



## วารสารวิศวกรรมศาสตร์และนวัตกรรม Journal of Engineering and Innovation

บทความวิจัย

### ผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่ายน้ำจืด *Chlorococcum humicola*

### Effects of nitrogen to phosphorus molar ratios on the growth and fatty acid accumulation of a freshwater microalga *Chlorococcum humicola*

ฉัตรชัย กันยารุช\* อธิศักดิ์ เกาโพธิ์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

Chatchai Kunyawut\* Idtisak Paopo

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

\* Corresponding author.

E-mail: chatchai.k@ubu.ac.th; Telephone: 0 4535 3413

วันที่รับบทความ 20 มิถุนายน 2564; วันที่แก้ไขบทความครั้งที่ 1 2 กันยายน 2564; วันที่ตอบรับบทความ 15 ธันวาคม 2564

#### บทคัดย่อ

การเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อเป็นวัตถุดิบทางชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยงและปัจจัยสำคัญหลายประการ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสในสารอาหารเหลวที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* (TISTR 8551) โดยจุลสาหร่ายที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $2.00 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup> ถูกเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟองปริมาตร 10 L ภายใต้สภาวะแบบกะ 14 วัน ในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (N:P) เท่ากับ 50:1 (GM-100%N), 5:1 (GM-10%N) และ 2.5:1 (GM-5%N) ซึ่งพบว่าการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่ายมีการตอบสนองที่ต่างกันต่อการแปรเปลี่ยนของความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรเจนในสารอาหารเหลว โดยการเลี้ยงจุลสาหร่ายใน GM-100%N ให้ผลผลิตชีวมวลมากที่สุดเท่ากับ  $0.77 \pm 0.14$  g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ 0.139 d<sup>-1</sup> ซึ่งมากกว่า  $\mu$  ของจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N ถึงร้อยละ 69.51 และ 98.57 ตามลำดับ เนื่องจากใน GM-100%N มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเพียงพอสำหรับจุลสาหร่ายในการสังเคราะห์โปรตีนและคลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงและแบ่งเซลล์จึงส่งผลให้มีการสังเคราะห์และสะสมกรดไขมันภายในเซลล์น้อยกว่ากรณีที่เลี้ยงในสารอาหารเหลวที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ค่อนข้างต่ำ ในทางตรงกันข้ามการเลี้ยงใน GM-5%N พบว่าจุลสาหร่ายมีปริมาณกรดไขมันสะสมมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ  $30.6 \pm 1.2$  ของน้ำหนักเซลล์แห้งสะสม เนื่องจากการเลี้ยงใน GM-5%N นั้นทำให้จุลสาหร่ายอยู่ภายใต้สภาวะการขาดแคลนไนโตรเจนในระดับที่สูงกว่า ดังนั้นเซลล์จุลสาหร่ายจึงลดการสังเคราะห์โปรตีนและคลอโรฟิลล์โดยเปลี่ยนไปสังเคราะห์และสะสมกรดไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์จากการได้รับแสงตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยง

#### คำสำคัญ

จุลสาหร่าย เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟอง ไนโตรเจน ผลผลิตชีวมวล กรดไขมัน

#### Abstract

Microalgae cultivation for being a biological feedstock of high-value products has long depended on culture conditions and various important factors. The objective of this research was to investigate the effects of nitrogen to phosphorus molar ratios on the growth and fatty acid accumulation of a freshwater microalga *Chlorococcum humicola* (TISTR 8551).

The microalgae having an initial density of  $2.00 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  was cultivated in a bubble column photobioreactor with a working volume of 10 L under batch condition for 14 days. The growth broth employed was modified BG-11 medium with the initial molar ratios of nitrogen to phosphorus (N:P) of 50:1 (GM-100%N), 5:1 (GM-10%N), and 2.5:1 (GM-5%N). It was found that the growth and fatty acid of the microalgae had different responses to a variation of the initial nitrogen concentration of the growth medium. The microalgae cultivated in the GM-100%N provided maximum biomass productivity of  $0.77 \pm 0.14$  g  $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$  and a specific growth rate ( $\mu$ ) of  $0.139 \text{ d}^{-1}$ . The figure of  $\mu$  obtained was higher than those cultivated in the GM-10%N and GM-5%N with 69.51 and 98.57%, respectively, because the GM-100%N had enough concentrations of nitrogen for the microalgae to synthesize protein and chlorophyll. Then, these compounds were used by the microalgae for photosynthesis and cell division resulted in lower activities of fatty acid synthesis and accumulation than those cultivated in the growth medium having relatively lower initial N:P molar ratios. On the other hand, the microalgae cultivated in the GM-5%N gave the highest cumulative fatty acid content of  $30.6 \pm 1.2$  %DCW. This was because the GM-5%N provided a higher degree of nitrogen starvation. Therefore, the microalgae reduced protein and chlorophyll synthesis activities and turned to increase fatty acid synthesis and accumulation in cells to prevent cell damage and degradation from light exposure during the cultivation period.

### Keywords

microalgae; bubble column photobioreactor; nitrogen; biomass productivity; fatty acid

## 1. บทนำ

ปัจจุบันจุลสาหร่ายมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากสามารถเลี้ยงให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นได้ตามความต้องการและสามารถใช้เป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมต่าง ๆ สำหรับการผลิตรายผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ในเชิงพาณิชย์หลายประเภทเนื่องจากภายในเซลล์ของจุลสาหร่ายมีสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น กรดอะมิโนที่จำเป็น กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน เกลือแร่ รงควัตถุหรือสีธรรมชาติ โดยสารประกอบอินทรีย์เหล่านี้หลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในเครื่องสำอาง สารปฏิชีวนะ และอาหารเสริมสุขภาพ [1-3] นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์ในด้านการบริโภคแล้ว จุลสาหร่ายยังได้รับความสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกเนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ทั้งนี้ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมจะทำให้มีการสะสมน้ำมันในเซลล์ของจุลสาหร่ายบางสายพันธุ์ด้วยปริมาณที่สูงถึงร้อยละ 50 – 70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง [2] ซึ่งการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวหลายสายพันธุ์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความเข้มข้นของธาตุอาหาร อัตราการป้อนอากาศและแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ ความเข้มแสง ฯลฯ [4] ทั้งนี้ปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนในสารอาหารเหลว (Growth

medium) นั้นเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันภายในเซลล์จุลสาหร่าย [5] โดยไนโตรเจนเป็นหนึ่งในธาตุอาหารที่มีความสำคัญอย่างมากต่อเซลล์จุลสาหร่ายเนื่องจากเป็นองค์ประกอบของโปรตีน กรดนิวคลีอิก รวมทั้งสารพันธุกรรมต่าง ๆ และเป็นธาตุที่มีปริมาณมากที่สุดรองจากคาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน [6] โดยไนโตรเจนมีปริมาณร้อยละ 1 – 10 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลสาหร่าย [7-8] ดังนั้นการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ของจุลสาหร่ายจึงจำเป็นต้องใช้ธาตุอาหารไนโตรเจน การเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อให้อยู่ภายใต้สภาวะการขาดแคลนธาตุไนโตรเจน (Nitrogen starvation) สามารถทำได้โดยการพร่องไนโตรเจน (Nitrogen depletion) ซึ่งจุลสาหร่ายจะเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน และโดยการจำกัดปริมาณไนโตรเจน (Nitrogen limitation) ซึ่งจุลสาหร่ายจะเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนไม่เพียงพอซึ่งภายในเซลล์จุลสาหร่ายอาจยังคงมีกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง [9] ถ้าหากปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนในสารอาหารเหลวถูกจำกัดให้เป็นสัดส่วนที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับธาตุอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น ฟอสฟอรัส จะทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์ของกระบวนการสังเคราะห์แสงที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก (Nitrogen-

rich compounds) ในปริมาณที่ลดลง เช่น โปรตีน คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ (ซึ่งเป็นรงควัตถุสำหรับดูดซับแสงภายในคลอโรพลาสต์ของจุลสาหร่าย) ในขณะที่มีการสังเคราะห์สารประกอบชนิดอื่นที่ให้พลังงานสูงกว่า (Energy-rich compounds) เช่น ลิพิด (Lipid) หรือกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้แล้วภายในคลอโรพลาสต์ของเซลล์จุลสาหร่ายที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีการพร่องของธาตุอาหารไนโตรเจนอาจมีปฏิกิริยาการสังเคราะห์ประเภทอื่นเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เพื่อเปลี่ยนสารประกอบซึ่งมีธาตุไนโตรเจนที่ไม่ใช่ลิพิด (เช่น คลอโรฟิลล์) ให้เป็นลิพิดซึ่งเป็นกระบวนการที่จุลสาหร่ายดึงไนโตรเจนภายในเซลล์มาใช้ในการสังเคราะห์ลิพิดหรือกรดไขมันเพื่อใช้ในการป้องกันผนังเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาแสง (Light reaction) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนั้นการเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจนจึงทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของเซลล์จุลสาหร่ายลดลงซึ่งเป็นผลมาจากการมีปริมาณของคลอโรฟิลล์ (ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ทำหน้าที่ดูดซับแสง) ไม่เพียงพอ ทำให้เซลล์จุลสาหร่ายลดหรือหยุดการแบ่งเซลล์และใช้ธาตุอาหารไนโตรเจนที่มีอยู่สังเคราะห์และสะสมกรดไขมันแทนการสังเคราะห์โปรตีน [1,10-12]

*Chlorococcum humicola* เป็นจุลสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวที่มีปริมาณกรดไขมันหรือน้ำมันในเซลล์ค่อนข้างสูง (ร้อยละ 45 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) กรดไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้นี้มีคุณสมบัติเป็นไตรกลีเซอไรด์เช่นเดียวกับน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมในการนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล [13-15] โดยที่ *Chlorococcum humicola* สามารถพบได้ง่ายในแหล่งน้ำจืดทั่วไปในประเทศไทยและทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะทางกายภาพในระหว่างการผลิตไบโอดีเซลได้ค่อนข้างดี นอกจากนี้แล้วจุลสาหร่ายสายพันธุ์นี้ยังมีเซลล์ขนาดใหญ่ทำให้มีความง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิต [16]

ภายใต้สถานการณ์ที่น้ำมันดิบมีราคาเพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบันส่งผลให้การพัฒนาการเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพจึงมีความจำเป็น โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การศึกษาผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงที่มีต่อการเจริญเติบโต

และการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* โดยผลการวิจัยที่ได้นี้จะประโยชน์ในการกำหนดรูปแบบและสภาวะการเลี้ยงจุลสาหร่ายให้เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันชีวภาพเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเป็นไบโอดีเซลซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินธุรกิจด้านการขนส่ง (Logistic) ของประเทศซึ่งมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง และช่วยลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันดิบซึ่งจะสามารถลดการขาดดุลทางการค้าของประเทศในระยะยาว ตลอดจนทั้งเป็นการเพิ่มความมั่นคงทางด้านพลังงานสำรองของประเทศ

## 2. การดำเนินงานวิจัย

### 2.1 จุลสาหร่าย

จุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* TISTR 8551 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยหัวเชื้อจุลสาหร่ายถูกนำมาเพาะขยายจำนวนเซลล์ด้วยสารอาหารเหลว BG-11 สูตรมาตรฐานซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (N:P) เท่ากับ 100:1 โดยประมาณ [16] ผสมด้วยสารอาหารเสริม (Trace metal A5, TMA<sub>5</sub>) ในปริมาณ 1 mg ต่อ 1 L ของสารอาหารเหลว BG-11 ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารอาหารเหลวให้มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.5 – 8.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1.0 M ตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงหัวเชื้อจุลสาหร่าย โดยให้แสงสังเคราะห์สีขาวที่มีความเข้ม 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (~3,500 Lux) และรักษาอุณหภูมิการเลี้ยงจุลสาหร่ายไว้ที่ 28°C – 32°C ป้อนอากาศตลอด 24 h [18]

### 2.2 สารอาหารเหลว

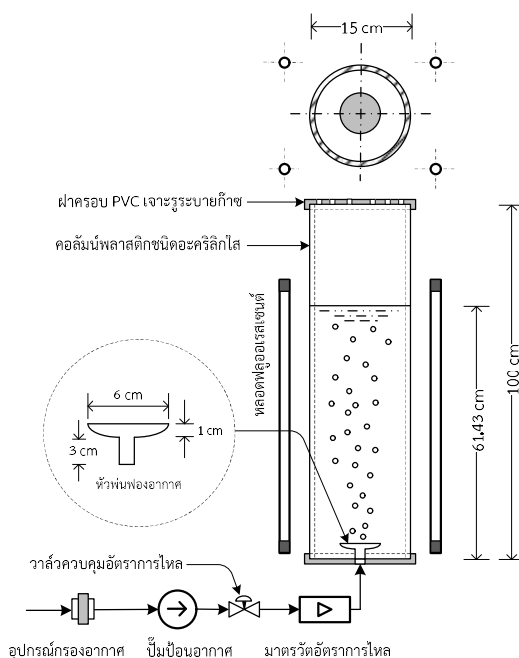
สารอาหารเหลวที่ใช้ในการทดลองนี้ปรับปรุงจาก BG-11 สูตรมาตรฐานโดยมี  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  และ  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$  เป็นแหล่งของธาตุอาหารไนโตรเจน (N) และฟอสฟอรัส (P) โดยในสารอาหารเหลวสูตรปรับปรุงทั้ง 3 สูตรนี้ (GM-100%N, GM-10%N และ GM-5%N) ยังประกอบด้วย  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  36  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20  $\text{mg L}^{-1}$  กรดซิตริก (Citric acid) 6  $\text{mg L}^{-1}$  เพอริกแอมโมเนียมซิเตรท 6  $\text{mg L}^{-1}$  EDTA 1  $\text{mg L}^{-1}$  และสารอาหารเสริมสูตร TMA<sub>5</sub> ซึ่งประกอบด้วย  $\text{H}_2\text{BO}_3$  2.86  $\text{g L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.81  $\text{g L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  390  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  222  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  79  $\text{mg L}^{-1}$  และ  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  50  $\text{mg L}^{-1}$

## 2.3 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟอง

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟอง (Bubble column photobioreactor, BCPBR) ที่ใช้เลี้ยงจุลสาหร่ายดังแสดงในรูปที่ 1 นั้นคอลัมน์ทำจากพลาสติกชนิดอะคริลิกใสทรงกระบอกเพื่อให้แสงส่องผ่านได้และสามารถสังเกตพฤติกรรม การไหลของสารอาหารเหลวและเซลล์ของจุลสาหร่าย [19] ที่ฐานด้านล่างภายในของคอลัมน์ติดตั้งหัวพ่นอากาศชนิดออริฟิสแผ่นเรียบแข็ง (Rigid orifice sparger) อากาศถูกป้อนเข้าสู่ส่วนล่างของ BCPBR ผ่านมาตรวัดอัตราการไหล ซึ่งอัตราการไหลของอากาศจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในเทอมของความเร็วผิวของก๊าซ (Superficial gas velocity,  $U_G$ ) โดยเทียบกับพื้นที่หน้าตัดของคอลัมน์เพื่อใช้ในการประเมินหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเชิงปริมาตรโดยรวมระหว่างเฟสก๊าซและของเหลว ( $k_La$ ) จากสมการที่ (1)

$$k_La = 0.32U_G^{0.7} \quad (1)$$

โดยที่  $U_G$  คือ ความเร็วผิวของอากาศ ( $m\ s^{-1}$ ) ซึ่งถูกป้อนเข้าสู่ BCPBR ที่ความดันบรรยากาศ [20] ให้แสงประดิษฐ์สีขาวสำหรับจุลสาหร่ายใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยติดตั้งหลอดฟลูออเรสเซนต์รอบ BCPBR



รูปที่ 1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟอง [19,21]

