บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย

3.1.1 อุปกรณ์การเก็บตัวอย่างและคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

1. ตาข่ายแพลงก์ตอน(Plankton net) ขนาดตาข่าย 45 ไมโครเมตร
2. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
3. ปิเปตขนาดเล็ก (Micropipette)
4. ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำภาคสนาม (เครื่องวัดอุณหภูมิ พีเอชมิเตอร์ และแถบวัดค่าความสามารถในการส่องผ่านของแสง)

3.1.2 อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

1. ถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และวาล์วควบคุม (CO_2 Cylinder and Regulator valve)
2. หลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ (Cool white fluorescence)
3. ชุดเครื่องเขย่าแบบให้แสง (Shaker) และอุปกรณ์เสริม (Accessories)
4. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดให้แสง (Tubular photo bioreactor)
5. เครื่องวัดความเข้มของแสง (Lux meter)
6. ปั๊มอากาศ (Air pump)

3.1.3 อุปกรณ์การสกัดและวิเคราะห์น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก

1. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
2. เครื่องปั่นความเร็วสูง (Centrifuge)
3. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
4. ตู้อบความร้อนแบบแห้ง (Hot air oven)
5. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography; GC)

3.1.4 อุปกรณ์การสกัดและวิเคราะห์น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก

1. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl nitrogen)
2. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไฟเบอร์ (Fiber analyzer)
3. เตาเผา (Furnace)

3.1.5 อุปกรณ์ประกอบการทดลองอื่น ๆ

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัดความดัน (Auto clave)
2. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balances)
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
4. เครื่องวัดจำนวนเซลล์ (Haemacytometer)
5. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
6. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hotplate stirrer)
7. หลอดทดลองและเครื่องแก้วต่าง ๆ (Glass wares)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

3.2.1.1 อาหารสูตร Modified Chu 13

อาหารสูตร Modified Chu 13 มีขั้นตอนและวิธีการเตรียมดังแสดงในภาคผนวก ก ซึ่งประกอบด้วยสารต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

KNO_3	$MnCl_2$	Citric acid
K_2HPO_4	$ZnSO_4.7H_2O$	H_3BO_3
$MgSO_4.7H_2O$	$CuSO_4.5H_2O$	KOH
$CaCl_2.2H_2O$	$CoCl_2.6H_2O$	HCl
Fe citrate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	

3.2.1.2 สารเคมีสำหรับศึกษาอิทธิพลต่าง ๆ

สารเคมีสำหรับศึกษาอิทธิพลต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ประกอบด้วย

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide; CO_2)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

สารต้านการเกิดฟอง (Anti foam; Dow Corning)

3.2.2 สารเคมีสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.3 สารเคมีสำหรับการสกัดน้ำมันและผลิตไบโอดีเซล

เมทานอล (CH_2OH)

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

เฮกเซน (Hexane)

สีซูดาน แบลค บี (Sudan Black B)

ซาฟรานิน (Safranin)

เอทานอล (Ethanol)

3.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

K_2SO_4	กรดบอริก (Boric acid)
TiO_2	Bromocresol green
Phenol	กลูโคส (Glucose)
Methyl red	ออกทานอล (n-octanol)

3.2.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของเมทิลเอสเทอร์

โทลูอีน (Toluene)

ไอโอดีน (Iodine)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

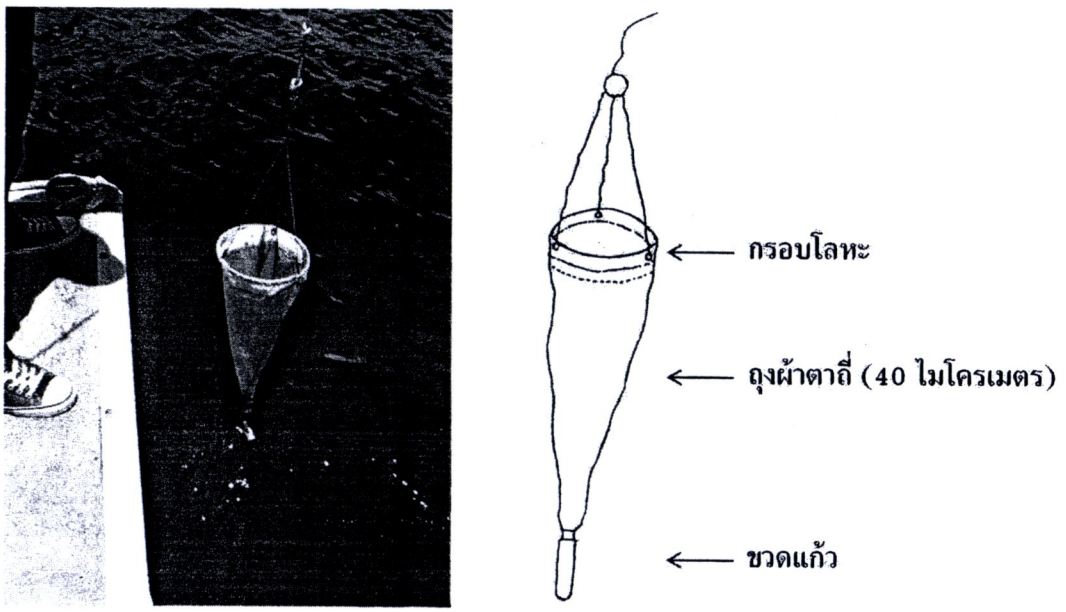
สารละลายเฮปเทน (n-haptane)

3.3 การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

ในการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ ประกอบไปด้วย 5 ขั้นตอนหลักได้แก่ การเก็บรวบรวมตัวอย่างน้ำ การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กด้วยกล้องจุลทรรศน์และการทำสาหร่ายให้บริสุทธิ์ การจัดจำแนกสายพันธุ์ และการเก็บรักษาเซลล์สาหร่าย ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.3.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และแหล่งที่อยู่อาศัยของสาหร่าย สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เจริญและลอยอยู่ในน้ำจืดโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าตาข่ายแพลงก์ตอน(Plankton net) ขนาดตาข่าย 45 ไมโครเมตร ที่ก้นกรวยตาข่ายจะมีขวดแก้วขนาดเล็กติดอยู่เพื่อเป็นที่เก็บตัวอย่างน้ำที่กรองได้ ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ตาข่ายแพลงก์ตอน และการใช้งาน (Marine Biology, Texas A&M University, 2009)

วิธีการใช้งานตาข่ายแพลงก์ตอน ให้ใช้มือที่ไม่ถนัดจับที่ปลายเชือก ซึ่งเชือกควรจะยาวเท่ากับระยะห่างที่ต้องการจะเก็บตัวอย่างน้ำส่วนมือที่ถนัดจับตาข่ายแพลงก์ตอนแล้วโยนไปในบริเวณที่ต้องการแล้วค่อย ๆดึงเชือกเข้าหาตัวผู้ใช้งาน เก็บตัวอย่างลงในภาชนะที่เตรียมไว้ ถ้าพื้นที่ ๆทำการเก็บตัวอย่างมีพื้นที่กว้างมากอาจจะใช้วิธีนั่งเรือแล้วลากถุงตาข่ายแพลงก์ตอน สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำไปเรื่อย ๆ จนทั่วบริเวณพื้นที่นั้น ๆ

สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ การเก็บตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจะเลือกบริเวณที่เป็นพื้นที่ชุ่มน้ำ และแหล่งกักเก็บน้ำตามธรรมชาติที่มีน้ำขังตลอดทั้งปีในพื้นที่ของจังหวัดบุรีรัมย์ ขอนแก่น นครพนม ชัยภูมิ และจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งลักษณะของพื้นที่ชุ่มน้ำจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสถานที่

3.3.2 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

นำตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร Modified Chu 13 (Largeau et al., 1980) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave รุ่น Labtech LAC-5060S, Daihan Labtech. Korea) เรียบร้อยแล้วและให้อากาศ

จากปั๊มอากาศเป็นเวลา 7-10 วัน สำหรับอาหารสูตร Modified Chu 13 เป็นสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กซึ่งมีองค์ประกอบของสารเคมีต่าง ๆ และปริมาณที่ใช้ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก

3.3.3 การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กให้ได้เซลล์เดียว

3.3.3.1 อุปกรณ์สำหรับคัดแยกเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อให้ได้สาหร่ายเซลล์เดียวสายพันธุ์บริสุทธิ์นั้นประกอบด้วยวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับทำการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

จากรูปที่ 3.2 แสดงวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับทำการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ดังต่อไปนี้

1) ปิเปตอัตโนมัติ
2) แผ่นสไลด์หลุม
3) ไมโครปิเปต
4) แผ่นสไลด์
5) หลอดทดลอง
6) เข็มเขี่ยเชื้อ
7) หลอดหยด
8) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
9) แผ่นสไลด์สำหรับนับเซลล์
10) ทิปขนาดเล็ก
11) กล้องจุลทรรศน์
12) ตะเกียงแอลกอฮอล์
13) ขวดน้ำกลั่น
14) อาหารเลี้ยงเชื้อ

