สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus armatus* และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัด

Optimal Condition for Cultivation of *Scenedesmus Armatus* Cultivation and Antioxidant Activity of Its Extract

ดวงกมล เรือนงาม*

Duangkamol Ruen-ngam*

บทคัดย่อ

Scenedesmus armatus เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่มีสำคัญในฐานะผู้ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและไบโอดีเซล งานวิจัยมีเพื่อศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus armatus* อันได้แก่ ศึกษาเรื่องสูตรอาหาร ศึกษาประเภทของหัวพ่นอากาศรูปแบบต่างๆ ศึกษาความเข้มแสง โดยเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการทดลองในระบบขนาด 800 mL และจากนั้นจะทำการขยายขนาดในระบบ 5,000 mL โดยใช้ปริมาตรอาหาร 400 mL และอาหาร 4,000 mL ตามลำดับ จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดสารต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมในระบบอาหาร 400 mL ความเข้มแสง 3,400 lux อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่ศึกษาได้แก่ BG11 N-8 และ BBM พบว่า BG11 สามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ความเข้มข้นเซลล์มากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ และอาหารชนิดนี้จะนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป ผลของความเข้มแสงระหว่าง 2,700 และ 3,400 lux พบว่า 3,400 lux เหมาะสมกับการเลี้ยงสาหร่าย เปรียบเทียบหัวพ่นอากาศที่แตกต่างกัน 5 แบบ ได้แก่ หัวพ่นอากาศที่พิจารณาได้แก่ ท่อยางซิลิโคนตรง ท่อยางซิลิโคนดัดวงกลมเจาะรู ซิลิโคน 3 ทางเจาะรู หัวทรายทรงกลม และหัวทรายทรงกระบอก โดยนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงแบบเขย่า ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายพิจารณาจากปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ ปริมาณเซลล์มีชีวิตวัดที่ความยาวคลื่น 560 nm และ น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าหัวทรายทรงกลมสามารถเลี้ยงสาหร่ายได้ปริมาณมากที่สุดคือ 6×10^6 cell/mL และ 3.34 $g_{driedweight}$/l นอกจากนี้ได้ศึกษาในระบบขยายขนาด 5,000 mL พบว่าหัวพ่นอากาศแบบซิลิโคน 3 ทางเจาะรูให้ความเข้มข้นของเซลล์มากที่สุด คือปริมาณ 8.7×10^6 cell/mL และ 5 g/l ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ และบี เบตาแคโรทีน และ ไลโคปีน เป็น 28.61 11.02 8.24 และ 7.08 mg/100 mL ตามลำดับ สารสกัดที่ได้สามารถเจือจางสีของสารละลาย DPPH ได้และได้ค่าประสิทธิภาพในต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละ 85.33 ใกล้เคียงกับเมื่อเทียบกับวิตามินซีที่ความเข้มข้น 1 g/100 mL ที่มีค่าเป็น ร้อยละ 135.33

คำสำคัญ: *Scenedesmus armatus* สารต้านอนุมูลอิสระ หัวพ่นอากาศ

ABSTRACT

Scenedesmus armatus is an important green microalgae for biodiesel and antioxidant producer. This research has focused on optimal condition for *Scenedesmus armatus* cultivation that covered with feed formular, type of saprger, light intensity. Preliminary test for the optimal condition investigation has done in 800 mL photoreacter then was used in large scale as 5,000 mL with medium volume of 400 mL and 4,000 mL, respectively. The production was then harvested and extracted for antioxidant compound and tested for its antioxidant ability. Preliminary tested for optimum medium in 400 mL cultivation system with light intensity of 3,400 lux. The investigated mediums were BG11, N-8 and BBM. Among the different medium, cells grown in BG11 medium showed the highest cell concentration compared with the others and then was further used in the next step. Effect of light intensity has been further investigated at 2,700 and 3,400 lux in 800 mL system. The result showed that 3,400 lux was enough for algae cultivation. The aeration system with five different air-sparger types (silicone tube, annulus sparger, three-way silicone, circular sand, cylindrical sand sparger) was then investigated and compared with ordinary shaker. The results of each condition were demonstrated in terms of cell concentration, viable cell density (OD 560 nm) and dried cell weight. The cultivation with the spherical sand sparger revealed the highest amount of algae cells with $6x10^6$ cell/mL and 3.34 $g_{driedweight}$/l. The large scale cultivation of 5,000 mL system was also studied in this research. The three-way silicone tube with ream showed the highest amount of cell concentration of $8.7x10^6$ cell/mL and 5 g/l. The concentration of chlorophyll a, b, β-carotene and lycopene were 28.61, 11.02, 8.24 and 7.08 mg/100 mL. The crude extract could decrese the color of DPPH and got the antioxidant inhibition was 85.33% which was comparable to Vitamin C at 1 g/100 mL was 135.33%.

