SWU Engineering Journal (2012) 7(2), 62-71
วารสารวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีที่ 7 ฉบับที่ 2 เดือนกรกฎาคม – ธันวาคม พ.ศ.2555

การศึกษาสภาวะการเลี้ยงจุลสาหร่ายที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและไขมัน

Study of Microalgae Cultivating Conditions Effecting on Protein and Lipid Content

ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร์
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ นครนายก ประเทศไทย 26120
E-mail: siriwans@swu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาสภาวะการเลี้ยงจุลสาหร่ายที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและไขมัน โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Chorella vulgaris* ในอาหารสูตร BG-11 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.14 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้แสง 4 ชนิด คือแสงธรรมชาติ (Sunlight, SL) แสงไฟไม้น้ำ(Blue light, BL) แสงไฟสีขาว (Day light, DL) และแสงไฟสีส้ม(Warm white light, WL) โดยให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง และศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสาหร่าย พบว่าสาหร่ายที่ให้แสดงธรรมชาติจะมีการเจริญเติบโตเร็วสูงสุด ตามด้วยแสงไฟไม้น้ำ แสงสีส้ม และแสงสีขาว สาหร่ายที่ทำการเลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติแบบไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (SL) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.784 ต่อวัน และเมื่อมีการป้อนคาร์บอนดออกไซด์ (SL-CO_2) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.913 ต่อวัน เซลล์สาหร่ายที่ทำการเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงธรรมชาติจะให้ปริมาณเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 1.993 กรัมต่อ 2 ลิตร โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 53.18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่สกัดได้โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟพบว่า ในสาหร่ายเกือบทุกสภาวะมีปริมาณกรดปาล์มิติกประมาณ 38 กรัมต่อ100 กรัมน้ำมัน และกรดโอเลอิกหรือโอเมก้า 9 ปริมาณ 1 ถึง 4 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน การเลี้ยงในสภาวะที่ใช้แสงไฟสีส้มพร้อมป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (WL-CO_2) มีปริมาณกรดไขมันไลโนเลอิก หรือโอเมก้า 6 ประมาณ 26 กรัมต่อ100 กรัมน้ำมัน ซึ่งมากกว่าสภาวะอื่น กรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิก หรือโอเมก้า 3 พบมากในจุลสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติ มีปริมาณ 10.63 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน ส่วนกรดไขมันชนิดแกมมาไลโนเลนิก หรือโอเมก้า 6 พบเฉพาะในเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงไฟสีขาวมีปริมาณ 1.53 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน

คำสำคัญ: สาหร่ายคลอเรลลา อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณโปรตีนและไขมัน

ABSTRACT

The objective of this experiment was to study of microalgae cultivating conditions affecting to protein and lipid content. In our study, the *Chlorella vulgaris* was cultivated in BG11 2-liter of bioreactor, initial pH of 7.14, 30°C and the light conditions: sunlight (SL), day light (DL), blue light (BL) and warm white light (WL) at room temperature. The effect of CO_2 feeding in the cultivation was also studied. All experiments, the results showed that the maximum specific growth rate under exposed to the sunlight with CO_2 (SL-CO_2) was 0.913 per day, whereas without CO_2, the maximum specific growth rate of

Chlorella vulgaris was 0.784 per day. *Chlorella vulgaris* exposed to SL condition gave a maximum dry cell weight of 1.993 grams per 2 liter of reactor volume with 53.18% protein content. From GC analysis, it was found that palmitic acid of all microalgae cultivating conditions is the major component of lipid composition with 38 grams per 100 grams, oleic acid was found to be 1-4 grams per 100 grams and WL-CO_2 condition gives a maximum linoleic acid 26 grams per 100 grams. α-linolenic acid had the maximum content of 10.63 grams per 100 grams from SL condition. While γ-linolenic acid was found only from DL condition with the content of 1.53 grams per 100 grams.

Key word: *Chlorella vulgaris*, Specific growth rate, Protein and lipid content

1. บทนำ

จุลสาหร่ายเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มนุษย์พยายามจะนำมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด เพราะจุลสาหร่ายให้ประโยชน์ทั้งทางด้านการนำมาเป็นพลังงานและอาหาร เนื่องด้วยจุลสาหร่ายมีปริมาณสารอาหารที่สำคัญมากเมื่อเทียบกับแหล่งอาหารชนิดอื่น และมีสารสำคัญที่สามารถนำไปทำประโยชน์อื่นได้ เช่น เครื่อง สำอาง ปุ๋ยชีวภาพและในอุตสหกรรมยา ปัจจุบันได้ทำการผลิตจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* เกิดขึ้นมาก เนื่องจากสาหร่ายสายพันธุ์นี้สามารถเลี้ยงดูได้ไม่ยาก และเนื่องมาจากในเซลล์ของสาหร่ายนั้น มีส่วนในการกักเก็บน้ำมัน จึงค่อนข้างได้รับความสนใจในการนำจุลสาหร่ายชนิดนี้มาสกัดน้ำมันเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคต [1] จึงมีการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์สาหร่าย พบว่า ชนิดของแสง ความเข้มแสง และจำนวนชั่วโมงการให้แสงมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันในเซลล์ ชิโนรสและคณะ [2] ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวพื้นเมืองสายพันธ์ *Chlorella sp.* โดยให้แสงไฟชนิดต่างๆ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กลูโคส และเหล็กที่อยู่ในรูปสารประกอบเฟอร์ริคคลอไรด์แก่สาหร่าย พบว่าชนิดของแสงไฟเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต ผลิตพอลิแซคาไรด์ (Polysaccharide) และไขมัน You et al. [3] ได้ทำการศึกษาชนิดแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *Porphyridium cruentum* โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสงสีต่างๆ พบว่าที่ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที แสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงทำให้มีมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายดีกว่าแสงสีน้ำเงินผสมแสงสีขาว โดยแสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงจะไปเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิแซคาไรด์ (Polysaccharide) และเพิ่มชีวมวล (Biomass) ของสาหร่าย และอัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Porphyridium cruentum* มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มของแสง แต่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อให้ระดับแสงเกินจุดอิ่มตัว (Saturation point) Yoo et al. [4] ได้ทำการศึกษาสาหร่าย 3 ชนิดที่จะสามารถผลิตไขมันได้สูงได้แก่ สาหร่าย *Botryococcus braunii* *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus sp.* เมื่อมีการเพิ่มอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10% และก๊าซไอเสียเข้าไปในระบบ พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้สาหร่ายมีความสามารถในการสร้างไขมันได้เพิ่มขึ้นและยังพบว่าเซลล์สาหร่ายมีอัตราการสังเคราะห์แสงดีขึ้น จึงทำให้ค่าความสารถในการสร้างชีวมวล (Biomass productivity) เพิ่มขึ้นอีกด้วย [5-6] เนื่องจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีผนังเซลล์ที่หนา การนำน้ำมันในเซลล์มาใช้ให้ได้มากที่สุดนั้นต้องมีการทำให้เซลล์แตกตัว Lee et al. [7] จึงมีการหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดไขมัน และพบว่าการสกัดไขมันที่ดีที่สุดด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นอกจากนั้นยังพบว่าการสกัดด้วยวิธี

ไมโครเวฟ (Microwaves) สามารถสกัดน้ำมันจากเซลล์ได้ปริมาณมากถึง 10.0-28.6 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้มีกลุ่มวิจัยที่สนใจการเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* [8-9] โดยศึกษาถึงสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะในห้องทดลองในด้านชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าอาหารสูตร BG-11 เหมาะสมกับการเลี้ยงและสภาวะที่เหมาะสมเป็นอุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.14 งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาหาสภาวะที่การเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* โดยที่ใช้แสงไฟสีต่าง ๆ ที่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการสังเคราะห์แสงและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มเข้าไปในระบบเลี้ยงที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและไขมันในเซลล์สาหร่าย โดยจะศึกษาถึงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในสภาวะแสงแตกต่างกัน รวมถึงการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะส่งผลถึงการผลิตโปรตีนและไขมัน เพื่อจะได้ข้อมูลเบื้องต้นมาพิจารณาสำหรับการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อสกัดเอาไขมันมาเป็นพลังงาน หรือนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล หรืออาหารเสริมเพื่อมนุษย์ได้

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 สารเคมีและวัสดุ

สาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* ได้รับมาจากสถาบันวิจัยและเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทุกชนิดเป็น AR Grade $CuSO_4$ (Ajax Finechem) Boric acid(Ajax Finechem) Petroleum Ether (J.T. Baker) H_2SO_4 (J.T. Baker) และ HCl (VWR International)

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายในแต่ละวัน ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (Shimadzu รุ่น UV1601 ประเทศญี่ปุ่น) การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใช้วิธี Kjeldahl โดยทำการกลั่นหาปริมาณแอมโมเนียโดยใช้ชุด Distillation Unit (Buchi: Model B 435 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) และทำการสกัดไขมันด้วยวิธี Soxhlet และใช้ Rotary evaporator (EYELA) ในการระเหยตัวทำละลาย และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของไขมันด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu: GC-14A) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.3 การเตรียมเชื้อสาหร่ายเริ่มต้น

นำเชื้อสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งเป็น Stock culture มาถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว Blue Green medium (BG-11) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและได้รับแสงเป็นเวลานาน 7 วัน จึงสามารถนำเชื้อไปทำการเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและไขมันจากจุลสาหร่ายต่อไป [8]

2.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

2.4.1 ชนิดของแสง

ทำการเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสงไฟจากหลอดไฟฟลูออเรสเซ็นต์ทั้งหมด 4 ชนิด คือ แสงธรรมชาติ (Sunlight, SL) แสงไฟไม้น้ำ (Blue light, BL) แสงไฟสีส้ม (Warm white light, WL) และแสงไฟสีขาว (Day light, DL) ขนาด 32 วัตต์ ค่าความเข้มแสงประมาณ 1100 ลักซ์ต่อหลอด โดยให้แสงจากหลอดไฟแก่สาหร่ายตลอด 24 ชั่วโมง เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาณ 2 ลิตร อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาสเซลเซียส) ค่า pH เริ่มต้นมีค่า 7.14 [8] และทำการป้อนอากาศทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าเซลล์สาหร่ายจะตกตะกอนและตายลงในที่สุดเพื่อหาค่าการเจริญของเซลล์สาหร่ายในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer เพื่อดูแนวโน้มการเจริญเติบโต จากการพล็อตค่าการเจริญเติบโต (Growth curve) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง LogN และ เวลา(วัน) โดย N คือความเข้มข้นของเซลล์สาหร่าย (กรัมต่อลิตร)

2.4.2 การป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เมื่อได้สภาวะแสงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงจากการศึกษาในหัวข้อ 2.4.1 แล้ว จากนั้นทำการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (99.99% บริษัทธนบุรีวัฒนา จำกัด) ที่อัตราการไหล 3.33 มิลลิลิตรต่อนาที ผสมกับอากาศจากเครื่องปั๊มอากาศอัตราการไหล 2.5 ลิตรต่อ

นาที เข้าสู่ถังปฏิกรณ์คิดเป็นสัดส่วนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.13% โดยปริมาตร และคงที่ตลอดเวลาทำการเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสงธรรมชาติ (SL) แสงไฟไม้น้ำ(BL) แสงไฟสีส้ม (WL) และแสงไฟสีขาว (DL) จากนั้นพิจารณาผลของชนิดแสงไฟที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ (1)

$$\mu = \frac{\ln(N/N_o)}{t} \quad (1)$$

เมื่อ μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (วัน$^{-1}$)

N = ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายวันเก็บตัวอย่าง (กรัมต่อลิตร)

N_o = ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายวันแรก (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา (วัน)

จากนั้นนำสารละลายสาหร่ายไปปั่นแยกเซลล์สาหร่ายโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge: ยี่ห้อ SANYO รุ่น MSE ประเทศอังกฤษ) นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์สาหร่ายไว้วิเคราะห์ต่อไป

2.5 การวิเคราะห์โปรตีน

นำเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl โดยทำการย่อยด้วยเครื่องย่อยเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเข้าเครื่องกลั่นโดยใช้กรดบอริก 4% ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ที่หยดอินดิเคเตอร์ผสม (Mixed indicator) ลงไป 2-3 หยด เป็นตัวจับแอมโมเนียจากนั้นทำการกลั่นเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำน้ำของเหลวที่ได้จากการกลั่นมาไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือเข้มข้น 0.1 โมลาร์ คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนโดยใช้สมการที่ (2)

$$\%\ \text{Nitrogen} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 14 \times 100}{W} \quad (2)$$

เมื่อ W = น้ำหนักของสารตัวอย่าง หน่วยเป็นมิลลิกรัม

V_2 = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้ไตเตรตกับสารละลายสารตัวอย่าง หน่วยเป็นมิลลิลิตร

V_1 = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้ไตเตรตกับสารไร้ตัวอย่าง (Blank) หน่วยเป็นมิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นของกรดเกลือมาตรฐาน มีหน่วยเป็นนอร์มัล (N)

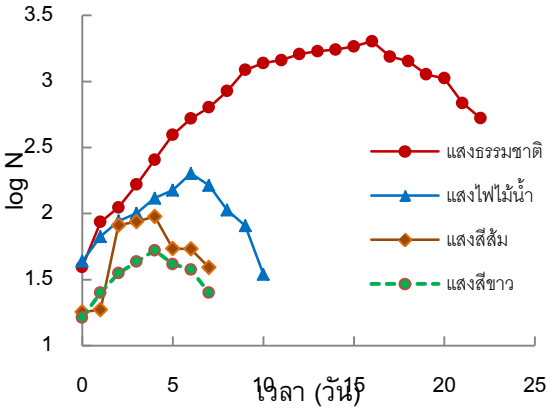
2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมัน

การหาองค์ประกอบของไขมันในจุลสาหร่ายทำโดยการแตกเซลล์สาหร่ายด้วยไมโครเวฟขนาดพลังงาน 100 วัตต์ เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เป็นสารตัวทำละลาย จากนั้นนำของผสมที่ได้มาสกัดไขมันด้วยวิธี Soxhlet โดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์เป็นตัวทำละลาย หลังจากนั้นนำส่วนที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมด จะได้เป็นน้ำมันดิบ (Crude oil) จากนั้นนำน้ำมันดิบจากขั้นตอนนี้ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ [10]

3 ผลการทดลอง

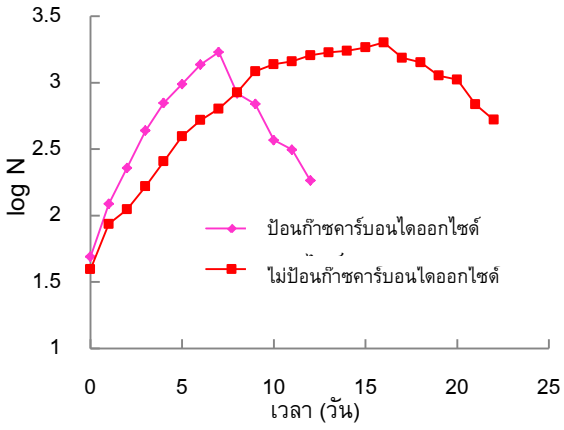
3.1 อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย

จากการเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสงไฟทั้ง 4 สภาวะแสงที่แตกต่างกันพบว่า การเลี้ยงด้วยแสงธรรมชาตินั้นให้ค่าการเจริญเติบโตที่สูงกว่าการเลี้ยงด้วยแสงชนิดอื่นๆ ดังรูปที่ 1



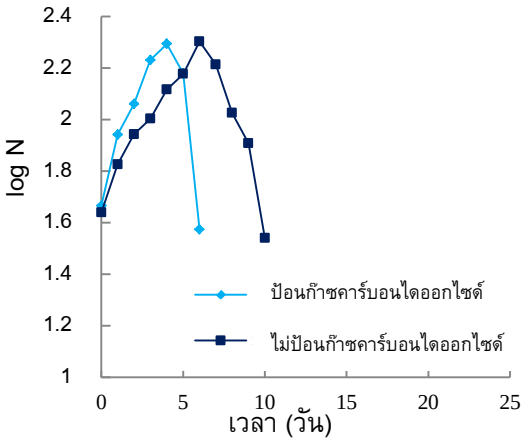
รูปที่ 1 กราฟแสดงผลการใช้แสงต่างชนิดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธ์ *Chlorella vulgaris* และไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

โดยจะเห็นว่ามีลำดับของแสงที่ทำให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เจริญเติบโตได้ดีนั้นเป็นแสงธรรมชาติ แสงไฟไม้น้ำ แสงสีส้ม และแสงสีขาวตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ You et al. [3] ที่พบว่าแสงสีน้ำเงินทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าแสงสีแดง สีขาว และแสงสีน้ำเงินผสมกับขาว ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบแสงน้ำเงินกับแสงธรรมชาติแล้วพบว่าแสงธรรมชาตินั้นให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าแสงสีน้ำเงิน เนื่องจากในแสงธรรมชาติจะประกอบด้วยแสงสีแดง แสงสีน้ำเงินและแสงอื่นๆ ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ผสมกันและเหมาะกับการใช้เป็นแหล่งพลังงานในการสังเคราะห์ของพืช ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะเลือกแสงไฟไม้น้ำซึ่งมีสีน้ำเงินและแสงธรรมชาติมาเป็นแหล่งแสงในการเลี้ยงสาหร่าย และทำการป้อนก๊าซคาร์บอนได ออกไซด์เข้าสู่ระบบการลี้ยง พบว่าการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายโดยทำให้สาหร่ายมีค่าการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่าการเลี้ยงแบบไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนได ออกไซด์ แต่มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่สั้นกว่า ดังรูปที่ 2 และ 3 เนื่องจากสาหร่ายสามารถนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงจะใช้เวลามาที่สภาวะเจริญเติบโตเต็มที่ (Stationary phase) สั้นลง



รูปที่ 2 กราฟแสดงผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติ

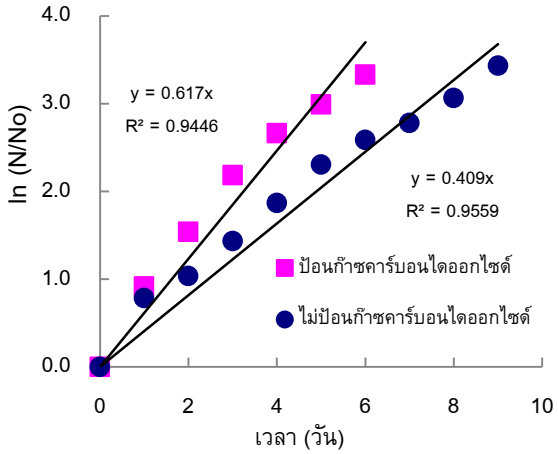
และเมื่อนำค่าความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายในแต่ละวันที่ให้แสงธรรมชาติและแสงไฟไม้น้ำและมีทั้งการป้อนและไม่ได้ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้สาหร่าย (รูปที่ 2 และ 3) มาหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะซึ่งคำนวณจากสมการที่ (1) พบว่าการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบการเลี้ยงสาหร่ายนั้นจะให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงแรกมีค่าสูงกว่าระบบที่ไม่ป้อน ทั้งนี้เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ จึงทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลงอย่างรวดเร็วกว่าระบบที่ไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากสาหร่ายโตจนถึงอายุที่สภาวะเต็มที่เร็วกว่าปกติ ทำให้มีค่า log N ที่สภาวะโตเต็มที่เท่ากัน ดังนั้นการเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสงธรรมชาติแบบป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเพื่อที่จะได้รับผลผลิตสูงในระยะเวลาสั้น



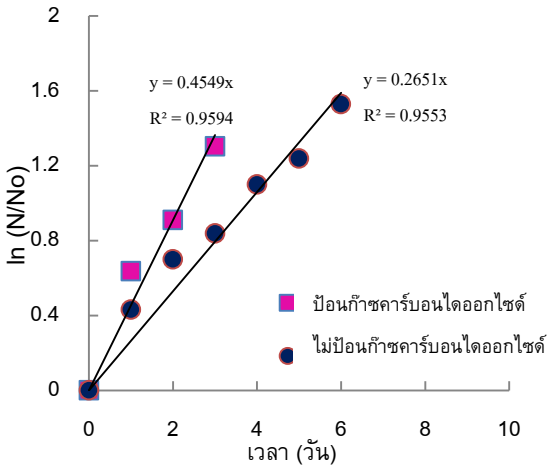
รูปที่ 3 กราฟแสดงผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เลี้ยงด้วยแสงไฟไม้น้ำ

เมื่อนำช่วง Exponential phase ของการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้งหมด(จากรูปที่ 2 และ 3) มาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln (N/No) และเวลา(วัน) เพื่อหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (μ) ของแต่ละสภาวะจะได้ผลดังรูปที่ 4 และ 5 ซึ่งจากรูปจะเห็นว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า ln (N/N_0) กับระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงที่เท่ากันนั้นตามสมการที่ (1) จะได้ค่า

ความชันของกราฟที่แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) มีค่าสูงและมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของระบบที่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าสูงกว่าระบบที่ไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของทั้งสองสภาวะแสง

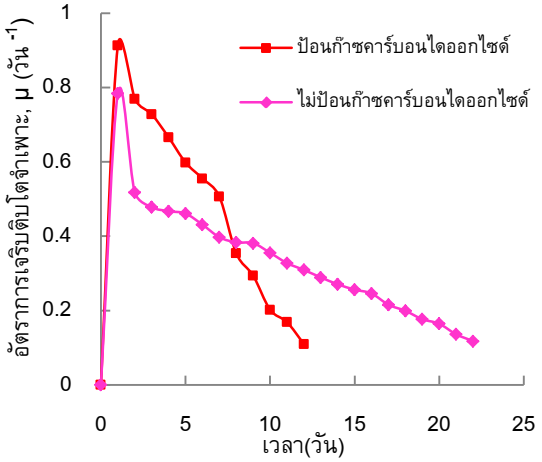


รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln (N/No) และเวลา (วัน) ของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติ



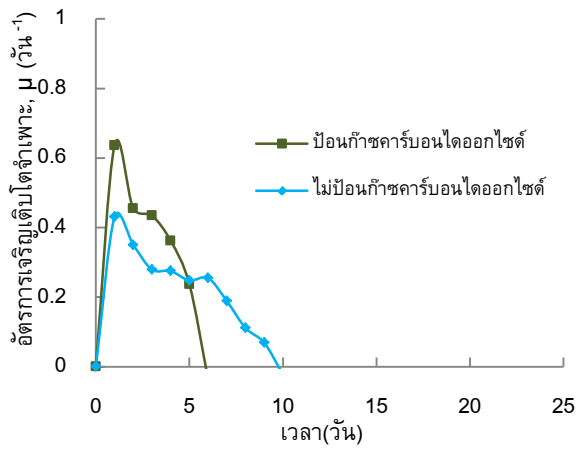
รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln (N/No) และเวลา (วัน) ของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงไฟไม้น้ำ

และเมื่อนำค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่เวลาต่างๆมาพล็อตกราฟกับเวลาจะได้ผลดังรูปที่ 6 และ 7 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoo et al. [4] ที่ทำการทดลองใช้อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10% และก๊าซไอเสีย (Flue gas) ในการเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus sp.* พบว่าเมื่อทำการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไอเสียให้แก่อากาศในระบบเลี้ยงเซลล์สาหร่าย ทำให้มีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงดีขึ้น จึงทำให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละวันเพิ่มขึ้น แต่จากงานวิจัยของฤทัยรัตน์ [5] ที่ได้ศึกษาผลของความเข้มแสงและความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในก๊าซผสมที่ต่างกัน(10% และ 20%) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* พบว่าความเข้มแสงเป็นปัจจัยเดียวที่มีอิทธิพลต่อการเติบโต ซึ่งผลการศึกษาที่ต่างกันอาจเนื่องจากการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 10% และ 20% ให้สาหร่ายเป็นความเข้มข้นที่สูงมากจนเกินความจำเป็นที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อีกจึงทำให้ไม่เห็นผลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ออัตราการเจริญเติบโตได้



รูปที่ 6 แสดงผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อค่า specific growth rate ของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติ

ซึ่งสอดคล้องกับ Lv et al. [11] พบว่าการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แก่ *Chlorella vulgaris* จะมีผลทำให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตสูง แต่หากปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้นจนถึงค่ามากกว่า 5% จะไม่เพิ่มการเจริญเติบโตและจะทำให้อัตราการสร้างไขมันลดน้อยลง โดยสภาวะที่ดีที่สุด คือ 1% คาร์บอนไดออกไซด์ 1.0 mM KNO_3 และความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที สามารถให้ไขมันสูงสุดถึง 40 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน



รูปที่ 7 แสดงผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อค่า specific growth rate ของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงไฟไม้น้ำ

จากการศึกษาของ Chiu et al. [12] พบว่า *Chlorella sp.* จะสามารถให้ปริมาณไขมันสูงเมื่อมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 2%-5% ส่วน Cheng et al. [13] ทำการศึกษาและพบว่าก๊าซคาร์บอนได ออกไซด์เข้มข้น 1% โดยปริมาตร สามารถทำให้ *Chlorella vulgaris* เจริญเติบโตดีที่สุด ในการทดลองของ Yoo et al. [4] และงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลการเติมและไม่เติมคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตได้และปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบไขมัน ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วง Exponential phase จากรูปที่ 4 -7 สามารถได้ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และชนิดของแสงที่มีผลต่อค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของจุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ชนิดของแสง	ชนิดอากาศที่ป้อน	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, μ (วัน$^{-1}$)	
		เฉลี่ย	สูงสุด
แสงธรรมชาติ	อากาศ	0.41	0.78
	อากาศ + CO_2	0.63	0.91
แสงไฟไม้น้ำ	อากาศ	0.27	0.43
	อากาศ + CO_2	0.45	0.64

3.2 ปริมาณโปรตีน

เมื่อนำเซลล์สาหร่ายไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl ตามขั้นตอนในหัวข้อ 2.5 พบว่าจุลสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะแสงธรรมชาติโดยไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุดถึง 53.18% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสังเกตได้ว่าเซลล์สาหร่ายที่ถูกเลี้ยงโดยไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นั้นสามารถให้ปริมาณโปรตีนมากกว่าแบบป้อนก๊าซคาร์บอนไดดอกไซด์ เนื่องจากเมื่อทำการเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในระบบจะทำให้จุลสาหร่ายใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต โดยความเข้มข้นของก๊าซไนโตรเจนในระบบจะมีค่าลดลงเนื่องจากการถูกแทนที่ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น จึงส่งผลต่อการสร้างปริมาณโปรตีนในจุลสาหร่าย เนื่องจากไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลกรดอะมิโนและโปรตีน และเมื่อพิจารณาการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้สาหร่ายที่ใช้แสงธรรมชาติและแสงไฟสีส้ม พบว่าแสงธรรมชาติทำให้สาหร่ายมีปริมาณโปรตีนมากกว่าเช่นกัน ปริมาณโปรตีนในสาหร่ายที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนในเซลล์สาหร่ายที่สภาวะการเลี้ยงต่างกัน

สภาวะเงื่อนไข	% โปรตีน
แสงธรรมชาติ + ป้อนอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	43.83 ± 1.10
แสงธรรมชาติ + ป้อนอากาศอย่างเดียว	53.18 ± 4.20
แสงไฟสีส้ม+ ป้อนอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	37.25 ± 2.30
แสงไฟสีขาว+ ป้อนอากาศอย่างเดียว	52.25 ± 2.60

3.3 ปริมาณไขมัน

ไขมันที่สกัดจากเซลล์สาหร่ายที่ทำการเลี้ยงในสภาวะต่างๆ เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยวิธี Soxhlet ในหัวข้อที่ 2.6 โดยใช้เครื่อง

ก๊าซโครมาโตกราฟ พบว่าปริมาณกรดปาล์มิติกที่พบในจุลสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติทั้งป้อนและไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีประมาณ 38% โดยน้ำหนัก ส่วนการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้แสงไฟสีส้มแบบป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีปริมาณกรดปาล์มิติกน้อยที่สุดเท่ากับ 34.88% โดยน้ำหนัก แต่มีปริมาณกรดไขมันไลโนเลอิก หรือโอเมก้า6 มากที่สุดถึง 25.90% โดยน้ำหนัก ส่วนกรดไขมันแกมมาไลโนเลนิก หรือโอเมก้า6 พบเฉพาะในเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงไฟสีขาวที่ไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีปริมาณ 1.53% โดยน้ำหนัก ส่วนกรดโอเลอิก หรือโอเมก้า9 มีปริมาณ 1-4% โดยน้ำหนัก และกรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิกหรือโอเมก้า 3 พบมากในสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติแบบไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยมีปริมาณเท่ากับ 10.63% โดยน้ำหนัก ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าโอเมก้า 3 ที่พบในน้ำมันปลาแซลมอน โดยน้ำมันที่ได้จากปลาแซลมอนมีปริมาณโอเมก้า3 เท่ากับ 35.31% โดยน้ำหนัก ดังนั้นสาหร่ายนี้อาจใช้เป็นแหล่งทางเลือกหรือทดแทนอาหารที่ให้ไขมันที่จำเป็นแทนจากน้ำมันปลาแซลมอน จากการศึกษาองค์ประกอบของไขมันที่สกัดได้จากสาหร่ายสามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณและองค์ประกอบของไขมันที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายแต่ละสภาวะ

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณไขมันจากสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง (กรัมต่อ 100 กรัม)			
	WL-CO_2	DL	SL-CO_2	SL
Palmitic	34.88	39.13	38.19	37.94
Linoleic (ω6)	25.90	7.92	10.67	15.84
Oleic(ω9)	1.27	2.43	3.55	2.30
α–linolenic (ω3)	2.55	0.88	4.31	10.63
γ-linolenic (ω6)	-	1.53	-	-

จากการศึกษาของ Nichols [14] พบว่าองค์ประกอบของไขมันที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เลี้ยงในอาหารอนินทรีย์จะมี α–linolenic acid (ω3) มากกว่าการเลี้ยงโดยอาหารแบบอินทรีย์ และจากศึกษาของ Converti et al. [15] พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณไขมันที่ได้จาก *Chlorella vulgaris* โดยเมื่อลดปริมาณไนโตรเจนในอาหารจะทำให้ปริมาณไขมันจากสาหร่ายเพิ่มขึ้นและมีกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักของไขมันประมาณ 60%

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ใช้อาหารอาหารสูตร BG-11 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.14 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ชนิดแสงที่แตกต่างกันและการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย คือ การใช้แสงธรรมชาติแบบป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจะให้ค่า log N เท่ากับ 3.3 ที่เวลา 16 วัน และค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.913 ต่อวัน และให้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 0.996 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ไม่มีการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.784 ต่อวัน การเลี้ยงโดยแสงไฟไม้น้ำแบบป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดสุดเท่ากับ 0.636 ต่อวัน และเมื่อไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีค่าเท่ากับ 0.431 ต่อวัน เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนพบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติโดยไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้ปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 53.18% ของน้ำหนักแห้งและการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้ปริมาณโปรตีนในสาหร่ายลดลง เมื่อพิจารณาปริมาณองค์ประกอบของไขมันพบว่า ในแต่ละสภาวะให้ปริมาณกรดปาล์มิติกมากถึง 35-40% โดยน้ำหนัก และมีสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น โอเมก้า 3 โอเมก้า 6 ซึ่งในสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติแบบไม่ป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีโอเมก้า 3 มากถึง 10.63% โดยน้ำหนัก ส่วนโอเมก้า 6 พบในสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสง

ไฟสีส้มแบบป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากถึง 25.90% โดยน้ำหนัก และโอเมก้า 9 มีในทุกสภาวะการเลี้ยงโดยมีประมาณ 1-4% ผลการศึกษานี้สามารถเป็นข้อมูลนำมาใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้แสงธรรมชาติและมีการป้อนอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับความเข้มข้นต่ำได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนเงินวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2552 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สัญญาเลขที่ 055/ 2552 ขอขอบคุณ ดร.กิตติพล กสิภาร์ สำหรับหัวเชื้อจุลสาหร่ายและแนะนำเทคนิคการเลี้ยง คุณเกษร บัวทอง สำหรับการเลี้ยงสาหร่าย นางสาววีรวรรณ พงศ์ประเสริฐสิน และนายกฤษฎา คำโมนะ ที่ช่วยเก็บข้อมูลและเตรียมข้อมูล

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae,” *Biotechnology Advances*, vol.25, pp.294–306, 2007.

[2] ชิโนรส ศรีศิริ ยิ่งยศ ลับภู ประสงค์ วงศ์วิชา และกันยรัตน์ โหละสุต. *“การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายท้องถิ่นเซลล์เดียว”* วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต. สาขาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, (2551).

[3] T. You and S. M. Barnett, “Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium Porphyridium cruentum,*” *Biochemical Engineering Journal,* vol.19, pp. 251-258, 2004.

[4] C. Yoo, S. Jun, J. Lee, C. Ahn and H. Oh, “Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide,” *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 571-574, 2010.

[5] ฤทัยรัตน์ วิศาลสุวรรณกร. *“ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของสาหร่าย Chlorella sp. โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพาะเลี้ยงในปฏิกรณ์ชีวภาพแสง”*. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, (2548).

[6] พวงผกา ดำรัตนา และพิมพรรณ ตันสกุล. *“ผลของช่วงแสงต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไฮโดรคาร์บอนในสาหร่าย Botryococcus braunii ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล”*. วิทยาศาสตรบัณฑิต. สาขาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, (2528).

[7] J. Lee, C. Yoo, S. Jun, C. Ahn and H. Oh, “Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae,” *Bioresource Technology*, vol.101, pp. s75-s77, 2010.

[8] ดนุกูล เลิศวณิชพัฒนกุล และศิริลักษณ์ นิยมการ. *“การผลิตโปรตีนจากจุลสาหร่ายเซลล์เดียว”*. วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต. สาขาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. นครนายก, (2551).

[9] กิติพล กสิภาร์ วัชระ เวียงแก้ว ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร์ และ ธนาธิป สามารถ. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง”. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข*. ปีที่ 40(1): 189-197, 2555.

[10] M. P. Mansour, “Reversed-phase high-performance liquid chromatography : purification of methyl esters C_{16}-C_{28} polyunsaturated fatty acids in microalgae, including octacosaoctaenic acid [28:8(n-3)],” *Journal of Chromatography A*, vol.1097, pp. 54-58, 2005.

[11] J. Lv, L. Cheng, X-H. Xu, L. Zhang and H. Chen, “Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions”. *Bioresource Technology”*, vol. 101, pp. 6797-6804, 2010.

[12] S. Y. Chui, C.Y. Kao, C.H. Chen, T.C.Kuan, S.C. Ong and C. S. Lin, "Reduction of CO_2 by a high density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photobioreactor. *Bio-resource Technology"*, vol. 99, pp. 3389-3396, 2008.

[13] L. Cheng, L. Zhang, H. Chen and C. Gao, "Carbon dioxide removal from air by micro-algae cultured in a membrane-photobio-reactor", *Separation and Purification Technology*, vol. 50, pp. 324-329, 2006.

[14] B.W. Nichols, "Light induced changes in the lipids of *Chlorella vulgaris*". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipid and Lipid Metabolism,* vol. 106 (2), pp. 274–279, 1965.

[15] A. Converti, A. A. Cazsa, E. Y. Ortiz, P. Perego and M. D. Borghi, "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*, vol. 48, pp.1146-1151, 2009.