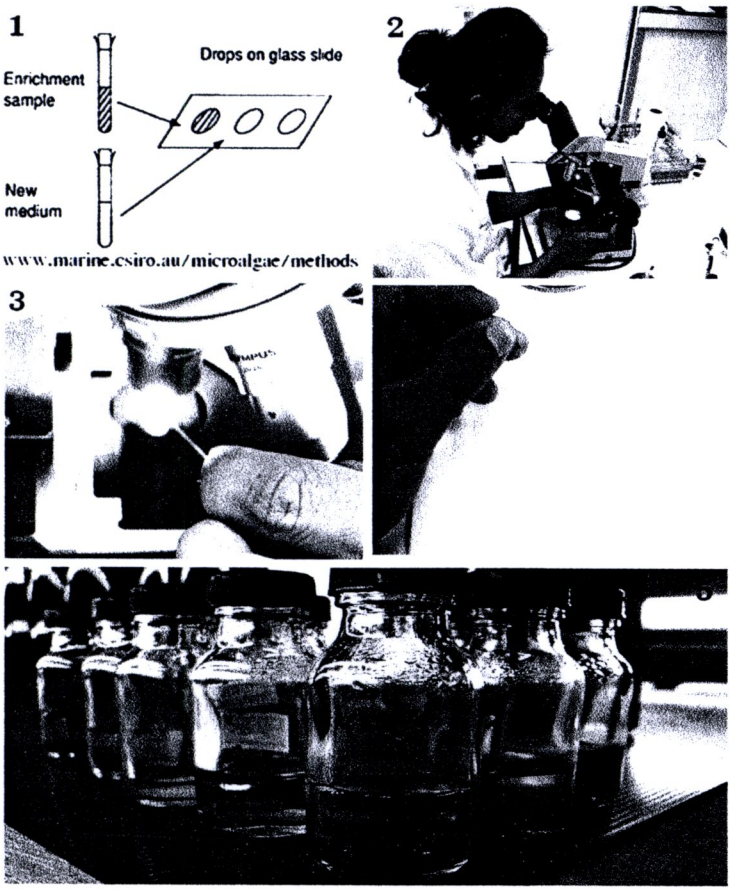
3.3.3.2 การเตรียมไมโครปิเปต

วิธีการทำไมโครปิเปต เตรียมได้โดยนำเอาปิเปตหรือหลอดแก้วขนาดเล็ก ๆที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาใส่จุกยางแล้วใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วเช่นกันมายืดปลายด้านเรียวเล็กของปิเปตนำไปลนเปลวไฟของตะเกียงแก๊ส เมื่อเนื้อแก้วอ่อนตัวและเป็นสีแดงให้ดึงออกตามแนวยาวอย่างช้า ๆพร้อมกับยกปิเปตห่างจากเปลวไฟ ลนไฟให้ได้เส้นผ่านศูนย์กลางเล็กที่สุด ตัดปลายปิเปตบริเวณใกล้จุดที่แก้วจะงอ (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546)

3.3.3.3 วิธีการคัดแยกสาหร่าย

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกสาหร่ายโดยใช้วิธีดูดออกโดยใช้ไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Optical microscope รุ่น CH-2, Olympus Optical, Japan) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เรียกว่า Manipulative

methods เป็นวิธีการแยกสาหร่ายที่เราต้องการออกจากสาหร่ายชนิดอื่นโดยวิธีกลหรือวิธีการทางฟิสิกส์ โดยของเหลวจะไหลเข้าปลายไมโครปิเปตเองโดยอาศัยแรงดึงแคปปิลลารี (Capillary force)



รูปที่ 3.3 วิธีการคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้วิธีดูดออกด้วยไมโครปิเปต

วิธีการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธีดูดออกด้วยไมโครปิเปต (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546) โดยทำการคัดแยกสาหร่ายในตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard Class II รุ่น CTL-120BT, TTK Science, Thailand) ซึ่งมีขั้นตอนและรายละเอียดดังต่อไปนี้ (ดังแสดงในรูปที่ 3.4)

1. เจือจางปริมาณเซลล์สาหร่ายเพื่อเพิ่มจำนวนได้จากการทดลองที่ 3.3.2 ด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13 ที่หยดไว้บนแผ่นกระจกสไลด์ 3-5 ครั้ง

2. นำแผ่นสไลด์หลุมที่มีสาหร่ายมาตรวจหาเซลล์สาหร่ายที่ต้องการด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยจะเลือกคัดแยกเฉพาะสาหร่ายที่พบเป็นจำนวนมากในแต่ละแหล่งน้ำนั้น ๆ จ่อปลายไมโครปิเปตที่เตรียมไว้ ลงตรงตำแหน่งที่มีสาหร่ายบนแผ่นสไลด์ข้อ 1 ซึ่งน้ำและสาหร่ายจะไหลเข้าไมโครปิเปตด้วยแรงดึงแคปปิลลารี ในครั้งแรกจะได้เซลล์สาหร่ายจำนวนหนึ่ง

3. จุ่มปลายไมโครปิเปตที่ดึงสาหร่ายจากข้อ 3 ลงในอาหารเหลวที่หยดไว้บนแผ่นสไลด์แผ่นใหม่โดยใช้จุกยางสวมที่ปลายไมโครปิเปตบีบอาหารเหลวที่มีสาหร่ายออก ซึ่งจะทำให้สาหร่ายหลุดออกไปอยู่ในอาหารเหลว จากนั้นตรวจดูสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง จะพบว่าสาหร่ายกระจายออกไป ใช้ไมโครปิเปตดูดสาหร่ายออก ด้วยวิธีการเดียวกับที่กล่าวมาตามข้อ 3 แล้วถ่ายลงในอาหารเหลว โดยทำซ้ำใน

