รายงานการวิจัย

ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันได้สูง

Optimal Factor for Growth of *Botryococcus braunii* to Produce High Yield Lipid

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

สัลวา ตอปี
สุธินี หีมยิ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
พ.ศ. 2559

ชื่องานวิจัย ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันได้สูง

ผู้วิจัย นางสาวสัลวา ตอปี และนางสาวสุธินี หีมยิ

คณะ/สถาบัน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ปี 2559

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการผลิตพลังงานทดแทนน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายได้รับความสนใจและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากสาหร่ายสามารถเจริญได้รวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยเมื่อเทียบกับการเพาะปลูกปาล์มหรือพืชน้ำมันอื่นๆ นอกจากนี้น้ำมันในสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดแยกสาหร่าย *B. braunii* และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่สามารถผลิตน้ำมันได้สูง โดยเก็บตัวอย่างน้ำ 5 แหล่ง ได้แก่ ทะเลสาบตอนล่าง ทะเลสาบตอนกลาง อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และอ่างเก็บน้ำคลองหลา ผลการวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางกายภาพพบว่า ค่า pH ของน้ำบริเวณทะเลสาบสงขลามีค่า pH สูงกว่าน้ำบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา และมีความเค็มเท่ากับ 1.93 ± 0.12 และ 1.70 ± 0.27 ppm (ทะเลสาบสงขลาตอนล่างและตอนกลางตามลำดับ) ส่วนอุณหภูมิและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าตัวอย่างน้ำจากบริเวณทะเลสาบมีอุณหภูมิและค่าไนโตรเจนทั้งหมดต่ำกว่าบริเวณอ่างเก็บน้ำ นอกจากนี้ค่า BOD_5 และ DO พบว่าตัวอย่างน้ำที่เก็บจากทะเลสาบและอ่างเก็บน้ำมีค่าใกล้เคียงกัน จากนั้นนำมาแยกสาหร่าย *B. braunii* โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 พบว่า สามารถแยกสาหร่าย *B. braunii* ได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลท แล้วนำมาคัดเลือกสาหร่ายที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดี พบว่า ไอโซเลท L2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.708 ± 0.067 กรัม/ลิตร (ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 0.035 ± 0.007 กรัม/ลิตร) ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* โดยศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม พบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 4 กรัมต่อลิตร เซลล์สาหร่ายสามารถสะสมน้ำมันได้ปริมาณสูง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีลด์ (Yield) เท่ากับ 11.91 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลของอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม พบว่า อัตราส่วน C/N เท่ากับ 10 มีปริมาณน้ำมันสูงสุด โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีลด์เท่ากับ 14.28 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันจากสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 ซึ่งผ่านการคัดเลือก โดยวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) ด้วย Gas Chromatography (GC) พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตกรดไขมัน (Fatty Acid) ซึ่งมีปริมาณ Palmitic Acid (C16:0) สูงสุด คือ 37.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Oleic Acid (C18:1) เท่ากับ 24.65 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 มีศักยภาพในการประยุกต์ต่อยอดเพื่อใช้ผลิตน้ำมันไบโอดีเซล

ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: *Botryococcus braunii*, ทะเลสาบสงขลา , อ่างเก็บน้ำ , น้ำมันจากสาหร่าย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เลข Bib# 140064
วันที่ 27 ส.ค. 2560
เลขเรียกหนังสือ ว 579.8 ส 117 ป

Research Title	Optimal Factor for Growth of *Botryococcus braunii* to Produce High Yield Lipid
Researcher	Mrs. Salwa Torpee and Mrs. Sutinee himyi
Faculty/Institute	Science and Technology, Rhajabat Songkhla University
Year	2016

Abstract

Microalgae is recently one of the promising feedstocks for production of biodiesel and develop a renewable energy resource. Because the algae are rapid of growth and lesser of area than palm oil plant. Furthermore, almost of lipid from algae are triglyceride. Thus, this research is focused on the isolation of *Botryococcus braunii* and optimum factors for good growth of algae to produce high yeild lipid. Total the samples were collected from 5 areas, including the middle and the lower part of Songkhla lagoon, Rhajabat University pond, Prince of Songkla University pond and Khlongla pond. It was founds that, the lagoons had higher of pH value than the ponds and 1.93 ± 0.12 and 1.70 ± 0.27 ppm for salinity (the lower and middle part of Songkhla lagoon respectively). In addition, the ponds had lower of temperature and total nitrogen than the lagoons. Furthermore, BOD_5 and DO value contained similar between the lagoons and ponds. Then, *B. braunii* was isolated from these samples on BG-11 medium. The results showed that from total of 18 isolates of *B. braunii*, the L2 isolate was selected strain for good growth that showed 0.708 ± 0.067 and 0.035 ± 0.007 g/L for cell dry weight and lipid accumulation respectively. And selected strain was further analyzed for the concentration of carbon source and C/N ration, the optimum factors for good growth of algae. These results showed that, the highest growth was obtained from L2 strain at 4 g/L of glucose concentration (11.91 % of the percentage of yield) and C/N ratio was 10 (14.28% of the percentage of yield). The studied about the composition of lipid from *B. braunii* L2 strain by Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) with Gas Chromatography (GC), found that this strain could produce the highest of Fatty Acid as Palmitic Acid (C16:0) 37.12%, followed by

Oleic Acid (C18:1) 24.65 %. The results revealed that *B. braunii* L2 strain could be used as a promising strain for renewable energy production in the future.

Keywords: *Botryococcus braunii*, Songkla lagoon, Pond, Lipid from Algae.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ได้มอบทุนวิจัย งบประมาณประจำปี 2555 เป็นจำนวนเงิน 60,000 บาท ให้แก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์ รวมทั้งโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่กรุณาอนุเคราะห์ให้ใช้ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย เพื่ออำนวยความสะดวกให้ผู้วิจัยดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณนายสาบือรี หะยีเด๊ะเราะ นายอิลฮัม แมเลาะปากา นางสาวฮายัร หลงกอหราบและนางสาวฮาบีบะห์ ดาแลหมัน นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ได้ช่วยงานวิจัยบางส่วนของผู้วิจัย

สัลวา ตอปี
สุธินี หีมยิ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สิงหาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(ก)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(ค)
กิตติกรรมประกาศ	(จ)
สารบัญ	(ฉ)
สารบัญตาราง	(ซ)
สารบัญภาพประกอบ	(ฌ)
บทที่ 1 บทนำ	**1**
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ในการวิจัย	1
สมมติฐาน	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตการวิจัย	2
นิยามศัพท์เฉพาะ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**3**
แหล่งน้ำธรรมชาติ	3
พลังงานทดแทน	5
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**19**
อุปกรณ์และเครื่องมือ	19
สารเคมี	19
การดำเนินการวิจัย	20
- ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของแหล่งธรรมชาติ	20
- การแยกสาหร่าย *B. braunii* จากตัวอย่างน้ำ	20
- การคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* ที่มีการเจริญดี	20
- การทดสอบปัจจัยที่มีเหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii*	21
- การวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ	21
- วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย *B. braunii*	21
- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	22

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	**23**
ศึกษาสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำธรรมชาติ	23
การแยกสาหร่าย *B. braunii* จากตัวอย่างน้ำ	23
การคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* ที่มีการเจริญดี	25
ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันสาหร่าย *B. braunii*	26
- ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม	26
- อัตราส่วน C/N ที่เหมะสม	28
องค์ประกอบของน้ำมันจากสาหร่าย *B. braunii*	30
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	**31**
สรุปผลการทดลอง	31
ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	**32**
ภาคผนวก	**39**
ประวัติย่อผู้วิจัย	**43**
ประวัติย่อคณะผู้วิจัย	**45**

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด และเอมไซม์	11
2.2	ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii*	16
4.1	พารามิเตอร์ทางกายภาพบริเวณทะเลสาบสงขลาและอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา	24
4.2	จำนวนไอโซเลทของสาหร่าย *B. braunii* จากแหล่งน้ำธรรมชาติต่างๆ	25
4.3	เปอร์เซ็นต์ยีลด์ของสาหร่าย *B. braunii* ไอโวเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ	28
4.4	เปอร์เซ็นต์กรดไขมันจากน้ำมันที่สกัดได้จากน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2	30

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา	4
2.2	กระบวนการแตกสลายทางความร้อน	7
2.3	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์	8
2.4	กลไกการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์	9
2.5	ปฏิกิริยาการเกิดสบู่ (Saponification)	10
2.6	ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน	10
2.7	ผลปาล์มที่นำมาทำเป็นไบโอดีเซล	12
2.8	ผลสบู่ดำที่นำมาทำเป็นไบโอดีเซล	13
2.9	สาหร่าย *Botryococcus braunii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	14
4.1	สาหร่าย *Botryococcus braunii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	25
4.2	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากทะเลสาบและอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา	26
4.3	ปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากทะเลสาบและอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา	26
4.4	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ	27
4.5	ปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ	28
4.6	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วน C/N ต่างๆ	29
4.7	ปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วน C/N ต่างๆ	29

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

หลายประเทศกำลังพัฒนาการผลิตพลังงานทดแทน เนื่องจากพลังงานจากซากฟอสซิล (Fossil Fuel) เหลือประมาณ 1% ในขณะที่ความต้องการพลังงานเพิ่มสูงขึ้น (Zhou and Thomson, 2009; Chunfang *et al.*, 2010) จึงมีการค้นหาแหล่งพลังงานทดแทนเรียกว่า น้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งโดยทั่วไปมักจะใช้พืชน้ำมัน เช่น ปาล์ม แต่ต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกปริมาณมาก และต้องใช้ระยะเวลานานในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งทางเลือกอีกทางหนึ่งคือการใช้จุลินทรีย์แทนปาล์ม เช่น สาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยเมื่อเทียบกับการเพาะปลูกปาล์ม นอกจากนี้น้ำมันในสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งผลิตเป็นไบโอดีเซลและกลีเซอรอลได้เมื่อผ่านการทำ Transesterification (Chisti, 2007) สาหร่าย *Botryococcus braunii* สามารถสร้างน้ำมันในเซลล์ได้ในปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น และเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลในอนาคต จึงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* เพื่อให้สาหร่าย *B. braunii* มีการเจริญเติบโตที่ดี สามารถใช้ผลิตน้ำมันจากสาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซล ซึ่งมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการสะสมน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii* อย่างแพร่หลาย เช่น การศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสม พบว่าโพแทสเซียมฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* ซึ่งมีการเจริญเท่ากับ 0.058 และ 0.090 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และผลิตน้ำมันเท่ากับ 0.083 และ 0.100 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (Tran *et al.*, 2010) นอกจากนี้ Natalia และคณะ (2011) ศึกษาผลของความเค็มต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย *B. braunii* พบว่าเมื่อใช้ NaCl ความเข้มข้น 0.3 และ 0.7 M มีการยับยั้งการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* ใน 3 วันแรกของการทดลอง ส่งผลให้ปริมาณของกรด Polyenoic ลดลงจาก 68.34% เป็น 29.38% และ 12.80% ตามลำดับ ส่วนกรดไขมันอิ่มตัวสายยาว เพิ่มขึ้นจาก 0.53% เป็น 5.30% และ 14.13% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* เพื่อผลิตน้ำมันได้ในปริมาณสูงและนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

2. วัตถุประสงค์ในการวิจัย

2.1) เพื่อศึกษาสภาพแวดล้อมของสาหร่าย *B. braunii* ในแหล่งน้ำธรรมชาติ

2.2) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* เพื่อผลิตน้ำมันได้สูง

3. สมมติฐาน

3.1) สภาพแวดล้อมในอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลาและทะเลสาบสงขลาเหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii*

3.2) ปัจจัยการเจริญ เช่น แหล่งคาร์บอนและอัตราส่วน C/N มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* เพื่อผลิตน้ำมันในปริมาณสูงได้

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

นำความรู้และผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล

5. ขอบเขตการวิจัย

5.1) รูปแบบและวิธีการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยศึกษาสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำธรรมชาติ เก็บตัวอย่างสาหร่ายมาแยกในห้องปฏิบัติการ แล้วคัดเลือกสาหร่ายที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงและศึกษาปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมในการเจริญของสาหร่ายเพื่อผลิตน้ำมันให้ได้ในปริมาณสูง

5.2) พื้นที่และชนิดของสาหร่ายที่ศึกษา

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *B. braunii* ที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันได้สูง ซึ่งศึกษาสภาพแวดล้อมของสาหร่าย *B. braunii* ในแหล่งน้ำธรรมชาติ คือ อ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลาและทะเลสาบสงขลา ได้แก่ อ่างเก็บน้ำคลองหลา อำเภอคลองหอยโข่ง อ่างเก็บน้ำในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง และอ่างเก็บน้ำในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ ส่วนทะเลสาบ ได้แก่ ทะเลสาบตอนกลาง อำเภอสิงหนคร และทะเลสาบตอนล่าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา และนำมาแยกสาหร่าย *B. braunii* ในห้องปฏิบัติการ (ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ ชั้น 4 มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา) แล้วคัดเลือกสาหร่ายที่สามารถให้ปริมาณน้ำมันได้สูงเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมในการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* ที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันได้สูง

5.3) ตัวแปรและนิยามปฏิบัติการ

5.3.1) ตัวแปร

ตัวแปรต้น : สาหร่าย *B. braunii*

ตัวแปรตาม : อัตราการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii*

ตัวแปรควบคุม : ปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณแหล่งคาร์บอน และอัตราส่วน C/N ที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่าย

6. นิยามศัพท์เฉพาะ

แหล่งคาร์บอน หมายถึง แหล่งสารอาหารชนิดหนึ่งของสาหร่ายเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนยังมีผลต่อการสะสมน้ำมันของสาหร่ายภายในเซลล์

อัตราส่วน C/N หมายถึง อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญและการสะสมน้ำมันของสาหร่าย

น้ำมันในสาหร่าย หมายถึง น้ำมันภายในเซลล์สาหร่าย *B. braunii* เนื่องจากเมื่อสาหร่าย *B. braunii* อยู่ในสภาวะหนึ่งที่เหมาะสม สาหร่าย *B. braunii* สามารถผลิตน้ำมันภายในเซลล์ของมันได้ ซึ่งน้ำมันที่สาหร่าย *B. braunii* ผลิตได้นี้ส่วนใหญ่เป็นน้ำมันไตรกลีเซอไรด์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. **แหล่งน้ำธรรมชาติ** แหล่งน้ำตามธรรมชาติและที่จัดขึ้นเพื่อนำน้ำมาใช้ประโยชน์ สามารถจำแนกได้ 3 ประเภท ได้แก่

1.1) แหล่งน้ำผิวดิน เป็นแหล่งน้ำจืดที่มีความสำคัญมากที่สุด และมีปริมาณมากที่สุด ได้แก่ น้ำในแม่น้ำ ลำคลอง ห้วยหนอง คลอง บึง ทะเลสาบ ตลอดจนอ่างเก็บน้ำ

1.1.1) ทะเลสาบ เช่น ทะเลสาบสงขลา

ทะเลสาบสงขลามีสภาพทางนิเวศวิทยาที่หลากหลาย เนื่องจากเป็นที่ไหลรวมจากต้นน้ำลำคลอง เล็กๆ มากมายและยังมีทางออกสู่ทะเลอ่าวไทย ปริมาณและสภาพน้ำในทะเลสาบขึ้นอยู่กับน้ำจืดที่ไหลลงมาและน้ำเค็มจากทะเลหนุนเข้ามา ซึ่งในฤดูน้ำหลากประมาณเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคมจะมีน้ำจืดไหลลงสู่ทะเลสาบจำนวนมาก จึงไปผลักดันน้ำเค็มออกสู่อ่าวไทย ในช่วงนี้น้ำในทะเลสาบจะขุ่นและเป็นน้ำจืด แต่เมื่อถึงฤดูแล้งปริมาณน้ำจืดที่ไหลลงสู่ทะเลสาบจะมีน้อย น้ำเค็มจะไหลเข้ามาแทนที่ในช่วงนี้ น้ำในทะเลสาบจะกร่อย สามารถแบ่งทะเลสาบสงขลาออกได้เป็น 4 บริเวณใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

ก) ทะเลน้อย

เป็นส่วนของทะเลสาบตอนบนสุด อยู่ในอำเภอควนขนุน เขตจังหวัดพัทลุง มีพื้นที่ประมาณ 26.6 ตารางกิโลเมตร มีความลึกโดยเฉลี่ยไม่เกิน 1 เมตร แม้ว่าในบางปีได้รับอิทธิพลจากน้ำกร่อยในทะเลสาบสงขลาตอนบนโดยผ่านทางคลองนางเรียมในหน้าแล้ง แต่โดยเนื้อแท้แล้วเป็นทะเลสาบน้ำจืดที่มีพืชน้ำ และปลาน้ำจืดอาศัยอยู่หลากหลายชนิด (เสาวภา อังสุภานิช, 2555)

ข) ทะเลสาบสงขลาตอนบน

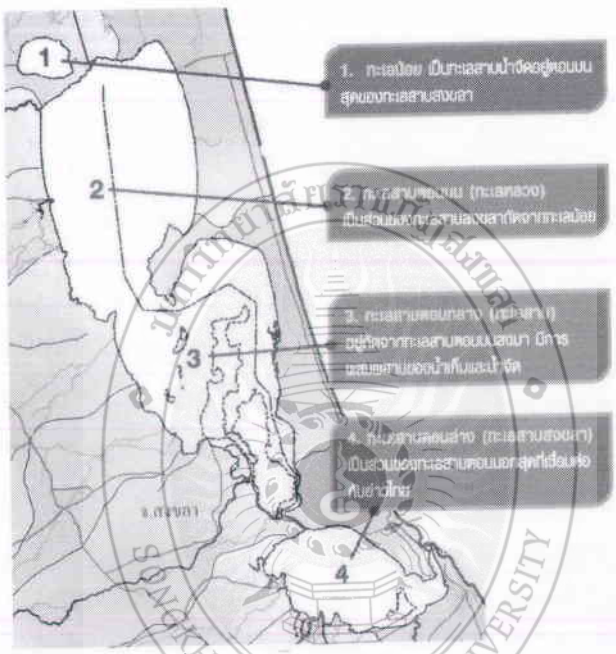
เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากทะเลสาบสงขลาตอนกลางขึ้นไปตั้งแต่บริเวณแหลมจองถนนถึงปากคลองนางเรียมซึ่งเป็นคลองเข้าสู่ทะเลน้อย ชายฝั่งตะวันตกขึ้นกับอำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง ส่วนชายฝั่งตะวันออกขึ้นกับอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ทะเลสาบส่วนนี้มีพื้นที่น้ำมากที่สุด ประมาณ 479.7 ตารางกิโลเมตร ความเค็มของน้ำต่ำมากอยู่ในช่วง 0-4 ส่วนในพัน มีความลึกเฉลี่ย 1.8 เมตร และเป็นน้ำจืดในฤดูฝนตกหนัก คนท้องถิ่นมักเรียกว่าทะเลหลวง (เสาวภา อังสุภานิช, 2555)

ค) ทะเลสาบสงขลาตอนกลาง

เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากทะเลสาบสงขลาตอนล่างเข้าไปข้างในโดยเชื่อมต่อทางคลองปากรอขึ้นไปถึงแหลมจองถนน (ฝั่งอำเภอเขาชัยสน) และเกาะใหญ่บริเวณแหลมยาง (ฝั่งอำเภอกระแสสินธุ์) พื้นที่ชายฝั่งตะวันตกส่วนใหญ่ขึ้นกับอำเภอปากพะยูนในเขตจังหวัดพัทลุง ส่วนพื้นที่ชายฝั่งตะวันออกส่วนใหญ่ขึ้นกับอำเภอสิงหนครและอำเภอสทิงพระในเขตจังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นที่ตั้งของพื้นที่เขตอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าคูขุดสทิงพระประชาชนทั่วไปรู้จักกันในนามของอุทยานนกน้ำ ทะเลสาบส่วนนี้มีพื้นที่น้ำประมาณ 351.4 ตารางกิโลเมตร มีพื้นที่เกาะโดยรวมประมาณ 106.5 ตารางกิโลเมตร มีความลึกเฉลี่ย 1.6 เมตร ความเค็มของน้ำอยู่ในช่วง 0-20 ส่วนในพัน และเป็นน้ำจืดในฤดูฝนตกหนัก (เสาวภา อังสุภานิช, 2555)

ง) ทะเลสาบสงขลาตอนล่างหรือตอนนอก

ตั้งอยู่ในเขตจังหวัดสงขลา เป็นตอนล่างสุดของทะเลสาบสงขลา มีร่องน้ำหรือปากทะเลสาบเปิดสู่ทะเลในอ่าวไทยตอนล่าง ส่วนทิศเหนือมีคลองปากรอเชื่อมติดต่อกับทะเลสาบสงขลาตอนล่าง จึงเป็นทะเลสาบน้ำกร่อยจนถึงน้ำเค็มขึ้นอยู่กับฤดูกาล น้ำมีความเค็มอยู่ในช่วง 0-34 ส่วนในพัน ความลึกโดยเฉลี่ย 1.5 เมตร มีพื้นที่น้ำประมาณ 182 ตารางกิโลเมตร มีพื้นที่เกาะ คือเกาะยอ ประมาณ 59 ตารางกิโลเมตร ริมฝั่งทะเลสาบสงขลาบางแห่งมีป่าชายเลนขึ้นประปราย เช่น ในคลองพะวง แต่นับวันมีพื้นที่ป่าลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากมีการปรับเปลี่ยนเป็นที่อยู่อาศัยและที่ประกอบอาชีพของมนุษย์ (เสาวภา อังสุภานิช, 2555)



ภาพที่ 2.1 ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา

(**ที่มา:** ปัทมาภรณ์ หมาดนุ้ย และศักดิ์อนันต์ ปลาทอง, 2552)

1.1.2) อ่างเก็บน้ำ

เป็นแหล่งน้ำผิวดินประเภทหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาบริเวณที่เคยขาดแคลนน้ำอุปโภคบริโภค และน้ำเพื่อใช้ในการเกษตร ซึ่งอ่างเก็บน้ำ คือ บริเวณที่ต่ำที่น้ำไหลจากร่องน้ำหรือลำน้ำตามธรรมชาติมารวมตัวกัน โดยสร้างเขื่อนปิดกั้นระหว่างหุบเขาหรือเนินเขาสูง จนเกิดเป็นแหล่งเก็บน้ำที่มีขนาดต่าง ๆ เรียกว่า เขื่อนเก็บกักน้ำ ส่วนใหญ่มีขนาดไม่สูงมาก มักก่อสร้างโดยใช้ดินบดอัดให้แน่นเป็นตัวเขื่อน จึงเรียกว่าเขื่อนดิน ซึ่งจะเก็บน้ำฝนที่ตกในฤดูฝนไหลมารวมกัน เก็บกักน้ำไว้ใช้ในฤดูแล้ง โดยส่งน้ำออกไปตามท่อส่งน้ำ ใช้สำหรับทำนา ปลูกผัก พืชไร่ เลี้ยงสัตว์ ใช้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์สัตว์น้ำเพื่อบริโภค และช่วยบรรเทาน้ำท่วมในฤดูฝน

1.2) แหล่งน้ำใต้ดิน ได้แก่ น้ำที่อยู่ในชั้นดินหรือหินของพื้นผิวโลก น้ำใต้ดินเกิดจากน้ำผิวดินซึมผ่านชั้นดินหรือหินที่น้ำซึมผ่านไม่ได้ ในเขตชนบทนิยมดื่มน้ำใต้ดิน เนื่องจากน้ำใต้ดินเป็นแหล่งน้ำที่สะอาด

1.3) แหล่งน้ำจากฟ้าหรือน้ำฝน ได้แก่ น้ำจืดที่เกิดจากการตกลงมาของฝน มีความสะอาดที่สุด เป็นแหล่งน้ำที่สำคัญที่มนุษย์ใช้เพื่อการอุปโภคบริโภค ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีประมาณ 800,000 ล้านลูกบาศก์เมตร โดยสามารถกักเก็บน้ำไว้ในอ่างเก็บน้ำได้ประมาณ 60,000 ล้านลูกบาศก์เมตร แต่ในปัจจุบันน้ำฝนในบางพื้นที่มีสารมลพิษปนเปื้อนจึงไม่ปลอดภัยสำหรับการอุปโภคบริโภค โดยเฉพาะตามแหล่งที่มีอุตสาหกรรมหนาแน่น

2. พลังงานทดแทน

พลังงานทดแทน (Alternative Energy) หมายถึง พลังงานที่นำมาใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิงและก๊าซธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมันดิบ น้ำมันปิโตรเลียม เป็นต้น สามารถแบ่งตามแหล่งที่ได้มาออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) พลังงานทดแทนจากแหล่งที่ใช้แล้วหมดไปเรียกว่า พลังงานสิ้นเปลือง (Nonrenewable Energy) ได้แก่ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ นิวเคลียร์ หินน้ำมัน และทรายน้ำมัน เป็นต้น

2) พลังงานที่ใช้แล้วสามารถหมุนเวียนมาใช้ได้อีกเรียกว่า พลังงานหมุนเวียน (Renewable Energy) ได้แก่ แสงอาทิตย์ลม ชีวมวล น้ำ และไฮโดรเจนเป็นต้น พลังงานทดแทนประเภทนี้เป็นพลังงานที่สะอาด ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่ในท้องถิ่น

2.1) พลังงานทดแทนในภาคขนส่ง (ทดแทนการใช้น้ำมัน)

2.1.1) เอทานอล (เชื้อเพลิงทดแทนเบนซิน)

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) หรือเกรนแอลกอฮอล์ (Grain Alcohol) หรือแอลกอฮอล์ เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ ไฮดรอกซิล (-OH) ต่ออยู่กับสายโซ่ของไฮโดรคาร์บอน มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH เอทานอลโดยทั่วไปสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ

ก) การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Synthesis) โดยใช้เอทิลีน (Ethylene) ที่เป็นผลิตผลพลอยได้จาก ปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ เอทานอลที่ผลิตโดยวิธีนี้ไม่สามารถนำมาบริโภคได้

ข) การหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ (Yeast Fermentation) โดยเชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนวัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อยและกากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และประเภทสุดท้ายคือ วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic Material) ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ฟางข้าว กากอ้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น ดังสมการ

$$(C_6H_{12}O_5)n + H_2O \longrightarrow n\,C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2n\,C_2H_5OH + 2n\,CO_2$$

Starch/Cellulose Glucose Ethanol Gas

ประโยชน์จากเอทานอลใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยนำเอทานอลกับน้ำมันเบนซินออกเทน 91 ในอัตราส่วนเอทานอล 1 ส่วน กับน้ำมันเบนซิล 9 ส่วน เป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนารถยนต์ให้

5.4) ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

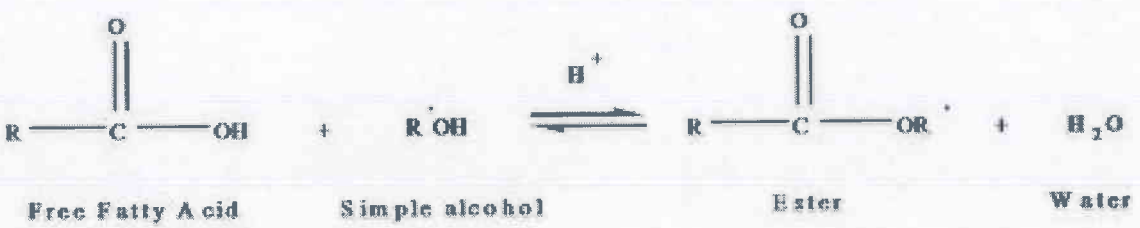
- ความชื้นและกรดไขมันอิสระ

สำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (NaOH , KOH, คาร์โบเนต เป็นต้น) กลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ที่ใช้จะต้องไม่มีน้ำเป็นส่วนผสมเพราะน้ำเป็นสาเหตุทำให้เกิดสบู่ขึ้นในระหว่างการทำปฏิกิริยาดังแสดงในภาพที่ 2.5 สบู่ที่เกิดขึ้นจะไปลดประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยาลง นอกจากนั้นยังส่งผลต่อคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลคือทำให้ค่าความหนืดสูงขึ้น ทำให้น้ำมันมีลักษณะเป็นเจล และยากต่อการแยกไบโอดีเซลออกจากกลีเซอรอลด้วย

ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเกิดสบู่ (Saponification)

(ที่มา: Waste Management and Research Center, 2006)

นอกจากน้ำแล้วยังมีกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid) ที่มีอยู่ในน้ำมันวัตถุดิบ ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา น้ำมันวัตถุดิบควรมีค่าความเป็นกรด (Acid Value) ไม่เกิน4 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม เพราะการมีกรดไขมันอิสระในน้ำมันวัตถุดิบที่มากเกินไปจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ (ไบโอดีเซล) น้อยลง ส่วนน้ำมันวัตถุดิบที่ค่าความเป็นกรดสูง (มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อกรัม) ควรนำน้ำมันมาทำการลดค่าความเป็นกรดลง โดยให้ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันซึ่งใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Acid Esterification) ดังแสดงในภาพที่ 2.6 แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อ (Ramadhas *et al*., 2005)



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

(ที่มา: Khan, 2002)

- อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับ เพราะฉะนั้น

สามารถใช้น้ำมันที่มีส่วนผสมน้ำมัน 80% และเอทานอล 20% เรียกว่า E20 สำหรับรถบางรุ่นสามารถใช้น้ำมันที่มีส่วนผสมของน้ำมัน 15% และเอทานอล 85% เรียกว่า E85

2.1.2) ไบโอดีเซล (เชื้อเพลิงทดแทนดีเซล)

เป็นเชื้อเพลิงดีเซลที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือสาหร่าย ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลทางเลือก นอกเหนือจากดีเซลที่ผลิตจากปิโตรเลียม โดยมีคุณสมบัติการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลจากปิโตรเลียม และสามารถใช้ทดแทนกันได้ คุณสมบัติสำคัญของไบโอดีเซลคือ สามารถย่อยสลายได้เองตามกระบวนการชีวภาพในธรรมชาติ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไบโอดีเซล เป็นสารประเภทเอสเทอร์ทำจากน้ำมันพืชที่ผ่านกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่ากระบวนการทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (Transesterification Process) โดยให้น้ำมันพืชทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่นเมทานอล หรือเอทานอล และมีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีลักษณะเป็น เอสเตอร์ของกรดไขมัน เรียกว่า Fatty Acid Methyl Ester ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล ซึ่งเรียกชนิดของไบโอดีเซลแบบเอสเตอร์นี้ตามชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (สถานวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนจากน้ำมันปาล์มและพืชน้ำมัน, 2555)

ก) เทคนิคการผลิตไบโอดีเซล

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เป็นไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ซึ่งเป็นสารประกอบทางเคมีที่ประกอบด้วยกรดไขมัน (Fatty Acid) 3 โมเลกุล และกลีเซอรอล (Glycerol) 1 โมเลกุล ด้วยพันธะเอสเทอร์ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2559)

