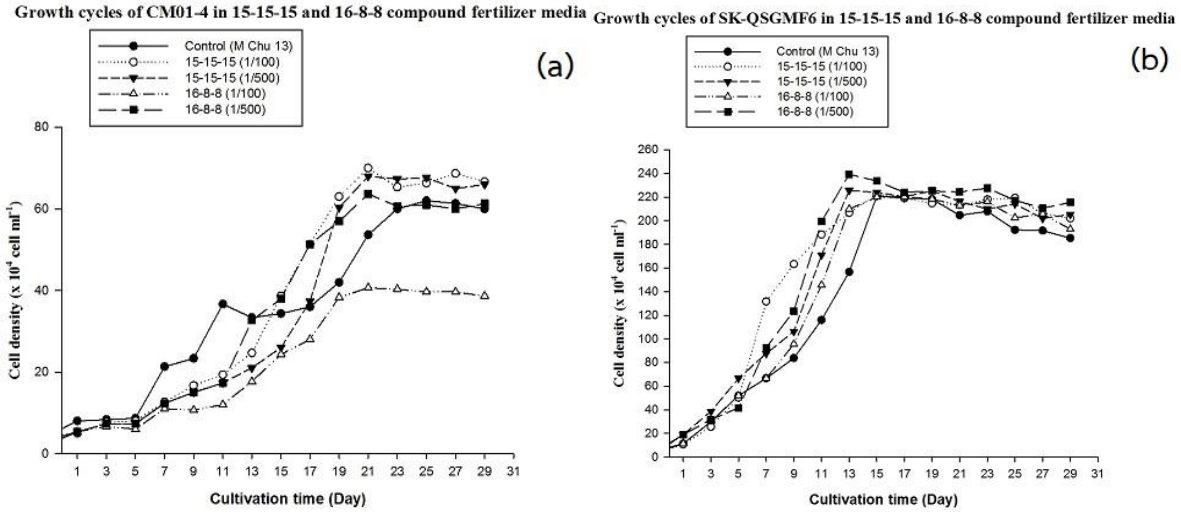
พบว่าอาหารปุ๋ยสูตร 16-8-8 (ภาพที่ 3, a) และปุ๋ยสูตร 15-15-15 (ภาพที่ 3, b) ที่อัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/500 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 13 วันเท่ากัน ให้อัตราการเจริญของเซลล์สูงที่สุดคือ $2.39 \times 10^6$ และ $2.26 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยมีค่าการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 ส่วนผลของอัตราส่วนการให้ปุ๋ย 1/50 มีอัตราการเจริญน้อยกว่าและใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 19 วัน



**ภาพที่ 4** แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 โดยใช้ปุ๋ยสูตร 16-8-8 และ 15-15-15 ในอัตราส่วนต่าง ๆ

และจากผลการศึกษาการเจริญเติบโตกับสาหร่ายไอโซเลท CM01-4 ในภาพที่ 4 พบว่าอาหารปุ๋ยสูตร 16-8-8 (ภาพที่ 4, a) ที่อัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยง 1/500 ให้อัตราการเจริญของเซลล์สูงที่สุดคือ $6.37 \times 10^5$ และปุ๋ยสูตร 15-15-15 (ภาพที่ 4, b) ที่อัตราการใช้ต่อน้ำเลี้ยง 1/100 และ 1/500 ให้อัตราการเจริญของเซลล์สูงใกล้เคียงกันเท่ากับ $7.0 \times 10^5$ และ $6.68 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 21 วันเท่ากัน ซึ่งดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 ส่วนการใช้ปุ๋ยที่อัตราส่วน 1/50 มีอัตราการเจริญน้อยกว่าและใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 21 วัน ซึ่งจากการทดสอบทั้ง 2 ไอโซเลทนี้ชุด negative control และอัตราส่วน 1/10 สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้

