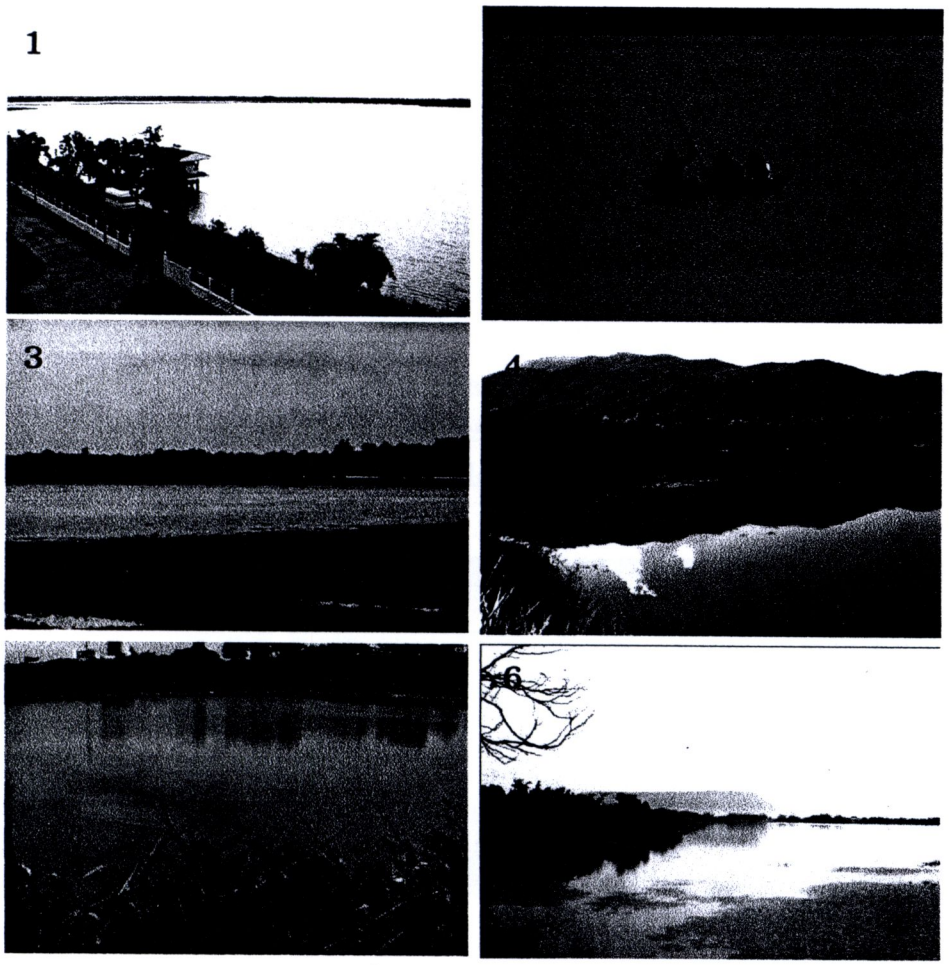
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งกักเก็บน้ำตามธรรมชาติในเขตพื้นที่ของจังหวัดเชียงใหม่ บุรีรัมย์ นครพนม ชัยภูมิ และจังหวัดขอนแก่น โดยใช้อุปกรณ์เก็บที่เรียกว่า ตาข่ายแพลงก์ตอน (Plankton net) ที่มีขนาดของตาข่าย 45 ไมโครเมตร โดยจะสุ่มเก็บที่ระดับความลึกของน้ำประมาณ 50 เซนติเมตร หรือในระดับที่ระดับแสงสามารถส่องผ่านได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะทั่วไปของแหล่งน้ำธรรมชาติที่ใช้เป็นแหล่งเก็บรวมสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

1) อ่างเก็บน้ำสนามบิน จ.บุรีรัมย์
2) อ่างเก็บน้ำห้วยตลาด จ.บุรีรัมย์
3) พื้นที่ชุ่มน้ำหนองไชยวาน จ.นครพนม
4) อ่างเก็บน้ำแม่เหียะ จ.เชียงใหม่
5) อ่างเก็บน้ำประมง จ.ขอนแก่น
6) อ่างเก็บน้ำหนองผักปัง จ.ชัยภูมิ

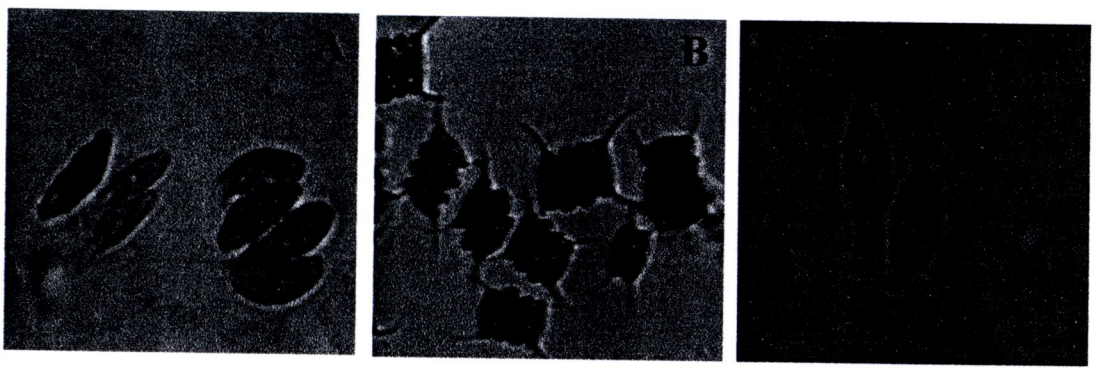
ตัวอย่างน้ำที่เก็บรวบรวมมานั้นจะทำการวัดคุณสมบัติเบื้องต้น (On-site examination) ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิของน้ำ และค่าความสามารถในการส่องผ่านของแสง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติของน้ำในบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย จากแหล่งน้ำธรรมชาติต่าง ๆ

พื้นที่	pH	อุณหภูมิ (°C)	ความสามารถในการส่องผ่านของแสง (cm.)
อ่างเก็บน้ำสนามบิน จ. บุรีรัมย์	6.98 ± 0.61	29.8 ± 0.84	71 ± 1.22
อ่างเก็บน้ำห้วยตลาด จ. บุรีรัมย์	6.50 ± 0.12	30.0 ± 1.00	15 ± 1.22
หนองไชยวาน จ. นครพนม	6.62 ± 0.13	29.4 ± 1.14	31 ± 0.71
อ่างเก็บน้ำแม่เหียะ จ. เชียงใหม่	7.02 ± 0.45	30.6 ± 1.52	50 ± 0.71
อ่างเก็บน้ำประมง จ. ขอนแก่น	6.72 ± 0.11	31.2 ± 1.30	45 ± 1.00
อ่างเก็บน้ำภูเขียว จ. ชัยภูมิ	6.12 ± 0.25	30.8 ± 0.84	40 ± 1.87

4.2 การคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก

ในการศึกษาครั้งนี้สนใจที่จะคัดแยกเฉพาะสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาตินั้น ๆ ซึ่งสามารถคัดแยกสาหร่ายสายพันธุ์ต่าง ๆให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ 3 สายพันธุ์ โดยเป็นสาหร่ายสีเขียวที่เก็บและคัดแยกได้จากบริเวณอ่างเก็บน้ำประมง จังหวัดขอนแก่น จำนวน 2 สายพันธุ์ และจากอ่างเก็บน้ำสนามบิน จังหวัดบุรีรัมย์ อีก 1 สายพันธุ์ โดยลักษณะของเซลล์สาหร่ายที่คัดแยกได้แสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ
A) KK21253-3 B) KK20552-1 C) PTB23652-9

4.3 การจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็ก

หลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากบริเวณอ่างเก็บน้ำประมง จังหวัดขอนแก่น และจากอ่างเก็บน้ำสนามบิน จังหวัดบุรีรัมย์ จากนั้นทำการจัดจำแนกชนิดของสายพันธุ์สาหร่าย โดยการสังเกตลักษณะของโคโลนี (Morphology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ดังรูปที่ 4.3 พบว่าเป็นกลุ่มของสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. โดยสามารถนำมาจัดลำดับหมวดหมู่ในอาณาจักรพืช (Plantae Kingdom) โดยใช้ระบบของ Bold and Wynne (1985) ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

อาณาจักร (Kingdom) Plantae

หมวด (Division) Chlorophyta

ชั้น (Class) Chlorophyceae

อันดับ (Order) Clorococcales

วงศ์ (Family) Scenedesmaceae

สกุล (Genus) *Scenedesmus*

ชนิด (Species) *obliquus, armatus, bernardii*

สาหร่ายสายพันธุ์ S. *obliquus* และ *S. armatus* เป็นสาหร่ายที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำประมง จังหวัดขอนแก่น และสาหร่ายสายพันธุ์ *S. bernardii* เป็นสาหร่ายที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำสนามบิน จังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งสาหร่ายที่คัดแยกได้มีลักษณะและสรีระของเซลล์ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของเซลล์และการจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์ของสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยวิธีจัดจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

พื้นที่	สายพันธุ์	ลักษณะของเซลล์
อ่างเก็บน้ำประมง จ. ขอนแก่น	*S. obliquus*	เซลล์สาหร่ายมีลักษณะเป็นกลุ่มโคโลนี อยู่รวมกันเป็นชุด ๆ ละ 4-8 เซลล์ เซลล์จะเชื่อมติดกันบริเวณด้านข้างของเซลล์ มีขนาดประมาณ 25 ไมโครเมตร
อ่างเก็บน้ำประมง จ. ขอนแก่น	*S. armatus*	เซลล์สาหร่ายจะอยู่เป็นกลุ่มโคโลนี โดยอยู่รวมกันเป็นชุด ชุดละ 4-8 เซลล์ เซลล์จะเชื่อมติดกันบริเวณกลางเซลล์ มีแฟลกเจลลา มีขนาดประมาณ 25 ไมโครเมตร
อ่างเก็บน้ำสนามบิน จ. บุรีรัมย์	*S. bernardii*	เซลล์สาหร่ายจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เซลล์มีลักษณะเรียวคล้ายเมล็ดข้าว มีขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร

วว.

