บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาปริมาณไขมันและชนิดกรดไขมันในสาหร่าย

3.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีรายงานว่าผลิตน้ำมันได้สูงมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดแยกสายพันธุ์ได้และที่มีอยู่แล้ว ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมงมาทำการเพาะเลี้ยงในขวดน้ำเกลือขนาด 1000 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อสาหร่าย 10 มิลลิลิตร ลงในขวดน้ำเกลือที่บรรจุอาหารโดยไซยาโนแบคทีเรียเพาะเลี้ยงในสูตร BG-11 ส่วนสาหร่ายสีเขียวใช้สูตร chlorella medium ส่วนไดอะตอมใช้สูตร Conway medium โดยให้อากาศต่อเนื่องตลอดเวลา เพาะเลี้ยงที่ห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส วางไว้บนชั้นที่มีการติดหลอดไฟฟลูออเรซเซนต์ที่เปิดอยู่ตลอดเวลา เลี้ยงไว้เป็นระยะเวลานาน 7 วัน เนื่องจากเป็นช่วงระยะเวลาที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด จากนั้นนำสาหร่ายตั้งต้นทุกชนิดที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการมาเพาะเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 10 ลิตรโดยใช้สาหร่ายตั้งต้น 1000 มิลลิลิตรต่ออาหาร 9 ลิตรซึ่งในการเลี้ยงนี้จะเลี้ยงในสภาวะปกติที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิแต่จะให้แสงตลอด 24 ชั่วโมงและจะมีการให้อากาศตลอดเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนและสัมผัสกันอย่างทั่วถึงระหว่างสาหร่าย อาหาร และแสง และทำการปิดปากโหลด้วยพลาสติกใส ทำการเลี้ยงเป็นเวลานาน 7 วัน เก็บเซลล์สาหร่ายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันและกรดไขมัน

3.1.2 การเก็บรวบรวมสาหร่ายขนาดใหญ่

สาหร่าย *Ulva rigida* และ *Ulva intestinalis* ได้รับมาจากสถานีประมงทะเลชายฝั่งจังหวัดตราดเดือนกุมภาพันธ์ 2555, สาหร่าย *Cladophora* sp.และ *Caulerpa* sp. ได้ทำการเก็บรวมจากเดือนพฤษภาคม 2555 และสาหร่าย *Acanthophora* sp., *Padina* sp. และ *Sargassum* sp. ได้ทำการเก็บรวมจากเดือนมีนาคม 2555 จากนั้นนำสาหร่ายทั้งหมดเข้า เครื่องอบ (Hot air oven) อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนสาหร่ายแห้ง แล้วนำมาวิเคราะห์ไขมันและกรดไขมันต่อไป

จากนั้นคัดเลือกชนิดสาหร่ายที่ให้ไขมันได้สูง สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณมากได้ง่ายในสูตรอาหารราคาถูก มาทำการผันแปรสภาวะในการเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่ให้ไขมันและผลผลิตได้สูง โดยผันแปรปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเคมี

3.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Determination of lipid content)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทำได้โดยการสกัดไขมันจากตัวอย่างสาหร่าย แล้วเปลี่ยนรูปกรดไขมันนั้นให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ methyl ester (derivatization) ด้วยกระบวนการ tranmethyllation จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟีแบบคาพิลลารี (capillary gas chromatography; GC-14B, Shimadzu, Japan) ร่วมกับการบันทึกข้อมูลด้วยเครื่องบันทึกผล integreter (C-R6A Chromatopac, Shimadzu) ประกอบกับบริเวณฉีดที่มี split injector และใช้ระบบตรวจแบบ flam ionization detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิดคาพิลลารี่ที่ทำ

ด้วย fused silica megabore column ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.540 มิลลิเมตร ทำการเคลือบภายในด้วยฟิมล์หนา 1 ไมโครเมตร ที่ประกอบด้วยสาร cyanopropyl 25%, phenyl 25%, methylsiloxane 50% อุณหภูมิคอลัมน์ที่ใช้งานเท่ากับ 210 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของ Injector และ detector ที่ใช้เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดคือ 1 ไมโครลิตร และอัตราการแบ่งตัวอย่าง (Split rate) เท่ากับ 100:1 ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซพา (carrier gas) และปรับอัตราไหลของก๊าซเท่ากับ 41 มิลลิลิตรต่อนาที

3.2 การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมัน : การหาสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ไขมันสูง

ทำการเลือกสาหร่ายชนิดที่มีไขมันสูงและพิจารณาการเพาะเลี้ยงว่าสามารถทำได้ง่ายและมีความเป็นไปได้ในการนำไปเพาะเลี้ยงในระดับมหภาคเพื่อเป็นวัตถุดิบผลิตน้ำมันได้เพียงพอ โดยนำสาหร่ายที่ให้ไขมันสูงมาผันแปรสภาวะในการเลี้ยง เพื่อหาสภาวะที่ให้ไขมันสูงที่สุดโดยทำการผันแปรความเข้มแสง ระยะเวลารับแสง ความเค็ม ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารสูตร Chlorella medium เลี้ยงสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรียด้วยอาหารสูตร BG-11 และเลี้ยงไดอะตอมในอาหาร Conway medium ในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นทำการผันแปรปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเข้มแสง (Lux) Light : Dark (ชม.) ความเค็ม (ppt) ปริมาณไนโตรเจน (%) ปริมาณฟอสฟอรัส (%) ปริมาณเหล็ก (%) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจนเข้าสู่ระยะปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ เก็บผลผลิตสาหร่าย วิเคราะห์ปริมาณไขมันที่ได้ในการเลี้ยงแต่ละสภาวะ โดยแต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 4 ซ้ำ

3.3 การเพาะเลี้ยงระดับมหมวล

นำสาหร่ายที่ให้ไขมันสูงสุด มาเพาะเลี้ยงระดับมหมวลในถังกลางแจ้งความจุ 500 ลิตร และบ่อกลางแจ้งขนาดความจุ 1 ตัน โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้ไขมันสูงสุด (จากข้อ 2) ใช้สารเคมีสูตรการค้า ทำการวิเคราะห์ไขมันและผลผลิตที่ได้ เพื่อหาวิธีในการเพาะเลี้ยงแบบมหมวลที่ใช้ต้นทุนต่ำที่สุด และให้ไขมันสูงที่สุด

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบปริมาณไขมันของสาหร่ายที่เลี้ยงในแต่ละสภาวะ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป สำหรับคอมพิวเตอร์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %