วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2562 : 37 (3) : 570 - 580

ผลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตไขมันและองค์ประกอบกรดไขมัน ที่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Botryococcus braunii* KMITL 2

Effect of Carbon Dioxide (CO_2) on Lipid Production and Fatty Acids Profile Affecting on Biodiesel Properties Produced from Green Microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์[1,2]* และบุปผา จงพัฒน์[1]
Suneerat Ruangsomboon[1,2]* and Buppha Jongput[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของระดับคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ต่อผลผลิตไขมันและองค์ประกอบกรดไขมัน ที่ส่งผลต่อคุณสมบัติไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่าย *Botryococcus braunii* KMITL 2 และเสริมด้วย CO_2 0.04, 1, 3, 5, 10, 15 และ 20% (v/v) เพาะเลี้ยงสาหร่ายจนเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ ผลพบว่าสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 ที่ 5% มีปริมาณไขมันและกำลังการผลิตไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 52.97±5.02% และ 72.06±0.40 mg/l/d โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกระดับ CO_2 และมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (CO_2 0.04%) 2 เท่า และ 5.1 เท่า ตามลำดับ สาหร่ายที่ได้รับ CO_2 10 % มีผลผลิตไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 0.54±0.02 g/l ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 3.6 เท่า โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกระดับ CO_2 ยกเว้น 5% ผลรวมของกรดไขมัน C10:0-C18:1 ซึ่งมีค่าซีเทนสูงกว่า 47 พบสูงสุด 95.41% ที่ระดับ CO_2 10% สาหร่ายที่ได้รับ CO_2 5% มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณต่ำ ซึ่งส่งผลให้สามารถเก็บรักษาน้ำมันไบโอดีเซลได้นาน ซึ่งเมื่อพิจารณาทั้งจากผลผลิตไขมันและคุณสมบัติไบโอดีเซลเบื้องต้น แล้วพบว่า CO_2 5 % เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้มากที่สุด

คำสำคัญ: โบทริโอคอคคัส ไขมัน กรดไขมัน ไบโอดีเซล

Abstract

Effect of carbon dioxide (CO_2) on lipid production and fatty acid composition affecting on biodiesel properties produced from green microalga *Botryococcus braunii* KMITL 2 was studied. Alga was cultivated and supplemented with 0.04, 1, 3, 5, 10, 15 and 20 % CO_2 (v/v) until reached the late exponential phase. The experimental results showed that the alga supplemented with 5% CO_2 produced significantly the highest lipid content (52.97±5.02%) and lipid productivity (72.06±0.40 mg/l/d) that were 2.0 and 5.1 times higher than control set (0.04% CO_2). The lipid yield (0.54±0.02 g/l) of the alga supplemented with 10% CO_2 was 3.6 times higher than the control, and significantly higher than others CO_2 concentrations except 5% CO_2. Alga supplemented with 10% CO_2 showed the highest percentage of C10:0-C18:1 fatty acids (95.41%) with cetane number higher than 47. The alga supplemented with 5% CO_2 showed low unsaturated fatty acid which lead to long term storage of biodiesel. Considerably, the highest lipid content and good biodiesel properties, 5% CO_2 could be the optimum condition for cultivation of this algal strain.

Keywords: *Botryococcus,* lipid, fatty acid, biodiesel

[1] หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520
[2] ศูนย์วิจัยร่วมภาครัฐและเอกชน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520
*Corresponding author: suneerat.ru@kmitl.ac.th

คำนำ

ทั้งจากปัญหาปริมาณเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีอยู่อย่างจำกัด และปัญหาการเพิ่มขึ้นของปริมาคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในชั้นบรรยากาศ ซึ่งส่งผลทำให้ปัญหาภาวะโลกร้อนรุนแรงขึ้น จึงทำให้นักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจในการศึกษาทดลองหาวัตถุดิบแหล่งใหม่ เพื่อนำมาเป็นแหล่งพลังงานทดแทน โดยเชื้อเพลิงในรูปเชื้อเพลิงเหลวได้รับความสนใจในการหาแหล่งทดแทนมากที่สุด เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่มีความต้องการใช้ในปริมาณมากทั้งจากอุตสาหกรรมขนส่ง ยานยนต์ โรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งวัตถุดิบหลายชนิดได้รับการศึกษาค้นคว้าและนำมาเป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิงเหลว โดยจะนิยมวัตถุดิบที่มาจากพืชเนื่องจากสามารถช่วยลดปริมาณ CO_2 ได้ (Kumar *et al*., 2010; Singh and Singh, 2014) เช่นปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น โดยพบว่าเมื่อใช้พืชเหล่านี้เป็นวัตถุดิบ ก่อให้เกิดปัญหาตามมา คือส่งผลกระทบต่อแหล่งวัตถุดิบของอาหารหรือสินค้าที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ หรือใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวนานเกินไป จึงต้องมีการหาแหล่งวัตถุดิบอื่นมาทดแทน

แหล่งวัตถุดิบประเภทหนึ่งที่ได้รับความนิยมมากคือสาหร่ายขนาดเล็ก เนื่องจากไม่ใช่วัตถุดิบที่เป็นอาหารของมนุษย์ ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น ไม่จำเป็นต้องใช้ที่ดินที่อุดมสมบูรณ์ และมีไขมันปริมาณสูง โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Botryococcus braunii* ซึ่งได้รับการยอมรับจากนักวิจัยว่าเป็นสาหร่ายที่มีปริมาณน้ำมันสูงเหมาะสมกับการนำมาเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายชนิดนี้มีคุณภาพสูง ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของน้ำมันไบโอดีเซลที่กำหนดไว้ในระดับโลก (ASTM D6751, 2012; and EN 14214 Fuel Standard (Biodiesel) Determination, 2003) ซึ่งโดยปกติแล้วการทำน้ำมันไบโอดีเซลจะต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลว่าผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้หรือไม่เช่น ค่าซีเทน (cetane-CN) ค่าความคงตัวของการออกซิไดซ์ (oxidative stability) ค่าการอุดตันของเครื่องยนต์ (cold-filter plugging point) เป็นต้น (Knothe, 2008) โดยค่าคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลเหล่านี้ขึ้นกับชนิดของกรดไขมันของสาหร่าย

แม้สาหร่าย *B. braunii* จะมีน้ำมันปริมาณมาก แต่พบว่ามีปัญหาคือสาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้า นักวิจัยต่าง ๆ จึงได้พยายามศึกษาหาสภาวะต่างๆ ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตหรือเพิ่มผลผลิตให้สาหร่ายชนิดนี้ เช่นการศึกษาปัจจัยด้านธาตุอาหาร แสง ความเค็ม อุณหภูมิ และปริมาณ CO_2 (Zhila *et al*.,2005; Ruangsomboon, 2012, 2015) เป็นต้น โดย CO_2 เป็นวัตถุดิบที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต ปริมาณไขมันและองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย ซึ่งระดับ CO_2 ที่แตกต่างกันย่อมส่งผลต่อสาหร่ายแตกต่างกันด้วย

โดยได้มีรายงานว่าระดับ CO_2 ที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มปริมาณชีวมวลและอาหารสะสมในสาหร่าย *B. braunii* (Ranga Rao *et al*., 2007; Yoo *et al*., 2010; Ge *et al*., 2011; Pooja and Himabindu, 2012) เช่นเมื่อ *B. braunii* ได้รับ CO_2 2% ในขณะที่เพาะเลี้ยง จะทำให้ผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายเพิ่มขึ้นสองเท่า และเมื่อปริมาณ CO_2 แตกต่างกันจะส่งผลให้มีองค์ประกอบกรดไขมันที่ต่างกัน (Ranga Rao *et al*., 2007) ระดับ CO_2 ที่เหมาะสมสามารถเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ให้เร็วขึ้น โดยสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จะมีระดับ CO_2 ที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป (Yoshimura *et al*., 2013)

การทราบระดับ CO_2 ที่เหมาะสมกับสายพันธุ์สาหร่ายที่เราต้องการเพาะเลี้ยงย่อมเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่จะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่เร็ว มีชีวมวลและไขมันสูง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาระดับ CO_2 ที่เหมาะสมกับสาหร่าย *B. braunii* KMITL 2 ที่ทำให้สาหร่ายมีผลผลิตไขมันสูงที่สุด และมีคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากล เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้ให้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่าย

ทำการคัดแยกเซลล์เดี่ยวของสาหร่าย *Botryococcus braunii* Kützing (1849) strain KMITL 2 จากอ่างเก็บน้ำคลองโบด จังหวัดนครนายก (GenBank accession numbers KX470608) ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรคลอเรลลา (Vonshak and Maske, 1982) ซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตไขมันของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ (Ruangsomboon, 2015) โดยเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมระดับอุณหภูมิ 25 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่ระดับ 60 µmol photons/m^2/s และใช้สาหร่ายนี้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาผลของระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่แตกต่างกันต่อผลผลิตไขมันและองค์ประกอบกรดไขมัน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตรคลอเรลลาและให้ CO_2 ในภาชนะเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ระดับ 0.04% (ชุดควบคุม), 1, 3, 5, 10, 15 และ 20 % (v/v) โดยซื้อ CO_2 จาก United Industrial Gases Co., Ltd., Thailand โดยใช้ CO_2 100% ผสมกับอากาศปกติ ให้ได้ระดับที่กำหนด โดยใช้วาล์วควบคุมปริมาณของแกส (Nitto model DK800S-6, K-1013, Japan) ให้ที่อัตรา 0.4 vvm ตลอดการเพาะเลี้ยง เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25 °C ในฟลาสก์แก้วขนาด 1 ลิตร ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่ระดับ 60 µmol photons/m^2/s เพาะเลี้ยงสาหร่ายจนเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (18 วัน) ทำการวิเคราะห์ผลผลิตไขมัน (Bligh and Dyer, 1959) องค์ประกอบกรดไขมัน (Ruangsomboon *et al*., 2013) ทุกๆ 6 วัน โดยสาหร่ายในทุกชุดการทดลองจะทำการเพาะเลี้ยง 24 ฟลาสก์ เพื่อให้มีปริมาณสาหร่ายพอเพียงต่อการวิเคราะห์ไขมัน วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีของ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตไขมันของสาหร่าย

เมื่อสาหร่ายเจริญเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตสูงสุด (late exponential phase) สาหร่ายที่ได้รับ CO_2 เสริมระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ระดับ 5% มีปริมาณไขมัน (lipid content) สูงที่สุดคือ 52.97±5.02% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกระดับ CO_2 และมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม 2 เท่า โดยที่สิ้นสุดการทดลองปริมาณไขมันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อ CO_2 เพิ่มขึ้นจาก 0.04 ถึง 5% ที่ระดับ CO_2 สูงมากกว่านี้ปริมาณไขมันจะลดลง (Figure 1A) ซึ่งแสดงว่าการเพิ่มระดับ CO_2 สามารถเพิ่มปริมาณไขมันในสาหร่าย *B. braunii* KMITL 2 ได้ แต่ CO_2 ที่สูงมากเกินไป ไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณไขมัน แต่กลับจะทำให้ไขมันลดลง โดยจะได้ไขมันสูงสุดที่ระดับ CO_2 ที่เหมาะสมเพียงระดับเดียวเท่านั้น ซึ่งแตกต่างกับรายงานของ Ge *et al*. (2011) ซึ่งรายงานว่าสาหร่าย *B. braunii* strain 765 ที่ได้รับ CO_2 2-20% จะมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่า 16.43-24.45% โดยในสายพันธุ์ 765 มีแนวโน้มว่ามีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นเมื่อ CO_2 เพิ่มขึ้น

ผลผลิตไขมัน (lipid yield) ในสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 10% มีปริมาณที่สิ้นสุดการทดลองสูงที่สุดเท่ากับ 0.54±0.02 g/l ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 3.6 เท่า โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับ CO_2 ที่ 0.04, 1, 3, 15 และ 20% (Figure 1B) ส่วนกำลังการผลิตไขมัน (lipid productivity) ของสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 5% มีค่าที่สิ้นสุดการทดลองสูงที่สุดคือ 72.06±0.40 mg/l/d ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมมากถึง 5.1 เท่า โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกระดับ CO_2 (Figure 1C)

สาหร่ายที่ได้รับ CO_2 10% ระหว่างการเพาะเลี้ยง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีปริมาณชีวมวล (biomass) สูงที่สุด 1.48±0.03 g/l (Figure 1D) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกระดับ CO_2 ที่เหลือ และมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมถึง 2.7 เท่า โดยมีแนวโน้มว่าการเพิ่มปริมาณ CO_2 จะช่วยเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายได้ แต่หากเพิ่มจนเกินระดับที่เหมาะสมจะลดชีวมวลลง โดยมีรายงานว่าสาหร่าย *B. braunii* สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

จะมีระดับ CO_2 ที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลได้สูงที่สุดแตกต่างกันไป เช่นสายพันธุ์ LB-572 ที่ได้รับ CO_2 0-2% พบว่าที่ 2% สาหร่ายมีชีวมวลสูงที่สุด (Ranga Rao *et al*., 2007) ในขณะที่สายพันธุ์ Showa ที่ได้รับ CO_2 0.04-50 % มีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ระดับ CO_2 0.2-5% (Yoshimura *et al*., 2013) ส่วนสายพันธุ์ 765 ที่ได้รับ CO_2 2-20% การเจริญเติบโตดีที่สุดที่ระดับ CO_2 20 %(Ge *et al*., 2011) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้เป็นสาหร่ายชนิด (specie) เดียวกัน แต่มีสายพันธุ์ (strain) ที่แตกต่างกัน ก็ต้องการระดับ CO_2 ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

