เอกสารอ้างอิง

กรมธุรกิจพลังงาน. (2550). **กำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเตอร์ของกรดไขมัน.** กรุงเทพฯ: สำนักนโยบายและแผนยุทธศาสตร์ สำนักปลัดกระทรวงพลังงาน กระทรวงพลังงาน.

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. (2536). **การเลี้ยง *Chlorella* sp. T9 ในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พนิดา รัตนพลที. (2552). **การประยุกต์ใช้สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตไบโอดีเซล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล. (2551). **ศักยภาพของพืชน้ำมันเพื่อใช้กับเครื่องยนต์.** ค้นเมื่อ 23 สิงหาคม 2553, จาก http://rescom.trf.or.th/display/show_colum_p.php?id_salaban=147.

ยศวดี สวัสดิรักษา. (2547). **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botrycoccus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2549). **สาหร่ายวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รติกร อลงกรณ์โชติกุล. (2550). **ไบโอดีเซล (Biodiesel).** กรุงเทพฯ: กลุ่มงานทดสอบเชื้อเพลิงและผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม โครงการเคมี กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

ลัดดา วงศ์รัตน์. (2540). **คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิภาวรรณ ศรีมุข. (2547). **น้ำมันพืชสำหรับบริโภค.** กรุงเทพฯ: โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

ศิริวรรณ ศิลป์สกุลสุข. (2550). **การควบคุมคุณภาพน้ำมันไบโอดีเซล.** กรุงเทพฯ: โครงการเคมี กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

ศูนย์วิจัยและและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. (2548). **การนับแพลงก์ตอนพืชด้วย Heamacytometer.** ค้นเมื่อ 23 กรกฎาคม 2553, จาก http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/hema.htm.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. (2550). **การผลิตและการตรวจสอบมาตรฐานไบโอดีเซลเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

สถาบันปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย. (2549). **พระบิดาแห่งการพัฒนาพลังงานไทย.** กรุงเทพฯ: กระทรวงพลังงาน.

สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน, กระทรวงพลังงาน. (2550). ไบโอดีเซลจากสบู่ดำ. กรุงเทพมหานคร: สำนักงาน.

Agarwal, A. K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy and Combustion Science, 33**(3), 233-271.

Andrade, M. R., & Costa, J. A. V. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture, 264**(1-4), 130-134.

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). **Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology.** New York: Taylor & Francis group.

Ben-Amotz, A., Fishler, R., & Schneller, A. (1987). Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. **Marine Biology, 95**(1), 31-36.

Bold, H.C., & Wynne, M.J. (1985). **Introduction to the algae: Structure and Reproduction.** 2nd ed. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, Inc.

Borowitzka, M. A. (1988). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology, 70**, 313-321.

Bouarab, L., Dauta, A., & 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**(11), 2706-2712.

Brenckmann, F., Largeau, C., Casadevall, E., Corre, B., & Berkaloff, C. (1985). Influence of light intensity on hydrocarbon and total biomass production of *Botryococcus braunii*. Relations with photosynthetic characteristics. **Energy from Biomass, 1**(8), 722 - 726.

Brown, M. (2008). **Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture.** Retrieved August, 17, 2010, from http://www.uanl.mx/secciones/publicaciones/nutricion_acuicola/VI/archivos/A19.pdf.

Burdon, K.L. (1946). Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations. **Journal of Bacteriology, 52**, 665 - 678.

Casadevall, E., Dif, D., Largeau, C., Gudin, C., Chaumont, D., & Desanti, O. (1985). Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultra structure, and phosphate nutrition. **Biotechnology and Bioengineering, 27**(3), 286-295.

Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Chen, C.H., Kuan, T.C., Ong, S.C., & Lin, C. S. (2008). Reduction of CO_2 by a high - density culture of *Chlorella sp.* in a semicontinuous photo bioreactor. **Bioresource Technology**, 99, 3389-3396.

Christi, Y. (2007). Biodiesel from Microalgae. **Biotechnology Advances, 25**(3), 294-306.

Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. (2009). **Microalgal Isolation Techniques.** Retrieved June, 25, 2010, fromhttp://www.marine.csiro.au/microalgae/methods/

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 48**(6), 1146-1151.

Dayananda, C., Shamala, T.R., & Ravishankar, G.A. (2006). Influence of Nitrogen Sources on Growth, Hydrocarbon and Fatty Acid Production by *Botryococcus braunii*. **Asian Journal of Plant Sciences, 55**, 799-804.

Dayananda, C., Sarada, R., Srinivas, P., Shamala, T., & Ravishankar, G. (2006). Presence of methyl branched fatty acids and saturated hydrocarbons in botryococcene producing strain of *Botryococcus braunii*. **Acta Physiologiae Plantarum, 28**(3), 251-256.

Eriksen, N. (2008). The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters, 30**(9), 1525-1536.

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

Grima, E.M., Belarbi, E.H., Acien Fernandez, F.G., Medina, A.R., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances, 20**(7-8), 491-515.

Guerin, M., Huntley, M.E., & Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin; applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology, 21**(5), 210-216.

Helvacioglu, S. (2008). **Micro-Algae Growth Technology**. Retrieved June, 5, 2010, from http://www.soley.cn/institute.

Hossain, A.B.M.S., Salleh, A., Boyce, A.N., Chowdhury, P., & Naqiuddin, M. (2008). Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 4**(3), 250-254.

Chang, H-M., Liao, H-F., Lee, C-C., & Shieh, C-J. (2005). Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 80**, 307-312.

HR BioPetroleum. (2008). **Algae oil**. Retrieved August, 4, 2010, from http://www.hrbp.com/Algae/AlgaeOil.html

Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology, 27**(8), 631-635.

Kojima, E., & Zhang, K. (1999). Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photo bioreactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering, 87**(6), 811-815.

KU Biodiesel. (2007). **ความรู้เกี่ยวกับไบโอดีเซล.** ค้นเมื่อ 13 มิถุนายน 2553, จาก http://www.biodiesel.rdi.ku.ac.th/index.php?option=com_content&task=view&id=7&Itemid=12

Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., & Dhamelincourt, P. (1980). Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. **Phytochemistry, 19**(6), 1043-1051.

Lee, S., Yoon, B. D., & Oh, H. M. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques, 12**(7), 553-556.

Lee, S.J., Kim, S.-B., Kim, J.-E., Kwon, G.-S., Yoon, B.-D., & Oh, H.-M. (1998). Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. **Letters in Applied Microbiology, 27**(1), 14-18.

Lehman, R. (2008). **Bio-Fuels from Algae**. Retrieved June, 17, 2010, from www.tamug.edu/research/Biofuels/Lehman.pdf.

Liu, B., Zhao, Z. & Kent, Z. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 82**(8), 775-780.

Lupi, F. M., Fernandes, H. M. L., Tome, M. M., Sa-Correia, I., & Novais, J. M. (1994). Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. **Enzyme and Microbial Technology, 16**(7), 546-550.

Mayfield, S. (2008). **Sunlight is the focus on algae growth.** Retrieved September, 12, 2010, from http://www.morpc.org/pdf/summit/AlgaeVenture_Ohio_080724.pdf

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

Marchetti, J. M., Miguel, V. U., & Errazu, A. F. (2007). Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews, 11**(6), 1300-1311.

Marine Biology, Texas A & M University. (2009). **Marine Biology.** Retrieved June, 20, 2010, from http://www.tamug.edu/gradstudents/ggsa.htm.

Meher, L. C., Vidya Sagar, D., & Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews, 10**(3), 248-268.

Miao, X., & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology, 97**(6), 841-846.

Michael B. Johnson. (2009). **Microalgal Biodiesel Production through a Novel Attached Culture System and Conversion Parameters.** Master thesis in Biological Systems Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.

Minowa, T., Yokoyama, S.-Y., Kishimoto, M., & Okakura, T. (1995). Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermo chemical liquefaction. **Fuel, 74**(12), 1735-1738.

Qin, J. (2005). **Bio - hydrocarbons from algae: impacts of temperature, light and salinity on algae growth.** Retrieved September, 18, 2010, from https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/05-025.pdf

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

Rahman, M.H.M., Ali, R.M. & Said, H.A. (2005). **Alleviation of NaCl-induced Effects on *Chlorella vulgaris* and *Chlorococcum humicola* by Riboflavin Application.** Retrieved June, 25, 2010, from http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_7_NO_1/12.pdf

Rao, A.R., Sarada, R., & Ravishankar, G.A. (2007). Influence of CO_2 on Growth and Hydrocarbon Production in *Botryococcus braunii*. **Journal of Microbiology Biotechnology, 17**(3), 414-419.

Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R. & Ravishankar, G.A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. **Bioresource Technology, 98**(3), 560-564.

Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in biotechnology, 19**, 430-436.

Sawayama, S., Inoue, S., & Yokoyama, S. Y. (1995). Phylogenetic position of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae) based on small subunit ribosomal RNA sequence data. **Journal of Phycology, 31**(3), 419-420.

Scragg, A. H., Illman, A. M., Carden, A., & Shales, S. W. (2002). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass and Bioenergy, 23**(1), 67-73.

Sen, B., Alp, M.T. & Kocer, M.A.T. (2005). Studies on Growth of Marine Microalgae in Batch Cultures: I. *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta). **Asian Journal of Plant Sciences, 4**(6), 636-638

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

Takagi, M., Karseno & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering, 101**(3), 223-226.

Teshima, S.-i., Yamasaki, S., Kanazawa, A., & Hirata, H. (1983). Effects of water temperature and salinity on Eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 49**(5), 805.

Vazquez Duhalt, R., & Arredondo-Vega, B.Q. (1991a). Haloadaptation of the green alga *Botyococcus braunii* (Race A). **Phytoichemisty, 30**(9), 2919-2925.

Vazquez Duhalt, R., & Arredondo-Vega, B.Q. (1991b). **Oil production from microalgae under saline stress.** Biomass for energy and industry 5th E.C conference. (pp. 547-551). England: Elsevier Applied Science.

Widjaja, A., Chien, C.-C., & Ju, Y.-H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40**(1), 13-20.

Woertz, I.C. (2007). **Lipid productivity of algae grown on dairy wastewater as a possible feedstock for biodiesel.** Master Thesis in Civil and Environmental Engineering, California Polytechnic University, San Luis Obispo, U.S.A.

Wolf, F. R., Nonomura, A. M., & Bassham, J. A. (1985). Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii* (CHLOROPHYTA). **Journal of Phycology, 21**(3), 388-396.

Yue, L., & Chen, W. (2005). Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO_2 tolerant fresh water microalgae. **Energy Conversion and Management, 46**(11-12), 1868-1876.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย

อาหารเหลวสูตร Modified Chu 13 (Largeau et al., 1980) (อ้างโดย ยศวดี, 2547) มีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

องค์ประกอบหลัก	**กรัม/ลิตร**
KNO_3	0.200
K_2HPO_4	0.040
$MgSO_4.7H_2O$	0.100
$CaCl_2.2H_2O$	0.054
Fe citrate	0.010
Citric acid	0.100

เมื่อละลายองค์ประกอบหลักดังกล่าวแล้ว เติม Micro element 1 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 6.7 (เป็นค่าที่อยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่างของอ่างเก็บน้ำประมง จ.ขอนแก่น) โดยใช้ 1 N KOH, HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยอุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

Micro elelement ในปริมาตร 1 ลิตร จะมีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

องค์ประกอบ	**กรัม/ลิตร**
H_3BO_3	2.85
$MnCl_2$	1.80
$ZnSO_4.7H_2O$	0.02
$CuSO_4.5H_2O$	0.08
$CoCl_2.6H_2O$	0.08
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.05

ภาคผนวก ข

การศึกษาการเจริญของเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก

1. การวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย

ทำการวิเคราะห์หาค่าความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV 1601-Visible Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยจะเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายเพื่อทำการวิเคราะห์ทุก ๆ วัน ตลอดระยะการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน

2. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย

1. อบหลอดเก็บตัวอย่าง แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. ดูดสาหร่ายจากอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออกแล้วล้างตะกอนสาหร่ายด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
3. จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccators) จากนั้นนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เพื่อนำมาคำนวณหาค่าน้ำหนักแห้ง (Dry biomass) ตามสูตร

$$\text{น้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย} = \frac{(A - B) \times 100}{\text{ปริมาตรของสาหร่าย}}$$

A คือ น้ำหนักสาหร่ายก่อนอบ

B คือ น้ำหนักสาหร่ายหลังอบ

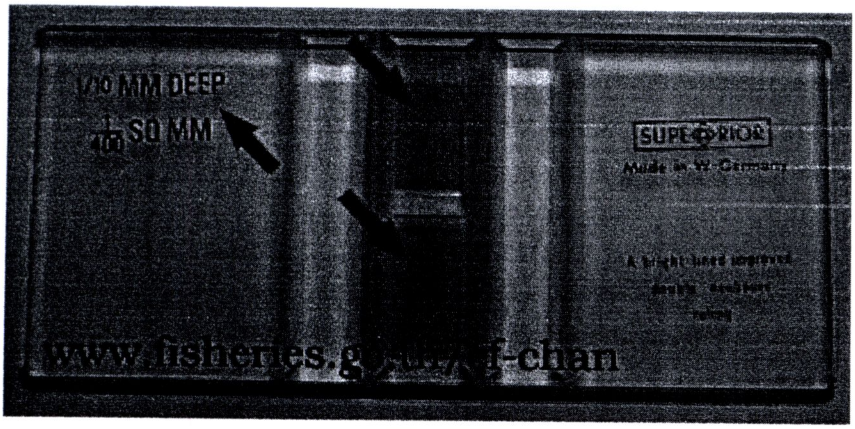
3. การนับจำนวนเซลล์สาหร่ายโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

การนับความหนาแน่นของแพลงก์ตอน ใช้หน่วย จำนวนเซลล์/ปริมาตรน้ำ โดยเฉพาะ เซลล์/มิลลิลิตร เป็นหน่วยที่นิยมใช้กับความหนาแน่นของสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ หรือ ในโรงเพาะฟัก การใช้หน่วยปริมาตรเป็นมิลลิลิตร เนื่องจากแพลงก์ตอนในห้องปฏิบัติการมีความหนาแน่นสูงมากโดยใช้อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด ที่เรียกว่า Heamacytometer

รายละเอียดบน Hemacytometer

บนแผ่น Hemacytometer นอกจากบอกชื่อบริษัท และแหล่งผลิตแล้ว ยังมีรายละเอียดอื่น ๆ อีก เช่น ระดับความลึก โดยทั่วไปจะใช้ 0.1 มิลลิเมตร และบอกขนาดของช่องเล็กที่สุดที่ตีตารางไว้ เช่น 1/400 ตารางมิลลิเมตร (ลูกศรชี้ขึ้น)

Hemacytometer จะมีตาราง 2 ตาราง (ลูกศรชี้ลง) และ Cover Glass ต้องใช้จะต้องผลิตสำหรับ Hemacytometer หากทำแตกจะต้องซื้อ Cover Glass ที่ผลิตมาสำหรับใช้กับ Hemacytometer เท่านั้น



รูปที่ ข.1 แสดงรายละเอียดของแผ่น Hemacytometer

ขั้นตอนการใช้งาน Hemacytometer

1. วาง Cover Glass บน Hemacytometer ซึ่งแผ่น Cover Glass จะอยู่เหนือผิวตาราง 0.1 มิลลิเมตร
2. ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำตัวอย่างมา 9-10 ไมโครลิตร
3. วางปลายปิเปตใกล้ขอบ Cover Glass จากนั้นค่อย ๆ หยดน้ำตัวอย่างลงไป ซึ่งน้ำจะไหลเข้าใต้ Cover Glass เองจนเต็มพื้นที่ตาราง (หยดทั้ง 2 ตาราง)
4. หากหยดน้ำตัวอย่างมากเกินไป จะเลอะล้น Cover Glass แต่หากหยดน้อยเกินไปน้ำก็จะไหลเข้าไม่เต็มพื้นที่ตาราง ต้องล้างและหยดใหม่

วิธีการนับปริมาณเซลล์สาหร่าย

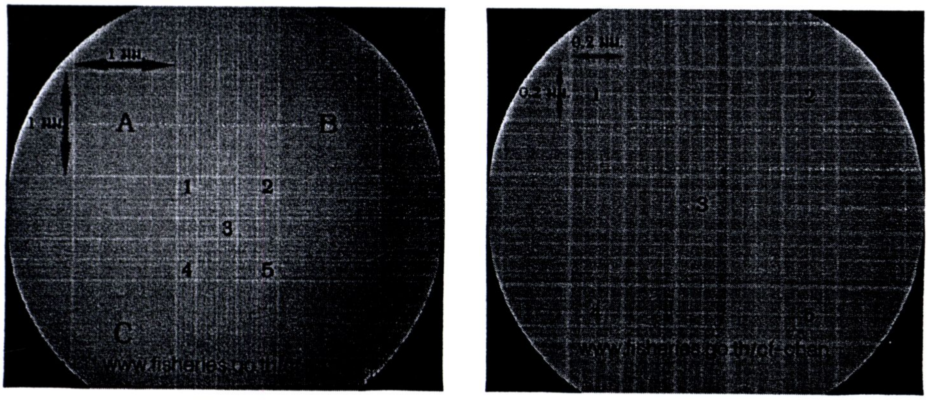
1. เมื่อน้ำตัวอย่างไหลเข้าใต้ Cover Glass จนเต็มพื้นที่ตาราง จะสามารถคำนวณปริมาตรน้ำได้จากพื้นที่ตาราง x ความลึก
2. เมื่อนับจำนวนสาหร่ายในตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็จะได้จำนวนแพลงก์ตอนต่อปริมาตรน้ำของตารางนั้น
3. จากนั้นคำนวณเป็น จำนวนแพลงก์ตอนต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร

ลักษณะของตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาพด้านซ้าย คือตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ช่อง A B C D มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรน้ำของช่อง A B C หรือ D ช่องใดช่องหนึ่งเท่ากับ ความกว้าง × ความยาว × ความลึก นั่นคือ 1 มม. × 1 มม. × 0.1 มม. หรือ 0.1 ซม. × 0.1 ซม. × 0.01 ซม. ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0001 ลบ.ซม. หรือ 0.0001 มล. (10^{-4}) นั่นเอง

ดังนั้นหากคือตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่าเลือกนับสาหร่ายที่ช่อง A B C และ D ความหนาแน่นของสาหร่ายจะมีค่าเท่ากับ

ค่าเฉลี่ยสาหร่ายในช่อง A B C D × 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร



รูปที่ ข.2 ตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

ภาพด้านขวา คือตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ช่อง 1 2 3 4 และ 5 มีความกว้างและยาวเท่ากับ 0.2 มม. ดังนั้นปริมาตรน้ำของช่อง 1 2 3 4 หรือ 5 ช่องใดช่องหนึ่งเท่ากับ ความกว้าง × ความยาว × ความลึก เท่ากับ 0.2 มม. × 0.2 มม. × 0.1 มม. หรือ 0.02 ซม. × 0.02 ซม. × 0.01 ซม. ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.000004 ลบ.ซม. หรือ 0.000004 มล. (4×10^{-6})

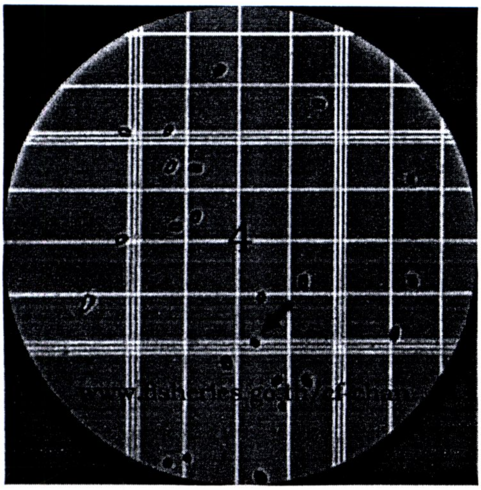
ดังนั้นหากเลือกนับสาหร่ายที่ช่อง 1 2 3 4 และ 5 ความหนาแน่นของสาหร่ายจะมีค่าเท่ากับ

ค่าเฉลี่ยสาหร่าย 5 ช่อง × 1/4 × 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร

หมายเหตุ ถ้าตัวอย่างมีการทำให้เจือจางต้องนำ Dilution factor (D) เข้ามาคูณด้วย

เส้นขอบช่องสี่เหลี่ยมที่นับจะมี 3 เส้น

ตารางของ Hemacytometer ที่ผู้ผลิตแนะนำให้ใช้นับสาหร่าย/แพลงก์ตอนได้ เส้นขอบช่องสี่เหลี่ยมนั้น จะมี 3 เส้น โดยเส้นตรงกลางเป็นเส้นของพื้นที่ตาราง ส่วนเส้นนอกและเส้นใน มีไว้เพื่อให้ง่ายต่อการตัดสินใจว่าเซลล์ของสาหร่ายจะอยู่นอกหรือในพื้นที่ช่องนับ (ลูกศรชี้)



รูปที่ ข.3 ลักษณะของเส้นขอบตารางของ Hemacytometer

การเลือกนับช่องใหญ่ (A-B-C-D) หรือ ช่องเล็ก (1-2-3-4-5)

การที่จะเลือกนับสาหร่ายโดยใช้ช่องใหญ่ (A-B-C-D) หรือช่องเล็ก (1-2-3-4-5) มีข้อคำนึงดังต่อนี้

1. การเลือกนับช่องใหญ่จะให้ค่าที่แม่นยำกว่าการเลือกนับที่ช่องเล็กเนื่องจากช่องใหญ่มีพื้นที่มากกว่า
2. สาหร่ายหรือแพลงก์ตอนบางชนิดที่เป็นเส้นสายหรือมีขนาดใหญ่มากจำเป็นจะต้องนับด้วยช่องใหญ่ เนื่องจากหากนับด้วยช่องเล็กเส้นสายของสาหร่ายมักจะเลยขอบของช่องเล็ก
3. หากสาหร่ายมีความหนาแน่นต่ำควรเลือกนับด้วยช่องใหญ่ (A-B-C-D)
4. ในกรณีที่ตัวอย่างสาหร่ายที่นับมีความหนาแน่นสูงมาก การนับในช่องใหญ่อาจจะใช้เวลานับมาก ก็สามารถเลือกนับในช่องเล็กได้

4. การหาอัตราการเจริญจำเพาะ และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า

ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate; μ_{max}) โดยหาจากกราฟการเจริญของสาหร่ายในช่วง Exponential growth phase และนำมาคำนวณตามสมการคณิตศาสตร์ ที่ระบุในการศึกษาของ Chiu et al. (2008) ดังต่อไปนี้

$$\text{ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ; } \mu_{max} = \frac{\ln(N_2 - N_1)}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ N คือจำนวนเซลล์

t คือหน่วยเวลา

$$\text{Doubling time : } t_d ; N_t = \frac{\ln(N_2 - N_1)}{t_2 - t_1}$$

สูตรคำนวณประชาการสุดท้าย $N_t = N_0^{\mu t}$

แทนค่า $2N_t = N_0^{\mu t}$

$$\ln 2 + \ln N_0 = \ln_0 + \mu t \ln e$$

$$\ln 2 = \mu t$$

ดังนั้น Doubling time: t_d $t = \frac{\ln 2}{\mu}$

หมายเหตุ

N_t = จำนวนประชากรสุดท้าย, N_0 = จำนวนประชากรเริ่มต้น

$\ln e = 1$, $\ln 2 = 0.693$

ตารางที่ ข.1 Analysis of variance ของการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการแปรผันระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

Between-Subjects Factors

		N
co2conc	.00	3
	5.00	3
	10.00	3
	15.00	3

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Biomass

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.602[a]	3	.201	50.613	.000
Intercept	46.468	1	46.468	11710.790	.000
co2conc	.602	3	.201	50.613	.000
Error	.032	8	.004		
Total	47.103	12			
Corrected Total	.634	11			

a. R Squared = .950 (Adjusted R Squared = .931)

Biomass

Duncan[a,b]

co2conc	N	Subset		
		1	2	3
.00	3	1.6393		
5.00	3		1.8827	
10.00	3			2.1673
15.00	3			2.1820
Sig.		1.000	1.000	.783

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .004.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสาหร่าย

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

สำหรับงานทดลองนี้ จะวิเคราะห์จากปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธี Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) ด้วยเครื่อง Kjeltec System โดยมีรายละเอียด และขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่างสาหร่าย 0.6 กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ในหลอดย่อย
2. เติมสารเร่ง K-jel tab (ประกอบด้วย K_2SO_4 5 g, Cu_2SO_4 0.15 g, TiO_2 0.15 g) จำนวน 2 เม็ด และกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเบา ๆ
3. นำไปย่อยบนเครื่องย่อย Kjeltec System จนได้สารละลายใส
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วนำไปต่อเข้ากับชุดเครื่องกลั่น
5. นำฟลาสก์ที่มีกรดบอริกเข้มข้น 4%ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลาย Bromocresol green และ Methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ มารองรับส่วนที่กลั่นได้
6. เติมสารละลาย 40% NaOH ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดย่อยที่เตรียมไว้ในเครื่องกลั่น
7. เปิดไอน้ำให้ความร้อน (steam) เพื่อทำการกลั่นตัวอย่าง
8. ถอดหลอดย่อยออกหลังจากกลั่นเสร็จให้นำฟลาสก์ในข้อ 5.5 มารองรับส่วนที่กลั่นได้ แล้วนำมาไตรเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนได้สารละลายสีชมพู
9. บันทึกปริมาณไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ใช้ไปแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนตามสูตรด้านล่างนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน} = \frac{14.01 \times (A - B) \times N}{W \times 10}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \text{ปริมาณโปรตีน} \times 6.25$$

A = ปริมาณของกรดที่ใช้ในการไตเตรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาณของกรดที่ใช้ในการไตเตรทกับ Blank

N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

W= น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (Phenol Sulfuric)

เป็นวิธีการที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ หรือน้ำตาลที่อยู่ในรูป mono-, di-, tri-, oligo- และ Polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้ โดยเมื่อสารทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟูริก จะให้สารประกอบสีส้ม

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอล 5%
2. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
3. กลูโคสบริสุทธิ์