2.2 การพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก




**ภาพที่ 5** แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท CM01-4 (a) และ SK-QSGMF6 (b)

จากผลการทดลองข้อ 2.1 สามารถสรุปผลการเจริญเติบโตได้ดังกราฟในภาพที่ 5 โดยคัดเลือกอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยงที่อัตราส่วน 1/500 ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 ที่ใช้อาหารปุ๋ย 16-8-8 และสาหร่ายไอโซเลท CM01-4 ใช้อาหารปุ๋ย 15-15-15 ที่มีค่าการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับอัตราส่วน 1/100 แต่ใช้ปุ๋ยน้อยกว่า เพื่อเป็นตัวกำหนดอัตราการใช้ปุ๋ยต่อน้ำเลี้ยงเพื่อทดสอบการเพาะเลี้ยงสำหรับสาหร่ายขนาดเล็กอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ SK-KhY6, A052, KK-20 และ Sm6-3

โดยการใช้ปุ๋ยเคมี 16-8-8 และ 15-15-15 ได้นำมาศึกษากับสาหร่ายอีก 2 ไอโซเลท ได้แก่ SK-KhY6 และ A052 โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตกับสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 ที่เหมาะสมกับสาหร่ายสายพันธุ์นี้ ผลการทดลองพบว่าการใช้ปุ๋ยเคมี 16-8-8 ให้ผลการเจริญเติบโตได้ดีทั้ง 2 ไอโซเลท โดยสาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 ให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุดเท่ากับ $1.26 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน ในขณะที่สาหร่ายไอโซเลท A052 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเช่นเดียวกัน คือ $2.54 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 17 วัน

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท KK-20 ได้ศึกษาการใช้กับอาหารจากปุ๋ยเคมีทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่ 30-0-0, 16-20-0, 16-8-8 และ15-15-15 โดยเปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน Modified Chu 13 ที่เหมาะสมกับสาหร่ายสายพันธุ์นี้ ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 24 วัน ซึ่งผลของการให้อาหารปุ๋ย 16-20-0 และอาหาร Modified Chu 13 เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุดใกล้เคียงกันคือ $2.59 \times 10^6$ และ $2.47 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ผลผลิตชีวมวลแห้ง 2.40 และ 3.02 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหารปุ๋ยเคมี 15-15-15 เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพียง $0.52 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตชีวมวล 1.50 กรัม ส่วนอาหารจากปุ๋ยเคมี 30-0-0 และ 16-8-8 สาหร่ายแทบไม่มีการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงเลือก อาหารปุ๋ย 16-20-0 ไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SM6-3 ได้ศึกษาการใช้กับอาหารจากปุ๋ยเคมีทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่ 12-6-30, 15-15-15, 8-24-24 และ 12-24-12 โดยเปรียบเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 N Free ที่เหมาะสมกับสาหร่ายสายพันธุ์นี้ ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 14 วัน ซึ่งผลของการให้อาหารปุ๋ย 8-24-24 พบว่าได้ปริมาณเซลล์สาหร่ายสดสูงสุดเท่ากับ 6.19 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณสารสกัดโพลิเมอร์ชีวภาพสูงสุด 1.84 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารจากปุ๋ยเคมี 3 สูตร ได้แก่ 12-6-30, 12-24-12, 15-15-15 และ BG-11 N Free ได้ปริมาณเซลล์สาหร่ายสดเท่ากับ 6.01 5.47 5.45 และ 3.62 กรัมต่อลิตร หลังทำการสกัดได้สารโพลิเมอร์ชีวภาพเท่ากับ 1.50 0.88 0.97 และ 1.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสดตามลำดับ (ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงเลือกอาหารปุ๋ย 8-24-24 ไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

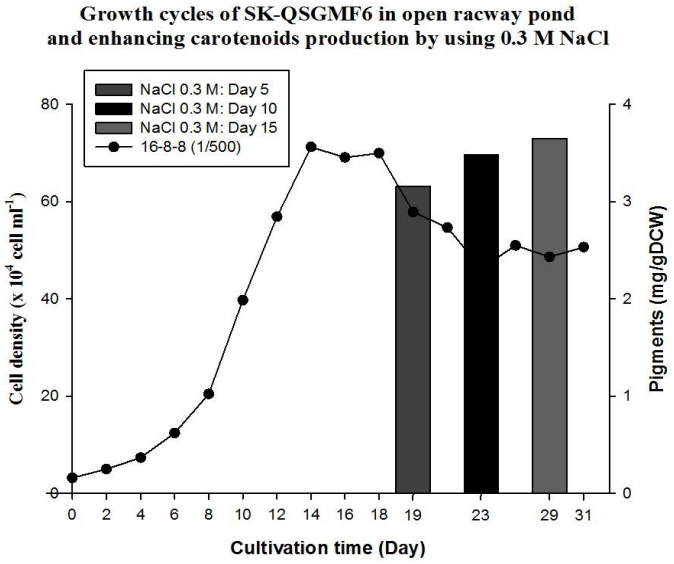
**ตารางที่ 1** ปริมาณสาหร่ายไอโซเลท Sm6-3 และสารสกัดโพลิเมอร์ชีวภาพ หลังการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน เทียบกับปุ๋ยเคมีสูตรต่างๆ