## 2.4 การเลี้ยงจุลสาหร่าย

บรรจุสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงปริมาตร 10 L ซึ่งผสมด้วย TMA<sub>5</sub> 1 mg ต่อ 1 L ของสารอาหารเหลวใน BCPBR จากนั้นเติมหัวเชื้อจุลสาหร่ายที่มีความหนาแน่นเชิงแสง (Optical density, OD) เท่ากับ 0.1 (มีปริมาณเซลล์ของจุลสาหร่ายเท่ากับ  $2.00 \times 10^6$  cell  $mL^{-1}$  โดยประมาณ) ทำการเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะแบบกะ 14 วัน ที่อุณหภูมิ  $28^\circ C - 32^\circ C$  ป้อนอากาศเข้าสู่ BCPBR โดยควบคุมให้  $U_G$  เท่ากับ  $0.3 \times 10^{-2} m\ s^{-1}$  เพื่อทำให้เกิดการไหลแบบพองก๊าซขนาดเล็กแขวนลอยในสารอาหารเหลวภายใน BCPBR ซึ่งเป็นพฤติกรรมทางกลศาสตร์ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงจุลสาหร่าย [22] โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเชิงปริมาตรโดยรวมระหว่าง  $CO_2$  และของเหลว ( $k_La$ ) เท่ากับ  $5.48 \times 10^{-3} s^{-1}$  [19] ให้แสงประดิษฐ์สีขาวที่มีความเข้ม  $50 \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$  ( $\sim 3,500$  Lux) โดยเวลาที่ให้และไม่ให้แสงเท่ากับ 12/12 h และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารอาหารเหลวให้มีค่า pH ระหว่าง 6.5 – 8.5 ด้วยสารละลายกรด HCl 0.1 M ตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยง ในการศึกษาผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงนั้นใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของ  $NaNO_3$   $250\ mg\ L^{-1}$  (GM-100%N),  $25.0\ mg\ L^{-1}$  (GM-10%N) และ  $12.5\ mg\ L^{-1}$  (GM-5%N) และความเข้มข้นเริ่มต้นของ  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$   $13.3\ mg\ L^{-1}$  เท่ากันในสารอาหารเหลวสูตรปรับปรุงทั้ง 3 สูตร ซึ่งจะทำให้อัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลวเท่ากับ 50:1, 5:1 และ 2.5:1 โดยประมาณ

## 2.5 การวิเคราะห์หาค่าของพารามิเตอร์

ทำการเก็บตัวอย่างสารอาหารเหลวซึ่งมีเซลล์จุลสาหร่ายแขวนลอยอยู่ด้วยจาก BCPBR ทุก 24 h เพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าของพารามิเตอร์ที่ศึกษา โดยความหนาแน่นของเซลล์วิเคราะห์โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) [23] ร่วมกับการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายโดยวิธีมาตรฐาน APHA: 2540-Solids; total solid dried method และความเข้มข้นของไนเตรทในสารอาหารเหลววิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน APHA: 450-  $NO_3^-$  B. Nitrogen (Nitrate) UV spectrophotometric screening method [24] สำหรับความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารอาหารเหลววิเคราะห์โดย

วิธีของ Strickland & Parson: Part II.2.1 Determination of reactive phosphorus [25] และปริมาณหรือความเข้มข้นของกรดไขมันในเซลล์จุลสาหร่ายวิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Blight & Dyer [26] โดยพารามิเตอร์ทุกเทอมในข้างต้นถูกวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนด้วยวิธีมาตรฐานทางสถิติ ทั้งนี้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลสาหร่าย (Specific growth rate) สามารถประเมินได้จากสมการที่ (2)

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

โดยที่  $\mu$  คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลสาหร่าย ( $d^{-1}$ )  $X_2$  และ  $X_1$  คือ ความหนาแน่นเซลล์จุลสาหร่าย ( $cell\ mL^{-1}$ ) ที่ระยะเวลาเลี้ยง  $t_2$  และ  $t_1$  (d) ตามลำดับ โดยการประเมินค่าเฉลี่ยของ  $\mu$  ใช้ข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในระยะทวีคูณ [27] ยกเว้นค่าของ  $\mu$  ที่แสดงในรูปที่ 10 นั้นทำการประเมินทุก 1 วัน ผลผลิตชีวมวล (Biomass productivity) ผลผลิตกรดไขมัน (Fatty acid productivity) ของจุลสาหร่ายสามารถประเมินได้จากสมการที่ (3) และ (4)

$$P_{BM} = \frac{N_2 - N_1}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

$$P_{FA} = \frac{F_2 - F_1}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

โดยที่  $P_{BM}$  คือ ผลผลิตชีวมวล ( $g\ L^{-1}\ d^{-1}$ )  $P_{FA}$  คือ ผลผลิตกรดไขมัน ( $g\ L^{-1}\ d^{-1}$ )  $N_2$  และ  $N_1$  คือ น้ำหนักเซลล์แห้งสะสม ( $g\ L^{-1}$ )  $F_2$  และ  $F_1$  คือ ปริมาณหรือความเข้มข้นของกรดไขมันสะสม ( $g\ L^{-1}$ ) ที่ระยะเวลาเลี้ยง  $t_2$  และ  $t_1$  (d) ตามลำดับ ทั้งนี้ร้อยละของกรดไขมัน (Percentage of fatty acid,  $PFA$ ) สามารถประเมินได้จากสมการที่ (5)

$$PFA = \left( \frac{FA}{DCW} \right) \times 100 \quad (5)$$

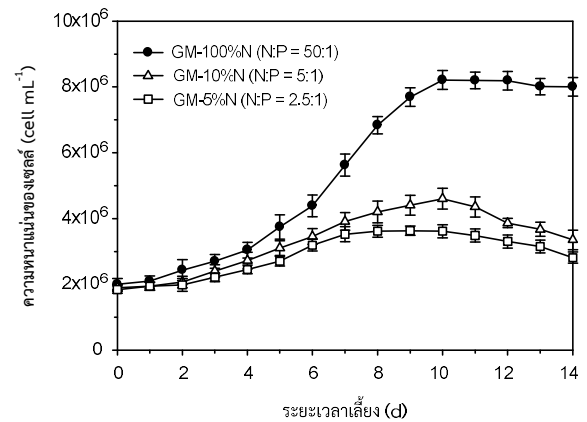
โดยที่  $FA$  คือ ปริมาณของกรดไขมัน ( $g\ L^{-1}$ ) และ  $DCW$  คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ( $g\ L^{-1}$ ) โดยร้อยละของกรดไขมันที่แสดงในรูปที่ 8 ประเมินจากการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันและน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละวัน สำหรับร้อยละของกรดไขมันที่แสดงในตารางที่ 1 เป็นค่าเฉลี่ยที่ประเมินจากปริมาณของกรดไขมันสะสมและน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 14 วัน

### 3. ผลการวิจัย

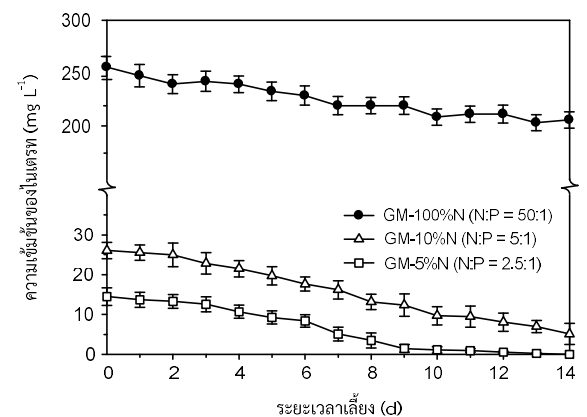
#### 3.1 ผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย

รูปที่ 2 แสดงความหนาแน่นของเซลล์ *Chlorococcum humicola* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ 14 วันใน BCPBR ด้วยสารอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรทแตกต่างกัน ซึ่งพบว่าจุลสาหร่ายมีพฤติกรรมของการเจริญเติบโตแบ่งได้เป็น 4 ระยะ โดยมีระยะปรับตัวใน 2 วันแรกเหมือนกัน เมื่อเข้าสู่ระยะทวีคูณจะพบว่ามีระยะเวลาที่แตกต่างกันโดยกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N และ GM-10%N นั้นอยู่ระหว่างวันที่ 3-10 ในขณะที่กรณีของ GM-5%N พบว่ามีระยะเวลาน้อยกว่า 1 วัน โดยอยู่ระหว่างวันที่ 3-9 และจากรูปที่ 2 จะพบว่าในระหว่างวันที่ 11-14 นั้นความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายมีค่าลดลงค่อนข้างน้อยมากสำหรับกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N ซึ่งให้เห็นว่าจุลสาหร่ายยังมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะคงตัวและในสารอาหารเหลวมีไนเตรทคงเหลือในปริมาณที่สูงมาก ซึ่งแตกต่างจากกรณีที่เลี้ยงใน GM-10% และ GM-5%N โดยความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างวันที่ 11-14 แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณไนเตรทคงเหลือในสารอาหารเหลวนี้น้อยพอสำหรับการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ โดยทั้ง 2 กรณีนี้จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะคงตัวประมาณ 1-2 วัน จากนั้นจึงเข้าสู่การเจริญเติบโตในระยะตาย และเมื่อสิ้นสุดการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณพบว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N, GM-10%N และ GM-5%N มีความหนาแน่นของเซลล์ที่มากที่สุดเท่ากับ  $8.2 \times 10^6 \pm 0.28 \times 10^6$ ,  $4.44 \times 10^6 \pm 0.32 \times 10^6$  และ  $3.72 \times 10^6 \pm 0.14 \times 10^6\ cell\ mL^{-1}$  และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ 0.139, 0.082 และ 0.070  $d^{-1}$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจุลสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตและมีอัตราการแบ่งเซลล์

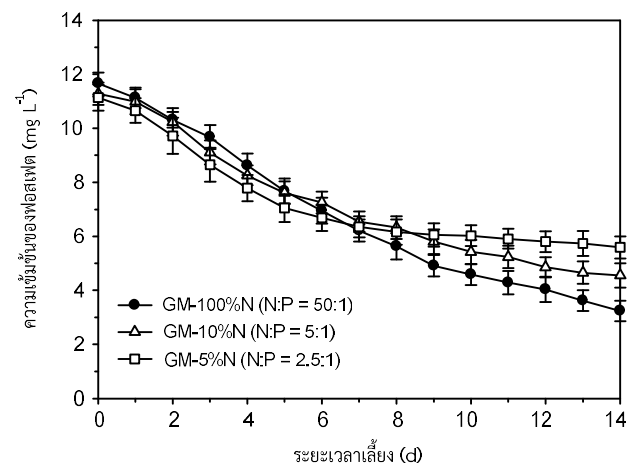
ในระดับที่สูงกว่าเมื่อทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่สารอาหารเหลวมีปริมาณของไนโตรเจนซึ่งอยู่ในรูปของไนเตรทอย่างเพียงพอต่อความต้องการที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ  $250 \text{ mg L}^{-1}$  ใน GM-100%N เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไนเตรทที่คงเหลือในสารอาหารเหลว (รูปที่ 3) จะพบว่ามีค่าสอดคล้องกับพฤติกรรมการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย (รูปที่ 2) ซึ่งจะพบว่าความเข้มข้นของไนเตรทมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องสำหรับกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N และ GM-10%N จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงในวันที่ 14 ในขณะที่ความเข้มข้นของไนเตรทในสารอาหารเหลวในกรณีของ GM-5%N นั้นพบว่ามีค่าน้อยกว่า  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  ตั้งแต่สิ้นสุดการเลี้ยงในวันที่ 8 ซึ่งอยู่ในช่วงปลายของการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณ และสอดคล้องกับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของฟอสเฟตดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งมีค่าลดลงค่อนข้างน้อยมากในระหว่างวันที่ 9-14 ในขณะที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารอาหารเหลวนั้นมีค่าคงลงอย่างสม่ำเสมอสำหรับกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N และ GM-10%N โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในวันที่ 14 พบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตที่คงเหลือในสารอาหารเหลวสำหรับกรณีของ GM-100%N นั้นมีค่าน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าฟอสเฟตถูกจุลสาหร่ายนำไปใช้ในการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบอัตราการใช้อาหารทั้ง 2 ชนิดสำหรับการเลี้ยงจุลสาหร่ายในสารอาหารเหลวสูตร GM-100%N, GM-10% และ GM-5%N พบว่าจุลสาหร่ายมีอัตราการใช้นิโตรเจนเท่ากับ 3.86, 1.43 และ  $0.89 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  และฟอสฟอรัสเท่ากับ 0.71, 0.63 และ  $0.55 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและมีธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสอย่างเพียงพอในสารอาหารเหลวนั้นจุลสาหร่ายจะสามารถใช้นิเตรทและฟอสเฟตในการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับ  $\mu$  สำหรับกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N นั้นมีค่ามากกว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N ถึงร้อยละ 69.51 และ 98.57 ตามลำดับ



รูปที่ 2 ความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน



รูปที่ 3 ความเข้มข้นของไนเตรทที่คงเหลือในสารอาหารเหลวภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน

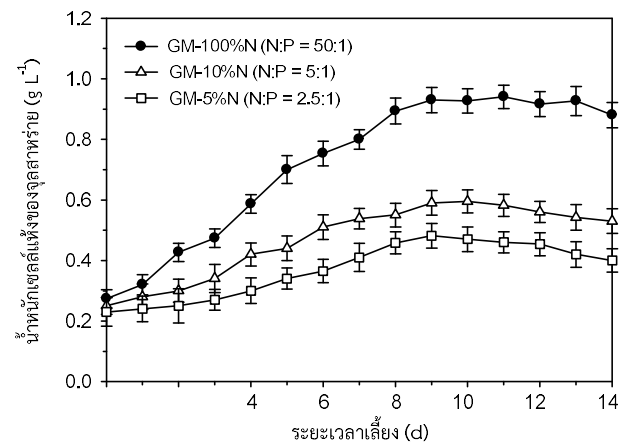


รูปที่ 4 ความเข้มข้นของฟอสเฟตที่คงเหลือในสารอาหารเหลวภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน

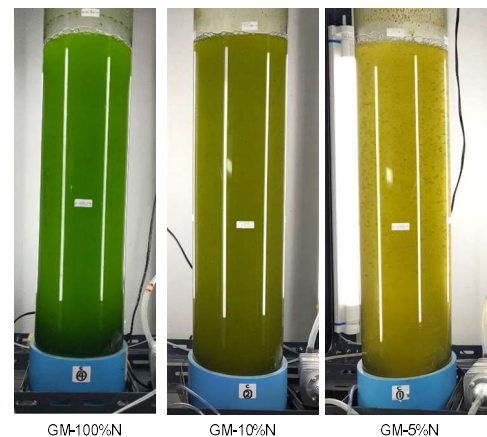
### 3.2 ผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ต่อ ชีวมวลและการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่าย

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 5 จะพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dried cell weight, DCW) หรือชีวมวลของจุลสาหร่ายที่เลี้ยงแบบกะ 14 วัน ด้วยสารอาหารเหลวสูตร GM-10%N และ GM-5%N นั้นมีค่าน้อยกว่ากรณีของ GM-100%N โดยเมื่อสิ้นสุดการเจริญเติบโตในระยะที่วัดพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ  $0.930 \pm 0.042$ ,  $0.590 \pm 0.041$  และ  $0.482 \pm 0.041$  g L<sup>-1</sup> สำหรับกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N, GM-10%N และ GM-5%N ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายดังแสดงในรูปที่ 1 โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 14 วัน พบว่าจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-100%N นั้นมีน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมเพิ่มขึ้นจากกรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N ถึงร้อยละ 52.92 และ 100.19 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลผลิตชีวมวลดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* โดยผลผลิตชีวมวลของจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N มีค่าน้อยกว่ากรณีของ GM-100%N ถึงร้อยละ 35.06 และ 48.05 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาสัดส่วนของน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมของจุลสาหร่ายต่อปริมาณหรือความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปตลอดระยะเวลา 14 วัน ดังแสดงในตารางที่ 2 จะพบว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N นั้นมีค่ามากกว่ากรณีของ GM-100%N ถึงร้อยละ 43.06 – 43.85 เนื่องจากกรณีของ GM-100%N นั้นมีความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายภายใน BCPBR มากกว่ากรณีของ GM-10%N และ GM-5%N (รูปที่ 2) จึงอาจทำให้เกิดผลกระทบของการบดบังแสงจากเซลล์ของจุลสาหร่ายด้วยกันเอง (Self-shading effect) [28] โดยเซลล์ที่อยู่ใกล้ผนัง BCPBR จะมีโอกาสได้รับแสงในปริมาณที่มากกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแกนกลางของ BCPBR จึงส่งผลให้การสังเคราะห์แสงของเซลล์จุลสาหร่ายมีประสิทธิภาพโดยรวมน้อยกว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N เมื่อพิจารณาสีของเซลล์จุลสาหร่ายใน BCPBR ดังแสดงในรูปที่ 6 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในวันที่ 14 วัน พบว่าเซลล์ของจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-5%N นั้นมีสีเหลืองจางกว่ากรณีของ GM-10%N ในขณะที่ยัง

ของ GM-100%N ยังคงมีสีเขียวจางกว่ากรณีของคลอโรฟิลล์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-5%N กำลังเจริญเติบโตภายใต้สภาวะการขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจนอย่างรุนแรง จึงส่งผลให้คลอโรฟิลล์ภายในเซลล์มีปริมาณลดลงเนื่องจากการเสื่อมสภาพซึ่งเป็นผลมาจากการที่ไนโตรเจนที่อยู่ในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์นั้นอาจถูกดึงมาใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน [8,29] ในระดับที่มากกว่ากรณีของ GM-10%N



รูปที่ 5 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน



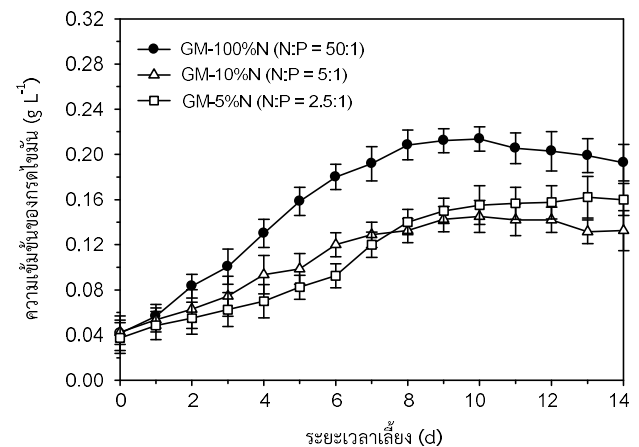
รูปที่ 6 สีของเซลล์จุลสาหร่ายเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 14 วัน ภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาปริมาณหรือความเข้มข้นของกรดไขมันที่สะสมในเซลล์จุลสาหร่ายดังแสดงในรูปที่ 7 จะพบว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N นั้นมีจุลสาหร่ายความเข้มข้นของกรดไขมันมากกว่ากรณีของ GM-10%N และ GM-5%N ตลอด

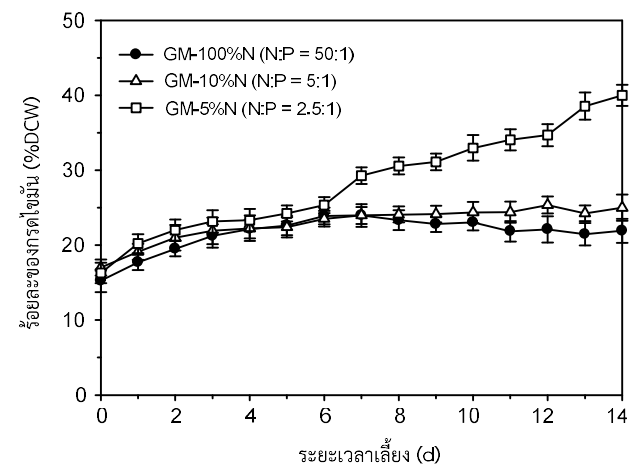


ระยะเวลา 14 วัน เนื่องจากการที่จุลสาหร่ายมีความหนาแน่นของเซลล์และน้ำหนักของเซลล์แห้งที่มากกว่า (รูปที่ 2 และ 5) โดยพบว่าจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-100%N มีปริมาณกรดไขมันสะสมสูงกว่ากรณีของ GM-10%N และ GM-5%N ถึงร้อยละ 45.12 และ 44.24 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 8 จะพบว่าระหว่างวันที่ 7-14 นั้นจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-5%N มีการสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ในระดับที่สูงกว่า โดยร้อยละของกรดไขมันในเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในวันที่ 14 พบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 40 ในขณะที่กรณีของ GM-100%N และ GM-10%N มีค่าเท่ากับร้อยละ 25 และ 22 ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่คงเหลือในสารอาหารเหลวที่แสดงในรูปที่ 3 โดยการเลี้ยงใน GM-5%N ระหว่างวันที่ 7-14 นั้นปริมาณของไนโตรเจนมีค่าใกล้เคียงกับศูนย์หรือเกือบหมดจึงส่งผลให้จุลสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจนในระดับที่สูงกว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N และ GM-10%N การที่ผลผลิตกรดไขมันของจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-100%N มีค่ามากกว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N (ร้อยละ 29.41) ดังแสดงในตารางที่ 1 นั้นเนื่องจากมีน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมที่มากกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาร้อยละของกรดไขมันสะสมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมของจุลสาหร่ายจะพบว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-5%N นั้นมีค่ามากที่สุด โดยมีค่ามากกว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-100%N ถึงร้อยละ 31.33 และ 39.09 ตามลำดับ และอัตราส่วนของกรดไขมันสะสมของจุลสาหร่ายต่อปริมาณของไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปตลอดระยะเวลา 14 วัน (ตารางที่ 2) นั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการลดลงของอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลว โดยกรณีของ GM-5%N จะพบว่ามีอัตราส่วนของกรดไขมันสะสมต่อปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปมากกว่ากรณีของ GM-10% และ GM-100%N ถึงร้อยละ

34.15 และ 150.00 ตามลำดับ ซึ่งเห็นว่าการที่มีธาตุอาหารไนโตรเจนในสารอาหารเหลวในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ (ดังเช่นกรณีของ GM-5%N) นั้นเป็นปัจจัยที่ช่วยกระตุ้นให้จุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* มีการสังเคราะห์และสะสมกรดไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันและลดการเสื่อมสภาพของเซลล์จากการได้รับแสงในช่วงการเลี้ยง [30]



รูปที่ 7 ความเข้มข้นของกรดไขมันของจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน



รูปที่ 8 ร้อยละของกรดไขมันในเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 น้ำหนักเซลล์แห้งสะสม ผลผลิตชีวมวล ปริมาณกรดไขมันสะสม ผลผลิตกรดไขมัน และร้อยละของกรดไขมันของจุลสาหร่ายที่เลี้ยงแบบกะ 14 วัน ในสารอาหารเหลว GM-100%N, GM-10%N และ GM-5%N ที่มี N:P เริ่มต้นเท่ากับ 50:1, 5:1 และ 2.5:1 ตามลำดับ

| อัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P | น้ำหนักเซลล์แห้งสะสม (g L <sup>-1</sup> ) | ผลผลิตชีวมวล (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | ปริมาณกรดไขมันสะสม (g L <sup>-1</sup> ) | ผลผลิตกรดไขมัน (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | ร้อยละของกรดไขมัน (%DCW) |
|--------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------|
| 50.0:1                         | 10.75 ± 0.11                              | 0.77 ± 0.14                                       | 2.38 ± 0.18                             | 0.17 ± 0.04                                         | 22.0 ± 1.8               |
| 5.0:1                          | 7.03 ± 0.09                               | 0.50 ± 0.22                                       | 1.64 ± 0.15                             | 0.12 ± 0.05                                         | 23.3 ± 1.4               |
| 2.5:1                          | 5.37 ± 0.05                               | 0.40 ± 0.18                                       | 1.65 ± 0.08                             | 0.12 ± 0.02                                         | 30.6 ± 1.2               |



**ตารางที่ 2** น้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและกรดไขมันสะสมต่อปริมาณของไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปในการเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบกะ 14 วัน

| อัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P | น้ำหนักเซลล์แห้งสะสมต่อปริมาณไนโตรเจน (g DCW mg N <sup>-1</sup> ) | กรดไขมันสะสมต่อปริมาณไนโตรเจน (g FA mg N <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 50.0:1                         | 0.201 ± 0.042                                                     | 0.044 ± 0.016                                            |
| 5.0:1                          | 0.353 ± 0.062                                                     | 0.082 ± 0.017                                            |
| 2.5:1                          | 0.358 ± 0.038                                                     | 0.110 ± 0.014                                            |

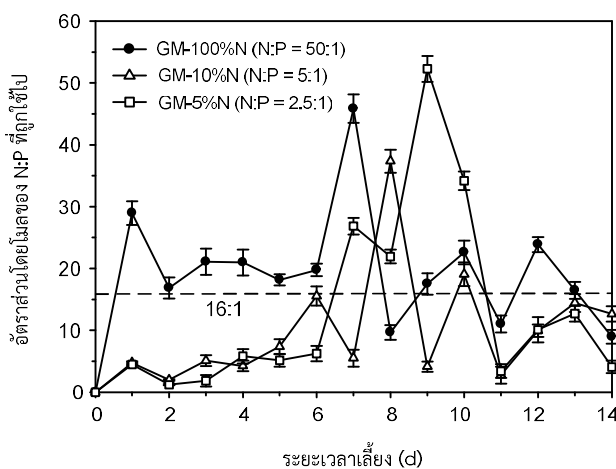
#### 4. การอภิปรายผลการวิจัย

การที่จุลสาหร่ายถูกจัดให้เป็นพืชชั้นต่ำชนิดเซลล์เดี่ยวและสามารถกำหนดให้เป็นสารประกอบเสมือนที่มีโครงสร้างโมเลกุล คือ C<sub>106</sub>H<sub>181</sub>O<sub>45</sub>N<sub>16</sub>P ซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลอะตอมของธาตุไนโตรเจนต่อธาตุฟอสฟอรัส (N:P) เท่ากับ 16:1 [31] ดังนั้นสารอาหารเหลวสูตรมาตรฐานส่วนใหญ่ที่ใช้เลี้ยงจุลสาหร่ายจึงมีอัตราส่วนโดยโมลของ N:P สูงกว่า 16:1 เพื่อให้จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้อย่างปกติภายใต้สภาวะที่ไม่ขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจน [32-33] เช่น สารอาหารเหลว BG-11 สูตรมาตรฐานนั้นอัตราส่วนโดยโมลของ N:P เท่ากับ 100:1 โดยประมาณ จุลสาหร่ายมีการใช้ธาตุอาหารฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปสารประกอบฟอสเฟตที่สำคัญ 2 ชนิด คือ แอดีนโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP) และนิโคตินเอไมด์แอดีนโนซีนไดนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate, NADPH) สำหรับการสะสมพลังงานภายในเซลล์ระหว่างที่มีการสังเคราะห์แสง โดยที่จุลสาหร่ายมีการใช้ธาตุอาหารฟอสฟอรัสในกระบวนการสังเคราะห์แสงในปริมาณที่ค่อนข้างน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับธาตุอาหารไนโตรเจน ดังนั้นผลกระทบของธาตุอาหารฟอสฟอรัสจึงไม่ได้ถูกศึกษาในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าธาตุอาหารฟอสฟอรัสมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่ายหลายสายพันธุ์น้อยกว่าธาตุอาหารไนโตรเจน [5,34]

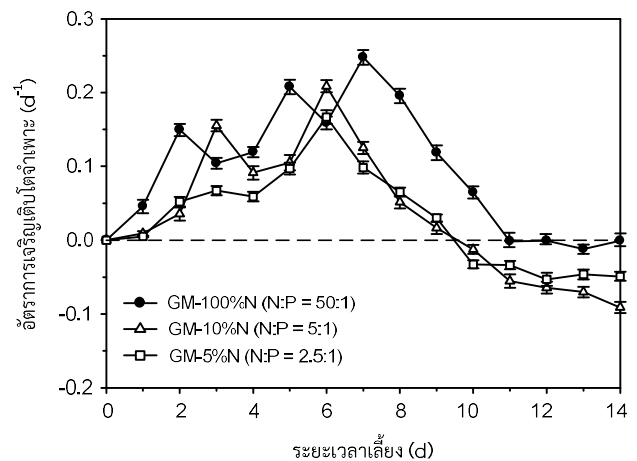
เมื่อพิจารณาอัตราส่วนโดยโมลของ N:P ในสารอาหารเหลวที่ถูกใช้ไปในแต่ละวัน (รูปที่ 9) ซึ่งประเมินจากปริมาณหรือความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสเฟตที่ถูกใช้ไปในแต่ละวันทั้งนี้ปริมาณของไนโตรเจนที่มีอยู่ใน TMA<sub>5</sub> จะมีผลกระทบน้อยมากต่ออัตราส่วนโดยโมลของ N:P ที่ถูกใช้ไปเนื่องจาก

TMA<sub>5</sub> ถูกเติมด้วยปริมาณ 1 mg ต่อ 1 L ของสารอาหารเหลวและสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารอาหารเหลวใน BCPBR ยังถูกควบคุมให้ pH มีค่าไม่สูงกว่า 8.5 เพื่อป้องกันการสูญเสียธาตุอาหารฟอสฟอรัสจากการตกตะกอนในรูปของเกลือฟอสเฟตโดยเฉพาะเมื่อจุลสาหร่ายเจริญเติบโตในระยะคงตัวและระยะตาย [35] โดยพบว่า การเลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนโดยโมลของ N:P ที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 6.10:1 และ 4.34:1 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า 16:1 ค่อนข้างมาก ในขณะที่การเลี้ยงใน GM-100%N นั้นมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนโดยโมลของ N:P ที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 14.60:1 ซึ่งใกล้เคียงกับ 16:1 แสดงให้เห็นว่าจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N มีการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีความเครียดจากการขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจนในระดับที่มากกว่ากรณีของ GM-100%N ซึ่งจะเห็นได้จากการที่ความหนาแน่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายที่ได้จากการเลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N นั้นมีค่าน้อยกว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N (ดังแสดงในรูปที่ 2 และรูปที่ 5) โดยการเลี้ยงใน GM-100%N มีน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมเพิ่มขึ้นจากกรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N ถึงร้อยละ 52.92 และ 100.18 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการที่อัตราส่วนของน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมต่อปริมาณของไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปในการเลี้ยง 14 วัน สำหรับกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N มีค่าน้อยกว่ากรณีของ GM-10%N และ GM-5%N ดังแสดงในตารางที่ 2 นั้นอาจเป็นผลมาจากการลดลงของประสิทธิภาพการกวนผสมใน BCPBR โดยการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์ จุลสาหร่ายในปริมาณที่สูงมากดังเช่นกรณีที่เลี้ยงใน GM-100%N นั้นจะทำให้มีเซลล์จุลสาหร่ายบางส่วนโดยเฉพาะเซลล์ที่อยู่ในบริเวณหรือย่านแกนกลางคอลัมน์ของ BCPBR ได้รับแสงไม่ทั่วถึงและส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้อัตราส่วนโดยโมลของ N:P ที่ถูกใช้ไปตลอดการเลี้ยง 14 วัน มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่า 16:1 (ถึงแม้ว่าจะมีธาตุอาหารไนโตรเจนในสารอาหารเหลวอย่างเพียงพอ) ซึ่งผลกระทบดังกล่าวนี้อาจไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นในระดับที่น้อยกว่าสำหรับกรณีของ GM-10%N และ GM-5%N และเมื่อพิจารณา  $\mu$  ของจุลสาหร่ายที่ประเมินในแต่ละวัน (รูปที่ 10) จะพบว่า การเลี้ยงใน GM-100%N นั้น  $\mu$  จะมีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่าศูนย์เพียง

เล็กน้อยในระหว่างวันที่ 11-14 ในขณะที่กรณีของ GM-10%N และ GM-5%N นั้น  $\mu$  มีค่าน้อยกว่าศูนย์ในช่วงการเลี้ยง ในวันที่ 9-14 ซึ่งการที่จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในคงตัว และระยะตายที่ยาวนานกว่าแสดงให้เห็นว่าจุลสาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนและคลอโรฟิลล์ได้อย่างเพียงพอเนื่องจากขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจนจึงส่งผลให้มีอัตราการแบ่งเซลล์ลดลง สำหรับการที่  $\mu$  ของกรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N มีค่าน้อยกว่าศูนย์มากกว่ากรณีของ GM-5%N ในระหว่างวันที่ 11-14 นั้นเป็นผลมาจากเซลล์จุลสาหร่ายที่ยังไม่ตายและมีขนาดใหญ่บางส่วนมีการจมตัวลงไปยังบริเวณส่วนล่างของ BCPBR ในปริมาณที่มากกว่ากรณีของ GM-5%N ถึงแม้ว่า BCPBR จะถูกออกแบบให้มีประสิทธิภาพของการกวนผสมที่ดีแต่การป้อนอากาศด้วย  $U_G$  เท่ากับ  $0.3 \times 10^{-2} \text{ m s}^{-1}$  โดยประมาณ นั้นอาจไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์จุลสาหร่ายที่มีขนาดใหญ่ทั้งหมด (เนื่องจากการสะสมกรดไขมันภายในเซลล์) ให้สามารถลอยขึ้นและกระจายตัวได้อย่างสม่ำเสมอภายใน BCPBR ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง [36-37] อย่างไรก็ตามการที่ไม่เพิ่มอัตราการไหลของอากาศที่ป้อนเข้าสู่ BCPBR นั้นเพื่อป้องกันไม่ให้มีเซลล์จุลสาหร่ายถูกทำลายหรือเสียหายเพิ่มมากขึ้นจากแรงเฉือนที่มีค่าเพิ่มขึ้นของฟองอากาศ [28,38]



รูปที่ 9 อัตราส่วนโดยโมลของ N:P ในสารอาหารเหลวที่ถูกใช้ไปภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน



รูปที่ 10 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) ของจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P แตกต่างกัน

จากรูปที่ 8 จะเห็นได้อย่างชัดเจนถึงผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลวที่มีต่อร้อยละของกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยในช่วงที่จุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* มีการเจริญเติบโตในระยะปรับตัวจนถึงช่วงกลางของระยะทวีคูณ (วันที่ 0-6) พบว่าจุลสาหร่ายที่เลี้ยงในสารอาหารเหลวทั้งสามสูตรนั้นมีการสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ด้วยปริมาณที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเนื่องจากยังคงมีปริมาณของธาตุอาหารไนโตรเจนในสารอาหารเหลวเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนและคลอโรฟิลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงและแบ่งเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับ  $\mu$  (รูปที่ 10) ที่มีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างวันที่ 0-6 และลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างวันที่ 7-14 ซึ่งเป็นช่วงที่ความเข้มข้นของไนเตรทในสารอาหารเหลวลดลงค่อนข้างมากโดยเฉพาะกรณีที่เลี้ยงใน GM-10%N และ GM-5%N (รูปที่ 3) ส่งผลให้จุลสาหร่ายเข้าสู่การเจริญเติบโตในระยะคงตัวและระยะตายเร็วกว่ากรณีของ GM-100%N ทำให้เซลล์จุลสาหร่ายมีการลดการสังเคราะห์โปรตีนและคลอโรฟิลล์และเปลี่ยนไปสังเคราะห์ลิพิดกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต [10] ซึ่งจะพบว่าการเลี้ยงใน GM-5%N มีร้อยละของกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่ากรณีที่เลี้ยงใน GM-10% และ GM-100%N ถึงร้อยละ 31.33 และ 39.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) การที่ร้อยละของกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-10%N มีค่าใกล้เคียงกับกรณีของ GM-100%N และน้อยกว่ากรณีของ

GM-5%N นั้นเนื่องจาก GM-10%N มีปริมาณของไนโตรเจนเฉลี่ยในแต่ละวันมากกว่ากรณีของ GM-5%N ตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยง (รูปที่ 3) จึงส่งผลให้จุลสาหร่ายมีการสังเคราะห์และสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ในปริมาณที่น้อยกว่า นอกจากนี้แล้วการที่เซลล์ของจุลสาหร่ายมีสีเขียวแกมเหลืองเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงยังชี้ให้เห็นว่าจุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-10%N มีการลดการสังเคราะห์โปรตีนและคลอโรฟิลล์และอาจมีการดึงเอาธาตุไนโตรเจนจากคลอโรฟิลล์มาใช้ในระหว่างการสังเคราะห์แสงเนื่องจากพบว่าอัตราส่วนโดยโมลของ N:P ที่ถูกใช้ไปตลอดการเลี้ยง 14 วัน ใน GM-10%N นั้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.1:1 ซึ่งมากกว่า 5:1 ซึ่งเป็นค่าเริ่มต้นของอัตราส่วนโดยโมลของ N:P ใน GM-10%N และจากการที่จุลสาหร่ายที่เลี้ยงใน GM-10%N มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่ากรณีของ GM-5%N (ร้อยละ 30.91) และประกอบกับการที่จุลสาหร่ายมีการสังเคราะห์กรดไขมันในระดับที่น้อยกว่า (ตารางที่ 2) จึงส่งผลให้ร้อยละของกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าน้อยกว่ากรณีของ GM-5%N ค่อนข้างมาก ในขณะที่มีค่าใกล้เคียงกับกรณีของ GM-100%N

ผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลว BG-11 ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* พบว่ามีความสอดคล้องกับจุลสาหร่าย *Chlorella zofingienensis* ที่เลี้ยงในสารอาหารเหลว BG-11 ที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P เท่ากับ 6.7:1 – 67:1 [34] โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและผลผลิตชีวมวลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ที่เพิ่มขึ้นใน BG-11 และมีค่ามากที่สุดเท่ากับ  $6.00 \pm 0.14 \text{ g L}^{-1}$  และ  $0.196 \pm 0.003 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงใน BG-11 ที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P เท่ากับ 67:1 ซึ่งมากกว่ากรณีของ BG-11 ที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P เท่ากับ 6.7:1 ถึงร้อยละ 54.78 และ 66.75 ตามลำดับ สำหรับผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ใน BG-11 ต่อการสะสมกรดไขมันของจุลสาหร่าย *Chlorella zofingienensis* พบว่าเป็นไปในทางตรงข้าม โดยร้อยละของกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตกรดไขมันของจุลสาหร่าย *Chlorella zofingienensis* ที่เลี้ยงใน BG-11 ที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นเท่ากับ 6.7:1 นั้นมีค่ามากที่สุดเท่ากับ  $65.1 \pm 3.0$  และ  $0.196 \pm 0.003 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากกรณีของ BG-11 ที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P เท่ากับ 67:1 ถึงร้อยละ 93.33 และ 27.90 ตามลำดับ ทั้งนี้ผลกระทบของอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลวต่อการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันในลักษณะเช่นนี้ยังพบในจุลสาหร่าย *Scenedesmus sp.* [5] *Chlorella minutissima* [29] *Scenedesmus obliquus* [33] และ *Chlorella sorokiniana* [39]

จากการที่การเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันในเซลล์ของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* มีการตอบสนองต่ออัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงในทางตรงข้าม โดยที่การเลี้ยงใน BG-11 ซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P มีค่ามากนั้นจะได้ชีวมวลในปริมาณที่มากแต่จะมีการสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ของจุลสาหร่ายในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ในขณะที่การเลี้ยงใน BG-11 ซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ที่มีค่าน้อยนั้นจะได้ชีวมวลในปริมาณที่น้อยแต่จะมีการสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ของจุลสาหร่ายในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* แบบกะที่มีการเติมสารอาหารเหลวเพียงครั้งเดียวที่เวลาเริ่มต้นนั้นไม่เหมาะสม เนื่องจากเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ที่ได้จากเลี้ยงในสารอาหารเหลวซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ที่มีค่ามากหรือน้อยเกินไปนั้นเมื่อนำมาสกัดเอากัดไขมันหรือน้ำมันชีวภาพจะได้ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อยจึงไม่มีความคุ้มค่าในทางเศรษฐศาสตร์ที่จะนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงรูปแบบหรือสภาวะการเลี้ยงเพื่อให้ได้ทั้งชีวมวลและกรดไขมันที่สะสมภายในเซลล์ของจุลสาหร่ายในปริมาณที่มากในเวลาเดียวกัน ซึ่งอาจทำได้โดยแบ่งการเลี้ยงเป็น 2 ขั้นตอน [1,40-45] โดยขั้นตอนที่ 1 นั้นเป็นการเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและในสารอาหารเหลวมีธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสอย่างเพียงพอเพื่อให้ได้เซลล์ของจุลสาหร่ายในปริมาณที่มากที่สุด จากนั้นจึงทำการเลี้ยงต่อเนื่องในขั้นตอนที่ 2 ด้วยการเพิ่มความเครียดให้กับเซลล์จุลสาหร่าย เช่น การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารไนโตรเจนในสารอาหารเหลว [5,29,33-34,39] เพื่อกระตุ้นให้เซลล์จุลสาหร่ายมีการสังเคราะห์และสะสมกรดไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น

## 5. สรุปผลการวิจัย

อัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงมีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตและการสะสมกรดไขมันภายในเซลล์ของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในทางตรงข้าม โดยน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตชีวมวลของจุลสาหร่ายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลจากจุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณที่นานกว่าเมื่อเลี้ยงในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P ที่มีค่ามาก เนื่องจากมีธาตุอาหารไนโตรเจนมากเพียงพอต่อการสังเคราะห์โปรตีนและคลอโรฟิลล์สำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการแบ่งเซลล์ จึงส่งผลให้จุลสาหร่ายมีการผลิตและสะสมกรดไขมันภายในเซลล์น้อยกว่ากรณีที่เลี้ยงจุลสาหร่ายในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงที่มีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P น้อยกว่า ซึ่งเป็นสภาวะที่จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตภายใต้ความเครียดจากการขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจน ซึ่งจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ถูกกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์และสะสมกรดไขมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์จากการได้รับแสงอย่างต่อเนื่องระหว่างที่ดำเนินการเลี้ยง โดยจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ที่เลี้ยงในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P เท่ากับ 50:1 (GM-100%N) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและผลผลิตชีวมวลมากที่สุดเท่ากับ  $0.139 \text{ d}^{-1}$  และ  $0.77 \pm 0.14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ตามลำดับ และมีร้อยละของกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ  $22.0 \pm 1.8$  ในขณะที่การเลี้ยงในสารอาหารเหลว BG-11 สูตรปรับปรุงซึ่งมีอัตราส่วนโดยโมลเริ่มต้นของ N:P เท่ากับ 2.5:1 (GM-5%N) นั้นมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและผลผลิตชีวมวลน้อยที่สุดเท่ากับ  $0.070 \text{ d}^{-1}$  และ  $0.40 \pm 0.18 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ตามลำดับ โดยมีร้อยละของกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเซลล์มากที่สุดเท่ากับ  $30.6 \pm 1.2$  ซึ่งการวิจัยในลำดับต่อไปนั้นเป็นการศึกษารูปแบบการเลี้ยงจุลสาหร่ายที่สามารถให้ผลผลิตชีวมวลและผลผลิตกรดไขมันภายในเซลล์จุลสาหร่ายในปริมาณที่สูงมากในเวลาเดียวกันเพื่อให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ในการนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซล

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์การวัดและสอบทานความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่าย

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Benavente-Valdés JR, Aguilar C, Contreras-Esquivel JC, Mendez-Zavala A, Montanez J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*. 2016; 10: 117-125.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007; 25: 294-306.
- [3] Goiris K, Colen WV, Wilches I, León-Tamariz F, Cooman LD, Muylaert K. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*. 2015; 7: 51-57.
- [4] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*. 2006; 67: 696-701.
- [5] Xin L, Hong-Ying H, Ke G, Ying-Xue S. Effect of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 2010; 191: 5494-5500.
- [6] Vymazal J. *Algae and Element Cycling in Wetland*. Boca Raton: Lewis Publishers; 1995.
- [7] Perez-Gacia O, Escalanie FME, Bashan LED, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Resources*. 2011; 45: 11-36.
- [8] Morales- Sánchez D, Kyndt J, Ogden K, Martinez A. Toward an understanding of lipid and starch accumulation in microalgae: A proteomic study of *Neochloris oleoabundans* cultivated under N-limited heterotrophic conditions. *Algal Research*. 2016; 20: 22-34.
- [9] Bona F, Capuzzo A, Francino M, Maffel ME. Semi- continuous nitrogen limitation as convenient operation strategy to maximize fatty acid production in *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*. 2014; 5: 1-6.
- [10] Lari Z, Moradi-Kheibari N, Ahmadzadeh H, Abrishamchi P, Moheimani NR, Murry MA. Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient

- management. *Journal of Applied Phycology*. 2016; 28: 3235-3250.
- [11] Najafabadi HA, Malekzadeh M, Jalilian F, Vossoughi M, Pazuki G. Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*. 2015; 180: 311-317.
- [12] Singh P, Guldhe A, Kumari S, Rawat I, Bux F. Combined metals and EDTA control: An integrated and scalable lipid enhancement strategy to alleviate biomass constraints in microalgae under nitrogen limited conditions. *Energy Conversion and Management*. 2016; 114: 100-109.
- [13] Phankosol S, Chum-in T, Krisnangkura K. Free energy additivity method for prediction dynamics viscosity of vegetable oils at various temperatures to its chemical compositions. *UBU Engineering Journal*. 2017; 10(2): 45-51.
- [14] Pokethitiyook P, Yuan JP, Meetam M, Sritong K, Pugkaew W, Damrongphol P. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*. 2012; 89(1): 296-302.
- [15] Kirtania K, Bhattacharya S. Application of the distributed activation energy model to the kinetic study of pyrolysis of the fresh water algae *Chlorococcum humicola*. *Bioresource Technology*. 2012; 107: 476-481.
- [16] Griffiths MJ, Harrison STL. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*. 2009; 21(5): 493-507.
- [17] Boussiba A, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiology*. 1991; 32(7): 1077-1082.
- [18] Wannasutthiwat S. *Growth and Enhancement of Carotenoids Production in Microalga Chlorococcum humicola in Continuous Condition*. MEng Thesis. Bangkok: Graduate school, Chulalongkorn University; 2014.
- [19] Kunyawut C, Paopo I, Krommuang A. Development of a bubble photobioreactor for microalgal culture. *Burapha Science Journal*. 2019; 24(2): 471-488.
- [20] Doran, PM. *Bioprocess Engineering Principles*. 2nd ed. London: Elsevier; 2013.
- [21] Thiangpakdee N, Kunyawut C, Paopo I. An increase in domestic wastewater treatment capacity of *Chlorococcum humicola*. *Burapha Science Journal*. 2021; 26(2): 1279-1292.
- [22] Fan LS. *Gas Liquid- Solid Fluidization Engineering*. London: Butterworth-Heinemann; 1989.
- [23] Krichnavaruk S, Powtongsook S, Pavasant P. Enhanced production capacity of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactors. *Bioresource Technology*. 2007; 98: 2123-2130.
- [24] APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: American water works association and water pollution control federation; 1999.
- [25] Strickland JDH, Parsons TR. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Toronto. Fisheries research board of canada: Alger press; 1972.
- [26] Bright EG, Dyer WJ. A rapid method of total liquid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1958; 37(8): 911-917.
- [27] Vaičiulyte S, Padovani G, Kostkevičiene J, Carlozzi, P. Batch growth of *Chlorella Vulgaris* CCALA 869 versus semi-continuous regimen for enhancing oil-rich biomass productivity. *Energies*. 2014; 7: 3840-3857.
- [28] Krichnavaruk S, Loataweesup W, Powtongsook S, Pavasant P. Optimal growth conditions and cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. *Chemical Engineering Journal*. 2005; 105: 91-98.
- [29] Ördög V, Stirk WA, Balint P, Staden JV, Lovase, C. Change in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima*. *Journal of Applied Phycology*. 2012; 24: 907-914.
- [30] Yang B, Jian JF, Kuo CM, Zhang DH, Lin CS. Biomass and lipid production of *Chlorella* sp. using municipal wastewater under semi- continuous cultivation. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*. 2017; 101: 485-493.
- [31] Grobbelaar JU. Algal nutrient: Mineral nutrient. Amos Richmond (eds). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. London: Wiley-Blackwell; 2004.
- [32] Redfield AC. The biological content of chemical factors in the environment. *American Scientist*. 1958; 46: 205-221.
- [33] Arbib Z, Ruiz J, Alvarez-Dias P, Garrido-Perez C, Barragan J, Perales JA. Photobiotreatment: influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics

- of *Scenedesmus obliquus*. *International journal of phytoremediation*. 2013; 15(8): 774-788.
- [34] Feng P, Deng Z, Fan L, Hu Z. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012; 114(4): 405-410.
- [35] Monfret E, Unc A. Defining wastewaters used for cultivation of algae. *Algal Research*. 2017; 24: 520-528.
- [36] Krommuang A, Kunyawut C, Paopo I. Domestic wastewater treatment with microalgae *Chlorococcum humicola* in an airlift photobioreactor. *Journal of Industrial Technology Ubon Ratchathani Rajabhat University*. 2021; 11(1): 55-57.
- [37] Gu W, Li H, Zhao P, Yu R, Pan G, Gao S, et al. Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* reveals two different high light-responsive strategies. *Scientific Reports*. 2014; 6661: 1-12.
- [38] Khoo CG, Lam MK, Lee KT. Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella Vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer study. *Algal Research*, 2016; 15: 65-76.
- [39] Adams C, Godfrey V, Wahlen B, Seefeldt L, Bugbee B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*. 2013; 131: 188-194.
- [40] Liu T, Li Y, Liu F, Wang C. The enhanced lipid accumulation in oleaginous microalga by the potential continuous nitrogen- limitation ( CNL) strategy. *Bioresource Technology*. 2016; 203: 150-159.
- [41] Pancha I, Chosh A, Mishra S. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*. 2017; 244, 1376-1383.
- [42] Mousavi S, Najafpour GD, Mohammadi M. CO<sub>2</sub> bio-fixation and biofuel production in an airlift photobioreactor by an isolated strain of microalgae *Coelastrum sp.* under high CO<sub>2</sub> concentration. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018; 25: 30139-30150.
- [43] Wang HT, Meng YY, Cao XP, Ai JN, Zhou JN, Xue S, Wang WL. Coordinated response of photosynthesis, carbon assimilation, and triacylglycerol accumulation to nitrogen starvation in the marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (haptophyta). *Bioresource Technology*. 2015; 177: 282-288.
- [44] Cabanelas ITD, Kleinegris DMM, Wijffels RH, Barbosa MJ. Repeated nitrogen starvation doesn't affect lipid productivity of *Chlorococcum littorale*. *Bioresource Technology*. 2016; 219: 576-582.
- [45] Shen XF, Liu JJ, Chauhan AS, Hu H, Ma LL, Lam PKS, et al. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. *Algal Research*. 2016; 17: 261-267.