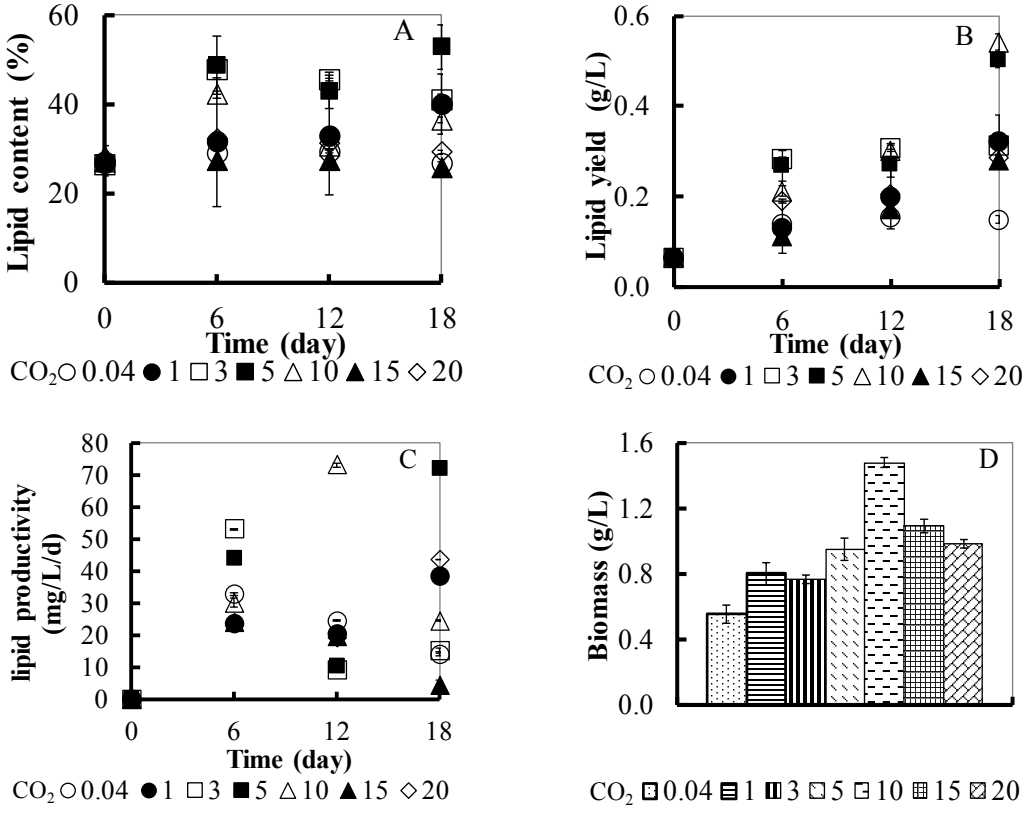

Figure 1. Lipid content (A), lipid yield (B), lipid productivity (C) and biomass (day 18th) of *B. braunii* KMITL 2 cultivated (D) under CO_2 at different concentrations (0.04-20%). Error bars represent ± S.D. of four replicates.

ผลของระดับคาร์บอนไดออกไซด์ต่อองค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่าย

องค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายสามารถเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความเหมาะสมในการใช้สาหร่ายชนิดนั้นๆ ในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล จากการทดลองครั้งนี้พบว่าสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 เกือบทุกระดับมีกรดไขมัน C16:0 เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีค่าอยู่ในช่วง 17.08-62.00% ยกเว้นสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 10% พบว่ามีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ C16:1 ซึ่งมีค่าสูงถึง 65.00-66.34% (Tables 1-2) กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) มีค่าอยู่ในช่วง 17.83-81.49% โดยค่าต่ำสุดและสูงสุดพบในสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 10 และ 0.04 % ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มแสดงให้เห็นว่าการเพิ่ม CO_2 ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะทำให้กรดไขมันอิ่มตัวมีปริมาณลดลง ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีค่าอยู่ในช่วง 18.51-82.17% โดยแบ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว

(monounsaturated fatty acid) อยู่ในช่วง 11.23-80.29% และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) 1.88-43.09% ชนิดกรดไขมันที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับ การศึกษาของ Ranga Rao *et al*. (2007) และ Fang *et al*. (2004) ซึ่งรายงานว่ากรดไขมันชนิดที่พบมากที่สุดใน *B. braunii* คือ C16:0 หรือ palmitic acid แต่มีความแตกต่างกับการศึกษาของ Yoo *et al*. (2010) ซึ่งรายงานว่าพบกรดไขมันชนิดเด่นคือ C18:1

เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำมันไบโอดีเซลของยุโรปซึ่งกำหนดไว้ว่าน้ำมันไบโอดีเซลต้องมี C18:3 n3 ไม่เกิน 12% ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีกรดไขมัน C18:3 n3 อยู่ในช่วง 0-14.47% โดยพบกรดไขมันชนิดนี้ที่เกินมาตรฐานกำหนด ในสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 15 และ 20% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การได้รับ CO_2 มากเกินไปจะทำให้สาหร่ายมีองค์ประกอบกรดไขมันที่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตไบโอดีเซล เกณฑ์มาตรฐานสำหรับการนำไขมันมาผลิตไบโอดีเซลอีกเกณฑ์หนึ่งคือต้องมีกรดไขมันที่มีพันธะคู่ตั้งแต่ 4 คู่ ขึ้นไป ไม่เกิน 1% เพราะหากมีมากจะเกิดการ oxidation ของไบโอดีเซลได้ง่าย จึงไม่เหมาะต่อการนำมาผลิตไบโอดีเซล จากการศึกษาครั้งนี้สาหร่ายที่มีเปอร์เซ็นต์รวมของกรดไขมันพันธะคู่ตั้งแต่ 4 คู่ขึ้นไป (4-6 คู่) เกิน 1 % คือสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 1% (18 วัน), 3% (6 วัน) และ 20% (18 วัน) โดยมีปริมาณกรดไขมันที่มีพันธะคู่ตั้งแต่ 4 คู่ขึ้นไป รวมเท่ากับ 2.90, 4.68 และ 1.55% ตามลำดับ

กรดไขมันที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลได้แก่กรดไขมันที่มีความยาวคาร์บอนตั้งแต่ C16-C18 (Miao *et al*., 2009; Francisco *et al*., 2010) โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลรวมของกรดไขมัน C16-C18 มีค่าอยู่ในช่วง 62.33-92.11% ซึ่งค่อนข้างสูง จึงเหมาะสมที่จะนำไขมันจากสาหร่ายชนิดนี้มาผลิตไบโอดีเซล โดยผลรวมของ C16-C18 ที่พบสูงสุด พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับ CO_2 15% เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน

ค่าซีเทน หรือ cetane number (CN) เป็นค่าที่เป็นดัชนีหลักในการบอกคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซล เป็นค่าที่มีผลต่อความเร็วในการจุดติดและคุณภาพของการเผาไหม้ โดยไบโอดีเซลที่มีค่า CN สูง จะมีคุณสมบัติในการจุดติดที่ดี ทำให้เครื่องยนต์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยมาตรฐานระดับโลกจากสองแหล่งกำหนดเกณฑ์ค่า CN ไว้ ว่าต้องไม่ต่ำกว่า 47 และ 51 (ASTM D6751, 2012 และ EN 14214 Fuel Standard (Biodiesel) Determination, 2003) เมื่อพิจารณาจากค่าซีเทนของกรดไขมัน โดยพิจารณาเฉพาะกรดไขมันที่ให้ซีเทนมากกว่า 47 ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดไว้ พบว่ากรดไขมันที่อยู่ในเกณฑ์นี้คือกรดไขมัน C10:0-C18:1 (Knothe, 2005) โดยค่ากรดไขมันนี้ในทุกชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 52.3-95.41% โดยผลรวมของกรดไขมัน C10:0-C18:1 ที่พบสูงสุด พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับ CO_2 10% เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน

ค่า iodine value (IV) คือค่าของความไม่อิ่มตัวของไบโอดีเซล ซึ่งจะส่งผลต่อค่าความคงตัวต่อการถูกออกซิไดส์ โดยไบโอดีเซลที่มีค่า IV สูง นั่นคือจะมีความเสถียรหรือความคงตัวต่ำ จะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายกว่าไบโอดีเซลที่มีค่า IV ต่ำ (Knothe, 2009) โดยเกณฑ์มาตรฐานของยุโรปกำหนดค่า IV ไว้ว่าต้องไม่เกิน 120 g I_2/100 g ซึ่งหากสาหร่ายมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จะส่งผลให้ค่า IV ของไบโอดีเซลสูง ซึ่งปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวยังส่งผลต่อค่า degree of unsaturation (DU) เป็นค่าที่ระบุถึงความสามารถหรือระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำมันไบโอดีเซลให้คงตัวอยู่ในสภาพเดิม ไม่ถูกออกซิไดส์ โดยไบโอดีเซลที่มีค่า DU ต่ำ จะมีความเสถียรหรือยังคงตัวที่ดีแม้เก็บรักษาเป็นเวลานาน นั่นคือหากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณต่ำ จะทำให้เก็บรักษาน้ำมันไบโอดีเซลได้นานนั่นเอง โดยจากการทดลองนี้สาหร่ายที่ได้รับ CO_2 ที่ 0.04% และ 5% จะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณต่ำกว่าสาหร่ายที่ได้รับระดับ CO_2 อื่น ๆ ซึ่งมีแนวโน้มจะส่งผลให้มีค่า IV และ DU ของไบโอดีเซลต่ำ ซึ่งส่งผลดีต่อการเก็บรักษาน้ำมันไบโอดีเซล

ค่า cold filter plugging point (CFPP) คือค่าในการทำนายคุณสมบัติการไหลของน้ำมันไบโอดีเซลที่ระดับอุณหภูมิต่ำ ไบโอดีเซลที่มีค่า CFPP สูง จะมีการไหลที่อุณหภูมิต่ำด้อยกว่าไบโอดีเซลที่มีค่า CFPP ต่ำ (Wu *et al*., 2005) โดยค่า CFPP สูงจะมีแนวโน้มที่จะตกตะกอนและอุดตันตัวกรองได้ง่าย (Mittelbach and Remschmidt, 2004) ซึ่งหากสาหร่ายมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสูงจะส่งผลให้ค่า CFPP สูงด้วยเช่นกัน โดยพบว่าสาหร่ายที่ได้รับ CO_2 0.04% มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสูงที่สุด ซึ่งหากนำไขมันจากสาหร่ายนี้ไปทำไบโอดีเซล ย่อมมีแนวโน้มที่จะเกิดการอุดตันเครื่องยนต์ได้

Table 1 Fatty acid profiles of *B. braunii* KMITL 2 under CO_2 at different concentrations (0.04-3%) on day 0^{th}, 6^{th}, 12^{th} and 18^{th}.

Fatty acid (%)	CO_2 0.04%				CO_2 1%			CO_2 3%		
	0	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}
C4:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00
C6:0	0.00	0.02	0.14	0.31	0.02	0.01	0.01	0.00	0.24	0.18
C8:0	1.93	0.20	0.40	0.14	0.10	0.12	0.28	0.26	0.16	0.15
C10:0	0.00	0.00	0.11	0.14	0.08	0.08	0.13	0.00	0.53	0.30
C11:0	0.26	0.43	0.13	0.30	1.11	1.97	0.22	0.22	0.05	0.04
C12:0	5.39	10.01	2.09	8.19	2.06	2.73	1.77	6.59	9.99	6.61
C13:0	3.26	5.38	1.32	4.00	5.78	6.63	3.44	3.17	5.02	3.19
C14:0	3.04	1.64	3.72	2.18	0.97	1.37	0.68	0.76	0.63	0.60
C14:1	0.00	0.00	1.82	0.60	0.16	0.98	0.24	0.00	0.00	0.00
C15:0	0.82	0.50	1.36	0.00	0.39	0.42	0.20	0.43	0.36	0.36
C15:1	0.38	0.29	0.53	0.29	0.04	0.17	0.10	0.38	0.18	0.11
C16:0	52.58	45.34	55.18	62.00	22.06	20.39	26.11	33.47	31.14	30.87
C16:1	2.53	2.16	4.85	0.93	6.65	7.16	8.27	2.78	3.53	4.60
C17:0	0.65	0.38	1.16	1.16	2.87	1.14	2.15	1.54	1.84	0.32
C17:1	9.52	5.05	3.15	2.21	0.41	0.25	0.43	2.79	10.99	11.48
C18:0	2.22	2.16	2.07	2.30	6.21	8.48	5.51	1.52	1.61	1.79
C18:1n9t	8.23	4.16	3.00	2.88	8.04	0.54	4.87	5.55	2.04	3.46
C18:1n9c	1.14	1.63	7.44	4.01	0.00	0.00	4.56	15.75	17.02	10.64
C18:2n6t	2.76	7.18	1.32	2.27	14.49	11.39	0.00	5.99	0.09	6.97
C18:2n6c	0.23	0.99	1.86	0.75	0.00	14.01	6.36	2.83	3.23	6.94
C18:3n3	0.54	2.68	0.68	2.71	0.00	0.00	9.68	2.44	0.72	0.84
C18:3n6	3.21	7.04	3.01	0.65	1.60	1.12	2.22	1.73	8.72	4.44
C20:0	0.37	1.55	2.13	0.47	21.16	16.62	1.62	0.84	1.04	0.84
C20:1	0.14	0.08	0.51	0.19	2.93	1.92	2.32	0.79	0.08	0.53
C20:2	0.00	0.61	0.33	0.10	0.41	0.17	6.76	0.00	0.00	0.00
C20:3n3	0.00	0.02	0.53	0.24	0.02	0.11	0.63	0.00	0.03	0.00
C20:3n6	0.18	0.12	0.09	0.09	0.14	0.02	1.55	0.30	0.19	0.23
C20:4n6	0.00	0.00	0.07	0.23	0.15	0.21	2.10	0.00	0.00	0.00
C:20:5n3	0.07	0.02	0.10	0.13	0.00	0.00	0.79	0.00	0.00	0.00

Table 1 (Continued)

Fatty acid (%)	CO_2 0.04%				CO_2 1%			CO_2 3%		
	0	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}
C21:0	0.00	0.06	0.15	0.15	0.22	0.16	0.26	0.00	0.00	0.34
C22:0	0.23	0.00	0.08	0.09	0.38	0.46	1.91	0.00	0.00	0.00
C22:1n9	0.14	0.00	0.00	0.00	0.38	0.38	1.54	0.00	0.00	0.00
C22:2	0.06	0.21	0.12	0.03	0.04	0.14	0.12	0.00	0.03	2.87
C22:6n3	0.00	0.00	0.20	0.10	0.10	0.03	0.01	4.68	0.00	0.00
C23:0	0.09	0.00	0.25	0.06	0.04	0.08	0.12	0.00	0.21	0.00
C24:0	0.00	0.00	0.09	0.00	0.42	0.37	0.60	0.00	0.00	0.00
C24:1	0.03	0.08	0.02	0.12	0.43	0.36	2.41	5.22	0.34	1.31
SFA	70.84	67.67	70.38	81.49	64.01	61.06	45.04	48.79	52.81	45.58
UFA	29.16	32.33	29.62	18.51	35.99	38.94	54.96	51.21	47.19	54.42
MUFA	22.11	13.46	21.33	11.23	19.04	11.74	24.75	33.25	34.18	32.13
PUFA	7.05	18.87	8.30	7.28	16.95	27.20	30.22	17.96	13.00	22.28
TFA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C16-C18	83.60	78.77	83.72	81.86	62.33	64.47	70.17	76.39	80.93	82.35
10:0-C18:1	90.01	79.14	87.94	91.20	56.83	52.30	58.68	74.93	84.94	74.37

SFA: Saturated fatty acid, UFA: Unsaturated fatty acid, MUFA: Monounsaturated fatty acid, PUFA: Polyunsaturated fatty acid, TFA: Total fatty acid

Table 2 Fatty acid profiles of *B. braunii* KMITL 2 under CO_2 at different concentrations (5-20%) on day 6^{th}, 12^{th} and 18^{th}.

FA (%)	CO_2 5%			CO_2 10%			CO_2 15%			CO_2 20%		
	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}
C4:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.94	0.95	0.71
C6:0	0.10	0.06	0.07	0.37	0.53	0.28	0.04	0.01	0.01	0.08	0.88	1.31
C8:0	0.17	0.00	0.03	0.55	0.39	0.20	0.10	0.05	0.04	0.02	2.57	2.41
C10:0	0.35	0.23	0.18	0.47	0.24	0.65	0.63	0.43	0.36	0.18	2.14	1.28
C11:0	3.63	0.30	0.31	0.38	0.24	0.13	0.25	0.08	0.06	0.22	0.97	1.26
C12:0	15.18	24.18	18.38	1.85	1.17	2.05	4.58	2.65	3.60	2.52	0.39	3.76
C13:0	0.12	0.36	2.49	1.35	0.90	1.28	4.32	2.63	0.86	6.63	4.42	4.43
C14:0	0.47	0.49	0.16	3.41	3.85	2.76	0.82	0.49	0.47	2.36	1.80	1.47
C14:1	0.49	0.56	0.71	0.28	0.34	0.31	0.35	0.45	0.28	2.31	0.10	0.87
C15:0	0.26	0.41	0.55	6.34	5.59	5.80	0.32	0.30	0.14	0.75	0.22	0.32
C15:1	0.11	0.20	0.21	0.35	0.31	0.40	0.51	0.81	0.53	0.29	0.05	0.47
C16:0	24.85	22.94	23.00	2.13	2.12	1.42	27.23	17.08	18.80	25.42	17.91	26.99
C16:1	2.89	7.15	6.23	65.00	65.46	66.34	2.56	2.02	1.95	7.91	2.33	2.52
C17:0	9.20	15.14	13.32	1.71	1.25	1.67	3.91	4.82	4.98	2.28	1.71	0.71
C17:1	7.26	1.10	1.47	3.79	3.44	4.54	5.93	10.92	14.99	1.38	2.08	1.40
C18:0	13.02	14.05	12.21	0.53	0.34	1.67	5.65	8.61	1.23	3.86	5.39	4.93
C18:1n9t	0.00	0.00	0.00	0.57	0.25	0.52	3.45	3.09	1.95	9.20	6.36	3.43
C18:1n9c	6.43	5.44	5.95	3.70	9.90	0.83	7.41	5.78	6.42	7.40	7.85	8.81
C18:2n6t	8.11	1.66	3.49	1.41	0.00	3.26	0.84	1.27	0.86	0.55	5.00	0.54
C18:2n6c	0.06	4.30	10.24	0.00	0.00	0.00	15.76	20.42	23.19	6.33	8.85	7.90
C18:3n3	1.46	0.11	0.08	0.29	0.10	0.00	10.18	11.55	13.31	10.11	14.47	12.70
C18:3n6	0.61	0.78	0.51	1.44	0.89	2.87	2.93	4.17	4.42	1.13	1.41	1.10
C20:0	4.28	0.11	0.09	0.37	0.21	0.81	0.27	0.06	0.00	1.01	6.71	0.88
C20:1	0.33	0.05	0.01	0.46	0.59	1.01	0.48	0.11	0.07	1.07	2.40	2.16
C20:2	0.01	0.08	0.04	0.31	0.32	0.00	0.08	0.04	0.05	0.14	0.06	0.06
C20:3n3	0.11	0.00	0.00	1.38	0.13	0.25	0.33	1.06	0.70	0.84	0.61	0.69
C20:3n6	0.22	0.08	0.01	0.08	0.09	0.25	0.10	0.04	0.04	1.00	0.03	0.87
C20:4n6	0.10	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.06	0.10	0.19	0.84	0.29	0.71
C:20:5n3	0.00	0.00	0.05	0.07	0.14	0.06	0.25	0.69	0.33	0.00	0.11	0.61

Table 2 (Continued)

FA (%)	CO_2 5%			CO_2 10%			CO_2 15%			CO_2 20%		
	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}	6^{th}	12^{th}	18^{th}
C21:0	0.04	0.07	0.05	0.00	0.40	0.00	0.10	0.06	0.00	0.26	0.89	0.54
C22:0	0.04	0.00	0.00	0.34	0.21	0.00	0.08	0.04	0.08	0.81	0.27	1.23
C22:1n9	0.05	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.17	0.06	0.04	0.31	0.15	0.77
C22:2	0.00	0.00	0.00	0.76	0.10	0.03	0.07	0.02	0.00	0.25	0.01	0.27
C22:6n3	0.02	0.03	0.01	0.09	0.10	0.08	0.01	0.01	0.00	0.11	0.14	0.23
C23:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.06	0.03	0.04	0.01	0.55	0.19	0.82
C24:0	0.04	0.05	0.06	0.24	0.31	0.37	0.22	0.01	0.03	0.92	0.19	0.48
C24:1	0.00	0.05	0.08	0.00	0.00	0.06	0.00	0.02	0.01	0.00	0.10	0.36
SFA	71.75	78.41	70.90	20.03	17.83	19.13	48.55	37.36	30.66	48.81	47.60	53.55
UFA	28.25	21.59	29.10	79.97	82.17	80.87	51.45	62.64	69.34	51.19	52.40	46.45
MUFA	17.56	14.55	14.66	74.15	80.29	74.00	20.86	23.26	26.25	29.87	21.42	20.79
PUFA	10.69	7.04	14.44	5.82	1.88	6.87	30.59	39.39	43.09	21.31	30.99	25.67
TFA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C16-C18	73.88	72.68	76.50	80.58	83.75	83.12	85.85	89.73	92.11	75.58	73.36	71.01
C10:0+	84.26	92.56	85.15	91.85	95.41	90.35	67.92	60.15	56.61	72.70	53.73	62.66

FA: fatty acid, SFA: Saturated fatty acid, UFA: Unsaturated fatty acid, MUFA: Monounsaturated fatty acid, PUFA: Polyunsaturated fatty acid, TFA: Total fatty acid, C10+: 10:0-C18:1

สรุปผลการศึกษา

ระดับ CO_2 ที่ 5% เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* KMITL 2 เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากให้ปริมาณผลผลิตไขมันสูง มีองค์ประกอบกรดไขมัน C10:0-C18:1 ที่มีค่า CN สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานอยู่สูงมาก และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำซึ่งส่งผลให้น้ำมันไบโอดีเซลมีคุณภาพที่ดี เก็บรักษาได้นาน แต่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงจึงควรมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณภาพเพื่อป้องกันการอุดตันของเครื่องยนต์ก่อนนำมาใช้จริง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (A118-0260-013)

เอกสารอ้างอิง

ASTM D6751, 2012. Standard specification for biodiesel fuel (B100) blend stock for middle distillate fuels. Retrieved from https://www.dieselnet.com/tech/fuel_biodiesel_std.php on 5 November 2015

Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Phys. 37: 911–917.

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

Francisco, E.C., D.B. Neves, E.J. Lopes and T.T. Franco. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. J. Chem. Technol. Biotechnol. 85: 395–403.

Fuel Standard (Biodiesel) Determination, 2003. Approved under section 21 of the fuel quality standard act 2002 by the Australian minister for the environment and heritage, 2003. Retrieved from https://www.comlaw.gov.au/Details/F2006B01373 on 5 November 2015.

Ge, Y., J. Liu and G. Tian. 2011. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO_2 concentration in photobioreactor. Bioresource Technol. 102: 130-134.

Knothe, G. 2005. "Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters." Fuel Process Technol. 86: 1059-1070.

Knothe, G. 2008. "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. Energy Fuels. 22: 1358–1364.

Knothe, G. 2009. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. Energy Environ. Sci. 2: 759–766.

Kumar, A., S. Ergas, X. Yuan, A. Sahu, Q. Zhang, J. Dewulf, F.X. Malcata and H. Langenhove. 2010. Enhanced CO_2 fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. Trends Biotechnol. 28: 371-380.

Miao, X.L., R.X. Li and H.Y. Yao. 2009. Effective acid-catalyzed transesterification for biodiesel production. Energy Convers. Manage. 50: 2680–2684.

Mittelbach, M. and C. Remschmidt. 2004. Biodiesel: the Comprehensive Handbook, Boersedruck Ges, M.B.H., Vienna.

Pooja, K., Himabindu, V., 2012. CO_2 removal from industrial flue gas using *Botryococcus braunii* for simultaneous lipid production. Int. J. Sci. Res. 3: 366-373.

Ranga Rao, A., R. Sarada and G.A. Ravishankar. 2007. Influence of CO_2 on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 414-419.

Ruangsomboon, 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. Bioresource Technol. 109: 261-265.

Ruangsomboon, S. 2015. Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. Bioresource Technol. 191: 377-384.

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. Appl. Phycol. 25: 867-874.

Singh, S.P. and P. Singh. 2014. Effect of CO_2 concentration on algal growth: A review. Renew Sust. Energ. Rev. 38: 172-179.

Vonshak, A. and H. Maske. 1982. Algae: growth techniques and biomass production, pp. 66-77. In: J. Coombs and D.O. Hall, eds. Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis. Pergamon Press, Oxford.

Wu, M., G. Wu, L. Han and J. Wang. 2005. Low-temperature fluidity of bio-diesel fuel prepared from edible vegetable oil. Petrol. Process Petrochem. 36: 57-60.

Yoo, C., S-Y. Jun, J-Y. Lee, C-Y. Ahn and H-M. Oh. 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresource Technol. 101: 571-574.

Yoshimura, T., S. Okada and M. Honda. 2013. Culture of the

hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: optimal CO_2, salinity, temperature, and irradiance conditions. Bioresource Technol. 133: 232-239.

Zhila, N.O., G.S. Kalacheva and T.G. Volova. 2005. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. J. Appl. Phycol. 17: 309-315.

วันรับบทความ (Received date) : 25 เม.ย. 60
วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 20 ก.พ. 61
วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 9 มี.ค. 62