ข้อ 3 และ 4 เรื่อยๆไปจนได้สาหร่ายจำนวนน้อยที่สุด หรือบางครั้งได้สาหร่ายเพียง 1 เซลล์ หรือหลายเซลล์ที่เป็นชนิดเดียวกัน

4. ถ่ายสาหร่ายลงในอาหารเหลวเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่ายต่อไป ซึ่งในขั้นตอนนี้จะต้องระมัดระวังในการถ่ายสาหร่ายลงขวดเพาะเลี้ยง ต้องแน่ใจว่าเซลล์สาหร่ายลงไปอยู่ในอาหารเหลวในขวดอย่างแน่นอนแล้วนำขวดอาหารเหลวที่ถ่ายเซลล์สาหร่ายลงเรียบร้อยแล้วไปไว้ในตู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค ที่มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง 16 ต่อ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตว่าสาหร่ายเจริญขึ้นหรือไม่ โดยสังเกตจากสีของอาหารเหลวซึ่งจะมีสีเขียวแล้วจึงนำมาตรวจดูว่าสาหร่ายที่ได้เป็นสาหร่ายสายพันธุ์เดียวหรือไม่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

5. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดแยกได้แล้วนั้นจะมีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะซึ่งประกอบด้วย เพนนิซิลิน G สเตรปโตมัยซินซัลเฟต และคลอแรมเฟนิคอล เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ เพื่อให้สาหร่ายที่คัดแยกได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

3.3.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

สำหรับการงานวิจัยครั้งนี้ ใช้วิธีการจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากรูปร่าง และสรีระวิทยาของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยส่งตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่สามารถคัดแยกและเพาะเลี้ยงขยายจำนวนเซลล์ได้ บรรจุในขวดแก้วที่มีอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร แล้วส่งไปทำการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดของสายพันธุ์สาหร่าย ณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.5 การเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

นำสาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ประมาณ 3 มิลลิลิตร ไปเก็บไว้ในหลอด Cryo tube ที่มีสภาพปลอดเชื้อแล้ว โดยภายในหลอดจะมีสารละลาย 20% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ประมาณ 5 มิลลิลิตรแล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (Ultra low temperature freezer; U410 premium, New Brunswick Scientific, England) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4 การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการสะสมน้ำมันในเซลล์สูง

นำสาหร่ายที่คัดแยกได้จากขั้นตอนการคัดแยกสาหร่ายดังกล่าวในข้อ 3.3 ไปแล้วนั้น มาหาสายพันธุ์ที่มีปริมาณการสะสมปริมาณน้ำมันไว้ภายในเซลล์สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติของการเจริญเติบโตของสาหร่าย วิธีการตรวจสอบปริมาณน้ำมันที่สะสมไว้ภายในเซลล์สาหร่ายเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับใช้ศึกษาในลำดับต่อไป ทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วยสีซูดาน แบลค บี (Sudan Black B) แล้วศึกษาปริมาณไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Burdon, 1946) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังต่อไปนี้

1. แผ่นฟิล์มของเซลล์สาหร่ายบนแผ่นสไลด์ โดยหยดเซลล์สาหร่ายลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์เพื่อตรึงเซลล์สาหร่ายไว้บนแผ่นสไลด์

2. หยดสารละลายซูดาน แบลค บี ให้ท่วม แผ่นฟิล์ม ทิ้งไว้ 10 นาที (สีซูดาน 0.3 กรัม ละลายใน 70% เอทานอล 100 มิลลิลิตร)

3. ล้างสีในส่วนที่เกินออกด้วยน้ำสะอาด แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. ย้อมด้วยสารละลาย 0.5% ซาฟรานิน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที

5. ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำสะอาด แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

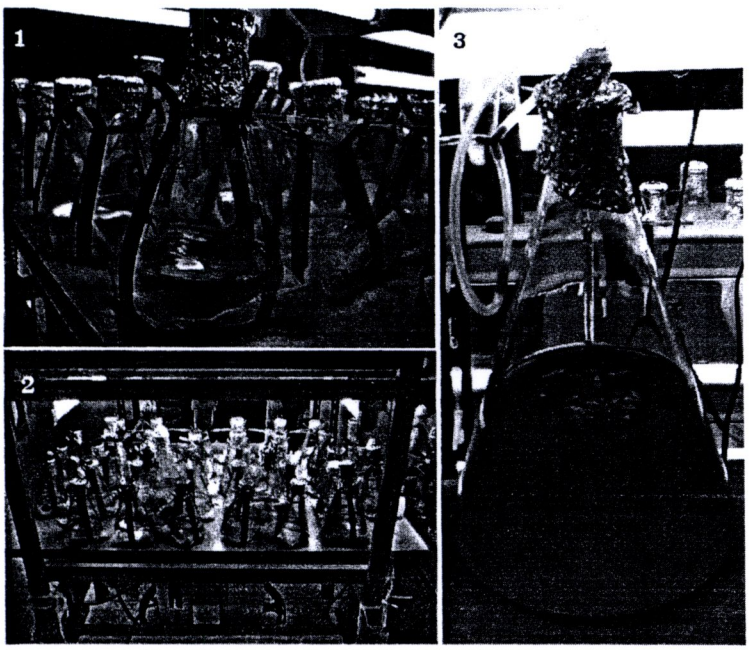
6. นำไปตรวจสอบปริมาณหยดไขมัน (Oil droplets) ที่สะสมในเซลล์สาหร่าย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า