Keywords: *Scenedesmus armatus*, green algae, sparger

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

บทนำ

Scenedesmus sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่พบมากในประเทศไทย พบในแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหล ดำรงชีวิตล่องลอยเป็นอิสระและแบบยึดเกาะ ส่วนมากมักพบเซลล์อยู่รวมกัน 2-32 เซลล์มีลักษณะโค้งรูปไข่หรือทรงกระบอก สาหร่ายชนิดนี้มีคุณประโยชน์มากมายเนื่องจากเป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางอาหารสูงจึงสามารถใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมของมนุษย์และเป็นอาหารสัตว์ใช้ทำปุ๋ย ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย โดยประโยชน์ที่สำคัญและทำให้เกิดความสนใจคือสามารถผลิตสารให้คุณประโยชน์แก่มนุษย์ได้ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ลูทีน แอสตาแซนทิน นีโอแซนทิน เบต้าแคโรทีน วิโอลาแซนทิน และซีแซนทิน สารเหล่านี้มีคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระได้ นักวิจัยหลายท่านจึงพยายามสกัดสารเหล่านี้ออกมาจากสาหร่าย เพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ [1-3] และเป็นแหล่งไขมันที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เป็นต้น

โดยทั่วไปแล้ว ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้นมีหลากหลายปัจจัย อันได้แก่ สารอาหาร อากาศ แสง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Arumugam และคณะ (2013) [4] ที่ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบการเจริญของชีวมวลสาหร่าย *Scenedesmus* sp. จากผลการทดลองพบว่าไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ชีวมวลเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือยูเรีย แต่ในงานวิจัยของ Xin และคณะ (2010) [5] พบว่าการใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายสีเขียวในปริมาณสูงที่สุด นอกจากปัจจัยทางด้านสารอาหารแล้ว อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. LX1 มีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและไขมันคือ 20 องศาเซลเซียส ส่วนในการทดลองของ Ho และคณะ (2014) [6] ทำการศึกษาปัจจัยของแสงที่ส่งผลต่อการผลิตลูทีนของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* FSP-3 โดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ต่างๆ ได้แก่ TS5, T8, หลอด Helix ที่มีความเข้มแสงตั้งแต่ 30-600 μMphoton/m^3.s และพบว่าการใช้หลอดไฟ LED สีขาวทำให้สาหร่ายผลิตลูทีนได้ดีกว่าการใช้หลอดไฟ LED สีอื่น ในงานวิจัยของ Yin-Hu และคณะ (2016) [7] ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus* sp. LX1 ใช้ความเข้มแสงในช่วง 1,000 – 5,000 lux มีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ในช่วง 10^6-6x10^6 cells/mL และพบว่าที่ความเข้มแสง 4,000 lux มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ในหน่วย cell/mL.d มากกว่าการเลี้ยงที่ความเข้มแสง 2,500 lux ถึง 2.67 เท่า และการศึกษาของ Abd El Baky และคณะ (2012) [8] ได้ทำการผสมคาร์บอนไดออกไซด์เข้ากับอากาศในปริมาณต่างๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากสาหร่าย *Scenedesmus obliquus*โดยพบว่าสาหร่ายมีการสะสมไขมันร้อยละ 38 เมื่อให้คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 12 และสะสมไขมันร้อยละ 28 และเสริมด้วย Fe^{3+} ปริมาณ 10 mg/l ลงในอาหาร

จากงานวิจัยข้างต้นพบว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นงานวิจัยมีเพื่อศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Scenedesmus armatus* อันได้แก่ ศึกษาเรื่องสูตรอาหาร ศึกษาประเภทของหัวพ่นอากาศรูปแบบต่างๆ ศึกษาความเข้มแสง โดยเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการทดลองในระบบขนาด 800 mL และ 5,000 mL โดยใช้ปริมาตรอาหาร 400 mL และอาหาร 4,000 mL

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. สารเคมี

$NaNO_3$ K_2HPO_4 $MgSO_4.7H_2O$ $CaCl_2.2H_2O$ Citric acid Ferric ammonium citrate EDTA disodium

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

magnesium salt Na_2CO_3 Agar Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) Monopotassium phosphate (KH_2PO_4) Potassium nitrate (KNO_3) Ferric Ethylene diaminetetraacetic Acid (FeEDTA) Magnesium sulfate ($MgSO_4.18H_2O$) Calcium chloride ($CaCl_2$) Trace element $NaNO_3$ $CaCl_2.2H_2O$ $MgSO_4.7H_2O$ K_2HPO_4 KH_2PO_4 NaCl Trace element (TCI, Thailand) น้ำกลั่น

2. การถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่าย *Scenedesmus armatus*

นำฟลาสก์บรรจุเชื้อ *S. armatus* ที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณสวนสาธารณะบึงพระราม จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นำมาทำการคัดเลือกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนจานอาหารแข็ง BG11 ใช้เทคนิค cross streak ภายใต้ตู้ถ่ายเชื้อ (Super Clean, 120BS, Thailand) บ่มที่อุณหภูมิห้อง และให้ความเข้มแสง 1,700-1,800 lux วัดโดยเครื่องวัดความเข้มแสงหรือ Lux meter (Takemura, DM-28, Japan) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จากนั้นเลือกจานอาหารที่มีเชื้อเจริญขึ้นและไม่เกิดการปนเปื้อนทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวเพื่อถ่ายลงในหลอดอาหารเอียงซึ่งเตรียมเหมือนข้างต้น โดยใช้เทคนิค simple streak (คัดเลือก 1 colony/1 slant) เพื่อเก็บไว้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

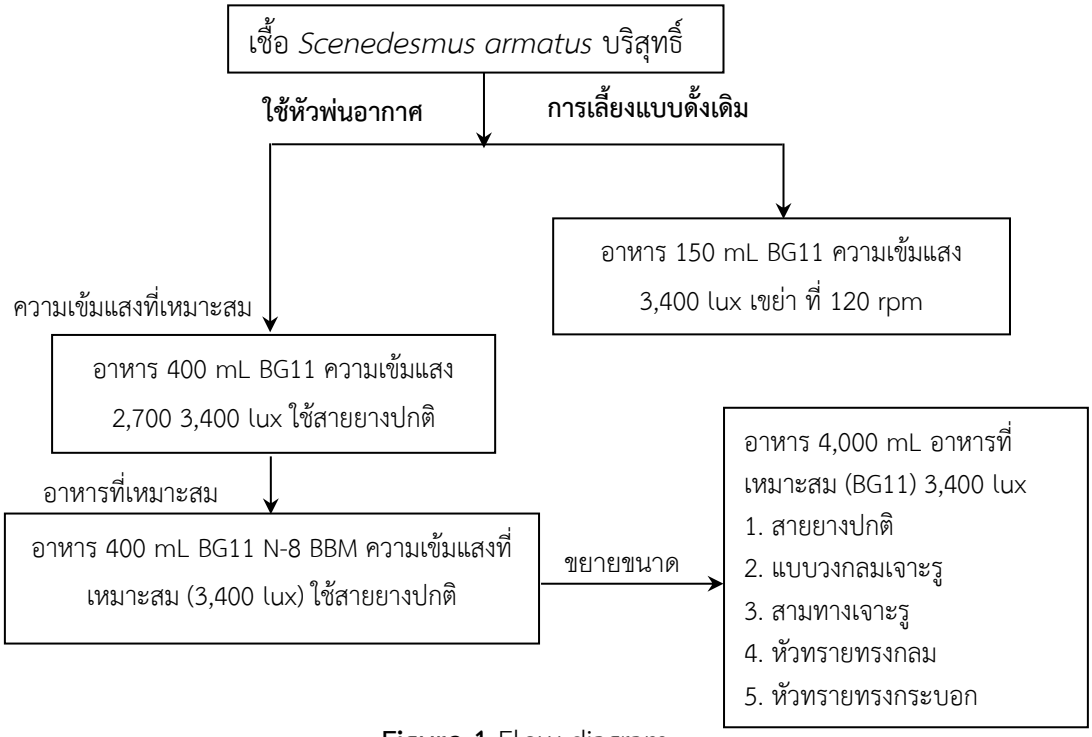

Figure 1 Flow diagram

3. การเลี้ยงแบบดั้งเดิม

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* ในอาหารสูตรที่คัดเลือกได้จากหัวข้อก่อนหน้าโดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 mL โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 150 mL ใช้เครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,400 lux และทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน ดังแสดงใน Figure 1

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

4. การเลี้ยงด้วยหัวพ่นอากาศ

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ ในระบบขนาด 800 และ 5,000 mL คือ มีอาหาร 400 และ 4,000 mL ตามลำดับ ป้อนอากาศผ่านหัวพ่นอากาศแบบต่างๆ ที่ประดิษฐ์ขึ้น ได้แก่ A = สายยางปกติ B = แบบวงกลมเจาะรู (จำนวน 4 รู แต่ละรูห่างกัน 1 cm สายยางยาว 11 cm) C = แบบสามทางเจาะรู (สายยางยาวด้านละ 2.5 cm สายยางแนวนอนเจาะรูด้านละ 1 รู แนวตั้งเจาะ 2 รู ด้านตรงข้ามกัน ปิดปลายสายยางทั้ง 3 ด้านด้วยการลนไฟ) และ D = แบบหัวทรายทรงกลม (ขนาดเส้นรอบวง 10 cm) และ E = แบบหัวทรายทรงกระบอก (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm ยาว 2.5 cm) แสดงใน Figure 2 โดยใช้เครื่องปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 47W (Atman, HP-8000) และเครื่องปั๊มอัดอากาศ กำลังไฟ 58W (Yamano, AP-40, China) ในระบบอาหาร 400 mL จะให้ปริมาณอากาศ 80 mL/min และระบบขยายขนาดให้ปริมาณอากาศเป็น 1,500 mL/min การเลี้ยงในระบบขยายขนาดต้องมีการถ่ายเชื้อจากระบบการเลี้ยงแบบเขย่าในห้องปฏิบัติการ (ขนาด 250 mL) ไปสู่ระบบขนาดใหญ่โดยต้องมีความเข้มข้นของเซลล์ในระบบใหม่อยู่ในช่วง 10^5-10^6 cell/mL ดังแสดงแผนผังการทดลองใน Figure 1

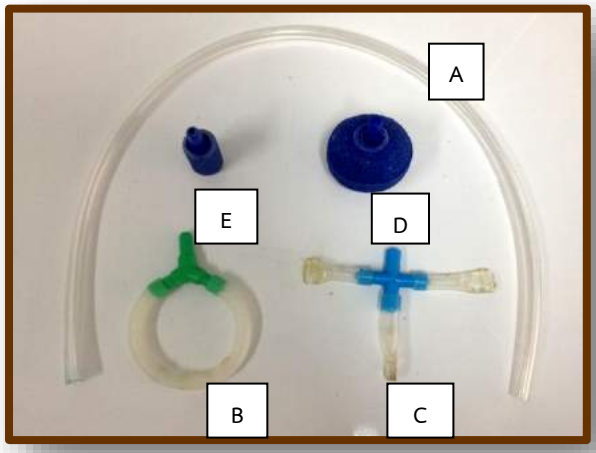

Figure 2 Different type of sparger: A = silicone tube, B = annulus sparger, C = three-way silicone sparger, D = circular sand sparger, E = cylindrical sand sparger

5. การเลี้ยงด้วยความเข้มแสงต่างๆ

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอากาศ โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ ในอาหารสูตร BG11 ในระบบอาหาร 400 mL ภายใต้แสงสว่างอย่างต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 lux ทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

6. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยระบบให้อากาศด้วยปั๊มอัดอากาศ โดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารทั้ง 3 สูตร ได้แก่ BG11 N-8 medium และ BBM ปรับปริมาตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave, TOMY, ES-315, Japan) โดยทดสอบในระบบอาหาร 400 mL ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงสว่างที่ความเข้มแสง 3,400 lux ด้วยหัวพ่นอากาศแบบสายยางปกติ ทำการตรวจผลเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

7. การวัดการเจริญของเซลล์สาหร่าย

7.1 วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 mL ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm (4,100 g) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (HERMLE,

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

Z326K, Germany) เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเซลล์แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (WTB binder, ED53, Germany) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการชั่งน้ำหนักทุกครั้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND, GF-800, Japan) รายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (g/L) จากผลที่ได้นำไปคำนวณประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตซึ่งแสดงด้วยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ โดยใช้สูตร [9]

$$\mu_{max} = \frac{lnx_2 - lnx_2}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ x คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาการเลี้ยงที่ 1 และ 2 (g/L) และค่าอัตราการเพิ่มของเซลล์ (Biomass productivity, P) ดังสูตร [9] และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$P\ (mg\ dried\ weight/\mathrm{l.\ day}) = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}_x - \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}_1}{T_x - T_1}$$

เมื่อ T_x คือ เวลาสุดท้าย และ T_1 คือเวลาเริ่มต้น

7.2 วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้สไลด์ Haemacytometer

การนับเซลล์ทำได้โดยใช้สไลด์นับเซลล์ชนิดฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, CH30, Japan) เมื่อดูดตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาหร่ายและนำไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ จะพบตาราง 25 ช่องใหญ่ ภายในมีตารางขนาดเล็ก 16 ช่อง ในการนับเซลล์ถ้าจำนวนเซลล์หนาแน่นมากอาจสุ่มนับ 5 ช่อง แต่ผลที่ได้ต้องคูณ 5 ทำการนับ 2 ซ้ำ คำนวณตามสูตรและหาค่าเฉลี่ย

$$\text{cell/mL} = \frac{\mathrm{C\ x\ D\ x\ 1000}}{\mathrm{A\ x\ d\ x\ F}}$$

เมื่อ C = จำนวนสาหร่ายที่นับได้ A = พื้นที่ของ grids เท่ากับ 0.04 mL^2 d = ความลึกของพื้นที่ที่นับ เท่ากับ 0.1 mL F = จำนวนช่องหรือตารางที่นับ D = ค่าการเจือจาง

7.3 วิธีการวัดความหนาแน่นโดยอาศัยแสง (Optical Density; OD)

นำตัวอย่างสาหร่ายที่ต้องการหาความหนาแน่นใส่ในคิวเวต แล้วนำไปวัดค่า OD ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Thermo SCIENTIFIC, GENESYS 10S UV-VIS, USA) ที่ความยาวคลื่น 560 nm บันทึกค่า OD ที่วัดได้

7.4 การเก็บสาหร่ายแห้ง

นำตะกอนสาหร่ายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer, Heto, Lyolab 3000, Denmark) เพื่อกำจัดน้ำออกในระดับเซลล์แล้วเก็บสาหร่ายแห้งไว้ที่ตู้เย็นแช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (SANYO, Japan) เพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป

8. การสกัดสารและการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ อันได้แก่ เบตาแคโรทีน และลิโคปีน หาได้จากการใช้การดูดกลืนแสงของสารสกัด การสกัดสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการเขย่า และการใช้ชุด soxhlet นำสาหร่ายแห้งที่ได้จากหัวข้อก่อนหน้า สกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธีการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราส่วนสาหร่ายต่อเอทานอลเป็น 1:134 (g/mL) และด้วยวิธีการสกัดด้วยชุด soxhlet โดยใช้ ethanol ปริมาตร 150 mL จากนั้นนำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศให้เหลือปริมาตรสารละลายเอทานอล 20 mL จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ที่พิจารณาและคำนวณปริมาณแต่ละองค์ประกอบดังสมการ [10] และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (mg/100 mL) = $0.999A_{663} - 0.0989A_{645}$

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (mg/100 mL) = $-0.328A_{663} + 1.77A_{645}$

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

ปริมาณเบตาแคโรทีน (mg/100 mL) = $0.216A_{663} - 1.22A_{645} - 0.034A_{505} + 0.452A_{453}$

ปริมาณลิโคปีน (mg/100 mL) = $(-0.0458A_{663}) + 0.204A_{645} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$

9. การตรวจสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระจะใช้วิธี DPPH assay ซึ่งเตรียมให้มีความเข้มข้น 0.35 mM ในเอทานอล ร้อยละ 95 ในที่มืด นำสารละลาย DPPH ผสมกับสารละลายที่สกัดได้ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที วัดการดูดกลืนสีที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (MF A062780, Labsystems, model) จากนั้นคำนวณฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant inhibition) ดังสมการ

ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (%)

$$= \left(\frac{1 - A_e}{A_o}\right) \times 100$$

เมื่อ A_o คือค่าการดูดสีของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง A_e คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อสารละลาย DPPH ถูกเจือจางสีด้วยตัวอย่างสารสกัด

ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. ผลของสูตรสารอาหาร

จากข้อมูลน้ำหนักแห้งและการนับเซลล์ พบว่าอาหารทั้ง 3 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณสาหร่ายได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนการวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm พบว่าการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ในครั้งที่ 1-8 (ช่วงวันที่ 1-15) ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารทั้ง 3 สูตรนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่การวัดค่า OD ในครั้ง 12 (วันที่ 23) เป็นต้นไปเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน BBM มีค่า OD ต่ำกว่าอาหาร BG11 และ N-8 อย่างเห็นได้ชัด ส่วนค่า OD ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 และ N-8 นั้นยังไม่มีความแตกต่างกันตั้งแต่การวัดผลครั้งที่ 1-11 (ช่วงวันที่ 1-21) โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 มีกราฟการเจริญสูงกว่าอาหาร N-8 ในการวัดผลครั้งที่ 12 (วันที่ 23) เป็นต้นไป จากการพิจารณาผลการทดลองโดยพิจารณาจากตัวแปร 3 ค่า พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างของผลการทดลองอย่างเห็นได้ชัด แต่เนื่องจากเซลล์สาหร่าย *S. armatus* ที่เจริญในอาหาร BG11 นั้นมีลักษณะตัวใหญ่กว่าที่เลี้ยงในอาหาร N-8 และ BBM ดังนั้นจึงใช้ BG11 ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. ผลของความเข้มแสง

จากข้อมูลน้ำหนักแห้งและการนับเซลล์ของทั้ง 2 ความเข้มแสง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสาหร่ายได้ไม่แตกต่างากัน ส่วนการวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะหรือความชันตลอดช่วงการเจริญเติบโตมากกว่าเมื่อใช้ความเข้มแสง 3,400 lux ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yin-Hu และคณะ [7, 11] พบว่าที่ความเข้มแสง 4,000 lux มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในหน่วย cell/mL.d มากกว่าการเลี้ยงที่ความเข้มแสง 2,500 lux ถึง 2.67 เท่า ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงใน Table 1

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

Table 1 Specific growth Rate (μ) and Biomass productivity of the 800 mL cultivation system with different sparger types and light intensity

Conditions	Specific Growth Rate, μ* ($g_{dried\ weight}$/l.day)	Biomass Productivity, P* ($mg_{dried\ weight}$/l.day)
A	0.0599±0.008	0.1629±0.022
B	0.0695±0.011	0.1486±0.020
C	0.0653±0.009	0.1484±0.021
D	0.0731±0.012	0.2344±0.042
E	0.0731±0.011	0.184±0.018
G	0.0313±0.007	0.1208±0.017
L	0.0317±0.007	0.1566±0.018

Remark: *average±SD, A = silicone tube, B = annulus sparger, C = three-way silicone sparger, D = circular sand sparger, E = cylindrical sand sparger with 3,400 lux, G = shake with 120 rpm and L = silicone with 2,700 lux

3. การเลี้ยงสาหร่ายในระบบขนาด 800 มิลลิลิตร

Figure 3 เป็นการแสดงการวัดผลด้วยการนับจำนวนเซลล์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่วงแรก คือ ครั้งที่ 1-2 (วันที่ 1-4) ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนการนับเซลล์ในครั้งที่ 3-6 (วันที่ 7-16) นั้นหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกัน แต่การนับเซลล์ในครั้งที่ 7 (วันที่ 19) เป็นต้นไปหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงกว่าหัวพ่นอากาศแบบอื่นอย่างเห็นได้ชัด โดยรวมแล้วพบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีการเจริญสูงสุดเมื่อเทียบกับหัวพ่นอากาศแบบอื่นๆ ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการวัดปริมาณด้วยค่า OD และการวัดด้วยน้ำหนักแห้ง หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมและหัวทรายทรงกระบอกให้ผลการเจริญสูงใกล้เคียงกันและเจริญได้ดีกว่าหัวพ่นแบบอื่นๆ ซึ่งยืนยันได้จากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะได้ผลดัง Table 1 ส่วนระบบการเลี้ยงแบบเขย่า สาหร่ายเจริญเติบโตได้น้อยที่สุด เนื่องมาจากว่าการเพาะเลี้ยงแบบเขย่านั้นไม่มีการให้อากาศลงไปในฟลาสก์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยตรง สาหร่ายเจริญเติบโตได้โดยใช้เพียงแค่อากาศจากภายนอกที่ซึมผ่านสำลีลงไปในฟลาสก์เท่านั้นและการเขย่าถึงแม้จะช่วยให้สาหร่ายสามารถใช้อากาศได้ดียิ่งขึ้น แต่การเขย่าทำให้เกิดการวนของน้ำในลักษณะวอร์เท็กซ์ (vortex) ทำให้สาหร่ายได้รับอากาศน้อยกว่าการพ่นอากาศลงไปในขวดเพาะเลี้ยงโดยตรงซึ่งโดยมากใช้วิธีนี้เป็นวิธีอ้างอิงในการออกแบบระบบการเลี้ยงเซลล์แบบต้องการอากาศ [12] ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าหัวพ่นอากาศที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* ในระบบขนาด 800 mL คือ หัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลม ซึ่งสาเหตุที่หัวพ่นอากาศแบบนี้ทำให้มีการเจริญสูงสุดนั้นน่าจะเป็นเพราะหัวทรายนั้นมีรูพรุนเล็กๆ จำนวนมาก ทำให้ฟองอากาศที่ออกมามีขนาดเล็กและมีปริมาณมาก ซึ่งจะให้ทำอากาศกระจายอย่างทั่วเต็มขวดทดลอง และสาหร่ายได้รับอากาศอย่างทั่วถึงกว่าหัวพ่นของอากาศลักษณะอื่นที่ฟองอากาศมีขนาดใหญ่และกระจายอากาศได้ไม่ทั่วถึง อย่างไรก็ตามหัวทรายมีข้อเสียคือเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายเพราะการฆ่าเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้ทำได้ยาก

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

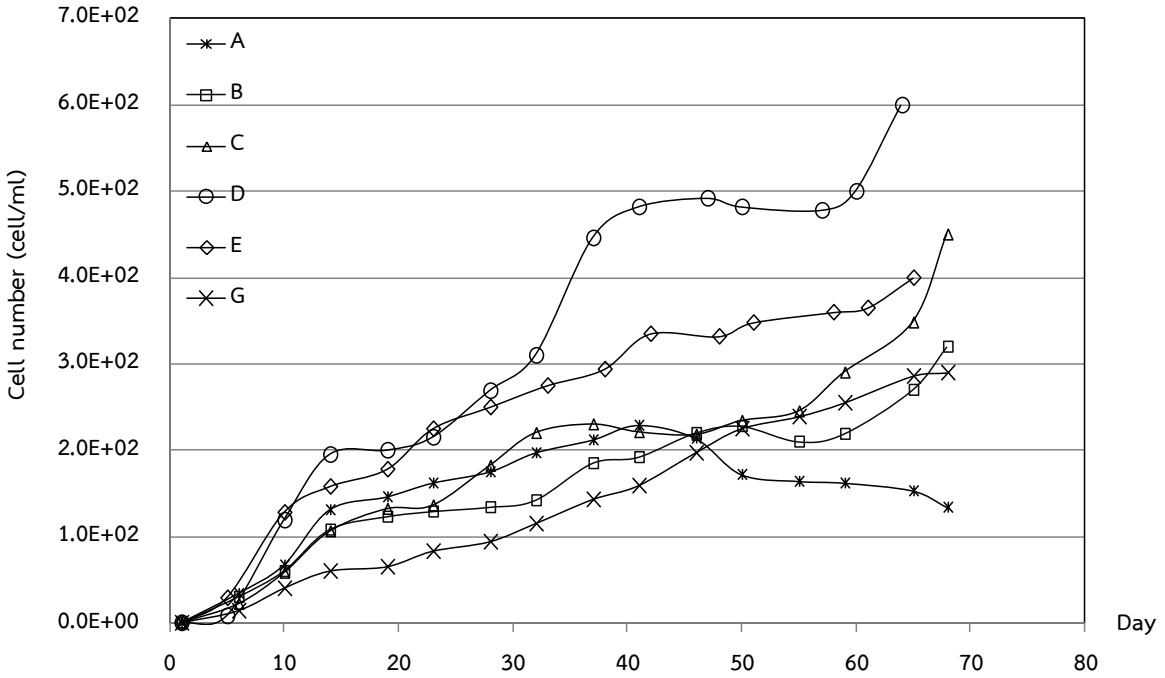

Figure 3 Cell number of *S. armartus* in differnt conditions: A = silicone tube, B = annulus sparger, C = three-way silicone sparger, D = circular sand sparger,E = cylindrical sand sparger with 3,400 lux, G = 120 rpm

4. การเลี้ยงสาหร่ายในระบบขนาด 5,000 มิลลิลิตร

Figure 4 แสดงปริมาณน้ำหนักแห้งตลอดการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของการเพาะเลี้ยงด้วยปั๊มอัดอากาศโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยปั๊มอัดโดยใช้หัวพ่นอากาศแบบอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการวัดผลการเจริญด้วยการนับจำนวนเซลล์ และวัดค่า OD สาเหตุที่หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีนั้น อาจจะเป็นเพราะว่าหัวพ่นอากาศมีรูถึง 4 รู โดยแต่ละรูอยู่ในระดับแตกต่างกันและอยู่ตรงข้ามกันจึงทำให้อากาศถูกปล่อยออกมาทุกทิศทาง สาหร่ายจึงได้รับอากาศอย่างทั่วถึง นอกจากนี้ความกว้างของสายยางซิลิโคนจากฝั่งซ้ายและขวาครอบคลุมพื้นที่ภายในขวดเพาะเลี้ยงได้ทั่วถึง แต่ในการทดลองขนาดเล็กที่ใช้ปริมาตรอาหาร 400 mL ที่พบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีประสิทธิภาพดีที่สุดนั้นอาจเนื่องมาจากว่าหัวทรายทรงกลมพอนำมาใช้เพาะเลี้ยงในขวดโหลใหญ่แล้วมีขนาดเล็กเกินไป ถึงแม้ว่าฟองอากาศจะมีขนาดเล็กและมีปริมาณมากแต่ไม่สามารถกระจายไปได้ทั่วถึงเท่าหัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรู อย่างไรก็ตามเมื่อข้อมูลเหล่านี้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ใน Table 2 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของหัวทรายทรงกระบอกมากกว่าแบบสามทางเจาะรูและหัวทรายทรงกลมตามลำดับแต่ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นการใช้หัวทรายทรงกลมและทรงกระบอกในการเลี้ยงในระบบขนาด 5,000 mL เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์สาหร่ายแต่จะทำให้ปลอดเชื้อได้ยากและจะควบคุมทิศทางการให้อากาศได้ยากอีกทั้งประยุกต์ใช้ในระบบขยายขนาดได้ยาก ดังนั้นการใช้หัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูจึงเป็นทางเลอกที่ดีและเหมาะสมในการพัฒนาระบบการเลี้ยงแบบขยายขนาดต่อไป

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

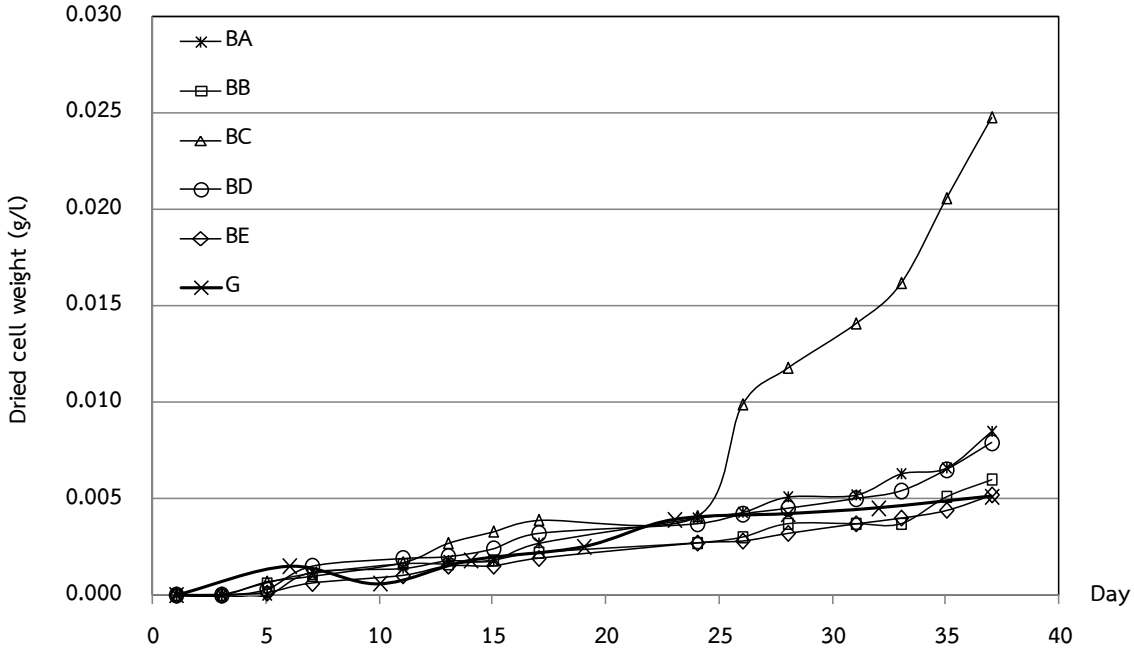

Figure 4 Dried cell weight of *S. armartus* in differnt conditions: BA = silicone tube, BB = annulus sparger, BC = three-way silicone sparger, BD = circular sand sparger, BE = cylindrical sand sparger with 3,400 lux in 5,000 mL, G = shake with 120 rpm with 3,400 lux in 800 mL system

Table 2 Specific growth Rate (μ) and Biomass productivity in 800 and 5,000 mL systems

Conditions	Specific Growth Rate, μ* ($g_{dried\ weight}$/l.day)	Biomass Productivity, P* ($mg_{dried\ weight}$/l.day)
BA	0.0653±0.010	0.2361±0.040
BB	0.0720±0.013	0.1667±0.017
BC	0.1115±0.028	0.6889±0.089
BD	0.1022±0.015	0.2194±0.035
BE	0.1235±0.018	0.1444±0.031
G	0.0313±0.007	0.1208±0.023

Remark:*average±SD, BA = silicone tube, BB = annulus sparger, BC = three-way silicone sparger, BD = circular sand sparger, BE = cylindrical sand sparger with 3,400 lux in 5,000 mL, G = shake with 120 rpm with 3,400 lux in 800 mL system

5. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสามารถวัดได้ด้วยการวัดค่า OD ได้ผลปริมาณดัง Table 3 พบว่าได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการมากกว่าเมื่อสกัดด้วยวิธี soxhlet แต่เมื่อมาทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระใน Table 4 พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิห้องสามารถสกัดสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า และ

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้โดยทั่วไป (vitamin C) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสาหร่าย *S. armartus* สามารถเป็นแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ [3, 13] จากงานวิจัยในอดีตยังไม่มีงานวิจัยใดที่ทดสอบฤทธิ์ของสารต้านทานอนุมูลอิสระที่สกัดได้ แต่ได้มีการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สะสมอยู่ในระยะต่างๆ ของการเลี้ยงเซลล์สาหร่าย พบว่าได้ปริมาณแคโรทีนอยด์มากสุดปริมาณ 2.0%DW หรือสามารถเก็บเกี่ยวได้ 20 mg/L.d [14]

Table 3 Amount of chlorophyll a, b, β-carotene, lycopene of cultivated *S. armartus* extracted by 2 methods

Antioxidant compounds	Content (mg/100 mL)	
	Shaking	Soxhlet
Chlorophyll a	1.46±0.08	28.61±1.9
Chlorophyll b	0.58±0.08	11.02±1.3
β-Carotene	0.80±0.07	8.24±0.8
lycopene	0.02±0.01	7.08±1.2

Table 4 Antioxidant inhibition of crude extract from *S. armartus* extracted by shaking and soxlet and standard Vitamin C

Antioxidant compounds	Antioxidant inhibition (%)
Crude extract from *S. armartus* extracted by shaking	85.33±2.5
Crude extract from *S. armartus* extracted by soxhlet	25.72±1.9
Vitamin C (1 g/100 mL))	135.33±1.0

สรุปผล

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. armatus* เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 สูตร (BG11 N8 และ BBM) พบว่าไม่แตกต่างกันแต่ BG11 ให้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าสูตรอาหารอื่นๆ ความเข้มแสงที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดำเนินการเปรียบเทียบที่ความเข้มแสง 2,700 และ 3,400 lux พบว่าการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ความเข้มแสงนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากเมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ 3,400 lux ชนิดของหัวพ่นอากาศรูปแบบต่างๆ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยดำเนินการทดสอบที่มีปริมาตรอาหาร 400 mL ปริมาณอากาศ 80 mL/min ที่ความเข้มแสง 3,400 lux พบว่าหัวพ่นอากาศแบบหัวทรายทรงกลมมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ในขณะที่ระบบเพาะเลี้ยงปริมาตรอาหาร 4,000 mL ปริมาณอากาศ 1,500 mL/min พบว่าหัวพ่นอากาศแบบสามทางเจาะรูมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ทั้งสองระบบมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าระบบการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (เขย่า) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดหัวพ่นอากาศมีความสัมพันธ์กับขนาดระบบที่ใช้เลี้ยง จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์สาหร่าย *S. armatus* ในสภาวะที่ดีที่สุดปริมาตรอาหาร 7,000 mL ได้เซลล์สาหร่าย *S. armatus* ที่ผ่านการทำ freeze drying มีน้ำหนักเท่ากับ

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

9.5106 กรัม นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายที่ได้ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหรือคือวิตามินซี ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. armartus* เป็นทางเลือกหนึ่งของแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติและสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการเพิ่มทั้งปริมาณและคุณภาพและพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ทีมวิจัยดำเนินการภายใต้ ทุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2557 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

[1] Catarina, G.A., Maria, G.S., Ana, M.A., Ana, N., V.M., Manuela, P.E., Catarina, D.M.M. and Xavier, M.F. (2013). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *S. obliquus* for use in food processing. Journal of Food Engineering. 116: 478-482.

[2] Hong-Wei, Y., Wei-Cheng, C. and Cheng-Hsiung, S. (2012). Supercritical fluid extraction of lutein from *Scenedesmus* cultured in an autotrophical photobioreactor. Bioresource Technology. 43: 53-57.

[3] Macías-Sáncheza, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M. and Montero, O. (2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. Talanta. 77: 947-952.

[4] Arumugama, M., Agarwal, A., Chandra, M.A. and Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *S. bijugatus*. Bioresource Technology. 131: 246-249.

[5] Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. and Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. Bioresource Technology. 101: 5494-5500.

[6] Ho, S.H., Chan, M.C., Liu, C.C., Chen, C.Y., Lee, W.L., Lee, D.J. and Chang, J.S. (2014). Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. Bioresource Technology. 152: 275-282.

[7] Yin-Hu, W., Yin, Y., Hong-Ying, H. and Lin-Lan, Z. (2016). Effects of cultivation conditions on the production of Soluble Algal Products (SAPs) of *Scenedesmus* sp. LX1. Algal Research. 16: 376–382.

[8] Abd El Baky, H.H., El-Baroty, G.S., Bouaid, A., Martinez, M. and Aracil, J. (2012). Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO_2 and Fe^{3+} levels for biodiesel production. Bioresource Technology. 119: 429-432.

[9] Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., Wang, Z. and Fan, L. (2014). Characterization of *Chlorococcum pamirumas* a potential biodiesel feedstock. Bioresiurce Technology. 162: 115-122.

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

[10] Nagata, M. and Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. [Online]. Avaiable: http://cse.naro.affrc.go.jp/mnagata/pigment2.pdf.

[11] Yin-Hua, W., Yin, Y., Xin, L., Hong-Ying, H. and Zhen-Feng, S. (2012). Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. Bioresource Technology. 112: 192-198.

[12] Kulkarni, A.V. and Joshi, J.B. (2011). Design and selection of sparger for bubble column reactor. Part I: Performance of different spargers. Chemical Engineering Research and Design. 89: 1972–1985.

[13] Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., Pavasant, P., Machmudah, S. and Goto, M. (2012). Selective extraction of lutein from alcohol-treated chlorella vulgaris by supercritical carbon dioxide. Chemical Engineering & Technology. 35: 255-260.

[14] Přiby, P., Pilný, J., Cepák, V. and Kaštánek. P. (2016). The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. Algal Research. 16: 69-75.

* duangkamol.ru@kmitl.ac.th, modeliebe@gmail.com
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok