

การคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีความสามารถในการผลิตไขมันจาก
แหล่งน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร

Isolation of lipid production of microalgae from agricultural wastewater

ปิยรัตน์ นามเสนา^{1*} และ สมัย แคนสิงห์¹

Piyarat Namsena^{1*} and Samai Khaensing¹

¹ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44000

*Corresponding author e-mail: Pnamsena@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีความสามารถในการผลิตไขมันจากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาล ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งจำนวน 18 ไอโซเลต (RMU ST1-ST18) และโรงงานน้ำตาลจำนวน 16 ไอโซเลต (RMU SU1-SU16) มีโคโลนีสีเขียวอ่อนและเข้ม รูปร่างกลมรี ขนาดเซลล์ 5.00-8.75 และ 5.50-7.25 ไมโครเมตร ตามลำดับ จากนั้นนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญและผลิตไขมันสะสมในอาหารเหลว Modified Medium สภาวะความเข้มแสง 2,000-3,000 ลักซ์ (12 ชั่วโมง มีด:12 ชั่วโมง สว่าง) นาน 7 วัน พบว่า สาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลสามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว Modified Medium มีมวลน้ำหนักแห้งในช่วง 0.06-0.49 กรัมต่อลิตร และ 0.08-0.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลไอโซเลต RMU - ST12 และ RMU - SU15 มีอัตราการเจริญสูงสุด 0.05 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.07 กรัมต่อลิตรต่อวัน ปริมาณไขมันสะสม 36.25 และ 41.50 เปอร์เซ็นต์โดยมวล สูงกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. (สายพันธุ์อ้างอิง) อย่างไรก็ตาม สาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลต RMU - SU15 มีอัตราการเจริญสูงสุดสูงกว่าสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลต RMU - ST12 แต่มีปริมาณไขมันสะสมที่ไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: สาหร่ายเซลล์เดียว น้ำมันไบโอดีเซล แหล่งน้ำทิ้ง โรงงานแป้ง โรงงานน้ำตาล

Abstract

This study was investigated the isolation of lipid production of microalgae isolated from modified starch and sugary wastewater. Results indicated 34 isolates of microalgae i.e. 18 isolates of microalgae (RMU ST1-18) found from modified starch wastewater while 16 isolates of microalgae (RMU SU1-16) found from sugary wastewater. Microscopy results of all 34 isolates showed a light to dark green colonies, oval shape and 5.00-8.75 μ m of cell size range, 34 isolates of microalgae were grown in modified medium broth under 2,000-3,000 lux light intensity and 12h light:12h dark of photoperiod for 7 days. Results showed that rapidly growth of microalgae isolated from modified

starch and sugary wastewater obtained 0.06-0.49 g/L and 0.08-0.54 g/L of cell dry weight, respectively. The maximum growth rate of 0.05 g/L/day and 0.07 g/L/day, lipid content of 36.25% and 41.50 % (w/w) were obtained from microalgae isolated from modified starch (RMU-ST12) and sugary wastewater (RMU-SU15), which higher than *Chlorella* sp.. However, isolate RMU-SU15 was shown maximum growth rate higher than RMU-ST12 but lipid content not significantly.

Keywords: Microalgae, Biodiesel, wastewater, starch, sugary

บทนำ

พลังงานเชื้อเพลิงมีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์และมีความต้องการใช้เพิ่มมากขึ้น แต่ปัจจุบันจะประสบปัญหาวิกฤติราคาน้ำมันตลอดจนสถานะการเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป รวมทั้งเป็นสาเหตุของปัญหาสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการคิดค้นพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทนและหนึ่งในนั้นคือ พลังงานจากพืชหรือพลังงานสะอาด โดยพืชที่สามารถนำมาผลิตน้ำมันมีหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง เรพซีด และปาล์ม เป็นต้น (Shen *et al.*, 2009) แต่ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวัตถุดิบใหม่ที่สามารถผลิตไขมันได้สูงกว่าพืชน้ำมัน โดยสาหร่ายเซลล์เดียวเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่เหมาะต่อการนำมาเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล หลักเกณฑ์ที่จำเป็นในการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวที่สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้คือ มีปริมาณไขมันสะสมสูง มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว เก็บเกี่ยวผลผลิตง่าย และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ซึ่งส่วนใหญ่สาหร่ายเซลล์เดียวที่มีคุณสมบัติตามหลักเกณฑ์ดังกล่าวอยู่ในดิวิชัน Chlorophyta (Phukan *et al.*, 2011) โดยสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งน้ำที่จะสามารถปรับตัวให้เข้าสภาวะแวดล้อมและเจริญเติบโตได้ดีกว่าสาหร่ายเซลล์เดียวที่เป็นสปิชีส์ non-native (Jimenez-Perez *et al.*, 2004) จึงได้มีการศึกษาและให้ความสนใจในเรื่องพลังงานชีวภาพหรือไบโอดีเซลจากสาหร่ายมาใช้เป็นพลังงานทดแทนมากขึ้น ดังการศึกษาของ Singh *et al.* (2008) ทำการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวได้จากแหล่งน้ำทิ้งในเขตเมือง Durban แอฟริกาใต้ พบว่าสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในดิวิชัน Chlorophyta สามารถสะสมไขมันได้ 3-12 เปอร์เซ็นต์ และ Yongmanitchai และ Ward (1991) รายงานว่าสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ 92 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่จะเจริญได้เร็วและมีการสะสมไขมันในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้แหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โรงงานผลิตเอทานอล แป้งมันสำปะหลัง และน้ำทิ้งจากครัวเรือนจะมีแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โปแทสเซียม ซัลเฟต แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เหล็ก และไนโตรเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบเดียวกันกับอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีความสามารถในการผลิตไขมันสะสมจากแหล่งน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมทางการเกษตร 2 แหล่ง ได้แก่ โรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลเพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตพลังงานทดแทนได้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวจากแหล่งน้ำทิ้งของโรงงานแปรงและโรงงานน้ำตาลและการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้

นำตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานแปรงในเขตจังหวัดกาฬสินธุ์และโรงงานน้ำตาลในเขตจังหวัดมหาสารคาม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว Modified medium (Liang *et al.*, 2009) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่า อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ความเข้มแสง 2,000-3,000 ลักซ์ (12 ชั่วโมงมืด : 12 ชั่วโมงสว่าง) นาน 7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างสาหร่ายเซลล์เดียวที่เพาะเลี้ยงได้ มาทำการเจือจาง โดยวิธี Serial dilution แล้วทำการ Spread plate บนอาหารแข็ง Modified medium บ่มที่สภาวะเดิม นาน 7 วัน หรือจนกว่าจะสังเกตเห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นจึงนำโคโลนีเดี่ยวมาทำการ Cross streak ขี้ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วนำสาหร่ายที่คัดแยกได้ไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการสังเกตรูปร่างและ วัดขนาดเซลล์ด้วย Ocular micrometer เปรียบเทียบกับสาหร่าย *Chlorella sp.* TISTR 8263 (สายพันธุ์อ้างอิง)

2. การศึกษาความสามารถในการเจริญและน้ำหนักแห้งของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้

ทำการศึกษาความสามารถในการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้ โดยการนำโคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว Modified medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ความเข้มแสง 2,000 - 3,000 ลักซ์ (12 ชั่วโมงมืด : 12 ชั่วโมงสว่าง) นาน 7 วัน แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร จากนั้นนำสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีความสามารถในการเจริญดีและเร็ว ($OD \geq 0.2$) มาเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิม นาน 7 วัน โดยใช้หัวเชื้อสาหร่าย (Inoculums) ที่มีค่า OD เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 จากนั้นนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้มารองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.5 แล้วคำนวณน้ำหนักแห้งและอัตราการผลิตเซลล์

3. การศึกษารูปแบบการเจริญและปริมาณไขมันสะสมของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้

นำสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีน้ำหนักแห้งสูงสุดจากข้อ 2 มาเตรียมหัวเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Modified medium ปริมาตร 800 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ความเข้มแสง 2,000 – 3,000 ลักซ์ (12 ชั่วโมงมืด : 12 ชั่วโมงสว่าง) นาน 7 วัน จากนั้นนำหัวเชื้อสาหร่ายย้ายลงในอาหารเหลว Modified medium ปริมาตร 5 ลิตร เพาะเลี้ยงที่สภาวะเดิม นาน 14 วัน โดยทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตรและน้ำหนักแห้งทุกวันเปรียบเทียบกับสาหร่าย *Chlorella sp.* และคำนวณอัตราการเจริญของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จากค่าน้ำหนักแห้งต่อเวลา จากนั้นนำผงสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน ปริมาณ 0.5 กรัม มาสกัดไขมันตามวิธีการของ Lee *et al.*, (2009) โดยใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายแล้วคำนวณหาปริมาณไขมันที่ได้

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวจากแหล่งน้ำทิ้งของโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้

จากการศึกษาการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวจากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาล พบว่าสามารถคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวจากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต ได้แก่ RMU-ST1, RMU-ST2, RMU-ST3, RMU-ST4, RMU-ST5, RMU-ST6, RMU-ST7, RMU-ST8, RMU-ST9, RMU-ST10, RMU-ST11, RMU-ST12, RMU-ST13, RMU-ST14, RMU-ST15, RMU-ST16, RMU-ST17 และ RMU-ST18 และสามารถคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวจากโรงงานน้ำตาลได้จำนวน 16 ไอโซเลต ได้แก่ RMU-SU1, RMU-SU2, RMU-SU3, RMU-SU4, RMU-SU5, RMU-SU6, RMU-SU7, RMU-SU8, RMU-SU9, RMU-SU10, RMU-SU11, RMU-SU12, RMU-SU13, RMU-SU14, RMU-SU15 และ RMU-SU16 โดยลักษณะโคโลนีของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากโรงงานแป้งมีสีเขียวเข้ม ส่วนสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากโรงงานน้ำตาลมีโคโลนีสีเขียวอ่อน แสดงใน Fig.1

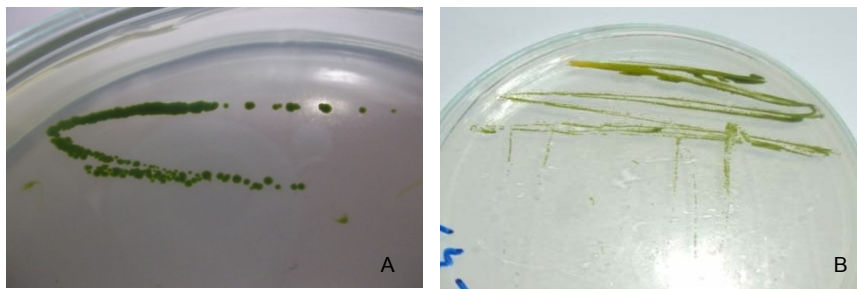


Fig. 1 Characteristic of microalgae colony isolated from starch wastewater (A) and sugary wastewater (B)

จากศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลทั้ง 34 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับสาหร่าย *Chlorella* sp. (สายพันธุ์อ้างอิง) พบว่าสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้ง มีรูปร่างกลมรี เซลล์มีขนาดเล็กอยู่ในช่วง 5.00 - 8.75 ไมโครเมตร เซลล์มีสีเขียวอ่อนลักษณะใกล้เคียงกับสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลต RMU-ST 2, RMU-ST7, RMU-ST9, RMU-ST11, RMU-ST12, RMU-ST13, RMU-ST14, RMU-ST15, RMU-ST16, RMU-ST17 และ RMU-ST18 มีขนาดเซลล์ที่ใหญ่อยู่ในช่วง 5.50-8.75 ไมโครเมตร และสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลต RMU-ST17 มีขนาดเซลล์ใหญ่ที่สุด 8.75 ไมโครเมตร ส่วนสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลต RMU-ST1, RMU-ST3, RMU-ST4, RMU-ST5, RMU-ST6, RMU-ST8 และ RMU-ST10 มีขนาดเซลล์ค่อนข้างเล็ก (5.00-5.35 ไมโครเมตร) ส่วนสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากโรงงานน้ำตาล มีรูปร่างกลมรีคล้ายไข่ โคโลนีสีเขียวอ่อนขนาดเซลล์อยู่ในช่วง 5.50-7.25 ไมโครเมตร โดยสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลต RMU-SU1, RMU-SU2, RMU-SU3, RMU-SU5, RMU-SU6, RMU-SU7, RMU-SU8, RMU-SU9, RMU-SU10, RMU-SU11, RMU-SU12,

RMU-SU13, RMU-SU14, RMU-SU15 และ RMU-SU16 มีขนาดเซลล์ใหญ่อยู่ในช่วง 6.00-7.25 ไมโครเมตร และสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลต RMU-SU14 มีขนาดเซลล์ใหญ่ที่สุด 7.25 ไมโครเมตร (Fig.2)

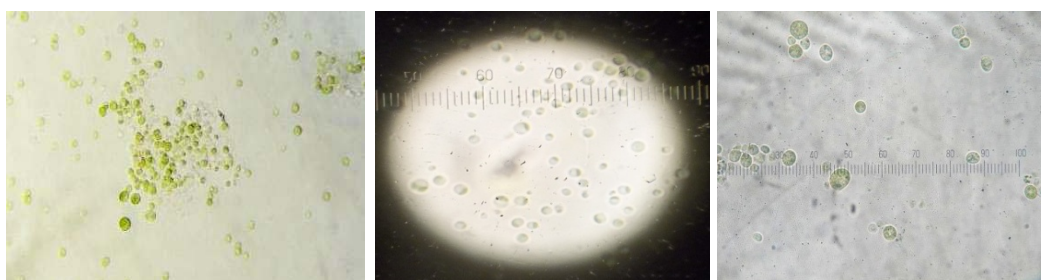


Fig. 2 Photos of microalgae under an optical microscope: (A) *Chlorella* sp., (B) Microalgae isolated from starch wastewater, (C) Microalgae isolated from sugary wastewater (400x)

2. ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญและน้ำหนักแห้งของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้

จากการนำสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกจากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลทั้ง 34 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Modified Medium นาน 7 วัน จากนั้นนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร พบว่า มีสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งจำนวน 10 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็ว ได้แก่ RMU-ST2, RMU-ST3, RMU-ST6, RMU-ST9, RMU-ST10, RMU-ST11, RMU-ST12, RMU-ST13, RMU-ST14 และ RMU-ST18 ซึ่งมีค่า OD ≥ 0.2 ส่วนสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานน้ำตาลมีจำนวน 10 ไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็ว ได้แก่ RMU-SU5, RMU-SU6, RMU-SU10, RMU-SU11, RMU-SU12, RMU-SU13, RMU-SU14, RMU-SU15, RMU-SU16, และ RMU-SU17 โดยมีค่า OD ≥ 0.2 ภายในระยะเวลาเลี้ยงนาน 7 วัน ส่วนสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลตอื่นมีลักษณะการเจริญที่ช้าโดยมีค่า OD < 0.2

จากการศึกษาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลที่สามารถเจริญได้ดีและเร็ว (OD ≥ 0.2) โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวในอาหารเหลว Modified Medium แล้วบ่มที่สภาวะเดิม นาน 7 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ห่มวลน้ำหนักแห้งของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับสาหร่าย *Chlorella* sp. (สายพันธุ์อ้างอิง) ได้ผลดัง Table 1 และ Table 2

จาก Table 1 แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายเซลล์เดียว RMU-ST12 มีน้ำหนักแห้งและอัตราการผลิตเซลล์สูงสุด (Cell productivity) เท่ากับ 0.49 กรัมต่อลิตร และ 0.07 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ มีค่าใกล้เคียงกับสาหร่าย *Chlorella* sp. สายพันธุ์อ้างอิง (0.50 กรัมต่อลิตร, 0.07 กรัมต่อลิตรต่อวัน) แต่สูงกว่าสาหร่ายเซลล์เดียวไอโซเลตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Table 1. Comparison of cell dry weight and cell productivity of ten microalgae isolated from starch wastewater.

Microalgae	Cell dry weight (g/L)	Cell productivity (g/L/d)
RMU-ST2	0.22±0.05 ^{bc}	0.03±0.01 ^{bc}
RMU-ST3	0.14±0.04 ^{bc}	0.02±0.01 ^{bc}
RMU-ST6	0.06±0.04 ^c	0.01±0.01 ^c
RMU-ST9	0.21±0.01 ^{bc}	0.03±0.00 ^{bc}
RMU-ST10	0.17±0.05 ^{bc}	0.03±0.01 ^{bc}
RMU-ST11	0.16±0.01 ^{bc}	0.02±0.00 ^{bc}
RMU-ST12	0.49±0.05 ^a	0.07±0.01 ^a
RMU-ST13	0.25±0.30 ^{bc}	0.03±0.04 ^{bc}
RMU-ST14	0.28±0.06 ^b	0.04±0.01 ^b
RMU-ST18	0.30±0.03 ^b	0.04±0.01 ^b
<i>Chlorella</i> sp.	0.50±0.08 ^a	0.07±0.01 ^a

Note: Mean within a column followed by the different letters (a,b,c) show significant statistical differences ($p<0.05$)

Table 2. Comparison of cell dry weight and cell productivity of ten microalgae isolated from sugary wastewater.

Microalgae	Cell dry weight (g/L)	Cell productivity (g/L/d)
RMU-SU5	0.13±0.05 ^{cd}	0.02±0.01 ^{cd}
RMU-SU6	0.08±0.03 ^d	0.01±0.04 ^d
RMU-SU10	0.18±0.02 ^{cd}	0.02±0.04 ^{cd}
RMU-SU11	0.17±0.01 ^{cd}	0.02±0.02 ^{cd}
RMU-SU12	0.33±0.07 ^b	0.05±0.01 ^b
RMU-SU13	0.18±0.01 ^{cd}	0.03±0.00 ^{cd}
RMU-SU14	0.36±0.09 ^b	0.05±0.01 ^b
RMU-SU15	0.54±0.04 ^a	0.08±0.01 ^a
RMU-SU16	0.22±0.01 ^{bcd}	0.03±0.01 ^{bcd}
RMU-SU17	0.24±0.12 ^{bc}	0.03±0.02 ^{bc}
<i>Chlorella</i> sp.	0.50±0.08 ^a	0.07±0.01 ^a

Note: Mean within a column followed by the different letters (a,b,c) show significant statistical differences ($p<0.05$)

จาก Table 2 พบว่าสาหร่ายเซลล์เดียว RMU-SU15 มีน้ำหนักแห้งและอัตราการผลิตเซลล์สูงสุด (Cell productivity) เท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตร และ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ สูงกว่าสาหร่ายเซลล์เดียวอีก 9 ไอโซเลต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสาหร่าย *Chlorella* sp.

(0.50 กรัมต่อลิตร, 0.07 กรัมต่อลิตรต่อวัน) ดังนั้นจึงคัดเลือกสาหร่ายเซลล์เดียว RMU-ST12 และ RMU-SU15 ไปศึกษารูปแบบการเจริญและปริมาณไขมันสะสมต่อไป

3. การศึกษารูปแบบการเจริญและปริมาณไขมันสะสมของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้

3.1 ผลการศึกษารูปแบบการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีน้ำหนักแห้งสูงสุดในอาหารเหลว Modified medium ปริมาตร 5 ลิตร นาน 14 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้มาวัดค่า OD และน้ำหนักแห้งเพื่อหาค่าอัตราการเจริญทุกวันแสดงผลดัง Fig.3 และ Fig.4

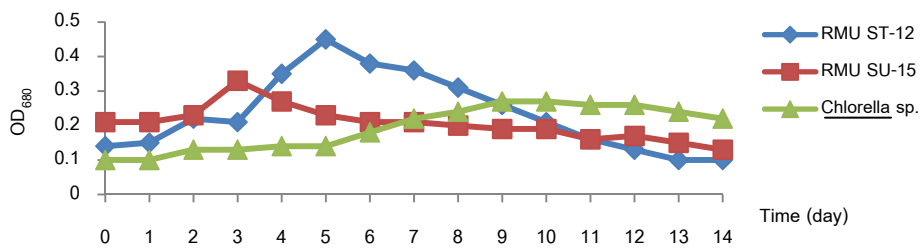


Fig.3 Growth curve of three microalgae (OD₆₈₀) in Modified medium broth for 14 days

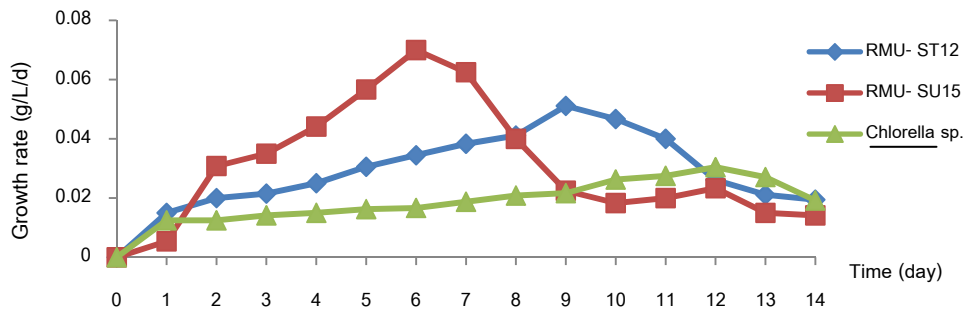


Fig.4 Growth rate of three microalgae (g/L/d) in Modified medium broth for 14 days

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียวจำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่า สาหร่ายเซลล์เดียว RMU-ST12 มีการเจริญสูงสุดในช่วงวันที่ 5-7 มีค่า OD สูงสุด 0.45 ส่วนสาหร่ายเซลล์เดียว RMU-SU15 มีการเจริญสูงสุดในช่วงวันที่ 3-4 มีค่า OD เท่ากับ 0.35 และสาหร่าย *Chlorella* sp. มีการเจริญสูงสุดในช่วงวันที่ 7-11 มีค่า OD เท่ากับ 0.25 ซึ่งเห็นได้ว่าสาหร่ายเซลล์เดียว RMU-SU15 มีการเจริญได้ดีกว่า (Fig.3) สอดคล้องกันกับค่าอัตราการเจริญ ซึ่งพบว่าสาหร่าย RMU-ST12, RMU-SU15 และ *Chlorella* sp. มีอัตราการเจริญสูงในช่วงวันที่ 8-11, 5-7 และ 8-12 วัน ตามลำดับ (Fig.4) โดยมีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 0.05, 0.07 และ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ในวันที่ 9, 6 และ 12 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายเซลล์เดียว RMU-SU15 มีการเจริญที่เร็วและมีอัตราการเจริญสูงสุดสูงกว่าสาหร่ายเซลล์เดียว RMU-ST12 และ สาหร่าย *Chlorella* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3)

Table 3. Maximum growth rate of Isolate RMU-ST12, RMU-SU15 and *Chlorella* sp.

Microalgae	Maximum growth rate (g/L/d)
RMU-ST12	0.05±0.03 ^b
RMU-SU15	0.07±0.06 ^a
<i>Chlorella</i> sp.	0.03±0.03 ^c

Note: Maximum growth rate calculated on culture for 9, 6 and 12 days, respectively.

Different letters (a,b,c) show significant statistical differences (p<0.05)

3.2 ผลการศึกษาปริมาณไขมันสะสมของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่คัดแยกได้

จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันสะสมของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้ง (RMU-ST12) และโรงงานน้ำตาล (RMU-SU15) เปรียบเทียบกับสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยนำผงแห้งของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล:คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:1 ได้ผลแสดงดัง Table 4

Table 4. Lipid contents of Isolate RMU-ST12, RMU-SU15 and *Chlorella* sp.

Microalgae	Lipid contents (%)
RMU-ST12	36.25±2.47 ^{ab}
RMU-SU15	41.50±1.41 ^a
<i>Chlorella</i> sp.	19.00±1.41 ^c

Note: Different letters (a,b,c) show significant statistical differences (p<0.05)

จากผลการสกัดไขมัน พบว่าสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาล มีปริมาณไขมันสะสมสูงกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. (สายพันธุ์อ้างอิง) ที่มีปริมาณเพียง 19.00 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สาหร่ายเซลล์เดี่ยวไอโซเลต RMU-ST12 และ RMU-SU15 มีปริมาณไขมันสะสมเท่ากับ 36.25 และ 41.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อ้างอิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่มีความสามารถในการผลิตไขมันจากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร พบว่าสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาลไอโซเลต RMU-ST12 และ RMU-SU15 มีอัตราการเจริญสูงสุดและปริมาณไขมันสะสมที่สูงกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. (สายพันธุ์อ้างอิง) และสาหร่ายเซลล์เดี่ยวไอโซเลต RMU-SU15 มีอัตราการเจริญสูงสุดสูงกว่าสาหร่ายเซลล์เดี่ยวไอโซเลต RMU-ST12 แต่มีปริมาณไขมันสะสมที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประเภทของน้ำทิ้งซึ่งเป็นแหล่งที่มาของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดี่ยว โดยสาหร่ายเซลล์เดี่ยวไอโซเลต RMU-SU15 มาจากแหล่งน้ำทิ้งที่มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่ง

คาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) และผลผลิตของเซลล์ (cell productivity) สาหร่ายเซลล์เดียวได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายเซลล์เดียวไฮโซเลต RMU-ST12 ซึ่งมาจากแหล่งน้ำทิ้งที่มีองค์ประกอบหลักเป็นแป้งและกรดอินทรีย์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ยากกว่าน้ำตาล เนื่องจากแป้งอาจต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายโมเลกุลให้เล็กลง (hydrolysis process) ก่อนถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chen (1996) ซึ่งพบว่าสาหร่ายเซลล์เดียวที่เพาะเลี้ยงในสภาวะ heterotrophic conditions ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นสารอินทรีย์ประเภทน้ำตาล สามารถส่งเสริมการเพิ่มของ cell density และ cell productivity ได้ และจากรายงานของ Vazhappilly และ Chen (1998a, b); Miao และ Wu (2004, 2006); Xu *et al.* (2006) ยังพบว่า สาหร่ายเซลล์เดียวบางสายพันธุ์ สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในสภาวะ heterotrophic conditions ที่มีสารอินทรีย์ประเภทน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะดังที่กล่าวมาข้างต้น อาจส่งเสริมให้สาหร่ายเซลล์เดียวไฮโซเลต RMU-SU15 มีการปรับตัวได้ดีเมื่อถูกเปลี่ยนไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ (อาหาร Modified medium) ในขณะที่สาหร่ายเซลล์เดียวไฮโซเลต RMU-ST12 อาจต้องอาศัยระยะเวลาในการปรับตัว (acclimation) เมื่อเปลี่ยนอาหารใหม่ ส่งผลให้อัตราการเจริญสูงสุดต่ำกว่าสาหร่ายเซลล์เดียวไฮโซเลต RMU-SU15 รวมถึงสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรมีการเจริญที่ดีและปริมาณไขมันสะสมสูงกว่าสายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งอาจเกิดจากการที่สาหร่ายสามารถปรับตัวเข้ากับอาหารและสภาพแวดล้อมใหม่ได้ดีและรวดเร็ว เนื่องจากแหล่งน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร (โรงงานแป้งและน้ำตาล) มีแร่ธาตุหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ที่อาจช่วยส่งเสริมการเจริญและการสะสมไขมันในเซลล์ของสาหร่ายทำให้สาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้มีการเจริญที่ดี นอกจากนี้ จากรายงานที่ผ่านมาโดย Gonzalez *et al.* (2013) พบว่าความแตกต่างในการเจริญ ปริมาณ คุณภาพของไขมันและการสะสมไขมันภายในเซลล์ของสาหร่าย สามารถใช้เป็นพารามิเตอร์เพื่อระบุความแตกต่างของสายพันธุ์สาหร่ายเซลล์เดียวได้ โดยใช้อธิบายร่วมกันกับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน ผลการทดลองที่พบในการศึกษานี้อาจเป็นไปได้ว่าสาหร่ายที่คัดแยกได้ อาจเป็นสาหร่ายสายพันธุ์อื่นซึ่งแตกต่างจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตามสาหร่ายที่คัดแยกได้ดังกล่าวยังต้องมีการระบุสายพันธุ์ที่แน่ชัดเพิ่มเติม ผลการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานแป้งและน้ำตาลมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็น feedstock เพื่อใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ โดยใช้หลักเกณฑ์ตามการอ้างอิงในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ Phukan *et al.* (2011) ซึ่งกล่าวว่าหลักเกณฑ์ที่จำเป็นในการคัดแยกสาหร่ายเซลล์เดียวที่สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้คือ มีปริมาณไขมันสะสมสูง มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว เก็บเกี่ยวผลผลิตง่าย และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ซึ่งสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีคุณสมบัติตามหลักเกณฑ์ดังกล่าวส่วนใหญ่อยู่ในดิวิชัน Chlorophyta และ Chaichalem *et al.* (2012) รายงานว่าสาหร่ายเซลล์เดียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดในประเทศไทย มีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ *Chlorococcum humicola*, *Didymocystis bicellularis*, *Monoraphidium contortum*, *Oocystis parva*,

Sphaerocystis sp. และ *Scenedesmus acutus*en โดยสาหร่าย *C. humicola* เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณไขมันสูง สุกเหมาะต่อการนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล

ผลการทดลองสรุปได้ว่าสาหร่ายเซลล์เดี่ยวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำทั้งโรงงานแป้งและโรงงานน้ำตาล ไอโซเลต RMU - ST12 และ RMU - SU15 มีอัตราการเจริญสูงสุด 0.05 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.07 กรัมต่อ ลิตรต่อวัน ปริมาณไขมันสะสม 36.25 และ 41.50 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ซึ่งสูงกว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. (สาย พันธุ์อ้างอิง) ที่มีอัตราการเจริญสูงสุดและปริมาณไขมันสะสมเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 19.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสาหร่ายเซลล์เดี่ยวไอโซเลต RMU - SU15 มีอัตราการเจริญสูงสุดสูงกว่า สาหร่ายเซลล์เดี่ยวไอโซเลต RMU-ST12 แต่มีปริมาณไขมันสะสมที่ไม่แตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏ มหาสารคาม ที่ให้อำนาจสถานที่และสารเคมีในการทำวิจัย โรงงานแป้งในเขตจังหวัดกาฬสินธุ์และ โรงงานน้ำตาลในเขตจังหวัดมหาสารคาม ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาและขอขอบคุณสถาบันวิจัย และพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่ได้จัดสรรทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณ พ.ศ. 2555 ในการทำ วิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Chaichalerm, S., Pokethitiyook, P., Yuan, W., Meetam, M., Sritong, K., Pugkaew, W., Kungvansaichol, K.,
- Kruatrachue, M. and Praneet, D. 2012. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*. 89(1): 296-302.
- Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*. 14(11): 421-426.
- Gonzalez, M. A., Proschold, T., Palacios, Y., Aguayo, P., Inostroza, I., and Gomez, P. I. 2013. Taxonomic identification and lipid production of two Chilean *Chlorella*-like strains isolated from a marine and an estuarine coastal environment. *AoB Plants. Special Issue (Algal Biotechnology)*: 1-5.
- Jimenez-Perez, M. V., Sanchez-Castillo, P., Romera, O., Fernandez-Moreno, D., and Perez-Martinez, C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology*. 34(5): 392-398.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., and Oh, H.-M. 2009. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*. 101(1): 75-77.

- Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*. 31(7): 1043-1049.
- Miao, X. and Wu, Q. 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J Biotechnol*. 110: 85-93.
- Miao, X.L. and Wu, Q.Y. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technology*. 97(6): 841-846.
- Phukan, M. M., Chutia, R. S., Konwar, B. K., and Kataki, R. 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. *Applied energy*. 88(10): 3307-3312.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. J., Wu, Q., and Mao, E. 2009. Microalgae mass production methods. *Transactions of the ASABE*. 52(4): 1275-1287.
- Singh, M., Chiya, M. and Bux, F. 2008. The potential of microalgae isolated from wastewater treatment plants to be used a feedstock for biodiesel production. *Water Institute of South Africa*. 1: 1-8.
- Vazhappilly, R. and Chen, F. 1998a. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *Journal American Oil Chemists Society*. 75(3): 393-397.
- Vazhappilly, R. and Chen, F. 1998b. Heterotrophic production potential of omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalgae and algae-like microorganisms. *Botanica Marina*. 41(1-6): 553-558.
- Yongmanitchai, W., and Ward, O. P. 1991. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*. 30(9): 2963-2967.
- Xu, H., Miao, X.L. and Wu, Q.Y. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal Biotechnology*. 126(4): 499-507.