3.5 การเตรียมกล้าเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก

การเตรียมกล้าเชื้อสาหร่ายเพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ ทำได้โดยการนำสาหร่ายจาก Stock culture ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 มาเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

1. นำกล้าเชื้อสาหร่ายมาถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร Modified Chu 13 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบให้แสงที่มีความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที อัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง คือ 16: 8 ชั่วโมง ที่มีความเข้มแสงขนาดประมาณ 2,500 ลักซ์ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

2. จากนั้นนำสาหร่ายดังกล่าวข้างต้นไปเพาะเลี้ยงต่อในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร ที่มีการให้อากาศบริสุทธิ์จากปั๊มอากาศ เพื่อเร่งการเจริญเติบโต จนสาหร่ายเข้าสู่ระยะ Exponential แล้วจึงนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำการศึกษาต่อไป

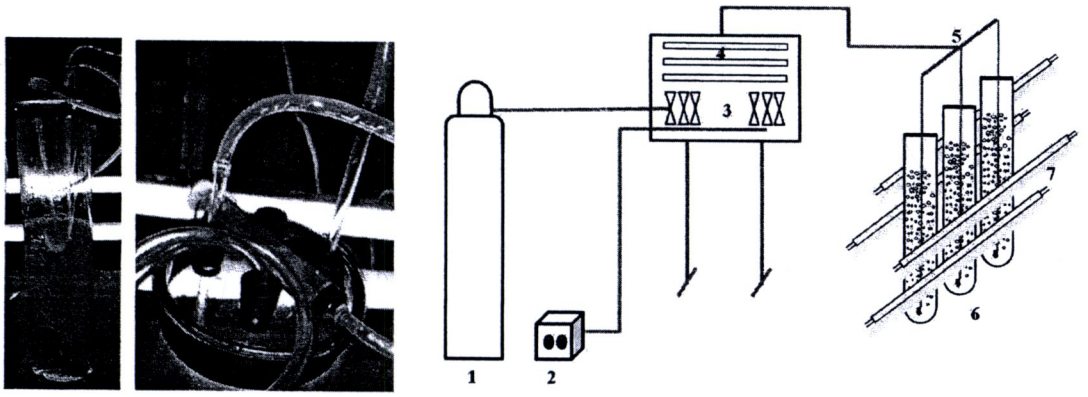


รูปที่ 3.4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

หมายเหตุ : 1, 2 เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนเครื่องเขย่าแบบให้แสงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
3 เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 5 ลิตร ที่มีการให้อากาศบริสุทธิ์จากปั๊มอากาศ

3.6 การเตรียมชุดปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง

ชุดปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสงเพื่อใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายสำหรับงานวิจัยนี้ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งทำด้วยแก้วหนา 2.5 มิลลิเมตร เป็นหลอดแก้วทรงกระบอก (Tubular) ปลายเปิดที่มีความจุ 3 ลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ความสูง 50 เซนติเมตร ส่วนฝาครอบทำจากแผ่นอะคริลิกใส วงกลมที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับปลายของหลอดแก้ว เจาะรูเพื่อทำเป็นช่อง (Port) สำหรับให้อากาศเก็บตัวอย่าง และ ท่อระบายอากาศ ดังแสดงในรูปที่ 3.5 (ซ้าย)



รูปที่ 3.5 องค์ประกอบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพและระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบปิด

ระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบใช้แสง โดยมีขั้นตอนการจัดการระบบดังรายละเอียดต่อไปนี้ (แสดงในรูปที่ 3.6 ขวา)

1. ถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 gas cylinder) ขนาดบรรจุ 25 กิโลกรัม ที่มีชุดควบคุมการไหลของก๊าซ (Control valve) สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2. ปั๊มอากาศ (Air pump) ยี่ห้อ HAILEA รุ่น ACO 380 ขนาดกำลัง (Power) 380W มีอัตราการให้อากาศสูงสุด 380 ลิตร/นาที เพื่อให้อากาศในระบบการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีชุดกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อกรองอากาศให้บริสุทธิ์ก่อนเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยง

3. ชุดควบคุมอัตราการป้อนก๊าซ (Gas feed controller) เพื่อควบคุมการแปรผันความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

4. ชุดผสมอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Gas mixer) เป็นอุปกรณ์ช่วยผสมอากาศก่อนนำเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยจะมีช่องให้อากาศ 3 ทาง (Three way cock) ซึ่งประกอบด้วย 3 ชุด แต่ละชุดสามารถกระจายอากาศผสมได้ 3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

5. ชุดท่อแก้วสำหรับให้อากาศและอุปกรณ์ช่วยในการกระจายอากาศ (Glass tube sparker) จากด้านล่างของในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

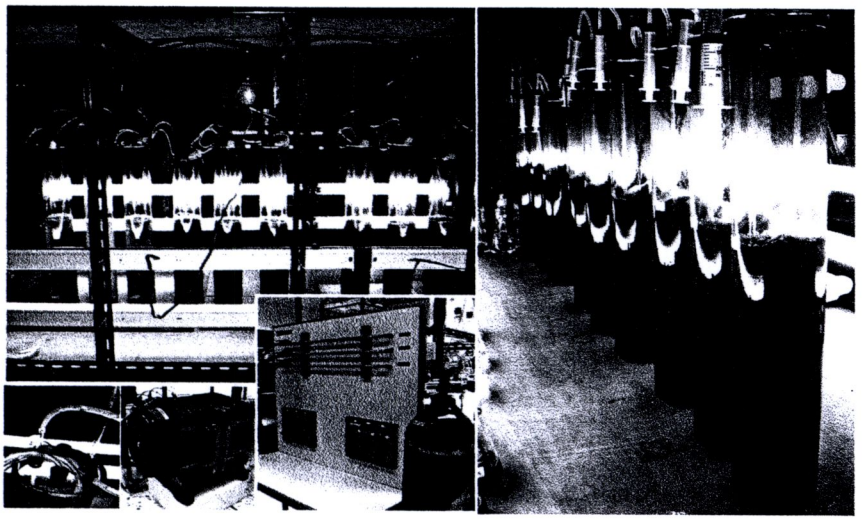
6. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Tubular reactor)

7. ชุดอุปกรณ์ให้แสงสว่าง (Illuminization equipment) โดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ชนิดหลอดเย็น (Cool white fluorescence) ขนาด 60วัตต์ มีชุดควบคุมการเปิด-ปิด (Timer) แบบอัตโนมัติ

3.7 การศึกษาอิทธิพลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

นำสาหร่ายจากข้อ 3.5 ที่เจริญเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Exponential phase) มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 3 ลิตร (ปริมาตรทำงาน 2 ลิตร) สำหรับงานวิจัยนี้ได้ออกแบบการทดลองโดยการแปรผันระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ออกเป็น 5%, 10% และ 15% โดยปริมาตร ผสมกับอากาศจากปั๊มให้อากาศ ในขณะที่ความเข้มข้น 0% (ชุดควบคุม) จะให้อากาศจากปั๊มอากาศเพียงอย่างเดียว โดยมีสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบออโตโทรฟิค ซึ่งให้แสงที่มีความเข้มของแสงเฉลี่ย 2,500 ลักซ์ มีอัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง คือ 16 ต่อ 8 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส โดยมีลักษณะของการเพาะเลี้ยงดังแสดงในรูปที่ 3.6

การติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์สาหร่ายด้วยสไลด์นับจำนวน (Counter chamber slide) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus biological microscope รุ่น CH-2, Olympus optical, Japan) วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Visible Spectrophotometer รุ่น UV 1601, Shimadzu, Japan) ที่มีความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร และวิธีการวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย (ภาคผนวกที่ 2)



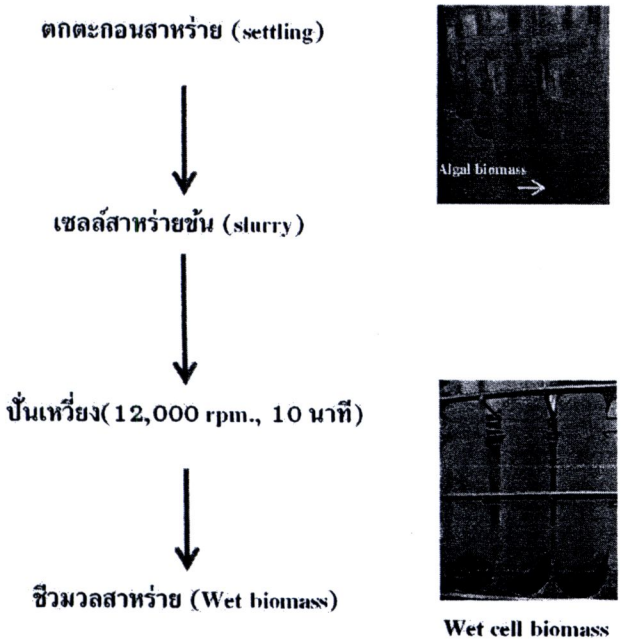
รูปที่ 3.6 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง ขนาด 3 ลิตร ที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

3.8 การศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการสะสมน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็ก

งานวิจัยนี้จะศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการสะสมน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็กโดยการเตรียมสารละลายในรูปของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่แปรผันระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ออกเป็น 3 ระดับ คือ 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ แล้วเติมลงไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมื่อสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะคงที่ (Early stationary phase) โดยจะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีระดับความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 3.7 และเก็บเกี่ยวเซลล์หลังจากเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์แล้วเป็นระยะเวลา 5, 10, 15 และ 20 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์

3.9 การเก็บเกี่ยวชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็ก

ชีวมวลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ จะใช้วิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปิดระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแล้วทิ้งเซลล์ไว้ข้ามคืนเพื่อให้เซลล์สาหร่ายจมตัวและตกตะกอน (Settling) ลงสู่ก้นถังปฏิกรณ์ชีวภาพดังแสดงในรูปที่ 3.7 จากนั้นค่อย ๆเทอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างช้า ๆ เก็บรวบรวมตะกอนเซลล์ (Slurry) ที่ก้นถังปฏิกรณ์ชีวภาพไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Bentop Refrigerated Ultracentrifuge รุ่น 2K15, Sigma, Osterode, Germany) ที่มีความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วรินส่วนที่เป็นอาหารเหลวทิ้งจะได้เซลล์สาหร่ายที่มีสภาพหมาด ๆ หรือในที่นี้จะเรียกว่าเซลล์เปียก (Wet cell biomass)



รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวชีวมวลสาหร่ายโดยวิธีการตกตะกอนเซลล์และปั่นเหวี่ยง

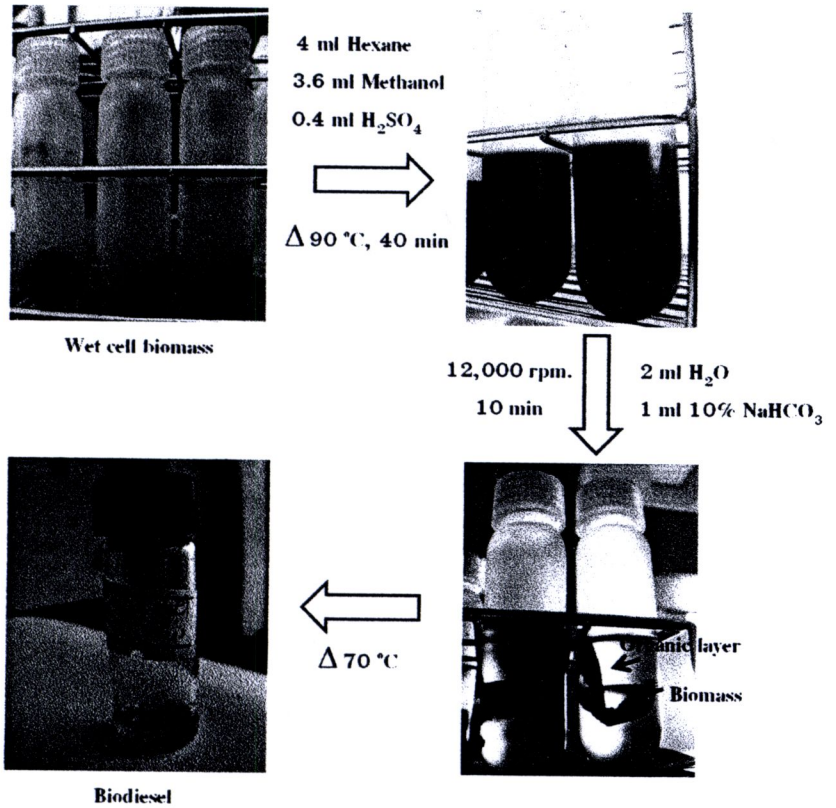
3.10 การศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

ชีวมวลของสาหร่ายที่ได้จากการเก็บเกี่ยวในข้อ 3.9 จะนำมาศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นภายในเซลล์สาหร่าย ดังต่อไปนี้ (วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ แสดงในภาคผนวก ค)

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธี Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)
2. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (Phenol Sulfuric)
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน โดยใช้วิธีการสกัดทางเคมีด้วยเครื่องซอกเล็ต (Soxhlet)
4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยใช้วิธีของวีนเดอร์ (Weender analysis)
5. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยใช้วิธีของวีนเดอร์ (Weender analysis)

3.11 การผลิตไบโอดีเซลจากเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กในระดับห้องปฏิบัติการ

สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ใช้วิธีการผลิตไบโอดีเซลแบบ *In-situ* acidic transesterification จากเซลล์เปียก (Wet algal biomass) ของสาหร่าย โดยได้ดัดแปลงจากวิธีของ Liu et al. (2007) ขั้นตอนโดยสรุปดังแสดงในรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการทำไบโอดีเซลแบบ *In-situ* acidic transesterification

วิธีการผลิตไบโอดีเซลแบบ *In-situ* acidic transesterification มีรายละเอียดและขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้นี้

1. ชั่งเซลล์สาหร่ายจากข้อ 3.8 จำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร

2. เติมเมทานอล 3.4 มิลลิลิตร กรดซัลฟูริคเข้มข้น 0.6 มิลลิลิตร และเฮกเซน 4 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดฝาเกลียวแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath รุ่น SBD-50Bio, Heto, Denmark) เป็นเวลา 40 นาที โดยจะต้องเขย่าให้เข้ากันตลอดเวลา

3. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และสารละลาย 10% โซเดียมไบคาบอเนต 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที

4. ปั่นให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลายชั้นบน (Organic layer) ซึ่งจะเป็นส่วนที่มีไบโอดีเซล (FAME) ละลายอยู่โดยใช้ Glass fiber syringes filters ไปใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

6. ทำซ้ำในขั้นตอน 4-5 เพื่อสกัดไบโอดีเซลให้ได้มากที่สุด

7. นำสารละลายเฮกเซนจากข้อ 6 ไประเหยในตู้ดูดควัน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

8. ชั่งน้ำหนักหลอดทดลองเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากเซลล์สาหร่าย

9. นำไบโอดีเซลที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และคุณสมบัติเบื้องต้นของน้ำมันไบโอดีเซลต่อไป

3.12 การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติเบื้องต้นในน้ำมันไบโอดีเซล

3.12.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากเซลล์สาหร่ายจะนำไปทดสอบการเกิดเมทิลเลชันของกรดไขมัน (FAME) เบื้องต้นโดยการทดสอบโครมาโตแกรมด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography โดยใช้แผ่น TLC เคลือบด้วยซิลิกา เจล ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร (Merck, Darmstadt, Germany) เป็น Stationary phase แล้วนำตัวอย่างไบโอดีเซลมาหยดบนแผ่น TLC ดังกล่าว ด้วย Micro-syringe แล้วนำไปวางใน TLC chamber ที่มีสารละลายอิ่มตัวของโทลูอีน-เฮกเซน ในอัตราส่วน 40 ต่อ 60 (mobile phase) ทิ้งให้สารเคลื่อนที่ประมาณ 15 เซนติเมตร แล้วนำแผ่น TLC ขึ้นมาทดสอบโครมาโตแกรมภายใต้ไอของเกล็ดไอโอดีนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างไบโอดีเซลที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography รุ่น 6890N(G1530N), Agilent Technologies, USA.) โดยใช้คอลัมน์ Supelco capillary column รุ่น SP^{TM}-2560 ขนาด 100 เมตร × 0.25 มิลลิเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.20 ไมโครเมตร ใช้ Flame Ionization Detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณโดยมีสภาวะในการวิเคราะห์เป็นดังนี้

อุณหภูมิของ Injector และ Detector คือ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 140 องศาเซลเซียส แล้วคงที่ไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที คงที่เป็นเวลา 17 นาที ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพาหะ (Carrier gas) ในอัตรา 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจนเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 450 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการชะตัวอย่าง (Split ratio) 100 ต่อ 1และใช้ปริมาณตัวอย่างไบโอดีเซล 1 ไมโครลิตร

3.12.2 การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล

โดยการวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้ ดังต่อไปนี้

3.12.2.1 ค่าความหนาแน่น (Density)

เป็นการหาค่าความหนาแน่นของน้ำมันที่ได้จากอัตราส่วนของน้ำหนักของน้ำมันต่อปริมาตรของน้ำที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

3.12.2.2 ค่าของกรด (Acid value)

ค่าของกรด คือ จำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ที่ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระของน้ำมัน 1 กรัม วิเคราะห์โดยการไตเตรท (Titration method) ด้วยสารละลาย Potassium hydroxide ethanolic standard ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร โดยมีฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

3.12.2.3 จุดวาบไฟ (Flash point)

เป็นการทดสอบอุณหภูมิที่น้ำมันเกิดวาบไฟขึ้นที่จุดใดจุดหนึ่งบนผิวน้ำมัน ทดสอบโดยการให้ความร้อนที่น้ำมันอย่างรวดเร็ว เมื่อสังเกตเห็นควันจากน้ำมันแล้วจึงค่อย ๆเพิ่มอุณหภูมิในอัตราไม่เกิน 15 องศาเซลเซียสต่อนาที พร้อมทั้งเปิดแก๊สเพื่อทำการทดสอบจุดวาบไฟแล้วบันทึกอุณหภูมิ

3.12.2.4 เสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation stability)

เป็นค่าที่บ่งถึงความสามารถของน้ำมันที่จะเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนแล้วได้ยางเหนียว วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง RANCIMAT ที่มีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 °ซ และเติมอากาศซึ่งมีอัตราการไหลของอากาศ 10 ลิตร/ชั่วโมง เข้าสู่ไบโอดีเซลน้ำหนัก 2.5 กรัมซึ่งบรรจุภายในหลอดทดลองแก้วและอยู่ในระบบปิดซึ่งมีการต่อสายท่ออากาศออกจากระบบปิด เพื่อนำอากาศส่วนที่อยู่ด้านบนซึ่งคืออากาศส่วนที่ถูกออกซิไดซ์ออกมานั้นจุ่มลงในกระบอกแก้วซึ่งบรรจุน้ำ DI (deionization) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร