

สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Desmodium quadricauda* โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

Optimization Model for Cultivation of Green Alga, *Desmodium quadricauda* as Feedstock for Biodiesel Production

พัฒนศักดิ์ ชิวปรีชา¹ และสุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์¹
Pattanasak Chewpreecha¹ and Suneerat Ruangsomboon¹

บทคัดย่อ

การใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Desmodium quadricauda* สำหรับใช้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล โดยคัดกรองปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวล และผลผลิตน้ำมันของสาหร่าย 7 ปัจจัย พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่อผลผลิตน้ำมันในทางบวก คือ KNO_3 , KH_2PO_4 , Fe, NaCl, light intensity และ CO_2 โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. quadricauda* เพื่อผลิตน้ำมันโดยใช้การทดลอง central composite design ที่ 6 ปัจจัย ได้สมการทำนายน้ำมัน ดังนี้ $Y(\text{lipid}) = 0.0038 + (0.0066 \text{KNO}_3) + (0.0028 \text{KH}_2\text{PO}_4) - (0.0130 \text{Fe}) + (0.0002 \text{NaCl}) - (0.0020 \text{CO}_2) - (0.0029 \text{KNO}_3 * \text{KNO}_3) + (0.0007 \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{KH}_2\text{PO}_4) + (0.3070 \text{Fe} * \text{Fe}) + (0.0001 \text{CO}_2 * \text{CO}_2) + (0.0006 \text{KNO}_3 * \text{KH}_2\text{PO}_4) + (0.0133 \text{KNO}_3 * \text{Fe}) + (0.0001 \text{KNO}_3 * \text{light intensity}) + (0.0005 \text{KNO}_3 * \text{CO}_2) + (0.0005 \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{Fe}) - (0.00001 \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{NaCl}) - (0.0001 \text{Fe} * \text{CO}_2)$ การทำนายปัจจัยการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อชีวมวล และผลผลิตน้ำมัน โดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface method) คือ ปริมาณ KNO_3 ที่ 2.44 g/L, KH_2PO_4 ที่ 2.44 g/L, Fe ที่ 0.12 g/L, NaCl ที่ 20.87 g/L, light intensity ที่ 82.52 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ และ CO_2 ที่ความเข้มข้น 6.09 % ซึ่งจะมีผลผลิตชีวมวล 1.34 g/L อัตราการผลิตชีวมวลที่ 0.06 g/L/d ผลผลิตน้ำมัน 1.02 g/L และมีอัตราการผลิตน้ำมันที่ 0.13 g/L/d

คำสำคัญ : *Desmodium quadricauda* ไบโอดีเซล แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ น้ำมัน

Abstract

Optimization model for cultivation of green alga, *Desmodium quadricauda* as feedstock for biodiesel production was performed by screening 7 factors which affected to biomass and lipid production of this alga. The factors; KNO_3 , KH_2PO_4 , Fe, NaCl, light intensity and CO_2 had significant positive effect to this alga. The optimization model by using central composite design (6 factors) for lipid production of this alga was: $Y(\text{lipid}) = 0.0038 + (0.0066 \text{KNO}_3) + (0.0028 \text{KH}_2\text{PO}_4) - (0.0130 \text{Fe}) + (0.0002 \text{NaCl}) - (0.0020 \text{CO}_2) - (0.0029 \text{KNO}_3 * \text{KNO}_3) + (0.0007 \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{KH}_2\text{PO}_4) + (0.3070 \text{Fe} * \text{Fe}) + (0.0001 \text{CO}_2 * \text{CO}_2) + (0.0006 \text{KNO}_3 * \text{KH}_2\text{PO}_4) + (0.0133 \text{KNO}_3 * \text{Fe}) + (0.0001 \text{KNO}_3 * \text{light intensity}) + (0.0005 \text{KNO}_3 * \text{CO}_2) + (0.0005 \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{Fe}) - (0.00001 \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{NaCl}) - (0.0001 \text{Fe} * \text{CO}_2)$. The optimum factors for biomass and lipid production by response surface method were 2.44 g/L of KNO_3 , 2.44 g/L of KH_2PO_4 , 0.12 g/L of Fe, 20.87 g/L of NaCl, light intensity 82.52 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ and 6.09 % of CO_2 which provided 1.34 g/L of biomass, 0.06 g/L/d of biomass production rate, 1.02 g/L of lipid yield, and 0.13 g/L/d of lipid production rate.

Keywords: *Desmodium quadricauda*, biodiesel, model, lipid

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

คำนำ

ปัจจุบันแหล่งพลังงานทางเลือกหลายประเภทได้รับความสนใจโดยเฉพาะเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) ซึ่งพบว่าสาหร่ายได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาเป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพเหล่านี้ เนื่องจากเจริญเติบโตรวดเร็วที่พืชบก เป็นแหล่งพลังงานที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพราะมีการนำคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ระหว่างการเจริญเติบโต สาหร่ายสามารถนำมาทำเชื้อเพลิงชีวภาพได้ทั้งไบโอเอทานอล ไบโอมีเทน และไบโอดีเซล ซึ่งเชื้อเพลิงประเภทหลังสุดคือเชื้อเพลิงที่มีความนิยมและต้องการมากที่สุด เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่มีการใช้มากในโรงงานอุตสาหกรรมและการคมนาคม สาหร่ายขนาดเล็กมีน้ำมัน 20-80 % ของน้ำหนักแห้ง และให้น้ำมันได้มากถึง 58,700-136,900 ลิตรต่อเฮคแตร์ต่อปี จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล (Chisti, 2007)

เกณฑ์สำคัญที่จะทำให้การนำสาหร่ายมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงได้สำเร็จในเชิงพาณิชย์คือ ต้องมีสายพันธุ์สาหร่ายที่เหมาะสม ให้ผลผลิตมวลชีวภาพ และน้ำมันสูง และการเพาะเลี้ยงต้องมีต้นทุนต่ำ โดยจากการศึกษาขั้นต้นของผู้วิจัยพบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Desmodesmus quadricauda* เป็นสาหร่ายที่เจริญเติบโตได้รวดเร็ว โดยเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ที่ 24-28 วัน ปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ดี และ Han *et al.* (2015) รายงานว่ามีผลผลิตชีวมวลสูง (1 g/L DW) มีโปรตีน 31-36 % แต่ยังมีน้ำมันอยู่ในปริมาณที่ไม่สูงมาก 27-31% เมื่อเทียบกับสาหร่ายบางชนิดเช่น *Botryococcus braunii* (Ruangsomboon, 2012) ดังนั้นการที่จะทำให้สาหร่ายชนิดนี้สามารถเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซลได้ในเชิงพาณิชย์ คือต้องทราบสภาวะที่กระตุ้นให้สาหร่ายมีมวลชีวภาพ และน้ำมันสูงที่สุด ซึ่งสภาวะดังกล่าวต้องอาศัยหลายปัจจัยในการเลี้ยงร่วมกันอย่างเหมาะสม

ปริมาณน้ำมันของสาหร่าย ผันแปรตามปริมาณสารอาหารและสภาวะในการเลี้ยงสาหร่าย (Mulbry *et al.*, 2008) เช่น ไนโตรเจน (Converti *et al.*, 2009; Widjaja *et al.*, 2009) ฟอสฟอรัส (Ruangsomboon *et al.*, 2013) โดยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสช่วยให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้เร็ว เพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย และหากขาดธาตุอาหารทั้งสองชนิดพบว่าการเจริญเติบโตจะลดลงแต่ปริมาณน้ำมันของสาหร่ายจะเพิ่มขึ้น สำหรับหลักมีบทบาทในการช่วยเพิ่มปริมาณรงควัตถุของสาหร่ายทำให้ผลผลิตชีวมวลเพิ่มมากขึ้น (Liu *et al.*, 2008) ส่วนความเข้มข้นแสงช่วยในการสังเคราะห์ด้วยแสงทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตและอาหารสะสมมากขึ้น ซึ่งสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการระดับแสงที่เหมาะสมต่างกัน (Amaro *et al.*, 2012) ความเค็มจะทำให้สาหร่ายน้ำจืดเกิดความเครียดและมีการสะสมน้ำมันมากขึ้น แต่บางครั้งพบว่าความเค็มระดับต่ำช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ (Takagi *et al.*, 2006) คาร์บอนไดออกไซด์ช่วยในการสังเคราะห์ด้วยแสงระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีมีอาหารสะสมสูงขึ้น (Ho *et al.*, 2010) และวิตามินมีส่วนช่วยในการนำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นและช่วยให้มีการสะสมน้ำมันในเซลล์มากขึ้น (Grant *et al.*, 2014) โดยปัจจัยต่างๆ ล้วนแล้วส่งผลซึ่งกันและกัน ในสาหร่ายชนิดเดียวกันจึงมีการเจริญเติบโตและมีปริมาณของน้ำมันที่แตกต่างกันหากได้รับสารอาหารต่างกัน

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง ล้วนมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันของสาหร่าย การทดลองศึกษาอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมในอดีตจะทำการศึกษาทีละปัจจัยซึ่งจะใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูงและได้ค่าตัวเลขโดยประมาณเท่านั้น จึงได้นักวิจัยทำการพัฒนารูปแบบทางสถิติและใช้สมการทางคณิตศาสตร์เพื่อหาความเหมาะสมของสภาวะต่างๆ หลายปัจจัยร่วมกัน โดยได้ผลที่แม่นยำ รวดเร็ว และสามารถคาดการณ์ผลผลิตในอนาคตได้ อีกทั้งยังประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่าย โดยรูปแบบการประเมินปัจจัยที่เหมาะสมที่ใช้คือ การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) เนื่องจากเป็นแบบการทดลองโดยอิทธิพลของปัจจัยร่วม ซึ่งเราสามารถทราบผลของปัจจัยหลัก (main effects) และจำนวนของปัจจัย (interaction effects) และนำมาทำการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (response surface method, RSM) ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ผลคือสามารถที่จะทราบสภาวะในการเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม (optimization) เมื่อพิจารณาหลายปัจจัยพร้อมๆ กัน และสามารถ

วิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) เพื่อใช้ในการคาดการณ์ได้ ซึ่งโดยทั่วไปรูปแบบของพื้นผิวตอบสนองจะแม่นยำกว่าการใช้วิธีการศึกษาที่ละปัจจัย (one factor at a time) (Cheng *et al.*, 2013)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเสนอและแสดงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลและผลผลิตน้ำมันในการเพาะเลี้ยงที่ทำให้สาหร่าย *D. quadricauda* มีผลผลิตน้ำมันสูง โดยการผันแปรปัจจัยต่างๆ ร่วมกัน แล้วทำนายปัจจัยโดยใช้สมการจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อเป็นแนวทางการเพาะเลี้ยงและนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ในด้านพลังงานทดแทน ช่วยลดวิกฤตปัญหาด้านการขาดแคลนพลังงานของมนุษย์ในอนาคต รวมถึงลดการพึ่งพาพลังงานจากต่างประเทศได้อีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. quadricauda* ที่คัดแยกจากบ่อเลี้ยงปลา อาคารเรียนรวมตึกพระเทพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในอาหารสูตร Chlorella medium (Vonshak and Maske, 1982) ในห้องเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อ ความเข้มแสง $48 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ให้แสง 24 h อุณหภูมิ $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ เพื่อใช้สาหร่ายเป็นหัวเชื้อในการศึกษาขั้นต่อไป

2. การศึกษาผลของปัจจัยที่เหมาะสมต่อชีวมวลและปริมาณน้ำมันของสาหร่าย

ทำการคัดกรอง (screening) ปัจจัยที่มีอิทธิพลร่วมต่อชีวมวลและน้ำมัน โดยวางแผนการทดลองแบบ two-level factorial design โดยมี 7 ปัจจัย (factors) คือ ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, เหล็ก, คาร์บอนไดออกไซด์, ความเข้มแสง, ความเค็ม และวิตามินบี 12 (B_{12} , cyanocobalamin) ตามรายละเอียดใน Table 1 (Ho *et al.*, 2012; Ruangsomboon, 2012, 2013) ออกแบบการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป minitab17 โดยมีชุดทดลองทั้งหมด 64 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 4 ข้ำ เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเลี้ยงสาหร่ายตามปัจจัยทดลองที่กำหนดแบบปลอดเชื้อ แสงสว่าง 12:12 h เป็นเวลา 28 d ที่ระดับอุณหภูมิ $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ วัดชีวมวล (dry weight) และน้ำมัน (Bligh and Dyer, 1959) ทุก 3 วัน วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ โดยทำการคัดกรองปัจจัยที่ต้องการจากค่า significant ค่า $p < 0.1$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 % แล้วนำปัจจัยที่มีค่า significant ที่ได้ไปศึกษาหาระดับที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface method) ด้วยการทดลองแบบ central composite design (CCD)

Table 1 Screening factors for biomass and lipid production of *D. quadricauda*.

No.	Model	Factors	Low level (-)	High level (+)
1	A	KNO_3 (g/L)	0.1	2
2	B	KH_2PO_4 (g/L)	0.1	2
3	C	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0	0.1
4	D	NaCl (mM)	0.01	100
5	E	Light intensity ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	22	69
6	F	B_{12} (cyanocobalamin, mg/L)	0	0.02
7	G	CO_2 (%)	0	5

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลและผลผลิตน้ำมันของสาหร่าย *D. quadricauda*

การใช้แผนการทดลองของ two-level factorial design เพื่อคัดเลือกปัจจัยหลาย ๆ ปัจจัย (Table 1) ให้เหลือเพียงปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อชีวมวลและการผลิตน้ำมันของสาหร่ายขนาดเล็ก *D. quadricauda* จากการวิเคราะห์ชีวมวลและน้ำมันของสาหร่ายที่สิ้นสุดการทดลอง พบว่าปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ light intensity รองลงมาคือ Fe, KNO_3 ร่วมกับ cyanocobalamin, KH_2PO_4 , KNO_3 , NaCl, CO_2 และ KH_2PO_4 ร่วมกับ NaCl ตามลำดับ (Figure 1A) ส่วนปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำมันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ light intensity รองลงมาคือ NaCl, KH_2PO_4 , KNO_3 ร่วมกับ Fe, KNO_3 และ CO_2 ตามลำดับ (Figure 1B)

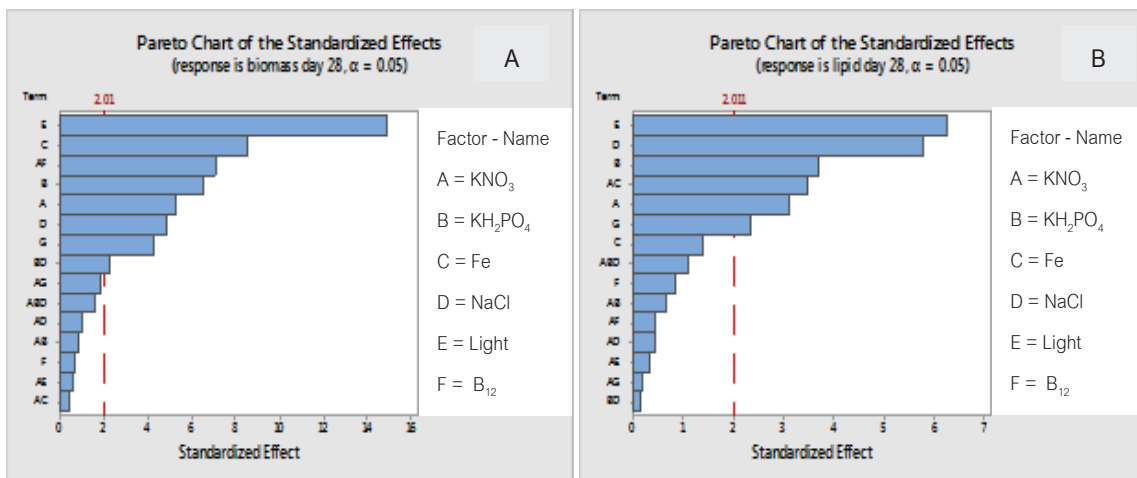


Figure 1 Factors influence on biomass (A) and lipid production (B) of *D. quadricauda*.

การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชีวมวลของสาหร่าย พบว่า KNO_3 , KH_2PO_4 , Fe, NaCl, light intensity, cyanocobalamin และ CO_2 มีอิทธิพลต่อชีวมวลในเชิงบวก คือเมื่อเพิ่มปริมาณของปัจจัยผลผลิตชีวมวลจะเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาจากเส้นความชันของกราฟพบว่า light intensity มีอิทธิพลต่อชีวมวลมากที่สุด โดยพิจารณาจากระดับความชันของกราฟ ซึ่งค่าความชันที่สูงหมายถึงปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลสูง (Figure 2A)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำมันในเชิงบวก คือ KNO_3 , KH_2PO_4 , Fe, NaCl, light intensity และ CO_2 ซึ่งหมายความว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของปัจจัยดังกล่าวผลผลิตน้ำมันของสาหร่ายจะเพิ่มขึ้น ส่วนปัจจัยที่มีอิทธิพลในเชิงลบ คือ cyanocobalamin เมื่อเพิ่มปริมาณของปัจจัยผลผลิตน้ำมันจะลดลง และเมื่อพิจารณาจากเส้นความชันของกราฟพบว่า KNO_3 , KH_2PO_4 , NaCl, light intensity และ CO_2 มีอิทธิพลมากต่อผลผลิตน้ำมัน โดยพิจารณาจากระดับความชันของกราฟยิ่งค่าความชันสูง หมายถึงปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลสูงต่อผลผลิตน้ำมันของสาหร่ายที่สิ้นสุดการทดลอง คือวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (Figure 2B)

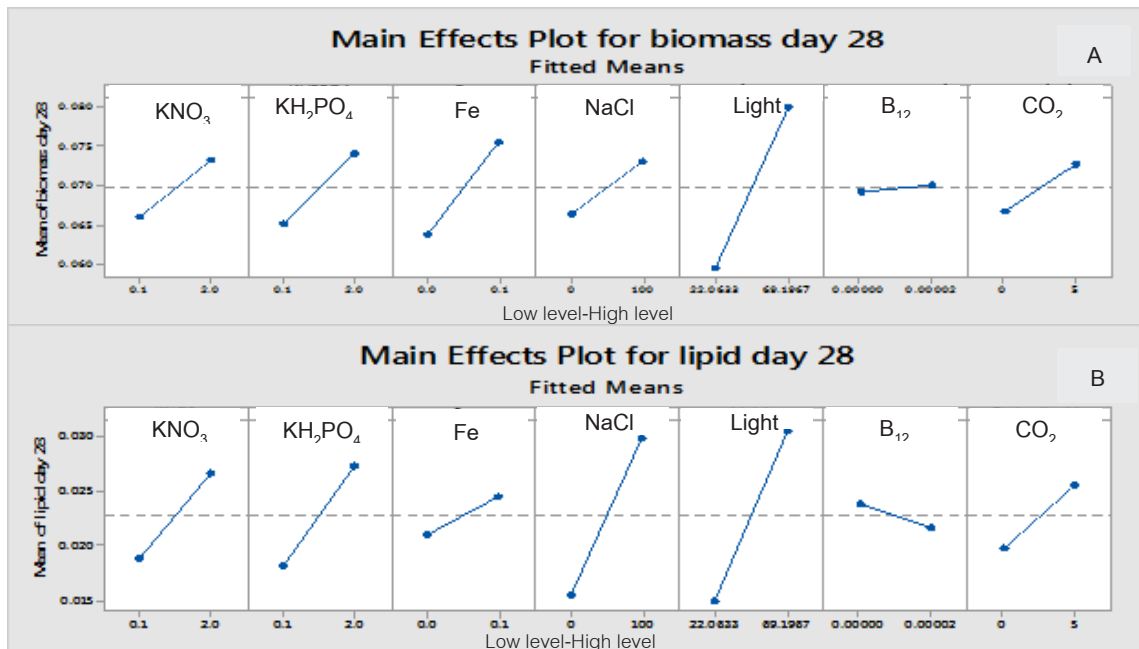


Figure 2 Factors effect on biomass (A) and lipid production (B) of *D. quadricauda* at 28 days of cultivation (KNO_3 -g/L, KH_2PO_4 -g/L, Fe-g/L, NaCl-mM, light intensity- $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, cyanocobalamin-mg/L และ CO_2 -%).

2. อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยต่อชีวมวลและผลผลิตน้ำมันของสาหร่าย *D. quadricauda*

การศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อชีวมวลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ KNO_3 * cyanocobalamin, KNO_3 * CO_2 และ KH_2PO_4 * NaCl (Figure 3) โดย cyanocobalamin มีบทบาททำให้สาหร่ายดูดซึมไนโตรเจนซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างรงควัตถุและการสังเคราะห์แสง ไปใช้ได้มากขึ้น จึงทำให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ส่วน CO_2 ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์แสง ไนโตรเจนจาก KNO_3 ช่วยในการรงควัตถุ สองปัจจัยนี้จึงทำงานเสริมกัน ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของสาหร่าย ส่วนโซเดียมและคลอไรด์ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ซึ่งช่วยเสริมกับฟอสฟอรัสในการถ่ายทอดพลังงานในเซลล์สาหร่าย จึงทำให้สาหร่ายมีพลังงานในการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่ส่งผลต่อผลผลิตน้ำมันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ KNO_3 * Fe และ KNO_3 * cyanocobalamin (Figure 4) โดยเหล็กมีส่วนช่วยให้สาหร่ายสร้างคลอโรฟิลล์ เอ มากขึ้น และช่วยให้ไนโตรเจนเข้าเซลล์ได้มากขึ้น เมื่อผลผลิตชีวมวลมากขึ้น จึงส่งผลให้ผลผลิตน้ำมันมากขึ้นนั่นเอง

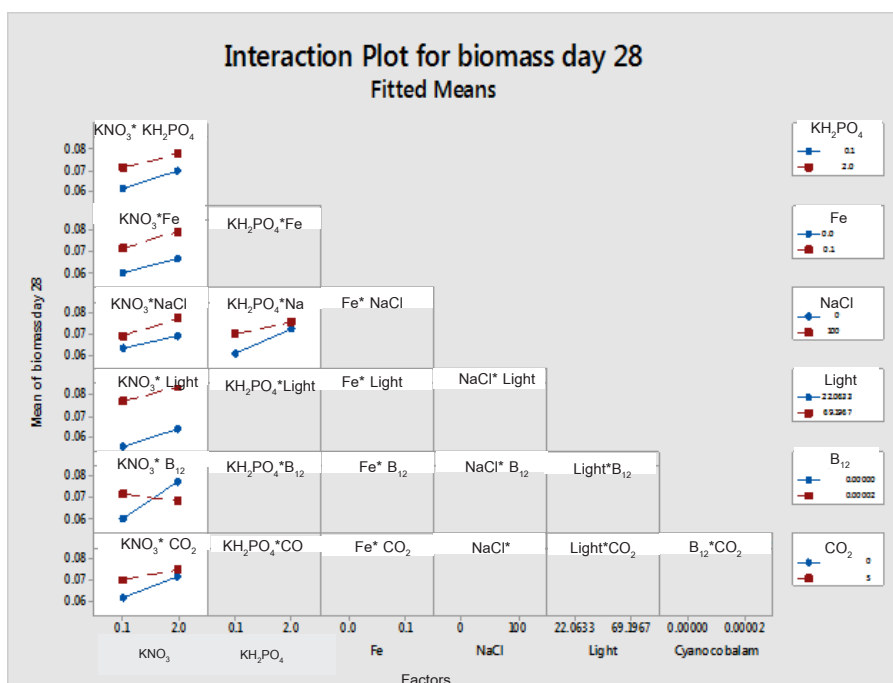


Figure 3 Interaction of tested factors on biomass of *D. quadricauda* at 28 days of cultivation (KNO_3 -g/L, KH_2PO_4 -g/L, Fe -g/L, NaCl-mM, light intensity- $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, cyanocobalamin-mg/L และ CO_2 -%).

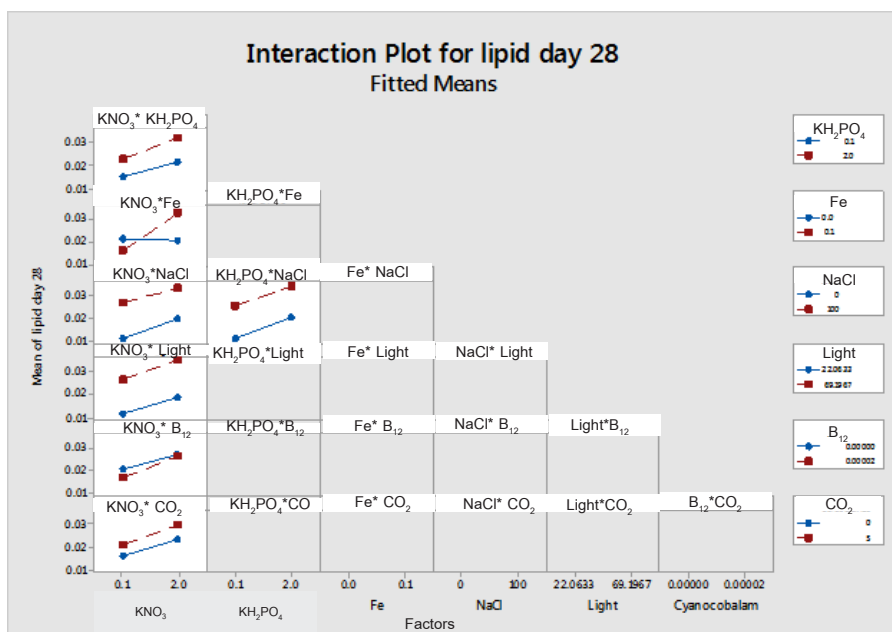


Figure 4 Interaction of tested factors on lipid production of *D. quadricauda* at 28 days of cultivation (KNO_3 -g/L, KH_2PO_4 -g/L, Fe -g/L, NaCl-mM, light intensity- $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, cyanocobalamin-mg/L และ CO_2 -%).

3. พื้นที่ผิวตอบสนองของอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยต่อชีวมวลและผลผลิตน้ำมันของสาหร่าย *D. quadricauda*

การศึกษาระดับที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองซึ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยได้ โดยสามารถบอกค่าที่สูงสุดของตัวแปรตาม (Y_i) โดยพิจารณาจากภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (Figure 5-6) และได้สมการทำนายผลของชีวมวลและผลผลิตน้ำมัน ผลการประมาณสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยเชิงพหุคูณ จากการทดลองเพื่อคัดกรองปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตชีวมวล และผลผลิตน้ำมัน ข้างต้น พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตที่ศึกษา คือ KNO_3 , KH_2PO_4 , Fe, NaCl, light intensity, cyanocobalamin และ CO_2 เมื่อนำปัจจัยดังกล่าวมาออกแบบการทดลองแบบ central composite design แบบ 6 ปัจจัยโดยใช้โปรแกรม design expert ver.7.0 และนำค่าที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์เพื่อหาสมการเพื่อการทำนาย โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ minitab 17 ได้สมการดังนี้

สมการทำนายชีวมวลคือ $Y (\text{biomass}) = 0.09896 + (0.00333 \text{ KNO}_3) + (0.00939 \text{ KH}_2\text{PO}_4) + (0.0540 \text{ Fe}) + (0.000187 \text{ NaCl}) - (0.000155 \text{ light intensity}) - (0.00314 \text{ CO}_2) - (0.00136 \text{ KNO}_3 * \text{KNO}_3) - (0.00164 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{KH}_2\text{PO}_4) - (0.756 \text{ Fe} * \text{Fe}) - (0.000001 \text{ NaCl} * \text{NaCl}) + (0.000002 \text{ light intensity} * \text{light intensity}) + (0.000353 \text{ CO}_2 * \text{CO}_2) + (0.001502 \text{ KNO}_3 * \text{KH}_2\text{PO}_4) + (0.0346 \text{ KNO}_3 * \text{Fe}) - (0.000013 \text{ KNO}_3 * \text{NaCl}) - (0.000027 \text{ KNO}_3 * \text{light intensity}) + (0.000759 \text{ KNO}_3 * \text{CO}_2) + (0.0009 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{Fe}) - (0.000075 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{NaCl}) - (0.000001 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{light intensity}) - (0.000027 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{CO}_2) - (0.000010 \text{ Fe} * \text{NaCl}) - (0.000036 \text{ Fe} * \text{light intensity}) - (0.000020 \text{ Fe} * \text{CO}_2) + (0.000000 \text{ NaCl} * \text{light intensity}) + (0.000000 \text{ NaCl} * \text{CO}_2) + (0.000000 \text{ light intensity} * \text{CO}_2)$

จากสมการพบว่าตัวแปรอิสระหลายค่าเช่น KNO_3 , KH_2PO_4 , Fe และ NaCl เป็นต้น มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าบวก จึงมีอิทธิพลไปในทางบวกต่อค่าตอบสนอง ($Y (\text{biomass})$) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น ค่าชีวมวลจะมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนตัวแปรอิสระที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าลบ เช่น light intensity เป็นต้น หมายความว่าเมื่ออิทธิพลในทางลบต่อค่าชีวมวล นั่นคือถ้าตัวแปรอิสระเหล่านี้มีค่าลดลง ค่าชีวมวลจะมีค่าเพิ่มขึ้นนั่นเอง โดยการที่ KNO_3 , KH_2PO_4 และ Fe มีสัมประสิทธิ์เป็นค่าบวกเนื่องจากเป็นแหล่งของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเหล็กซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยตรง การเพิ่มปริมาณธาตุอาหารเหล่านี้จึงส่งผลในทางบวก ส่วน NaCl แม้จะส่งผลให้เกิดความเค็ม แต่จากการทดลองนี้ใช้ในปริมาณที่ไม่สูงจึงทำให้เป็นการเพิ่มโซเดียม กับคลอไรด์ให้กับสาหร่าย จึงช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ส่วนค่า light intensity มีค่าเป็นลบแสดงว่าสาหร่ายชนิดนี้ชอบความเข้มแสงในระดับต่ำ การเพิ่มความเข้มแสงจะยับยั้งการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย ทำให้มีการเจริญเติบโตลดลง

สมการทำนายผลผลิตน้ำมันคือ $Y (\text{lipid}) = 0.00385 + (0.006613 \text{ KNO}_3) + (0.002816 \text{ KH}_2\text{PO}_4) - (0.0130 \text{ Fe}) + (0.000161 \text{ NaCl}) - (0.000014 \text{ light intensity}) - (0.002080 \text{ CO}_2) - (0.002895 \text{ KNO}_3 * \text{KNO}_3) + (0.000725 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{KH}_2\text{PO}_4) + (0.307 \text{ Fe} * \text{Fe}) + (0.000000 \text{ NaCl} * \text{NaCl}) + (0.000001 \text{ light intensity} * \text{light intensity}) + (0.000117 \text{ CO}_2 * \text{CO}_2) + (0.000627 \text{ KNO}_3 * \text{KH}_2\text{PO}_4) + (0.01329 \text{ KNO}_3 * \text{Fe}) - (0.000000 \text{ KNO}_3 * \text{NaCl}) + (0.000123 \text{ KNO}_3 * \text{light intensity}) + (0.000471 \text{ KNO}_3 * \text{CO}_2) + (0.00051 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{Fe}) - (0.000011 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{NaCl}) - (0.000000 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{light intensity}) + (0.000002 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{CO}_2) - (0.000006 \text{ Fe} * \text{NaCl}) - (0.000003 \text{ Fe} * \text{light intensity}) - (0.00012 \text{ Fe} * \text{CO}_2) - (0.000000 \text{ NaCl} * \text{light intensity}) + (0.000000 \text{ NaCl} * \text{CO}_2) + (0.000000 \text{ light intensity} * \text{CO}_2)$

จากสมการทำนายผลผลิตน้ำมันพบว่าตัวแปรอิสระเช่น KNO_3 , KH_2PO_4 และ NaCl เป็นต้น มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าบวก จึงมีอิทธิพลไปในทางบวกต่อค่าตอบสนอง ($Y (\text{lipid})$) ซึ่งหมายถึง ถ้าตัวแปรอิสระเหล่านี้มีค่าเพิ่มขึ้น ค่าผลผลิตน้ำมันจะมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนตัวแปรอิสระที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าลบ เช่น Fe, light intensity และ CO_2 เป็นต้น หมายความว่าเมื่ออิทธิพลในทางลบต่อผลผลิตน้ำมัน นั่นคือถ้าตัวแปรอิสระเหล่านี้มีค่าลดลง ผลผลิตน้ำมันจะมีค่าเพิ่มขึ้นนั่นเอง จากการที่ KNO_3 , KH_2PO_4 และ NaCl มีอิทธิพลในทางบวกต่อผลผลิตน้ำมัน นั่นเป็นเพราะทั้งสามปัจจัยนี้ส่งผลให้มีผลผลิตชีวมวลสูง จึงทำให้ผลผลิตน้ำมันสูงขึ้นด้วย ส่วนค่า Fe และ CO_2 ซึ่งมีอิทธิพลทางลบต่อผลผลิตน้ำมันเนื่องจาก แม้ทั้ง Fe และ CO_2 จะช่วยกระตุ้นให้มีชีวมวลสูง แต่ทำให้มีการสะสมน้ำมันในปริมาณต่ำ เนื่องจาก

ต้องใช้พลังงานในการแบ่งเซลล์และเน้นการสะสมคาร์โบไฮเดรตมากกว่าน้ำมัน ส่วน light intensity นั้นส่งผลให้ผลผลิตชีวมวลต่ำลง จึงทำให้ผลผลิตน้ำมันต่ำลงด้วยเช่นกัน

การหาจุดเหมาะสมของตัวแปรที่ศึกษา โดยนำข้อมูลจากพื้นที่ผิวตอบสนอง (Figure 5-6) มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเพื่อหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัยที่จะส่งผลให้มีชีวมวลสูงสุด จากผลการทำนายปริมาณของปัจจัยที่เหมาะสมต่อผลผลิตชีวมวล และผลผลิตน้ำมัน โดยพิจารณาจากผลผลิตทั้งหมด คือ ปริมาณ KNO_3 ที่ 2.44 g/L, KH_2PO_4 ที่ 2.44 g/L, Fe ที่ 0.12 g/L, NaCl ที่ 20.87 g/L, light intensity ที่ 82.52 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ และ CO_2 ที่ 6.09 % สามารถให้ผลผลิตชีวมวล 1.34 g/L อัตราการผลิตชีวมวลที่ 0.06 g/L/d ผลผลิตน้ำมัน 1.02 g/L และให้อัตราการผลิตน้ำมันที่ 0.13 g/L/d

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษากับสาหร่ายในสกุลเดียวกัน จากการศึกษาของ Ji *et al.* (2014) ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Desmodesmus* sp. EJ15-2 โดยศึกษาปัจจัยคือ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มแสงและช่วงเวลาได้รับแสง ต่อผลผลิตชีวมวล และประเมินความเหมาะสมโดยวิเคราะห์การตอบสนองของพื้นที่ผิว พบว่าสภาวะในการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่มีความสัมพันธ์สูงต่อผลผลิตชีวมวล (0.76 g/L) คืออุณหภูมิ 30°C ที่ความเข้มแสง 98 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ และช่วงเวลาได้รับแสง (L:D) 14:10 ซึ่งพบว่ามีค่าความเข้มแสงที่ระดับใกล้เคียงกันกับการศึกษาครั้งนี้

การศึกษาค้นคว้าวิธีการศึกษาด้วยวิธีวิเคราะห์การตอบสนองของพื้นที่ผิว และ central composite design นั้น เป็นวิธีที่ได้ข้อมูลตัวเลขที่เฉพาะเจาะจง แม่นยำมากกว่าการทดลองที่ละปัจจัย และได้รับการยอมรับ ความนิยมในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสาหร่าย เช่น การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตน้ำมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Chlorella* sp. LAM-H โดยใช้วิธีวิเคราะห์การตอบสนองของพื้นที่ผิว และ central composite design พบว่าปัจจัยร่วมที่เหมาะสมต่อการกักตุนไขมันเท่ากับ 247.16 mg/L/d ภายใต้สภาวะความเข้มข้นกลูโคส 26.2 g/L, โซเดียมไนเตรท 2.06 g/L และ อุณหภูมิ 28.18°C (Xie *et al.*, 2012) และการศึกษาของ Song *et al.* (2007) ซึ่งได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ที่ใช้สำหรับการผลิตชีวมวลและกรดไขมัน DHA ของ *Schizochytrium limacinum* OUC88 โดยใช้วิธีการทางสถิติ คือ plackett-burman และ response surface methodology สำหรับคัดเลือกปัจจัยหลาย ๆ ปัจจัย เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีนัยสำคัญและปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย พบว่าค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตชีวมวลคือ อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน และอายุเชื้อเริ่มต้น โดยสามารถผลิตชีวมวลได้ 24.1 g/L และผลิต DHA ได้ 4.7 g/L

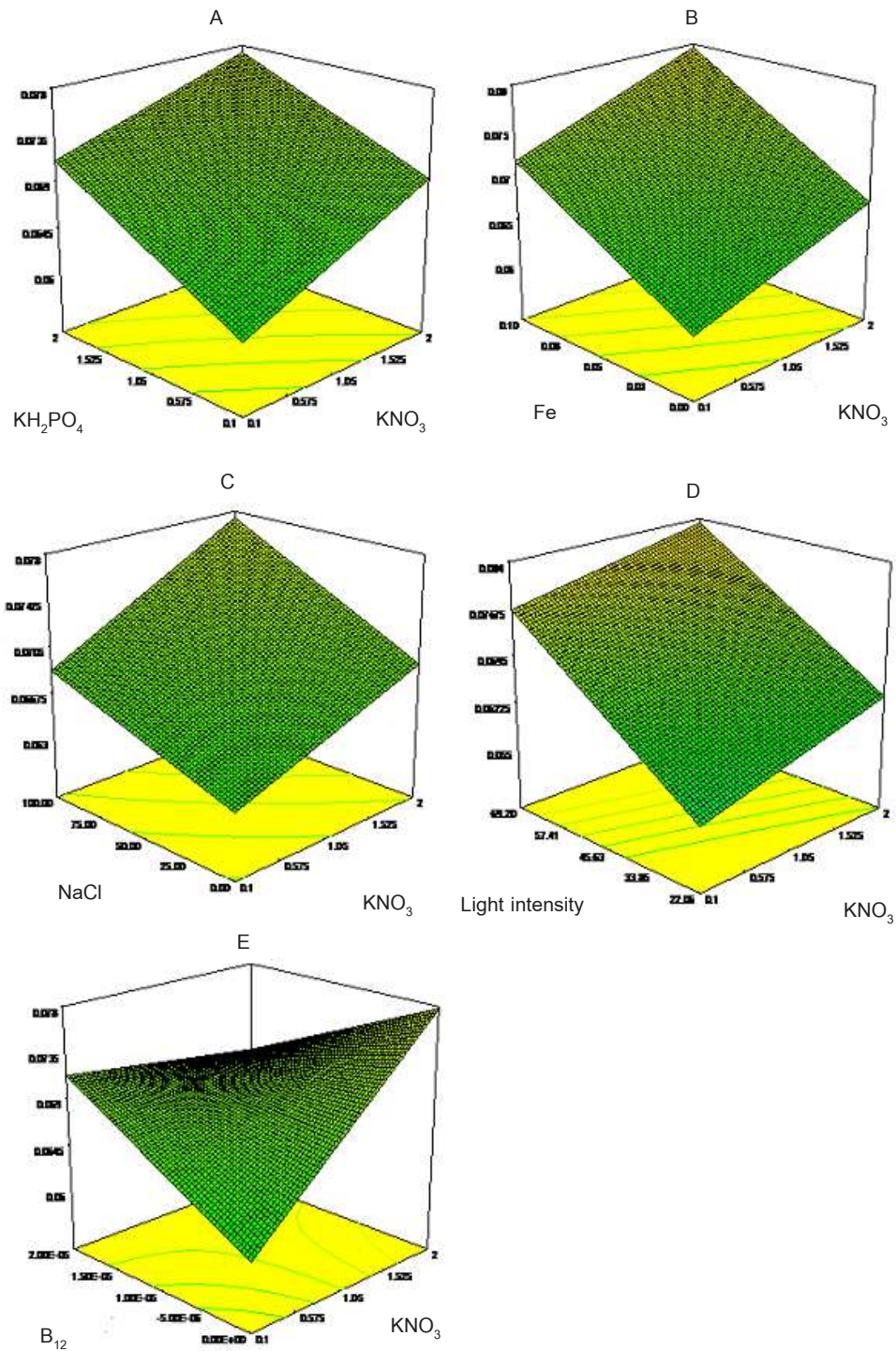


Figure 5 Response surface plots of influence factors on biomass of *D. quadricauda* at 28 days of cultivation (KNO_3 -g/L, KH_2PO_4 -g/L, Fe -g/L, NaCl-mM, light intensity- $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, cyanocobalamin-mg/Lและ CO_2 -%).

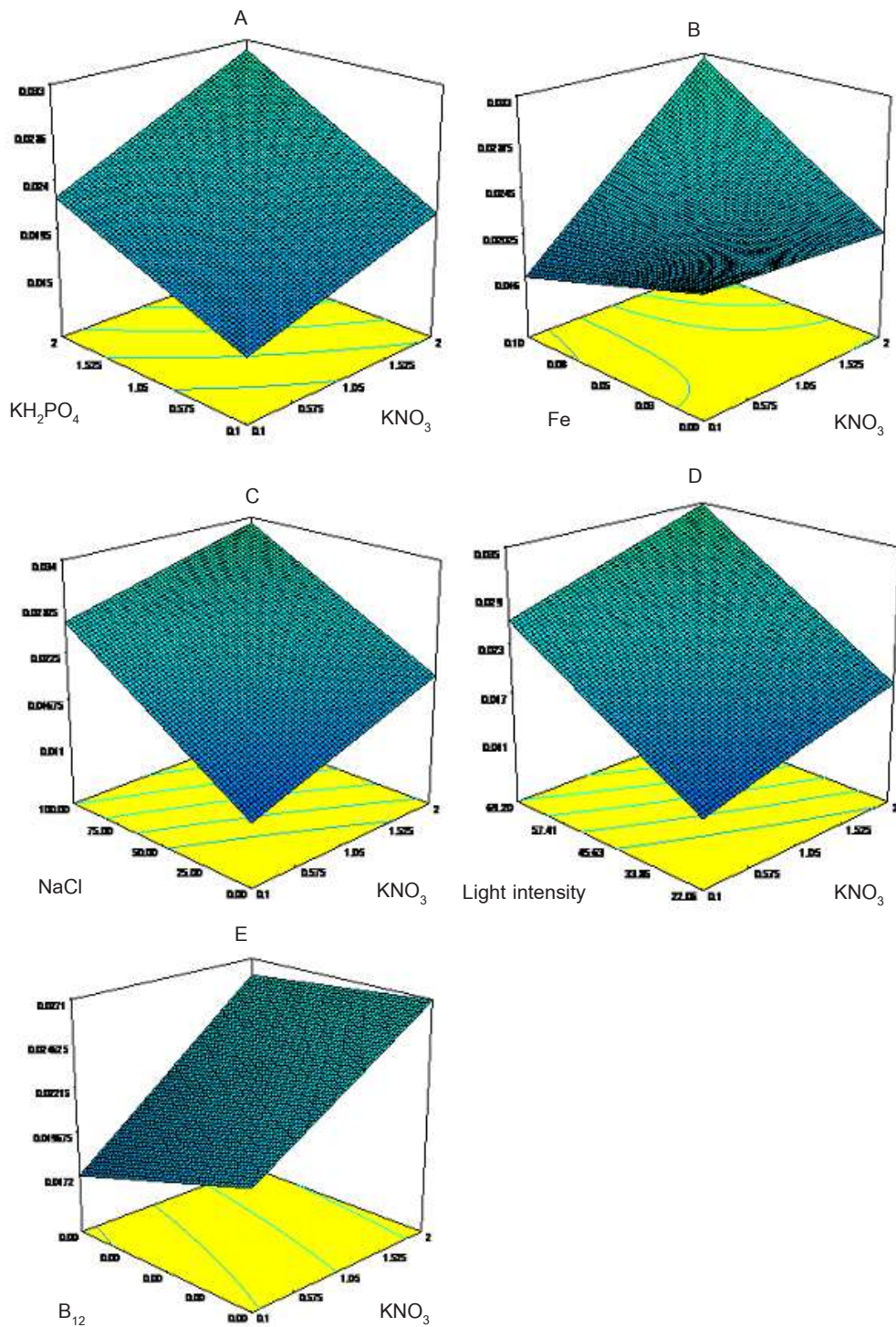


Figure 6 Response surface plots of influence factors on lipid of *D. quadricauda* at 28 days of cultivation (KNO_3 -g/L, KH_2PO_4 -g/L, Fe -g/L, NaCl-mM, light intensity- $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, cyanocobalamin-mg/L และ CO_2 -%).

สรุป

ปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทางบวก และมีความเหมาะสมต่อผลผลิตชีวมวล และผลผลิตน้ำมัน ของ *D. quadricauda* คือ ปริมาณ KNO_3 ที่ 2.44 g/L, KH_2PO_4 ที่ 2.44 g/L, Fe ที่ 0.12 g/L, NaCl ที่ 20.87 g/L, light intensity ที่ 82.52 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ และ CO_2 ที่ 6.09 % โดยจากการทำนายด้วยสามารถให้ผลผลิตชีวมวล 1.34 g/L อัตราการผลิตชีวมวลที่ 0.06 g/L/d ผลผลิตน้ำมัน 1.02 g/L และให้อัตราการผลิตน้ำมันที่ 0.13 g/L/d ซึ่งการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในปัจจัยดังกล่าวจะเป็นแนวทางการผลิตสาหร่ายนี้เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลได้

กิตติกรรมประกาศ

“การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558”

เอกสารอ้างอิง

- Amaro, H.M., A.C. Macedo and F.X. Malcata. 2012. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels. Energy. 44: 158-166.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can J. Biochem. Phys. 37: 911-917.
- Cheng, K.C., M. Ren. and L. Kimberly. 2013. Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* UTEX 250. Bioresour. Technol. 128: 44-48.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotech. Adv. 25: 294-306.
- Converti, A., A.A. Casazza., E.Y. Ortiz., P. Perego and M.D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem. Eng. Process: Process Intensification. 48: 1146-1151.
- Grant, M.A.A., E. Kazamia, P. Cicuta and A.G. Smith. 2014. Direct exchange of vitamin B₁₂ is demonstrated by modeling the growth dynamics of algal-bacterial cocultures. The ISME J. 8: 1418-1427.
- Hana, L., H. P. Hu, L. Jiang, G. Ma, S. Zhang and F. Han. 2015. Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. Bioresour. Technol. 175: 262-268.
- Ho, S.H., C.Y. Chen and J.S. Chang. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresour. Technol. 113: 244-252.
- Ho, S.H., C.Y. Chen, K.L. Yeh, W.M. Chen, C.Y. Lin and J.S. Chang. 2010. Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates. Biochem. Eng. J. 53: 57-62.
- Ji, F., R. Hao, Y. Liu, G. Li, Y. Zhou and R. Dong. 2013. Isolation of a novel microalgae strain *Desmodesmus* sp. and optimization of environmental factors for its biomass production. Bioresour. Technol. 148: 249-254.
- Liu, Z., G. Wang and B. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresour. Technol. 99: 4717-4722.
- Mulbry, W., K. Shannon, P. Carolina and K.W. Elizabeth. 2008. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. Bioresour. Technol. 99: 8137-8142.
- Ruangsobmoon, S. 2012. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. Bioresour. Technol. 109: 261-265.

- Ruangsomboon, S., M. Ganmanee and S. Choochote. 2013. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. J. Applied Phycol. 25: 867-874.
- Song, X., X. Zhang, C. Kuang, L. Zhu and N. Guo. 2007. Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. Process Biochem. 42: 1391-1397.
- Takagi, M., Karseno and T. Yoshida. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. J. Biosci. Bioeng. 101: 223-226.
- Vonshak, A. and Maske, H. 1982. Algae: growth techniques and biomass production, in: Coombs, J. and Hall, D.O., (Eds.), Techniques in Bioproducity and Photosynthesis. Pergamon Press, Oxford, pp. 66-77.
- Widjaja, A., C.C. Chien and Y.H. Ju. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 40: 13-20.
- Xie, T., Y. Sun, K. Du, B. Liang, R. Cheng and Y. Zhang. 2012. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for oil production. Bioresour. Technol. 118: 235-242.