| Culture media | Biomass of microalgae ($gram_{fresh}$/litre) | Biopolymer extracted (%wt.) |
|---|---|---|
| BG-11 N Free | 3.62 | 1.46 |
| 15-15-15 | 5.45 | 0.97 |
| 12-24-12 | 5.47 | 0.88 |
| 12-6-30 | 6.01 | 1.50 |
| 8-24-24 | 6.19 | 1.84 |

**3. ผลการศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์เพื่อกระตุ้นการสะสมสารสำคัญ**

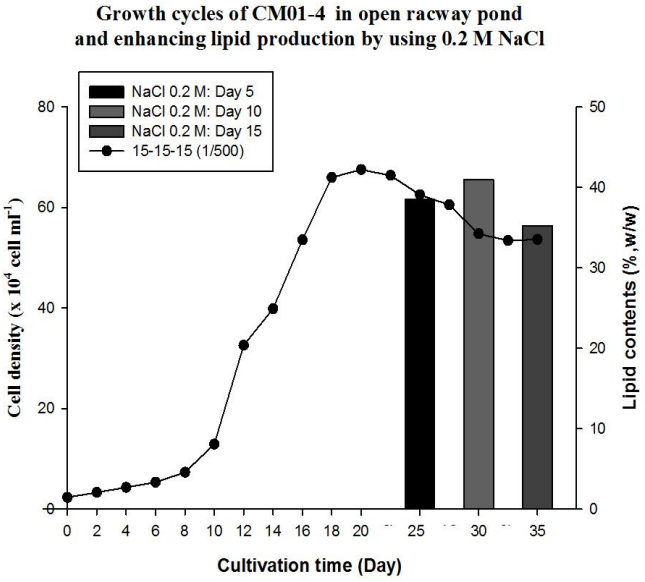
จากผลการทดลองการใช้อาหารปุ๋ยสูตร 16-8-8 อัตราส่วน 1/500 ในข้อ 2 ที่ให้ผลการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6, SK-KhY6 และ A052 เมื่อสาหร่ายเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) ของแต่ละสายพันธุ์แล้วทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 หลังการเพาะเลี้ยง 14 วัน และเลี้ยงต่อเนื่องหลังเติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 15 วัน มีการสะสมปริมาณสารแคโรทีนอยด์สูงสุด 3.65 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในภาพที่ 6 สาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 หลังการเพาะเลี้ยง 13 วัน และเลี้ยงต่อเนื่องหลังจากเติมโซเดียม

คลอไรด์อีก 15 วัน หลังการสกัดได้สารแคโรทีนอยด์เท่ากับ 4.40 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง และสาหร่ายไอโซเลท A052 หลังการเพาะเลี้ยง 17 วัน และเลี้ยงต่อเนื่องหลังเติมโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 15 วัน สามารถพอลีแซคคาไรด์ (TPE) ได้เท่ากับ 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง




**ภาพที่ 6** อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย SK-QSGMF6 ด้วยปุ๋ยสูตร 16-8-8 อัตราส่วน 1/500

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท CM01-4 ใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตราส่วน 1/500 หลังการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 6.76 x $10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายมีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อเพาะเลี้ยงหลังชักนำด้วยโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 10 วันดังแสดงในภาพที่ 7




**ภาพที่ 7** อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย CM01-4 โดยใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตราส่วน 1/500

**4. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิด (Open raceway pond)**

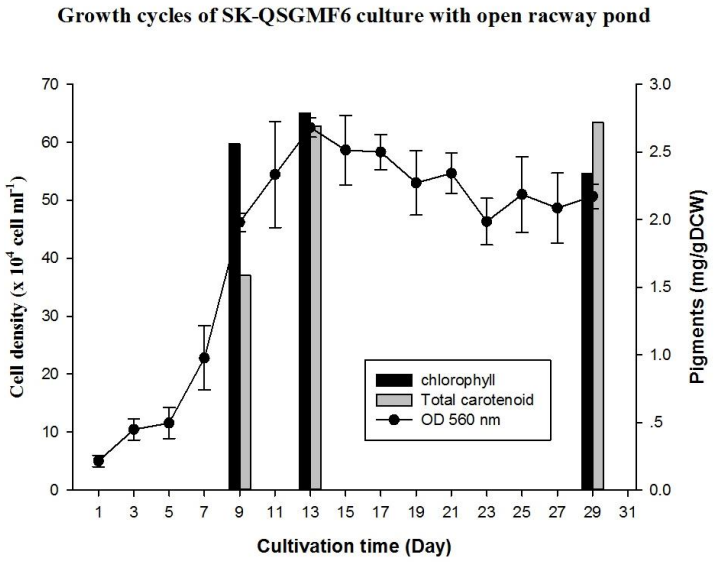
จากผลการทดลองในข้อ 2 ได้ทราบอัตราการให้อาหารต่อน้ำเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมคือ 1 ต่อ 500 จึงนำทดสอบการเพาะเลี้ยงในบ่อปริมาตร 500 ลิตร โดยใช้หัวเชื่อสาหร่ายเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรน้ำเพาะเลี้ยง เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายระหว่างสูตรมาตรฐานที่ใช้สารเคมีเกรดอุตสาหกรรมและปุ๋ยเคมีสูตรที่เหมาะสมกับสาหร่ายแต่ละไอโซเลทโดยใช้น้ำจากระบบน้ำประปาเพื่อการคำนวณต้นทุนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละไอโซเลท ดังนี้

3.1 ผลการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 เพื่อเพื่อการผลิตสารสีคลอโรฟิลด์ และแคโรทีนอยด์หรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

เนื่องจากสารสีคลอโรฟิลล์จะเป็นลักษณะสีของเซลล์สารสาหร่ายโดยปกติและสารแคโรทีนอยด์จะมีการสะสมในระหว่างการเจริญเติบโต 3 ช่วงระยะ คือระยะเพิ่มจำนวน (log phase), ระยะเริ่มคงที่หรือหลังการเพิ่มจำนวน (late log phase) และระยะสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (late stationary phase) ดังนั้นจึงสังเกตเห็นลักษณะทางกายภาพของน้ำเพาะเลี้ยงเมื่อใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วันดังภาพที่ 8

**ภาพที่ 8** ลักษณะของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 ในบ่อแบบขยายขนาดแบบเปิดปริมาตร 500 ลิตร

โดยผลการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร Modified Chu 13 พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญที่สูงที่สุดในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง มีความหนาแน่นของเซลล์ $6.26 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และได้ผลผลิตชีวมวล 2.05 กรัมต่อลิตร ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้วิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีการของ Porra (2002) พบว่าเมื่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายอยู่ในระยะ log phase และ late log phase เซลล์จะมีสีเขียวเข้มมีค่าปริมาณคลอโรฟิลด์ 2.56 และ 2.79 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ในขณะที่ระยะ late stationary phase มีปริมาณเพียงคลอโรฟิลด์ 2.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 9) และการหาปริมาณแคโรทีนอยด์ ดัดแปลงจากวิธีของ de Quiros and Costa (2006) พบว่าในระยะ log phase มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.59 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนในระยะ late log phase และระยะ late stationary phase มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 2.69 และ 2.72 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ




**ภาพที่ 9** อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย Isolate SK-QSGMF6 โดยใช้อาหาร Modified Chu 13

ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารปุ๋ยสูตร 16-8-8 อัตราส่วน 1/500 จะเน้นไปในการสะสมสารแคโรทีนอยด์หรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ซึ่งหลังการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) จึงทำการชักนำให้เซลล์สาหร่ายด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ SK-QSGMF6 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 7.12 x $10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องหลังเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ อีก 15 วัน ได้ทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายไปด้วยเครื่องปั่นแยกกากและนำอบแห้งเพื่อสกัดสารจากเซลล์สาหร่ายได้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์สูงสุด 2.92 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยใช้เทคนิคการสกัด Supercritical fluid extraction (SFE) ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายภายใต้สภาวะวิกฤติยิ่งยวด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 300 บาร์ ใช้เวลาสกัด 3 ชั่วโมง เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารแคโรทีนอยด์ที่ได้คือ Beta-carotene, Lutein, Zeaxanthin และ Astraxanthin