วิธีการ

1. ชั่งสาหร่ายแห้ง 10 มิลลิกรัม โดยเครื่องชั่งละเอียด
2. เติมน้ำกลั่น ทำให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร
3. ดูดสารละลายสาหร่าย 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
4. เติมฟีนอล 5% 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร (ควรเติมให้เสร็จใน 20 วินาที) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรง ๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (Blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมแทนตัวอย่างในข้อ 3) และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7. การเตรียมกราฟมาตรฐาน ทำโดยการเตรียมสารละลายกลูโคสบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำตามขั้นตอนที่ 4-6

การคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกลูโคส จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

$$\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (\% dry weight)} = \frac{\text{(ความเข้มข้นของกลูโคส xปริมาณคาร์โบไฮเดรต) x100}}{\text{น้ำหนักแห้งของสาหร่าย (มก) x100}}$$

* ปริมาตรคาร์โบไฮเดรต คือ 50 มิลลิลิตร (ชั่งสาหร่ายแห้ง 10 มก. เติมน้ำกลั่นทำให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร)

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

งานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันโดยใช้วิธีซอกเล็ต (Soxhlet extraction) เป็นการสกัดสารสำคัญออกจากตัวอย่างทดลอง โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ เมทานอล หรือ เฮกเซน ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดน้ำมันจากวัตถุดิบต่าง ๆ โดยใช้ชุดสกัดสารในซอกเล็ต โดยให้ตัวทำละลายหมุนเวียนผ่านสารที่เราต้องการสกัดหลาย ๆ ครั้งที่อุณหภูมิสูงจนกระทั่งสารที่เราต้องการสกัดออกมามีความเข้มข้นมากพอ ส่วนตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วนั้น สามารถนำมากลั่นและนำกลับไปใช้ใหม่ได้

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ชุดอุปกรณ์สกัดน้ำมัน (Soxhlet extraction apparatus)
2. หลอดกระดาษใส่สารตัวอย่าง (thimble)
3. เตาอบ (oven)
4. โถดูดความชื้น (desiccators)
5. ตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอล)

โดยมีรายละเอียดและขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

1. ชั่งน้ำหนักสาหร่ายโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

2. ห่อด้วยกระดาษกรองให้มิดชิด แล้วนำไปใส่ในหลอดกระดาษ (Thimble)

3. นำหลอด Thimble ใส่ลงในชุดเครื่องสกัดน้ำมัน (Soxhlet) แล้วต่อกับขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอล) 100 มิลลิลิตร ลงไปในขวดก้นกลม (Receiving flask)

4. ต่อ Condenser เข้ากับเครื่อง Soxhlet ให้ความร้อนในอัตราเร็วของการควบแน่น 3 หยด/วินาที ทำการสกัด 6-8 ชั่วโมง หรือดูจนกระทั่งน้ำมันถูชะจาก Thimble ลงในขวดก้นกลมหมดแล้วโดยสังเกตจากสารละลายที่ไหลออกจาก Thimble ไม่มีสี

5. แยกขวดก้นกลมออกมาจากนั้นนำสารละลายผสมไปเทลงในกรวยแยก (Separatory funnel) เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้สารผสมเข้าดี แล้วเติมเฮกเซน 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่ากรวยแยกให้ของเหลว

ผสมกันมากที่สุด ในการเขย่าจะมีแรงดันจากไอระเหยของตัวทำละลายซึ่งต้องปล่อยออกโดยการเอียงกรวยแยกให้ปลายเอียงขึ้นประมาณ 45 องศา แล้วเปิดก๊อกเพื่อลดความดัน

6. ตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้นออกจากกัน เก็บสารละลายชั้นบนซึ่งจะมีน้ำมันละลายอยู่ในชั้นของเฮกเซนไว้ในหลอดที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในข้อ 5-6 โดยเก็บตัวอย่างไว้ในหลอดเดิม

7. หลังจากระเหยเฮกเซนออกให้หมดแล้วนำเข้าโถดูดความชื้น จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำมัน ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำมัน (\%)} = \frac{(B-A) \times 100}{C}$$

A = น้ำหนักหลอดเก็บตัวอย่างเปล่า (กรัม)
B = น้ำหนักหลอดเก็บตัวอย่างเปล่า + น้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ (กรัม)
C = น้ำหนักสาหร่าย (กรัม)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย (Crude fiber)

สำหรับงานทดลองนี้ ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง FIWE ซึ่งมีรายละเอียดและขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างที่สกัดน้ำมันแล้วชั่งใส่ในถ้วยแก้ว (Crucible) ประมาณ 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด

2. เติมสารช่วยกรอง 0.5 กรัม

3. เติมสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น 1.25 % ที่ต้มให้ร้อนแล้ว 150 มิลลิลิตร ที่มี n-octanol จำนวน 3 หยด ต้มไว้เป็นเวลา 30 นาที

4. เปิดส่วนสุญญากาศ เพื่อดูดสารละลายออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง โดยเปิดส่วนควบคุมความดัน เพื่อดันให้อากาศผ่านฐานของถ้วยแก้ว เพื่อให้ส่วนผสมในถ้วยคลุกเคล้ากันดีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

5. เติมสารละลาย KOH เข้มข้น 1.25 % ที่ทำให้ร้อนแล้ว 150 มิลลิลิตร และ n-octanol จำนวน 3 หยด ต้มไว้เป็นเวลา 30 นาที

6. เทสารละลาย KOH ออกและล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง และน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง แล้วนำมาล้างด้วยอะซีโตน 25 มิลลิลิตร 3 ครั้ง

7. นำถ้วยออกจากเครื่อง FIWE แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก จะได้ค่าน้ำหนักของเส้นใยรวมกับเถ้า (น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา)

8. จากนั้นนำไปหาปริมาณเถ้าโดยเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 500 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาตั้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำออกมาชั่งน้ำหนักเถ้า ซึ่งจะเป็นน้ำหนักของตัวอย่างหลังเผาด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณเส้นใยตามสูตรด้านล่างนี้

$$\text{ปริมาณเส้นใย(\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}) \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างสาหร่าย}}$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash)

ในอาหารประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าเป็นวิธีการหาปริมาณของสารอนินทรีย์ที่เหลือจากการเผาไหม้ที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่สารอินทรีย์ถูกเผาไหม้จนหมด เถ้าที่ได้จะมีสีขาวเทา ซึ่งมีส่วนประกอบของแร่ธาตุที่เปลี่ยนไปจากสภาพเดิม เนื่องจากแร่ธาตุบางอย่างอาจระเหยไปในระหว่างการเผาที่อุณหภูมิสูง 500 องศาเซลเซียส

วัสดุอุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace)
2. เตาอบ
3. ถ้วยกระเบื้อง
4. เครื่องชั่งละเอียด

โดยมีรายละเอียดและขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

1. อบภาชนะบรรจุ (crucible) ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของภาชนะ
2. ชั่งน้ำหนักสาหร่าย 1 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. นำไปวางบนแผ่นให้ความร้อน ให้ความร้อนอย่างช้า ๆ ค่อย ๆเพิ่มความร้อนจนตัวอย่างเป็นสีดำและเผาไหม้จนหมดควัน
4. นำไปเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (จับเวลาเมื่ออุณหภูมิของเตาเผาถึง 500 °C)
5. ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณเถ้า ตามสูตรด้านล่างนี้

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{(B-A) \times 100}{C}$$

B = น้ำหนักของภาชนะ + สาหร่ายหลังเผา
A = น้ำหนักของภาชนะ
C = น้ำหนักของสาหร่ายก่อนก่อนเผา

6. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture)

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและสารที่ระเหยได้ที่อุณหภูมิ 103 ± 2 °C โดยอาศัยหลักการอบที่อุณหภูมิที่แน่นอน อบจนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ โดยใช้ตู้อบ น้ำหนักที่หายไปคือปริมาณความชื้นและสารที่ระเหยได้

วัสดุอุปกรณ์

1. ถ้วยอลูมิเนียม
2. เตาอบ
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. โถดูดความชื้น

โดยมีรายละเอียดและขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

1. อบภาชนะบรรจุ ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปดูดความชื้นด้วยโถดูดความชื้น เป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของภาชนะ
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสาหร่าย (Wet cell biomass) 5 กรัม
3. ปิดฝาแล้วนำเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 103 °C จนอุณหภูมิของตัวอย่างคงที่ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง
4. นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 30 นาที
5. ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วนำไปคำนวณปริมาณความชื้น ตามสูตรด้านล่างนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(B-A) \times 100}{C}$$

B = น้ำหนักของสาหร่ายก่อนอบ
A = น้ำหนักของสาหร่ายหลังอบ
C = น้ำหนักแห้งของสาหร่ายก่อนอบ

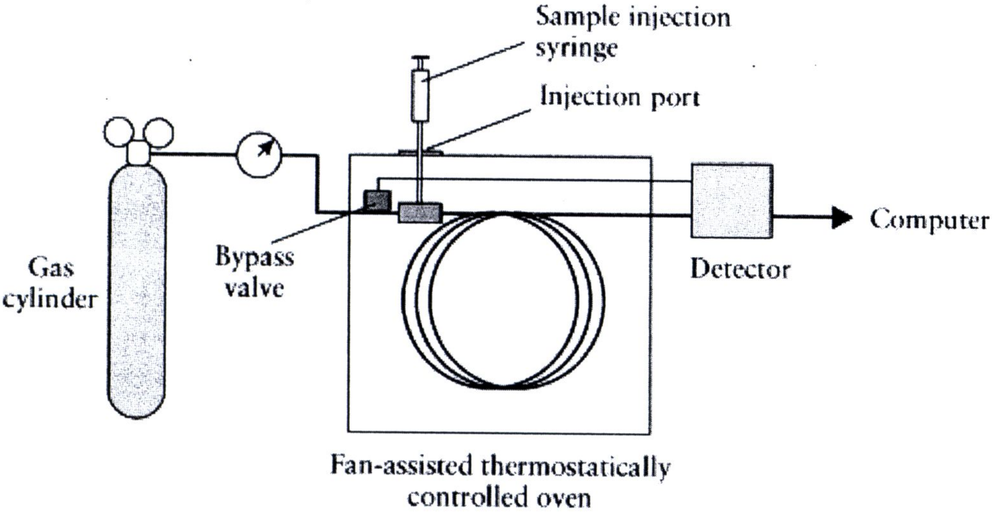
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน

วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติของไบโอดีเซล

เครื่อง Gas Chromatography (GC) เป็นเครื่องวิเคราะห์สารเคมีที่ใช้เทคนิคการแยกสารผสมที่ระเหยได้ง่ายที่เป็นทั้งของแข็งของเหลว และก๊าซ โดยมีก๊าซเฉื่อยเป็นตัวพา (Carrier gas) เข้า column ซึ่งสามารถแยกสารผสมมากกว่าหนึ่งชนิดให้ได้มาซึ่งสารประกอบเดี่ยวๆ ตามลำดับ ในสภาวะที่เหมาะสม และตรวจวัดสารตัวอย่างด้วย detector ตามคุณสมบัติเฉพาะทางเคมีพร้อมทั้งคำนวณหาชนิดและปริมาณของสารตัวอย่างเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard samples) โดยอัตโนมัติด้วยระบบคอมพิวเตอร์



รูปผนวกที่ ง.1 Gas Chromatography system

องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่อง GC สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนคือ

1. Injector เป็นส่วนที่สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่เครื่องและระเหยเป็นแก๊สก่อนที่จะเข้าสู่ column อุณหภูมิที่เหมาะสมของ injector ควรเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้สารสามารถระเหยได้แต่ไม่ทำให้สารสลายตัว (decompose)
2. Oven เป็นส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุ column และควบคุมอุณหภูมิของ column ให้เป็นไปตามที่กำหนด
3. Detector เป็นส่วนที่ตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง (Flame Ionization Detector; FID)

การประยุกต์ใช้งานเครื่อง GC กับการวิเคราะห์ไบโอดีเซล

วิธีการทดสอบหาค่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ในน้ำมันไบโอดีเซล; EN 14103 เป็นการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเอสเทอร์ของ Fatty Acid Methyl Ester เหมาะสำหรับการหาปริมาณเอสเทอร์ของเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันสาหร่าย โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี การคำนวณหาปริมาณกรดไขมันในครั้งนี้จะใช้โครมาโตแกรมที่วิเคราะห์จากเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟฟีโดยนำความสูงของพีค (Height peak) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดไขมันมาตรฐาน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี บริษัท Agilent Model 6890N รุ่น G1530N
    1.1 คอลัมน์ บริษัท Supelco รุ่น Inert Cap WAX
        - Stationary phase คือ polyethylene glycol
        - ความยาว 100 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร และความหนา 0.2 ไมโครเมตร
    1.2 ดีเทคเตอร์ ชนิด เฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์
2. สารละลายเฮปเทน
3. ขวดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งสาร Internal standard น้ำหนัก 0.0500 กรัม โดยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในขวดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งสารตัวอย่างไบโอดีเซล น้ำหนัก 0.2500 กรัม โดยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในขวดเดิมพร้อมบันทึกน้ำหนัก
3. เติมสารละลายเฮปเทน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าสารละลายให้เข้ากัน
4. นำตัวอย่าง ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

ตัวอย่างในการคำนวณ :

การวิเคราะห์นี้น้ำหนักสารตัวอย่าง เท่ากับ 249.7 มิลลิกรัม และน้ำหนักของ internal standard เท่ากับ 50.4 มิลลิกรัม นำไปคำนวณได้ผลดังนี้

$$C(\%\ W/W) = \frac{[(\sum A - AEI - AH) \times MEI \times 100]}{(AEI \times MSAM)}$$

$$= \frac{[(323780428 - 3971183.7 - 300560869.2) \times 0.0504 \times 100]}{(3971183.7 \times 0.2497)}$$

$$= 97.83$$

ความหมายของตัวแปรในสมการคำนวณ

เมื่อ C = ปริมาณเมทิลเอสเทอร์, ร้อยละโดยน้ำหนัก
$\sum A$ = พื้นที่พีคทั้งหมด
AEI = พื้นที่พีคของสาร internal standard
AH = พื้นที่พีคของสารละลายเฮปเทน
MEI = น้ำหนักของสาร internal standard (มิลลิกรัม)
$MSAM$ = น้ำหนักของสารตัวอย่างไบโอดีเซล (มิลลิกรัม)

ภาคผนวก จ

การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

ในระหว่างการศึกษาได้มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในรูปแบบต่าง ๆ ดังนี้

1. การประชุมวิชาการ (Conference)

   1.1 ภายในประเทศ

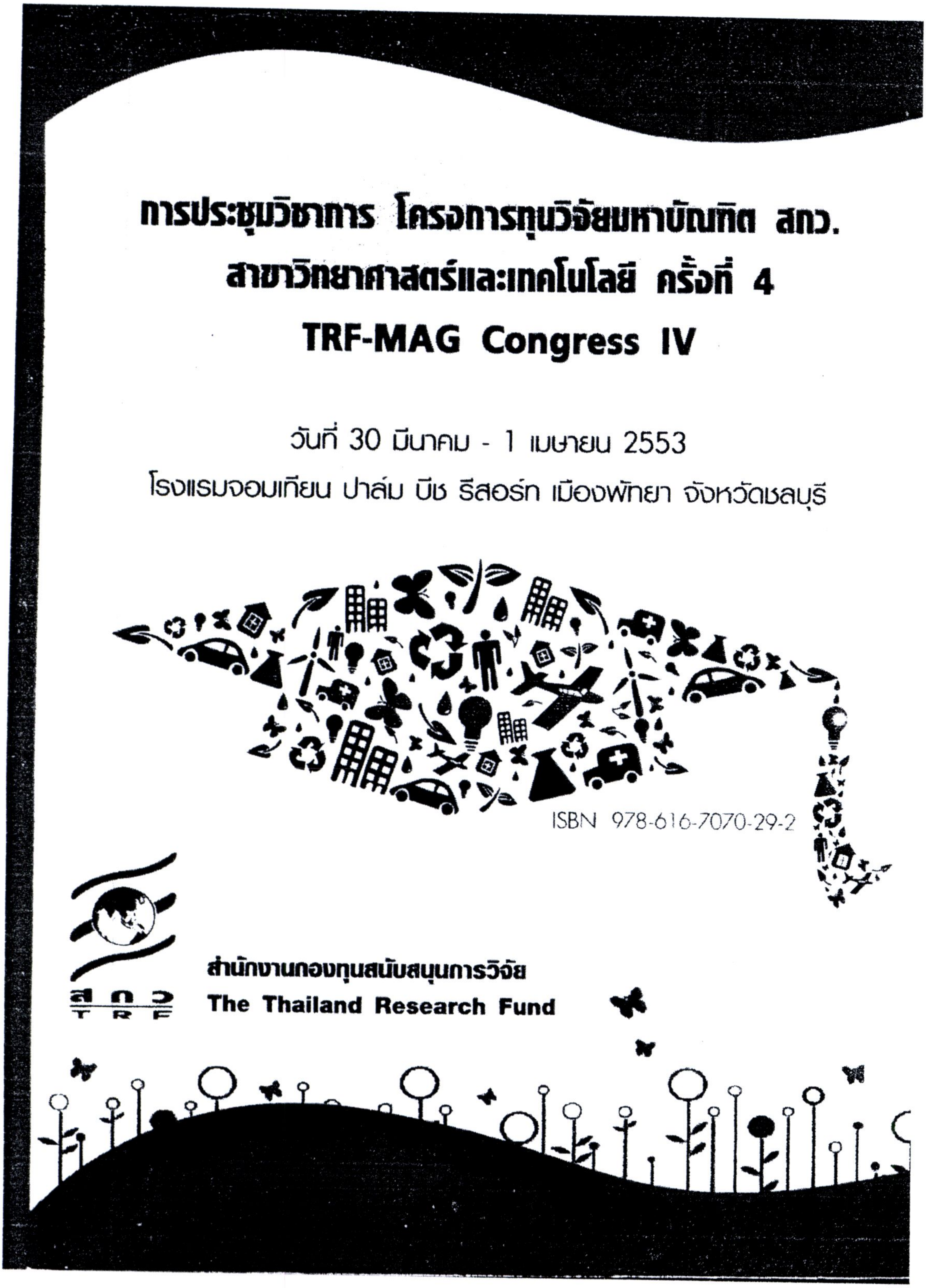
   - การประชุมวิชาการโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 4 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี ระหว่างวันที่ 30 มีนาคม 2553 ถึง 1 เมษายน 2553 (นำเสนอแบบปากเปล่า)

   1.2 ต่างประเทศ

   - 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 14-18 September 2010, Rimini, Italy (Oral presentation)

2. การเขียนบทความวิจัย (Manuscript)

   1) P. Enmak and P. Kaewkannetra, (2010). *In-situ* acidic transesterrification of microalgal oil: Effect of CO_2 and oil storage on *Scenedesmus obliuus.* Bioresource Technology. (Submission)



การประชุมวิชาการ โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.
สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 4
TRF-MAG Congress IV

วันที่ 30 มีนาคม - 1 เมษายน 2553
โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี

ISBN 978-616-7070-29-2

สกว
TRF
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
The Thailand Research Fund

Influences of CO_2 Concentrations and Salinity on Acceleration of Microalgal Oil as Raw Material for Biodiesel Production

Pravoon Enmak [a,b] **and Pakawadee Keawkanetra** [b,c]
[a] *Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*
[b] *Center for Alternative Research and Development, Khon Kaen university, Khon Kaen 40002, Thailand.*
[c] *Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand.*

Introduction and Objective

Carbon dioxide (CO_2), one of the main greenhouse gases, causes global warming problem. Many researchers have played attention to figure out alternative bio-regenerative methods to reduce the atmospheric CO_2. Microalgae are interesting microorganisms because of their high growth rate and lipid accumulation. In this work, we investigated influences of CO_2 concentrations and salinity on acceleration of microalgal oil as raw material for biodiesel production.

Methods

The water samples were collected from water basins in several Northeastern area of Thailand. The algae were subjected to purification by serial dilution followed by micropipette technique. The isolated culture was inspected by regular observation under microscope method and confirmed in isolation techniques by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). Then, the isolated microalgae were cultivated in 3-L vertical tubular glass photoreactors, using modified Chu 13 medium maintained under autotrophic cultivations (16:8 hr of light dark cycle using cool white fluorescent and ambient temperature). Effect of different CO_2 concentrations mixed with ambient air (5, 10% and 15%) on growth of the isolated microalgae was also investigated.

Results

The green colonial unicellular microalga was identified as *Scenedesmus Obliquus*. The strain can be grown in all variations of CO_2 concentrations. Moreover, it was found that the algal biomass yields increased as CO_2 increases. The maximum biomass was obtained at 2.18 gL^{-1} when 15% CO_2 concentration was used.

Conclusion

The optimal condition for cultivation of *Scenedesmus Obliquus* obtained will be further investigated in other stress condition of sodium chloride (NaCl) concentrations (0.1, 0.2, 0.3 M). Then, the optimal condition for both algal biomass production and oil accumulation will be evaluated. In addition the project will be fulfilled after cell recovery, microalgal oil extraction and transesterification reaction for biodiesel production.

Keywords: microalgae, isolation, carbon dioxide, salinity, biodiesel production

Selected References:

1. Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H. and Lin, C.S. **Bioresource Technology** 2009; 100: 833-838
2. Dayananda, C., Ravishanka, G.A., Sarada, R. and Kumar, V. **Electronic Journal of Biotechnology** 2007; http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue1/full/16/index.html
3. Dayananda, C., Sarada, R., Rani, M.U., Shamala, T.R. and Ravishankar, G. A. **Biomass and Bioenergy** 2007; 31: 87-93.
4. Rao R., Sarada A.R. and Ravishankar G.A. **J. Microbiol. Biotechnol** 2007; 17(3): 414-419.

การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า ในการประชุมวิชาการโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.
สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 4 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี
ระหว่าง
วันที่ 30 มีนาคม 2553 ถึง 1 เมษายน 2553

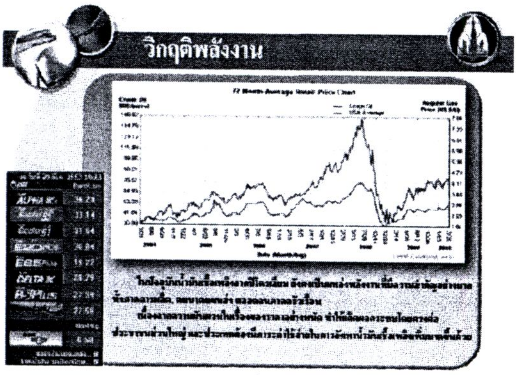
อิทธิพลของความเข้มข้นของ CO_2 และความเค็ม
ต่อการเร่งการสะสมน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก
เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

ประยูร เอ็นมาก

MRG-W1515S034

[illegible]

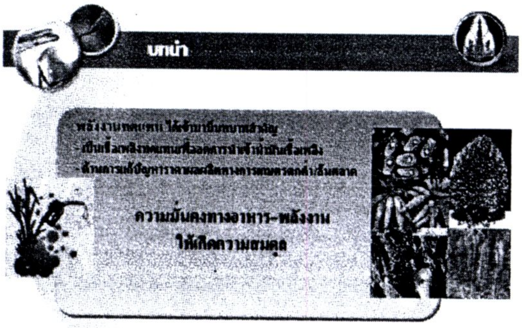
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น



วิกฤติพลังงาน

ในปัจจุบันน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ยังคงเป็นแหล่งพลังงานที่มีความสำคัญอย่างมาก ทั้งภาคการผลิต, คมนาคมขนส่ง และภาคครัวเรือน

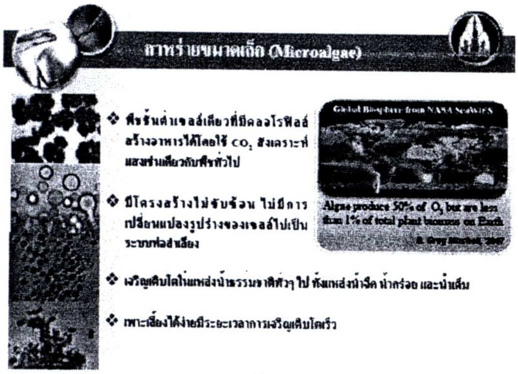
เนื่องจากความผันผวนในเรื่องของราคาน้ำมัน ทำให้เกิดผลกระทบโดยตรงต่อประชาชนส่วนใหญ่ และประเทศต้องเสียค่าใช้จ่ายในการจัดหาน้ำมันเชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้นด้วย



บทนำ

พลังงานทดแทน ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ
- เป็นเชื้อเพลิงทดแทนที่ลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง
- ด้านการแก้ปัญหาราคาผลผลิตทางการเกษตรตกต่ำ/ล้นตลาด

ความมั่นคงทางอาหาร-พลังงาน
ให้เกิดความสมดุล



สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)

- ❖ พืชชั้นต่ำเซลล์เดียวที่มีคลอโรฟิลล์ สร้างอาหารได้โดยใช้ CO_2 สังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไป
- ❖ มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไปเป็นระบบท่อลำเลียง
- ❖ เจริญเติบโตในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วๆ ไป ทั้งแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม
- ❖ เพาะเลี้ยงได้ง่ายมีระยะเวลาการเจริญเติบโตเร็ว

Algae produce 50% of O_2 but are less than 1% of total plant biomass on Earth

B. Greg Mitchell, 2007

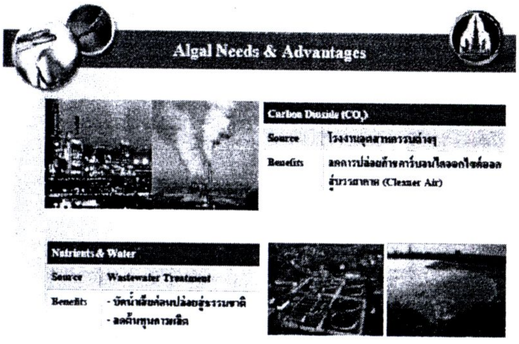
สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)

Lindsey Bierer, 2006

พื้นที่และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จะต้องมีอุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีไม่ต่ำกว่า 15 °C (บริเวณแถบเส้นศูนย์สูตร)

Oil Source	Biomass [illegible]
Soya	1-2.5
Rapeseed	3
Palmoil	19
Jatropha	7.5-10
Microalgae	140-255

Source: [illegible]



Algal Needs & Advantages

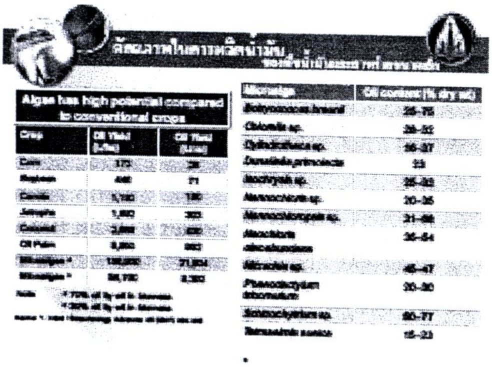
Carbon Dioxide (CO_2)	
Source	โรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ
Benefits	ลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศ (Cleaner Air)

Nutrients & Water	
Source	Wastewater Treatment
Benefits	- บัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติ - ลดต้นทุนการผลิต

Algal Needs & Advantages

Land	
[illegible]	- [illegible] - [illegible]
[illegible]	- [illegible] - [illegible]

Light	
[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]



ศักยภาพในการผลิตน้ำมัน

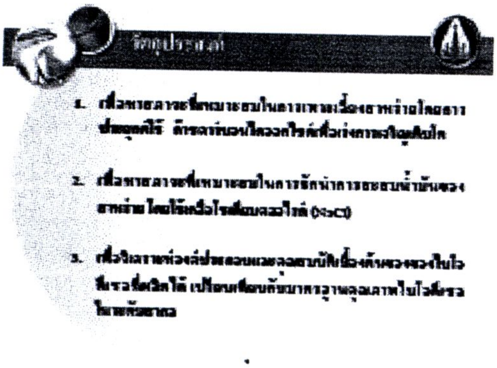
[illegible]

Algae has high potential compared to conventional crops

Crop	Oil Yield (L/ha)	Oil Yield (L/rai)
Corn	172	28
Soybean	446	71
Canola	1,190	190
Jatropha	1,892	303
Coconut	2,689	430
Oil Palm	5,950	952
Microalgae a	136,900	21,904
Microalgae b	58,700	9,392

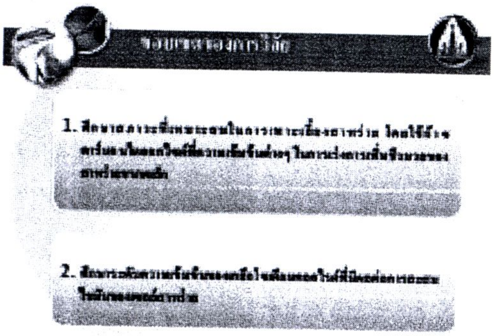
Note: a 70% oil (by wt) in biomass.
b 30% oil (by wt) in biomass.
[illegible]

Microalga	Oil content (% dry wt)
Botryococcus braunii	25–75
Chlorella sp.	28–32
Cylindrotheca sp.	16–37
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25–33
Nannochloris sp.	20–35
Nannochloropsis sp.	31–68
Neochloris oleoabundans	35–54
Nitzschia sp.	45–47
Phaeodactylum tricornutum	20–30
Schizochytrium sp.	50–77
Tetraselmis sueica	15–23



วัตถุประสงค์

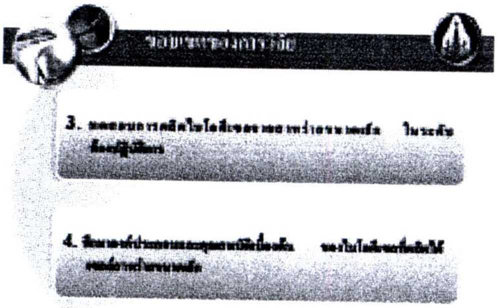
1. [illegible]
2. [illegible] (CO₂)
3. [illegible]



ขอบเขตของการวิจัย

1. [illegible]

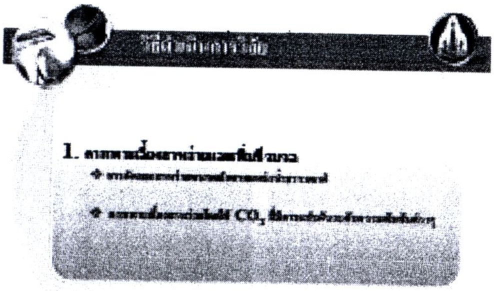
2. [illegible]



ขอบเขตของการวิจัย

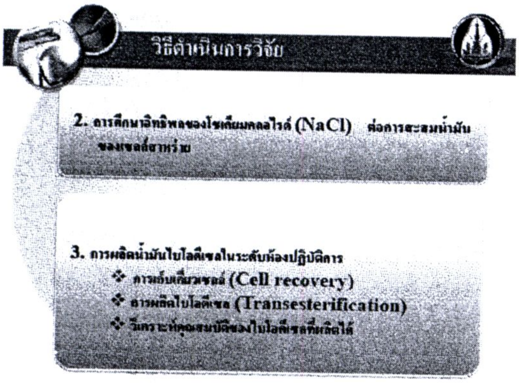
3. [illegible]

4. [illegible]



วิธีดำเนินการวิจัย

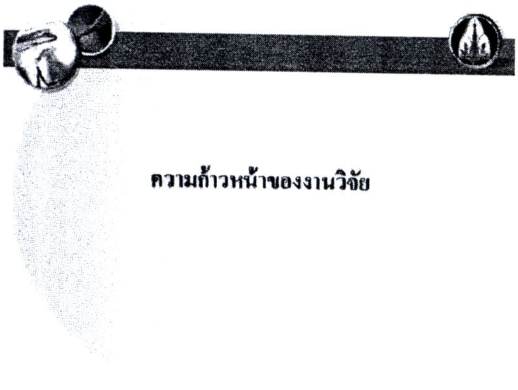
1. [illegible]
- [illegible]
- [illegible] CO_2 [illegible]



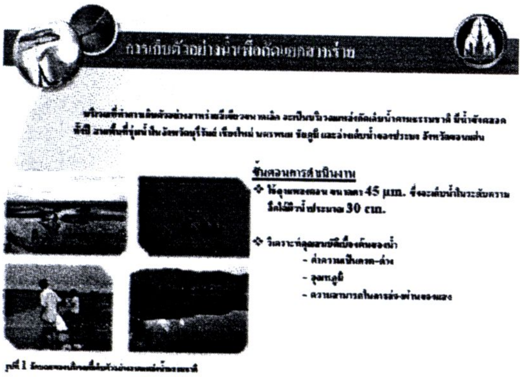
วิธีดำเนินการวิจัย

2. การศึกษาอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการสะสมน้ำมันของเซลล์สาหร่าย

3. การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการ
- ❖ การเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell recovery)
- ❖ การผลิตไบโอดีเซล (Transesterification)
- ❖ วิเคราะห์คุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตได้



ความก้าวหน้าของงานวิจัย

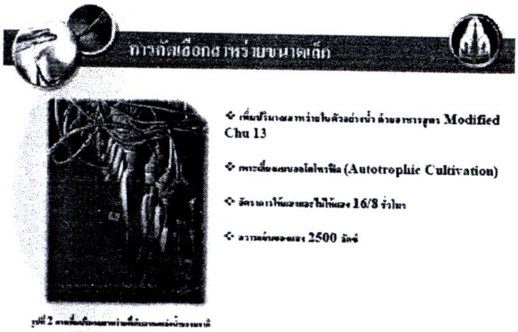


การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อคัดแยกสาหร่าย

บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก จะเป็นบริเวณแหล่งกักเก็บน้ำตามธรรมชาติ มีน้ำขังตลอดทั้งปี ตามพื้นที่ชุ่มน้ำในจังหวัดบุรีรัมย์ เชียงใหม่ นครพนม ชัยภูมิ และอ่างเก็บน้ำ[illegible] จังหวัดขอนแก่น

รูปที่ 1 ลักษณะของบริเวณที่เก็บตัวอย่างแหล่งน้ำธรรมชาติ

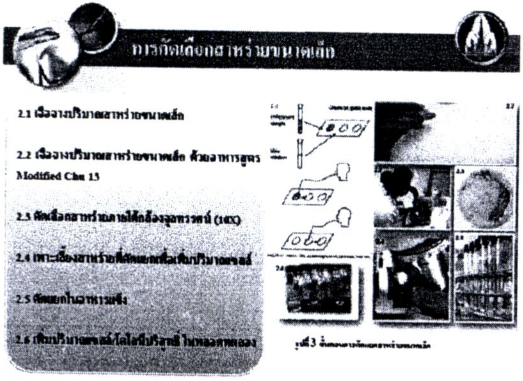
ขั้นตอนการดำเนินงาน
- ❖ ใช้ถุงแพลงตอน ขนาดตา 45 µm. ซึ่งจะตักน้ำในระดับความลึกใต้ผิวน้ำประมาณ 30 cm.
- ❖ วิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของน้ำ
  - ค่าความเป็นกรด-ด่าง
  - อุณหภูมิ
  - ความสามารถในการส่องผ่านของแสง



การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็ก

รูปที่ 2 การเพิ่มปริมาณสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

- ❖ เพิ่มปริมาณสาหร่ายในตัวอย่างน้ำ ด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13
- ❖ เพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค (Autotrophic Cultivation)
- ❖ อัตราการให้แสงและไม่ให้แสง 16/8 ชั่วโมง
- ❖ ความเข้มของแสง 2500 ลักซ์



การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็ก

2.1 เจือจางปริมาณสาหร่ายขนาดเล็ก

2.2 เจือจางปริมาณสาหร่ายขนาดเล็ก ด้วยอาหารสูตร Modified Chu 13

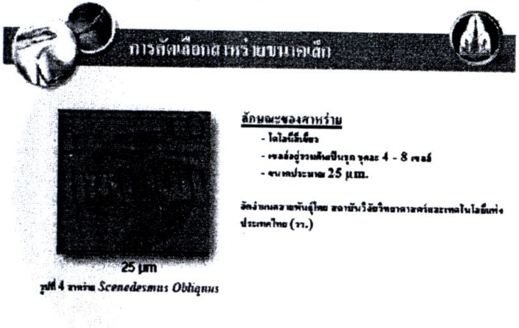
2.3 คัดเลือกสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (10X)

2.4 เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดแยกเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์

2.5 คัดแยกในอาหารแข็ง

2.6 เพิ่มปริมาณเซลล์/โคโลนีบริสุทธิ์ ในหลอดทดลอง

รูปที่ 3 ขั้นตอนการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็ก



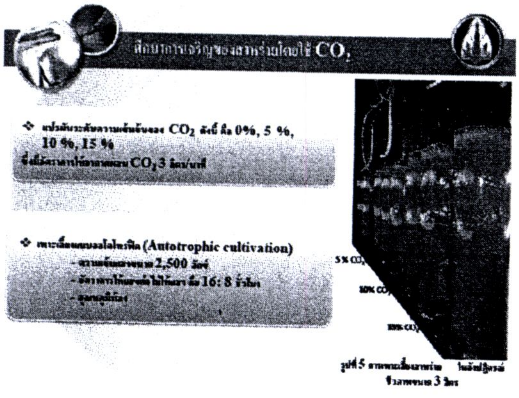
การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็ก

25 µm

รูปที่ 4 สาหร่าย *Scenedesmus Obliquus*

ลักษณะของสาหร่าย
- โคโลนีสีเขียว
- เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 4 - 8 เซลล์
- ขนาดประมาณ 25 µm.

จัดจำแนกสายพันธุ์โดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)



ศึกษาการเจริญของสาหร่ายโดยใช้ CO_2

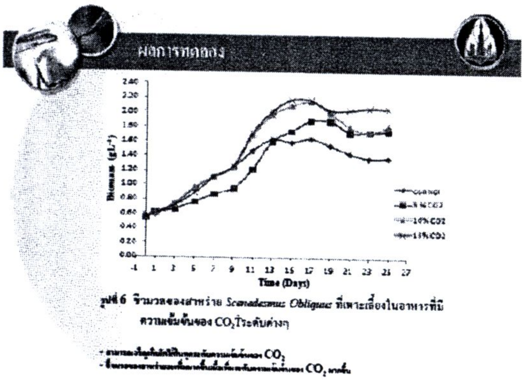
- แปรผันระดับความเข้มข้นของ CO_2 ดังนี้ คือ 0%, 5 %, 10 %, 15 %

ซึ่งมีอัตราการให้อากาศผสม CO_2 3 ลิตร/นาที

- เพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิก (Autotrophic cultivation)
  - ความเข้มแสงขนาด 2,500 ลักซ์
  - อัตราการให้แสงต่อไม่ให้แสง คือ 16: 8 ชั่วโมง
  - อุณหภูมิห้อง

5% CO2
10% CO2
15% CO2

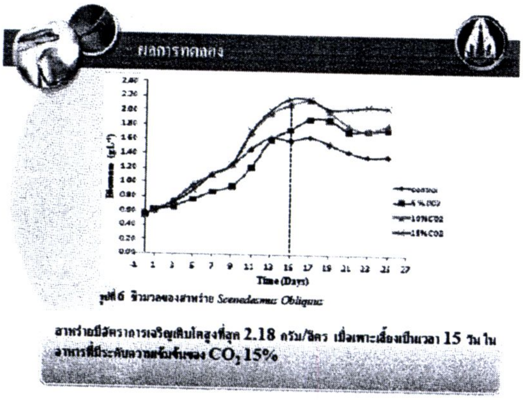
รูปที่ 5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร



ผลการทดลอง

รูปที่ 6 ชีวมวลของสาหร่าย *Scenedesmus Obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของ CO_2 ระดับต่างๆ