คำขอบริการที่ 2553 / 031 ที่ ฝวช.

รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์

ให้แก่

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การทดสอบ / วิเคราะห์ จัดจำแนกชนิดสายพันธุ์สาหร่าย

วิธีทดสอบ / วิเคราะห์ จัดจำแนกชนิดสายพันธุ์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาวะการทดสอบ / วิเคราะห์ : อุณหภูมิ : 28±2 องศาเซลเซียส

วันที่ทดสอบ / วิเคราะห์ -

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์

ตัวอย่าง	สาหร่ายที่พบ
1. KK 21253-3	*Scenedesmus obliquus*
2. KK 20552-1	*Scenedesmus armatus*
3. PTB 23652-9	*Scenedesmus bernardii*

ผู้ทดสอบ / วิเคราะห์ น.ส. วัชรี กัลยาลัง

ผู้ตรวจสอบ (ดร. อาภรณ์ [illegible])

ผู้รับรอง (ดร. [illegible])

ผู้อำนวยการฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

วันที่ [illegible] 2553

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.

แก้ไขครั้งที่ : 0 แบบฟอร์มประกาศใช้วันที่ 16 ตุลาคม 2551 FM-BSD-WI-10-02 (ไทย)

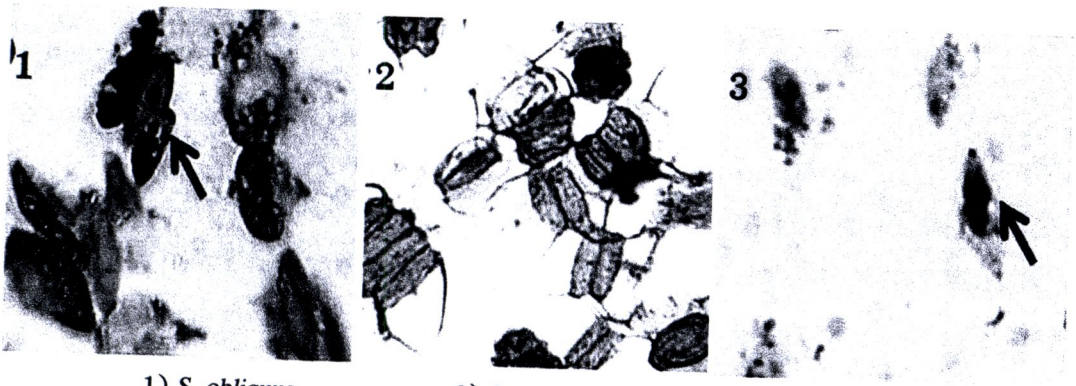
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
[illegible]
E-mail: [illegible]

รูปที่ 4.3 รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์การจัดจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ ไทย (วว.)

4.4 การคัดเลือกสาหร่ายที่มีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์สูง

สาหร่ายสายพันธุ์บริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์ ได้นำมาทดสอบปริมาณหยดไขมัน (Oil droplet) ที่สะสมไว้ภายในเซลล์เบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้วิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีซูดาน แบลค บี (Sudan Black B) โดยไขมันที่อยู่ภายในเซลล์สาหร่ายจะทำปฏิกิริยากับสีย้อมและจะแสดงผลออกมาให้เห็นเป็นจุดสีดำกระจายอยู่ภายในเซลล์ ถ้าตรวจพบว่ามีจุดสีดำกระจายอยู่เต็มเซลล์แสดงว่ามีปริมาณไขมันเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง

ผลจากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่า สาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* สามารถย้อมติดสีได้และสังเกตเห็นจุดสีดำกระจายอยู่ภายในเซลล์ (บริเวณที่ลูกศรชี้) มากกว่าสาหร่ายสายพันธุ์ *S. bernardii* ในขณะที่สาหร่ายสายพันธุ์ *S. armatus* ไม่พบว่ามีจุดสีดำกระจายอยู่ภายในเซลล์เลย ซึ่งคาดว่าน่าจะมีปริมาณไขมันน้อยกว่าสายพันธุ์อื่นที่คัดแยกได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* เพื่อทำการศึกษาอิทธิพลของคาร์บอนไดออกไซด์และความเค็มต่อการสะสมน้ำมันไว้ภายในเซลล์ต่อไป

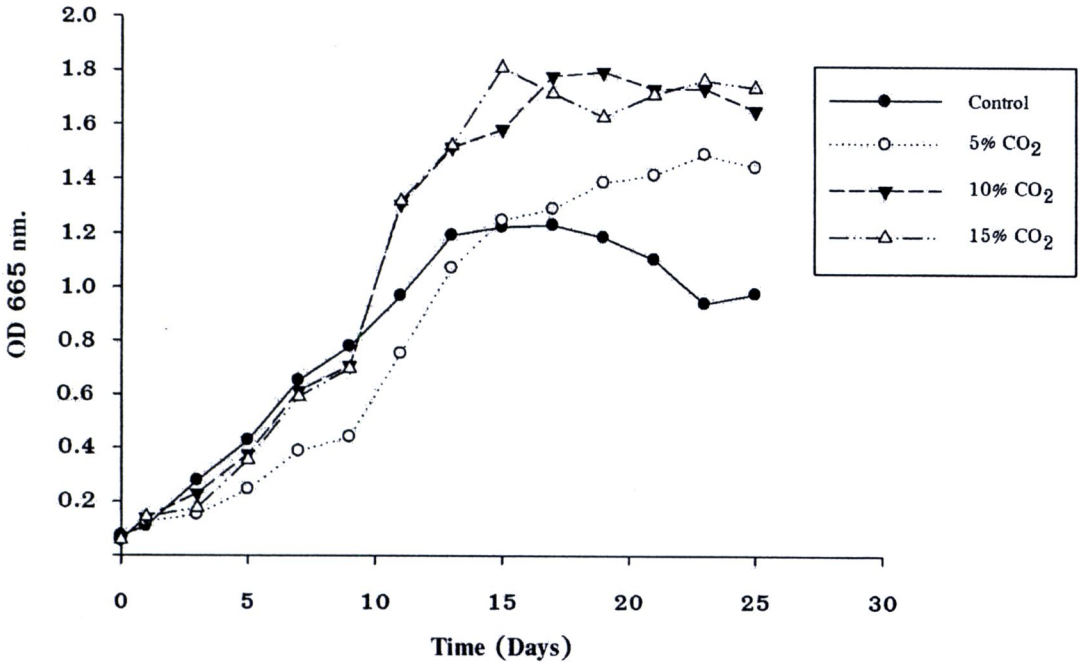


1) *S. obliquus* 2) *S. armatus* 3) *S. bernardii*

รูปที่ 4.4 ลักษณะของหยดไขมันที่สะสมไว้ภายเซลล์ของสาหร่าย เมื่อย้อมด้วยซูดาน แบลค บี

4.5 การศึกษาอิทธิพลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญของสาหร่ายขนาดเล็ก

จากการนำสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* มาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาอิทธิพลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยการให้อากาศผสมกับคาร์บอนไดออกไซด์ที่แปรผันความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 0%, 5%, 10% และ 15% ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 25 วัน และติดตามการเจริญของสาหร่ายทุกวันด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ผลการทดลองพบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายในทุกระดับความเข้มข้นโดยสาหร่ายมีการเจริญได้ดีกว่าชุดควบคุมหรือที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 0% (ชุดที่มีให้อากาศโดยผ่านปั๊มอากาศเพียงอย่างเดียว)



รูปที่ 4.5 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

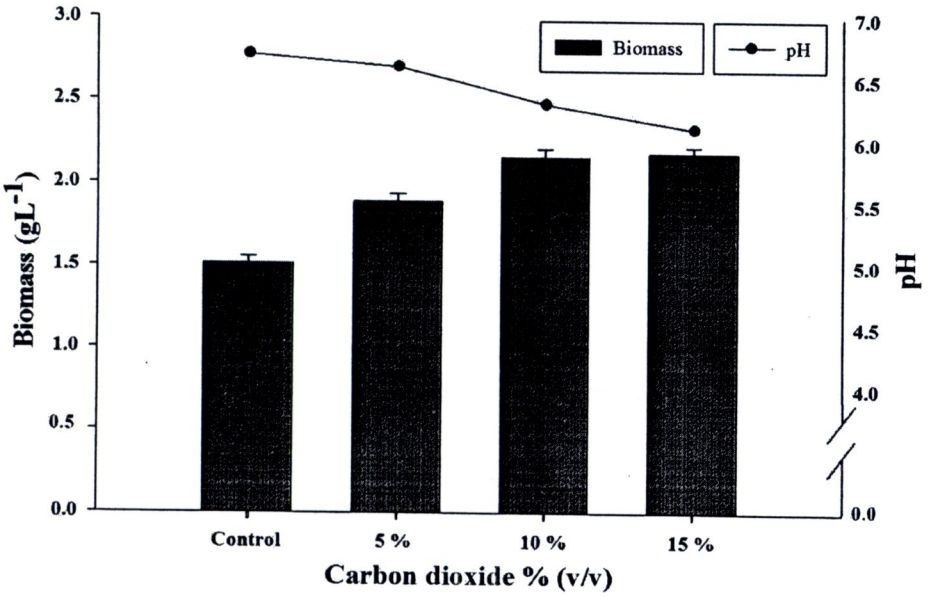
จากรูปที่ 4.5 เมื่อมีการพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 15% ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากับ 2.182 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.451 ต่อวัน ในขณะที่ที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 10% สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากับ 2.167 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 19 วัน มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.385 ต่อวัน ส่วนความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากับ 1.883 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 23 วัน มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.331 ต่อวัน ในขณะที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยให้อากาศที่ไม่ได้ผสมคาร์บอนไดออกไซด์ (ชุดควบคุม) พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 1.64 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.1401 ต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Yue and Chen (2005) ซึ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* ZY-1 ที่คัดแยกได้ในสภาวะที่มีการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0-70% พบว่า สาหร่ายมีอัตราการเจริญสูงที่สุด 5.722 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 10% และพบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้นมากกว่านี้ สาหร่ายจะมีอัตราการเจริญลดลงตามลำดับ ในขณะที่ Lee et al. (2009) รายงานว่าสามารถเพิ่มชีวมวลของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. ได้เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG 11 ที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตรา 0.3 v/v/m.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 4.3 ค่าพารามิเตอร์การเจริญของสาหร่าย *S. obliquus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

พารามิเตอร์	ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์			
	Control	5% CO_2	10% CO_2	15% CO_2
วันที่เจริญสูงสุด (วัน)	17	23	19	15
จำนวนเซลล์สูงสุด (เซลล์/มิลลิลิตร)	1.850×10^7	2.20×10^7	2.95×10^7	3.025×10^7
น้ำหนักแห้งสูงสุด (กรัม/ลิตร)	1.640	1.883	2.167	2.182
อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}, d^{-1})	0.141	0.331	0.385	0.451

จากการติดตามสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเมื่อมีการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้นจะทำให้ค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่ำลงแต่ไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวเริ่มต้น ซึ่งมีค่าประมาณ 6.7 จากรูปที่ 4.6 จะพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 15% เป็นเวลา 25 วัน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงจากค่า pH เริ่มต้นมากที่สุด คือ 6.1 จากการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงแนวโน้มว่าถ้าหากเพิ่มระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ให้สูงขึ้นอีกอาจจะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นจนเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กได้ ทั้งนี้เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี เมื่อละลายน้ำแล้วจะเป็นปฏิกิริยากลายเป็นกรดคาร์บอนิค (carbonic acid) ซึ่งมีผลทำให้ค่า pH ต่ำลงได้



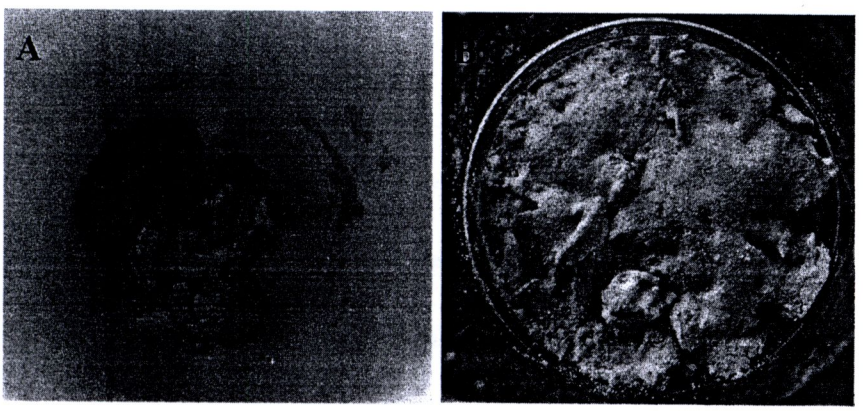
รูปที่ 4.6 อิทธิพลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการสร้างชีวมวลสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

จากข้อมูลในตารางที่ 4.3 เมื่อนำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงชีวมวลสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่าง ๆไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของลักษณะการเจริญเติบโตโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีปัจจัยเดียว (Uni-variance) ซึ่งข้อมูลทั้งหมดพิจารณาที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p=0.05) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 13.0 for Windows (SPSS inc., Chicago, IL) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างทีละคู่ (Duncan's Multiple Rang Test) พบว่าอัตราการเจริญของสาหร่ายทั้ง 2 สภาวะ กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้เลือกใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่มีอัตราการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุดที่ 15% ซึ่งสาหร่ายสามารถเจริญและทนต่อความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูงสุด (โดยพิจารณาถึงข้อได้เปรียบในการนำคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ได้มากที่สุด) เพื่อนำไปศึกษาอิทธิพลของความเค็มในรูปของโซเดียมคลอไรด์ต่อการชักนำให้เกิดการสะสมปริมาณน้ำมันในเซลล์ของสาหร่าย *S. obliquus* เป็นลำดับต่อไป

ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายในชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 15% และนำไปศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์ พบว่าเซลล์สาหร่าย *S. obliquus* ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และปริมาณเยื่อใย เป็นหลัก โดยมีปริมาณที่คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบหลักของเซลล์สาหร่าย *S. obliquus* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิคที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 15%

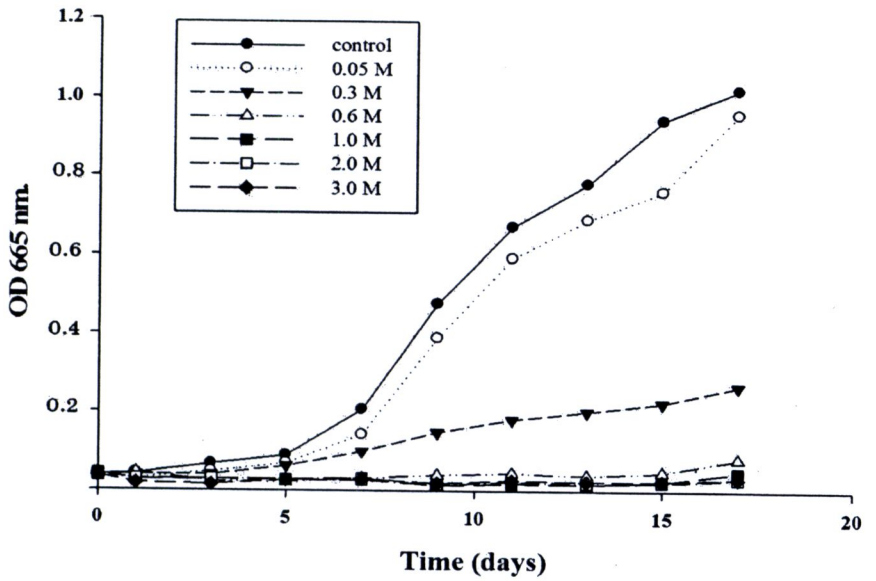
องค์ประกอบของเซลล์	ปริมาณ (% โดยน้ำหนักแห้ง)
โปรตีน	23.19
คาร์โบไฮเดรต	11.0
ไขมัน	12.34
ปริมาณเยื่อใย	9.18



รูปที่ 4.7 ลักษณะสีของเถ้า (A) และเยื่อใย (B) ของสาหร่าย *S. obliquus* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 15%

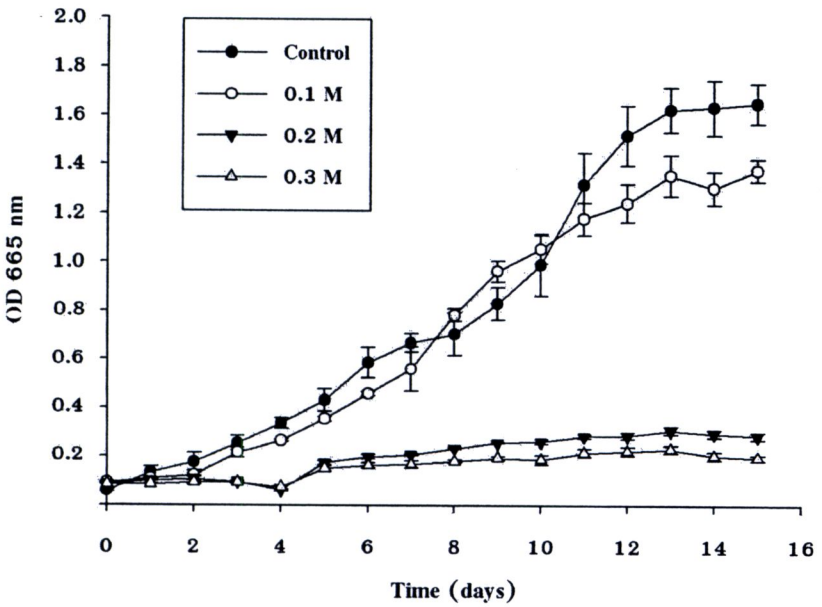
4.6 การศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการสะสมน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก

ในเบื้องต้นได้ทำการศึกษาการเจริญของสาหร่ายภายใต้อิทธิพลของความเค็มในรูปความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีการแปรผันที่ระดับ 0.05, 0.3, 0.6, 1, 2 และ 3 โมลาร์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย 150 มิลลิลิตร โดยทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปผสมในอาหารตั้งแต่เริ่มแรกของการเพาะเลี้ยง (t=0 วัน) ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ สาหร่ายสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะควบคุม (สภาวะที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์, 0 โมลาร์) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.3 โมลาร์ สาหร่ายจะมีอัตราการเจริญอย่างช้า ๆ และจะพบว่าสาหร่ายไม่สามารถเจริญได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.6 โมลาร์ ขึ้นไป ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาหร่ายที่คัดแยกได้นั้นเป็นสาหร่ายน้ำจืด สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีโซเดียมคลอไรด์ดังกล่าว จึงเป็นสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ไม่เหมาะสมแต่สาหร่ายยังคงมีชีวิตอยู่ได้และมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสาหร่ายที่คัดแยกได้ในครั้งนี้สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้นสูงกว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากรายงานของ Rahman et al. (2005) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าอิทธิพลของความเค็มส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยพบ ว่าระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 250 มิลลิโมลาร์ สาหร่าย *C. vulgaris* จะมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าชุดควบคุม และยังพบว่าคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่สะสมในเซลล์มีปริมาณลดต่ำลง ในขณะเดียวกัน Takagi et al. (2006) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ATCC 30929 ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลพบว่าสาหร่ายสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 1 โมลาร์เท่านั้น



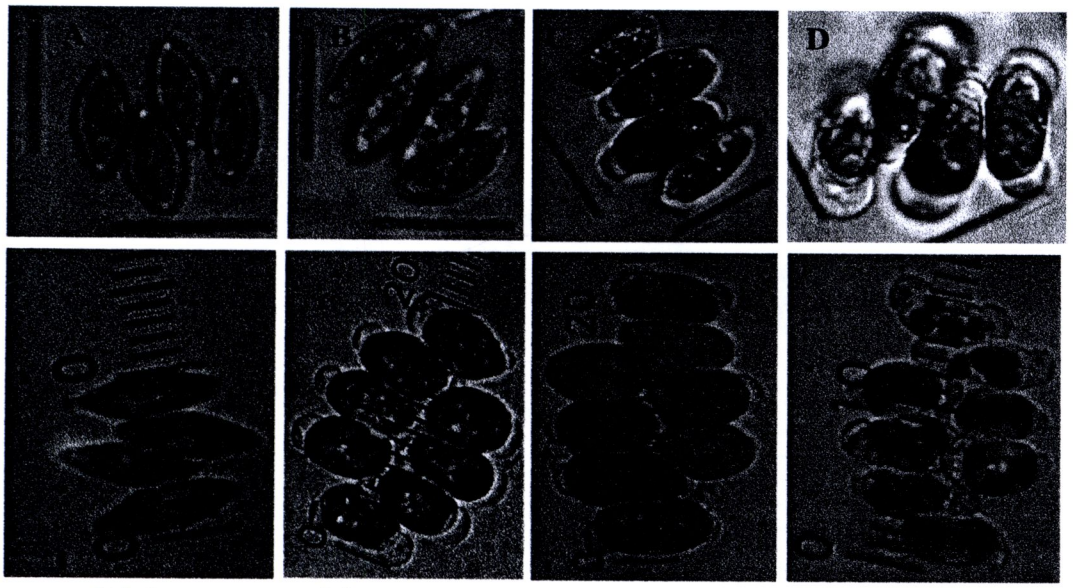
รูปที่ 4.8 การเจริญของสาหร่าย *S. obliquus* ที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของ NaCl

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นจึงได้ออกแบบการทดลองโดยทำการแปรผันระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ใหม่ออกเป็น 3 ระดับคือ 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ โดยเติมลงไปในอาหารตั้งแต่เริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิคเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.6 ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญช้าลงและได้ผลผลิตชีวมวลของเซลล์ต่ำดังแสดงในรูปที่ 4.9 นอกจากนี้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือเข้มข้นที่ 0.1 โมลาร์ เท่านั้น โดยมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าในสภาวะปกติที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในอาหารเหลว (ชุดควบคุม) ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้อย่างช้า ๆ



รูปที่ 4.9 การเจริญของสาหร่าย *S. obliquus* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของ NaCl 3 ระดับ และให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 15%

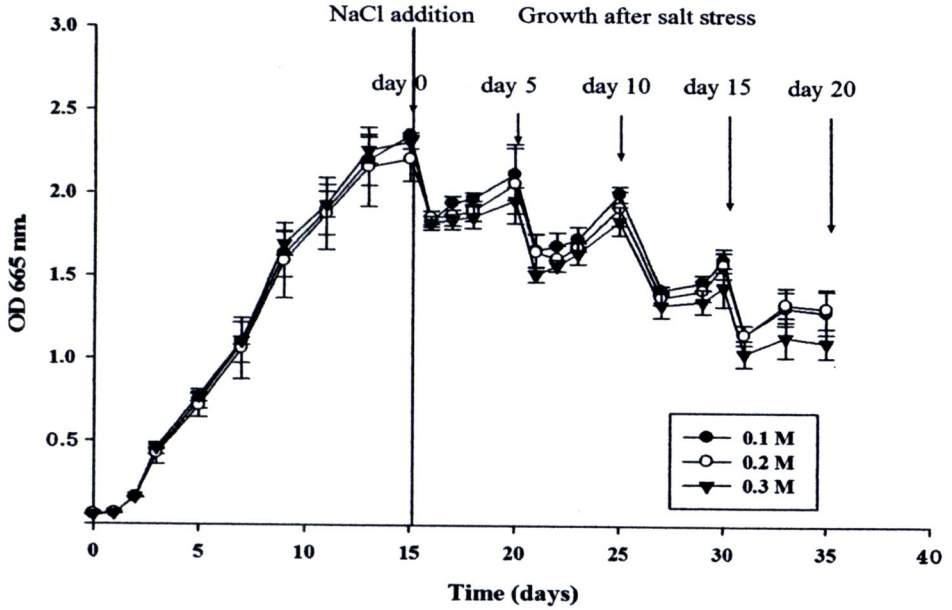
และเมื่อนำเซลล์สาหร่ายจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นต่าง ๆของโซเดียมคลอไรด์มาศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา พบว่าสาหร่ายจะมีโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ในแต่ละโคโลนีจะมีจำนวนเซลล์เรียงติดกันมากขึ้น โดยส่วนใหญ่พบว่ามีการจัดเรียงตัวเป็น 8 เซลล์ และสังเกตเห็นว่ามีชั้นเมือกใสมาห่อหุ้มรอบ ๆ เซลล์หนามากขึ้น ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่เซลล์มีการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีพอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม นอกจากนั้นยังพบลักษณะของเซลล์สาหร่ายมีปริมาณสารสีเขียวภายในเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุม) ดังแสดงในรูปที่ 4.10



(A) Control (B) 0.1 M NaCl (C) 0.2 M NaCl (D) 0.3 M NaCl

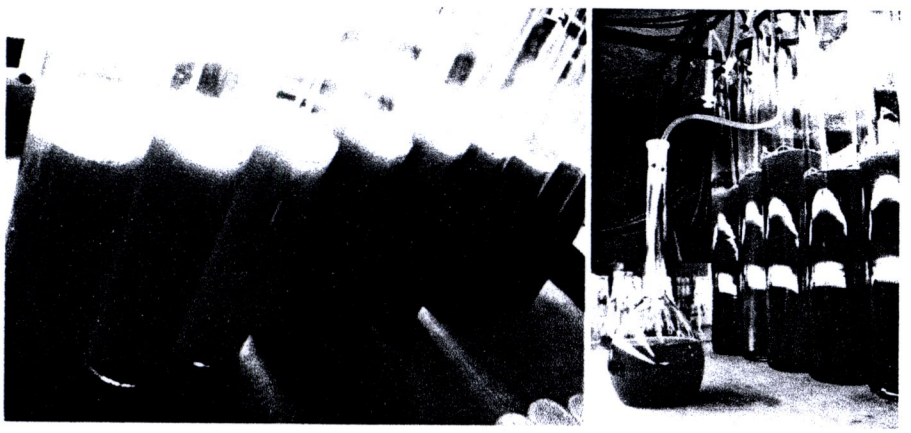
รูปที่ 4.10 สรีระวิทยาของเซลล์สาหร่าย *S. obliquus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ต่าง ๆ (แถวบน) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน, (แถวล่าง) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

จากผลการทดลองข้างต้นจะเป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต กล่าวคือ ในอาหารเพาะเลี้ยงจะมีการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์สาหร่ายมีปริมาณน้อยและอาจจะยังไม่แข็งแรง นอกจากนี้สายพันธุ์สาหร่ายที่คัดแยกได้และนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นสาหร่ายน้ำจืด เมื่อมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถเร่งการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงปรับวิธีการเพาะเลี้ยงใหม่ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 15% เพื่อเร่งการเจริญของเซลล์เพื่อผลิตชีวมวลให้ได้ปริมาณสูงก่อน โดยทำการเพาะเลี้ยงจนสาหร่ายเจริญเข้าสู่ช่วงแรกของระยะพักตัว (Early stationary phase) จากนั้นจึงทำการชักนำให้เซลล์สาหร่ายเกิดการสะสมน้ำมันขึ้นในเซลล์โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ระดับคือ 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงและติดตามการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยมีลักษณะการเจริญเติบโตดังแสดงในรูปที่ 4.11 โดยจะเก็บเกี่ยวเซลล์ทุก ๆ 5 วัน เป็นระยะเวลา 20 วัน เพื่อนำมาศึกษาศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการสะสมน้ำมันในเซลล์สาหร่าย



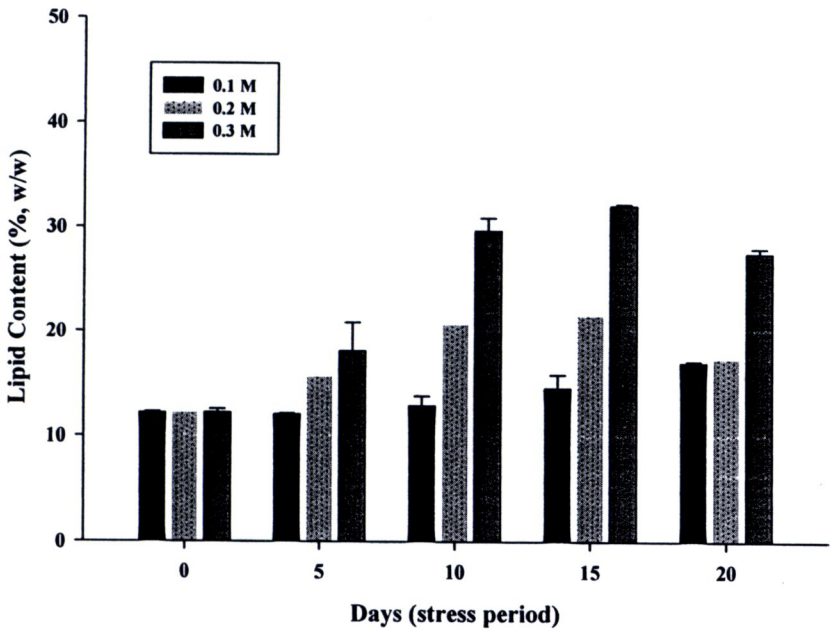
รูปที่ 4.11 การเจริญของสาหร่าย *S. obliquus* ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อสาหร่ายเจริญเข้าสู่ระยะ Early stationary phase ซึ่งมีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 15%

ภายหลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในอาหารแล้ว 10 วัน สาหร่ายเริ่มมีสีเขียวแกมเหลืองในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 ในขณะที่สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.1 และ 0.2 โมลาร์ สาหร่ายยังคงมีสีเขียวเข้มปกติแต่จะมีสีเขียวแกมเหลืองชัดมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากสาหร่ายเริ่มทนต่อสภาพแวดล้อมดังกล่าวไม่ได้และตายไปในที่สุด



รูปที่ 4.12 ลักษณะของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. obliquus* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ NaCl และมีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 15%
(ซ้าย) เซลล์จะเริ่มมีสีเขียวแกมเหลืองเมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 M เป็นเวลา 10 วัน
(ขวา) การเก็บเซลล์สาหร่ายเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

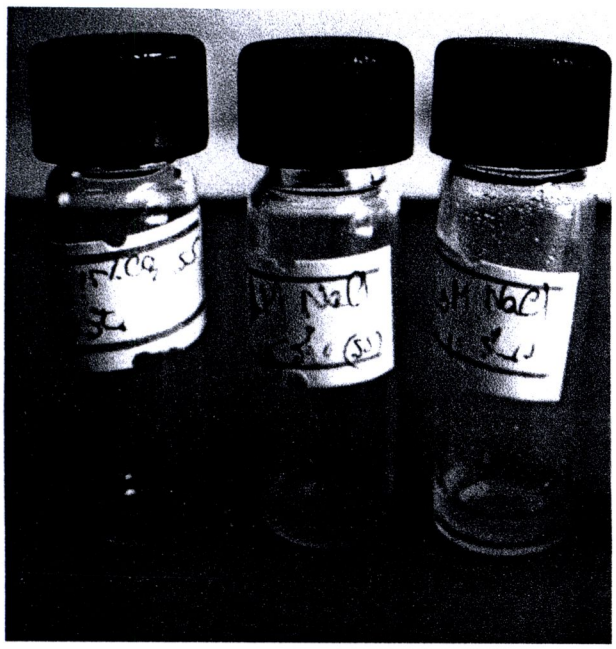
เมื่อทำการศึกษาปริมาณน้ำมันที่มีสะสมไว้ภายในเซลล์ของสาหร่าย โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมีโดยใช้เครื่องซอกเล็ต (Soxhlet extraction unit) พบว่าความเค็มที่อยู่ในรูปของโซเดียมคลอไรด์สามารถกระตุ้นให้สาหร่าย *S. obliquus* มีการสร้างน้ำมันสะสมไว้ในปริมาณที่สูงขึ้นได้ในทุกระดับความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันจากสาหร่ายที่ไม่ได้มีการเติมโซเดียมคลอไรด์หรือในสภาวะปกติ (วันที่ 0) ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงที่สุดโดยสามารถสกัดได้ 32.14% (โดยน้ำหนักแห้ง) หลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ไปแล้ว 15 วัน และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึงวันที่ 20 พบว่ามีปริมาณน้ำมันลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเริ่มตายและลดจำนวนเซลล์ลง ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีปริมาณน้ำมันสะสม 21.6% หลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ไปแล้ว 15 วัน และที่ระดับความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0.1 โมลาร์ มีปริมาณน้ำมันสะสม 17.04% หลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ไปแล้ว 20 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีปริมาณน้ำมันสะสมเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องน่าจะเนื่องมาจากสาหร่ายยังสามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยจะสังเกตเห็นว่าสาหร่ายยังมีสีเขียวอยู่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สอดคล้องกับรายงานของ Teshima et al. (1983) ที่ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella sacharophila* โดยด้วยน้ำทะเลที่เจือจางในระดับ 30% (หรือมีความเข้มข้นของเกลือประมาณ 0.15 โมลาร์) พบว่าสามารถเร่งการสะสมน้ำมันในเซลล์ได้ 12.9%



รูปที่ 4.13 อิทธิพลของความเค็มต่อการสะสมปริมาณน้ำมันในสาหร่าย *S. obliquus* เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 วัน

4.7 การผลิตไบโอดีเซลจากเซลล์สาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการ

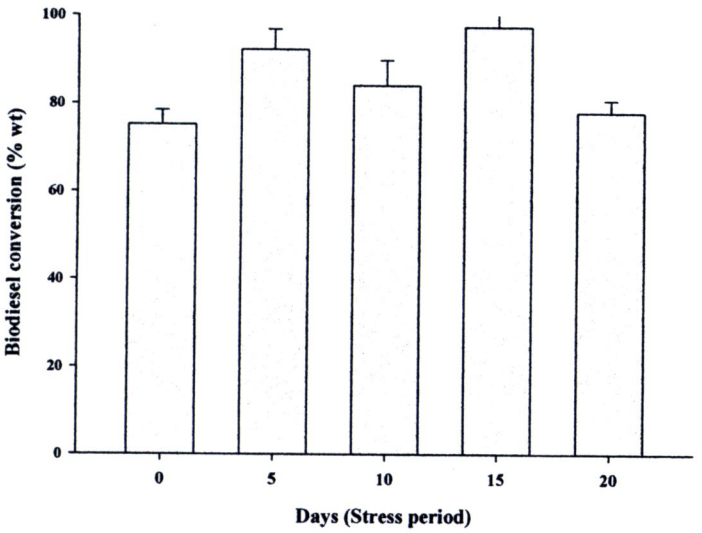
สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ใช้วิธีการผลิตไบโอดีเซลแบบ *In-situ* acidic transesterification จากเซลล์เปียกของสาหร่าย (Wet algal biomass) ซึ่งได้ดัดแปลงจากวิธีของ Liu et al. (2007) ทั้งนี้เพื่อเป็นลดขั้นตอนต่าง ๆ ในการเตรียมวัตถุดิบ เช่น ขั้นตอนการทำแห้งของเซลล์สาหร่าย และขั้นตอนการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์สาหร่าย โดยใช้เซลล์สาหร่ายที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.6 ที่ชักนำการสะสมน้ำมันด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ลักษณะของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้นั้นจะมีสีส้มแดงและมีลักษณะเป็นของเหลวข้นคล้ายน้ำมันพืช ดังแสดงในรูปที่ 4.14



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 4.14 ลักษณะของไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากเซลล์เปียกของสาหร่าย *S. obliquus* โดยใช้วิธี *In-situ* acidic transesterification

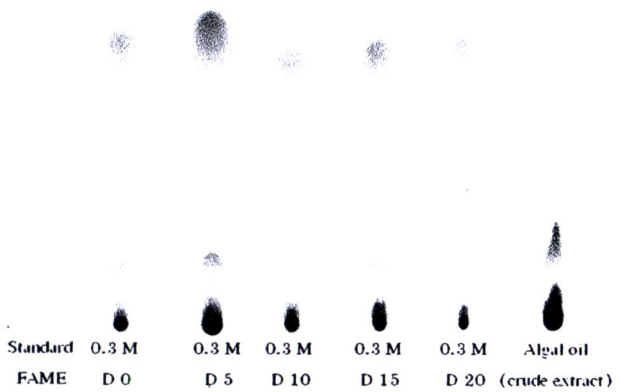
การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้วิธี *In-situ* acidic transesterification จากชีวมวลสาหร่ายในทุก ๆ 5 วัน หลังจากเติมเกลือความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ของไบโอดีเซลเมื่อคำนวณตามวิธีของ Chang et al. (2005) พบว่ามีค่าระหว่าง 75.19% - 97.42% ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์ผลได้ที่แตกต่างกันอาจจะมีผลมาจากลักษณะของวัตถุดิบ หรือชีวมวลเริ่มต้นที่แตกต่างกัน อาทิเช่น ปริมาณน้ำหนักของชีวมวล ปริมาณความชื้น หรือปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานผลการวิจัยของ Michael et al. (2009) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้วิธี Direct transesterification จากเซลล์สาหร่ายทะเล *Schizochytrium limacinum* พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าเท่ากับ 66.97% (โดยน้ำหนัก) ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใช้สาหร่ายทะเล ซึ่งมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้สาหร่ายน้ำจืดที่มีการชักนำด้วยเกลือเพื่อให้เกิดการสะสมน้ำมัน ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงไปจนถึงระยะเวลาที่เหมาะสม (ในที่นี้คือ 15 วัน) เซลล์อาจจะเริ่มเสียสภาพและเอื้อต่อการไหลออกของน้ำมันเมื่อทำการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์สาหร่ายโดยใช้สารเคมีและใช้ความร้อนสูงเพื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้สมบูรณ์กว่า จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์ผลได้ของไบโอดีเซลที่สูงกว่า



รูปที่ 4.15 ไบโอดีเซลผลได้ที่ผลิตได้ โดยใช้วิธี *In-situ* acidic transesterification จากสาหร่าย *S. obliquus* ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์

4.8 การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันไบโอดีเซล

นำไบโอดีเซลที่ผลิตได้มาวิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันเบื้องต้นโดยนำมาทดสอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) แล้วทำการตรวจสอบโครมาโตแกรมภายใต้ไอของเกล็ดไอโอดีน เพื่อให้แน่ใจว่าเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์อย่างสมบูรณ์แล้ว เพราะถ้าหากว่าน้ำมันที่ได้ยังไม่ใช่เมทิลเอสเทอร์จะทำให้คอลัมน์ของเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (GC) เสียหายได้ โดยทำการเปรียบเทียบกับลักษณะของแถบโครมาโตแกรมของสารเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้ในทุกสภาวะเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ได้สมบูรณ์ ในขณะที่น้ำมันสาหร่ายที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Soxhlet extraction และยังไม่ผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์จะไม่พบแถบโครมาโตแกรมของเมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.16

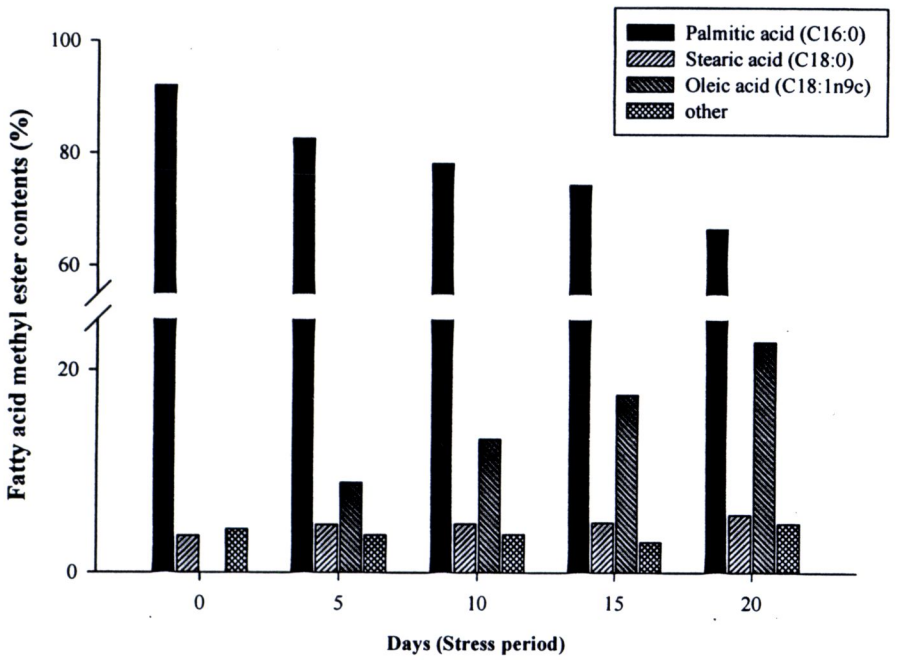


รูปที่ 4.16 การทดสอบคุณภาพของไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์, FAME) ที่ผลิตได้โดยวิธี *In-situ* acidic transesterification จากสาหร่าย *S. obliquus* หลังจากเติม NaCl ที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์

การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันชนิดต่าง ๆที่เป็นเมทิลเอสเทอร์ (Fatty acid methyl ester, FAME) ในน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้นั้น ทำได้โดยการคำนวณจากความสูงและพื้นที่ใต้กราฟของแถบโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟี (ภาคผนวก ง) เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐาน พบว่าไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากสาหร่าย *S. obliquus* มีกรดไขมันชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะกรดไขมันชนิดอิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก เช่นเดียวกับน้ำมันที่ได้จากกลุ่มพืชน้ำมันต่าง ๆ นอกจากนั้นยังพบว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในปริมาณหนึ่งด้วย

ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากสาหร่าย *S. obliquus* มีกรดไขมันที่อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ (FAME) เป็นองค์ประกอบหลัก ๆ 3 ชนิด คือ กรดปาล์มมิติค (Palmitic acid) กรดสเตียริก (Stearic acid) และกรดโอเลอิก (Oleic acid) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากการทดลองเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปแล้วเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน พบว่ากรดปาล์มมิติคมีปริมาณลดลงแต่กรดโอเลอิกมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับโดยจะมีปริมาณกรดปาล์มมิติคเท่ากับ 92.08%, 82.66%, 78.21%, 74.45% และ 66.62% ตามลำดับ ปริมาณกรดสเตียริกเท่ากับ 3.63%, 4.74%, 4.81%, 4.93% และ 5.72% ตามลำดับ ปริมาณกรดโอเลอิกเท่ากับ 0%, 8.90%, 13.22%, 17.60% และ 22.80% ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีปริมาณกรดไขมันชนิดอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 4.29%, 3.70%, 3.76%, 3.02% และ 4.86% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.17

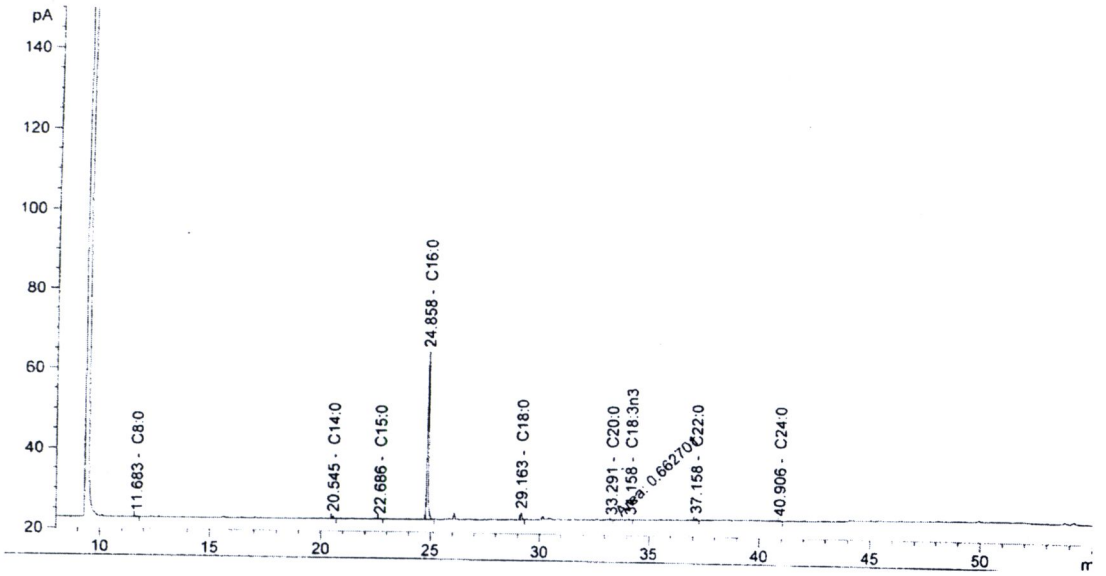


รูปที่ 4.17 ปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของไบโอดีเซลที่ผลิตได้โดยวิธี *In-situ* acidic transesterification จากสาหร่าย *S. obliquus*

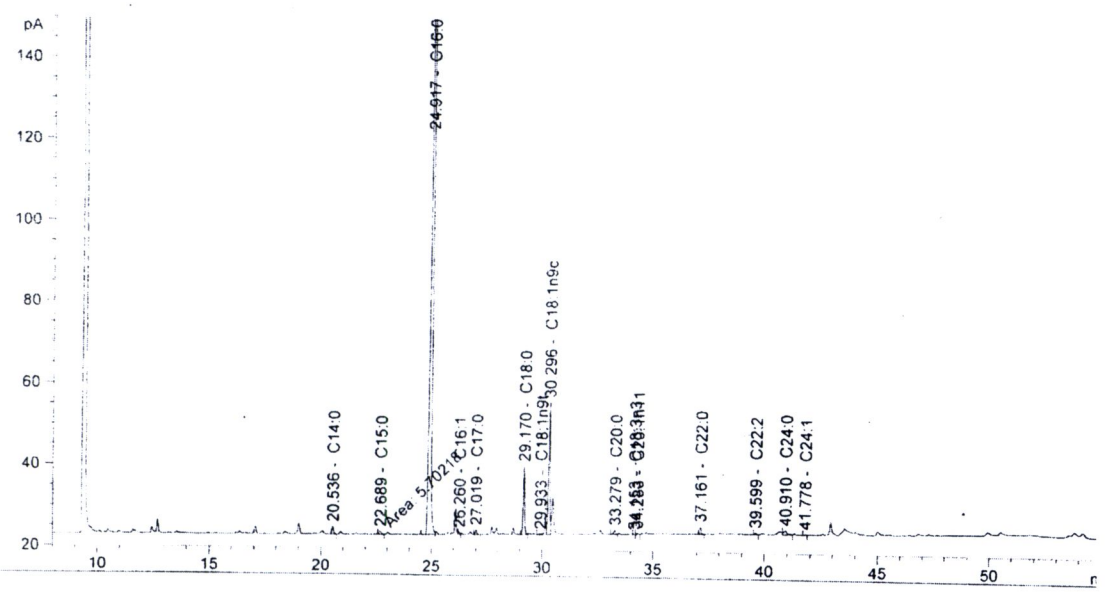
ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบของกรดไขมันชนิดเมทิลเอสเทอร์ (FAME) ในน้ำมันไบโอดีเซล ที่ผลิตได้จากเซลล์สาหร่าย *S. obliquus* เมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 M

ชนิดของกรดไขมันในเมทิลเอสเทอร์		ปริมาณ (% พื้นที่ใต้กราฟ)				
		0 วัน	5 วัน	10 วัน	15 วัน	20 วัน
C4:0	Butyric acid	-	-	-	-	-
C6:0	Caproic acid	-	-	-	-	0.80
C8:0	Caprylic acid	0.51	-	-	-	-
C10:0	Capric acid	-	-	-	-	-
C12:0	Lauric acid	-	-	-	-	-
C14:0	Myristic acid	1.42	0.55	0.53	0.63	0.50
C15:0	Pentadecanoic acid	0.29	0.35	0.32	0.43	0.28
C16:0	Palmitic acid	92.08	82.66	78.21	74.45	66.62
C16:1n7	Palmitoleic acid	-	0.22	0.28	0.10	0.34
C17:0	Heptadecanoic	-	0.37	0.41	0.35	0.40
C18:0	Stearic acid	3.63	4.74	4.81	4.93	5.72
C18:1n9t	Trans-9-Elaidic acid	-	0.13	-	-	-
C18:1n9c	Cis-9-Oleic acid	-	8.90	13.22	17.60	22.80
C18:2n6	Cis-9, 12-Linoleic acid	-	-	0.44	0.37	0.43
C20:0	Arachidic acid	0.33	0.42	0.41	0.38	0.64
C18:3n6	Gamma- Linoleic acid	-	-	-	-	-
C18:3n3	Alpha- Linoleic acid	0.16	0.02	0.11	0.01	0.18
C20:1n11	Cis-11-Eicosenoic acid	-	0.07	0.15	0.04	0.21
C22:0	Behenic acid	1.22	0.59	0.59	0.34	0.65
C22:2	Cis-13, 16-Docosadienoic acid	-	0.15	0.21	0.17	-
C20:5n3	Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid (EPA)	-	-	-	-	-
C24:0	Lignoceric acid	0.36	0.74	0.31	0.20	0.43
C24:1n9	Nervonic acid	-	0.10	-	-	-
C22:6n3	4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic acid (DHA)	-	-	-	-	-
	รวม	100	100	100	100	100

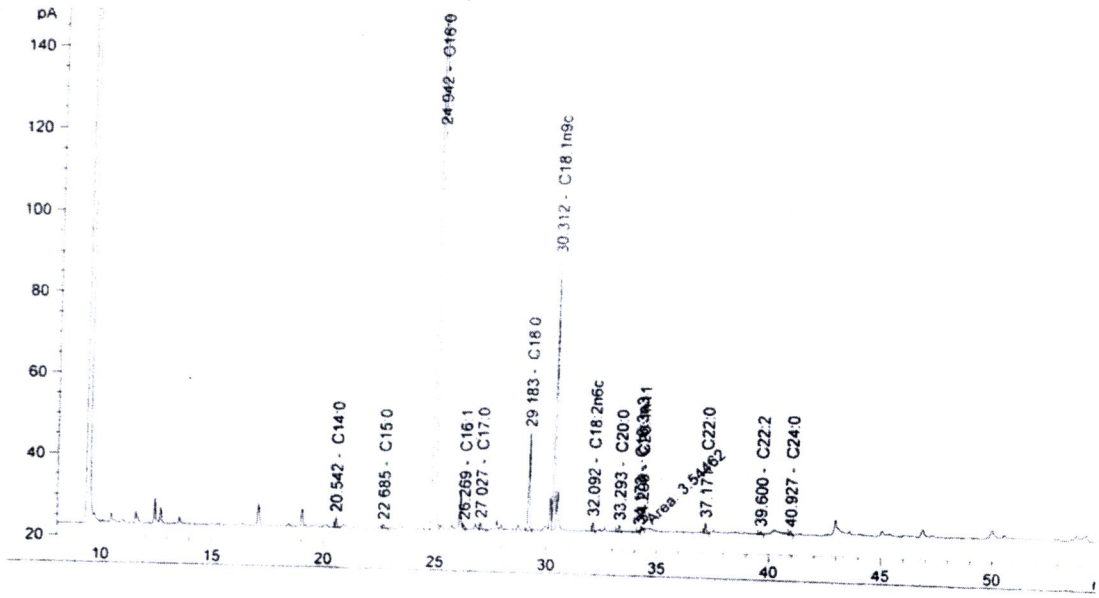
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) หรือไบโอดีเซลที่ผลิตได้นั้นได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ง ลักษณะของโครมาโตแกรมของไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีลักษณะดังแสดงในรูปด้านล่างนี้



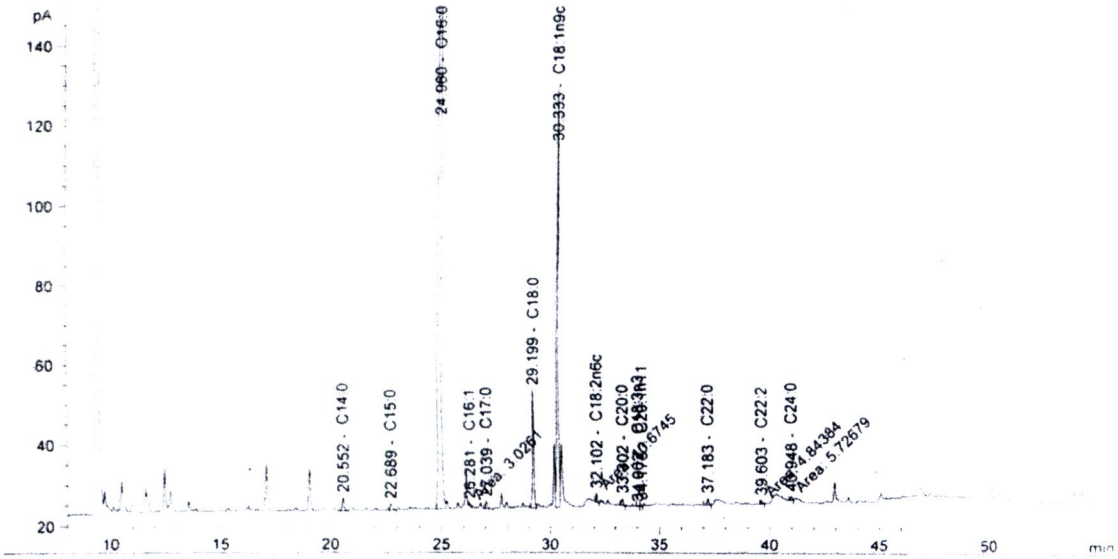
รูปที่ 4.18 โครมาโตแกรมของน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 15% และเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 M แล้วที่เวลา 0 วัน



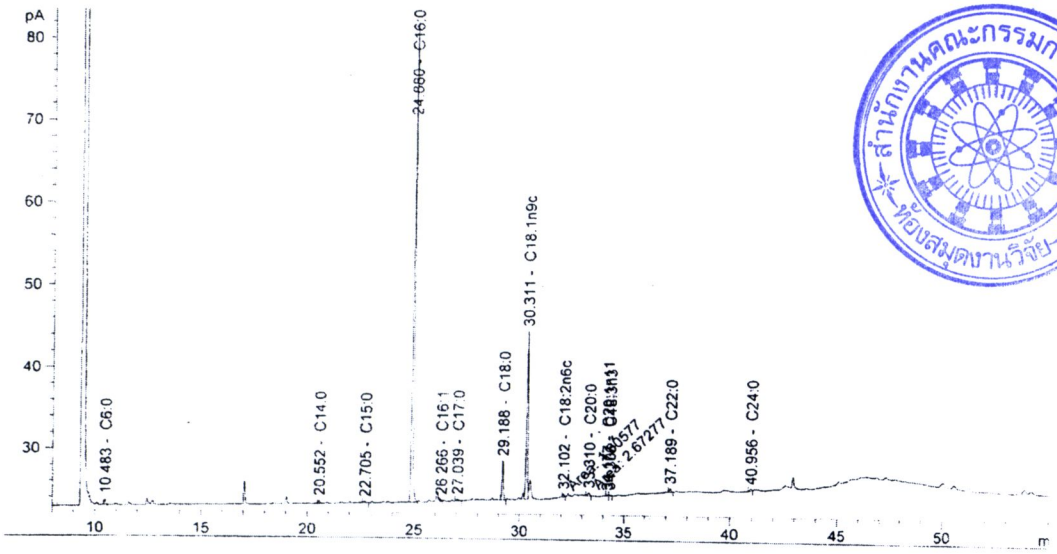
รูปที่ 4.19 โครมาโตแกรมของน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 15% และเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 M แล้วที่เวลา 5 วัน



รูปที่ 4.20 โครมาโตแกรมของน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 15% และเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 M แล้วที่เวลา 10 วัน



รูปที่ 4.21 *โครมาโตแกรมของน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ S. obliquus ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 15% และเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 M แล้วที่เวลา 15 วัน*



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรมของน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายสายพันธุ์ *S. obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการให้อากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 15% และเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเติมเกลือที่มีความเข้มข้น 0.3 M แล้วที่เวลา 20 วัน

จากข้อมูลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากสาหร่าย *S. obliquus* เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับน้ำมันที่ได้จากพืชน้ำมันชนิดต่าง ๆ ที่เคยมีรายงานไว้แล้วพบว่าสาหร่ายที่คัดแยกได้มีกรดปาล์มมิติคสูงกว่าในน้ำมันปาล์มถึง 41.6 เปอร์เซ็นต์ ดังข้อมูลในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันระหว่างสาหร่าย *S. obliquus* กับพืชน้ำมันชนิดต่าง ๆ

กรดไขมัน		ปริมาณ (% โดยน้ำหนัก)			
		ปาล์ม[a]	ถั่วเหลือง[a]	สบู่ดำ[b]	*S. obliquus*[c]
C16:0	Palmitic acid	43.50	10.30	15.38	74.45
C18:0	Stearic acid	4.30	3.80	6.24	4.93
C18:1	Oleic acid	36.60	22.80	40.23	17.60

[a] วิภาวรรณ ศรีสุข, (2547)

[b] สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน (2550)

[c] *S. obliquus* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 15 วัน

4.9 การวิเคราะห์คุณสมบัติของไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก

การทดสอบคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากสาหร่าย *S. obliquus* เช่น ความเป็นกรดด่าง (pH) ความหนาแน่น (Density) และค่าของกรด (Acid value) เสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation stability) และจุดวาบไฟ (Flash point) โดยเปรียบเทียบคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตจากแหล่งวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ ในที่นี้ได้เลือกพิจารณาจากสาหร่ายสายพันธุ์ *C. vulgaris* และน้ำมันปาล์ม ที่เคยมีรายงานผล

การทดลองไว้ก่อนหน้านี้พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของไบโอดีเซลและน้ำมันดีเซล พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่าดังแสดงในตารางที่ 4.7 ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.27 ค่าความหนาแน่นเท่ากับ 0.901 กรัมต่อมิลลิลิตร (ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส) ค่าของกรดเท่ากับ 0.538 ค่าความเสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเท่ากับ 7.5 ชั่วโมง โดยมาตรฐานของ ASTM ที่กำหนดว่าจะต้องไม่ต่ำกว่า 6 ชั่วโมง และจุดวาบไฟเท่ากับ 200 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในมาตรฐานของ ASTM ที่กำหนดคุณภาพของไบโอดีเซลไว้ไม่ต่ำกว่า 120 องศาเซลเซียส จากข้อมูลในตารางที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้โดยใช้วิธี *In-situ* acidic transesterification จากสาหร่าย *S. obliquus* มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากเซลล์สาหร่าย *S. obliquus*, *C. vulgaris* น้ำมันปาล์ม และมาตรฐานไบโอดีเซลของ American standard testing and material (ASTM)

คุณสมบัติ	ไบโอดีเซล				น้ำมันดีเซล[d]
	S. obliquus[a]	*C. vulgaris*[b]	น้ำมันปาล์ม[c]	ASTM	
ความหนาแน่น (Density) (g/ml) (15 °C)	0.901	0.862	0.887	0.86-0.9	0.81-0.87
ค่ากรด (Acid value) (mg KOH/g)	0.538	-	ต่ำกว่า 0.8	< 0.80	สูงสุด 0.5
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7	7.27	-	6-7.5	-
เสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (110 °C)	7.5	-	8-10	> 6	≤ 25
จุดวาบไฟ (Flash point)	200 °C	-		> 120 °C	>52 °C

a) ไบโอดีเซลที่ผลิตจากเซลล์สาหร่าย *S. obliquus*
b) พนิดา รัตนพลที (2552)
c) พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล (2525)
d) กรมธุรกิจพลังงาน (2550)

จากผลการทดลองดังกล่าว จึงน่าจะเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคตได้ เนื่องจากการผลิตไบโอดีเซลจากเซลล์เปียกของสาหร่ายโดยใช้วิธี *In-situ* acidic transesterification มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับมาตรฐานของไบโอดีเซลที่กำหนดไว้ นอกจากนี้แล้วการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีนี้ยังเป็นการลดขั้นตอนในการเตรียมวัตถุดิบ เช่น ขั้นตอนการทำแห้งของเซลล์สาหร่าย และขั้นตอนการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์สาหร่าย โดยจะต้องมีการพัฒนาระบบการผลิตชีวมวลจากสาหร่ายที่รวดเร็วและมีปริมาณที่มากพอสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ตลอดจนการพัฒนาขั้นตอนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์อย่างเป็นรูปธรรมมากยิ่งขึ้น

จากผลการทดลองดังกล่าว จึงน่าจะเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคตได้ เนื่องจากการผลิตไบโอดีเซลจากเซลล์เปียกของสาหร่ายโดยใช้วิธี *In-situ* acidic transesterification มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับมาตรฐานของไบโอดีเซลที่กำหนดไว้ นอกจากนี้แล้ว การผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีนี้ยังเป็นการลดขั้นตอนในการเตรียมวัตถุดิบ เช่น ขั้นตอนการทำแห้งของเซลล์สาหร่าย และขั้นตอนการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์สาหร่าย โดยจะต้องมีการพัฒนาระบบการผลิตชีวมวลจากสาหร่ายที่รวดเร็วและมีปริมาณที่มากพอสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ตลอดจนการพัฒนาขั้นตอนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์อย่างเป็นรูปธรรมมากยิ่งขึ้น