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SK-KhY6 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 5.37 x $10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.75 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องหลังเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ อีก 15 วัน ได้ทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายไปด้วยเครื่องปั่นแยกกากและนำอบแห้งเพื่อสกัดสารจากเซลล์สาหร่ายได้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์สูงสุด 3.84 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยใช้เทคนิคการสกัด Supercritical fluid extraction (SFE) ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายภายใต้สภาวะวิกฤติยิ่งยวด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 300 บาร์ ใช้เวลาสกัด 3 ชั่วโมง เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารแคโรทีนอยด์ที่ได้คือ Lycopene, Beta-carotene, Lutein, Zeaxanthin และ Astraxanthin

3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท A052 ด้วยสูตรอาหารปุ๋ย 16-8-8 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 7.03x$10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงหลังชักนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์เป็นเวลา 15 วัน ได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 1.69 กรัมต่อลิตร ทำการ

สกัดพอลีแซคคาไรด์ (total polysaccharides extract, TPE) จากสาหร่ายที่ถูกกระตุ้นได้สูงสุด 6.51 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สาหร่ายที่ไม่ถูกกระตุ้นสามารถสกัดได้เพียง 4.12 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง

3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท CM01-4 ด้วยสูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15 สำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายสำหรับผลิตไขมัน ทำการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 20 วัน จากนั้นจึงทำการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์และเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 10 วัน โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ $6.76 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ได้สูงสุด 41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

3.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท KK-20 ด้วยสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมี 16-20-0 ทำการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 21 วัน เมื่อจากนั้นจึงทำการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์และเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 10 วัน โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดที่ 2.80x106 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้อัตราการให้ผลผลิตชีวมวลสาหร่าย 0.52 กรัมลิตร มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนในรูปไขมันได้สูงสุด 3.09 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

3.6 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไอโซเลท SM6-3 ด้วยสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมี 8-24-24 ทำการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase)ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 14 วัน หลังการกระตุ้นด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์และเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง 10 วัน ได้อัตราการให้ผลผลิตสาหร่าย 1.22 กรัมต่อลิตร และผลการสกัดสารโพลิเมอร์ชีวภาพได้ 0.33 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด

**5. การศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดและการสกัดสารสำคัญ**

โดยขั้นตอนนี้จะใช้วิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายจากบ่อเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์แบบอัตโนมัติ (High performance self-cleaning Separator) ซึ่งต้องหาอัตราการไหลและระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย เพื่อให้ได้ลักษณะของตัวอย่างที่เหมาะสม โดยพบว่าที่ระดับอัตราการไหลของสาหร่ายเข้าสู่เครื่องเหวี่ยง 500 $\pm$ 50 ลิตรต่อชั่วโมง เป็นอัตราเร็วที่เหมาะสมและไม่มีเซลล์สาหร่ายเหลือทิ้งในอาหารที่เพาะเลี้ยง และใช้ระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย 50 นาทีต่อรอบของการปั่นเหวี่ยง มีลักษณะของเนื้อตัวอย่างสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการนำไปอบแห้งเพื่อสกัดสารต่อไปดังแสดงในภาพที่ 10

**ภาพที่ 29** (a) เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติ (High performance self-cleaning Separator)
(b) ลักษณะของสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้ (c) เซลล์ของสาหร่ายที่ได้จากการอบแห้ง

**9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาดแบบบ่อเปิด ด้วยการพัฒนาสูตรอาหารจากปุ๋ยเคมีเทียบกับสูตรอาหารมาตรฐาน โดยสูตรปุ๋ย 16-8-8 ให้ผลการเจริญเติบโตได้ดีกับสาหร่ายขนาดเล็กที่ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือ ไอโซเลท SK-QSGMF6 เป็นสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella* sp. และไอโซเลท SK-KhY6 เป็นสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrella* sp. และ เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด $7.13 \times 10^5$ และ $1.26 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่ผลิตโพลีแซคคาไรด์สกัดได้จากสาหร่ายไอโซเลท A052 เป็นสาหร่ายสายพันธุ์ *Coelastrum microporum* เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด $2.54 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยผลการกระตุ้นด้วยความเค็มของน้ำเลี้ยงด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ สาหร่ายไอโซเลท SK-QSGMF6 และ SK-KhY6 ให้ปริมาณสารสกัดแคโรทีนอยด์ 3.65 และ 3.56 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งตามลำดับ ส่วนสาหร่ายไอโซเลท A052 ให้สารพอลีแซคคาไรด์ 6.51 %ต่อน้ำหนักแห้ง

สาหร่ายไอโซเลท CM01-4 ใช้สูตรอาหารปุ๋ย 15-15-15 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ $6.76 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีปริมาณไขมันในเซลล์ 41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังการถูกกระตุ้นด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สาหร่ายไอโซเลท KK-20 ใช้สูตรอาหารปุ๋ย 16-20-0 และการกระตุ้นการสะสมสารด้วยการเติม NaCl ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ได้ผลผลิตสาหร่ายมีความหนาแน่นเท่ากับ $3.50 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลผลิตชีวมวล 2.40 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนในรูปไขมันได้สูงสุด 3.09 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสาหร่ายสายพันธุ์ Sm6-3 ใช้สูตรอาหารปุ๋ย 8-24-24 มีอัตราการให้ผลผลิตเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตร

หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ปริมาณสารสกัดโพลิเมอร์ชีวภาพ 0.33 กรัมต่อกรัมสาหร่ายสด

จากการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กขยายขนาดแบบบ่อเปิดด้วยการใช้ใบพัดเพื่อการหมุนเวียนน้ำและเติมอากาศ รวมทั้งการใช้สูตรอาหารปุ๋ยเคมีที่มีธาตุอาหารหลักเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแตสเซียม ทดแทนสูตรอาหารมาตรฐาน และปัจจัยด้านสภาวะความเค็มของน้ำเพาะเลี้ยงเพื่อการกระตุ้นการสะสมสารสำคัญเพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตแล้ว ยังมีแนวทางอื่นๆ ที่จะสามารถพัฒนาได้ เช่น การเพาะเลี้ยงปิดแบบท่อหมุนเวียนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากปัจจัยภายนอกต่างๆ และการกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยก๊าซคาร์บอนไดร์ออกไซด์ แสงสีต่างๆ และธาตุอาหารเสริม เป็นต้น เพื่อกระตุ้นให้สเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กมีการสังเคราะห์สำคัญบางตัวที่นักวิจัยสนใจต่อไป

**10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กขยายขนาดแบบบ่อเปิดด้วยการใช้ใบพัดเพื่อการหมุนเวียนน้ำและเติมอากาศ เพื่อให้ได้หลักการที่ถูกต้อง สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ มีเทคโนโลยีที่ง่ายและเหมาะสมกับเกษตรกรไทย เพื่อที่สามารถถ่ายทอดสู่กลุ่มเกษตรกรในพื้นที่ที่ไม่สามารถใช้ประโยชน์จากที่ดินเพื่อเพาะปลูกพืชได้ รวมทั้งผู้ประกอบการที่สนใจนำไปพัฒนาต่อยอดในเชิงพาณิชย์ลดการนำเข้าวัตถุดิบที่มีราคาสูงจากต่างประเทศได้

**11. เอกสารอ้างอิง**


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

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงตอนพืช. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Donkin, P. 1976. Ketocarotenoid biosynthesis by Heamatococcus pluvialis. **Phytochemistry.** 15: 711-718.

Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition. **Trends Biotechnol.** 21(5):210–216.

Miki, W., Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Appl. Chem.** 1991; 63: 141-6.

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.

Rosenberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ.(2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Curr Opin Biotechnol** 19(5):430-6.

Shan Qin, Guo-Xiang Liu, Zheng-Yu Hu, (2008). The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Process Biochemistry**, 43, 795–802.

Sommer, T.R., D Souza, F.M.L. and Morrisy, N.m. 1992. Pigmentation of adult rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, using the green alge *Haematococcus pluvialis* **Aquacult**. 106:63-74.

**12. ภาคผนวก**