1) การใช้โดยตรงและการผสม

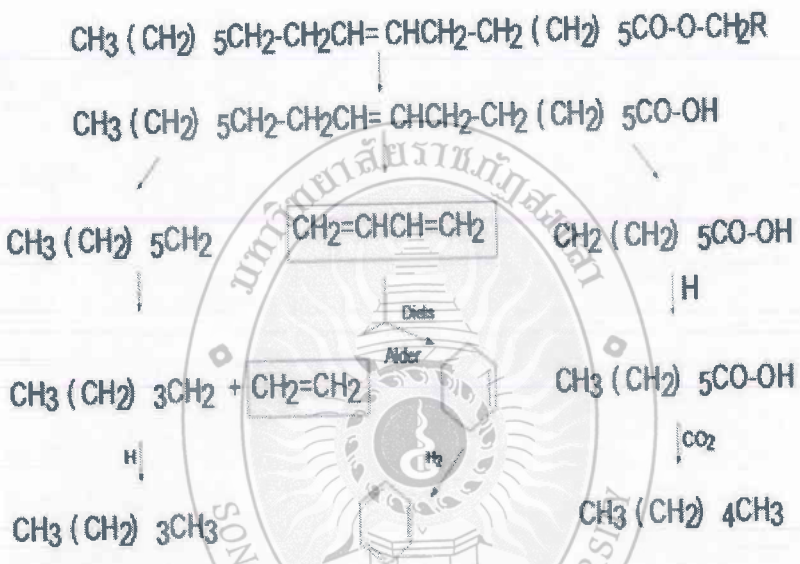
การใช้โดยตรงคือ น้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชแท้ๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู ซึ่งสามารถนำเอามาใช้ได้เลยกับเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ต้องผสมหรือผสมสารเคมีอื่นหรือไม่ต้องนำมาเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำมัน ส่วนแบบผสมคือเป็นการผสมระหว่างน้ำมันพืช (หรือไขมันสัตว์) กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซลหรืออื่นๆ เพื่อให้ไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลให้มากที่สุด เช่น โคโคดีเซลที่ประจวบคีรีขันธ์ซึ่งเป็นการผสมระหว่างน้ำมันมะพร้าวกับน้ำมันก๊าด หรือที่เรียกปาล์มดีเซล (กองบรรณาธิการ, 2548)

2) ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)

ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่กระจายตัวในสภาวะสมดุลโดยมีอนุภาคในคอลลอยด์ส่วนมากอยู่ในช่วง 1 - 150 นาโนเมตร ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาค่าความหนืดสูงในน้ำมันพืชให้มีค่าความหนืดลดลง โดยใช้ควบคู่กับตัวทำละลายเช่น เมทานอล, เอทานอล และ บิวทานอล (Srivasyava and Prasad, 1999) ไมโครอิมัลชั่นที่เกิดจากเมทานอลกับน้ำมันพืชจะได้น้ำมันที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเครื่องยนต์พบว่ามีการสะสมตัวของคราบ (ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน) เกาะรอบๆ หัวฉีดและวาล์วของเครื่องยนต์ซึ่งเป็นข้อเสียของน้ำมันที่ผลิตโดยวิธีนี้ (Ma *et al.*, 1999)

3) กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (Pyrolysis)

เป็นกระบวนการเปลี่ยนจากสารประกอบหนึ่งชนิดไปเป็นสารประกอบอื่นๆมากกว่าหนึ่งชนิด โดยใช้ความร้อนหรือใช้ความร้อนร่วมกับตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้จะต้องจำกัดปริมาณอากาศหรือออกซิเจนที่ใช้ในกระบวนการด้วยเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการประมาณ 450 - 600 องศาเซลเซียส สารประกอบที่ผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะถูกทำให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งกระบวนการนี้ยากที่จะกำหนดหรือควบคุมให้ได้ผลผลิตตามที่ต้องการเนื่องด้วยความหลากหลายทางปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการไพโรไลซิสได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ กรดไขมันธรรมชาติ (Natural Fatty Acid) และเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Ma *et al.*, 1999) กลไกของกระบวนการแตกสลายทางความร้อนแสดงในภาพที่ 2.2



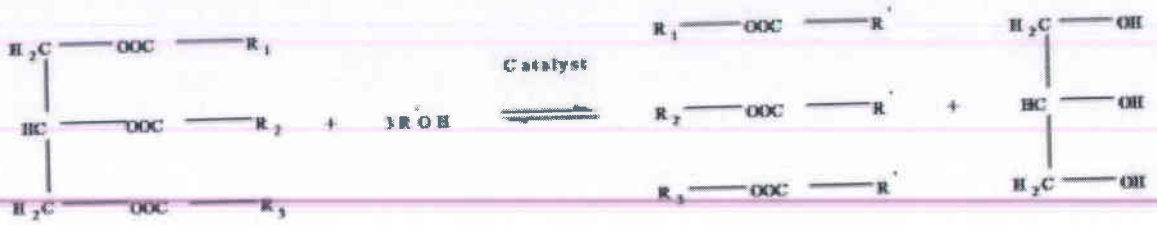
ภาพที่ 2.2 กระบวนการแตกสลายทางความร้อน
(ที่มา: Srivasyava and Prasad, 1999)

4) การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต

เป็นกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งวิธีนี้เป็นการนำเอาน้ำมันวัตถุดิบมาทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย พร้อมทั้งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมกล่าวคือ ไม่มีของเสียจากกระบวนการ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะต้องใช้อุณหภูมิและความดันในระดับที่ค่อนข้างสูงประมาณ 512.20 เคลวิน และ 8.10 เมกะปาสคาล ตามลำดับ เพื่อต้องทำให้เมทานอลอยู่ในสภาวะเหนือวิกฤต (Demirbas, 2002)

5) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างไขมันหรือน้ำมัน (Triglyceride) กับแอลกอฮอล์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล โดยมีตัวเร่งในปฏิกิริยา (Ma *et al.*, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ตัวเร่งปฏิกิริยาทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ได้เร็วขึ้น (Agarwal, 2007)



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์
(ที่มา: Ma *et al*., 1999)

5.1) ชนิดตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การนำตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะช่วยทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีและผลิตภัณฑ์เกิดได้ดีขึ้น โดยชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถแบ่งได้ดังนี้

- ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (Base Catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งควรใช้ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือเอทานอล โดยน้ำมันที่ใช้จะเป็นชนิดใดก็ได้ เช่น น้ำมันดิบ (Crude Oil) น้ำมันที่ใช้แล้ว เป็นต้น ก่อนทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันควรเปลี่ยนจากรูปเบส (NaOH, KOH) ไปเป็นในรูปของสารประกอบ อัลคอกซี (Alcoxy) ก่อน โดยการเตรียมสารประกอบอัลคอกซีเป็นไปดังปฏิกิริยาเคมี (Marchetti *et al*., 2005)

$$R{-}CH_2OH + NaOH \longrightarrow H_2O + R{-}CH_2ONa$$

สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสนี้จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอีกทั้งยังให้ผลิตภัณฑ์ (ไบโอดีเซล) ในปริมาณที่สูงด้วย (Ma *et al*., 1999) ส่วนข้อจำกัดตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสคือ น้ำ และ ปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันดิบ (Free Fatty Acid) ถ้ามีน้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระอยู่ในระบบของการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณมากจะทำให้มีสบู่เกิดขึ้นแทนที่จะได้น้ำมันไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ (Agarwal, 2007)

- ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด (Acid Catalyst)

กรดที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะทำให้ได้ผลผลิตคือน้ำมันไบโอดีเซลในปริมาณมากแต่ปฏิกิริยาจะเกิดช้ามาก อาจจะใช้เวลามากกว่า 1 วันกว่าปฏิกิริยาจะเกิดอย่างสมบูรณ์ แต่ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดสามารถใช้ได้ดีกับกลีเซอไรด์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและน้ำในปริมาณสูงได้เช่น ในน้ำมันที่ใช้แล้วเป็นต้น (Fukuda *et al*., 2001)

- เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปสถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการต่างๆ เช่น ไฮโดรไลซิสของกลีเซอรอล แอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) และ แอซิโดไลซิส (Acidolysis) ข้อดีของเอนไซม์ไลเปสคือ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก ไม่มีของเสียออกมาจากกระบวนการ ข้อเสียของเอนไซม์คือมีราคาค่อนข้างแพง (Fukuda *et al*., 2001)

- ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ (Heterogeneous Catalyst)

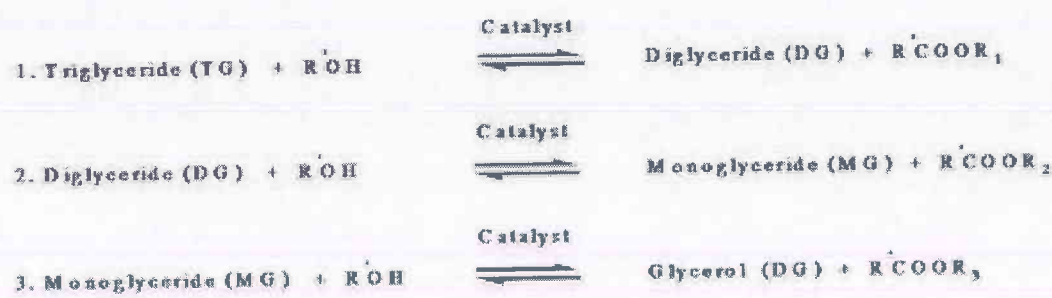
เป็นการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวในระบบ เช่น ZrO_2 ZnO KNO_3/ZrO_2 KNO_3/KL zeolite เป็นต้น ซึ่งการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะช่วยแก้ปัญหาการเกิดสบู่ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อใช้เบสเป็นตัวเร่งในระบบที่มีน้ำในปฏิกิริยา (Jitputti *et al*., 2005)

5.2) แอลกอฮอล์ที่ใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอรฟิเคชัน

แอลกอฮอล์ที่นำมาใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันคือ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล และ บิวทานอล โดยเฉพาะเมทานอลมีการใช้มากที่สุดเพราะมีราคาถูกอีกทั้งยังมีข้อดีในส่วนของคุณสมบัติทางกายภาพและด้านเคมี คือ เป็นโมเลกุลขนาดเล็กมีขั้ว ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวของ เมทานอลสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับกลีเซอไรด์ได้อย่างรวดเร็วและสามารถละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้ดี ตามสัดส่วนของปฏิกิริยาเคมีพบว่าเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ต้องใช้อัตราส่วนโดยโมลแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันเป็น 3:1 แต่ในทางปฏิบัติต้องใช้อัตราส่วนที่มากกว่านั้น หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของผสมระหว่าง เอสเทอร์ กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยา ไตร- , ได - , และโมโนกลีเซอไรด์ เพราะฉะนั้นการทำให้ ไบโอดีเซลบริสุทธิ์จึงเป็นเรื่องที่ค่อนข้างยาก เพราะถ้าไบโอดีเซลมีส่วนผสมของโมโนกลีเซอไรด์จะทำให้ ไบโอดีเซลเกิดการแข็งตัวง่าย ทั้งนี้ถ้ามีสิ่งเจือปนอยู่ในไบโอดีเซลก็จะทำให้จุดหมอกควัน (Cloud Point) และจุดไหลเท (Pour Point) มีค่าสูงขึ้นด้วย (Ma *et al*., 1999)

5.3) กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยแบบผันกลับได้ 3 ขั้นตอนย่อย นั่นคือเริ่มจากไตรกลีเซอไรด์ เปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ ตามลำดับ สุดท้ายได้เป็น เอสเทอร์ กับ กลีเซอรอล ดังแสดงในภาพที่ 2.4 จากกลไกข้างล่างพบว่าแต่ละขั้นตอนย่อยจะได้ 1 โมลของเอสเทอร์



ภาพที่ 2.4 กลไกการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์

(ที่มา: Fukuda *et al*., 2001)

แอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องใช้ในปริมาณที่มากเกินพอเพื่อที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางขวามากขึ้นซึ่งก็จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นเช่นกัน ดังนั้นยิ่งใช้อัตราส่วนมากเท่าไหร่ก็จะทำให้ได้เอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) มากขึ้นเท่านั้นและภายในเวลาที่สั้นลงด้วย อัตราส่วน 6:1 เป็นค่าที่ถูกใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมพบว่าได้เมทิลเอสเทอร์มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ (Fukuda *et al.*, 2001)

- ตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งสามารถแบ่งได้เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด หรือเอนไซม์ กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเร็วกว่าเมื่อใช้กรดเป็นตัวเร่ง แต่อย่างไรก็ตามกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันมันอิสระในปริมาณมากและมีน้ำผสมอยู่ด้วยการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเหมาะสมกว่า (Ma *et al.*, 1999) ตามตารางที่ 2.1 คือตารางที่เปรียบเทียบข้อแตกต่างของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด และเอนไซม์

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด และเอมไซม์

ตัวแปร	ตัวเร่ง		
	เบส	กรด	เอนไซม์ไลเปส
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	60 - 70	55 - 80	30 - 40
กรดไขมันอิสระในน้ำมัน	เกิดสบู่	เกิดเอสเทอร์	เกิดเอสเทอร์
น้ำในน้ำมัน	มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา	มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา	ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	สูง
การ recovery กลีเซอรอล	ยาก	ยาก	ง่าย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ต้องมีการล้างซ้ำ	ต้องมีการล้างซ้ำ	ไม่ต้องล้าง

(ที่มา: Marchetti *et al.*, 2005)

- เวลาและอุณหภูมิการทำปฏิกิริยา

อัตราการเกิดไบโอดีเซลจะแปรผันโดยตรงกับเวลา นั่นคือถ้าเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นก็จะทำให้ได้ปริมาณเอสเทอร์มากขึ้นเช่นกัน (Meher *et al.*, 2004) ส่วนอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันอย่างมาก อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาให้เพียงพอ ปฏิกิริยาก็จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใต้อุณหภูมิห้อง แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับจุดเดือดของแอลกอฮอล์ที่ใช้เช่น ถ้าเป็นเมทานอลอุณหภูมิที่ใช้คือ 60 - 70 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศ (โดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) (Agarwal, 2007)

- อัตราการกวนผสม

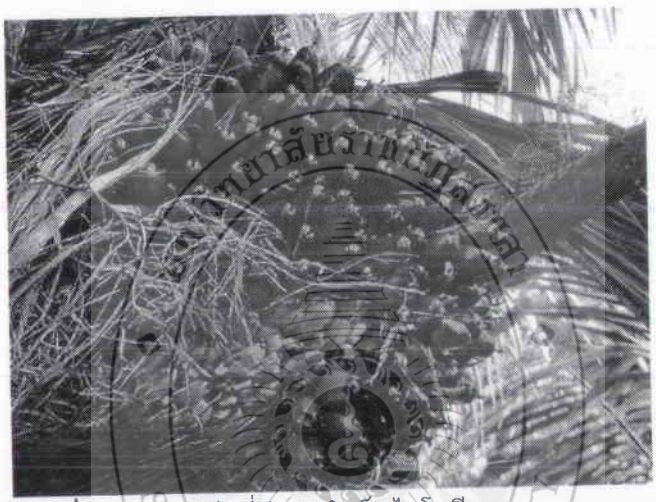
การกวนผสมนับเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมาก สำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพราะน้ำมันหรือไขมันที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลนั้นไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับแอลกอฮอล์และ

ตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงต้องมีการกวนผสมให้เนื้อสารสัมผัสกันปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจึงจะเกิดและได้เป็นไบโอดีเซล (Meher *et al.*, 2004)

ข) แหล่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

1) ปาล์ม

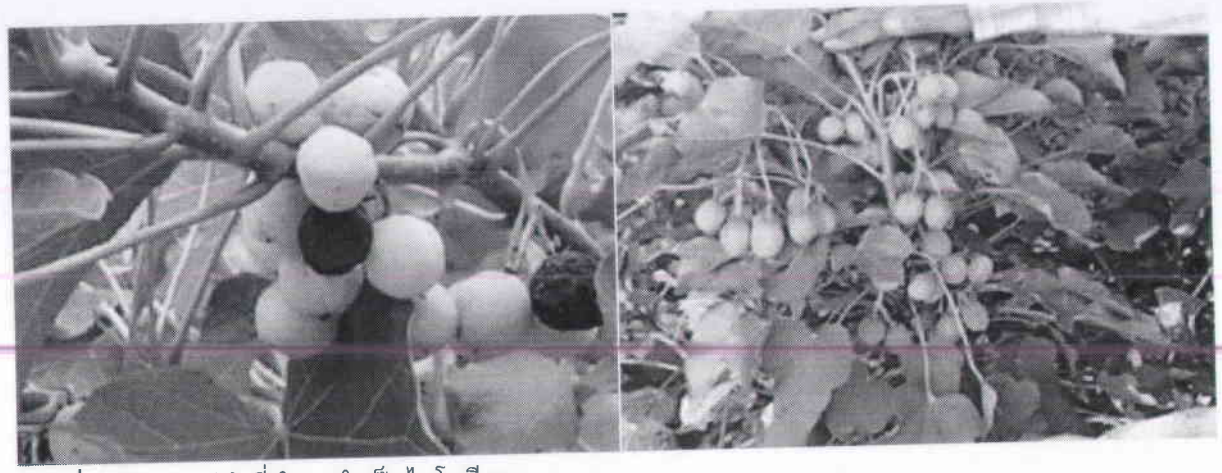
ประเทศไทยมีผลผลิตของปาล์มจำนวนมาก น้ำมันปาล์มมีทั้งกรดไขมันที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบหลัก กล่าวคือ มี Palmitic Acid 42.6% และ Oleic Acid 40.5% (Demirbas, 2002) การที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก จะช่วยให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอัลคิลเอสเทอร์ไม่อิ่มตัว (Unsaturated Alkyl Ester) ซึ่งเป็นไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดี มีความหนืดไม่สูงเกินมาตรฐานสากล



ภาพที่ 2.7 ผลปาล์มที่นำมาทำเป็นไบโอดีเซล
(ที่มา: ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, 2559)

2) สบู่ดำ

ผลสบู่ดำมีสีเขียว เมื่อสุกจะมีสีเหลืองและสีดำในที่สุด แต่ละผลมี 3 เมล็ด ถ้าตากแห้งแล้ว เมล็ดสบู่ดำ 1 กิโลกรัมจะมีปริมาณ 1,200-1,400 เมล็ด ซึ่งสามารถนำมาหีบและสกัดเป็นน้ำมันสบู่ดำ ใช้แทนน้ำมันดีเซลในเครื่องจักรกลการเกษตรได้ เนื่องจากในเมล็ดของสบู่ดำ มีปริมาณน้ำมันสูงถึงร้อยละ 52.8 ของน้ำหนักเนื้อใน และในน้ำมันสบู่ดำมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง กล่าวคือ มีปริมาณกรดโอเลอิก 44.8 เปอร์เซ็นต์ และกรดไลโนเลอิก 34.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่งผลให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีความหนืดที่เหมาะสมและมีคุณภาพดี นอกจากนี้การนำสบู่ดำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลยังไม่เป็นการแย่งตลาดของน้ำมันที่ใช้บริโภค



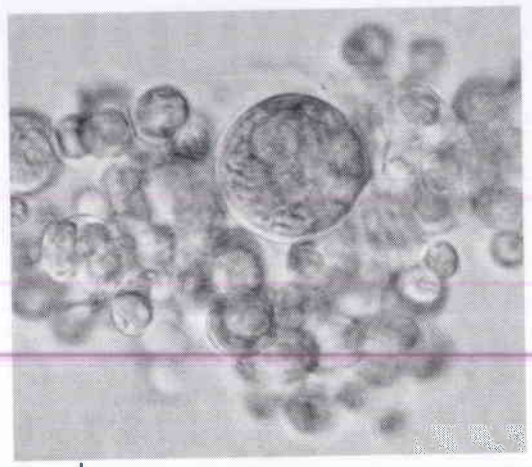
ภาพที่ 2.8 ผลสบู่ดำที่นำมาทำเป็นไบโอดีเซล
(ที่มา: นันทวรรณ สโรบล, 2559)

3) สาหร่ายน้ำจืด-น้ำเค็ม

3.1) สาหร่าย *Botryococcus braunii*

สาหร่าย *B. braunii* พบครั้งแรกกว่า 100 ปีแล้วมาแล้ว เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่สามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ปริมาณมากจัดอยู่ในดิวิชั่น Chlorophyta ชั้น Chlorophyceae ออเดอร์ Chlorococcales ตระกูล Dictyospheriaceae สกุล *Botryococcus* มีลักษณะสำคัญคืออยู่รวมกันเป็นโคโลนี โคโลนีเป็นสีเขียว สีส้มหรือน้ำตาลความยาวประมาณ 6-10 µm และ กว้าง 3-6 µm รอบนอกมีเมือกหุ้มจึงมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ และเมือกทำให้มีโคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้นและลอยน้ำได้มีสายบางไซโตพลาซึมเชื่อมระหว่างโคโลนี ลักษณะของเซลล์รูปกลมรีแต่ละเซลล์มีหนึ่งคลอโรพลาสต์ คลอโรพลาสต์มีลักษณะรูปถ้วยหรือ discoid มีไพรีลอยด์รูปถ้วยเช่นกัน และในโคโลนีที่ไม่เจริญเต็มที่จะไม่ผลิตแป้งรูปจานและผลิตน้ำมันในประมาณมาก เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์ตามยาวเท่านั้นโดยเซลล์มารวมตัวกันเพิ่มขึ้นหลังจากโคโลนีมีการแบ่งตามความยาวบริเวณเมือกหุ้มหรือเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแบ่งตัวของโคโลนีที่มีอายุมาก (Fritsch, 2004; Blackburn, 2006 and Prescott, 2007 อ้างโดย Vongprasert, 1986) สาหร่าย *B. braunii* มีลำดับ r-RNA เป็น 16s RNA ซึ่งเหมือนกับสาหร่าย *Characium vaculatum* และ *Dunaliella parva* (Sawayama *et al.*, 1995) สามารถพบสาหร่ายชนิดนี้ได้ทั่วไปพบได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด (Chisti, 2000 อ้างโดย Banerjee *et al.*, 2002)

สาหร่าย *B. braunii* สามารถเปลี่ยนแปลงพลังงานแสงอาทิตย์เป็นไฮโดรคาร์บอนได้ถึง 3% (Gudin and Thepnier, 1986) และเซลล์สาหร่ายยังสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อการเจริญเติบโตได้อีกด้วย สาหร่าย *B. braunii* เมื่อเข้าระยะพักจะมีโคโลนีสีน้ำตาล สีส้ม สีเขียว และมีไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบถึง 76% น้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการศึกษากันมากในด้านองค์ประกอบของเซลล์ของเหลวภายในเซลล์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาการสังเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนบริเวณที่มีการสะสมน้ำมันในเซลล์ Ultrastructural Information และ แหล่งธรรมชาติที่พบสาหร่ายชนิดนี้ (Maxwell *et al.*, 1968)



ภาพที่ 2.9 สาหร่าย *Botryococcus braunii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
(ที่มา: Tony Mcginley, 2001)

3.2) การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สาหร่ายต้องการน้ำ แสงแดด และคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต สาหร่ายสามารถโตได้ดีในพื้นที่ที่มีอากาศร้อนและมีแสงแดดมาก การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดและระบบปิด

- **การเพาะเลี้ยงในระบบเปิด (Open-system)** เป็นวิธีการเลี้ยงสาหร่ายแบบธรรมชาติ เช่น เลี้ยงในบ่อน้ำ คลอง และชายทะเล เป็นต้น แต่การเลี้ยงสาหร่ายโดยวิธีนี้ยากต่อการดูแล ทั้งในเรื่องการปนเปื้อนของบ่อน้ำ เช่น แบคทีเรีย ที่มีผลกระทบต่อการเติบโตของสาหร่าย และ การควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

- **การเพาะเลี้ยงในระบบปิด (Closed-system)** เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการวิจัยและพัฒนามากเพราะการเพาะเลี้ยงวิธีนี้สามารถควบคุม อุณหภูมิ และสิ่งปนเปื้อนได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถพัฒนาและออกแบบให้อยู่ในช่วงที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงระบบปิดสามารถตั้งใกล้กับโรงงานที่ปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อนำแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย (กลุ่มพัฒนามาตรฐานน้ำมันเชื้อเพลิง, 2557)

นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายยังมีการแบ่งสภาวะในการเพาะเลี้ยงออกเป็น 3 สภาวะ ได้แก่

- **การเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค (Autotrophic Cultivation)** เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยต้องการใช้แสงและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากธรรมชาติเป็นหลักในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์สารชีวิมวลต่าง

- **การเพาะเลี้ยงแบบเฮทเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic Cultivation)** เป็นการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารประกอบอินทรีย์เช่นกลูโคส ซูโครสหรือ กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ซึ่งจะเพาะเลี้ยงในที่ที่ไม่มีแสงหรือในที่มืดตลอดเวลา (Bouarab *et al.*, 2004)

- **การเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิค (Mixotrophic Cultivation)** เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนและแสงเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานตามลำดับโดยทีแสงที่ใช้อาจเป็นแสงจากธรรมชาติ (แสงอาทิตย์) หรือแสงจากหลอดไฟภายในระยะเวลาที่เหมาะสม

3.3) ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสะสมน้ำมันของสาหร่าย

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้เซลล์ในปริมาณมากและมีการสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ในปริมาณสูงนั้นมีปัจจัยสำคัญดังนี้

- **แหล่งอาหาร (Nutrients)** ไม่ว่าจะเป็นคาร์บอนหรือไนโตรเจน โดยคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งสาหร่ายสามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายได้ในน้ำซึ่งอยู่ในรูปของคาร์บอเนต นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วไนโตรเจนก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อกระตุ้นให้สะสมน้ำมัน โดยจำเป็นต้องมีการควบคุมการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนหรือมีในปริมาณที่จำกัดจะมีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์น้ำมันของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้น (Widjaja *et al*., 2009) นอกจากนี้ไนโตรเจนมีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนเมตาบอลิซึมในเซลล์สาหร่ายและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกรดอะมิโน โปรตีน และเอนไซม์ภายในเซลล์

- **แสง (Light)** แสงเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งมีความสำคัญมาก โดยเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์โดยแสง (Richmond, 1986 อ้างโดย ศิริพรรณ จันทร์น้ำท่วม, 2557) รายงานว่าเมื่อความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นการเติบโตของสาหร่ายจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยจะเพิ่มการสังเคราะห์ด้วยแสงและเร่งการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยสำคัญจำกัดที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายด้วย เมื่อความเข้มแสงสูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการทำงาน การหายใจของเซลล์หรือที่เรียกว่า Photoinhibition ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของสาหร่ายและช่วงระยะเวลาที่รับแสง

- **อุณหภูมิ (Temperature)** มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์สาหร่ายและการทำงานของเอนไซม์รวมถึงโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆในเซลล์สาหร่ายโดยเฉพาะปริมาณน้ำมันในเซลล์สาหร่ายดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายแต่ละชนิด (พนิดา รัตนพลที, 2551)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและกระตุ้นให้เกิดการสะสมน้ำมันไม่ว่าจะเป็นความเค็มหรือบางครั้งอาจมีการเติมสารอาหารบางอย่างลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสะสมน้ำมันภายในเซลล์สาหร่ายให้สูงขึ้น

3.4) องค์ประกอบน้ำมันในสาหร่าย *B. braunii*

น้ำมันที่สะสมภายในเซลล์สาหร่าย *B. braunii* มีองค์ประกอบดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii*

Hydrocarbons	Relative %
C_{13}	0.04
C_{14}	3.64
C_{15}	7.64
C_{16}	10.15
C_{17}	17.82
C_{18}	6.2
C_{19}	4.19
C_{20}	8.21
C_{21}	2.57
C_{22}	5.8
C_{23}	6.35
C_{24}	4.81
C_{25}	18.74
C_{26}	4.33

(ที่มา: Dayananda *et al*., 2012)

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร์ (2555) ศึกษาสภาวะการเลี้ยงสาหร่ายที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและไขมัน โดยเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ *Chorella vulgaris* ในอาหารสูตร BG-11 มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.14 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้แสง 4 ชนิด คือแสงธรรมชาติ (Sunlight, SL) แสงไฟสีฟ้า (Blue Light, BL) แสงไฟสีขาว (Day Light, DL) และแสงไฟสีส้ม(Warm White Light, WL) โดยให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง และศึกษาผลของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสาหร่าย พบว่าสาหร่ายที่ให้แสงธรรมชาติจะมีการเจริญเติบโตเร็วสูงสุด ตามด้วยแสงไฟสีฟ้า แสงสีส้ม และแสงสีขาว สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติแบบไม่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (SL) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.784 ต่อวัน และเมื่อมีการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ (SL-CO_2) มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.913 ต่อวัน เซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงธรรมชาติจะให้ปริมาณเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 1.993 กรัมต่อ 2 ลิตร โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 53.18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่สกัดได้โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า ในสาหร่ายเกือบทุกสภาวะมีปริมาณกรด ปาล์มิติก 38.00 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน และกรดโอเลอิก หรือโอเมก้า 9 มีปริมาณ 1.00 ถึง 4.00 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน การเลี้ยงในสภาวะที่ใช้แสงไฟสีส้มพร้อมเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (WL-CO_2) มีปริมาณกรดไขมัน ไลโนเลอิก หรือ โอเมก้า 6 เท่ากับ 26 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน ซึ่งมากกว่าสภาวะอื่น กรดไขมันแอลฟาไลโนเลนิก หรือ โอเมก้า 3 พบมากในสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงธรรมชาติ มีปริมาณกรดไขมันเท่ากับ 10.63 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน ส่วนกรดไขมันชนิดแกมมาไลโนเลนิก หรือ โอเมก้า 6 พบเฉพาะในเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงไฟสีขาวมีปริมาณกรดไขมันเท่ากับ 1.53 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำมัน

ชิโนรส ศรีศิริ และคณะ (2552) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและเปอร์เซ็นต์ของการสะสมไขมันในการเลี้ยงสาหร่ายพื้นเมือง ในขวดแก้วใส (PET) โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงของวาตานาเบ้และกอนซาเลซ (Watanabe and Gonzalez) มีการให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 1% ณ ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ และ 5000 ลักซ์ โดย

ใช้แสงสีส้มและสีขาว จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 36 วัตต์ ช่วงเวลาของการให้แสงสว่างต่อมืดเท่ากับ 12: 12 และ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 27-29 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายท้องถิ่นพื้นเมือง จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้สาหร่ายพื้นเมืองมีการเจริญโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.542 ต่อวัน และมีไขมันสะสมในเซลล์ร้อยละ 6.42 ตามลำดับ ณ ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ โดยมีแสงสีส้มเป็นแหล่งพลังงาน ช่วงสว่างต่อมืดเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง ปริมาณเฟอร์ริคคลอไรด์และกลูโคสเท่ากับ 0.003 และ 0.450 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ยศวดี สวัสดิรักษา (2547) ศึกษาคัดแยกสาหร่าย *Botryococcus braunii* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรคาร์บอนจากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้คาปิลลารีปิเปต แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ Modified Chu 13 และ Kralz and Myers ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 6.7 โดยเลี้ยงในอ่างแก้วควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่งโมง ที่ความเข้มแสง 3000 5000 และ10000 ลักซ์ ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ให้อากาศผสม CO_2 1 เปอร์เซ็นต์ อัตรา 1 ลิตรต่อนาที ซึ่งเพาะเลี้ยงแบบกะ พบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตในอาหาร Modified Chu 13 ได้ดีกว่าในอาหาร Kralz and Myers เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.25 กรัมต่อลิตร

Dayananda และคณะ (2012) ศึกษาการแยกสาหร่าย คุณสมบัติ และการเพาะเลี้ยงในโรงเรือนของสาหร่าย *Botryococcus* sp. พบว่าเมื่อแยกสาหร่ายและดูลักษณะทางสัณฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ SEM (Scanning Electron Microscopic) สาหร่ายที่แยกได้เป็น *Botryococcus* sp. และวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ Hexane พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น Hexadecane (10.15%), Heptadecane (17.82%) และ Pentacosane (18.74%)

Yeesang และ Cheirsilp (2011) ศึกษาผลของไนโตรเจน ความเค็ม ปริมาณของเหล็ก (Fe^{3+}) ในอาหารเพาะเลี้ยงและความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่าย พบว่าสามารถแยกสาหร่ายได้ 4 สายพันธุ์ (TRG, KB, SK, and PSU) ซึ่งเก็บตัวอย่างจากทะเลสาบ (จังหวัดสงขลา , ตรัง และกระบี่) และอ่างเก็บน้ำในภาคใต้ของประเทศไทย นอกจากนี้เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนปริมาณ 0.2 g/L สามารถผลิตน้ำมันเท่ากับ 25.8%, 17.8%, 15.8% และ 5.7% ตามลำดับ เมื่อใช้ Fe^{3+} 0.74 mM ให้ปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 35.9%, 30.2%, 28.4% และ 14.7% ตามลำดับ

Yaming และคณะ (2011) ศึกษาการเจริญของ *Botryococcus braunii* 765 โดยใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูง (2–20%) พบว่าที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 20% ได้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 2.31 g/L ที่ 25 วัน นอกจากนี้ปริมาณไฮโดรคาร์บอนและขนาดของโคโลนีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

Yoo และคณะ (2010) ศึกษาการคัดเลือกสาหร่ายในการผลิตน้ำมันโดยใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 10% สาหร่าย *Scenedesmus* sp. ได้ชีวมวลและอัตราการผลิตน้ำมันเท่ากับ 217.50 และ 20.65 mg/L/d ตามลำดับ (9% ของชีวมวล) สาหร่าย *Botryococcus braunii* ได้ชีวมวลและอัตราการผลิตน้ำมันเท่ากับ 26.55 และ 5.51 mg /L/d (21% ของชีวมวล) ตามลำดับ

Dayananda และคณะ (2007) ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* เพื่อผลิตไฮโดรคาร์บอนและ Exopolysaccharides ในอาหารสูตร BG11 และ Chu 13 พบว่าอาหารสูตร BG11 สาหร่ายให้ชีวมวลได้ดีที่สุดเท่ากับ 2.00 และ 2.80 g/L และผลิตไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 46.00% และ 33.00% (*B. braunii* สายพันธุ์ SAG 30.81 และ LB-572 ตามลำดับ)

Aresta และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดใหญ่ *C. linum* โดยใช้วิธี Thermochemical Liquefaction และวิธี Supercritical CO_2 Extraction พบว่าวิธีแรกสามารถใช้สาหร่ายเปียกในการผลิตไบโอดีเซล ในขณะที่วิธีที่สองใช้สาหร่ายแห้งในการวิเคราะห์ โดยวิธี Thermochemical Liquefaction ใช้อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส และ 395 องศาเซลเซียส ในการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย โดยองค์ประกอบของน้ำมันที่ได้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ เช่น กรดไขมันมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิต่ำ และมีการสลายตัวเกิดขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งวิธี Thermochemical Liquefraction มีประสิทธิภาพในการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายได้ดีกว่าวิธี Supercritical CO_2 Extraction เมื่อเปรียบเทียบในเชิงปริมาณของน้ำมันที่สกัดได้ แต่มีข้อเสียที่อาจเกิดการสลายตัวได้ที่อุณหภูมิสูง

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 ขวดรูปชมพู่

1.2 ตาข่ายแพลงค์ตอน

1.3 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

1.4 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง

1.6 หลอดฟลูออเรสเซนต์

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.8 เครื่องวัดความเค็ม

1.9 ตู้ดูดความชื้น

1.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.11 ตู้อบ

1.12 เครื่องปั้มอากาศ

1.13 กล้องจุลทรรศน์

2. สารเคมี

2.1 $NaNO_3$

2.2 $K_2HPO_4.3H_2O$

2.3 $MgSO_4.7H_2O$

2.4 $CaCl_2.2CH_2O$

2.5 Citric Acid

2.6 Ferric Ammonium Citrate

2.7 EDTA, Disodium Magnesium Salt

2.8 Na_2CO_3

2.9 FeCl3

2.10 Deionized Water

2.11 Trace Metal Mix A5

2.12 H_3BO_3

2.13 $MnCl.4H_2O$

2.14 $ZnSO_4.2H_2O$

2.15 $NaMoO_4.5H_2O$

2.16 $CuSO_4.5H_2O$

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

2.17 $CO(NO_3)_2.6H_2O$

3. การดำเนินการวิจัย

3.1) ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของแหล่งธรรมชาติ

ศึกษาตัวอย่างน้ำจากทะเลสาบ 2 แหล่ง ได้แก่ ทะเลสาบตอนล่าง และทะเลสาบตอนกลาง และจากอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา 3 แหล่ง ได้แก่ อ่างเก็บน้ำในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อ่างเก็บน้ำในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และอ่างเก็บน้ำคลองหลา โดยศึกษาแหล่งละ 3 จุด ซึ่งวัดพารามิเตอร์ทางกายภาพ ได้แก่ ความเค็ม (กรณีตัวอย่างน้ำจากทะเลสาบ) , อุณหภูมิ และ ความโปร่งแสง จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำ (ไม่ผ่านการกรองด้วยถุงลากแพลงค์ตอน) ใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง แล้วเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่า pH, TKN (Total Kjeldahl Nitrogen), BOD (Biological Oxygen Demand) และ DO (Dissolved Oxygen)

3.2) การแยกสาหร่าย *B. braunii* จากตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 5 แหล่ง จากข้อ 3.1 โดยเก็บบริเวณผิวน้ำลึกลงไปประมาณ 10-12 เซนติเมตร แล้วลากถุงกรองแพลงค์ตอนขนาดตา 20 ไมครอน ในน้ำประมาณ 2-3 ครั้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างน้ำใส่ในขวดดูแรน (Duran) แล้วเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาแยกสาหร่าย *B. braunii* ในห้องปฏิบัติการ โดยให้แสงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น (ผ่านการฆ่าเชื้อ) 3 ครั้ง จากนั้นนำมาแยกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งใช้หลอดคาปิลลารีดูดสาหร่าย *B. braunii* ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร BG-11 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปให้แสงเป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์ แล้วนำมาแยกสาหร่าย *B. braunii* ให้บริสุทธิ์ โดยการ Streak บนอาหาร BG-11 แล้วดูลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง เพื่อยืนยันผล

3.3) การคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* ที่มีการเจริญดี

3.3.1) การเตรียมหัวเชื้อ

นำสาหร่ายที่ผ่านการแยกจากข้อ 3.2 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BG11 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ออกซิเจนและแสง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำมาปรับหัวเชื้อเริ่มต้นโดยการวัดค่า OD ที่มีความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5

3.3.2) การทดสอบการเจริญเติบโต

นำหัวเชื้อสาหร่ายจากข้อ 3.3.1 ปริมาตรร้อยละ 10 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BG11 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ออกซิเจนและแสง เป็นเวลา 21 วัน ซึ่งเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน แล้วนำมาวัดพารามิเตอร์ คือ ค่า pH และ น้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นคัดเลือกสาหร่ายที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4) การทดสอบปัจจัยที่มีเหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii*

3.4.1) ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.3 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BG11 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรหัวเชื้อร้อยละ 10) แล้วนำไปให้อากาศและแสง เป็นเวลา 21 วัน ซึ่งเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน แล้วนำมาวัดพารามิเตอร์ คือ ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำมัน จากนั้นเลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2) อัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.3.3 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BG11 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.1 แล้วแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 5 10 15 และ 20 (ปริมาตรหัวเชื้อร้อยละ 10) จากนั้นนำไปให้อากาศและแสง เป็นเวลา 21 วัน ซึ่งเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน แล้วนำมาวัดพารามิเตอร์ คือ ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำมัน จากนั้นเลือกอัตราส่วน C/N ที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงที่สุด

3.5) การวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ

3.5.1) น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากสูตรดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักภาชนะหลังอบ - น้ำหนักภาชนะก่อนอบ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์}} \times 1{,}000$$

3.5.2) การสกัดน้ำมัน

นำเซลล์แห้งจากข้อ 3.5.1 มาสกัดน้ำมัน โดยใส่สารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสใสในหลอดที่ทราบน้ำหนัก (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง) นำส่วนใสไประเหยให้แห้ง โดยตั้งค้างคืนในตู้ดูดควัน แล้วคำนวณปริมาณน้ำมันจากสูตรดังนี้

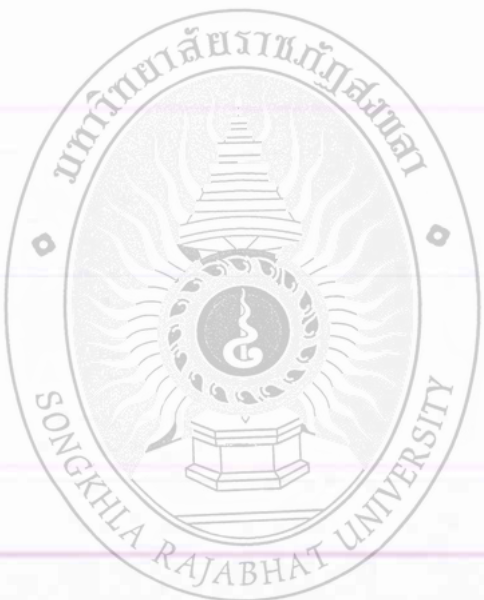
$$\text{ปริมาณน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักภาชนะหลังอบ - น้ำหนักภาชนะก่อนอบ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์}} \times 1{,}000$$

3.6) วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย *B. braunii*

นำน้ำมันที่ผ่านการสกัด วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันโดยวิเคราะห์หาปริมาณการผลิต FAME (Fatty Acid Methyl Esters) ซึ่งใช้ Gas Chromatography (GC) ตามวิธีของ Cheirsilp และ Torpee (2012)

3.7) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ one-way ANOVA ในการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ *P*-value < 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยใช้ Duncan's Multiple Rang Test



บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. ศึกษาสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการศึกษาสภาพแวดล้อมแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ ทะเลสาบสงขลา และอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา โดยทะเลสาบสงขลาศึกษาสภาพแวดล้อม 2 แหล่ง ได้แก่ ทะเลสาบตอนล่างและทะเลสาบตอนกลาง ส่วนอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา ศึกษาสภาพแวดล้อม 3 แหล่ง ได้แก่ อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และอ่างเก็บน้ำคลองหลา ซึ่งวิเคราะห์พารามิเตอร์ทางกายภาพ ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ ความโปร่งแสง ความเค็ม (กรณีตัวอย่างน้ำจากทะเลสาบสงขลา) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ค่า BOD และ DO พบว่า ค่า pH ของน้ำบริเวณทะเลสาบสงขลามีค่า pH สูงกว่าน้ำบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา และมีความเค็มเท่ากับ 1.93 ± 0.12 และ 1.70 ± 0.27 ppm (ทะเลสาบสงขลาตอนล่างและตอนกลางตามลำดับ) แต่อุณหภูมิของน้ำบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลามีอุณหภูมิสูงกว่าน้ำบริเวณทะเลสาบสงขลา เนื่องจากน้ำบริเวณอ่างเก็บน้ำเป็นน้ำนิ่ง แต่น้ำบริเวณทะเลสาบสงขลาเป็นแหล่งน้ำขนาดใหญ่มีปริมาณน้ำมาก นอกจากนี้ยังมีลม ส่งผลให้น้ำบริเวณทะเลสาบสงขลามีความโปร่งแสง (66.27±17.10 - 67.23 ± 10.23 เซนติเมตร) มากกว่าน้ำในบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา (19.33 ±0.67 - 32.78 ± 2.34 เซนติเมตร) (ตารางที่ 4.1)

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าตัวอย่างน้ำจากบริเวณทะเลสาบมีค่าไนโตรเจนทั้งหมดต่ำกว่าบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา ซึ่งไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและการสะสมน้ำมันของจุลินทรีย์ โดยเป็นสารอาหารของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งปริมาณของไนโตรเจนในสภาวะแวดล้อมนั้นๆสามารถเป็นตัวกำหนดศักยภาพของจุลินทรีย์ในการผลิตสารเมทาบอไลต์บางชนิดได้ ส่วนค่า BOD_5 และ DO พบว่าตัวอย่างน้ำที่เก็บจากทั้ง 2 ส่วน มีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.1)

ONKHARAK RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1 พารามิเตอร์ทางกายภาพบริเวณทะเลสาบสงขลาและอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา

พารามิเตอร์	ทะเลสาบสงขลา		อ่างเก็บน้ำ		
	ตอนล่าง	ตอนกลาง	ม. ราชภัฏสงขลา	ม. สงขลานครินทร์	คลองหลา
pH	8.00 ± 0.00	8.40 ± 0.55	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00
อุณหภูมิ	29.50 ± 0.45	27.63 ± 0.64	32.78 ± 2.34	31.00±0.00	32.44±0.38
ความเค็ม (ppm)	1.93 ± 0.12	1.70 ± 0.27	-	-	-
ความโปร่งแสง (cm.)	67.23 ± 10.23	66.27±17.10	32.78 ± 2.34	27.22±0.38	19.33 ±0.67
TKN	5	4	7.5	7	6
BOD_5	10.5	10.05	9.5	9.25	9
DO	7.8	7.5	8	8.1	8.5

2. การแยกสาหร่าย *B. braunii* จากตัวอย่างน้ำ

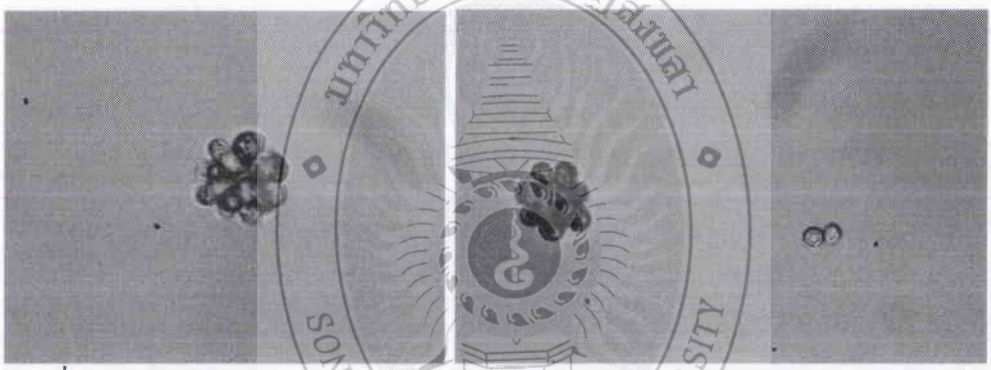
จากการแยกสาหร่าย *B. braunii* จากตัวอย่างน้ำ ซึ่งเก็บจากทะเลสาบสงขลาและอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 พบว่า สามารถแยกสาหร่าย *B. braunii* ได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลท โดยแยกได้จากทะเลสาบสงขลา 6 ไอโซเลท และ 12 ไอโซเลท จากอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา (ตารางที่ 2) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถแยกสาหร่ายได้จากทุกแหล่งของตัวอย่างน้ำที่เก็บ ดังนั้นจึงบ่งชี้ได้ว่าสภาวะแวดล้อมของตัวอย่างน้ำทั้งสองแหล่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* คือ มีอุณหภูมิและความอุดมสมบูรณ์ของอินทรีย์สารเพียงพอต่อการเจริญ โดยสาหร่ายชนิดนี้เป็นสาหร่ายสีเขียว ซึ่งสาหร่ายสีเขียวสามารถพบได้ทั่วไปแทบทุกแห่ง ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายสีเขียวเป็นสาหร่ายน้ำจืด หรือสาหร่ายที่ขึ้นอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศก็ได้ โดยเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ หรือน้ำลึกที่แสงส่องถึง (ยุวดี พีรพรพิศาล , 2549) และด้วยเหตุนี้จากผลการทดลอง ตัวอย่างน้ำจากทะเลสาบสงขลาสามารถแยกสาหร่าย *B. braunii* ได้น้อยกว่าตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำ เนื่องจากทะเลสาบสงขลามีความขุ่นมากกว่าอ่างเก็บน้ำดังตาราง 4.1 และจากผลการทดลองสอดคล้องกับ โดย Yeesang และ Cheirsilp (2011) ศึกษาผลของไนโตรเจน ความเค็ม ปริมาณของเหล็ก (Fe^{3+}) ในอาหารเพาะเลี้ยงและความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันของสาหร่าย โดยแยกจากทะเลสาบและอ่างเก็บน้ำในภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา ตรัง และกระบี่ พบว่าสามารถแยกสาหร่ายได้ 4 สายพันธุ์ (TRG, KB, SK, and PSU) นอกจากนี้เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนปริมาณ 0.2 g/L สามารถผลิตน้ำมันเท่ากับ 25.8%, 17.8%, 15.8% และ 5.7% ตามลำดับ เมื่อใช้ Fe^{3+} 0.74 mM ให้ปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 35.9%, 30.2%, 28.4% และ 14.7% ตามลำดับ ซึ่งสาหร่ายที่แยกได้มีลักษณะสำคัญคือ เซลล์รูปไข่หรือกลม มักเกาะกันเป็นกลุ่ม โดยมีสายไซโตพลาสมิค (Cytoplasmic) มาเชื่อมต่อกันในแต่ละเซลล์หรือโคโลนี

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ทำให้ทัลลัสใหญ่ขึ้น ซึ่งกลุ่มเซลล์ค่อนข้างกลมหรือมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในมีแกรนูลของเม็ดน้ำมันที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ ดังภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลทของสาหร่าย *B. braunii* จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

แหล่งน้ำธรรมชาติ	จำนวนไอโซเลท
ทะเลสาบสงขลาตอนล่าง	3
ทะเลสาบสงขลาตอนกลาง	3
อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา	4
อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	5
อ่างเก็บน้ำคลองหลา	3



ภาพที่ 4.1 สาหร่าย *B. braunii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

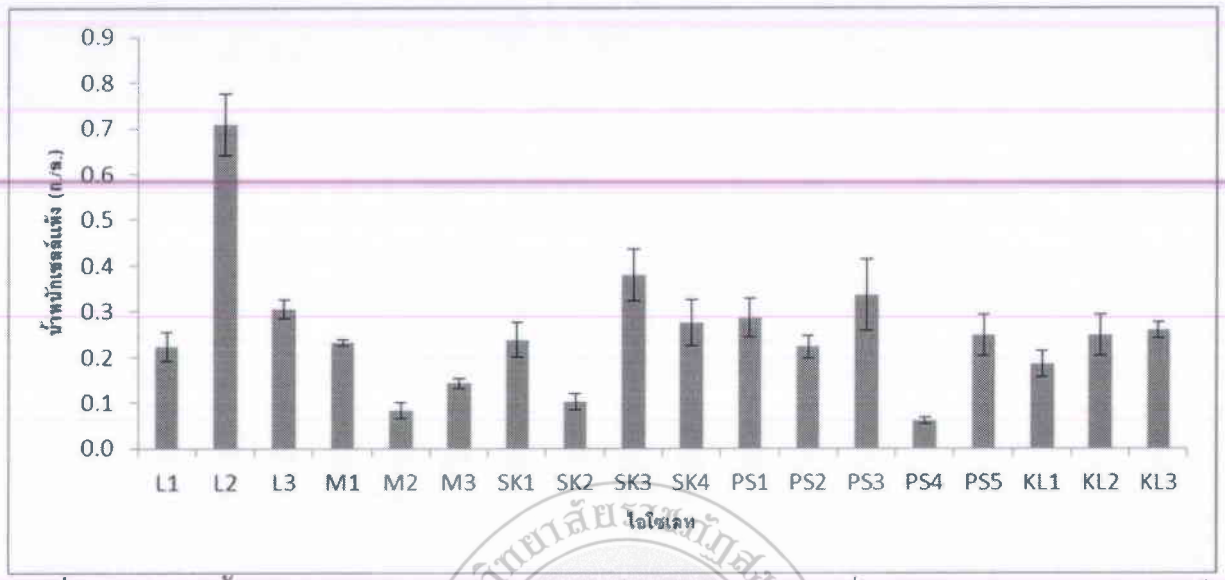
3. การคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* ที่มีการเจริญดี

จากผลการคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* ที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยนำสาหร่ายที่แยกได้เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 เป็นเวลา 21 วัน แล้ววัดค่า pH และน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุกๆ 3 วัน พบว่า ไอโซเลท L2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 0.708 ± 0.067 กรัม/ลิตร ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลสาบสงขลาตอนล่าง รองลงมาคือ SK3 และ Kl4 (ภาพที่ 4.2) ซึ่งแยกได้จากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา และอ่างเก็บน้ำคลองหลา ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำมัน พบว่าไอโซเลท L2 มีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 0.035 ± 0.007 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.3) ซึ่งจากการศึกษาน้ำหนักเซลล์ของ *B. braunii* Kutz. ที่เลี้ยงในบ่อเปิด เพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ พบว่า สาหร่าย *B. braunii* Kutz. AP105 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.855 ± 0.026 กรัม/ลิตร และปริมาณน้ำมันเท่ากับ 190 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CHU-13 เป็นเวลา 21 วัน (Ashokkumar and Rengasamy., 2012) แต่การทดลองของผู้วิจัยใช้อาหาร BG-11 ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกัน

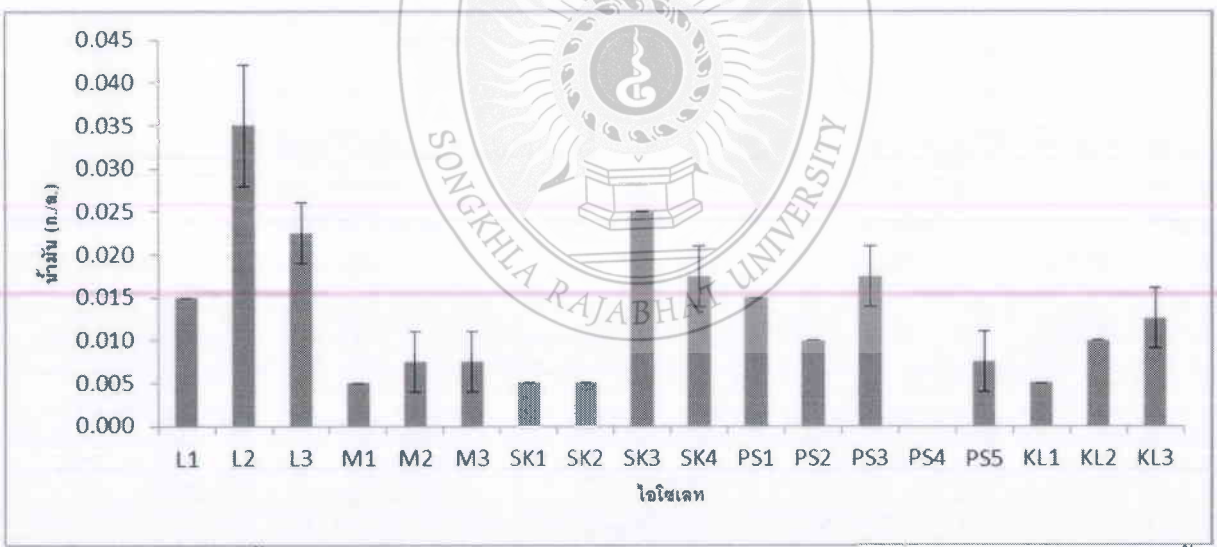
ส่วนค่า pH พบว่า ทุกไอโซเลทให้ค่า pH ในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาผ่านไป เนื่องจากสาหร่ายมีการเจริญในอาหารเพาะเลี้ยง แล้วสร้างสารอาหารและกรดไขมันบางชนิด ในขณะเดียวกัน

579.8
ส 111ว
27 ธ.ค. 2560

เป็นการลดไฮโดรเจนไอออนในอาหารเช่นกัน ซึ่งความไม่สมดุลของสารไฮโดรเจนไอออนต่อไฮดรอกซีมีผลให้อาหารเพาะเลี้ยงมีความเป็นเบส ส่งผลให้ค่า pH ในอาหารเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากทะเลสาบและอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา



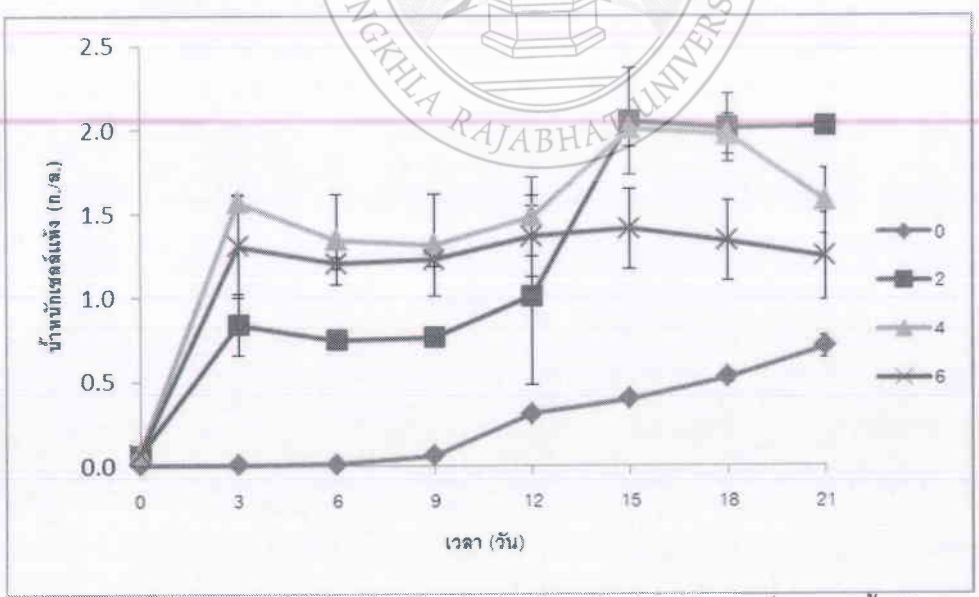
ภาพที่ 4.3 ปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากทะเลสาบและอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา

4. ปัจจัยที่มีเหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันสาหร่าย *B. braunii*

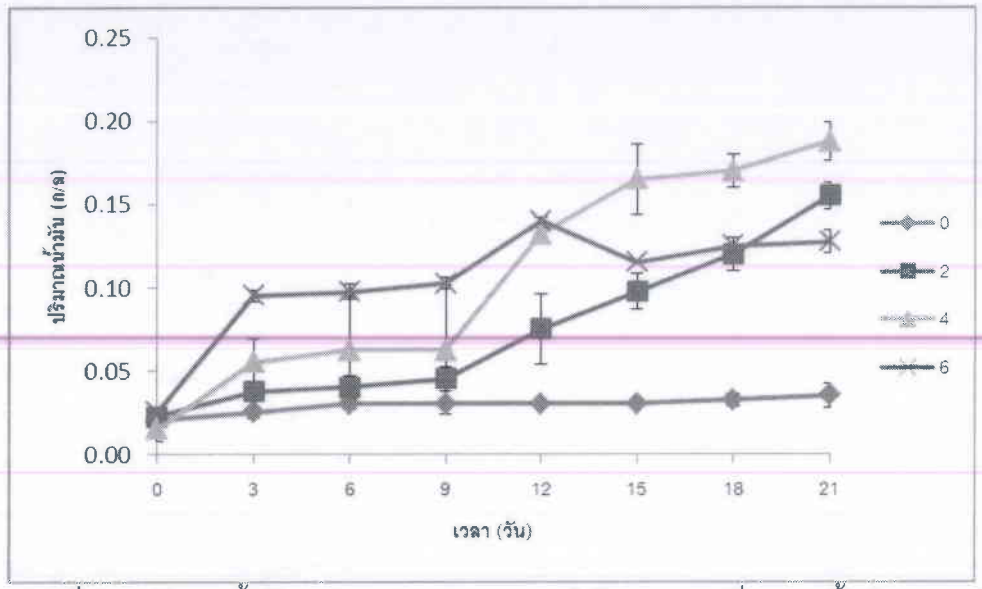
4.1 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันความเข้มข้นเป็น 0 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้สาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือก (ไอโซเลท L2) พบว่าในช่วง 12 วันแรกของการทดลอง สาหร่ายไอโซเลท L2 มีการเจริญเพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แต่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร สาหร่ายมีการเจริญสูงสุด ส่วนวันที่ 15 ของการทดลอง ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

สาหร่ายมีการเจริญดีกว่า และเจริญคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.020-2.050 ± 0.057-0.318 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.4) ส่วนปริมาณน้ำมัน พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 4 กรัมต่อลิตร เซลล์สาหร่ายสามารถสะสมน้ำมันได้ปริมาณสูงเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ โดยมีการสะสมน้ำมันเท่ากับ 0.188 ± 0.0115 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.5) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีลด์ (Yield) เท่ากับ 11.91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือความเข้มข้นของกลูโคส 6 2 และ 0 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยีลด์เท่ากับ 10.24, 7.67 และ 4.93 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งจากผลการทดลองในชุดที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 4 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยีลด์ สูงกว่าในชุดที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2 กรัมต่อลิตร เนื่องจากชุดทดลองที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสูง แต่มีการสะสมน้ำมันในเซลล์ต่ำ ดังนั้นจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้กับเซลล์สาหร่ายมีผลต่อการสะสมน้ำมันของเซลล์ ซึ่งเซลล์ใช้กลูโคสในการเจริญ โดยเปลี่ยนกลูโคสเป็น Acetyl CoA หรือ Malonyl CoA ซึ่งสารทั้ง 2 ตัวนี้เป็นสารอินเตอร์มีเดียต (Intermediate) แล้วเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน ส่งผลให้มีการสะสมลิพิดภายในเซลล์สาหร่าย เพื่อเป็นพลังงานสำรองให้กับเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณอาหารอย่างจำกัด นอกจากนี้จากผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Botryococcus braunii* แบบ Mixotrophic พร้อมกับให้แก๊ส CO_2 เพื่อหายีลด์ชีวมวลและลิพิด โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร BG-11 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 กรัมต่อลิตร แล้วให้แก๊ส CO_2 ด้วยอัตราการไหล 0.1 vvm ที่เวลาต่างๆ (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมงต่อวัน) พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 2.5 กรัมต่อลิตร มียีลด์ชีวมวลและลิพิดสูงสุดเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นอื่นๆ โดยมียีลด์ชีวมวลและลิพิดเท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร และ 1.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Pooja and Himabindu, 2014)



ภาพที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 4.5 ปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ

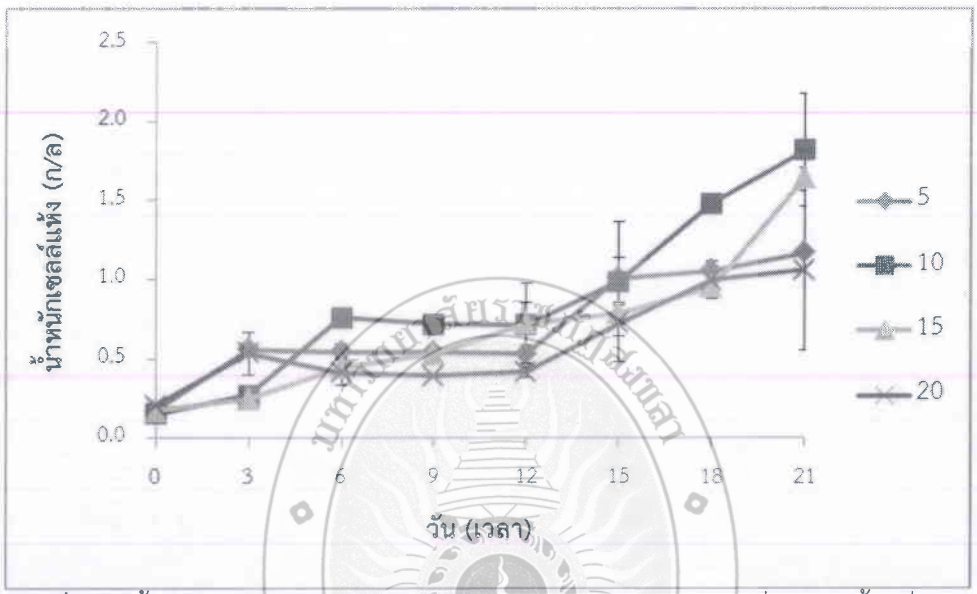
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ยีลด์ของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกลูโคส (g/L)	เปอร์เซ็นต์ยีลด์
0	4.93[a]
2	7.67[b]
4	11.91[c]
6	10.24[c]

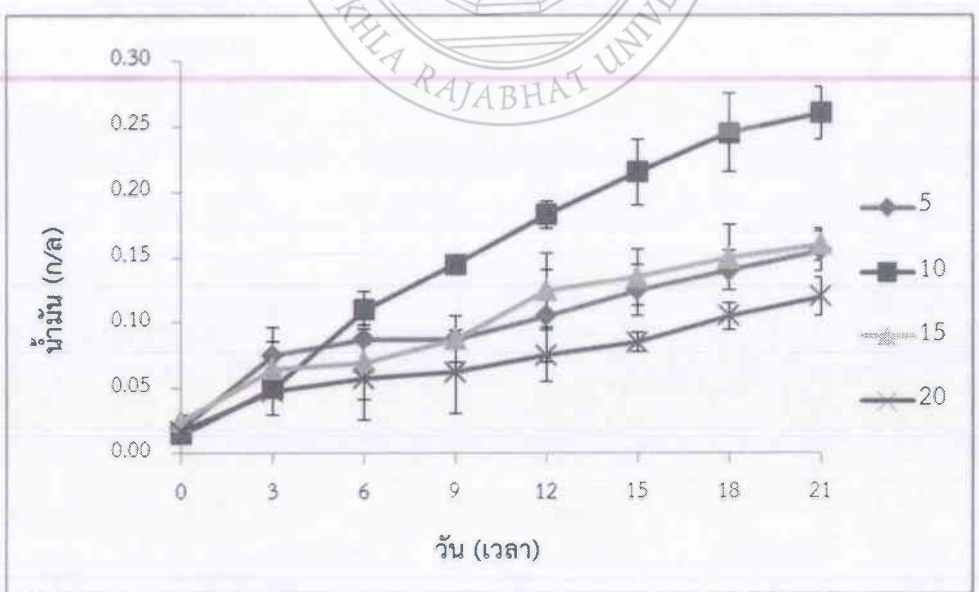
4.2 อัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม

จากการศึกษาอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม โดยแปรผันเป็น 5, 10, 15 และ 20 ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน แล้วเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เป็นเวลา 21 วัน พบว่าที่อัตราส่วน C/N เท่ากับ 10 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.820 ± 0.306 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.6) และมีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 0.260 ± 0.002 กรัมต่อลิตร ที่เวลาสุดท้ายของการทดลอง (ภาพที่ 4.7) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีลด์เท่ากับ 14.28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดที่มีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 15, 5 และ 20 โดยมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.645 ± 0.060, 1.170 ± 0.014 และ 1.057 ± 0.505 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำมันเท่ากับ 0.160 ± 0.012, 0.155 ± 0.015 และ 0.120 ± 0.015 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วน C/N มีผลต่อการสะสมน้ำมันของสาหร่าย เนื่องจากการสะสมน้ำมันของสาหร่าย ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยสาหร่ายสามารถสะสมน้ำมันได้ดีในสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนหรือมีปริมาณไนโตรเจนต่ำ ดังรายงานวิจัยของ

Illman และคณะ (2000) ศึกษาการเพิ่มค่าความร้อนของ *Chlorella* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ พบว่า สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เจริญได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการเจริญที่ 0.99 ต่อวัน และ *Chlorella emersonii* มีค่าความร้อนสูงที่สุด (29 กิโลจูลต่อกรัม) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณลิพิดที่เซลล์ผลิต โดย *C. emersonii* สามารถผลิตลิพิด 63 ± 1 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนปกติ (ชุดควบคุม) มีปริมาณลิพิดเท่ากับ 29 ± 2.5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วน C/N ต่างๆ



ภาพที่ 4.7 ปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วน C/N ต่างๆ

5. องค์ประกอบของน้ำมันจากสาหร่าย *B. braunii*

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันจากสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 ซึ่งผ่านการคัดเลือก โดยวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) ด้วย Gas Chromatography (GC) พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตกรดไขมัน (Fatty Acid) ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated Fatty Acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated Fatty Acid) โดยพบทั้งในรูปแบบ Monounsaturated Fatty Acid และ Polyunsaturated Fatty Acid ซึ่งมีปริมาณ Palmitic Acid (C16:0) สูงสุด คือ 37.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Oleic Acid (C18:1) มีปริมาณเท่ากับ 24.65 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.4 โดยกรดไขมัน Palmitic Acid และ Oleic Acid เป็นกรดไขมันที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ซึ่ง Fang และคณะ (2004) และ Dayanada และคณะ (2006) อ้างโดย Yeesang และ Cheirsilp (2011) รายงานว่า กรดไขมันทั้ง 2 ชนิด เป็นกรดไขมันทีผลิตมากในสาหร่าย *B. braunii* นอกจากนี้กรดไขมัน Oleic Acid ยังเป็นสารตัวกลาง (Precursor) ของ Non- Isoprenoid Hydrocarbons ที่ผลิตโดยสาหร่าย *Botryococcus* และกรดไขมัน Oleic Acid เป็นกรดไขมันที่ใช้เป็นองค์ประกอบหลักในการผลิตไบโอดีเซล (Tran *et al*, 2010) และจากรายงานของ Zhila, Kalacheva และ Volova (2005) ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญและองค์ประกอบลิพิดของสาหร่ายสีเขียว *Botryococcus braunii* Kutz. IPPAS H-252 พบว่า องค์ประกอบกรดไขมัน (FA Composition) ในลิพิดทั้งหมดของสาหร่าย *B. Braunii* โดยมีปริมาณ C16:0 และ C18:1ω9 เท่ากับ 22.4 เปอร์เซ็นต์ และ 13.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Prat Medium เป็นเวลา 20 วัน ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่จำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าปริมาณ C16:0 ลดลง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 19.1 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณ C18:1ω9 เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 24.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน Oleic Acid ของผู้วิจัยได้ศึกษาดังกล่าวข้างต้น

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซนต์กรดไขมันจากน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2

ชนิดของกรดไขมัน	เปอร์เซ็นต์กรดไขมัน
Palmitic Acid (C16:0)	37.12
Palmitoleic Acid (C16:1)	1.55
Stearic Acid (C18:0)	7.57
Oleic Acid (C18:1)	24.65
Linoleic Acid (C18:2)	6.75
Linolenic Acid (C18:3)	18.41

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาพแวดล้อมแหล่งน้ำธรรมชาติ 5 แหล่ง ได้แก่ ทะเลสาบตอนล่าง ทะเลสาบตอนกลาง อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และอ่างเก็บน้ำคลองหลา แล้ววิเคราะห์พารามิเตอร์ทางกายภาพ พบว่า ค่า pH ของน้ำบริเวณทะเลสาบสงขลามีค่า pH สูงกว่าน้ำบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา และมีความเค็มเท่ากับ 1.93 ± 0.12 และ 1.70 ± 0.27 ppm (ทะเลสาบสงขลาตอนล่างและตอนกลางตามลำดับ) แต่อุณหภูมิของน้ำบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลามีอุณหภูมิสูงกว่าน้ำบริเวณทะเลสาบสงขลา และความโปร่งแสง พบว่าทะเลสาบสงขลามีความโปร่งแสง (66.27±17.10 – 67.23±10.23 เซนติเมตร) มากกว่าบริเวณอ่างเก็บน้ำ (19.33±0.67 – 32.78±2.34 เซนติเมตร) ส่วนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าตัวอย่างน้ำจากบริเวณทะเลสาบมีค่าไนโตรเจนทั้งหมดต่ำกว่าบริเวณอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา นอกจากนี้ค่า BOD_5 และ DO พบว่าตัวอย่างน้ำที่เก็บจากทะเลสาบและอ่างเก็บน้ำมีค่าใกล้เคียงกัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 5 แหล่ง มาแยกสาหร่าย *B. braunii* โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 พบว่า สามารถแยกสาหร่าย *B. braunii* ได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลท โดยแยกได้จากทะเลสาบสงขลา 6 ไอโซเลท และจากอ่างเก็บน้ำในจังหวัดสงขลา 12 ไอโซเลท แล้วนำมาคัดเลือกสาหร่าย *B. braunii* ที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยนำสาหร่ายที่แยกได้เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 เป็นเวลา 21 วัน แล้ววัดค่า pH และน้ำหนักเซลล์แห้ง ทุกๆ 3 วัน พบว่า ไอโซเลท L2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 0.708 ± 0.067 กรัม/ลิตร (ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 0.035 ± 0.007 กรัม/ลิตร) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลสาบสงขลาตอนล่าง รองลงมาคือ SK3 และ Kl4 ซึ่งแยกได้จากอ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา และอ่างเก็บน้ำคลองหลา ตามลำดับ จากนั้นศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *B. braunii* โดยศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม พบว่าผลของการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 4 กรัมต่อลิตร เซลล์สาหร่ายสามารถสะสมน้ำมันได้ปริมาณสูง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีลด์ (Yield) เท่ากับ 11.91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือความเข้มข้นของกลูโคส 6, 2 และ 0 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยีลด์เท่ากับ 10.24, 7.67 และ 4.93 ตามลำดับ และผลของอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสม พบว่าอัตราส่วน C/N เท่ากับ 10 มีปริมาณน้ำมันสูงสุด โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีลด์เท่ากับ 14.28 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันจากสาหร่าย *B. braunii* ไอโซเลท L2 ซึ่งผ่านการคัดเลือก โดยวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) ด้วย Gas Chromatography (GC) พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตกรดไขมัน (Fatty Acid) มีปริมาณ Palmitic Acid (C16:0) สูงสุด คือ 37.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Oleic Acid (C18:1) เท่ากับ 24.65 เปอร์เซ็นต์

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ผลิตน้ำมันในระดับใหญ่ขึ้น (Pilot Scale) เพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริง

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มพัฒนามาตรฐานน้ำมันเชื้อเพลิง .2557. **ความรู้เกี่ยวกับ น้ามันเชื้อเพลิงจากสาหร่าย.** สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง.

กองบรรณาธิการ. 2548. **ไบโอดีเซล- พลังงานทดแทนช่วยชาติ.** เทคนิค: เครื่องกล ไฟฟ้า อุตสาหการ. 22 (256): 154-163.

ชิโนรส ศรีศิริ, ยิ่งยศ ลับภู, ประสงค์ วงศ์วิชา และ กันยรัตน์ โหละสุต. 2552. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของสาหร่ายท้องถิ่นเซลล์เดียว**. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2559. **ความสำคัญของปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี.** ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. http://rdo.psu.ac.th/index.php/recommend/420-psu-palm1. (เข้าถึงเมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม 2559)

นันทวรรณ สโรบล. 2559. **การปลูกสบู่ดำ.** http://alangcity.blogspot.com/2013/03/blog-post_14.html. (เข้าถึงเมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม 2559)

ปัทมาภรณ์ หมาดนุ้ย และศักดิ์อนันต์ ปลาทอง. 2552. **สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา**. http://slbkb.psu.ac.th/jspui/handle/2558/539 (เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 มิถุนายน 2559)

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2559. **Triglyceride / ไตรกลีเซอไรด์.** http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1001/triglyceride (เข้าถึงเมื่อวันที่ 8 สิงหาคม 2559)

พนิดา รัตนพลที. 2551. **ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก.** วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 16 (1): 9-13.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. **สาหร่ายวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยศวดี สวัสดิรักษา. 2547. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถานวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนจากน้ำมันปาลม์และพืชน้ำมัน. 2555. **ไบโอดีเซลคืออะไร.** คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. http://www.biodiesel.eng.psu.ac.th/whatis.php (เข้าถึงเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน 2555)

เสาวภา อังสุภานิช. 2555. **ระบบนิเวศทะเลสาบสงขลา.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 96 หน้า

ศิริพรรณ จันทร์น้ำท่วม, 2557. **การคัดแยก *Botryococcus braunii* และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรคาร์บอน**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร์. 2555. **การศึกษาสภาวะการเลี้ยงจุลสาหร่ายที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและไขมัน**. วารสารวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 7(2): 62-71.

Agarwal, A.K. 2007. **Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines.** Progress in Energy and Combustion Sciene 33: 233–271.

Aresta, M., Dibenedetto, A. and Barberio, G. 2005. **Utilization of macro-algae for enhanced CO_2 fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study**. Fuel Process Technol 86(14-15): 1679-1693.

Ashokkumar, V. and Rengasamy, R. 2012, **Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production**. Journal of Bioresource Technology 104: 394-399.

Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U. C. 2002. ***Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals**. Crit Rev Biotechnol 22:245–279.

Bouarab, L., Dauta, A. and Loudiki, M. 2004. **Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration**. Water Research 38: 2706-2712.

Cheirsilp, B. and Torpee, S. 2012. **Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation**. Bioresource Technology. 110. 510–516

Chisti, Y. 2007. **Biodiesel from microalgae**. Biotechnology Advances 25: 294 – 306.

Chunfang, G., Yan, Z., Yi, D. and Qingyu, W. 2010. **Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides***. Applied Energy 87: 756 – 761.

Dayanada, C., Sarada, R., Shamata, T. R., Ravishakar, G. A. 2006. **Influence of nitrogen source on growth, hydrocarbon and fatty acid production by *Botryococcus braunii*.** Asian Journal Plant Science. 5(5): 799-804.

Dayanada, C., Saradaa, R., Usha Ranib, M., Shamalab, T. R. and Ravishankar, G. A. 2007. **Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media**. Biomass and Bioenergy 31: 87 – 93.

Dayanada, C., Kumudha, A., Sarada, R. and Ravishankar, A. 2012. **Isolation, characterization and outdoor cultivation of green microalgae *Botryococcus* sp.**. Scientific Research and Essays 5: 2497 - 2505.

Demirbas, A. 2002. **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol**. Energy Convers Manage 43: 2349-2356.

Fang, J. Y., Chiu, H. C., Wu, J. T., Chiang, Y. R., Hsu, S. H. 2004. **Fatty acid in *Botryococcus braunii* accelerate tropical delivery of flurbiprofen into and across skin**. Int. Pharm. 276: 163-173.

Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. **Biodiesel fuel production by transesterification of oils**. Journal of Bioscience and Bioengineering 92: 405-416.

Gudin, C. and Thepnier, C. 1986. **Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae**. Advance in Biotechnological Processes. 6: 73-110.

Illman, A.M., Scragg, A.H. and Shales, S.W. 2000. **Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium**. Enzyme and Microbial Technology 27: 631–635.

Jitputti, J., Kitiyanan, B., Rangsunvigit, P., Bunyakiat, K., Attanatho, L. and Jenvanitpanjakul, P. 2005. **Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts**. Chemical Engineering Journal 116: 61-66.

Khan, A.K. 2002. **Research into Biodiesel Kinetics and Catalyst Development**. www.cheque.uq.edv.au (เข้าถึงเมื่อวันที่ 16 มกราคม 2558)

Ma, F., Clements, L.D. and Hanna, M.A. 1999. **The effect of mixing on transesterification of beef tallow**. Bioresource Technology 69: 289-293.

Marchetti, J.M., Miguel, V.U. and Errazu, A.F. 2005. **Possible methods for biodiesel production**. Renewable and Sustainable Energy Reviews 20: 280-285.

Maxwell, J. R., Douglas, A.G., Eglinton, G. and Mccormick, A. 1968. **The Botryococcenes Hydrocarbons of Novel Structure from the alga *Botryococcus braunii,* Kutzing,** Phytochemistry. 7: 2157-2171.

Meher, L.C., Sagar, D. and Naik, S.N. 2004. **Technical aspects of biodiesel production by Transesterification-a review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews 10: 1-21.

Natalia, O. Z., Galina, S. K. and Tatiana, G. V. 2011. **Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252**. Journal of Applied Phycology 23: 47 – 52.

Pooja, K. and Himabindu, V. 2014. **Mixotrophic Cultivation of *Botryococcus Braunii* for Biomass and Lipid Yields with Simultaneous CO_2 Sequestration**. Journal of Engineering Research and Applications 4(10): 151-156.

Ramadhas, A.S., Jayaraj, S. and Muraleeharan, C.. 2005. **Biodiesel production from high FFA rubber seed oil**. Fuel 84: 335-340.

Sawayama, S., Inoue, S. and Yokoyama, S. 1995. **Phylogenetic position of *Botryococcus braunii* on small subunit of ribosomal RNA sequence data**. Journal of Phycology. 31: 419-425.

Srivastava, A. and Prasad, R. 1999. **Triglycerides - based diesel fuels**. Renewable and Sustainable Energy Review 4: 111-133.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

Tony Mcginley, 2001. **Algae Pre-historic and Furure Oil Source.** SUSTAINABLE ENERGY AUTHOR IRELAND (SEAI). http://wood-pellet-ireland.blogspot.com/2011/07/algae-pre-historic-and-furure-oil.html (เข้าถึงเมื่อวันที่ 31 ตุลาคม 2557)

Tran, H. L., Kwon, J. S., Kim, Z. H., Oh, Y. and Lee, C. G. 2010. **Statistical Optimization of Culture Media for Growth and Lipid Production of *Botryococcus braunii* LB572.** Biotechnology and Bioprocess Engineering 15: 277 - 284.

Vangprasert, R. 1986. **Baseline for the Cultivation of Native Oil Rich Algae (*Botryococcus braunii*), as the Potential Source of the Biocrude Oil Production in Thailand.** Thesis of Master of Science Technology of Environmental Management Mahidol University Bangkok, Thailand.

Waste Management and Research Center. 2006. **Small Scale Biodiesel Production.** www.wmrc.com. (เข้าถึงเมื่อวันที่ 16 มกราคม 2558)

Widjaja, A., Chien, C. C. and Yi-Hsu Ju, b. 2009. **Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 40; 13–20.

Yaming, G., Junzhi, L. and Guangming, T. 2011. **Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO_2 concentration in photobioreactor.** Bioresource Technology 102: 130 – 134.

Yeesang, C. and Cheirsilp, B. 2011. **Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand.** Bioresource Technology 102: 3034 – 3040.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

Yoo, C., Jun, S. Y., Jae-Yon Lee, J. Y., Ahn, C. H. and Oh, H. M. 2010. **Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide**. Bioresource Technology 101: 71 – 74.

Zhila, N. O., Kalacheva, G. S. and Volova, T. G. 2005. **Effect of Nitrogen Limitation on the Growth and Lipid Composition of the Green alga *Botryococcus braunii* Kutz. IPPAS H-252**. Russian Journal of Plant Physiology. 52(3): 311-319.

Zhou, A. and Thomson, E. 2009. **The development of biofuels in Asia**. Applied Energy 86: 11– 20.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

1. อาหาร BG-11

$NaNO_3$	1.5	กรัม/ลิตร
K_2HPO_4	0.04	กรัม/ลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.075	กรัม/ลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.036	มิลลิกรัม/ลิตร
Citric acid	6.0	มิลลิกรัม/ลิตร
Ferric ammonium citrate	6.0	มิลลิกรัม/ลิตร
EDTA	1.0	มิลลิกรัม/ลิตร
Na_2CO_3	0.02	กรัม/ลิตร
Trace metal	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Trace metal:

H_3BO_3	2.86	กรัม/ลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	1.81	กรัม/ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222	กรัม/ลิตร
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39	กรัม/ลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.079	กรัม/ลิตร
$Co(NO_3)_2.H_2O$	0.0494	กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการ

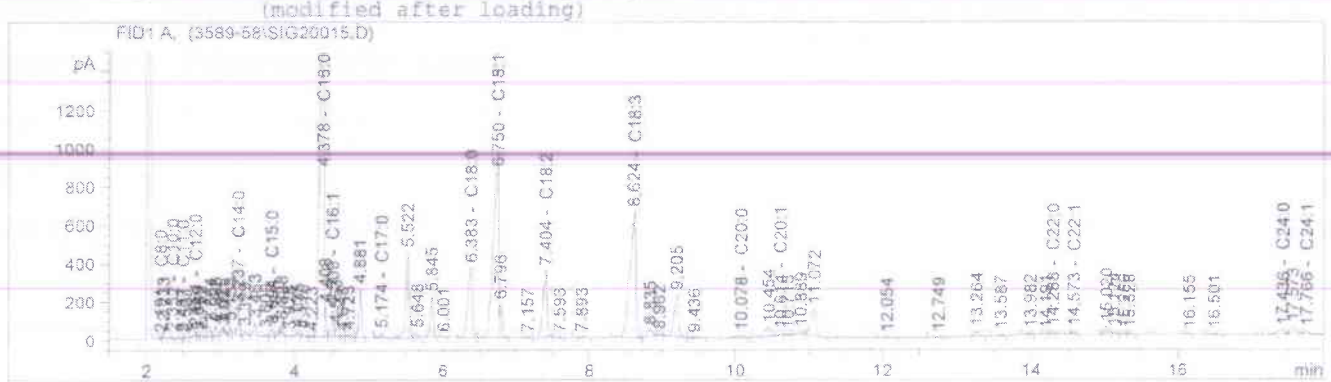
1. นำหลอดเซนตริฟิวขนาด 15 มิลลิลิตร ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ใช้ปิเปตดูดสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ลงในหลอดเซนตริฟิวปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง
3. นำสาหร่ายจากข้อ 2 ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำสาหร่ายออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก
5. นำค่าที่ได้มาคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากสูตร

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

$$= \frac{\text{(น้ำหนักของสาหร่ายหลังอบ – น้ำหนักของหลอดเมื่ออบครั้งแรก)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างเริ่มต้น}} * 1000$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

```
Injection Date  : 9/23/2015 5:01:02 PM          Seq. Line :   4
Sample Name     : L2-FAME                        Vial :   3
Acq. Operator   : Pimpimol                       Inj :   1
                                                 Inj Volume : 1 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3589-583.M
Last changed    : 9/23/2015 3:49:48 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3589-58L.M
Last changed    : 9/25/2015 9:53:09 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



Area Percent Report

```
Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      9/25/2015 9:51:23 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: FID1 A,
```

Peak #	RetTime [min]	Type		Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	2.191	BB	+	0.0225	6.54119	0.02557	C8:0
2	2.258		+	0.0000	0.00000	0.00000	C9:0
3	2.352	BB	+	0.0258	17.57961	0.06355	C10:0
4	2.487	BB	+	0.0268	5.94613	0.02142	C11:0
5	2.661	BB	+	0.0236	43.35329	0.14904	C12:0
6	2.901		+	0.0000	0.00000	0.00000	C13:0
7	3.237	BB	+	0.0282	256.47293	0.92485	C14:0
8	3.694	BB	+	0.0300	82.75006	0.29815	C15:0
9	4.378	VV	+	0.0458	7540.31201	27.17150	C16:0
10	4.509	VV	+	0.0347	314.48691	1.14351	C16:1
11	5.174	BB	+	0.0508	78.46714	0.28276	C17:0
12	6.383	BV	+	0.0616	1537.46338	5.54025	C18:0
13	6.750	VV	+	0.0673	5008.26660	18.04728	C18:1
14	7.404	BB	+	0.0565	1371.95032	4.94382	C18:2
15	8.624	BB	+	0.0761	3740.70898	13.47964	C18:3
16	10.078	BB	+	0.0873	49.29493	0.17763	C20:0
17	10.614	BB	+	0.0537	29.44856	0.10612	C20:1
18	14.288	BB	+	0.0427	37.35740	0.13462	C22:0
19	14.573	BB	+	0.0439	35.49214	0.12790	C22:1
20	17.436	BB	+	0.0823	110.72962	0.39901	C24:0
21	17.766	BB	+	0.0538	48.85937	0.17606	C24:1
Totals :					2.03136e4	73.2002	

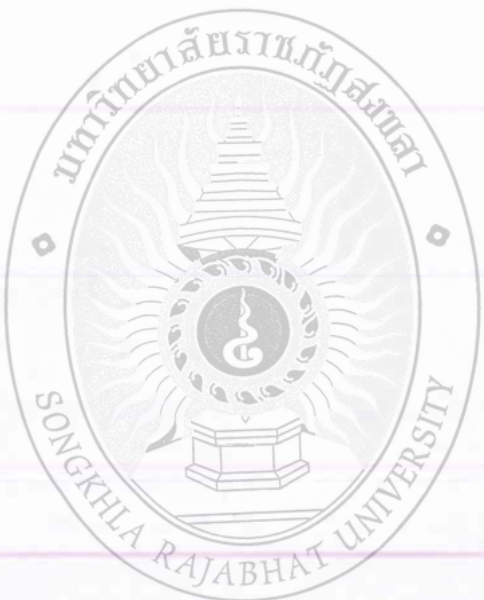
```
 Results obtained with enhanced integrator!
2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Time reference compound(s) not found
```

*** End of Report ***

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1. **หัวหน้าโครงการวิจัย**

2556: การคัดเลือก *Bacillus* spp. เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการเพาะเลี้ยงกุ้ง
ทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา



ประวัติย่อคณะผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวสุธินี หีมยิ
ตำแหน่ง อาจารย์ประจำตามสัญญา
โปรแกรมวิชา ชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัย ราชภัฏสงขลา
ผลงานวิชาการ

1. สีตีอาอีเสาะ อีบุ๊ สาบารียะ กะจิ และ**สุธินี หีมยิ**. 2558. ชนิดและการแพร่กระจายของไส้เดือนทะเลวงศ์ Serpulidae ที่เกาะบนรากโกงกางบริเวณคลองพะวง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ "ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา ครั้งที่ 3" ระหว่างวันที่ 28-29 พฤษภาคม 2558 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. หน้า 1250 – 1263. สงขลา.

2. เสาวภา อังสุภานิช และ**สุธินี หีมยิ**. 2555. สัตว์พื้นใต้น้ำกลุ่มหนอนปล้อง: โพลิชีตในทะเลสาบสงขลา. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 270 หน้า.

3. **สุธินี หีมยิ**, เสาวภา อังสุภานิช และจรัสศรี อ่างตันญา. 2552. ไส้เดือนทะเลหน้าดินในเขตน้ำท่วมบริเวณเกาะลิดีเล็ก จังหวัดสตูล. วารสารการประมง. 62: 341 – 350.

4. เสาวภา อังสุภานิช จรัสศรี อ่างตันญา พรสันติ์ สัมพันธรัตน์ พัชรี แก้วประการ **สุธินี หีมยิ** รัชนี พุทธปรีชา และตันติพงษ์ เพชรไชยา. 2551. อิทธิพลของปะการังเทียมต่อสัตว์หน้าดินในบริเวณฝั่ง จ. ปัตตานี และ จ. นราธิวาส. โครงการฟื้นฟูทรัพยากรชายฝั่งทะเล อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดปัตตานี และจังหวัดนราธิวาส (กิจกรรมประเมินผลสำเร็จ) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: 3-26 – 3-66.

5. คนึงนิจ แก้วทอง ฐิติพร ธีรวิกรานต์ และ**สุธินี หีมยิ**. 2557. ความหลากหลายและความชุกชุมของสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดกลางบริเวณหาดเก้าเส้งถึงแหลมสนอ่อน จังหวัดสงขลา. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย" ครั้งที่ 6 ระหว่างวันที่ 3-4 กรกฎาคม 2557 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. (นำเสนอโปสเตอร์)

6. วาริก เส็นนาฮู อัครเดช แหลมกา และ**สุธินี หีมยิ**. 2557. ความหลากหลายของสัตว์หน้าดินขนาดกลางบริเวณหาดสะกอม จังหวัดสงขลา. ในการประชุมวิชาการอนุกรมวิธานและชีสเทมาติคส์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 23 -25 พฤษภาคม 2557 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก. (นำเสนอโปสเตอร์)

7. ซามีมี มะนุ อาอีซ๊ะห์ มิง และ**สุธินี หีมยิ**. 2556. แพลงก์ตอนพืชที่อาจก่อให้เกิดอันตรายบริเวณคลองพะวง ตำบลพะวง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย" ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 1 -2 สิงหาคม 2556 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. (นำเสนอโปสเตอร์)

8. สุไหวย๊ะ แดสา ศิริกาน โสะหลี และ**สุธินี หีมยิ**. 2556. การใช้แพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นในการชี้วัดคุณภาพน้ำบริเวณคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย" ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 1 -2 สิงหาคม 2556 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. (นำเสนอโปสเตอร์)

9. ปรัชญา หะหมาน นางสาวพัชรี เทพสุริบูรณ์ และ**สุธินี หีมยิ**. 2556. ความหลากหลายและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช บริเวณอ่างเก็บน้ำสิริกิติ์ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย" ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 1 -2 สิงหาคม 2556 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. (นำเสนอโปสเตอร์)

10. **สุธินี หีมยิ** สุไหวย๊ะ แดสา และศิริกาน โสะหลี. 2556. ชนิดและการแพร่กระจายของแพลงก์ตอนพืชในคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา. ในการประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 6 สาหร่ายและแพลงก์ตอน: จากรากฐานสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน วันที่ 28-30 มีนาคม 2556 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่. (นำเสนอโปสเตอร์)

11. พงศธร จันทรัตน์ **สุธินี หีมยิ** และสัลวา ตอปี. (2556). การศึกษาประชาคมแพลงก์ตอนสัตว์เบื้องต้นในทะเลสาบสงขลาตอนกลาง. ในการประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติครั้งที่ 6 สาหร่ายและแพลงก์ตอน: จากรากฐานสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน วันที่ 28-30 มีนาคม 2556 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่. (นำเสนอโปสเตอร์)

12. Angsupanich, S., Ruensirikul, J. and **Himyi, S.** 2010. Redescription of *Ctenapseudes sapensis* (Chilton, 1926) from the Upper Songkhla Lagoon, Thailand. (Crustacea: Tanaidacea). Songklanakarin Journal of Science and Technology 32 (4): 349 – 355.

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

1. ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

2552-2555 : การเชื่อมโยงระหว่างการศึกษาพรรณสัตว์พื้นใต้น้ำในทะเลสาบสงขลาและการถ่ายทอดความรู้สู่ชุมชนท้องถิ่น
ทุนสนับสนุนภายใต้สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

2548-2550 : โครงการการฟื้นฟูทรัพยากรชายฝั่งทะเลอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.ปัตตานี และ จ. นราธิวาส (กิจกรรมประเมินผลสำเร็จ)
ทุนสนับสนุนภายใต้สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงาน กปร.)

2. งานวิจัยที่กำลังทำ :

1. ความหลากหลายและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนบริเวณหาดแก้วลากูน จังหวัดสงขลา : ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ประจำปีงบประมาณ 2558