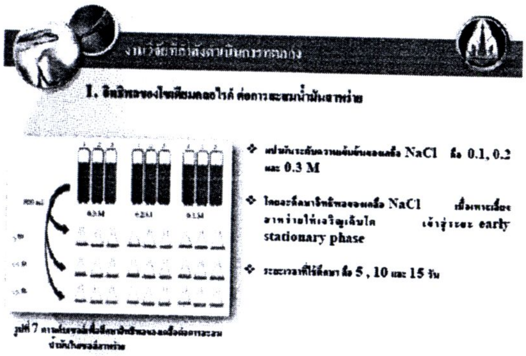
- สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกระดับความเข้มข้นของ CO_2
- ชีวมวลของสาหร่ายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ CO_2 มากขึ้น



ผลการทดลอง

รูปที่ 6 ชีวมวลของสาหร่าย *Scenedesmus Obliquus*

สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.18 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ CO_2 15%



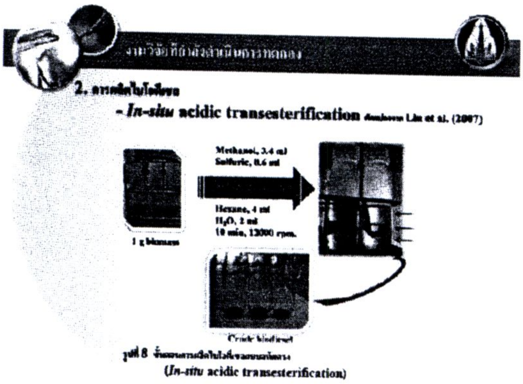
งานวิจัยที่กำลังดำเนินการทดลอง

1. อิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ ต่อการสะสมน้ำมันสาหร่าย

900 ml
0.3 M
0.2 M
0.1 M
5 วัน
10 วัน
15 วัน

รูปที่ 7 การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของเกลือต่อการสะสมน้ำมันในเซลล์สาหร่าย

- แปรผันระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl คือ 0.1, 0.2 และ 0.3 M
- โดยจะศึกษาอิทธิพลของเกลือ NaCl เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้เจริญเติบโต เข้าสู่ระยะ early stationary phase
- ระยะเวลาที่ใช้ศึกษา คือ 5 , 10 และ 15 วัน



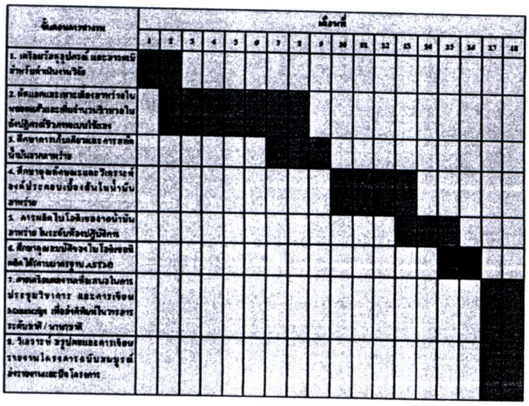
งานวิจัยที่กำลังดำเนินการทดลอง

2. การผลิตไบโอดีเซล

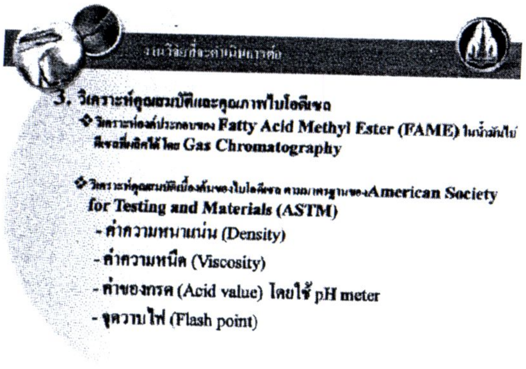
- *In-situ* acidic transesterification ดัดแปลงจาก Lin et al. (2007)

Methanol, 3.4 ml
Sulfuric, 0.6 ml
Hexane, 4 ml
H2O, 2 ml
10 min, 12000 rpm.
1 g biomass
Crude biodiesel

รูปที่ 8 ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลแบบทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยตรง
(*In-situ* acidic transesterification)



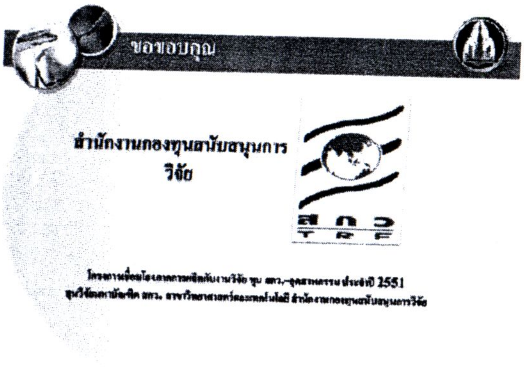
ขั้นตอนการทำงาน	เดือนที่																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. เตรียมวัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับดำเนินงานวิจัย	■	■																
2. คัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายในหลอดแก้วและเพิ่มจำนวนชีวมวลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใช้แสง		■	■	■	■	■	■	■										
3. ศึกษาการเก็บเกี่ยวและการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย							■	■	■									
4. ศึกษาคุณลักษณะและวิเคราะห์องค์ประกอบเชิงเส้นในน้ำมันสาหร่าย										■	■	■	■					
5. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย ในระดับห้องปฏิบัติการ													■	■	■			
6. ศึกษาคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ตามมาตรฐาน ASTM															■	■		
7. จัดเตรียมผลงานเพื่อเสนอในการประชุมวิชาการ และการเขียน manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ / นานาชาติ																	■	■
8. วิเคราะห์ สรุปผลและการเขียนรายงานโครงการฉบับสมบูรณ์ส่งรายงานและปิดโครงการ																	■	■



งานวิจัยที่จะดำเนินการต่อ

3. วิเคราะห์คุณสมบัติและคุณภาพไบโอดีเซล

- ❖ วิเคราะห์องค์ประกอบของ Fatty Acid Methyl Ester (FAME) ในน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้ โดย Gas Chromatography
- ❖ วิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของไบโอดีเซล ตามมาตรฐานของAmerican Society for Testing and Materials (ASTM)
  - ค่าความหนาแน่น (Density)
  - ค่าความหนืด (Viscosity)
  - ค่าของกรด (Acid value) โดยใช้ pH meter
  - จุดวาบไฟ (Flash point)

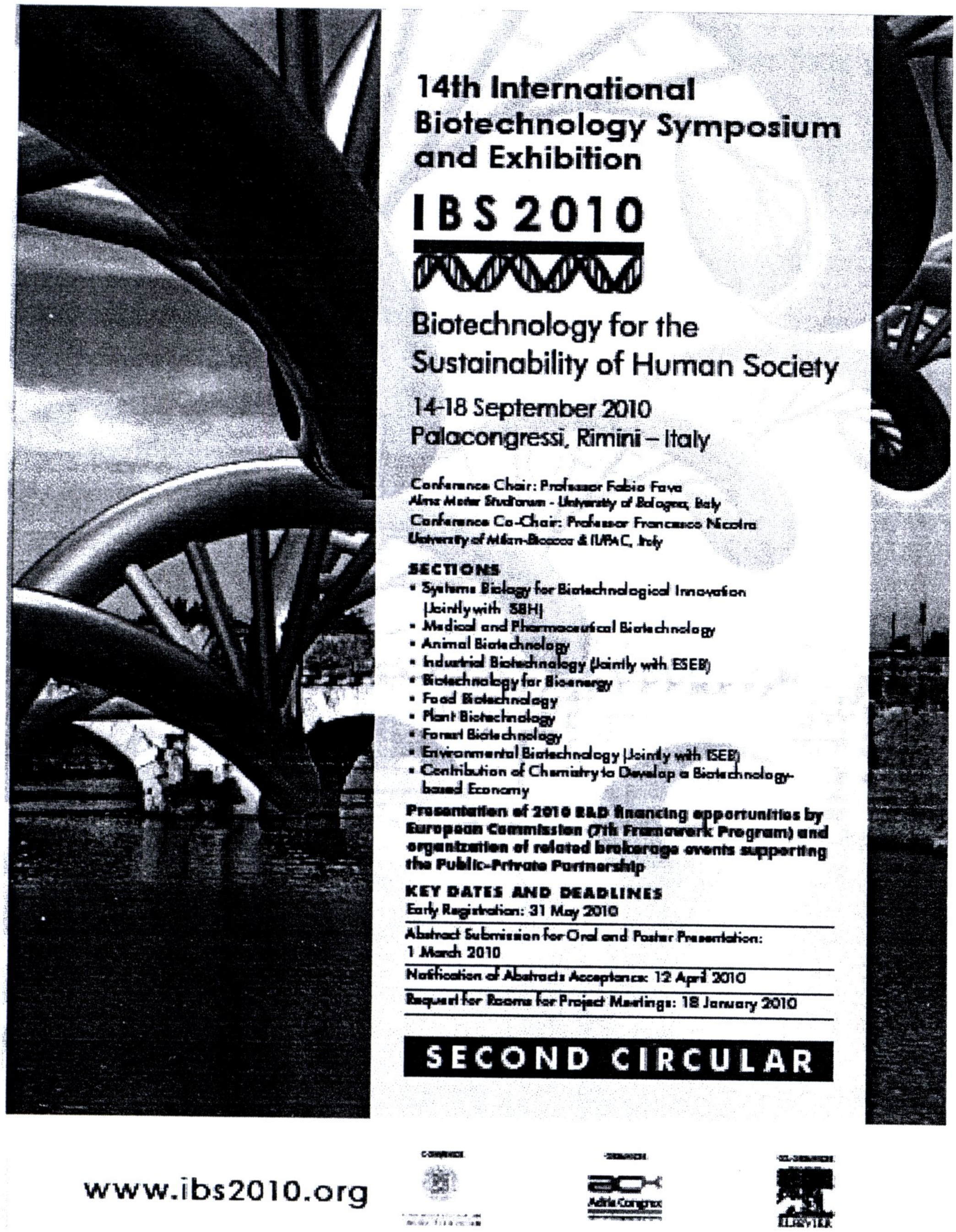


ขอขอบคุณ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม ประจำปี 2551
ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย



14th International Biotechnology Symposium and Exhibition

IBS 2010

Biotechnology for the Sustainability of Human Society

14-18 September 2010
Palacongressi, Rimini – Italy

Conference Chair: Professor Fabio Fava
Alma Mater Studiorum - University of Bologna, Italy
Conference Co-Chair: Professor Francesco Nicotra
University of Milan-Bicocca & IUPAC, Italy

SECTIONS

- Systems Biology for Biotechnological Innovation (Jointly with SBH)
- Medical and Pharmaceutical Biotechnology
- Animal Biotechnology
- Industrial Biotechnology (Jointly with ESEB)
- Biotechnology for Bioenergy
- Food Biotechnology
- Plant Biotechnology
- Forest Biotechnology
- Environmental Biotechnology (Jointly with ESEB)
- Contribution of Chemistry to Develop a Biotechnology-based Economy

Presentation of 2010 R&D financing opportunities by European Commission (7th Framework Program) and organization of related brokerage events supporting the Public-Private Partnership

KEY DATES AND DEADLINES

Early Registration: 31 May 2010

Abstract Submission for Oral and Poster Presentation:
1 March 2010

Notification of Abstracts Acceptance: 12 April 2010

Request for Rooms for Project Meetings: 18 January 2010

SECOND CIRCULAR

www.ibs2010.org

Title:

Influences of CO_2 concentrations and salinity on acceleration of microalgal oil as raw material for biodiesel production

Authors & affiliations:

Prayoon Enmak [a,b], *Pakawadee Kaewkannetra* [b,c]
[a] *Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*
[b] *Centre for Alternative Energy Research and Development (AERD),*
Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[c] *Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University,*
Khon Kaen 40002, Thailand

Abstract:

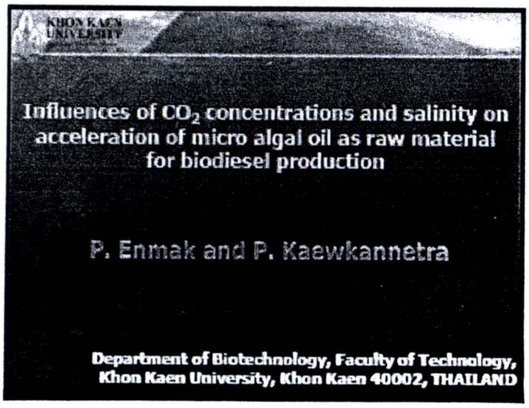
In this work, several microalgae samples were collected from natural water basins in northern area of Thailand using micropipette technique. The isolation step was investigated by regular observation under microscope technique. The algal strains were enriched in modified Chu 13 medium. The morphology of the algal isolated strain showed in a green unicellular colony thereafter as identified as *Scenedesmus Obliquus.* Then, growth monitoring was performed in 3L vertical tubular glass photo-reactors containing modified Chu 13 medium under autotrophic cultivations (16:8 hr of light dark cycle using cool white fluorescent at room temperature) coupling which injection of different CO_2 concentrations (5, 10 and 15%) mixed with ambient air for achieving the maximum algal biomass. The results revealed that the *S. Obliquus* can be grown in all variations of CO_2 concentrations. Moreover, it was found that the algal biomass yields increased as CO_2 concentrations increase. The maximum biomass was obtained at 2.18 gL^{-1} (dry cell weight) when 15% CO_2 concentration was used. Hereafter, the effect of salinity on the oil accumulation in the *S. Obliquus* was considered. Sodium chloride (NaCl) solutions (0.1, 0.2 and 0.3 M) were prepared with deionized water and then were added into the cultures when the algal cells reached at early stationary phase (salt stress period). The algal biomass was harvested at day 5th, 10th and 15th after salt stress. Biodiesel was performed by *in-situ* acidic transesterification. The biodiesel property obtained was subjected to American Society for Testing and Materials Standard (ASTM), such as flash point, pH, density and viscosity.

Keywords: CO_2; salinity; microalgal oil; *Scenedesmus Obliquus*; biodiesel

References:

1. Dayananda, C., Ravishanka, G.A., Sarada, R. and Kumer, V. 2007. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. **Electronic Journal of Biotechnology.** 10: 78-91.
2. Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y. and Oh, H.M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology.** 101: 575-577.
3. Ulberth, F., M. Henninger. 1992. One-step extraction methylation method for determining the fatty acid composition of processed foods. **Journal of American Oil Chemists Society.** 69: 174-177.

การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า ในงานประชุมวิชาการ 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition ระหว่างวันที่ 14-18 กันยายน 2553 ณ เมืองริมินี ประเทศอิตาลี

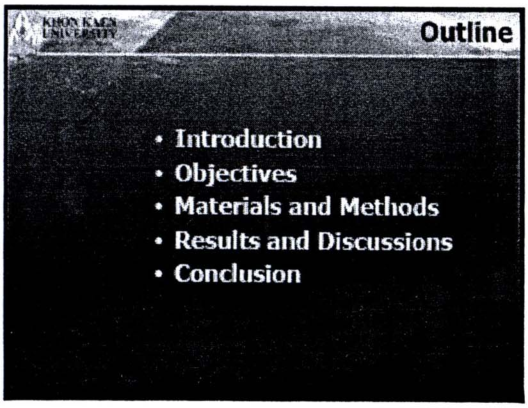


KHON KAEN UNIVERSITY

Influences of CO_2 concentrations and salinity on acceleration of micro algal oil as raw material for biodiesel production

P. Enmak and P. Kaewkannetra

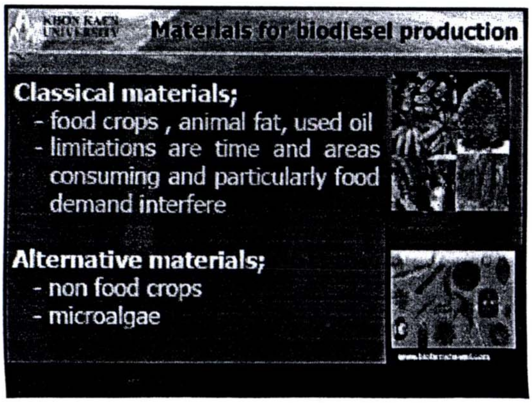
Department of Biotechnology, Faculty of Technology,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, THAILAND



KHON KAEN UNIVERSITY

Outline

- Introduction
- Objectives
- Materials and Methods
- Results and Discussions
- Conclusion

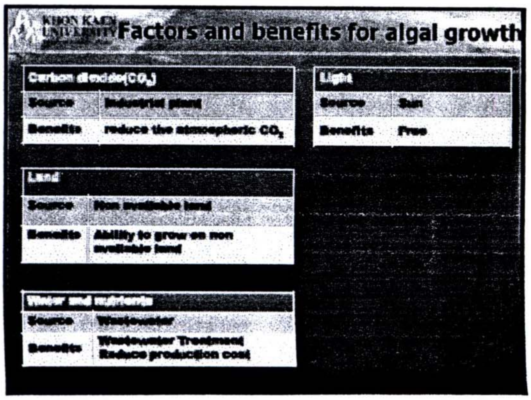


KHON KAEN UNIVERSITY

Materials for biodiesel production

Classical materials;
- food crops , animal fat, used oil
- limitations are time and areas consuming and particularly food demand interfere

Alternative materials;
- non food crops
- microalgae



KHON KAEN UNIVERSITY

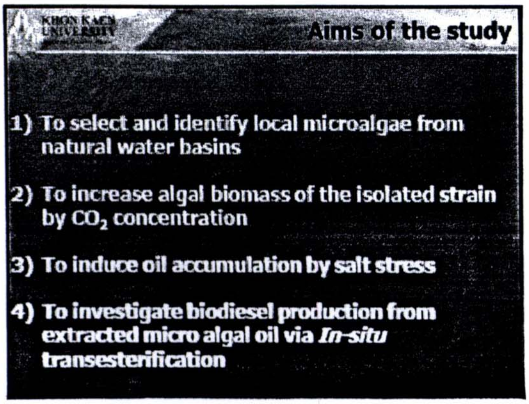
Factors and benefits for algal growth

Carbon dioxide(CO_2)	
Source	Industrial plant
Benefits	reduce the atmospheric CO_2

Light	
Source	Sun
Benefits	Free

Land	
Source	Non available land
Benefits	Ability to grow on non available land

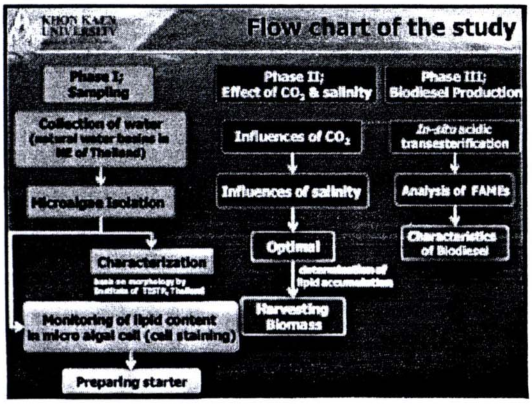
Water and nutrients	
Source	Wastewater
Benefits	Wastewater Treatment Reduce production cost



KHON KAEN UNIVERSITY

Aims of the study

1) To select and identify local microalgae from natural water basins
2) To increase algal biomass of the isolated strain by CO_2 concentration
3) To induce oil accumulation by salt stress
4) To investigate biodiesel production from extracted micro algal oil via *In-situ* transesterification



KHON KAEN UNIVERSITY

Flow chart of the study

Phase I; Sampling

Collection of water (natural water basins in NE of Thailand)

Microalgae Isolation

Characterization

basis on morphology by Institute of TISTR, Thailand

Monitoring of lipid content in micro algal cell (cell staining)

Preparing starter

Phase II; Effect of CO_2 & salinity

Influences of CO_2

Influences of salinity

Optimal

determination of lipid accumulation

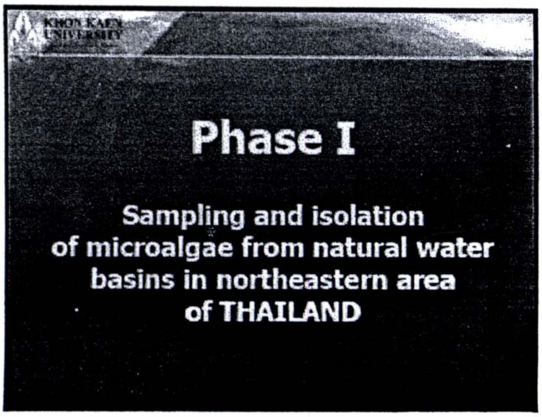
Harvesting Biomass

Phase III; Biodiesel Production

In-situ acidic transesterification

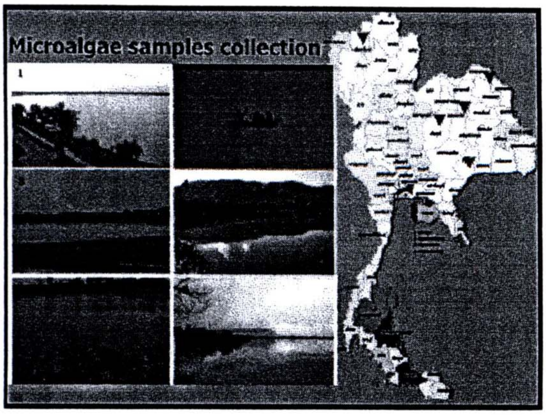
Analysis of FAMEs

Characteristics of Biodiesel

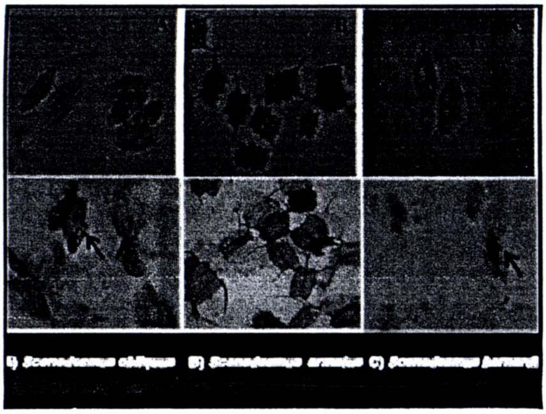


Phase I

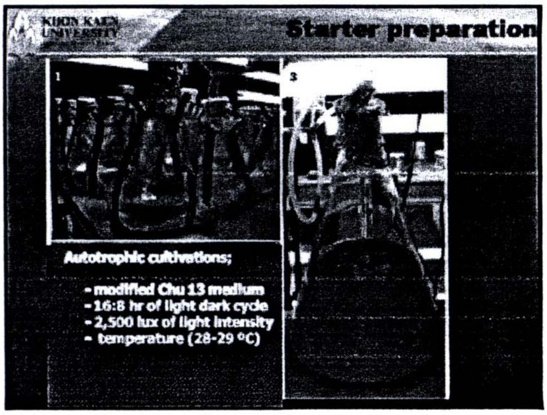
Sampling and isolation of microalgae from natural water basins in northeastern area of THAILAND



Microalgae samples collection



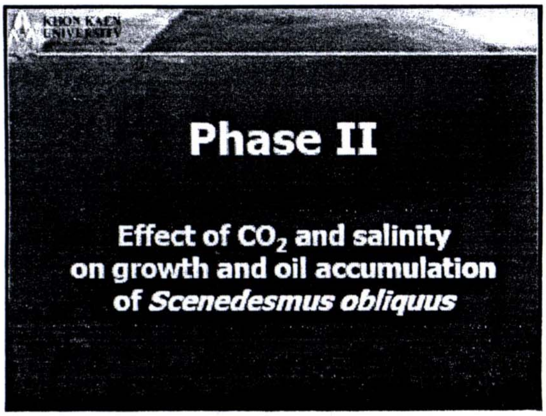
A) *Scenedesmus obliquus* B) *Scenedesmus armatus* C) *Scenedesmus barnardii*



Starter preparation

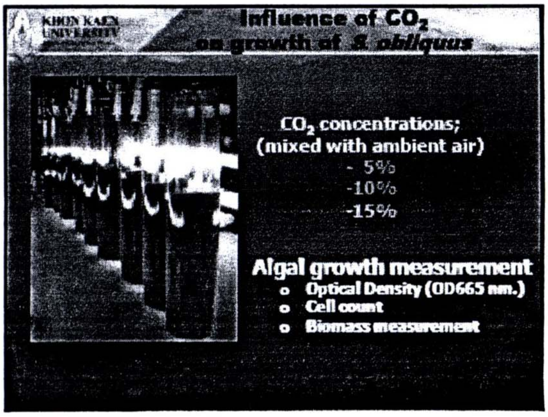
Autotrophic cultivations;

- modified Chu 13 medium
- 16:8 hr of light dark cycle
- 2,500 lux of light intensity
- temperature (28-29 °C)



Phase II

Effect of CO_2 and salinity on growth and oil accumulation of *Scenedesmus obliquus*

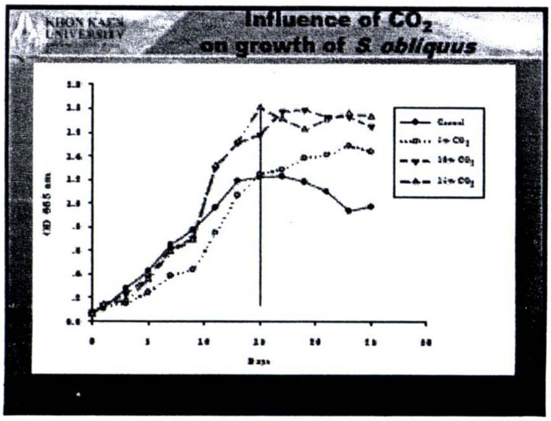


Influence of CO_2 on growth of *S. obliquus*

CO_2 concentrations;
(mixed with ambient air)
- 5%
-10%
-15%

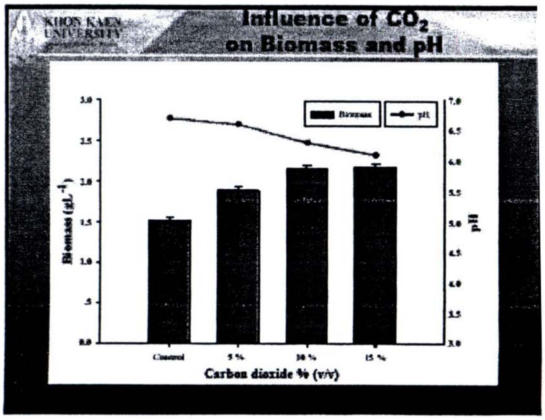
Algal growth measurement

- Optical Density (OD665 nm.)
- Cell count
- Biomass measurement



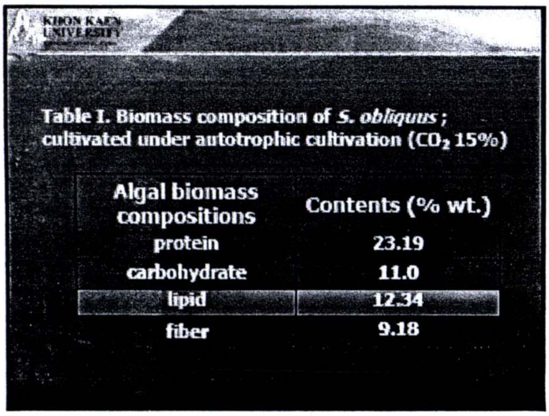
KHON KAEN UNIVERSITY

Influence of CO_2 on growth of *S. obliquus*



KHON KAEN UNIVERSITY

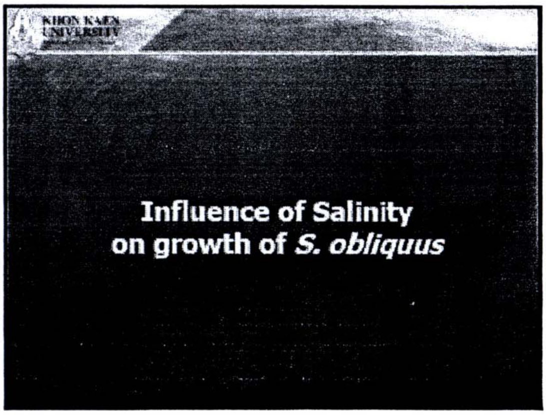
Influence of CO_2 on Biomass and pH



KHON KAEN UNIVERSITY

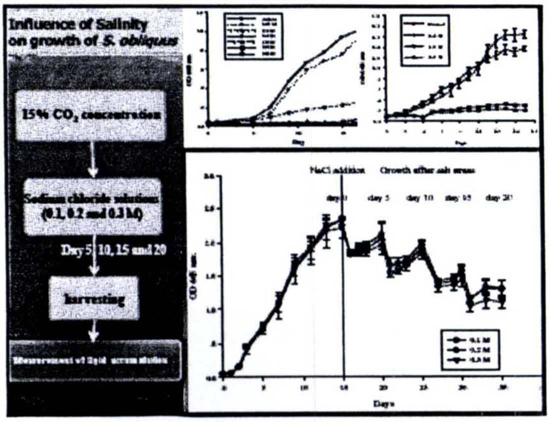
Table I. Biomass composition of *S. obliquus*; cultivated under autotrophic cultivation (CO_2 15%)

Algal biomass compositions	Contents (% wt.)
protein	23.19
carbohydrate	11.0
lipid	12.34
fiber	9.18



KHON KAEN UNIVERSITY

Influence of Salinity on growth of *S. obliquus*



Influence of Salinity on growth of *S. obliquus*

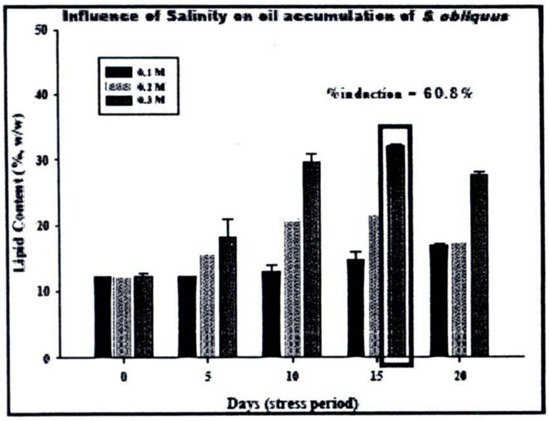
15% CO_2 concentration

Sodium chloride solutions (0.1, 0.2 and 0.3 M)

Day 5, 10, 15 and 20

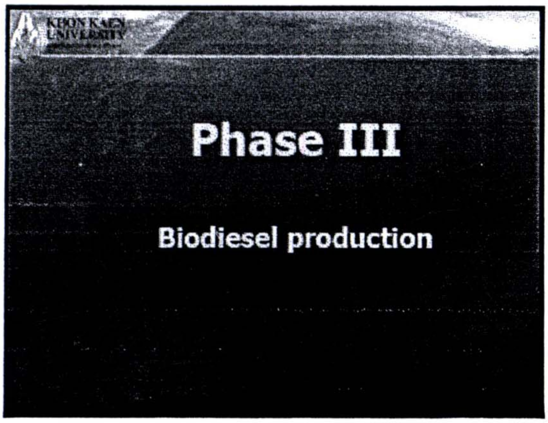
harvesting

Measurement of lipid accumulation



Influence of Salinity on oil accumulation of *S. obliquus*

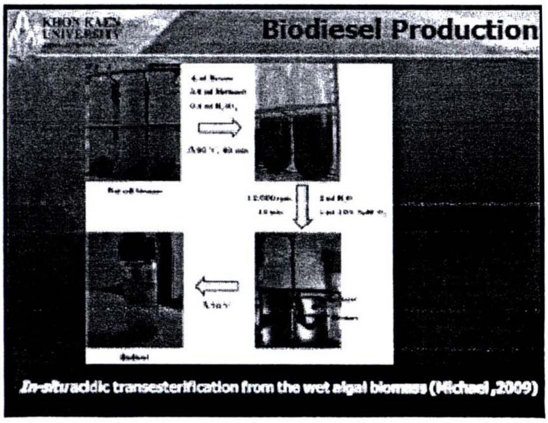
%induction = 60.8%



KHON KAEN UNIVERSITY

Phase III

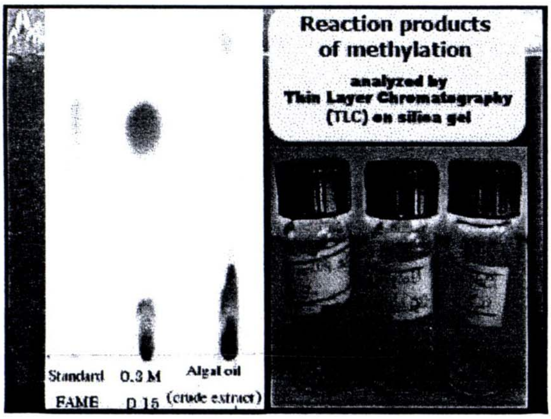
Biodiesel production



KHON KAEN UNIVERSITY

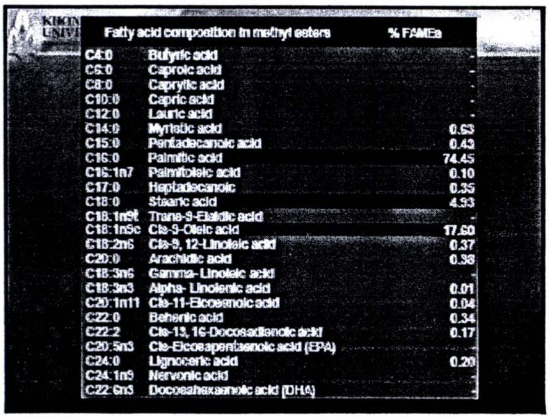
Biodiesel Production

In-situ acidic transesterification from the wet algal biomass (Michael ,2009)



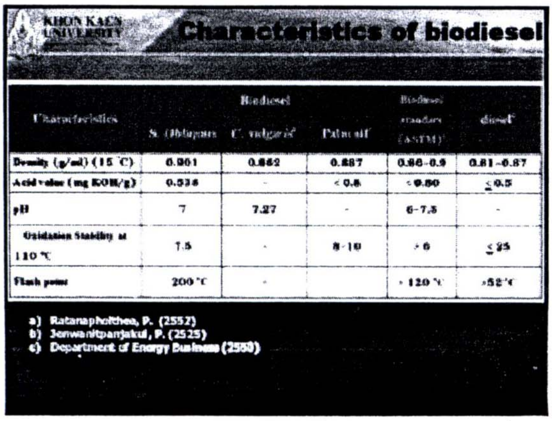
Reaction products of methylation

analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) on silica gel



KHON KAEN UNIVERSITY

Fatty acid composition in methyl esters		% FAMEs
C4:0	Butyric acid	-
C6:0	Caproic acid	-
C8:0	Caprylic acid	-
C10:0	Capric acid	-
C12:0	Lauric acid	-
C14:0	Myristic acid	0.63
C15:0	Pentadecanoic acid	0.43
C16:0	Palmitic acid	74.45
C16:1n7	Palmitoleic acid	0.10
C17:0	Heptadecanoic	0.35
C18:0	Stearic acid	4.93
C18:1n9t	Trans-9-Elaidic acid	-
C18:1n9c	Cis-9-Oleic acid	17.60
C18:2n6	Cis-9, 12-Linoleic acid	0.37
C20:0	Arachidic acid	0.38
C18:3n6	Gamma- Linoleic acid	-
C18:3n3	Alpha- Linolenic acid	0.01
C20:1n11	Cis-11-Eicosenoic acid	0.04
C22:0	Behenic acid	0.34
C22:2	Cis-13, 16-Docosadienoic acid	0.17
C20:5n3	Cis-Eicosapentaenoic acid (EPA)	-
C24:0	Lignoceric acid	0.20
C24:1n9	Nervonic acid	-
C22:6n3	Docosahexaenoic acid (DHA)	-

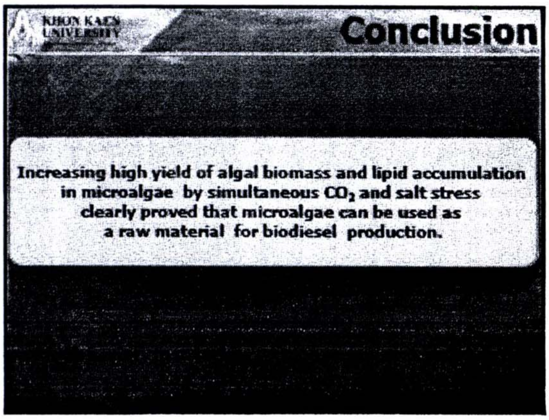


KHON KAEN UNIVERSITY

Characteristics of biodiesel

Characteristics	Biodiesel			Biodiesel standard (ASTM)[c]	diesel[c]
	S. Obliquus[a]	C. vulgaris[b]	Palm oil[c]		
Density (g/ml) (15 °C)	0.901	0.862	0.887	0.86-0.9	0.81-0.87
Acid value (mg KOH/g)	0.538	-	< 0.8	< 0.80	≤ 0.5
pH	7	7.27	-	6-7.5	-
Oxidation Stability at 110 °C	7.5	-	8-10	> 6	≤ 25
Flash point	200 °C	-		> 120 °C	>52 °C

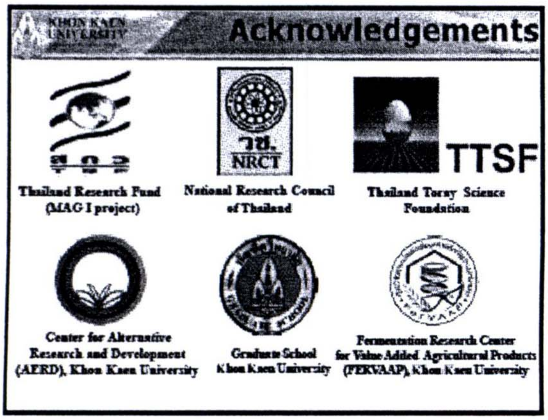
a) Ratanapholthee, P. (2552)
b) Jenwanitpanjakul, P. (2525)
c) Department of Energy Business (2550)



KHON KAEN UNIVERSITY

Conclusion

Increasing high yield of algal biomass and lipid accumulation in microalgae by simultaneous CO_2 and salt stress clearly proved that microalgae can be used as a raw material for biodiesel production.



KHON KAEN UNIVERSITY

Acknowledgements

สกว
วช.
NRCT
TTSF

Thailand Research Fund (MAG I project)

National Research Council of Thailand

Thailand Toray Science Foundation

Center for Alternative Research and Development (AERD), Khon Kaen University

Graduate School Khon Kaen University

Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FERVAAP), Khon Kaen University

KHON KAEN UNIVERSITY

Wellcome to PK-Laboratory Team

KHON KAEN UNIVERSITY

Thank you for your kind attention

Welcome to
Thailand
THAILAND

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

ประวัติผู้เขียน

ประวัติส่วนตัว

นายประยูร เอ็นมาก
วัน เดือน ปีเกิด 8 ตุลาคม พ.ศ. 2524
ภูมิลำเนา บ้านเลขที่ 40 หมู่ 1 ต. ประทัดบุ อ. ประโคนชัย จ. บุรีรัมย์

การศึกษา

มัธยมศึกษาตอนปลาย (พ.ศ. 2540-2543) โรงเรียนประโคนชัยพิทยาคม จ.บุรีรัมย์
ปริญญาตรี (พ.ศ. 2543-2547) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปริญญาโท (พ.ศ. 2551-2553) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประสบการณ์ทำงาน

- นักวิจัย (พ.ศ. 2547-2551) บริษัทมิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ
- นักวิทยาศาสตร์ (พ.ศ. 2552-ปัจจุบัน) สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร