การเติบโตและการเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

นางสาวศุทธินี วรรณสุทธิวัฒน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GROWTH AND ENHANCEMENT OF CAROTENOIDS PRODUCTION IN MICROALGA *CHLOROCOCCUM HUMICOLA* IN CONTINUOUS CULTIVATION

Miss Sutthinee Wannasutthiwat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเติบโตและการเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง
โดย	นางสาวศุทธินี วรรณสุทธิวัฒน์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อาทิวรรณ โชติพฤกษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พิมพ์พร พลเพชร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.สุรเชษฐ์ บุรุษอาชาไนย)

ศุทธินี วรรณสุทธิวัฒน์ : การเติบโตและการเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (GROWTH AND ENHANCEMENT OF CAROTENOIDS PRODUCTION IN MICROALGA*CHLOROCOCCUM HUMICOLA* IN CONTINUOUS CULTIVATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.กษิดิศ หนูทอง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข, 116 หน้า.

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะแวดล้อมเพื่อทำให้เกิดการสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่ายสีเขียว *Chlorococcum humicola* ภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ผลการทดลองในระบบแบบแบตช์พบว่าจุลสาหร่าย *C. humicola* มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.36 ต่อวัน การศึกษาในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องซึ่งใช้ขวดดูแรนจำนวน 5 ชุด วางเรียงต่อกัน และใช้อาหารสูตร BG-11 ควบคุมอัตราการเจือจางที่ 0.35 ต่อวัน การเพิ่มความเข้มแสงจาก 3,500 ลักซ์ ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3 เป็น 100,000 ลักซ์ ในขวดที่ 4 - 5 ร่วมกับสภาวะการขาดไนโตรเจน ซึ่งใช้การลดปริมาณ $NaNO_3$ ในอาหาร BG-11 ลง 20 เท่า สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เป็น 3.68 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับสภาวะแสงปกติ (3,500 ลักซ์) และมีไนโตรเจนที่เพียงพอ (อาหารสูตร BG-11) ประมาณ 2.6 เท่า นอกจากนี้ผลการศึกษาในระบบต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์เมื่อมีปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงพอ ในส่วนต่อไปได้ทำการคัดเลือกถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงเพื่อใช้งาน ซึ่งพบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดที่มีท่ออากาศยกอยู่ภายในเป็นรูปแบบที่เหมาะสมที่สุดต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* เนื่องจากสามารถช่วยในการฟุ้งกระจายของจุลสาหร่ายในของเหลวได้ดี ส่วนสุดท้ายของการทดลองได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ได้รับการคัดเลือกภายใต้สภาวะเหมาะสมที่ได้รับก่อนหน้านี้ คือ อัตราการเจือจาง 0.35 ต่อวัน ความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และอาหารสูตร BG-11 ผลการทดลองที่สภาวะคงตัวพบว่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์มีค่าเท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งคิดเป็น 4.3 เท่า เมื่อเทียบกับอัตราการผลิตในระบบแบบแบตช์

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5670406621 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: CAROTENOIDS PRODUCTION / CHLOROCOCCUM HUMICOLA / CONTINUOUS CULTIVATION / PHOTOBIOREACTOR

SUTTHINEE WANNASUTTHIWAT: GROWTH AND ENHANCEMENT OF CAROTENOIDS PRODUCTION IN MICROALGA*CHLOROCOCCUM HUMICOLA* IN CONTINUOUS CULTIVATION. ADVISOR: ASST. PROF.KASIDIT NOOTONG, Ph.D., CO-ADVISOR: SORAWIT POWTONGSOOK, Ph.D., 116 pp.

This reserch aimed to study the environmental condition that induced the accumulation of carotenoids in green microalgal *Chlorococcum humicola* cultured under continuous cultivating system. The results of batch cultivation indicated the maximum specific growth rate of 0.36 day^{-1}. The continuous cultures of *C. humicola* in the cultivating system consisting of 5 Duran glass bottles in series, subjected to the dilution rate of 0.35 day^{-1}, incresing the light intensity from 3,500 lux in cultivating bottle 1 - 3 to 100,000 lux in cultivating bottle 4 - 5 and maintaining the nitrogen deficient condition by reducing the weight of $NaNO_3$ in the BG-11 media for 20 folds, was able to increase the concentrations of carotenoids as high as 3.68 mg/g.d.w., which is approximately 2.6 times greater than the results when maintaining the normal light intensity (3,500 lux) and sufficient nitrogen (BG-11 media). Moreover, the results from the contonuous cultures demonstrated that increasing CO_2 concentrations to 2% v/v was effective in enhancing carotenoids accumulation given sufficient amount of nitrogen in the growth media. Suitable configuration of photobioreactor was chosen in the next section, and it was found that the airlift photobioreactor with internal draft-tube was the best for the cultures of *C. humicola* because it provided the most effective cell suspension. The last part of the research invovled the continuous cultures of *C. humicola* in the photobioreactor selected earlier. The photobioreactor was supplied with BG-11 media and operated under the dilution rate of 0.35 day^{-1}, light intensity of 100,000 lux, air flow rate of 138 L/h and 2% v/v CO_2. The results of steady state operation revealed carotenoids productivity of 0.56 mg/L/day, which was approximately 4.3 times higher than the productivity obtained from batch cultivation under equivalent system volume.

Department:	Chemical Engineering	Student's Signature	.....
Field of Study:	Chemical Engineering	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2014	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ชี้แนะให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาตลอดจนได้ให้ความช่วยเหลือในแต่ละขั้นตอนของการทำงานวิจัย รวมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อาทิวรรณ โชติพฤกษ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.พิมพ์พร พลเพชร และ ดร.สุรเชษฐ์ บุรุษอาชาไนย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจทานวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่สำหรับทำการวิจัย และตลอดจนให้ความกรุณาสำหรับเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และคำแนะนำในการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณามอบความรู้อันเป็นประโยชน์ คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา ณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิจัยวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านเงินทุนสำหรับการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ปวีณา ตปนียวรวงศ์ ที่ได้ให้คำแนะนำในเรื่องเทคนิคการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย ตลอดจนการใช้เครื่องมือต่างๆ รวมถึงการจัดซื้อจัดหาอุปกรณ์สำหรับการทำงานวิจัย และขอขอบคุณพี่ลลิดา เชาว์เรืองฤทธิ์ และพี่ๆ น้องๆ ที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกคน ที่ได้ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี สำหรับมิตรภาพ กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือทั้งในด้านการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่มอบความรัก กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆด้าน ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญรูปภาพ ..... ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 5
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่ายสีเขียวคลอโรคอคคัม (*Chlorococcum*) 7
2.1.1 โครงสร้างของคลอโรคอคคัม *(Chlorococcum)* 10
2.1.2 รงควัตถุ (Pigment) 11
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย 15
2.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยระบบปิด (Closed system) 16
2.4 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง 18
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 23
3.1 การศึกษาการเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบตช์ 23
3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย 23
3.1.2 การเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3.2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบต่อเนื่องเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและสะสมแคโรทีนอยด์ 26

3.2.1 ผลของความเข้มแสงและการขาดไนโตรเจนต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 27

3.2.2 ผลของการเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 28

3.3 ศึกษารูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* 30

3.3.1 การเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ 31

3.3.2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง 32

3.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง 34

บทที่ 4 ผลการทดลอง 35

4.1 การเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในระบบแบบแบตช์ 35

4.1.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย 35

4.1.2 การเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ 36

4.2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบต่อเนื่องเพื่อศึกษาการเติบโตและสะสมแคโรทีนอยด์ 37

4.2.1 ผลของความเข้มแสงและการขาดธาตุอาหารไนโตรเจน 37

4.2.2 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 44

4.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง 53

4.3.1 การเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ระหว่างการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง 55

หน้า

4.3.2 การเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง 59

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 64

5.1 สรุปผลการทดลอง 64

5.2 ข้อเสนอแนะ 68

รายการอ้างอิง 69

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 116

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบทางเคมีของไรน้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) เปรียบเทียบกับอาร์ทีเมีย (*Artemia sp.*) 4

ตารางที่ 2.1 ข้อดีและข้อจำกัดของจุลสาหร่ายสีเขียวที่ให้การสะสมแคโรทีนอยด์ 8

ตารางที่ 2.2 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์และตัวอย่างแหล่งที่พบ 13

ตารางที่ 2.3 แคโรทีนอยด์ในกลุ่มแคโรทีนและแซนโทรฟิลล์ที่ตรวจพบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* 14

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* 15

ตารางที่ 2.5 การผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ด้วยระบบแบบแบตช์ 16

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลสาหร่ายสูตร BG-11 24

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.1 25

ตารางที่ 3.3 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.2.1 28

ตารางที่ 3.4 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.2.2 29

ตารางที่ 3.5 ขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบ (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น 31

ตารางที่ 3.6 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3.1 32

ตารางที่ 3.7 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3.2 33

ตารางที่ 3.8 สรุปวิธีการวิเคราะห์ผลการทดลอง 34

ตารางที่ 4.1 สรุปผลผลิตต่อวันของน้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์ (Productivity of Dry weight และ Carotenoids, (mg/L/day)) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง 52

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์และอัตราการผลิตที่สภาวะคงตัวของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก 61

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ระหว่างการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์ ระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ระบบต่อเนื่องในขวดเพาะเลี้ยงที่เรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด และจากงานวิจัยในอดีต 62

ตารางที่ 5.1 สรุปสภาวะแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง ธาตุอาหารไนโตรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ในกลุ่ม (1) แคโรทีน (Carotene) และ (2) แซนโทรฟิลล์ (Xanthophyll) 1

ภาพที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* 11

ภาพที่ 2.2 ถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เติมอากาศและการดัดแปลงถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เติมอากาศ 19

ภาพที่ 2.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift Photobioreactor) 20

ภาพที่ 2.4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน (Flat-plate Photobioreactor) 22

ภาพที่ 3.1 แผนภาพระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่อง ในขวดแก้ว Duran ปริมาตร 2 ลิตร ที่วางเรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด 27

ภาพที่ 3.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบ (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น 30

ภาพที่ 4.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 35

ภาพที่ 4.2 การเติบโตซึ่งตรวจวัดในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 36

ภาพที่ 4.3 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบตช์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารสูตร BG-11 37

ภาพที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* จากขวดเพาะเลี้ยงทั้ง 5 ของระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตรที่มี 5% และ 100% $NaNO_3$ ในสูตรอาหาร BG-11 ที่ควบคุมความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 (a) 3,500 ลักซ์ (b) 50,000 ลักซ์ และ (c) 100,000 ลักซ์ 39

ภาพที่ 4.5 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรและมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายจากขวดเพาะเลี้ยงทั้ง 5 ของระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตรที่มี 5% และ 100% $NaNO_3$ ในสูตรอาหาร BG-11 ที่ควบคุมความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 (a) 3,500 ลักซ์ (b) 50,000 ลักซ์ และ (c) 100,000 ลักซ์ 41

ภาพที่ 4.6 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรและมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายจากขวดเพาะเลี้ยงทั้ง 5 ของระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตรที่มี 5%

และ 100% $NaNO_3$ ในสูตรอาหาร BG-11 ที่ควบคุมความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 (a) 3,500 ลักซ์ (b) 50,000 ลักซ์ และ (c) 100,000 ลักซ์ 42

ภาพที่ 4.7 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ปกติ และสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% 43

ภาพที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการเติมอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1-3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5) 45

ภาพที่ 4.9 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในหน่วย (A) มิลลิกรัมต่อลิตร (B) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในหน่วย (C) มิลลิกรัมต่อลิตร, (D) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการเติมอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1-3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4-5) 46

ภาพที่ 4.10 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการเติมอากาศปกติและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5) 47

ภาพที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ร่วมกับการเติมอากาศปกติและเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5) 48

ภาพที่ 4.12 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในหน่วย (A) มิลลิกรัมต่อลิตร (B) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในหน่วย (C) มิลลิกรัมต่อลิตร (D) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% เติมอากาศปกติและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5) 50

ภาพที่ 4.13 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ในระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% เติมอากาศปกติและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5)..... 51

ภาพที่ 4.14 การฟุ้งกระจายของเซลล์จุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (Draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น 54

ภาพที่ 4.15 ผลของอัตราไหลของอากาศต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ด้วยอาหารสูตร BG-11 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร..... 57

ภาพที่ 4.16 (A) ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (B) ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ จากเซลล์จุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่อัตราไหลของอากาศ 58 และ 138 ลิตรต่อชั่วโมง และเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร 58

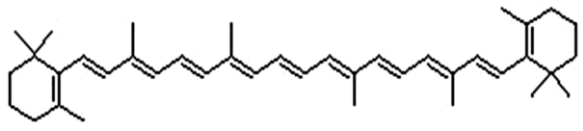
ภาพที่ 4.17 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ในระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ด้วยอัตราไหลของอากาศ 58 และ 138 ลิตรต่อชั่วโมง 59

Chulalongkorn University

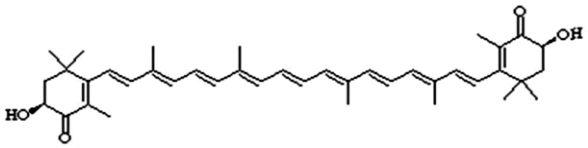
บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์เช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) แคโรทีน (Carotene) และ (2) แซนโทรฟิลล์ (Xanthophyll) หรือ ออกซิแคโรทีน (Oxycarotene) ตัวอย่างของกลุ่มแคโรทีน ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (Beta-carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่ประกอบด้วยเส้นสายคาร์บอนไม่อิ่มตัวจำนวน 40 อะตอม และพบได้ทั่วไปในพืช เนื่องจากเป็นรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ในส่วนของกลุ่มแซนโทรฟิลล์ (Xantrophyll) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเพิ่มเข้ามาในรูปของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ตัวอย่างของแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแซนโทรฟิลล์ ได้แก่ แอสต้าแซนทีน (Astaxanthin) ลูทีน (Lutein) และ ฟูโคแซนธิน (Flucoxanthin) เป็นต้น ภาพที่ 1.1 แสดงตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์



(1) Beta-carotene



(2) Astaxanthin

ภาพที่ 1.1 ตัวอย่างโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ในกลุ่ม (1) แคโรทีน (Carotene) และ (2) แซนโทรฟิลล์ (Xanthophyll)

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีการสังเคราะห์แสงทุกชนิด ได้แก่ พืชชั้นสูง จุลสาหร่าย เห็ด รา และแบคทีเรียบางชนิด แคโรทีนอยด์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างหลากหลาย เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากแคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตวิตามินเอ เพื่อช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย [1, 2] นอกจากนี้ แคโรทีนอยด์ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเกษตร การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์ปีก โดยนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารของสัตว์น้ำ เพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำมีสีสันที่สวยงาม [3] และเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ปีก เพื่อให้ไข่แดงที่ได้มีสีสวย [4]

การผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลสาหร่ายได้รับความสนใจและเป็นที่นิยมมากกว่าการผลิตจากเห็ด รา หรือแบคทีเรีย เนื่องจากจุลสาหร่ายมีความปลอดภัยในการนำไปใช้งาน [5] และนอกจากนี้จุลสาหร่ายสีเขียว (Green Microalgae) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เจริญเติบโตได้ง่ายและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ทุกฤดูกาลทั้งสภาวะกลางแจ้งในระบบเปิด หรือภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง (Photobioreactor) แบบระบบปิดที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม [6] จุลสาหร่ายสีเขียวหลายชนิดสามารถผลิตและสะสมแคโรทีนอยด์ได้ภายในเซลล์ เพื่อให้เซลล์จุลสาหร่ายสามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมแก่การเติบโต เช่น สภาวะความเข้มแสงสูง สภาวะขาดธาตุอาหารไนโตรเจน สภาวะความเค็มสูง และสภาวะอุณหภูมิต่อ [2, 7, 8] ตัวอย่างของจุลสาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูง ได้แก่ *Dunaliella spp*. ให้การผลิตเบต้าแคโรทีน *Haematococcus pluvialis* ผลิตแอสต้าแซนทีน [7] และ *Muriellopsis sp.* ผลิตลูทีน [9] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม *Dunaliella spp.* เป็นจุลสาหร่ายน้ำเค็มที่ต้องเพาะเลี้ยงด้วยน้ำที่มีความเค็มสูงมาก [10] จึงอาจมีปัญหาจากการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล เช่น ฝนตกทำให้ความเค็มลดลง ในส่วนของ *H. pluvialis* เป็นจุลสาหร่ายที่มีอัตราการเติบโตที่ช้า ไม่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว มีช่วงกว้างของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่ำและไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง [11, 12]

คลอโรคอคคัม (*Chlorococcum*) เป็นจุลสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวที่มีลักษณะเซลล์เดียว ไม่เคลื่อนที่ เพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลสาหร่ายสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตในระยะคงที่ (Stationary phase) ได้เป็นเวลานาน และมีความคงทนต่อสภาวะความเข้มแสงและอุณหภูมิได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจุลสาหร่าย *Haematococcus* [11, 12] ด้วยเหตุนี้จุลสาหร่าย *Chlorococcum* จึงได้รับความสนใจและถูกนำมาใช้ในงานอย่างแพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากจุลสาหร่าย *Chlorococcum* สามารถผลิตและสะสมแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณสูง โดยมีรายงานว่า การผลิตแคโรทีนอยด์จะเกิดขึ้นเมื่อจุลสาหร่ายอยู่ภายใต้สภาวะความเครียด ได้แก่ สภาวะที่มีความเข้มแสงสูง สภาวะการขาดธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) และการเพาะเลี้ยงในน้ำเค็ม [7, 13] นอกจากการผลิตแคโรทีนอยด์แล้วจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ยังมีคุณประโยชน์ทางด้านโภชนาการ โดยผลการวิเคราะห์องค์ประกอบอย่างหยาบของชีวมวลจุลสาหร่ายพบว่า ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ที่เป็นประโยชน์ต่อการเติบโตของสัตว์น้ำ และเนื่องจากสัตว์น้ำเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ด้วยตัวเองจึงจำเป็นต้องบริโภคอาหารที่มีส่วนผสมของแคโรทีนอยด์ เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเม็ดสีของกล้ามเนื้อและเพิ่มสีสันของผิวในปลาสวยงาม [3] เป็นต้น

แพลงก์ตอนสัตว์ (Zooplankton) เช่น อาร์ทีเมีย และ โรติเฟอร์ นิยมใช้เป็นอาหารระหว่างการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ โดยแพลงก์ตอนสัตว์เหล่านี้จะบริโภคจุลสาหร่ายเป็นอาหารหลัก ดังนั้นหากจุลสาหร่ายซึ่งเป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์มีแคโรทีนอยด์สะสมในปริมาณมาก ก็จะทำให้สัตว์น้ำได้รับแคโรทีนอยด์ในปริมาณมากเช่นกัน [14] ในส่วนของประเทศไทยนั้น มีรายงานการค้นพบแพลงก์ตอนสัตว์สายพันธุ์ใหม่ชื่อว่า ไรน้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella Thailandensis*) ไรน้ำนางฟ้าไทยมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก เนื่องจากมีการสะสมโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และแคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะแอสต้าแซนทีนในปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับอาร์ทีเมีย ดังแสดงในตารางที่ 1.1 [15] การสะสมของแคโรทีนอยด์ในไรน้ำนางฟ้าไทย เกิดจากการที่ไรน้ำนางฟ้าไทยบริโภคจุลสาหร่ายที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์สะสมอยู่สูง

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบทางเคมีของไรน้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) เปรียบเทียบกับอาร์ทีเมีย (*Artemia sp.*) ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ เถ้า และองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ [15]

องค์ประกอบ	***B. thailandensis***	***Artemia sp.***
<u>องค์ประกอบอย่างหยาบ (%)</u>		
โปรตีน	64.56 ± 0.66	56.25 ± 1.04
ไขมัน	7.57 ± 0.26	13.49 ± 0.52
คาร์โบไฮเดรต	16.24 ± 0.60	14.63 ± 0.86
ไฟเบอร์	5.12 ± 0.12	0.37 ± 0.13
เถ้า	6.42 ± 0.21	15.26 ± 1.09
<u>Carotenoids (% of to. car.)</u>		
Lutein	1.91 ± 1.32	-
β-carotene	15.31 ± 3.64	37.96
Astaxanthin	65.08 ± 6.74	-
Canthaxanthin	17.69 ± 2.27	20.44
อื่นๆ (ที่ระบุไม่ได้)	-	41.60

จากเหตุผลที่กล่าวมา การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อให้มีการผลิตและสะสมของแคโรทีนอยด์ในปริมาณมากจึงมีความจำเป็น ซึ่งหากประสบผลสำเร็จจะสามารถสร้างภาพลักษณ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมให้แก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งในอดีตมักใช้อาหารที่มาจากการจับสัตว์น้ำธรรมชาติมาใช้ในกระบวนการผลิต [16]นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายนิยมทำในระบบแบบแบตช์ (Batch cultures) แม้ว่าระบบดังกล่าวจะให้อัตราการผลิต (Productivity) ของจุลสาหร่ายที่ต่ำกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous cultures) ก็ตาม จากข้อได้เปรียบของระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในแง่มุมด้านการตอบโจทย์การผลิตจุลสาหร่ายให้ได้ปริมาณมากเพียงพอต่อการใช้งานในฟาร์มขนาดใหญ่และสามารถนำมาใช้เลี้ยงไรน้ำนางฟ้าไทยได้ด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะทดลองศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียด ได้แก่ ความเข้มแสง ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีผลต่อการ

เติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* รวมถึงการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นอย่างยั่งยืน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมซึ่งประกอบด้วย ความเข้มแสง การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีผลต่อการเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวดแก้ว Duran ขนาด 2 ลิตร ที่เรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด
2. เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. งานวิจัยเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมต่อการสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C. humicola* โดยการทดลองทำในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยใช้ขวดแก้ว Duran ขนาด 2 ลิตร ที่เรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 ที่มีการปรับความเข้มข้นของไนโตรเจนเป็น 5% $NaNO_3$ และ 100% $NaNO_3$ ของสูตรอาหารมาตรฐาน BG-11 ช่วงความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ 3,500 50,000 และ100,000 ลักซ์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการให้อากาศความเข้มข้นสูงสุดที่ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร
2. เปรียบเทียบการใช้งานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ซึ่งประกอบด้วยถังปฏิกรณ์แบบ (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (Draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. ตัวแปรที่ใช้ในการติดตามผลประกอบด้วย น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย คลอโรฟิลล์ แคโรทีน-นอยด์ ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีมาตรฐานของ Strickland and Parson et al., (1972) และ APHA, (1992)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตและสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C. humicola*
2. ได้รับแนวทางในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มากขึ้น และสามารถนำผลผลิตที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารระหว่างการอนุบาลสัตว์น้ำได้จริง
3. เพื่อสร้างภาพลักษณ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมให้แก่อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ
4. สามารถนำรูปแบบการศึกษาไปประยุกต์ใช้กับจุลสาหร่ายชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น หรือเพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารชนิดต่างๆตามที่ต้องการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เจริญเติบโตได้ง่าย สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย จึงมีการนำจุลสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตในเชิงการค้าเป็นจำนวนมาก พื้นฐานของการเลี้ยงจุลสาหร่ายจะใช้การสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตชีวมวลของจุลสาหร่ายให้ได้ปริมาณมาก และจุลสาหร่ายถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของสารอาหาร สารเคมี และพลังงานเชื้อเพลิง เป็นต้น ด้วยเหตุนี้โรงงานอุตสาหกรรมจึงนำจุลสาหร่ายมาเป็นวัตถุดิบทางเลือกในกระบวนการผลิต เช่น อุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์ อุตสาหกรรมผลิตสารเคมีภัณฑ์ อุตสาหกรรมผลิตปุ๋ยชีวภาพ อุตสาหกรรมด้านพลังงาน อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงและอนุบาลสัตว์น้ำ เป็นต้น ดังนั้นจุลสาหร่ายจึงจัดเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรม

2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่ายสีเขียวคลอโรคอคคัม (*Chlorococcum*)

การจัดเรียงตามลำดับอนุกรมวิธานของจุลสาหร่ายคลอโรคอคคัม (*Chlorococcum*) สามารถแสดงได้ดังนี้ [6]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceac

Order Chlorococcales

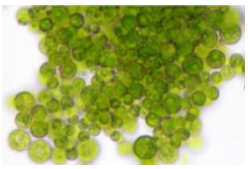
Family Chlorococcaceae

Genus Chlorococcum

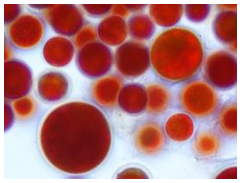
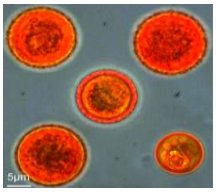
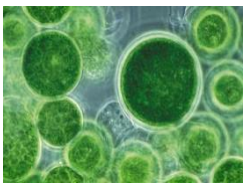
จุลสาหร่ายที่อยู่ใน *Division Chlorophyta* ส่วนใหญ่จะมีสีเขียวเหมือนหญ้า เนื่องจากภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ บี จำนวนมาก ซึ่งจะบดบังรงควัตถุสีอื่นๆไว้ นอกจากนี้ยังมีแคโรทีนอยด์ ประเภท แคโรทีนและแซนโทรฟิลล์ อีกหลายชนิดที่อยู่ภายใน

คลอโรพลาสต์ จุลสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิดจะเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันและสะสมแคโรทีนอยด์ได้ต่างชนิดกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 การเติบโตขึ้นอยู่กับสภาพอุณหภูมิของแหล่งน้ำที่เพาะเลี้ยง ความเข้มของแสง และความสมบูรณ์ของสารอาหาร โดย 10 เปอร์เซ็นต์ ของจุลสาหร่าย สีเขียวจะเป็นจุลสาหร่ายน้ำเค็มที่เหลืออีก 90 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นจุลสาหร่ายน้ำจืด จุลสาหร่ายสีเขียวมีสมาชิกมากประมาณ 450 จีนัส และ 7000 สปีชีส์ [17] แต่ละจีนัสมีความแตกต่างกันมากทั้งรูปร่าง โครงสร้าง และการสืบพันธุ์

ตารางที่ 2.1 ข้อดีและข้อจำกัดของจุลสาหร่ายสีเขียวที่ให้การสะสมแคโรทีนอยด์

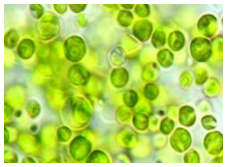
ชนิดของจุลสาหร่าย	ข้อดี	ข้อจำกัด	อ้างอิง
C. humicola 	- เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว - ทนต่อการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะแวดล้อมได้ดี (ค่าพีเอช 6.1-9) - เพาะเลี้ยงกลางแจ้งได้ (อุณหภูมิ 25-45 °C) - แคโรทีนอยด์ที่สะสม ได้แก่ แอสต้าแซนทีน ลูทีน เบต้า-แคโรทีน เป็นต้น - การเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ง่าย เนื่องจากเซลล์มีการจมตัว	- จำเป็นต้องติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มเติมเพื่อช่วยให้เซลล์มีการฟุ้งกระจายตัวแขวนลอยอยู่ในระบบ	[11, 12, 18-20]

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ข้อดีและข้อจำกัดของจุลสาหร่ายสีเขียวที่ให้การสะสมแคโรทีนอยด์

ชนิดของจุลสาหร่าย	ข้อดี	ข้อจำกัด	อ้างอิง
H. pluvialis 	- สะสมของแอสต้าแซนทีน สูงมาก (5% W/W)	- เจริญเติบโตช้า - ให้น้ำหนักเซลล์ต่ำ - อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคบ (24-28 °C) - เพิ่มค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงในห้องห้องปรับอากาศ	[10, 18, 19, 21-23]
D. salina 	- สะสมเบต้า-แคโรทีน - เจริญเติบโตง่าย - ทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงทางสิ่งแวดล้อมได้ดี - เพาะเลี้ยงกลางแจ้งได้	- เพาะเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มสูงมาก (2M NaCl) - การเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ยากและมีราคาสูง	[10, 24]
C. protothecoides 	- สะสมแคโรทีนอยด์ 0.8 % w/w และสะสมลูทีนสูงสุด 0.04% w/w - มีประสิทธิภาพดีสำหรับการผลิตไบโอดีเซลล์	- การเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ยาก	[25]

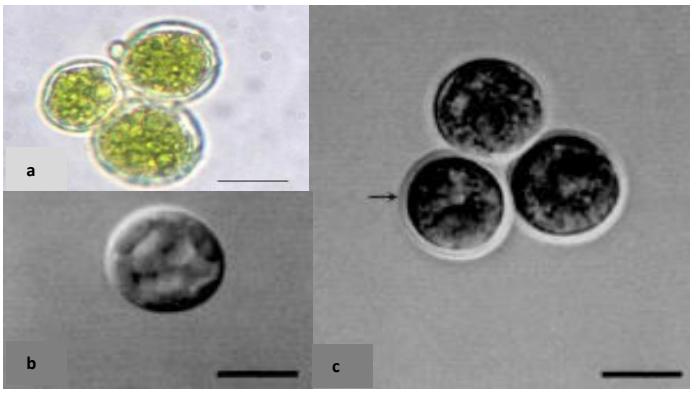
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ข้อดีและข้อจำกัดของจุลสาหร่ายสีเขียวที่ให้การสะสมแคโรทีนอยด์

ชนิดของจุลสาหร่าย	ข้อดี	ข้อจำกัด	อ้างอิง
C. vulgaris 	- เจริญเติบโตเร็ว - เพาะเลี้ยงง่าย - ใช้ผลิตเป็นพลังงานทดแทน	- การเก็บเกี่ยวเซลล์ทำได้ยาก	[26]

2.1.1 โครงสร้างของคลอโรคอคคัม *(Chlorococcum)*

คลอโรคอคคัม (*Chlorococcum*) เป็นจุลสาหร่ายน้ำจืดที่ไม่เคลื่อนที่ เจริญเติบโตอยู่ในน้ำตื้น หรือน้ำลึกที่แสงส่องถึง บางชนิดสามารถขึ้นบนก้อนหิน ทราย บนพืช [6] และบางชนิดอาจพบอยู่ในหิมะหรือน้ำแข็ง [13] คลอโรคอคคัมมีขนาดเซลล์ประมาณ 7.8 - 15.2 ไมโครเมตร [27] ในสภาพปกติจะเป็นเซลล์เดียวแต่บางครั้งอาจเห็นเป็นกลุ่มโคโลนีเล็กๆ ประกอบไปด้วยเซลล์จำนวน 2 - 4 เซลล์ มีลักษณะเป็นทรงกลมหรือรูปไข่ ภายในมีคลอโรพลาสต์ เป็นรูปถ้วยเกือบเต็มเซลล์ ลักษณะของคลอโรพลาสต์จะมีเยื่อหุ้มสองชั้นคือ ชั้นนอก และ ชั้นใน (ภาพที่ 2.1) เยื่อหุ้มชั้นในมีการม้วนตัวทำให้เกิดระบบเยื่อที่ซับซ้อนอยู่ภายใน โดยเยื่อจะมีลักษณะเป็นถุงกลมแบนเรียกว่า ไทลาคอยด์ (Thylakoid) เรียงซ้อนอยู่เป็นตั้งๆ แต่ละตั้งเรียกว่า กรานัม (Granum) ระหว่างกรานัมจะมีเยื่อเชื่อมต่อกันเรียกว่า สโตรมาลาเมลลา (Stroma lamella) ส่วนบริเวณที่ไม่มีเยื่อภายในคลอโรพลาสต์ เรียกว่า สโตรมา (Stroma) หรือ เมทริกซ์ ในส่วนของสโตรมาจะประกอบด้วยโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เยื่อภายในไทลาคอยด์จะประกอบไปด้วย โปรตีน และไขมัน ซึ่งมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ และ แคโรทีนอยด์ นอกจากนี้ภายในเซลล์ *Chlorococcum* จะมีไพรีนอยด์ 1 อัน หรือมากกว่า ทำหน้าที่ในการสะสมอาหาร [6]



ภาพที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของจุลสาหร่าย *Chlorococcum*, (a) ลักษณะคลอโรพลาสต์, (b) และผนังเซลล์ของจุลสาหร่าย, (b) อ้างอิง: (a) จาก Thomas et al., (2004) [28] และ (b, c) จาก Klochkova et. Al., (2006) [27] แถบมาตราส่วน = 10 ไมโครเมตร

2.1.2 รงควัตถุ (Pigment)

รงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) [6]

คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) เป็นรงควัตถุหลักในคลอโรพลาสต์ มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงสีแดงและสีน้ำเงิน และจะสะท้อนแสงสีเขียวออกมาให้เห็น จุลสาหร่าย *Chlorococcum* ประกอบไปด้วย คลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ บี โดยคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงขั้นต้น สามารถดูดพลังงานแสงได้ด้วยตัวเอง ส่วนคลอโรฟิลล์ บี จะดูดพลังงานแสงแล้วส่งต่อไปให้คลอโรฟิลล์ เอ อีกครั้งหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะไม่ละลายในน้ำแต่จะละลายในสารละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน (Acetone) เมทานอล (Methanol) ปิโตรเลียมสปิริต (Petroleum spirit) และ ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether) ในอัตรา 2:1 โดยปริมาตร [6]

แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง พบในสิ่งมีชีวิตที่มีการสังเคราะห์แสงทุกชนิด เช่น พืชชั้นสูง จุลสาหร่าย และจุลินทรีย์บางชนิด รงควัตถุกลุ่มนี้จะดูดกลืนแสงสีน้ำเงินบริเวณช่วงความยาวคลื่น 400 - 450 นาโนเมตร และจะสะท้อนแสงสีเหลืองและสีส้มออกมา [6]

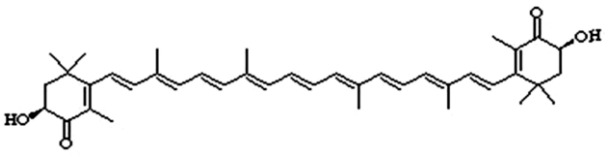
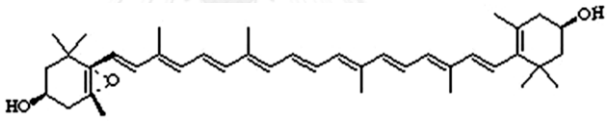
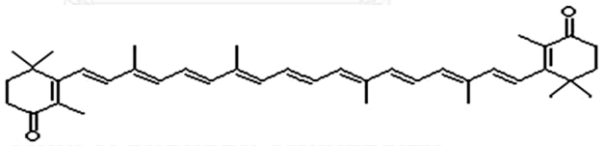
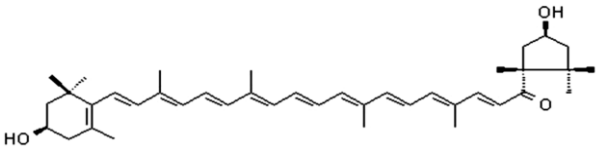
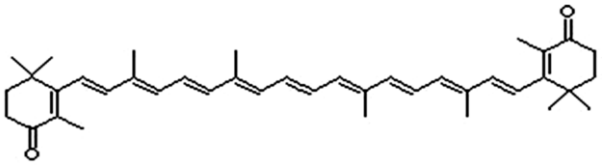
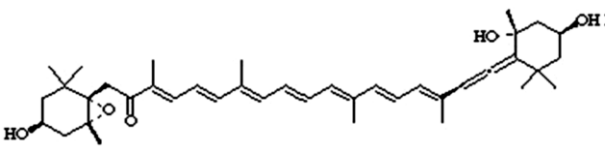
บทบาทหน้าที่ของแคโรทีนอยด์ คือ ป้องกันเซลล์จากการเสียสภาพเนื่องจากอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียด ได้แก่ สภาวะที่มีความเข้มแสงสูง ภายใต้สภาวะดังกล่าวจะส่งผลให้จุลสาหร่ายเกิดความเครียด และความเครียดถูกสร้างขึ้นมาใน 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 เกิดขึ้นในช่วงเวลา 0 - 8 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มแสงที่จุลสาหร่ายได้รับซึ่งในขั้นตอนนี้ Primary and secondary carotenoid จะทำหน้าที่ในการปกป้องการเกิด Photo-oxidation ขั้นตอนที่ 2 เกิดขึ้นในช่วงเวลา 4 - 12 ชั่วโมง เมื่อ Primary carotenoid ลดลง Secondary carotenoid จะเริ่มสะสมขึ้นทันทีแทนที่ Primary carotenoid เพื่อช่วยในการปกป้องการสังเคราะห์แสง และขั้นตอนที่ 3 เกิดขึ้นในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป [29-31] ดังนั้น เมื่อจุลสาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียดจึงเกิดการผลิตแคโรทีนอยด์ขึ้นมาและเม็ดสีของแคโรทีนอยด์ถูกนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตอาหารและยา อุตสาหกรรมการเกษตรและการเพาะเลี้ยง โดยใช้เป็นส่วนผสมในอาหารของสัตว์น้ำเพื่อให้สัตว์น้ำมีสีสันที่สวยงาม [3] และเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ปีกเพื่อให้ไข่แดงที่ได้มีสีสดใส [4] แคโรทีนอยด์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แคโรทีน (Carotene) และ แซนโทรฟิลล์ (Xantrophyll) ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มมีลักษณะโครงสร้างและแหล่งที่พบต่างกัน (ตารางที่ 2.2)

แคโรทีน (Carotene) เป็นรงควัตถุที่มีสีส้ม เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยออกซิเจนและคาร์บอนเท่านั้น แคโรทีนที่พบมากและมีความสำคัญ ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่ประกอบด้วยเส้นสายคาร์บอนไม่อิ่มตัว 40 อะตอม พบทั่วไปในพืชเนื่องจากเป็นรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง แคโรทีนถูกนำมาผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีและเป็นสารตั้งต้นของการผลิตวิตามินเอ ซึ่งเป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันในร่างกายโดยเชื่อว่าสามารถป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็งบางชนิดได้ [2] นอกจากนี้ยังพบ แอลฟาแคโรทีน และซิกมาแคโรทีน

แซนโทรฟิลล์ (Xantrophyll) เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง แซนโทรฟิลล์อาจจะเรียกว่า แคโรทีนอล (Carotenol) หรือ ออกซิแคโรทีน (Oxycarotene) เนื่องจากเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเพิ่มเข้ามาในรูปของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ตัวอย่างสารประกอบแซนโทรฟิลล์ ได้แก่ แอสต้าแซนทีน (Astaxanthin) ลูทีน (Lutein) ฟูโคแซนธิน (Flucoxanthin) และมิกโซแซนโธฟิลล์

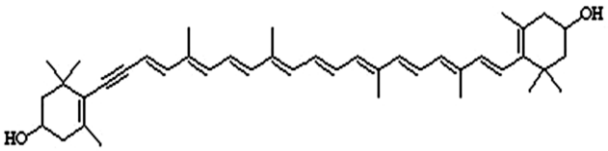
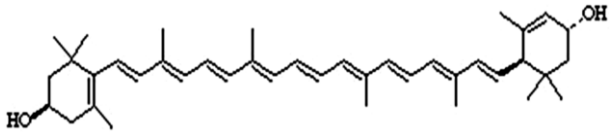
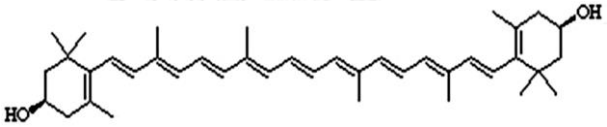
(Myxoxanthophyll) เป็นต้น ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแคโรทีนและแซนโทรฟิลล์ที่ตรวจพบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum*

ตารางที่ 2.2 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์และตัวอย่างแหล่งที่พบ [2]

ประเภท	โครงสร้าง	ตัวอย่างแหล่งที่พบ
แอสต้าแซนทีน (Astaxanthin)		แซลมอน กุ้ง และขนนกกระเรียน
แอนเทอราแซนทีน (Antheraxanthin)		ข้าวโพด
แคนต้าแซนทีน (Canthaxanthin)		แซลมอน, กุ้ง และขนนกกระเรียน
แคปแซนทีน (Capsanthin)		พริกไทย และพริกหยวก
แอลฟาแคโรทีน (α-Carotene)		แครอท และพืชสีเขียว
ไดอะโตแซนทีน (Diatoxanthin)		สาหร่าย และปะการัง

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) โครงสร้างของแคโรทีนอยด์และแหล่งที่พบ [2]

ประเภท	โครงสร้าง	ตัวอย่าง แหล่งที่พบ
ฟูโคแซนทีน (Fucoxanthin)		สาหร่าย และสาหร่ายทะเล
ลูทีน (Lutein)		พืชสีเขียว
ซีแซนทีน (Zeaxanthin)		พืชหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในข้าวโพด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.3 แคโรทีนอยด์ในกลุ่มแคโรทีนและแซนโทรฟิลล์ที่ตรวจพบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* [19]

ประเภท	แคโรทีนอยด์ (%)
เบต้า-แคโรทีน	22.6
แอสต้าแซนทีน	17.3
ลูทีน	31.2
อื่นๆ (ระบุไม่ได้)	28.9

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum*

ปัจจัย	ค่าที่เหมาะสม	หมายเหตุ	อ้างอิง
แสงสว่าง	1,000 - 10,000 ลักซ์ สำหรับการเติบโต 10,000 - 100,000 ลักซ์ สำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์	ช่วงความเข้มแสงที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง โดยที่ความเข้มแสงสูงมีผลให้จุลสาหร่ายเกิดสภาวะเครียดจึงผลิตและสะสมแคโรทีน-นอยด์ได้สูงขึ้น	[7, 11, 12, 18, 32-34]
อุณหภูมิ	25 - 45 องศาเซลเซียส	มีความทนทานและมีช่วงกว้างของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสูง	[11, 12, 18, 34-36]
พีเอช	6.1 - 9	ทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชได้ในช่วงกว้าง	[11, 12, 36]
ไนโตรเจน	0-0.247 กรัมไนโตรเจน/ลิตร	เป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเติบโต	[34, 36]

2.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยระบบปิด (Closed system)

การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยระบบปิดถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงในบ่อเปิดกลางแจ้งที่ให้ผลผลิตต่ำและการปนเปื้อนสูง ซึ่งโดยมากนิยมดำเนินการในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงยังดูแลรักษาความสะอาดได้ง่ายและลดปัญหาการปนเปื้อน การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงในระบบปิดแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ (1) ระบบแบบแบตช์ (Batch) (2) ระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง (Fed-Batch) และ (3) ระบบแบบต่อเนื่อง (Continuous)

การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (Batch) เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิดที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก [37] โดยเติมอาหารเมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเพียงครั้งเดียวและไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเติมเข้าไปในระบบขณะทำการเพาะเลี้ยง จะพบว่าโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อผลิตชีวมวลและผลิตแคโรทีนอยด์จะเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบแบตช์ ดังแสดงในตารางที่ 2.5 แม้ว่าอัตราการเติบโตของจุลสาหร่ายในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์มีแนวโน้มลดลงจนเป็นศูนย์ เนื่องจากเกิดสภาวะขาดอาหารหรือเกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมแก่การเติบโต เช่น เกิดจากการสะสมของของเสียหรือสารพิษที่จุลสาหร่ายสร้างขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.5 การผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ด้วยระบบแบบแบตช์

ถังปฏิกรณ์	อาหาร	ความเข้มแสง	แคโรทีนอยด์	อ้างอิง
Stirred tank	Urea salt + 2%CO_2	14,800 lux.	3.1 mg/g.dw	[12]
Tubular photobioreactor	Urea salt (2 mM-N)	170,000 lux.	5.2 mg/g.dw	[12]
Tubular photobioreactor	BG-11 (50% v/v) + 0.2 M NaCl	150,000 lux.	2.0 mg/g.dw	[32]

การเพาะเลี้ยงแบบเฟตแบตช์ (Fed-Batch) เป็นการดำเนินการที่มีการป้อนสารอาหารให้แก่เซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยไม่มีการดึงผลิตภัณฑ์ออกจากระบบ การเพาะเลี้ยงแบบเฟตแบตช์มีประโยชน์ในแง่การควบคุมปฏิกิริยา โดยเฉพาะกรณีที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในระดับสูงทำให้เกิดผลลบต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ หรือที่เรียกกันว่า Substrate Inhibition แต่อย่างไรก็ตามการใช้งานระบบแบบเฟตแบตช์มีข้อควรระวัง เนื่องจากระบบดังกล่าวมีปริมาณอาหารเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาแต่ปริมาตรของถังปฏิกรณ์คงที่ ดังนั้นการออกแบบการทดลองจะต้องระมัดระวังในเรื่องของอัตราการป้อนสารเข้าสู่ระบบ มิเช่นนั้นอาหารที่ป้อนเข้าระบบอาจล้นออกนอกถังปฏิกรณ์

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous) เป็นการดำเนินการที่ระบบจะมีการป้อนสารเข้าและดึงสารออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพตลอดเวลาอย่างสมดุล ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะควบคุมให้เซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะอยู่ในระยะทวีคูณ (Exponential phase) ตลอดเวลา ระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะให้ผลผลิตต่อหน่วยเวลา (Productivity) สูงกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแขวนลอยที่มีการกวนผสมสมบูรณ์และไม่มีการรีไซเคิลเซลล์ (Completely-Mixed Suspended Growth Bioreactor with No Recycle) หากดำเนินการภายใต้สภาวะคงตัวจะพบว่า ค่าอัตราการเจือจาง (Dilution Rate, D) มีค่าเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะซึ่งเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

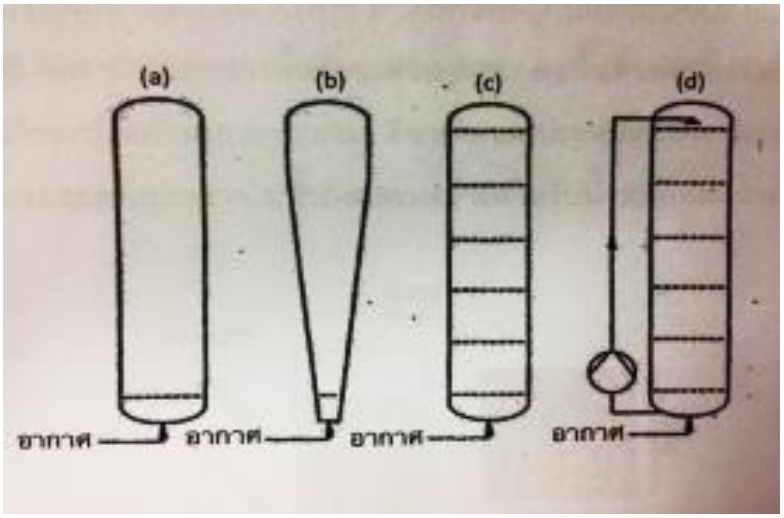
$$D = \frac{F}{V} = \mu \qquad (2.1)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ V = ปริมาณของเหลวในถังปฏิกรณ์ และ D = อัตราการเจือจาง จากสมการที่ 2.1 จะเห็นว่าสามารถปรับอัตราการเจริญจำเพาะของจุลสาหร่ายในระบบการเพาะเลี้ยงได้ โดยปรับอัตราการไหลของอาหารภายในระบบเท่านั้น และหากค่าอัตราการเจือจางมากกว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($D > \mu_m$) จะพบว่าเซลล์ในถังปฏิกรณ์จะไม่สามารถใช้อาหารได้ทันและจะถูกชะออกจากถังปฏิกรณ์ ลักษณะแบบนี้เรียกว่า สภาวะ Washout

2.4 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงสำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายมีหลายรูปแบบ ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบฟองอากาศ (Bubble column Photobioreactor) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift Photobioreactor) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน (Flat-plate Photobioreactor) เป็นต้น

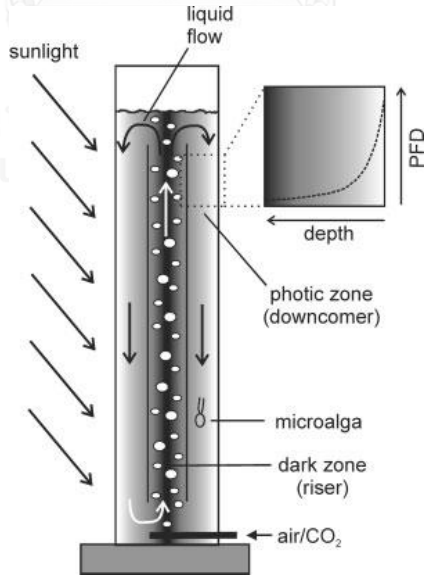
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Bubble column Photobioreactor) ลักษณะการใช้งาน จะเป่าอากาศให้แก่ของเหลวในถังโดยตรงจากหัวจ่ายบริเวณก้นถัง เพื่อให้ออกซิเจนแก่ระบบเพาะเลี้ยงและทำให้เกิดการกวนผสมของของเหลวภายในถัง รูปแบบการไหลของของเหลวภายในถังจะเป็นแบบไร้ทิศทาง การใช้งานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศมีความจำเป็นต้องเพิ่มความเร็วของอากาศเมื่อมีปริมาณเซลล์ในถังปฏิกรณ์เพิ่มสูงขึ้น เพื่อให้เซลล์สามารถแขวนลอยได้ในของเหลว อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเร็วของอากาศอาจนำไปสู่การเกิดฟองอากาศมากกว่าปกติ และทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ นอกจากนี้เมื่อฟองอากาศขนาดเล็กลอยขึ้นสู่ด้านบนของถังปฏิกรณ์อาจรวมตัวกันเป็นฟองอากาศขนาดใหญ่ ซึ่งทำให้อัตราการถ่ายเทออกซิเจนลดลง ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เติมอากาศในหลายรูปแบบ เช่น ปรับรูปร่างของถังปฏิกรณ์ให้มีลักษณะเป็นทรงกรวยในบริเวณฐาน เพื่อเพิ่มความเร็วของอากาศในบริเวณดังกล่าวซึ่งบริเวณดังกล่าวจะมีความเข้มข้นของเซลล์อยู่สูง ทำการเพิ่มซีพเทรย์ (Sieve Tray) เพื่อทำลายฟองอากาศขนาดใหญ่และเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวและอากาศ นอกจากนี้มีการไหลวนของของเหลวโดยใช้ปั๊มที่ติดตั้งอยู่ภายนอกถังปฏิกรณ์ เพื่อให้ของเหลวเกิดการผสมกันได้ดีขึ้น เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 ถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เติมอากาศและการดัดแปลงถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เติมอากาศ (a) แบบดั้งเดิม (b) ดัดแปลงบริเวณฐานให้เป็นกรวย (c) ดัดแปลงโดยเพิ่ม Sieve Tray (d) มีการไหลวนน้ำหมักโดยใช้ปั๊มและติดตั้ง Sieve Tray ที่มา: ดัดแปลงจาก Lee, 1992: 172 [38]

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift Photobioreactor) มีการให้อากาศเพื่อกวนของเหลวภายในระบบเช่นเดียวกับถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ การพัฒนาถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกมีจุดเริ่มต้นจากการผลิตจุลินทรีย์เซลล์เดียวจากเมทานอล ซึ่งพบว่าจะต้องใช้พลังงานมากเพื่อกวนของเหลวและให้ออกซิเจน อีกทั้งยังมีปัญหาเกี่ยวกับการระบายความร้อน เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้พัฒนาถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกที่ไม่ใช้ใบพัด แต่อาศัยการให้อากาศเพียงอย่างเดียว โดยจะควบคุมการให้อากาศในถังปฏิกรณ์เพื่อให้ของเหลวภายในถังปฏิกรณ์เกิดการเคลื่อนที่ในทิศทางที่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ซึ่งเป็นหนึ่งในรูปแบบของการไหลวนของของเหลวในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก จากรูปจะเห็นว่าถังปฏิกรณ์แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Riser ซึ่งเป็นส่วนที่มีการให้อากาศและของเหลวเกิดการเคลื่อนที่ขึ้นสู่ด้านบนของถังปฏิกรณ์ ในส่วนของ Downcomer ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีการให้อากาศและของเหลวเคลื่อนที่กลับลงมาสู่ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ก่อนที่จะเคลื่อนที่ขึ้นสู่ด้านบนอีกครั้ง

หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก จะอาศัยความแตกต่างระหว่างความหนาแน่นของของเหลวเมื่อมีอากาศผสมอยู่ในบริเวณที่แตกต่างกัน โดยอากาศจะถูกป้อนจากทางด้านล่างของถังปฏิกรณ์ ทำให้ในส่วนฐานของถังปฏิกรณ์มีฟองอากาศอยู่เป็นจำนวนมากส่งผลให้ของเหลวในบริเวณนี้มีความหนาแน่นลดลงและเริ่มเคลื่อนที่ขึ้นสู่ด้านบนของถังปฏิกรณ์ ในส่วนบริเวณด้านบนของถังปฏิกรณ์ซึ่งมีความดันต่ำกว่าด้านล่างจะพบว่า ฟองอากาศที่ละลายอยู่ในของเหลวจะถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้ของเหลวมีความหนาแน่นมากขึ้นและเริ่มตกลงสู่ส่วนล่างของถังปฏิกรณ์อีกครั้ง อัตราการหมุนเวียนของของเหลวในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความสูงของถังปฏิกรณ์ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของส่วน Downcomer ต่อพื้นที่ส่วน Riser (A_d: A_r) อัตราไหลอากาศ เป็นต้น ข้อดีของถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกคือ ประหยัดพลังงานและมีแรงเฉือนต่ำ แต่ข้อด้อยคือ เหมาะสำหรับของเหลวที่มีความหนืดต่ำ ดังนั้น ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกจึงถูกนำมาใช้งานด้านการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย เนื่องจากช่วยให้จุลสาหร่ายเกิดการกระจายตัวรับแสงและดูดซึมสารอาหารได้อย่างทั่วถึง ซึ่งมีผลต่อการเติบโตและอัตราการผลิตชีวมวล ดังแสดงในตารางที่ 2.6 เป็นการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกที่มีการปรับอัตราไหลของอากาศ

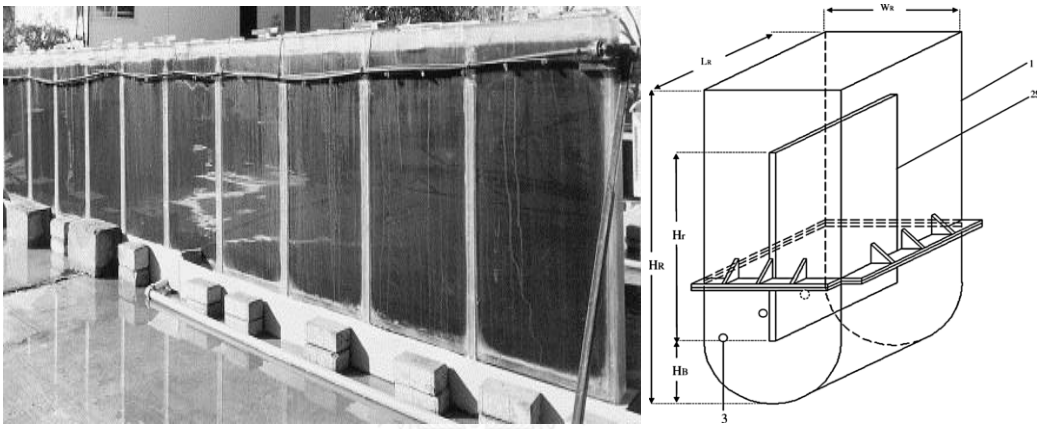


ภาพที่ 2.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift Photobioreactor) [8]

ตารางที่ 2.6 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกที่ปรับอัตราไหลของอากาศ (ลิตรต่อชั่วโมง) ซึ่งมีผลต่ออัตราการเติบโตจำเพาะและการผลิตชีวมวลของจุลสาหร่าย

รูปแบบ	**ปริมาตรถัง (L.)**	**อัตราไหลของอากาศ (L/h.)**	**อัตราการเติบโตจำเพาะ (1/h.)**	**อ้างอิง**
Flat plate Airlift reactor (*C. vulgaris*.)	2.3	15	0.05	[39]
		30	0.18	
	3.5	15	0.10	
		30	0.30	
		60	0.39	
	5.2	30	0.05	
		60.	0.13	
รูปแบบ	**ปริมาตรถัง (L.)**	**อัตราไหลของอากาศ (L/h.)**	**ชีวมวล (g/L)**	**อ้างอิง**
PBRs (*C. vulgaris*.)	16	12	0.04 (g/L)	[40]
		78	0.15 (g/L)	
		164	0.74 (g/L)	

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน (Flat-plate Photobioreactor) ตัวถังมีความหนาประมาณ 5 - 10 เซนติเมตร ทำให้มีพื้นที่ผิวในการรับแสงได้มาก แสงกระจายตัวได้ดีและลดการบดบังแสงกันเองของเซลล์จุลสาหร่าย ภายในถังปฏิกรณ์มีการติดตั้งอุปกรณ์เสริมเข้าไปเพื่อแบ่งสัดส่วนภายในออกเป็นสองส่วนคือ Riser และ Downcomer (ภาพที่ 2.4) ซึ่งจะช่วยในเรื่องการไหลวนของของไหล ทำให้เซลล์ไหลวนกระจายตัวเพื่อรับแสงได้ดีและลดการจมตัวของเซลล์ นอกจากนี้สามารถนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบนไปประยุกต์เพาะเลี้ยงกลางแจ้งได้ [41]



(a) (b)

ภาพที่ 2.4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน (Flat-plate Photobioreactor) (a) จาก Cheng-Wu et al., 2001 (b) จาก Issarapayup et al., 2009 [42, 43]

Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยงานวิจัยแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ (1) การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบบแบตช์เพื่อให้ได้รับข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการเติบโต (2) การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตและสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย และ (3) เปรียบเทียบการใช้งานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* โดยเลือกใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบ (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยกอยู่ภายใน (Draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น

3.1 การศึกษาการเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบตช์

งานวิจัยในส่วนนี้ ทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* และการศึกษาการเติบโตของจุลสาหร่ายด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดแก้ว Duran ปริมาตร 2 ลิตร เพื่อให้ได้รับข้อมูลเบื้องต้น ได้แก่ ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (Maximum Specific Growth Rate, μ_m) และอัตราผลผลิตของเซลล์สูงสุด

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย

นำหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* มาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายเพิ่มปริมาณ โดยเตรียมอาหารสูตร BG-11 (ตารางที่ 3.1) และขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปิดด้วยจุกสำลี นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเป็น

การฆ่าเชื้อและป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเติมลงในขวดรูปชมพู่ด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตรของอาหารต่อหัวเชื้อเซลล์เท่ากับ 9:1 หลังจากนั้นนำขวดรูปชมพู่ไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง 3,500 - 5,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส ในระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายหัวเชื้อทุกสัปดาห์เพื่อขยายหัวเชื้อให้มีปริมาณที่เพียงพอ

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลสาหร่ายสูตร BG-11 อ้างอิงจาก Rippka et al., (1979), [44]

<u>ส่วนที่ 1</u>: ส่วนประกอบอาหาร สูตร BG-11

ส่วนประกอบ	**กรัม/ลิตร**
$NaNO_3$	1.500
$K_2HPO_4.3H_2O$	0.040
$MgSO_4.7H_2O$	0.075
$CaCl_2.2H_2O$	0.036
Na_2CO_3	0.020
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA	0.001
Trace metal mix A_5	1 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>ส่วนที่ 2</u>: ส่วนประกอบ Trace metal mix A_5

ส่วนประกอบ	**กรัม/ลิตร**
H_3BO_3	2.860
$MnCl_2.4H_2O$	1.810
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.390
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222
$CuSO_4.5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.050

3.1.2 การเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

นำหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ในหัวข้อ 3.1.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในขวดแก้ว Duran ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 15 วัน โดยใช้สูตรอาหาร BG-11 ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องระหว่าง 28 - 32 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ และเติมอากาศที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Gelman Acrodisc 50 ที่มีขนาดช่องว่างเฉลี่ยเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร ควบคุมอัตราไหลของอากาศที่ 45 - 50 ลิตรต่อชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวจากขวดแก้ว Duran ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกวัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของสารอาหารไนเตรทและฟอสเฟต ตามวิธีมาตรฐานของ Strickland and Parsons et al., (1972) และ APHA, (1992) ข้อมูลที่ได้จะนำมาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_m) ซึ่งเกิดขึ้นในช่วง Exponential Phase ดังสมการที่ 3.1

$$\mu_m = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \qquad (3.1)$$

โดยที่ μ_m = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเซลล์ (วัน$^{-1}$); X = น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และ t = ระยะเวลา (วัน) ตารางที่ 3.2 สรุปตัวแปรที่ใช้ศึกษาในการทดลอง ที่ 3.1

Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.1

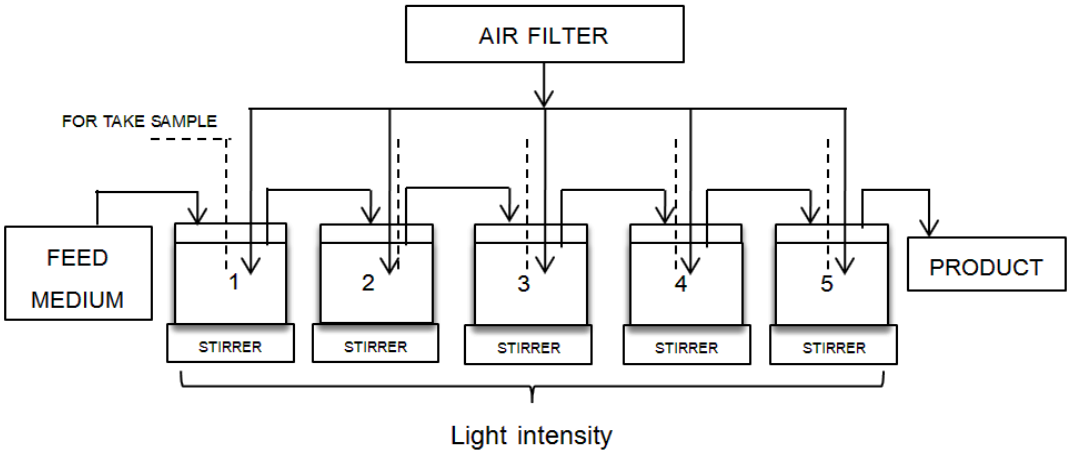
ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง หรือ วิเคราะห์**
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. อาหาร BG-11	ตารางที่ 3.1
2. ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	ประมาณ 0.066 กรัมต่อลิตร
3. ความเข้มแสง	3,500 ลักซ์
4. อัตราไหลของอากาศ	45 - 50 ลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.1

ตัวแปร	ค่าที่ใช้ในการทดลอง หรือ วิเคราะห์
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
5. อุณหภูมิ	28 - 32 องศาเซลเซียส
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
2. ความเข้มข้นของสารอาหาร	ความเข้มข้นของ NO_3^- และ PO_4^{3-}

3.2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบต่อเนื่องเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและสะสมแคโรทีนอยด์

ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องในขวดแก้ว Duran ปริมาตร 2 ลิตร ที่วางเรียงต่อกัน จำนวน 5 ขวด ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BG-11 โดยควบคุมอัตราการเจือจาง (Dilution Rate) ให้น้อยกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเล็กน้อยเพื่อป้องกันการเกิดภาวะ Washout ทั้งนี้ปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง BG-11 ที่ถูกเติมเข้ามาจะทำให้ของเหลวในถังเพาะเลี้ยงที่ 1 ล้นออกสู่ถังเพาะเลี้ยงที่ 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ และสุดท้ายจะล้นออกสู่ถังเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ในอัตราที่เท่ากันตลอดเวลา ดังแสดงในภาพที่ 3.1 แผนภาพระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในส่วนการทดลองที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 แผนภาพระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่อง ในขวดแก้ว Duran ปริมาตร 2 ลิตร ที่วางเรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด

3.2.1 ผลของความเข้มแสงและการขาดไนโตรเจนต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ ในชุดควบคุมจะเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปกติ คือ 100% $NaNO_3$ ของอาหารสูตร BG-11 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 จะเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยอาหารที่ปรับสูตรเป็น 5% $NaNO_3$ ของอาหารสูตร BG-11 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ จนกระทั่งระบบเข้าสู่สภาวะคงตัว (Steady State) จึงปรับระดับความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 โดยใช้ระดับความเข้มแสงเท่ากับ 3,500 50,000 และ 100,000 ลักซ์ เมื่อระบบเพาะเลี้ยงเข้าสู่สภาวะคงตัวอีกครั้งของแต่ละความเข้มแสงที่ทำการทดลอง (3,500 50,000 และ 100,000 ลักซ์) จะเก็บตัวอย่างของเหลวจากขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 ถึง 5 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของสารอาหารไนเตรทและฟอสเฟต ตามวิธีมาตรฐานของ Strickland and Parsons et al., (1972) และ APHA, (1992) ตารางที่ 3.3 สรุปตัวแปรที่ใช้ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.2.1

ตารางที่ 3.3 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.2.1

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง หรือ วิเคราะห์**
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. อาหาร BG-11	ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 5% และ 100% ของอาหารมาตรฐาน (ตารางที่ 3.1)
2. ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	ประมาณ 0.066 กรัมต่อลิตร
3. ความเข้มแสง	3,500 - 100,000 ลักซ์
4. อัตราไหลของอากาศ	45 - 50 ลิตรต่อชั่วโมง
5. อุณหภูมิ	28 - 32 องศาเซลเซียส
6. อัตราการเจือจาง	น้อยกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเล็กน้อย (จากการทดลองที่ 3.1)
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
2. ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์	มิลลิกรัมต่อลิตร
3. ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์	มิลลิกรัมต่อลิตร
4. ความเข้มข้นของสารอาหาร	ความเข้มข้นของ NO_3^- และ PO_4^{3-}

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2 ผลของการเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

การทดลองในส่วนนี้ใช้วิธีเหมือนกับหัวข้อ 3.2.1 โดยการทดลองในส่วนนี้จะใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร BG-11 ปกติที่มี $NaNO_3$ 100% และสูตรปรับปรุงที่มี $NaNO_3$ 5% ของอาหารสูตรปกติ และทำการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่ผสมกับอากาศเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราไหลของอากาศ 45 - 50 ลิตรต่อชั่วโมง เพาะเลี้ยงด้วยความเข้มแสงเริ่มต้น 3,500 ลักซ์ เมื่อระบบเพาะเลี้ยงเข้าสู่สภาวะคงตัวจึงปรับเพิ่มความเข้มแสงที่ให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์

สูงสุดจากการทดลองที่ 3.2.1 จากนั้นให้ระบบเข้าสู่สภาวะคงตัวอีกครั้ง จึงเก็บตัวอย่างของเหลวจากขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 ถึง 5 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของสารอาหารไนเตรทและฟอสเฟต ตามวิธีมาตรฐานของ Strickland and Parsons et al., (1972) และ APHA, (1992) ตารางที่ 3.4 สรุปตัวแปรที่ใช้ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.2.2

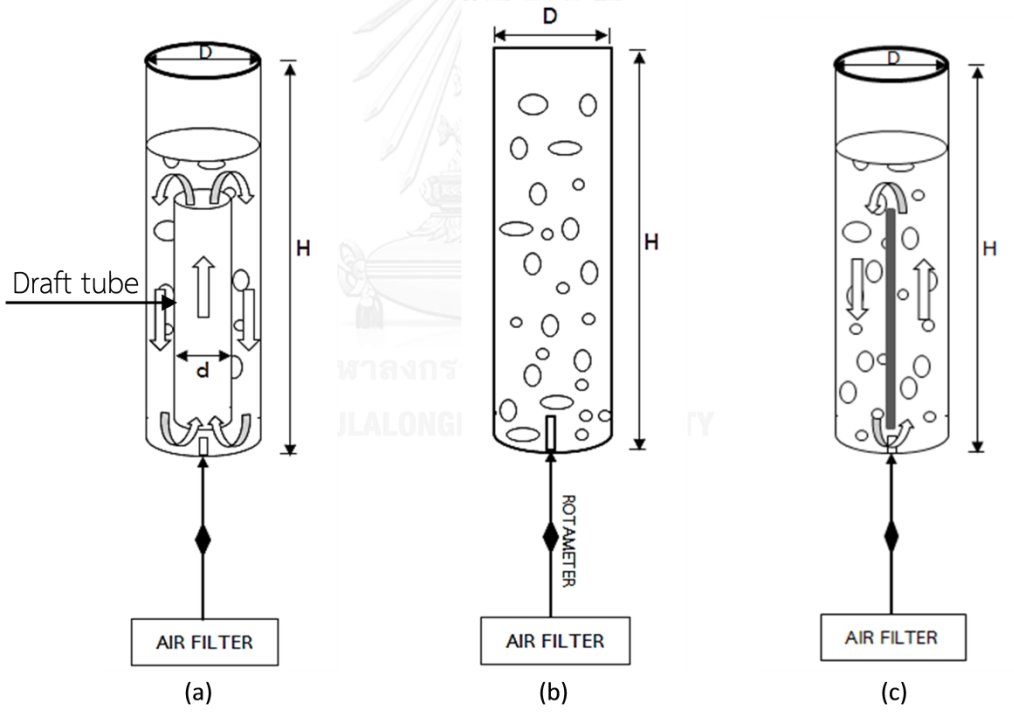
ตารางที่ 3.4 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.2.2

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง หรือ วิเคราะห์**
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. อาหาร BG-11	ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 5% และ 100% ของอาหารมาตรฐาน (ตารางที่ 3.1)
2. ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	ประมาณ 0.066 กรัมต่อลิตร
3. ความเข้มแสง	ผลจากการทดลองที่ 3.2.1
4. อัตราไหลของอากาศ	45 - 50 ลิตรต่อชั่วโมง
5. อุณหภูมิ	28 - 32 องศาเซลเซียส
6. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร
7. อัตราการเจือจาง	น้อยกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเล็กน้อย (จากการทดลองที่ 3.1)
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
2. ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์	มิลลิกรัมต่อลิตร
3. ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์	มิลลิกรัมต่อลิตร
4. ความเข้มข้นของสารอาหาร	ความเข้มข้นของ NO_3^- และ PO_4^{3-}

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 ศึกษารูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola*

งานวิจัยในส่วนนี้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น แสดงดังภาพที่ 3.2 เพื่อศึกษาการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง เพื่อให้ได้รับข้อมูลเบื้องต้น ได้แก่ รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงและอัตราไหลของอากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* โดยขนาดของท่อแสดงในตารางที่ 3.5



ภาพที่ 3.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบ (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น

ตารางที่ 3.5 ขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบ (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง	เส้นผ่านศูนย์กลางท่อ (D)	ความสูงของท่อ (H)	เส้นผ่านศูนย์กลางท่อใน (d)	ความสูงท่อใน/แผ่นกั้น (h)	A_D/A_R
Airlift Type I[(a)]	10 cm	55 cm	5 cm	25 cm	3.87
Bubble column[(b)]	10 cm	55 cm	-	-	-
Airlift Type II[(c)]	10 cm	55 cm	-	25 cm	3.87

3.3.1 การเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

การทดลองในส่วนนี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง โดยนำหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ในหัวข้อ 3.1.1 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยปริมาตรเพาะเลี้ยง 4 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องระหว่าง 28 - 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะของอาหาร ความเข้มแสง และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ให้ผลผลิตของแคโรทีนอยด์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.2 และเติมอากาศที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Gelman Acrodisc 50 ที่มีขนาดช่องว่างเฉลี่ยเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร เข้าทางด้านล่างของถังปฏิกรณ์ การทดลองในส่วนนี้จะปรับระดับอัตราไหลของอากาศในช่วง 50 - 140 ลิตรต่อชั่วโมง เพื่อศึกษาผลของอัตราไหลของอากาศต่อการเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย ติดตามผลโดยการเก็บตัวอย่างของเหลวจากถังปฏิกรณ์ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทุกวัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของสารอาหารไนเตรทและฟอสเฟต ตาม

วิธีมาตรฐานของ Strickland and Parsons et al., (1972) และ APHA, (1992) ตารางที่ 3.6 สรุปตัวแปรที่ใช้ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3.1

ตารางที่ 3.6 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3.1

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง หรือ วิเคราะห์**
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. อาหาร BG-11, ความเข้มแสง, CO_2	ผลจากการทดลองที่ 3.2
2. ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	ประมาณ 0.066 กรัมต่อลิตร
3. อัตราไหลของอากาศ	50 - 140 ลิตรต่อชั่วโมง
4. อุณหภูมิ	28 - 32 องศาเซลเซียส
5. ขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง	ตารางที่ 3.5
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
2. ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์	มิลลิกรัมต่อลิตร
3. ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์	มิลลิกรัมต่อลิตร
4. ความเข้มข้นของสารอาหาร	ความเข้มข้นของ NO_3^- และ PO_4^{3-}

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

การทดลองในส่วนนี้ จะนำรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงรวมถึงอัตราไหลของอากาศที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.1 มาเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบต่อเนื่อง โดยสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะนำสภาวะที่ให้ผลผลิตของแคโรทีนอยด์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.2 และควบคุมอัตราการเจือจาง (Dilution Rate) ให้น้อยกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเล็กน้อย (จากการทดลองที่ 3.1) ติดตามผลโดยการเก็บตัวอย่างของเหลวจากถังเก็บเกี่ยวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกวัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนัก

เซลล์แห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ความเข้มข้นของสารอาหารไนเตรทและฟอสเฟต ตามวิธีมาตรฐานของ Strickland and Parsons et al., (1972) และ APHA., (1992) ตารางที่ 3.7 สรุปตัวแปรที่ใช้ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3.2

ตารางที่ 3.7 ตัวแปรควบคุมและตัวแปรตามที่ศึกษาในการทดลองส่วนที่ 3.3.2

ตัวแปร	**ค่าที่ใช้ในการทดลอง หรือ วิเคราะห์**
<u>ตัวแปรควบคุม</u>	
1. อาหาร BG-11, ความเข้มแสง, CO_2	ผลจากการทดลองที่ 3.2
2. ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น	ประมาณ 0.066 กรัมต่อลิตร
3. อัตราไหลของอากาศ	ผลจากการทดลองที่ 3.3.1
4. อุณหภูมิ	28 - 32 องศาเซลเซียส
5. ขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง	ตารางที่ 3.5
6. อัตราการเจือจาง	น้อยกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเล็กน้อย (จากการทดลองที่ 3.1)
<u>ตัวแปรตาม</u>	
1. อัตราการเติบโตของจุลสาหร่าย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
2. ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์	มิลลิกรัมต่อลิตร
3. ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์	มิลลิกรัมต่อลิตร
4. ความเข้มข้นของสารอาหาร	ความเข้มข้นของ NO_3^- และ PO_4^{3-}

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

ตารางที่ 3.8 สรุปวิธีการวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์	วิธีการ	อุปกรณ์วัดผล	อ้างอิง
1.น้ำหนักเซลล์แห้ง	2540-Solids, B. Total Solids Dried	เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	APHA, (1992), [45]
2.ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์	Part IV.3.I Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids,185	UV-Vis Spectrophotometer	Strickland and Parsons et al., (1972), [46]
3.ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์	Part IV.3.I Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids,185	UV-Vis Spectrophotometer	Strickland and Parsons et al., (1972), [46]
4.ความเข้มข้นของไนเตรท	4500-NO_3 Nitrogen (Nitrate), B. Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method, 4-87	UV-Vis Spectrophotometer	APHA, (1992), [45]
5.ความเข้มข้นของฟอสเฟต	Part II.2. Determination of phosphorus, Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method, 49	UV-Vis Spectrophotometer	Strickland and Parsons et al., (1972), [46]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ในระบบแบบแบตซ์

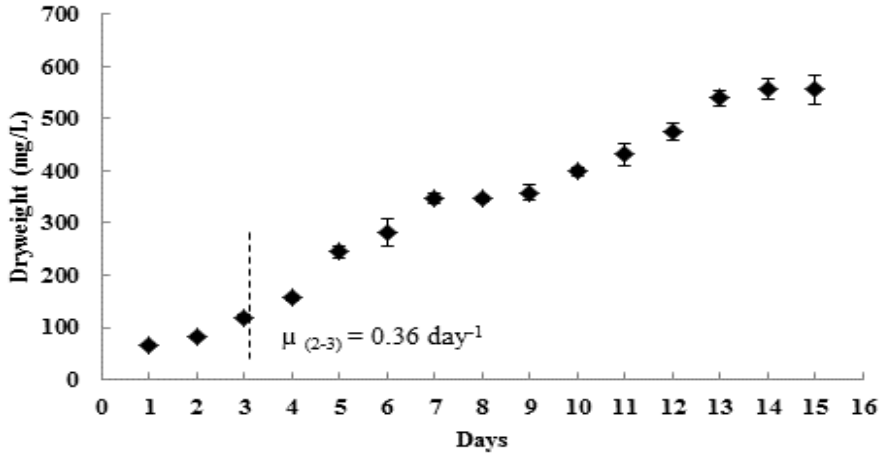
4.1.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย

ในเบื้องต้นได้ทำการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปิดด้วยจุกสำลีเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าเซลล์จุลสาหร่ายมีการเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้น สังเกตได้จากสีเขียวที่เข้มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป เซลล์จุลสาหร่ายที่ได้จะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตซ์ต่อไป

ภาพที่ 4.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงระหว่างการทดลองแบบแบตซ์

4.1.2 การเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

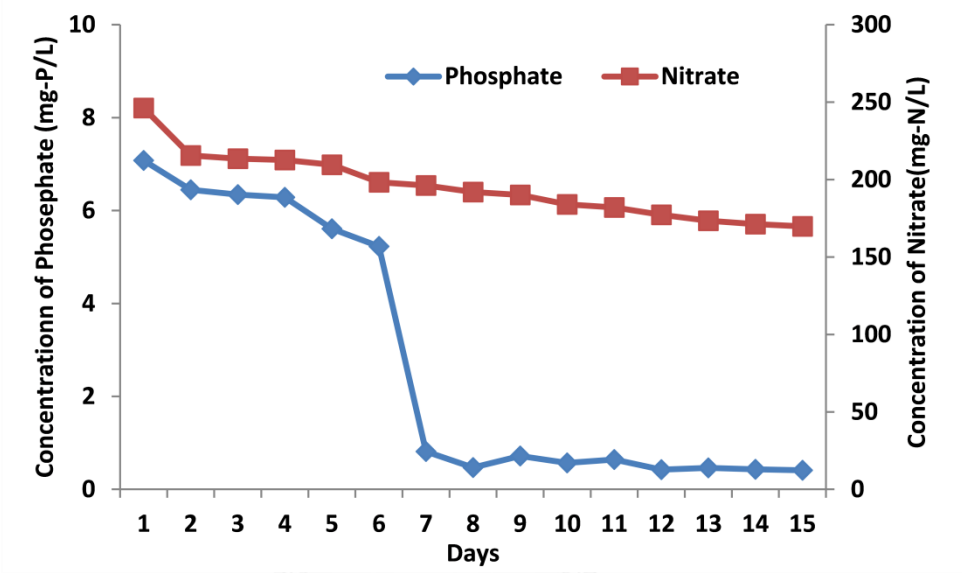
นำหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ในหัวข้อ 4.1.1 มาเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในขวดแก้ว Duran ปริมาตร 2 ลิตร ที่เติมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BG-11 ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิในช่วง 28 - 32 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองซึ่งวัดในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าประมาณ 66 มิลลิกรัมต่อลิตร จากรูปที่ 4.2 ซึ่งแสดงการเติบโตของจุลสาหร่ายในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า จุลสาหร่ายมีการเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นและมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 556 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเกิดขึ้นระหว่างวันที่ 2 ถึง 3 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีค่าเท่ากับ 0.36 ต่อวัน ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ได้รับในการทดลองนี้อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับข้อมูลการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ของ Zhange et al., (1997) [11, 12] ที่มีค่าระหว่าง 0.3 - 0.46 ต่อวัน



ภาพที่ 4.2 การเติบโตซึ่งตรวจวัดในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11

เมื่อทำการตรวจวัดความเข้มข้นของสารอาหารหลัก ซึ่งประกอบด้วยไนเตรทและฟอสเฟต (ภาพที่ 4.3) พบว่าความเข้มข้นของไนเตรทเริ่มต้นประมาณ 246 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องซึ่งเป็นผลจากจุลสาหร่ายใช้ไนโตรเจนในการเติบโตเพื่อสร้างโปรตีน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีความเข้มข้นของไนเตรทเหลืออยู่ในระบบสูงถึง 170 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร แสดง

ให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BG-11 มีปริมาณไนเตรทมากเกินพอต่อความต้องการของจุลสาหร่าย ในส่วนของความเข้มข้นของฟอสเฟตพบว่า มีฟอสเฟตเริ่มต้นประมาณ 7 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และถูกใช้ไปในการเติบโตเนื่องจากความเข้มข้นของฟอสเฟตลดลงอย่างต่อเนื่องและลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว โดยมีความเข้มข้นเหลือเพียงประมาณ 0.5 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ในวันที่ 9 และอยู่ในระดับดังกล่าวจนสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 4.3 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบตช์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารสูตร BG-11

4.2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบต่อเนื่องเพื่อศึกษาการเติบโตและสะสมแคโรทีนอยด์

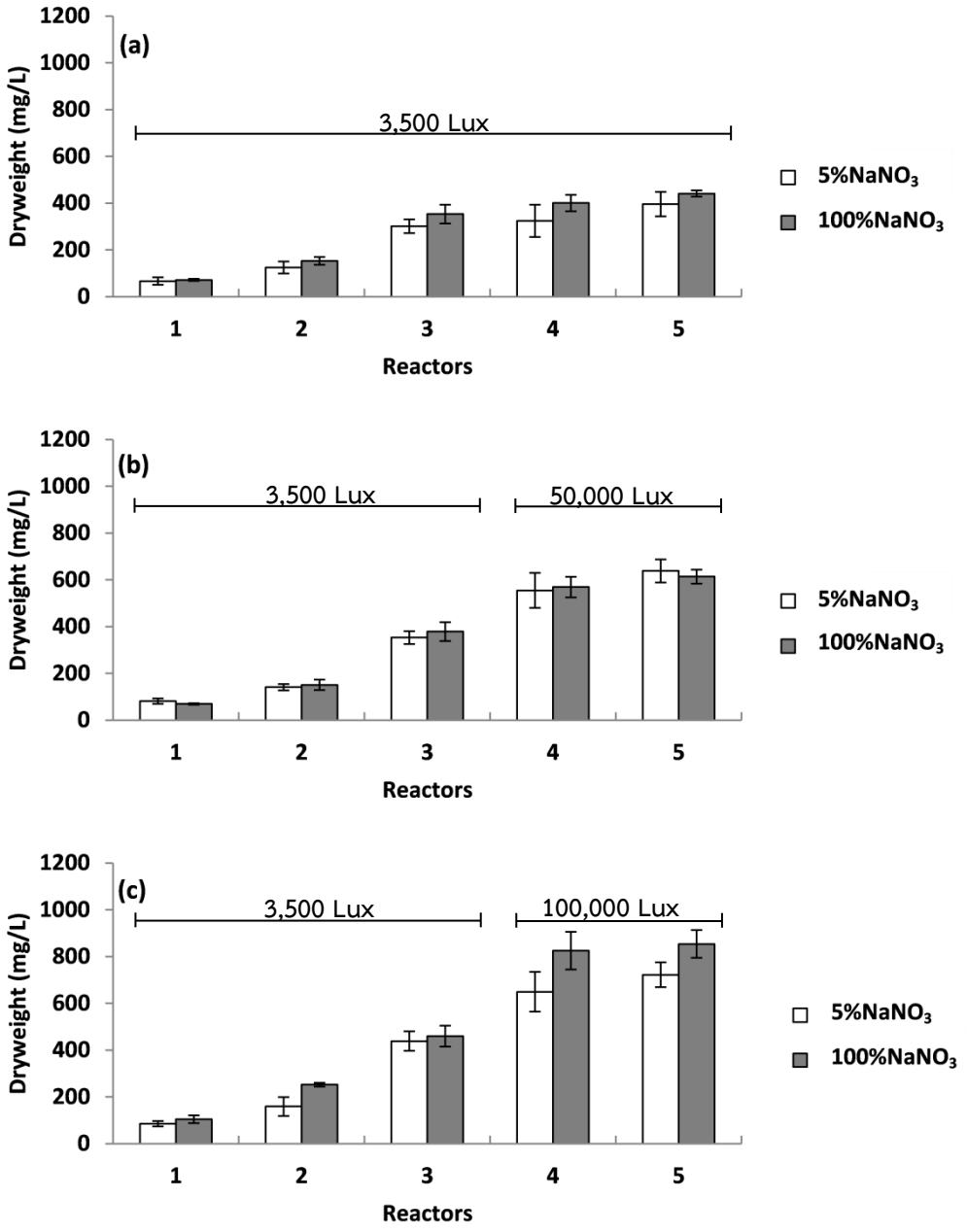
4.2.1 ผลของความเข้มแสงและการขาดธาตุอาหารไนโตรเจน

การทดลองนี้ได้ปรับเพิ่มระดับความเข้มแสงและลดความเข้มข้นของธาตุอาหารไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง โดยมีสมมติฐานว่าความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นและการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนจะมีผลเชิงบวกต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ [2, 7, 11, 12, 47] ผนวกกับผลการทดลองที่ได้รับจากส่วนที่ 4.1.2 ซึ่งมี

ข้อเสนอแนะให้ปรับปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในอาหารให้น้อยลง ดังนั้นการทดลองในส่วนนี้จึงเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ (100% $NaNO_3$) และ BG-11 สูตรปรับปรุงที่ลดไนโตรเจนลง 20 เท่า (5% $NaNO_3$) เพื่อให้จุลสาหร่ายอยู่ในสภาวะขาดธาตุอาหารไนโตรเจน และดำเนินการเพาะเลี้ยงในระบบแบบต่อเนื่องที่มีขวดเพาะเลี้ยงวางเรียงกันทั้งหมด 5 ขวด (ภาพที่ 3.1) การทดลองได้ควบคุมอัตราป้อนสารอาหารที่ 0.7 ลิตรต่อวัน ซึ่งเทียบเท่ากับอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.35 ต่อวัน ซึ่งน้อยกว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (0.36 ต่อวัน) ที่ได้รับจากการทดลองส่วนที่ 4.1.2 การควบคุมอัตราการเจือจางให้ต่ำกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดช่วยให้ลดโอกาสของสภาวะ Washout ซึ่งทำให้ปริมาณเซลล์ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องลดลง [38] การทดลองนี้ได้ควบคุมระดับความเข้มแสงที่ 3,500 ลักซ์ ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3 และเมื่อระบบเข้าสู่ระยะคงตัว (Steady State) จึงปรับความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 ของแต่ละชุดการทดลองเป็น 50,000 ลักซ์ และ 100,000 ลักซ์ โดยในชุดควบคุมได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายโดยใช้อาหารสูตร BG-11 และในชุดทดลองได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5%

ผลการทดลองที่แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 4.4) พบว่าการเพิ่มระดับความเข้มแสงจาก 3,500 ลักซ์ เป็น 100,000 ลักซ์ ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 จะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นทั้งในชุดควบคุม (มีไนโตรเจนเพียงพอ) และชุดทดลอง (ขาดไนโตรเจน) โดยน้ำหนักเซลล์แห้งจากขวดเพาะเลี้ยงที่ 5 มีค่าประมาณ 854 และ 722 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ปกติ ที่มี 100% $NaNO_3$ และ 5%$NaNO_3$ ตามลำดับ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้รับที่ความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ เพิ่มสูงขึ้นจากความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ ถึง 43 – 48 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

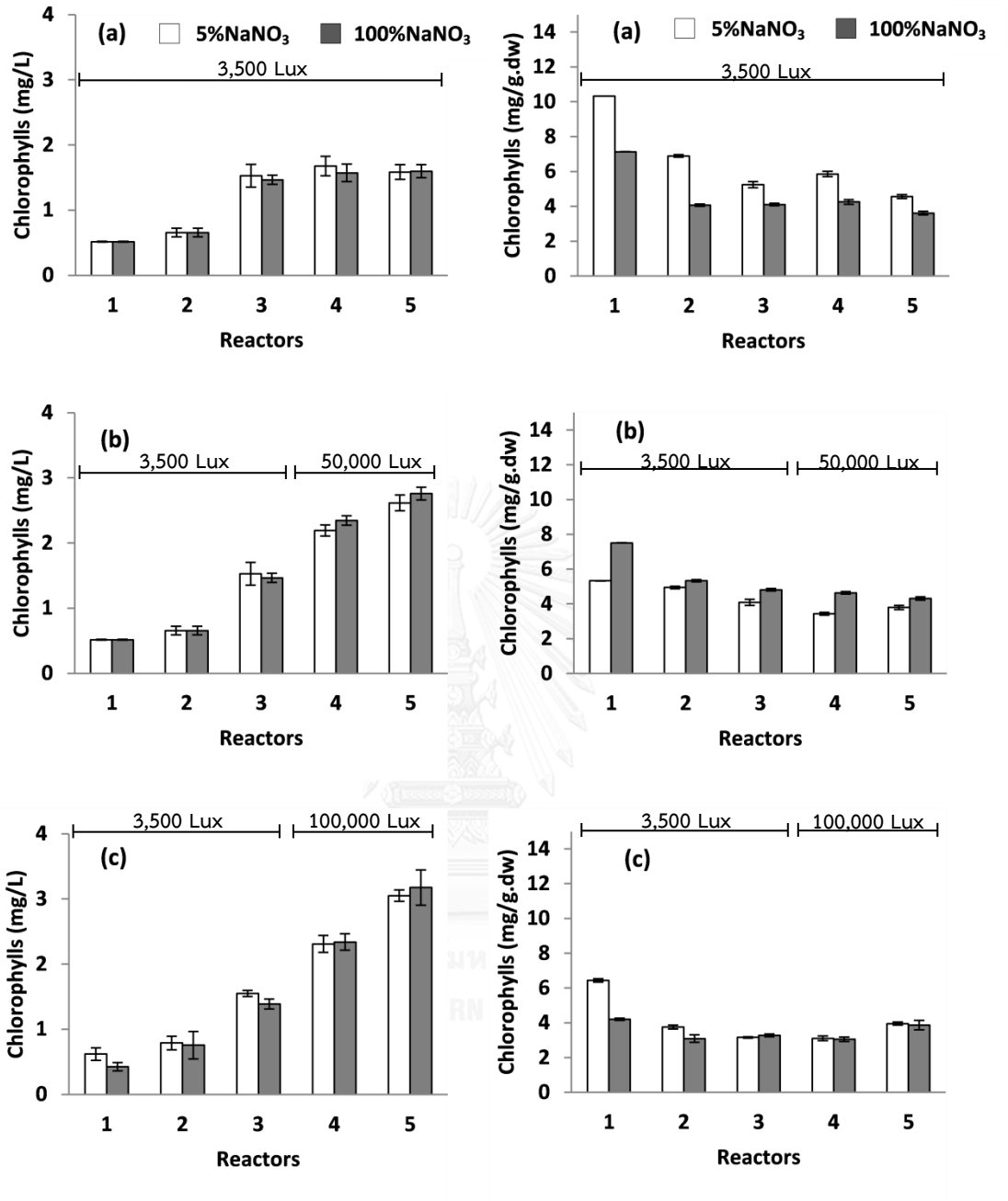


ภาพที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* จากขวดเพาะเลี้ยงทั้ง 5 ของระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตรที่มี 5% และ 100% $NaNO_3$ ในสูตรอาหาร BG-11 ที่ควบคุมความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 (a) 3,500 ลักซ์ (b) 50,000 ลักซ์ และ (c) 100,000 ลักซ์

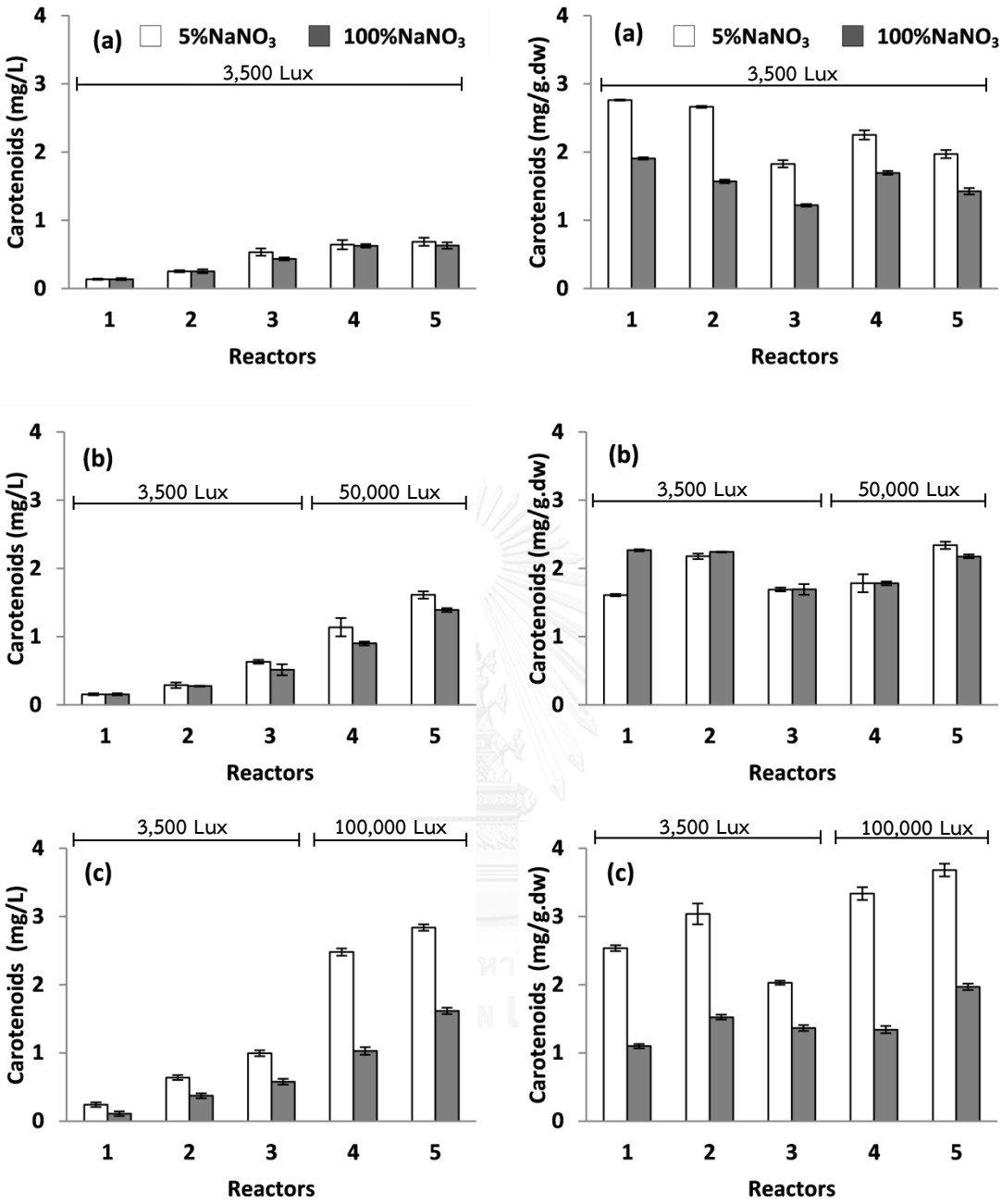
ในส่วนของคลอโรฟิลล์ (ภาพที่ 4.5) พบว่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) จากขวดการเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 เพิ่มสูงขึ้นตามการเพิ่มระดับความเข้มแสงเช่นเดียวกันกับน้ำหนักเซลล์แห้ง การเพิ่มระดับความเข้มแสงจะทำให้เซลล์จุลสาหร่ายมีโอกาสได้รับแสงมากขึ้น ส่งผลให้การสังเคราะห์

แสงและการเติบโตเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการทดลองนี้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 3.17 และ 3.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี 100%$NaNO_3$ และ 5% $NaNO_3$ ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากระดับแสงเริ่มต้นที่ 3,500 ลักซ์ ประมาณ 48 - 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ต่อหน่วยน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.86 และ 3.95 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี 100%$NaNO_3$ และ 5% $NaNO_3$ ตามลำดับ สำหรับแคโรทีนอยด์ (ภาพที่ 4.6) พบว่าที่ระดับความเข้มแสงต่ำ (3,500 ลักซ์) การผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* เมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร BG-11 ที่มี 100% $NaNO_3$ และ 5% $NaNO_3$ ไม่ได้แตกต่างกันมาก โดยมีความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เฉลี่ยประมาณ 0.66 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มแสงให้ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 เป็น 50,000 และ 100,000 ลักซ์ จะพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการขาดไนโตรเจนจะให้การผลิตแคโรทีนอยด์ที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ไม่ขาดไนโตรเจน (100% $NaNO_3$) โดยที่ความเข้มแสง 50,000 ลักซ์ จุลสาหร่ายสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 1.61 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้อาหารที่ขาดไนโตรเจน และสามารถผลิตได้ 1.39 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้อาหารที่มีไนโตรเจนเพียงพอ และเมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 100,000 ลักซ์ จุลสาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 2.84 และ 1.62 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้อาหารสูตร BG-11 ที่ขาดและไม่ขาดไนโตรเจน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% จะให้การผลิตแคโรทีนอยด์มากกว่าการใช้อาหารสูตร BG-11 ปกติ ถึง 43 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้รับสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang et al., (1997) [12] ที่เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* โดยเมื่อลดความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 140 เป็น 28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และเพิ่มความเข้มแสงจาก 15,000 เป็น 170,000 ลักซ์ ความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่ายเพิ่มขึ้นจาก 3 เป็น 5.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความเข้มแสงที่สูงขึ้นจะช่วยกระตุ้นให้จุลสาหร่ายผลิตแคโรทีนอยด์เพื่อป้องกันการเสียสภาพของเซลล์จากการสังเคราะห์แสง Photooxidation [29, 31]

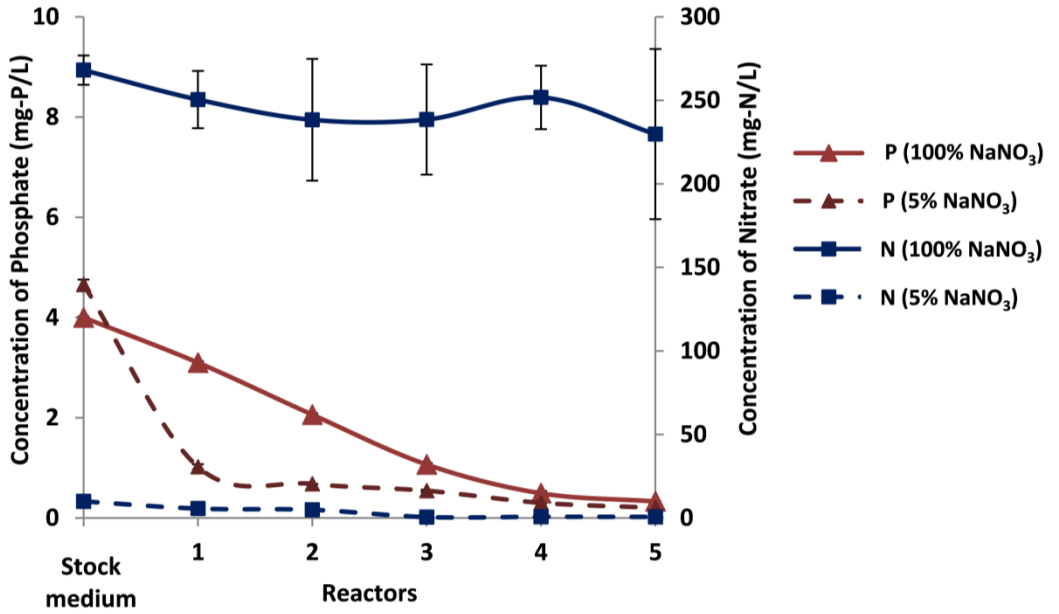
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 4.5 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรและมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายจากขวดเพาะเลี้ยงทั้ง 5 ของระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตรที่มี 5% และ 100% $NaNO_3$ ในสูตรอาหาร BG-11 ที่ควบคุมความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 (a) 3,500 ลักซ์ (b) 50,000 ลักซ์ และ (c) 100,000 ลักซ์



ภาพที่ 4.6 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรและมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายจากขวดเพาะเลี้ยงทั้ง 5 ของระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตรที่มี 5% และ 100% $NaNO_3$ ในสูตรอาหาร BG-11 ที่ควบคุมความเข้มแสงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 (a) 3,500 ลักซ์ (b) 50,000 ลักซ์ และ (c) 100,000 ลักซ์



ภาพที่ 4.7 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ปกติ และสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5%

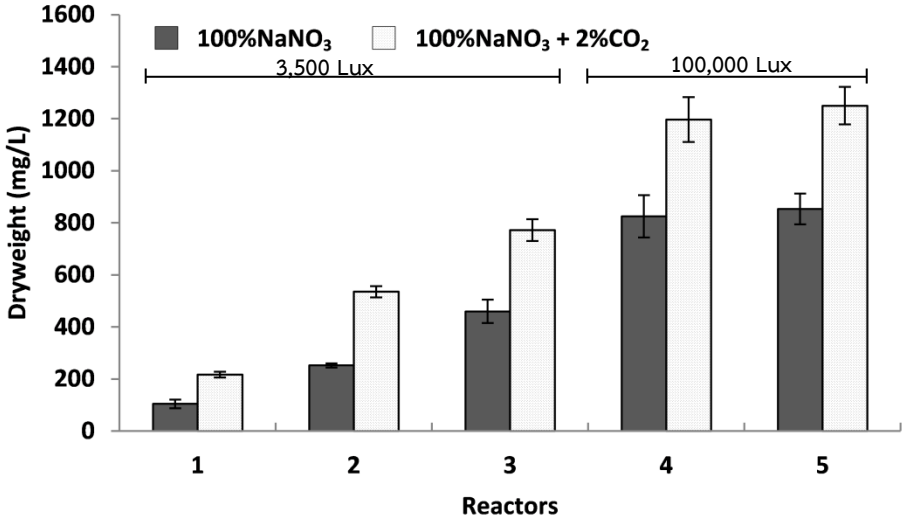
ในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องได้เก็บตัวอย่างน้ำวันละ 5 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ผลการวิเคราะห์น้ำ (ภาพที่ 4.7) พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 มีการลดลงของไนเตรทเพียงเล็กน้อยจาก 268 เป็น 230 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งสื่อได้ว่าปริมาณไนโตรเจนในรูปของไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมากเกินพอต่อการใช้งานของจุลสาหร่าย ซึ่งอาจนำไปสู่การสูญเสียสารอาหารที่มีราคาสูงออกไปโดยไม่จำเป็น ขณะที่การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% พบการลดลงของไนเตรทจากประมาณ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 จนหมดในขวดเพาะเลี้ยงที่ 3 การใช้งานไนโตรเจนในขวดเพาะเลี้ยง 3 ขวดแรก ส่งผลให้เกิดสภาวะขาดไนโตรเจนตามมาในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 ซึ่งนำไปสู่การสะสมของแคโรทีนอยด์ ผลการทดลองที่ได้รับสอดคล้องกับผลการวิจัยในอดีตที่ระบุว่าการขาดไนโตรเจนระหว่างเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* จะทำให้จุลสาหร่ายเกิดความเครียดและเริ่มผลิตแคโรทีนอยด์ [7, 13] ในส่วนของฟอสเฟตพบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตลดลงอย่างต่อเนื่องจนหมดในขวดเพาะเลี้ยงสุดท้าย เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่

จำเป็นต่อกระบวนการถ่ายเทพลังงานและการสร้างกรดนิวคลีอิค ซึ่งมีผลต่อการเติบโตและสะสมโปรตีนของจุลสาหร่าย [48]

4.2.2 ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

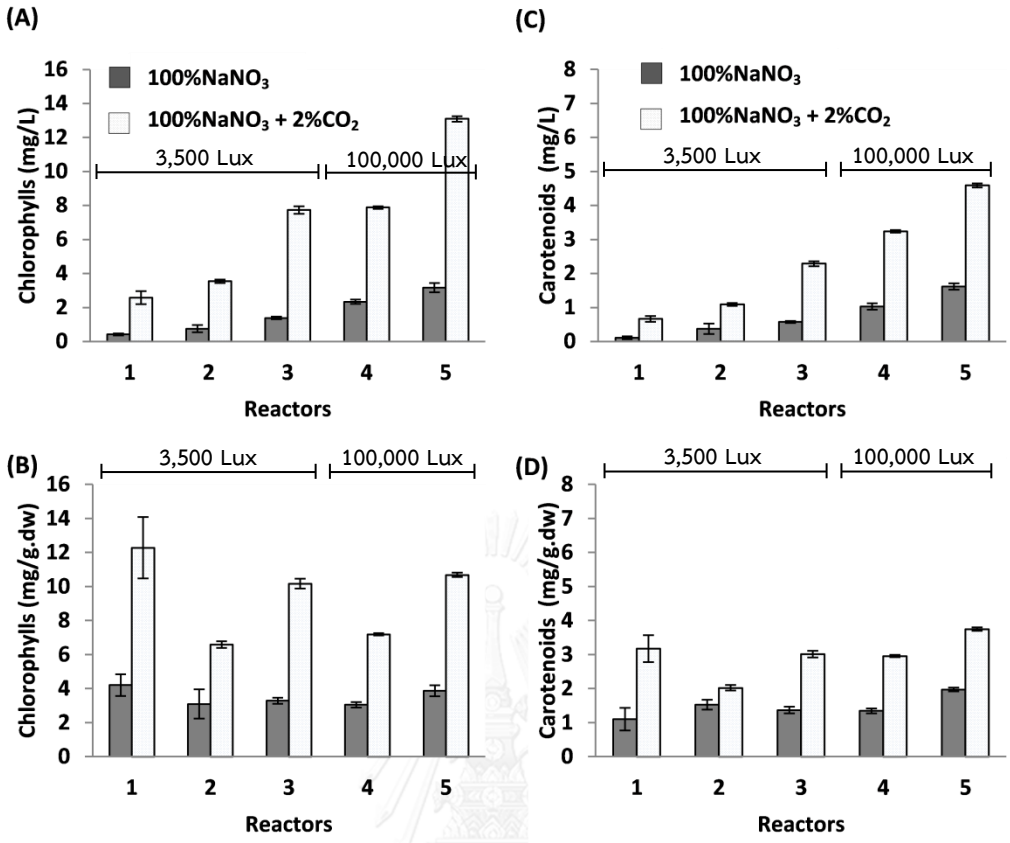
จากผลสรุปในหัวข้อ 4.2.1 ซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มแสงเป็น 100,000 ลักซ์ และลดความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เหลือเพียง 5% ของสูตรอาหาร BG-11 ปกติ จะช่วยเพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในระบบต่อเนื่อง นอกจากปัจจัยในข้างต้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ยังเป็นอีกปัจจัยที่อาจมีผลต่อความสามารถในการเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ ดังนั้นการทดลองในส่วนนี้จะปรับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ป้อนให้แก่จุลสาหร่าย *C. humicola* โดยใช้อากาศและอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และควบคุมสภาวะแวดล้อมโดยใช้ข้อสรุปจากหัวข้อที่ 4.2.1

การทดลองในส่วนนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปกติ เพื่อป้องกันสภาวะการขาดไนโตรเจนที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ระบบ ซึ่งผลการทดลอง (ภาพที่ 4.8) พบว่า การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยอาหารสูตร BG-11 ปกติ ร่วมกับการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เข้าสู่ขวดเพาะเลี้ยงทำให้จุลสาหร่ายมีการเติบโตที่ดีขึ้นซึ่งแสดงได้จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้อากาศปกติ โดยที่เมื่อควบคุมระดับความเข้มแสงที่ 100,000 ลักซ์ ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 5 พบว่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร มีค่าเท่ากับ 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอากาศปกติที่ระดับความเข้มแสงเดียวกันถึง 32 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วงที่เหมาะสมมีผลดีต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย เนื่องจากทำให้สังเคราะห์แสงได้ดีขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการสร้างชีวมวลเพิ่มสูงขึ้นด้วย [49] และค่าพีเอชที่ตรวจวัดได้จากการทดลองอยู่ในช่วง 7.3 – 8.1



ภาพที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการเติมอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5)

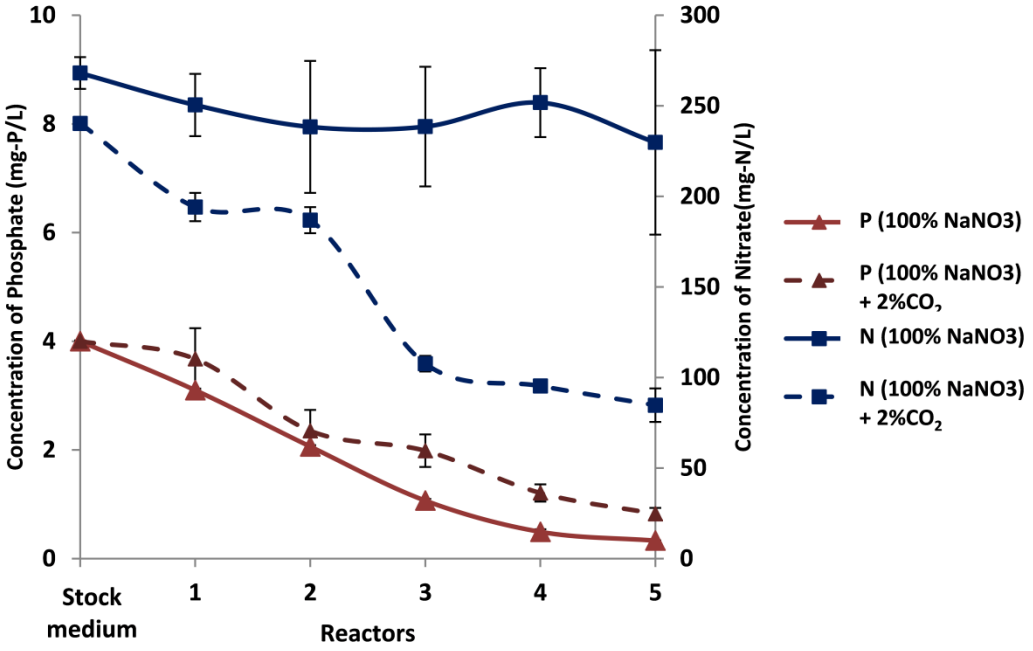
เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (ภาพที่ 4.9) จะพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยอาหารสูตรอาหาร BG-11 ปกติ ร่วมกับการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จะทำให้เกิดการสะสมคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์สูงมากกว่าระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้อากาศปกติ โดยความเข้มข้นสูงสุดของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์มีค่าเท่ากับ 13.09 และ 4.59 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าผลการทดลองที่ไม่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถึง 75 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่าย ดังนั้นเมื่อมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้ามาจึงส่งผลให้จุลสาหร่ายมีการผลิตคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง [6, 49] ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ได้รับมากกว่าค่าจากการเพาะเลี้ยงเมื่อควบคุมระดับความเข้มแสงที่ 3,500 ลักซ์ ถึง 41 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.9 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในหน่วย (A) มิลลิกรัมต่อลิตร (B) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในหน่วย (C) มิลลิกรัมต่อลิตร, (D) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการเติมอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1-3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4-5)

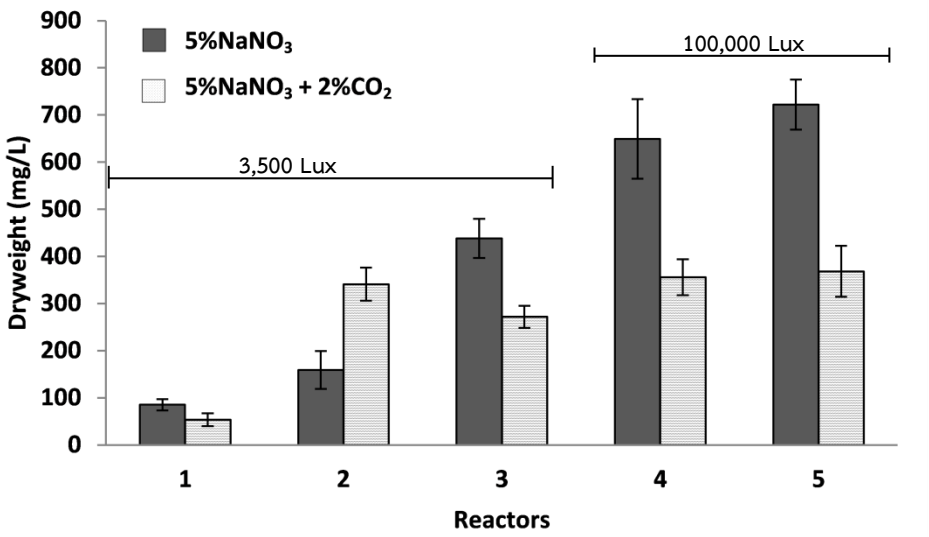
ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้เก็บตัวอย่างน้ำในขวดเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นไนเตรท และฟอสเฟตที่เหลืออยู่ในระบบ ผลการทดลอง (ภาพที่ 4.10) พบว่าความเข้มข้นของไนเตรทได้ลดลงอย่างต่อเนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 250 - 268 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร จนเหลือความเข้มข้นสุดท้าย 230 และ 85 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร เมื่อใช้อากาศปกติและอากาศที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในการเพาะเลี้ยง จากการทดลองทำให้สรุปผลในเบื้องต้นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนในสูตรอาหาร BG-11 ปกติ มีเพียงพอต่อการเติบโตของจุล

สาหร่ายแม้ว่าจะมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไป ในส่วนของฟอสเฟตพบว่าความเข้มข้นได้ลดลงอย่างต่อเนื่องจากค่าเริ่มต้นประมาณ 4 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และคงเหลือในขวดเพาะเลี้ยงสุดท้ายที่ประมาณในช่วง 0.4 – 0.8 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ทั้งในกรณีที่เติมอากาศปกติและเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการลดลงของฟอสเฟตเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องทั้งในกรณีที่มีการเติมอากาศปกติและเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 4.10 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการเติมอากาศปกติและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5)

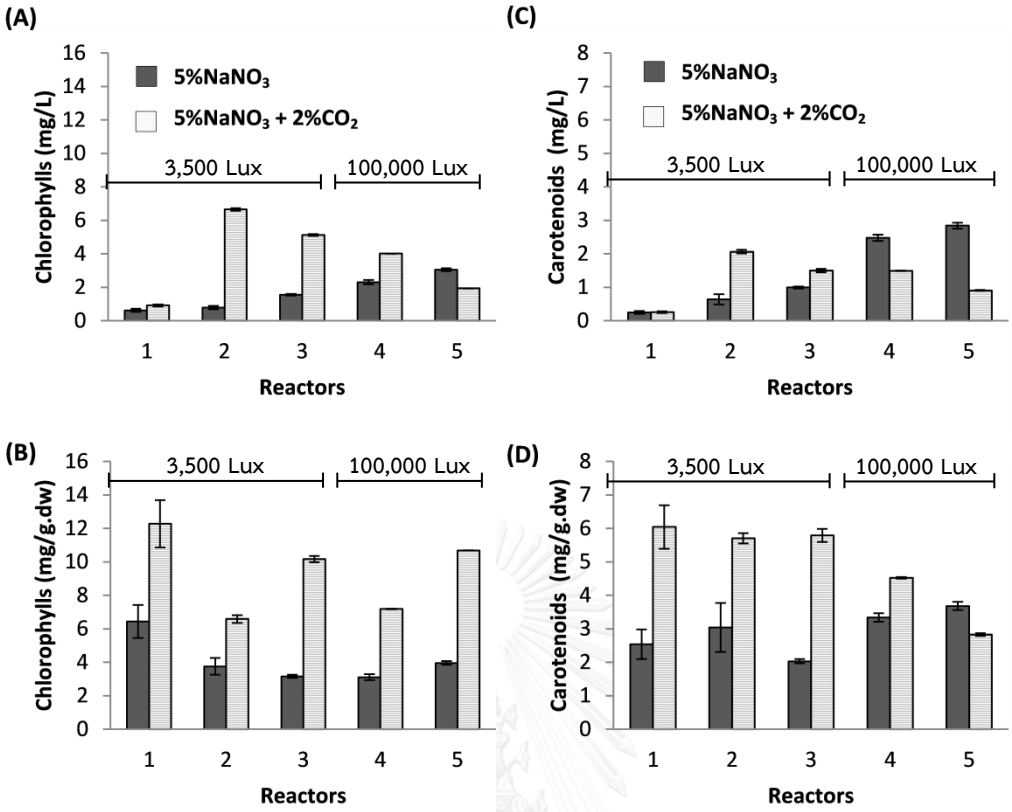
การทดลองต่อไปได้ศึกษาการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C. humicola* เมื่อเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ร่วมกับการใช้อาหารสูตร BG-11 ที่มี 5% $NaNO_3$ ผลการเติบโตซึ่งตรวจวัดโดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 4.11) พบว่าจุลสาหร่ายที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร มีการเติบโตที่ดีในขวดเพาะเลี้ยงที่ 2 และลดลงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 3 ต่อจากนั้นมีการเติบโตที่ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ใช้อากาศปกติพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่ายสะสมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมากกว่าขวดเพาะเลี้ยงที่เติมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตั้งแต่ขวดเพาะเลี้ยงที่ 3 เป็นต้นไป โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในกรณีที่ใช้อากาศปกติเกิดขึ้นในขวดเพาะเลี้ยงที่ 5 (722 มิลลิกรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงโดยเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เกิดขึ้นในขวดเพาะเลี้ยงที่ 2 (341 มิลลิกรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ร่วมกับการเติมอากาศปกติและเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5)

ในส่วนความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (ภาพที่ 4.12) พบว่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในระบบเพาะเลี้ยงที่ใช้อากาศปกติ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากขวดการเพาะเลี้ยงที่ 1 ถึง 5 (0.62 – 3.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) ขณะที่ระบบเพาะเลี้ยงที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จะมีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนในขวดเพาะเลี้ยงที่ 2 และลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องในขวดเพาะเลี้ยงที่ 3 ถึง 5 โดยความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 5 เมื่อเติมอากาศปกติมีค่าเท่ากับ 3.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เมื่อเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ถึง 36เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จะพบว่าระบบการเพาะเลี้ยงที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าระบบที่เติมอากาศปกติในทุกขวดเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นผลมาจากอิทธิพลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและเม็ดสีของรงควัตถุ

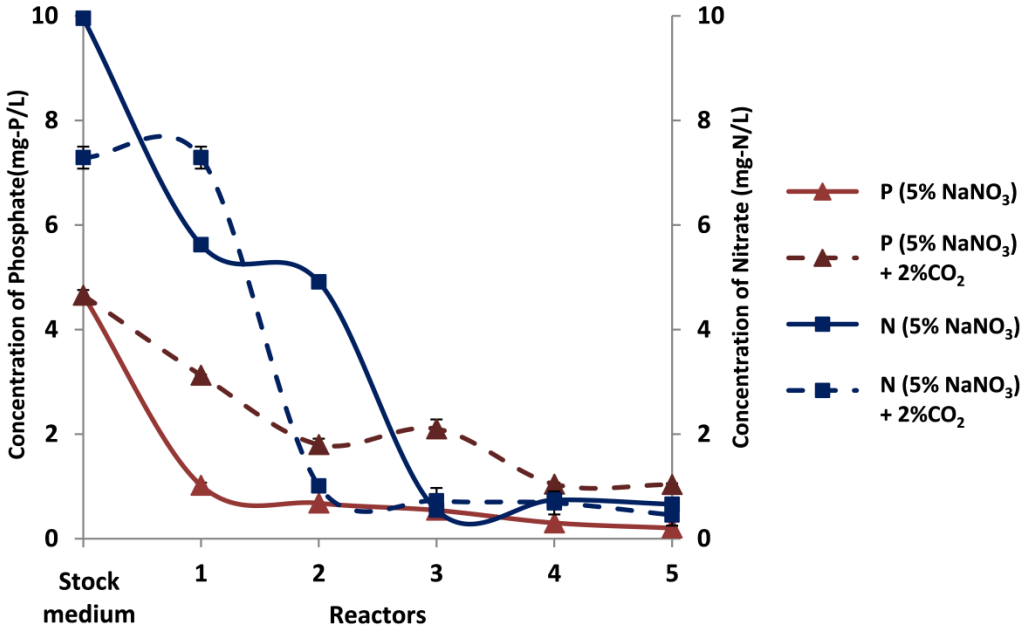
ในส่วนความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ (ภาพที่ 4.12) พบว่าระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เติมอากาศปกติจะมีความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจากขวดการเพาะเลี้ยงที่ 1 ถึง 5 ขณะที่ระบบเพาะเลี้ยงที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จะมีความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนในขวดเพาะเลี้ยงที่ 2 (2.06 มิลลิกรัมต่อลิตร) และลดต่ำลงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 3 ถึง 5 โดยความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 5 ของระบบที่เติมอากาศปกติ (2.84 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีค่ามากกว่าระบบที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ถึง 68 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบเป็นความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่า ระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าระบบเพาะเลี้ยงที่เติมอากาศปกติในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 – 4 และลดต่ำลงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 5 โดยปริมาณของแคโรทีนอยด์ในขวดการเพาะเลี้ยงที่ 5 ของระบบที่เติมอากาศปกติ (3.68 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) มีค่ามากกว่าระบบที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2% โดยปริมาตร (2.83 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ถึง 23 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.12 ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในหน่วย (A) มิลลิกรัมต่อลิตร (B) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในหน่วย (C) มิลลิกรัมต่อลิตร (D) มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% เติมอากาศปกติและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5)

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตจากระบบเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง แสดงในภาพที่ 4.13 ความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรเจนในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 มีค่าในช่วง 7-10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเข้มข้นของไนโตรเจนได้ลดลงอย่างต่อเนื่องและหมดลงในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 โดยความเข้มข้นสุดท้ายมีค่า 0.66 และ 0.45 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในกรณีที่ใช้อากาศปกติเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายและใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรตามลำดับ การหมดลงของไนเตรทในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 5 เนื่องจากจุลสาหร่ายใช้ไนโตรเจนใน

การเติบโตและสะสมแป้ง จึงก่อให้เกิดเป็นสภาวะขาดธาตุอาหารไนโตรเจนซึ่งส่งผลให้จุลสาหร่ายเกิดภาวะความเครียดและผลิตแคโรทีนอยด์ขึ้นมาเพื่อป้องกันความเสียหายจากเซลล์เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ในส่วนของฟอสเฟตพบว่าความเข้มข้นได้ลดลงอย่างรวดเร็วในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 ซึ่งมีค่าฟอสเฟตคงเหลืออยู่ในช่วง 1 – 3 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงขวดการเพาะเลี้ยงสุดท้ายซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.2 – 1 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร ทั้งในกรณีที่เติมอากาศปกติและเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร



ภาพที่ 4.13 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ในระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% เติมอากาศปกติและก๊าซคาร์บอนได-ออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ภายใต้ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3) และ 100,000 ลักซ์ (ขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5)

จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวด Duran ปริมาตร 2 ลิตร วางเรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 100% และ $NaNO_3$ 5% ความเข้มแสง 3,500 – 100,000 ลักซ์ อากาศปกติและอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สรุปผลผลิตต่อวันของน้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์ (Productivity of Dry weight และ Carotenoids, (mg/L/day)) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

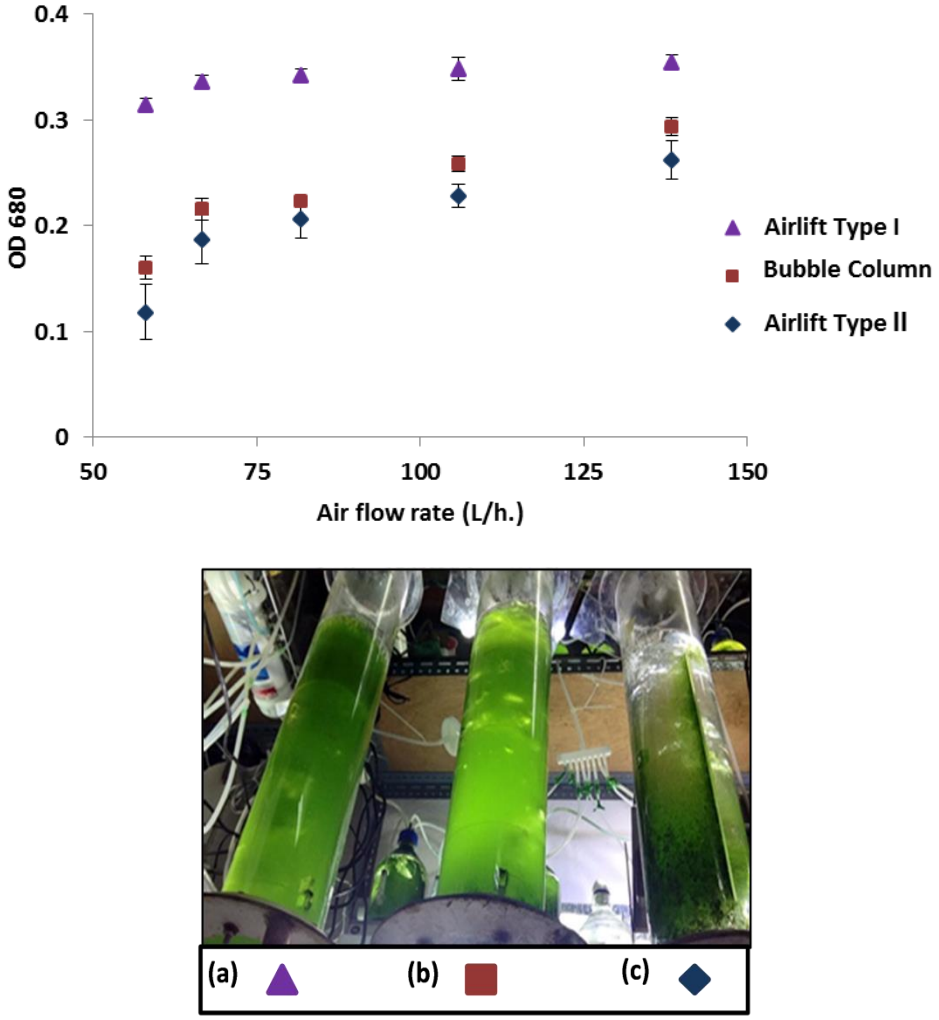
ระบบ	สภาวะ	ความเข้มแสง (ลักซ์)	Productivity of D.W. (mg/L/day)	Productivity of Carotenoids (mg/L/day)
แบบต่อเนื่อง ขวด Duran 5×2 ลิตร (ปริมาตรรวม 10 ลิตร)	BG-11	3,500	154	0.22
		50,000	214	0.49
		100,000	299	0.57
	BG-11 2% CO_2	100,000	438	1.61
	BG-11 (5%$NaNO_3$)	3,500	139	0.24
		50,000	223	0.56
		100,000	253	0.99
	BG-11 (5%$NaNO_3$) 2% CO_2	100,000	129	0.32

4.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

การทดลองในส่วนนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อคัดเลือกรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* การทดลองเป็นผลสืบเนื่องจากข้อสังเกตระหว่างการเพาะเลี้ยงในการทดลองส่วนที่ 4.1 และ 4.2 ที่พบจุลสาหร่ายตกตะกอนเมื่อปิดการให้อากาศและการกวนของเหลว รวมถึงจุลสาหร่ายบางส่วนเกาะติดกับผนังขวดเพาะเลี้ยง การทดลองนี้เลือกใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง 3 รูปแบบ ได้แก่ (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (Draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น (ภาพที่ 3.2) ซึ่งมีปริมาตรใช้งานเท่ากับ 4 ลิตร ทั้งหมดทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยระบบแบบแบตช์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสงที่ 100,000 ลักซ์ และปรับอัตราไหลของอากาศในช่วง 50 - 140 ลิตรต่อชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.14 ซึ่งแสดงค่าความขุ่น (OD) ของวัตถุในของเหลวที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลล์จุลสาหร่าย ดังนั้นค่าความขุ่นที่มีค่าสูงจะหมายถึง ปริมาณของจุลสาหร่ายที่สามารถฟุ้งกระจายในของเหลวได้ดี ผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (Draft tube) (ชนิด a) ช่วยให้เซลล์ฟุ้งกระจายในของเหลวได้ดีที่สุด จากกราฟจะเห็นได้ว่าที่อัตราไหลต่ำสุดของอากาศ (58 ลิตรต่อชั่วโมง) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก สามารถเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ให้ฟุ้งกระจายได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น ถึง 49 และ 63 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอัตราไหลของอากาศให้สูงขึ้น จะเห็นได้ว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก มีการฟุ้งกระจายของจุลสาหร่ายเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย โดยเมื่อควบคุมอัตราไหลของอากาศสูงสุดที่ 138 ลิตรต่อชั่วโมง จะมีการฟุ้งกระจายของจุลสาหร่ายมากกว่าที่อัตราไหลต่ำสุดเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ ในทางกลับกันถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น จะมีการฟุ้งกระจายของจุลสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มอัตราไหลของอากาศ โดยที่อัตราไหลของอากาศสูงสุดจะมีการฟุ้งกระจายของจุลสาหร่ายมากกว่าที่อัตราไหลต่ำสุด

ถึง 45 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้นจำเป็นต้องใช้อัตราไหลของอากาศที่สูงเพื่อให้จุลสาหร่ายฟุ้งกระจายได้ดี



ภาพที่ 4.14 การฟุ้งกระจายของเซลล์จุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง (a) Airlift Type I คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (Draft tube) (b) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ และ (c) Airlift Type II คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น

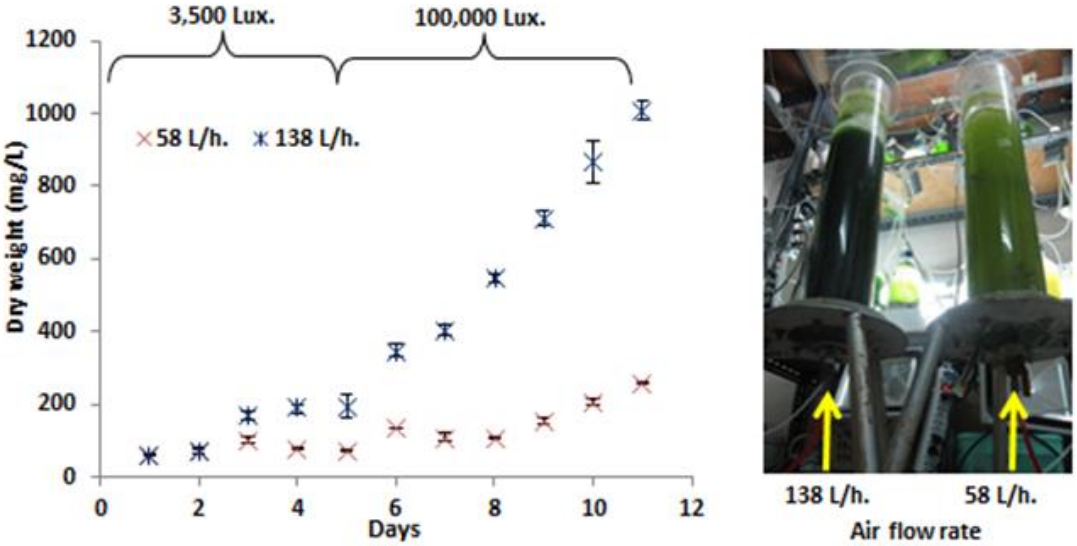
4.3.1 การเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ระหว่างการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

จากการทดลองเบื้องต้นซึ่งพบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (Draft tube) ซึ่งจะเรียกในส่วนต่อไปว่าถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก มีความเหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ดังนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ที่มีปริมาตรดำเนินการ 4 ลิตร ด้วยอาหารสูตร BG-11 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกด้วยอัตราไหลของอากาศต่ำสุดและสูงสุด (58 และ 138 ลิตรต่อชั่วโมง) ที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในช่วงเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงจะควบคุมความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ และเมื่อจุลสาหร่ายเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบคงที่ (Stationary Phase) จะปรับความเข้มแสงขึ้นเป็น 100,000 ลักซ์ ซึ่งเป็นสภาวะที่จุลสาหร่ายเกิดความเครียดและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุด ผลการทดลอง (ภาพที่ 4.15) พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายด้วยอัตราไหลของอากาศสูงสุด (138 ลิตรต่อชั่วโมง) ทำให้จุลสาหร่ายฟุ้งกระจายในของเหลวได้ดีและสามารถรับแสงได้อย่างทั่วถึง ส่งผลให้จุลสาหร่ายเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วซึ่งยืนยันได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นจาก 193 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์) ในวันที่ 5 เป็น 1,008 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 (ความเข้มแสง 100,000 ลักซ์) ขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยอัตราไหลต่ำสุด (58 ลิตรต่อชั่วโมง) พบว่าจุลสาหร่ายมีการฟุ้งกระจายในของเหลวได้ไม่ดีเท่ากับอัตราไหลสูงสุด เนื่องจากสังเกตพบจุลสาหร่ายส่วนหนึ่งได้จมตัวอยู่ที่ก้นถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ข้อสังเกตเกี่ยวกับการจมตัวของจุลสาหร่ายที่ก้นถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกมีความแตกต่างจากผลการทดลองเบื้องต้นที่รายงานในส่วนที่ 4.3.1 ที่ไม่พบการจมตัวของจุลสาหร่าย ผลที่ได้รับจากการทดลองนี้คาดว่าเป็นผลของการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ซึ่งทำให้จุลสาหร่ายสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ส่งผลให้เซลล์มีน้ำหนักมากขึ้นและการฟุ้งกระจายของเซลล์ที่อัตราไหลของอากาศ 58 ลิตรต่อชั่วโมง เกิดขึ้นได้ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองเบื้องต้น

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (ภาพที่ 4.16) พบว่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเซลล์จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อัตราไหลของอากาศ 58 ลิตรต่อชั่วโมง ทั้งช่วงก่อนการเพิ่มความเข้มแสง (วันที่ 1 - 5) และหลังเพิ่มความเข้มแสง ในวันที่ (วันที่ 6 – 11) โดยในวันที่ 11 พบว่าเมื่อควบคุมอัตราไหลของอากาศที่ 138 ลิตรต่อชั่วโมง จะได้รับความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์เท่ากับ 16.77 และ 5.54 มิลลิกรัมต่อลิตร (16.63 และ 5.49 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอัตราไหลของอากาศที่ 58 ลิตรต่อชั่วโมง ประมาณ 84 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่ได้รับมีค่ามากกว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์จากงานวิจัยของ Zhang et al., (1997), [12] ซึ่งรายงานความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ 5.0 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบท่อ (Tubular photobioreactor) ภายใต้สภาวะกลางแจ้ง

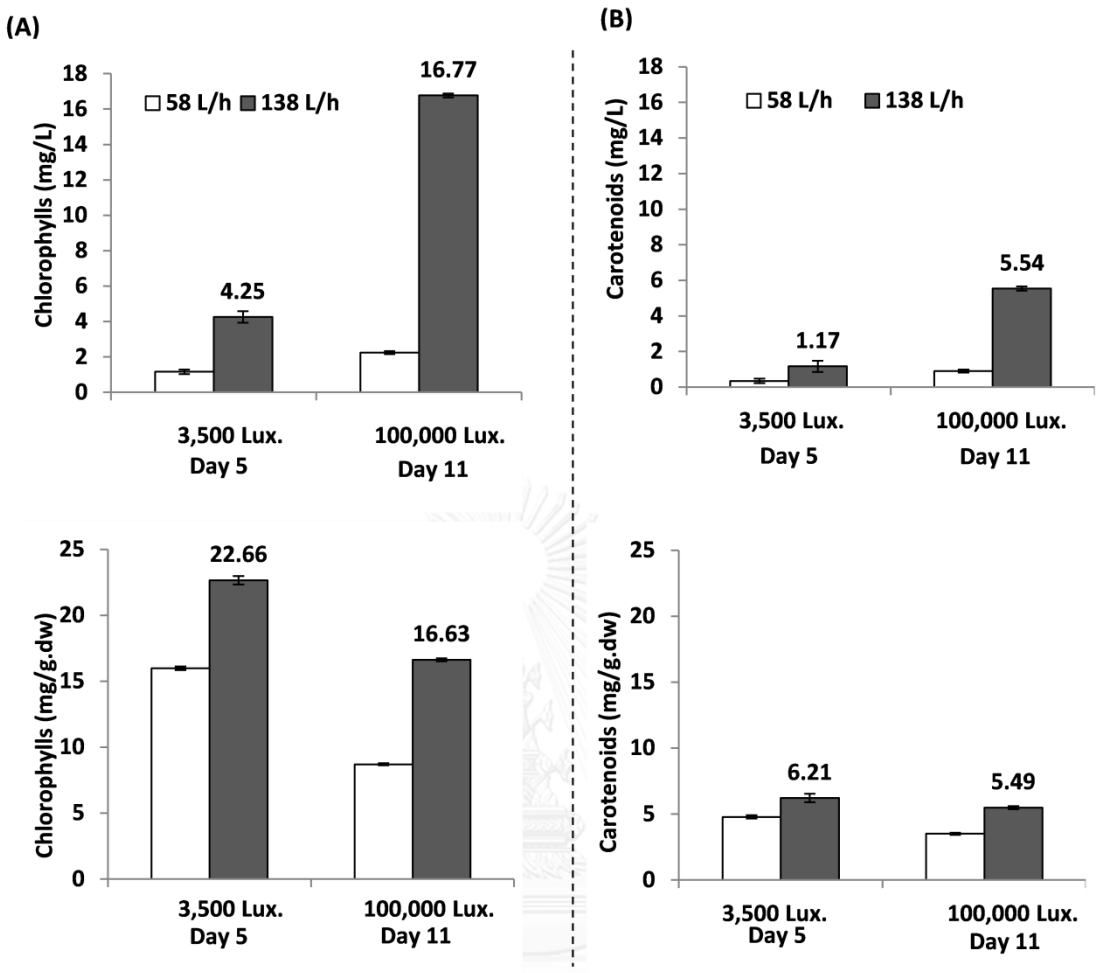
ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในรูปไนเตรทและฟอสเฟต ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก แสดงผลในภาพที่ 4.17 การเพาะเลี้ยงที่อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าจุลสาหร่ายมีการใช้ไนโตรเจนในการเติบโตและการสังเคราะห์แสง ซึ่งยืนยันได้จากความเข้มข้นของไนเตรทที่ลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องและการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของไนโตรเจนประมาณ 250 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในวันที่ 11 มีความเข้มข้นของไนโตรเจนคงเหลือ 161 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ลดลง 35 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 3.5 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร และลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งอยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ (< 0.7 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร) ในวันที่ 4 จนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง ในส่วนการเพาะเลี้ยงที่อัตราไหลของอากาศ 58 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่ามีการลดลงของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในรูปแบบเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง โดยปริมาณของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่ลดลงจะถูกใช้ในการเติบโตของจุลสาหร่ายร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลให้จุลสาหร่ายมีอัตราการสังเคราะห์แสงได้ดีขึ้นจึงเพิ่มความสามารถในการผลิตชีวมวล (Biomass productivity) และรงควัตถุเพิ่มสูงขึ้นด้วย [48, 49]

อย่างไรก็ตามการใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่าอัตราไหลของอากาศสูงจะช่วยเพิ่มโอกาสแก่จุลสาหร่ายในการรับแสงและส่งผลให้มีการเติบโตสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yee-Keung, [40] ที่เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. vulgaris* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงด้วยอัตราไหลอากาศ 12 -164 ลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งพบว่าการเพิ่มอัตราไหลอากาศมีผลให้การผลิตชีวมวลของจุลสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นจาก 0.04 เป็น 0.74 กรัมต่อลิตร



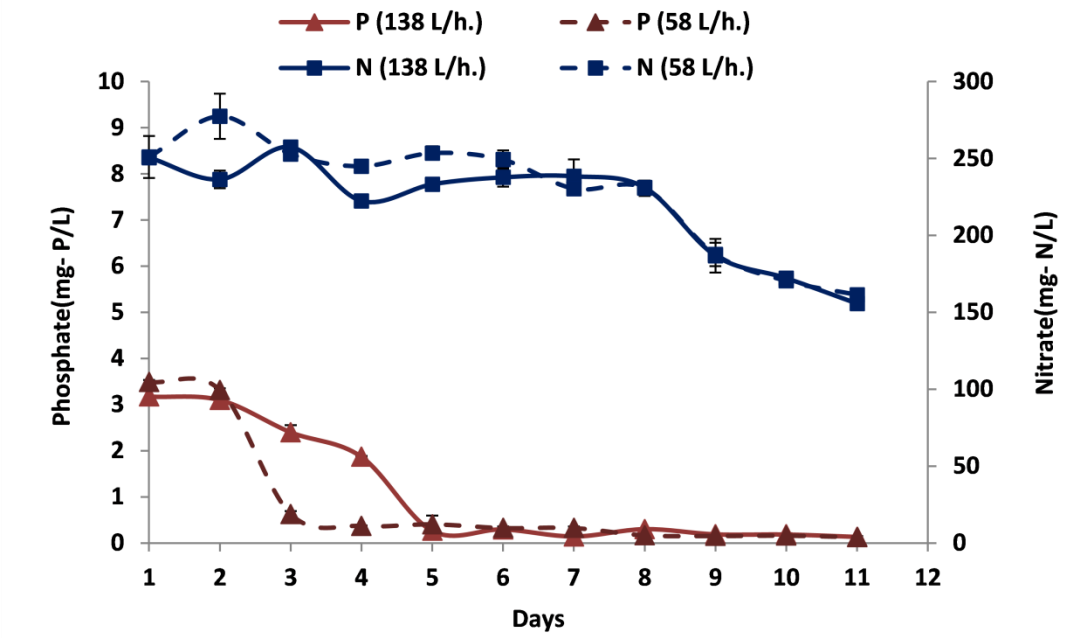
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 4.15 ผลของอัตราไหลของอากาศต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ด้วยอาหารสูตร BG-11 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 4.16 (A) ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (B) ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ จากเซลล์จุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่อัตราไหลของอากาศ 58 และ 138 ลิตรต่อชั่วโมง และเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร



ภาพที่ 4.17 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ในระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ด้วยอัตราไหลของอากาศ 58 และ 138 ลิตรต่อชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3.2 การเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

การทดลองในส่วนนี้จะนำรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงรวมถึงอัตราไหลของอากาศที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ได้ผลจากการทดลองที่ 4.3.1 มาเพาะเลี้ยงด้วยระบบแบบต่อเนื่อง ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ควบคุมอัตราการเจือจาง 0.35 ต่อวัน ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และอัตราไหลของอากาศที่ 138 ลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกมีค่าประมาณ 165

มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการตรวจวัดตัวแปรได้แก่ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงและเข้าสู่สภาวะคงตัวในวันที่ 3 ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปรที่ตรวจวัดได้อย่างมีนัยสำคัญในวันหลังจากนั้น ตารางที่ 4.1 แสดงค่าตัวแปรที่สภาวะคงตัวโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง (453 มิลลิกรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (5.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ (1.55 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในส่วนของอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ (Carotenoids Productivity) ซึ่งคำนวณได้จากผลคูณของอัตราการเจือจางและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่สภาวะคงตัว พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.54 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน จากตารางที่ 4.2 ซึ่งเปรียบเทียบอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างการเพาะเลี้ยงในระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ระบบต่อเนื่องที่ใช้งานขวดเพาะเลี้ยงที่เรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด และระบบแบบแบตช์ ซึ่งเปรียบเทียบโดยใช้ปริมาตรของเหลวที่เท่ากัน จะได้ข้อสรุปว่าการเพาะเลี้ยงในระบบต่อเนื่องมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานเพื่อให้ได้รับผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก ในระบบต่อเนื่องจะมีการป้อนสารอาหารเข้าและดึงผลิตภัณฑ์ออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพตลอดเวลาอย่างสมดุล ซึ่งทำให้สามารถควบคุมเซลล์ให้มีอัตราการเจริญจำเพาะอยู่ในระยะทวีคูณ (Exponential phase) ตลอดเวลา

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งและแคโรทีนอยด์ จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกกับการเพาะเลี้ยงด้วยขวด Duran ขนาด 2 ลิตร ที่วางเรียงกัน 5 ขวด พบว่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยขวด Duran ขนาด 2 ลิตร ที่วางเรียงกัน 5 ขวด มีค่าเท่ากับ 1.61 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกประมาณ 3 เท่า ซึ่งอาจเป็นเพราะถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกมีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงสูงและมีขนาดใหญ่กว่าขวด Duran จึงส่งผลให้จุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในขวด Duran ขนาด 2 ลิตร ที่วางเรียงกัน 5 ขวด ได้รับความเข้มแสงอย่างทั่วถึง ซึ่งจะนำไปสู่การเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น ข้อสังเกตที่คล้ายกันยังพบในงานของ Sriouam, P et al., (2007), [50] ที่พบว่าการใช้ถังปฏิกรณ์ขนาดเล็กและต่อกันแบบอนุกรมโดยเลี้ยงในระบบต่อเนื่องสามารถลดปัญหาการบังแสงจากตัวไดอะตอมได้ เนื่องจากไดอะตอมจะกระจายไปอยู่ในถังปฏิกรณ์แต่ละถังทำให้ความเข้มข้นในถังที่ 1 มีความเข้มข้นน้อยลง แสงส่องผ่านได้มากขึ้นส่งผลให้ไดอะตอมเจริญเติบโตได้มากขึ้นและในงานวิจัยของ

Krichnavaruk, S et al., (2005), [51] กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงไดอะตอมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่ต่ออนุกรมให้ผลผลิตที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ถึง 24.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Itcharoen, W et al., (2014), [52] ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. gracilis* แบบต่อเนื่องด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่ต่อกันแบบอนุกรมให้ผลผลิตของเซลล์มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม นอกจากนี้การลดลงของอัตราการผลิตเมื่อทำการขยายขนาดถังปฏิกรณ์มีรายงานอยู่ในงานวิจัยของ Timothy et al., (2011), [39] ซึ่งพบการลดลงของอัตราการผลิตเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะของ *C. vulgaris* เมื่อขยายขนาดถังปฏิกรณ์ที่เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. vulgaris*

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ และอัตราการผลิตที่สภาวะคงตัวของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ควบคุมอัตราเจือจางที่ 0.35 ต่อวัน ความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ และอัตราไหลของอากาศที่ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่ 138 ลิตรต่อชั่วโมง

วิเคราะห์	**ความเข้มข้น (mg/L)**	**Productivity (day^{-1})**
น้ำหนักเซลล์แห้ง	453	159
Chlorophylls	5.05	1.77
Carotenoids	1.55	0.54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ระหว่างการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบตช์ ระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ระบบต่อเนื่องในขวดเพาะเลี้ยงที่เรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด และจากงานวิจัยในอดีต

รูปแบบ	**ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง**	**สภาวะ**	**Productivity of Carotenoids (mg/L/day)**	
แบตช์[1]	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง แบบอากาศยก (ปริมาตร 4 ลิตร)	BG-11, 100,000 ลักซ์ 2%CO_2	0.13	
ต่อเนื่อง[1]	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง แบบอากาศยก (ปริมาตร 4 ลิตร)	D = 0.35 ต่อวัน BG-11, 100,000 ลักซ์ 2%CO_2	0.54	
ต่อเนื่อง[1]	ขวดเพาะเลี้ยง (Duran) ที่วางเรียงต่อกันจำนวน 5 ขวด (ปริมาตรรวม 10 ลิตร)	D = 0.35 ต่อวัน BG-11, 100,000 ลักซ์ 2%CO_2	1.61	
แบตช์[2]	ท่อ (Tubular) (ปริมาตร 50 ลิตร)	50% BG-11 (v/v) 0.2 M NaCl 150,000 ลักซ์ (กลางแจ้ง)	1.49	[32]
แบตช์[3]	ท่อ (Tubular)	Urea salt 10mM NH_4Cl 170,000 ลักซ์ (กลางแจ้ง)	3.0	[12]

[1] งานวิจัยนี้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยขวด (Duran) ที่วางเรียงต่อกันจำนวน 5 ขวดให้อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์สูงที่สุดเท่ากับ 1.61 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์มากกว่า [2] งานวิจัยของ Masojidek et al., (2000), [32] ถึง 7.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ต่ำกว่า [3] งานวิจัยของ Zhang et al., (1997), [12] โดย Masojidek เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่ปราศจากไนโตรเจนร่วมกับการเติม 0.2 M NaCl ที่สภาวะกลางแจ้ง ในขณะที่ Zhang เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยอาหารที่มีความเข้มข้น 10 mM NH_4Cl และเพาะเลี้ยงที่สภาวะกลางแจ้ง (170,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 25 – 45 องศาเซลเซียส (ตอนกลางวัน – ตอนกลางคืน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งหวังเพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบต่อเนื่อง เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ โดยเน้นสภาวะแวดล้อมที่นำไปสู่การสะสมแคโรทีนอยด์ (ตารางที่ 5.1) และการศึกษาเบื้องต้นถึงรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่เหมาะแก่การใช้งานและประเมินการใช้งานเบื้องต้น ผลการทดลองสามารถสรุปได้ ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบแบบแบตช์ด้วยขวด Duran ปริมาตร 2 ลิตร ด้วยอาหารสูตร BG-11 ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 15 วัน ได้รับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.36 ต่อวัน และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 556 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารยังพบว่า อาหารสูตร BG-11 มีปริมาณไนเตรทมากเกินความต้องการของจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงที่ระบุในข้างต้น

2. การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบต่อเนื่อง ซึ่งใช้งานขวดแก้ว Duran ขนาด 2 ลิตร จำนวน 5 ขวด วางเรียงต่อกัน โดยควบคุมอัตราเจือจางที่ 0.35 ต่อวัน ซึ่งน้อยกว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ได้รับในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ พบว่าการเพิ่มความเข้มแสงจาก 3,500 ลักซ์ ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3 เป็น 100,000 ลักซ์ ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 4 - 5 จะทำให้ชีวมวลของจุลสาหร่ายในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 440 - 854 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มจาก 1.6 – 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เพิ่มจาก 0.63 – 1.62 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากการเพิ่มความเข้มแสงยังพบว่าการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนซึ่งทำได้โดยลดปริมาณ $NaNO_3$ ในอาหารสูตร BG-11 ลง 20 เท่า จะทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 396 – 722 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มจาก 1.58 – 3.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เพิ่มจาก 0.68 – 2.84 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สามารถช่วยเพิ่มการสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C. humicola* นอกเหนือจากการเพิ่มความเข้มแสงและสภาวะขาดธาตุอาหารไนโตรเจน พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่ายก็ต่อเมื่อในระบบเพาะเลี้ยงมีธาตุอาหารไนโตรเจนในรูปไนเตรทที่เพียงพอ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในระบบต่อเนื่องที่ใช้งานขวด Duran จำนวน 5 ขวด มาเรียงต่อกัน โดยควบคุมอัตราการเจือจางที่ 0.35 ต่อวัน ความเข้มแสงที่ 3,500 ลักซ์ ในขวดเพาะเลี้ยงที่ 1 - 3 และความเข้มแสงที่ 100,000 ลักซ์ ในขวดที่ 4 - 5 ผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนจากการใช้อากาศมาเป็นอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จะช่วยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มจาก 1,038 – 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร คลอโรฟิลล์เพิ่มจาก 3.2 – 13.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคโรทีนอยด์เพิ่มจาก 1.6 – 4.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้งานอาหารสูตร BG-11 ปกติที่ไม่มีการลดปริมาณ $NaNO_3$

4. ผลการศึกษาเบื้องต้นในการเลือกรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ใช้ความสามารถในการฟุ้งกระจายของจุลสาหร่ายในของเหลวในถังปฏิกรณ์ ผลการทดลองพบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยก (Draft tube) อยู่ภายใน (Airlift Photobioreactor with Internal Draft Tube) มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Bubble Column Photobioreactor) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีแผ่นกั้น (Airlift Photobioreactor with Baffle) เมื่อนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ได้รับการ คัดเลือกมาทดสอบโดยเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบตช์ โดยใช้อาหารสูตร BG-11 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ พบว่าการควบคุมอัตราไหลของอากาศที่ 138 ลิตรต่อชั่วโมง มีการฟุ้งกระจายของเซลล์ในของเหลวที่ดีและเซลล์ตกตะกอนน้อย และให้น้ำหนักเซลล์แห้ง (1,008 มิลลิกรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (16.7 มิลลิกรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ (5.54 มิลลิกรัมต่อลิตร) มากที่สุด

5. ในส่วนสุดท้ายของงานวิจัยได้นำผลการทดลองในข้างต้นคือ ใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีท่ออากาศยกอยู่ภายในมาเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่อง โดยใช้อาหารสูตร BG-11 อัตราการเจือจางที่ 0.35 ต่อวัน ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ ผลการทดลองพบว่า ที่สภาวะคงตัวจุลสาหร่ายให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 453 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 1.55 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์เท่ากับ 0.54 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน อัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ในระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มี ดราฟท์ทูปอยู่ภายใน มีค่ามากกว่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์แบบแบตช์ 4 เท่า แต่น้อยกว่าอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์แบบต่อเนื่องในขวด Duran ขนาด 2 ลิตร จำนวน 5 ขวด ประมาณ 3 เท่า ซึ่งเป็นผลจากการขยายขนาดถังปฏิกรณ์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น จึงมีผลต่อพื้นที่การรับแสงและส่งผลต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย

ตารางที่ 5.1 สรุปสภาวะแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง ธาตุอาหารไนโตรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola*

ระบบ	สภาวะ	ความเข้มแสง (ลักซ์)	Productivity of D.W. (mg/L/day)	Productivity of Carotenoids (mg/L/day)
แบบแบตช์ ขวด Duran 2 ลิตร	BG-11	3,500	40	-
แบบต่อเนื่อง ขวด Duran 5×2 ลิตร (ปริมาตรรวม 10 ลิตร)	BG-11	3,500	154	0.22
		50,000	214	0.49
		100,000	299	0.57
	BG-11 2% CO_2 (v/v)	100,000	438	1.61

ตารางที่ 5.1 (ต่อ) สรุปสภาวะแวดล้อมได้แก่ ความเข้มแสง ธาตุอาหารไนโตรเจน และก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola*

ระบบ	สภาวะ	ความเข้มแสง (ลักซ์)	Productivity of D.W. (mg/L/day)	Productivity of Carotenoids (mg/L/day)
แบบต่อเนื่อง ขวด Duran 5×2 ลิตร (ปริมาตรรวม 10 ลิตร)	BG-11 (5%NaNO3)	3,500	139	0.24
		50,000	223	0.56
		100,000	253	0.99
	BG-11 (5%$NaNO_3$) 2% CO_2 (v/v)	100,000	129	0.32
แบบแบตช์ด้วยถังปฏิกรณ์อากาศยก (ปริมาตร 4 ลิตร)	BG-11 2% CO_2 (v/v)	100,000	23	0.13
แบบต่อเนื่อด้วยถังปฏิกรณ์อากาศยก (ปริมาตร 4 ลิตร)	BG-11 2% CO_2 (v/v)	100,000	163	0.56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* จะพบปัญหาการจมตัวของเซลล์จุลสาหร่ายที่ก้นถังปฏิกรณ์ชีวภาพหรือเกาะบนผนังของถังปฏิกรณ์ เมื่อปิดระบบผสมของเหลวหรือมีอัตราไหลของอากาศไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีอุปกรณ์เสริมหรือศึกษารูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ช่วยให้เกิดการไหลวนของน้ำอย่างเพียงพอ เพื่อช่วยให้จุลสาหร่ายฟุ้งกระจายรับแสงและสารอาหารได้เต็มที่ นอกจากนี้อาจทำการศึกษาถึงประเภทของวัสดุที่เหมาะสมสำหรับใช้สร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง โดยวัสดุที่เหมาะสมต้องสามารถให้แสงผ่านได้ดี ทนทาน ราคาถูก และลดการเกาะติดของจุลสาหร่าย

2. จากคุณสมบัติของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ตกตะกอนได้ง่ายและมีน้ำหนักเซลล์ค่อนข้างมาก จึงทำให้มีความเป็นไปได้ในการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่ทำหน้าที่เพาะเลี้ยงเซลล์และแยกเซลล์ออกจากของเหลวได้ภายในหนึ่งหน่วยปฏิบัติการ ซึ่งหากประสบผลสำเร็จจะทำให้ระบบเพาะเลี้ยงและแยกเซลล์มีขนาดเล็กลงและประหยัดค่าใช้จ่ายได้

3. จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ใช้งานขวด Duran จำนวน 5 ขวด มาเรียงต่อกัน สามารถปรับอัตราการเจือจางในขวดเพาะเลี้ยงที่ 5 ได้โดยการปรับขนาดของขวดให้ใหญ่ขึ้นหรือเปลี่ยนรูปแบบของขวดให้เป็นถังปฏิกรณ์แบบแผ่นแบน เพื่อให้เซลล์จุลสาหร่ายภายในระบบได้รับแสงอย่างทั่วถึง ลดการบดบังแสงกันเองของเซลล์และช่วยให้เซลล์เกิดภาวะความเครียดมากขึ้นซึ่งจะมีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

4. จากการวิเคราะห์ไนเตรทของระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบแบตช์และแบบต่อเนื่องพบว่ามีปริมาณไนเตรทคงเหลืออยู่ในระบบเพาะเลี้ยงปริมาณมาก ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียสารเคมีที่มีราคาแพงไปกับสายขาออกของถังปฏิกรณ์โดยไม่จำเป็น ดังนั้นจึงควรศึกษาการปรับลดปริมาณไนเตรทในสูตรอาหารเพื่อลดการสูญเสีย ซึ่งการลดปริมาณไนโตรเจนจะเป็นประโยชน์ต่อการการผลิตและสะสมแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C. humicola* เช่นกัน

รายการอ้างอิง

[1] Johnson, E.J. The role of carotenoids in human health: Nutrition clinical care. Human Nutrition Research 5(2) (2002): 56-65.

[2] Eldahshan, O.A. and Singab, A.N.B. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Carotenoids. Inorganic Chemistry Journal 2(1) (2013): 225-234.

[3] García-Chavarría, M. and Lara-Flores, M. The use of carotenoid in aquaculture. Research Journal of Fisheries and Hydrobiology 8(2) (2013): 38-49.

[4] Karadas. Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. British Poultry Science 45 (2006): 561-566.

[5] Johnson, E.A. and Lewis, M.J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma.* Journal of General Microbiology 115(1) (1979): 173-183.

[6] ยุวดี พีรพรพิศาล. สาหร่ายวิทยา (Phycology). 1 ed, ed. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ภ.ค., 2546.

[7] Jens, S. and Hartmut, L. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. Plant Molecular Biology 52 (2003): 343-356.

[8] Barbosa, M.J., Janssen, M., Ham, N., Tramper, J., and Wijffels, R.H. Microalgae cultivation in air-lift reactors: Modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. Biotechnology and bioengineering 82(2) (2003): 170-179.

[9] Campo, J.A.D., Moreno, J., Rodrı´guez, H., Vargas, M.A., Rivas, J.n., and Guerrero, M.G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis sp*. (*Chlorophyta*). Journal of Biotechnology 76 (2000): 51-59.

[10] Borowitzka, M.A., Huisman, J.M., and Osborn, A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type. Journal of Applied Phycology 3(4) (1991): 295-304.

[11] Zhang, D. and Lee, Y. Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, *Chlorococcum sp.* Journal of Applied Phycology 9(5) (1997): 459-463.

[12] Zhang, D.H., Lee, Y.K., Ng, M.L., and Phang, S.M. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum sp*. Journal of Applied Phycology 9 (1997): 147-155.

[13] Leya, T., Rahn, A., tz, C.L., and Remias, D. Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment compositionand applied aspects for biotechnology. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 67 (2009): 432-443.

[14] Candreva, P. Use of the brine shrimp, *Artemia spp*., in marine fish larviculture. Aquaculture (1-2) (2001).

[15] Wipavee Dararat, Khomsorn, L., and La-Orsri, S. Biochemical Composition of Three Species of Fairy Shrimp (*Branchiopoda:Anostraca*) from Thailand. Journal of Crustacean Biology 32 (2012): 81-87.

[16] Gupta, S.K., Jha, A.K., Pal, A.K., and Venkateshwarlu, G. Use of natural carotenoids for pigmentation in fishes. Natural product Radiance 6 (2006): 46-49.

[17] John Tiftickjian. Division Chlorophyta - Green Algae 2006. Available from: http://doctortee.com/dsu/tiftickjian/nvp/chlorophyta.html

[18] Bhagavathy, S., Sumathi, P., and Bell, I.J.S. Green algae *Chlorococcum* humicola-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1(1) (2011): S1-S7.

[19] Bhagavathy, S. and Sumathi, P. Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. Biomedicine & Preventive Nutrition 2 (2012): 276-282.

[20] Zhang, D.H. and Lee, Y.K. Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum sp.* strain MA-1. Applied Microbiol Biotechnol 55 (2001): 537-540.

[21] Lee, Y.K. and Soh, C.W. Accumulation of Astaxanthin in *Haematococcus* Lacustris (Chlorophyta). Journal of phycology 27(5) (1991): 575-577.

[22] Fan, L., Vonshak, A., and Boussiba, S. Effect of Temperature and Irradiance on Growth of *Haematococcus Pluvialis* (*Chlorophyceae*). Journal of phycology 30(5) (1994): 829-833.

[23] Chaumont, D. and Thépenier, C. Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. Journal of Applied Phycology 7(6) (1995): 529-537.

[24] Dipak, P. and Lele, S. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina.* Indian Journal of Biotechnology 4(8) (2005): 476-483.

[25] Campenni, L., et al. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella* protothecoides under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. Applied microbiology and biotechnology 97(3) (2013): 1383-1393.

[26] Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., and Zhou, B.-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris.* Bioresource Technology 99(11) (2008): 4717-4722.

[27] Klochkova, T.A., Kang, S.-H., Cho, G.Y., Pueschel, C.M., West, J.A., and Kim, G.H. Biology of terrestrial green alga, *Chlorococcum sp*. (*Chlorococcales*, *Chlorophyta*), collected from the Miruksazi stupa in korea. Phycologia 45(3) (2006): 349-358.

[28] Thomas, B.T. Ecology and biodiversity of soil algae of Pathanamthitta district Kerala. St. Berchmans College Mahatma Gandhi University, 2014.

[29] Fátima Santos, M. and Mesquita, J. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (*Girod*.) *Rostafinski* (*Volvocales*). Some aspects of carotenogenesis. Cytologia 49(1) (1984): 215-228.

[30] Hagen, C., Braune, W., and Greulich, F. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (*Girod*) *Rostafinski* (*Volvocales*) IV. Protection from photodynamic damage. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 20(2) (1993): 153-160.

[31] Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., and Arad, S.M. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. Journal of plant physiology 146(4) (1995): 527-534.

[32] Masoj´ıdek, J., et al. Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum sp.* grown under nitrogen deficiency and salinity stress. Journal of Applied Phycology 12 (2000): 417-426.

[33] Zhao, B. and Su, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 31 (2014): 121-132.

[34] Feng, P., Deng, Z., Huc, Z., Wang, Z., and Fan, L. Characterization of *Chlorococcum pamirum* as a potential biodiesel feedstock. Bioresource Technology 162 (2014): 115-122.

[35] Pingzhong Feng, Zhongyang Deng, Zhengyu Hua, and Lu Fan. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. Bioresource Technology 102 (2011): 10577–10584.

[36] Karemore, A., Pal, R., and Sen, R. Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusionum* as bioenergy feedstock. Algal Research 2 (2013): 113-121.

[37] Stanbury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S.J. Principles of fermentation technology. Elsevier, 2013.

[38] Lee, J.M. Biochemical engineering. Prentice Hall Englewood Cliffs, NJ, 1992.

[39] Timothy, A.a.F., D. F. . Optimissing the delivery of energy (for mixing and mass transfer) and light to algal photobioreactors. Centre for Bioprocess Engineering Research Department of Chemical Engineering University of cape town, 2011.

[40] Yee-keung, W. and Kin-chung, H. Optimization for cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* and lipid production in photobioreactor.

[41] Hoekema, S., Bijmans, M., Janssen, M., Tramper, J., and Wijffels, R.H. A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. International Journal of Hydrogen Energy 27(11) (2002): 1331-1338.

[42] Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R., and Richmond, A. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.*(*Eustigmatophyceae*). Aquaculture 195(1) (2001): 35-49.

[43] Issarapayup, K., Powtongsook, S., and Pavasant, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis.* Journal of Biotechnology 142(3) (2009): 227-232.

[44] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *cyanobacteria.* Journal of General Microbiology 111(1) (1979): 1-61.

[45] APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Maryland: Victor Graphics, 1992. ed.

[46] Strickland, J.D.H., and Pasons, T. R. . A Practical Handbook of Water Analysis. 2nd edition Otawa: Fishery Research Board of Canada ed., 1972.

[47] Schroeder, W.A. and Johnson, E.A. Singlet oxygen and peroxyl radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma.* Journal of Biological Chemistry 270 (1995): 18374-18379.

[48] ลัดดา วงศ์รัตน์. แพลงก์ตอนพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. Vol. พิมพ์ครั้งที่ 2, 2544.

[49] ฤทัยรัตน์ วิศาลสุวรรณกร. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของสาหร่าย Chlorella sp. โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, , 2548.

[50] Sriouam, P. Debottlenecking of the airlift cultivation process for *Chaetoceros calcitrans*. Master's Degree, Chulalongkorn University, 2007.

[51] Krichnavaruk, S. Scaleup of an Airlift Bioreactor for Cultivation of Diatom "*Chaetoceros Calcitrans*". Ph.D. Science Chemical Engineering Chulalongkorn University, 2005

[52] Ritcharoen, W., Sriouam, P., Nakseedee, P., Sang, P., Powtongsook, S., Kungvansaicho., K. and Pavasant P. . Cultivation options for indoor and outdoor growth of *Chaetoceros gracilis* with airlift photobioreactors. . Maejo International Journal of Science and Technology (2014): 100-113.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry weight)

APHA, (1992)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. กระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร
3. ตู้อบ
4. Vacuum dessicator

วิธีการ

1. นำกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ และเก็บไว้ที่ Vacuum dessicator
2. เก็บของเหลวตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ
3. กรองของเหลวตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบจากข้อ 1
4. ล้างเซลล์จุลสาหร่ายบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น
5. นำกระดาษกรองที่ผ่านการกรองตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักของตัวอย่างคงที่
6. นำค่าน้ำหนักตัวอย่างที่วัดได้ลบกับค่าน้ำหนักของกระดาษกรองเริ่มต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

Strickland and Parsons et al., (1972)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. UV-Vis Spectrophotometer
2. เครื่อง Centrifuge
3. เครื่อง Vortex
4. สารละลาย 90% Acetone
5. แท่งแก้วบดสาร
6. กระดาษ Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร
7. ชุดเครื่องแก้วทดลอง

วิธีการวิเคราะห์

1. เก็บของเหลวตัวอย่างจากการทดลอง
2. นำของเหลวตัวอย่างมา Centrifuge เพื่อแยกชั้นของน้ำอาหารและเซลล์จุลสาหร่าย
3. ดูดน้ำอาหารออกจากเซลล์จุลสาหร่ายให้หมด
4. บดเซลล์ด้วยแท่งแก้วเพื่อให้เซลล์แตก
5. เติมสารละลาย 90% Acetone ลงในหลอดการทดลองด้วยอัตราส่วนที่เท่ากับปริมาตรของของเหลวตัวอย่างที่เก็บมา
6. นำไป Centrifuge ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และ Vortex ที่ 5000 rpm อีก 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง
7. เก็บตัวอย่างข้ามคืนในที่เย็นและห้ามโดนแสง
8. นำตัวอย่างที่เก็บข้ามคืนมา Centrifuge ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และ Vortex ที่ 5000 rpm อีก 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

9. นำสารละลายส่วนที่ใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ช่วงความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง

1. คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) ช่วงความยาวคลื่น 630-645 นาโนเมตร
2. แคโรทีนอยด์ (Total carotenoids) ช่วงความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

วิธีการคำนวณ

Chlorophyll A; $\frac{\mu g}{10 ml}$ = (11.6*E_{665})-(1.31*E_{645})-(0.014*E_{630}); $\frac{\text{exac vol.}(\text{ml})}{\text{Cuvette width}(\text{cm})}$ Total carotenoids; $\frac{\mu g}{10 ml}$ = (4*E_{480}); $\frac{\text{exac vol.}(\text{ml})}{\text{Cuvette width}(\text{cm})}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและฟอสเฟตในอาหาร BG-11

APHA, (1992) และ Strickland and Parsons et al., (1972)

อุปกรณ์สารเคมี

1. UV-Vis Spectrophotometer
2. เครื่อง Vortex
3. กระดาษ Whatman GF/C ขนาด 47มิลลิเมตร
4. ชุดเครื่องแก้วทดลอง
5. Ammonium molybdate: $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
6. Sulfuric Acid: H_2SO_4
7. Ascorbic Acid
8. Potassium antimony tartrate: $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 1/2H_2O$

วิธีการเตรียมสารละลายรีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. Ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)
   - ละลาย Ammonium molybdate 15 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกทึบแสง)
2. Sulfuric Acid (H_2SO_4):
   - เติม Sulfuric Acid 140 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดแก้วและเก็บไว้ในที่เย็น)
3. Ascorbic Acid:
   - ละลาย Ascorbic Acid (AR grade) 27 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกและเก็บไว้ในที่เย็น)

4. Potassium antimony tartrate solution:
    - ละลาย Potassium antimony tartrate 0.34 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกหรือขวดแก้ว)
5. Mixed reagent
    - นำสารที่เตรียมในข้อ 1-4 มาผสมกันโดยเรียงลำดับดังนี้ Ammonium molybdate solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร Sulfuric Acid solution ปริมาตร 250 มิลลิลิตร Ascorbic Acid solution ปริมาตรา 100 มิลลิลิตร Potassium antimony tartrate solution ปริมาตรา 50 มิลลิลิตร

    หมายเหตุ: ควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้ง และไม่สามารถเก็บสารได้นานเกิน 6 ชั่วโมง ปริมาตรดังกล่าวนี้สามารถใช้ได้กับตัวอย่างน้ำจำนวน 50 ตัวอย่าง

สร้างค่ามาตรฐาน (Standard) ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต

1. เตรียมความเข้มข้นของสารละลายไนเตรท 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. เตรียมความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต 0.2, 0.4, 0.6, 1.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. นำสารทั้งสองชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยไนเตรทวัดช่วงความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร ฟอสเฟตวัดช่วงความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร
4. สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของไนเตรทและฟอสเฟตให้ได้ค่า

วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. เก็บของเหลวตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. นำของเหลวตัวอย่างกระดาษ Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร
3. นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของไนเตรทแล้วฟอสเฟต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ขั้นตอนการวิเคราะห์ไนเตรท

1. Dilute สารละลายตัวอย่าง 50 เท่า
2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร
3. คำนวณผลที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

ขั้นตอนการวิเคราะห์ฟอสเฟต

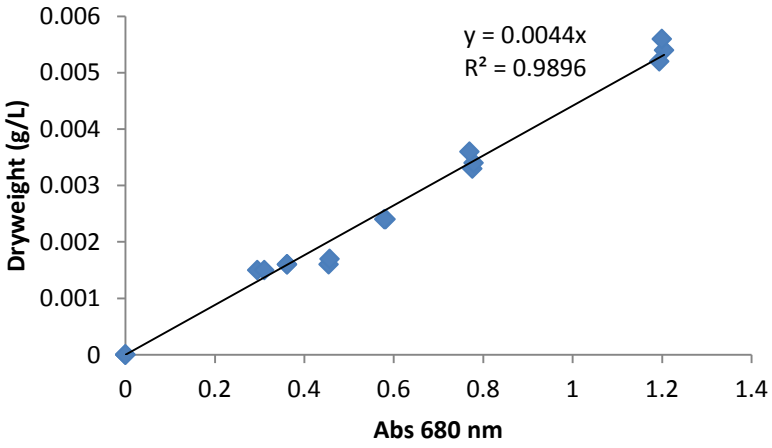
1. เก็บของเหลวตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. นำของเหลวตัวอย่างกระดาษ Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร
3. เติมรีเอเจนต์ลงในน้ำตัวอย่างด้วยอัตราส่วนของรีเอเจนต์ต่อปริมาณน้ำตัวอย่าง 1:10
4. ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Vortex
5. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร
7. คำนวณผลที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง

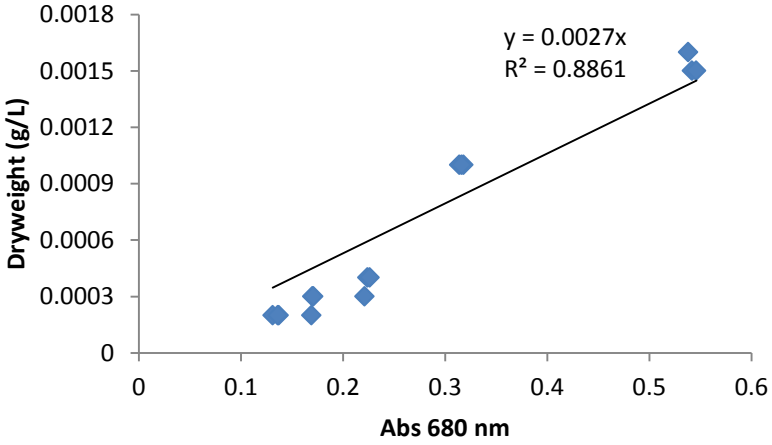
การติดตามผลการทดลอง

1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola*

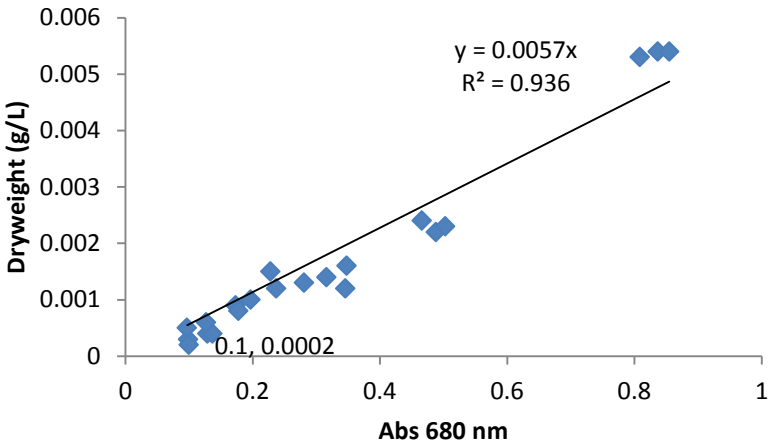


ภาพที่ ง-1 กราฟมาตรฐานการเติบโตของจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร 100% $NaNO_3$ ของอาหาร BG-11

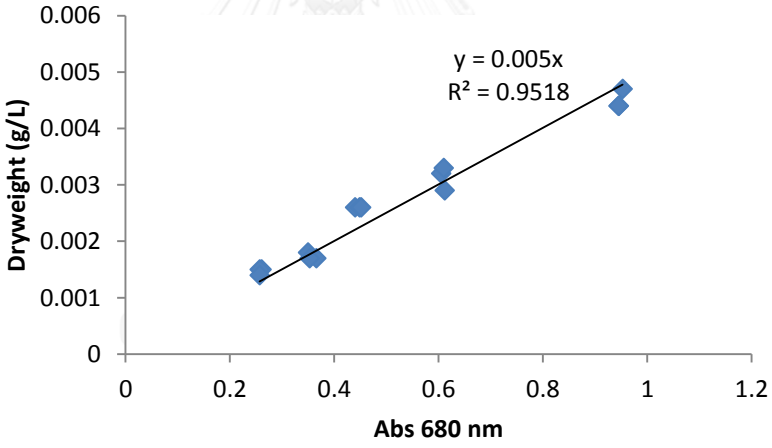
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ ง-2 กราฟมาตรฐานการเติบโตของจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร 5% $NaNO_3$ ของอาหาร BG-11



ภาพที่ ง-3 กราฟมาตรฐานการเติบโตของจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร



ภาพที่ ง-4 กราฟมาตรฐานการเติบโตของจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร 5% $NaNO_3$ ของอาหาร BG-11 และเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

2. การคำนวณอัตราการเติบโตของจุลสาหร่าย

เมื่อทราบความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง สามารถคำนวณอัตราการเติบโตของจุลสาหร่ายได้จากสมการ

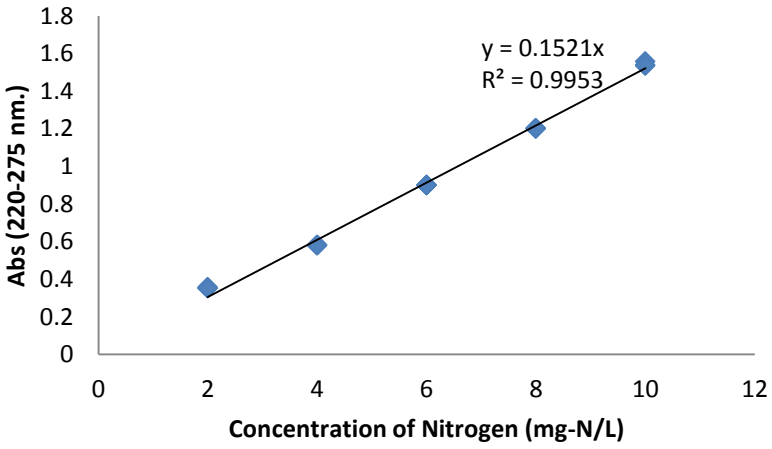
$$\mu = \frac{(ln\ X_2 - lnX_1)}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

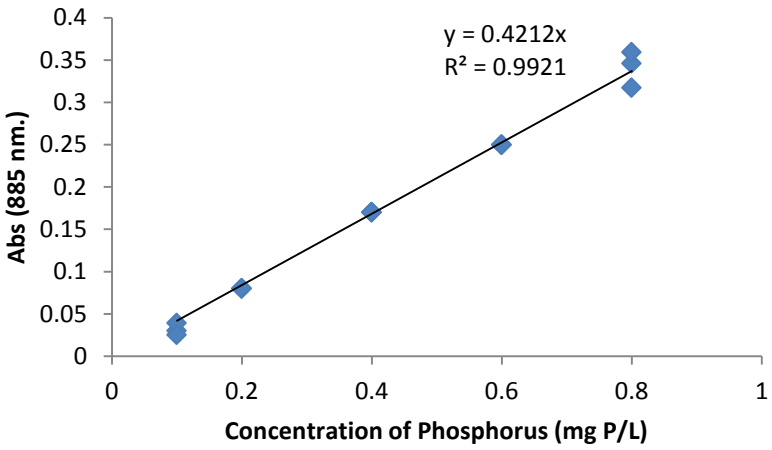
X_1 คือ ความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่าย ณ เวลา t_1 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

X_2 คือ ความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่าย ณ เวลา t_2 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

3. ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน



ภาพที่ ง-5 กราฟมาตรฐานสารละลายไนเตรทที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร



ภาพที่ ง-5 กราฟมาตรฐานสารละลายฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมฟอสฟอรัสต่อลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก จ

ผลการศึกษาการเติบโตของจุลสาหร่ายโดยวิเคราะห์จากน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ จ-1 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.1

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/L)			ค่าเฉลี่ย (mg/L)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
17/04/2557	65.46	70.14	62.79	66.13±3.72
18/04/2557	80.16	86.17	84.84	83.72±3.16
19/04/2557	118.90	125.58	114.90	119.79±5.40
20/04/2557	156.98	150.97	161.66	156.53±5.36
21/04/2557	256.51	233.80	243.82	244.71±11.38
22/04/2557	311.29	259.18	277.22	282.56±26.46
23/04/2557	350.70	356.04	334.67	347.14±11.12
24/04/2557	341.35	346.69	349.36	345.80±4.08
25/04/2557	373.41	344.02	357.38	358.27±14.72
26/04/2557	395.46	408.82	390.78	398.35±9.36
27/04/2557	455.58	422.84	414.83	431.08±21.59
28/04/2557	475.62	490.31	459.58	475.17±15.37
29/04/2557	550.43	545.76	523.04	539.74±14.65
30/04/2557	577.15	551.10	541.75	556.67±18.35
31/04/2557	557.78	581.83	527.05	555.55±27.46

ตารางที่ จ-2 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อ เนื่อง อาหารสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		**ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)**
21/5/57	ซ้ำ 1	64.67	160.30	394.91	558.66	644.66
	ซ้ำ 2	70.18	171.31	410.05	589.62	663.92
	ซ้ำ 3	69.49	158.24	412.80	560.72	650.16
	ค่าเฉลี่ย	68.11±3.0	163.29±7.0	405.92±9.6	569.66±17.3	652.91±9.9
22/5/57	ซ้ำ 1	72.93	168.56	383.90	585.49	582.74
	ซ้ำ 2	68.80	177.50	395.60	573.10	601.31
	ซ้ำ 3	68.11	176.13	372.90	617.14	573.10
	ค่าเฉลี่ย	69.95±2.60	174.06±4.8	384.13±11	591.91±22.7	585.72±14.3
23/5/57	ซ้ำ 1	64.67	132.10	405.23	622.64	610.94
	ซ้ำ 2	72.24	178.19	419.68	625.39	593.74
	ซ้ำ 3	70.18	170.62	403.86	635.02	599.25
	ค่าเฉลี่ย	69.03±3.91	160.30±24.7	409.59±8.7	627.69±6.50	601.31±8.78
26/5/57	ซ้ำ 1	71.55	130.03	396.98	531.14	597.87
	ซ้ำ 2	71.55	138.98	381.84	554.53	597.87
	ซ้ำ 3	75.68	132.78	391.47	562.78	570.35
	ค่าเฉลี่ย	72.93±2.38	133.93±4.58	390.10±7.6	549.48±16.4	588.70±15.9

ตารางที่ จ-3 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อ เนื่อง อาหารสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสง 50,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		**ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)**
11/4/57	ซ้ำ 1	74.99	174.06	388.03	421.06	434.13
	ซ้ำ 2	70.18	171.31	403.86	431.38	432.06
	ซ้ำ 3	69.49	167.18	396.70	443.76	429.31
	ค่าเฉลี่ย	71.55±3.0	170.85±3.5	396.20±7.9	432.06±11	431.83±2.4
12/4/57	ซ้ำ 1	79.81	161.68	363.26	363.26	448.58
	ซ้ำ 2	68.80	159.62	352.26	376.34	445.14
	ซ้ำ 3	68.11	162.37	355.01	368.77	434.13
	ค่าเฉลี่ย	72.24±6.6	161.22±1.4	356.84±5.7	369.46±6.6	442.61±7.5
14/4/57	ซ้ำ 1	74.99	153.42	332.99	414.18	429.31
	ซ้ำ 2	72.24	171.31	317.86	421.74	434.13
	ซ้ำ 3	70.18	167.87	328.18	429.31	430.69
	ค่าเฉลี่ย	72.47±2.4	164.20±9.5	326.34±7.7	421.74±7.6	431.38±2.6
15/4/57	ซ้ำ 1	74.99	126.59	291.71	350.19	434.13
	ซ้ำ 2	66.05	129.34	296.53	352.26	429.31
	ซ้ำ 3	72.93	131.41	293.78	348.82	445.14
	ค่าเฉลี่ย	71.32±4.7	129.11±2.4	294.01±2.4	350.42±1.7	436.19±8.1

ตารางที่ จ-4 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		**ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)**
16/7/57	ซ้ำ 1	71.55	126.59	231.17	615.07	859.31
	ซ้ำ 2	94.26	125.22	227.04	619.20	848.30
	ซ้ำ 3	94.26	126.59	231.17	619.20	848.30
	ค่าเฉลี่ย	86.69±13.1	126.13±0.8	229.79±2.4	617.82±2.4	851.97±6.4
18/7/57	ซ้ำ 1	91.50	255.94	362.58	777.44	824.22
	ซ้ำ 2	86.69	264.88	377.71	787.07	804.27
	ซ้ำ 3	86.69	255.94	377.71	777.44	804.27
	ค่าเฉลี่ย	88.29±2.8	258.92±5.2	372.67±8.7	780.65±5.6	810.92±11.5
19/7/57	ซ้ำ 1	99.76	246.30	434.13	766.43	774.00
	ซ้ำ 2	104.58	241.49	414.18	837.98	850.37
	ซ้ำ 3	98.38	246.30	420.37	699.01	837.98
	ค่าเฉลี่ย	100.91±3.3	244.70±2.8	422.89±10	767.81±69.5	820.78±40.9
20/7/57	ซ้ำ 1	91.50	255.94	444.45	777.44	824.22
	ซ้ำ 2	86.69	264.88	432.75	787.07	804.27
	ซ้ำ 3	86.69	255.94	432.75	777.44	804.27
	ค่าเฉลี่ย	88.29±2.78	258.92±5.1	436.65±6.8	780.65±5.56	810.92±11.5

ตารางที่ จ-5 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ควบคุมความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)
16/6/57	ซ้ำ 1	85.26	134.56	320.74	306.24	354.96
	ซ้ำ 2	88.74	133.98	323.64	307.40	358.44
	ซ้ำ 3	83.52	144.42	331.18	319.00	350.32
	ค่าเฉลี่ย	85.84±2.6	137.65±5.8	325.19±5.4	310.88±7.1	354.57±4.1
18/6/57	ซ้ำ 1	48.14	82.36	256.94	256.94	366.56
	ซ้ำ 2	48.14	88.74	275.50	272.60	361.92
	ซ้ำ 3	49.88	85.84	262.74	272.60	362.50
	ค่าเฉลี่ย	48.72±1.0	85.65±3.2	265.06±9.5	267.38±9.0	363.66±2.5
19/6/57	ซ้ำ 1	81.20	148.48	265.06	250.56	377.58
	ซ้ำ 2	91.64	154.28	276.08	249.98	375.84
	ซ้ำ 3	84.10	148.48	264.48	250.56	379.32
	ค่าเฉลี่ย	85.65±5.4	150.41±3.4	268.54±6.5	250.37±0.3	377.58±1.7
20/6/57	ซ้ำ 1	49.30	93.96	289.42	284.78	346.84
	ซ้ำ 2	50.46	96.28	294.64	282.46	349.16
	ซ้ำ 3	49.88	95.12	291.16	291.16	346.26
	ค่าเฉลี่ย	49.88±0.6	95.12±1.2	291.74±2.6	286.13±4.5	347.42±1.5
22/6/57	ซ้ำ 1	63.80	135.14	339.30	402.52	470.96
	ซ้ำ 2	62.64	140.94	345.10	402.52	466.32
	ซ้ำ 3	63.22	138.04	312.62	401.36	474.44
	ค่าเฉลี่ย	63.22±0.58	138.04±2.9	332.34±17.3	402.13±0.7	470.57±4.1

ตารางที่ จ-6 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ควบคุมความเข้มแสง 50,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)
29/7/57	ซ้ำ 1	48.14	82.36	256.94	256.94	366.56
	ซ้ำ 2	48.14	88.74	275.50	272.60	361.92
	ซ้ำ 3	49.88	85.84	262.74	272.60	362.50
	ค่าเฉลี่ย	48.72±1.0	85.65±3.2	265.06±9.5	267.38±9.0	363.66±2.5
30/7/57	ซ้ำ 1	81.20	148.48	265.06	250.56	377.58
	ซ้ำ 2	91.64	154.28	276.08	249.98	375.84
	ซ้ำ 3	84.10	148.48	264.48	250.56	379.32
	ค่าเฉลี่ย	85.65±5.4	150.41±3.4	268.54±6.5	250.37±0.3	377.58±1.7
31/7/57	ซ้ำ 1	49.30	93.96	289.42	284.78	346.84
	ซ้ำ 2	50.46	96.28	294.64	282.46	349.16
	ซ้ำ 3	49.88	95.12	291.16	291.16	346.26
	ค่าเฉลี่ย	49.88±0.6	95.12±1.2	291.74±2.7	286.13±4.5	347.42±1.5
1/8/57	ซ้ำ 1	63.80	135.14	339.30	402.52	470.96
	ซ้ำ 2	62.64	140.94	345.10	402.52	466.32
	ซ้ำ 3	63.22	138.04	312.62	401.36	474.44
	ค่าเฉลี่ย	63.22±0.6	138.04±2.9	332.34±17	402.13±0.7	470.57±4.1
4/8/57	ซ้ำ 1	66.12	143.84	323.64	428.04	462.84
	ซ้ำ 2	64.96	140.36	324.22	428.04	464.58
	ซ้ำ 3	66.70	142.10	322.48	427.46	456.46
	ค่าเฉลี่ย	65.93±0.9	142.10±1.7	323.45±0.9	427.85±0.3	461.29±4.3

ตารางที่ จ-7 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)	ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)
17/8/57	ซ้ำ 1	96.28	145.00	402.52	539.40	734.86
	ซ้ำ 2	76.56	142.10	415.86	545.20	767.92
	ซ้ำ 3	70.76	149.64	381.64	562.02	702.38
	ค่าเฉลี่ย	81.20±13.4	145.58±3.8	400.01±17.3	548.87±11.8	735.05±32.7
18/8/57	ซ้ำ 1	86.42	119.48	421.08	653.66	649.60
	ซ้ำ 2	73.66	122.38	431.52	657.72	649.60
	ซ้ำ 3	73.66	119.48	421.08	654.82	679.76
	ค่าเฉลี่ย	77.91±7.4	120.45±1.7	424.56±6.0	655.40±2.1	659.65±17.4
20/8/57	ซ้ำ 1	91.64	211.12	487.78	749.36	776.04
	ซ้ำ 2	98.02	207.06	499.96	742.40	776.62
	ซ้ำ 3	99.18	213.44	483.14	737.76	760.96
	ค่าเฉลี่ย	96.28±4.1	210.54±3.2	490.29±8.7	743.17±5.8	771.21±8.8
21/8/57	ซ้ำ 1	73.66	120.06	518.52	646.70	828.24
	ซ้ำ 2	73.66	138.62	500.54	681.50	817.22
	ซ้ำ 3	62.64	136.30	506.34	693.10	813.16
	ค่าเฉลี่ย	69.99±6.4	131.66±10	508.47±9.18	673.77±24.1	819.54±7.8
17/8/57	ซ้ำ 1	96.28	145.00	402.52	539.40	734.86
	ซ้ำ 2	76.56	142.10	415.86	545.20	767.92
	ซ้ำ 3	70.76	149.64	381.64	562.02	702.38
	ค่าเฉลี่ย	81.20±13.3	145.58±3.8	400.01±17.3	548.87±11.8	735.05±32.7

ตารางที่ จ-8 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		**ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)**
20/3/58	ซ้ำ 1	216.60	574.56	738.72	1090.98	1167.36
	ซ้ำ 2	202.92	508.44	774.06	1067.04	1216.38
	ซ้ำ 3	210.90	533.52	768.36	1133.16	1293.90
	ค่าเฉลี่ย	210.14±6.8	538.84±33.4	760.38±18.9	1097.06±33	1225.88±63
21/3/58	ซ้ำ 1	216.60	513.00	738.72	1288.20	1233.48
	ซ้ำ 2	202.92	534.66	774.06	1333.80	1238.04
	ซ้ำ 3	210.90	552.90	768.36	1292.76	1220.94
	ค่าเฉลี่ย	210.14±6.8	533.52±19.9	760.38±18.9	1304.92±25	1230.82±8
22/3/58	ซ้ำ 1	209.76	576.84	779.76	1289.34	1159.38
	ซ้ำ 2	210.90	517.56	787.74	1089.84	1161.66
	ซ้ำ 3	223.44	532.38	802.56	1059.06	1129.74
	ค่าเฉลี่ย	214.70±7.59	542.26±30.8	790.02±11.6	1146.08±12	1150.26±17
23/3/58	ซ้ำ 1	215.46	562.02	714.78	1224.36	1347.48
	ซ้ำ 2	222.30	535.80	697.68	1243.74	1352.04
	ซ้ำ 3	204.06	487.92	734.16	1144.56	1334.94
	ค่าเฉลี่ย	213.94±9.21	528.58±37.5	715.54±18.3	1204.22±52	1344.82±8
24/3/58	ซ้ำ 1	224.58	513.00	857.28	1233.48	1297.32
	ซ้ำ 2	243.96	534.66	826.50	1238.04	1295.04
	ซ้ำ 3	234.84	552.90	817.38	1220.94	1306.44
	ค่าเฉลี่ย	234.46±9.70	533.52±19.9	833.72±20.9	1230.82±8.8	1299.60±6

ตารางที่ จ-9 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2

วันที่เก็บผลเพาะเลี้ยง		**ขวดเพาะเลี้ยง 1 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 2 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 3 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 4 (mg/L)**	**ขวดเพาะเลี้ยง 5 (mg/L)**
20/3/58	ซ้ำ 1	85.00	241.00	274.00	385.00	380.00
	ซ้ำ 2	86.00	263.00	244.00	366.00	370.00
	ซ้ำ 3	86.00	230.00	202.00	367.00	319.00
	ค่าเฉลี่ย	85.67±0.58	244.67±16.8	240.00±36.1	372.67±10.7	356.33±32.7
21/3/58	ซ้ำ 1	46.00	316.00	248.00	365.00	270.00
	ซ้ำ 2	57.00	275.00	241.00	347.00	288.00
	ซ้ำ 3	57.00	255.00	219.00	337.00	300.00
	ค่าเฉลี่ย	53.33±6.35	282.00±31.1	236.00±15.1	349.67±14.2	286.00±15.1
22/3/58	ซ้ำ 1	39.00	373.00	263.00	347.00	306.00
	ซ้ำ 2	38.00	387.00	283.00	313.00	336.00
	ซ้ำ 3	51.00	325.00	232.00	328.00	320.00
	ค่าเฉลี่ย	42.67±7.23	361.67±32.5	259.33±25.7	329.33±17	320.67±15.0
23/3/58	ซ้ำ 1	68.00	289.00	279.00	378.00	399.00
	ซ้ำ 2	69.00	335.00	302.00	349.00	412.00
	ซ้ำ 3	55.00	336.00	272.00	419.00	436.00
	ค่าเฉลี่ย	64.00±7.81	320.00±26.8	284.33±15.7	382.00±35.2	415.67±18.8

ตารางที่ จ-10 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 58 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.1

อัตราการไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง				
วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/L)**			**ค่าเฉลี่ย**
	ซ้ำ 1	**ซ้ำ 2**	**ซ้ำ 3**	
2/6/2558	55.440	62.480	63.360	60.427±4.341
3/6/2558	75.680	66.880	70.400	70.987±4.429
4/6/2558	110.000	95.920	103.840	103.253±7.058
5/6/2558	79.200	76.560	76.560	77.440±1.524
6/6/2558	76.560	66.880	73.920	72.453±5.004
7/6/2558	136.400	133.760	134.640	134.933±1.344
8/6/2558	105.600	98.560	121.440	108.533±11.719
9/6/2558	105.600	102.080	108.240	105.307±3.090
10/6/2558	147.840	151.360	161.920	153.707±7.327
11/6/2558	198.000	207.680	212.960	206.213±7.587
12/6/2558	255.200	257.840	258.720	257.253±1.832

ตารางที่ จ-11 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.1

อัตราการไหลของอากาศ 58 ลิตรต่อชั่วโมง				
วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/L)**			**ค่าเฉลี่ย**
	ซ้ำ 1	**ซ้ำ 2**	**ซ้ำ 3**	
2/6/2558	58.960	58.080	62.480	59.840±2.328
3/6/2558	67.760	80.080	64.240	70.693±8.317
4/6/2558	166.320	178.640	159.280	168.080±9.799
5/6/2558	175.120	190.960	197.120	187.733±11.349
6/6/2558	228.800	177.760	172.480	193.013±31.104
7/6/2558	327.360	359.920	356.400	347.893±17.869
8/6/2558	393.360	399.520	420.640	404.507±14.307
9/6/2558	542.960	535.920	561.440	546.773±13.180
10/6/2558	693.440	707.520	735.680	712.213±21.508
11/6/2558	802.560	889.680	911.680	867.973±57.708
12/6/2558	993.520	990.880	1041.040	1008.480±28.229

ตารางที่ จ-12 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.2

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/L)			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
15/6/2558	167.58	161.88	165.30	164.92±2.87
16/6/2558	283.86	282.72	289.56	285.38±3.67
17/6/2558	451.44	449.16	453.72	451.44±2.28
19/6/2558	454.86	450.30	454.86	453.34±2.68
20/6/2558	466.26	473.10	466.26	468.54±3.95
22/6/2558	442.32	432.06	438.90	437.76±5.22
23/6/2558	450.30	436.62	450.30	445.74±7.89
24/6/2558	532.38	503.88	518.70	518.32±14.25
25/6/2558	413.82	433.20	409.26	418.76±12.71
26/6/2558	420.66	427.50	428.64	425.60±4.32
27/6/2558	446.88	462.84	465.12	458.28±9.94

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ

ผลการผลิตคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola*

ตารางที่ ฉ-1 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (วันที่ 11/04/2557-15/04/2557)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	0.515±0.01	0.138±0.015	0.267±0.027	7.130±0.07	1.907±0.21
2	0.655±0.06	0.253±0.03	0.391±0.07	4.066±0.41	1.571±0.17
3	1.464±0.07	0.435±0.02	0.298±0.03	4.103±0.19	1.220±0.06
4	1.572±0.13	0.626±0.03	0.399±0.02	4.255±0.36	1.696±0.07
5	1.597±0.10	0.631±0.05	0.395±0.01	3.609±0.22	1.426±0.11
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L/d)	Carotenoids (mg/L/d)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw/d)	Carotenoids (mg/g.dw/d)
1	0.185	0.050	0.096	2.567	0.687
2	0.236	0.091	0.141	1.464	0.566
3	0.527	0.157	0.107	1.477	0.439
4	0.566	0.226	0.144	1.532	0.611
5	0.575	0.227	0.142	1.299	0.513

ตารางที่ ฉ-2 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสง 50,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (วันที่ 21/05/2557-27/05/2557)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	0.515±0.005	0.156±0.015	0.302±0.033	7.511±0.077	2.269±0.225
2	0.656± 0.066	0.276±0.008	0.423±0.036	5.333±0.534	2.242±0.063
3	1.464±0.070	0.516±0.080	0.352±0.047	4.808±0.231	1.693±0.26
4	2.345±0.071	0.902±0.028	0.385±0.007	4.634±0.141	1.783±0.055
5	2.757±0.099	1.391±0.028	0.505±0.015	4.316±0.154	2.177±0.04
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L/d)	Carotenoids (mg/L/d)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw/d)	Carotenoids (mg/g.dw/d)
1	0.185	0.056	0.109	2.704	0.817
2	0.236	0.099	0.152	1.920	0.807
3	0.527	0.186	0.127	1.731	0.609
4	0.844	0.325	0.139	1.668	0.642
5	0.993	0.501	0.182	1.554	0.784

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฉ-3 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (วันที่ 26/07/2557-31/07/2557)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	0.424±0.064	0.111±0.034	0.274±0.118	4.199±0.633	1.101±0.333
2	0.756±0.211	0.373±0.035	0.529±0.190	3.089±0.863	1.526±0.144
3	1.387±0.077	0.578±0.043	0.419±0.055	3.279±0.183	1.366±0.101
4	2.339±0.126	1.031±0.054	0.441±0.002	3.046±0.165	1.343±0.070
5	3.174±0.271	1.618±0.047	0.513±0.051	3.867±0.330	1.971±0.057
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L/d)	Carotenoids (mg/L/d)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw/d)	Carotenoids (mg/g.dw/d)
1	0.153	0.040	0.098	1.511	0.396
2	0.272	0.134	0.191	1.112	0.549
3	0.499	0.208	0.151	1.181	0.492
4	0.842	0.371	0.159	1.096	0.483
5	1.143	0.582	0.185	1.392	0.710

ตารางที่ ฉ-4 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ควบคุมความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (วันที่ 16/06/2557-22/06/2557)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	0.515±0.005	0.138±0.008	0.267±0.014	10.325±0.106	2.762±0.154
2	0.656±0.066	0.253±0.013	0.388±0.024	6.891±0.690	2.663±0.140
3	1.529±0.175	0.533±0.053	0.350±0.029	5.240±0.600	1.828±0.183
4	1.675±0.149	0.644±0.068	0.389±0.077	5.854±0.522	2.252±0.239
5	1.585±0.114	0.684±0.060	0.434±0.059	4.561±0.328	1.970±0.173
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L/d)	Carotenoids (mg/L/d)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw/d)	Carotenoids (mg/g.dw/d)
1	0.185	0.050	0.096	3.717	0.994
2	0.236	0.091	0.140	2.481	0.959
3	0.550	0.192	0.126	1.886	0.658
4	0.603	0.232	0.140	2.108	0.811
5	0.570	0.246	0.156	1.642	0.709

ตารางที่ ฉ-5 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ควบคุมความเข้มแสง 50,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (วันที่ 29/07/2557-4/08/2557)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	0.515±0.005	0.156±0.015	0.302±0.033	5.328±0.055	1.609±0.159
2	0.656±0.066	0.289±0.041	0.440±0.024	4.943±0.495	2.178±0.307
3	1.529±0.175	0.631±0.028	0.415±0.032	4.095±0.469	1.691±0.074
4	2.191±0.084	1.138±0.134	0.521±0.080	3.435±0.132	1.784±0.209
5	2.616±0.120	1.613±0.053	0.618±0.039	3.793±0.174	2.339±0.077
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L/d)	Carotenoids (mg/L/d)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw/d)	Carotenoids (mg/g.dw/d)
1	0.185	0.056	0.109	1.918	0.579
2	0.236	0.104	0.158	1.779	0.784
3	0.550	0.227	0.149	1.474	0.609
4	0.789	0.410	0.188	1.236	0.642
5	0.942	0.581	0.222	1.365	0.842

ตารางที่ ฉ-6 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (วันที่ 17/08/2557-21/08/2557)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	0.619±0.095	0.244±0.043	0.409±0.143	6.433±0.989	2.539±0.445
2	0.790±0.104	0.640±0.154	0.820±0.225	3.754±0.496	3.040±0.730
3	1.548±0.046	0.996±0.031	0.643±0.009	3.157±0.093	2.031±0.063
4	2.308±0.131	2.480±0.093	1.077±0.009	3.106±0.176	3.337±0.126
5	3.049±0.087	2.840±0.092	0.932±0.051	3.953±0.113	3.683±0.120
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L/d)	Carotenoids (mg/L/d)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw/d)	Carotenoids (mg/g.dw/d)
1	0.223	0.088	0.147	2.316	0.914
2	0.285	0.230	0.295	1.351	1.094
3	0.557	0.358	0.232	1.137	0.731
4	0.831	0.893	0.388	1.118	1.201
5	1.098	1.022	0.336	1.423	1.326

ตารางที่ ฉ-7 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2 (วันที่ 20/03/2558-24/03/2558)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	6.374±0.748	1.385±0.183	0.217±0.006	23.263±2.729	5.057±0.667
2	11.514±0.536	2.587±0.126	0.225±0.002	33.208±1.546	7.460±0.363
3	12.402±0.215	2.870±0.066	0.231±0.001	12.875±0.223	2.979±0.068
4	19.374±0.299	5.134±0.104	0.265±0.001	20.608±0.318	5.461±0.111
5	22.197±3.377	5.926±0.062	0.272±0.047	24.332±3.701	6.496±0.068
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L/d)	Carotenoids (mg/L/d)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw/d)	Carotenoids (mg/g.dw/d)
1	2.294	0.499	0.078	8.375	1.820
2	4.145	0.931	0.081	11.955	2.686
3	4.465	1.033	0.083	4.635	1.072
4	6.975	1.848	0.095	7.419	1.966
5	7.991	2.133	0.098	8.760	2.339

ตารางที่ ฉ-8 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2 (วันที่ 21/03/2558-24/03/2558)

ขวดเพาะเลี้ยง	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
1	0.919±0.060	0.258±0.028	0.280±0.024	21.537±1.411	6.042±0.651
2	6.652±0.082	2.062±0.056	0.310±0.005	18.393±0.228	5.702±0.153
3	5.130±0.049	1.502±0.050	0.293±0.007	19.781±0.189	5.793±0.195
4	4.014±0.004	1.489±0.008	0.371±0.002	12.187±0.013	4.521±0.023
5	1.935±0.003	0.907±0.013	0.468±0.007	6.036±0.008	2.827±0.042
Productivity (day^{-1})					
ขวดเพาะเลี้ยง	**Chlorophylls (mg/L/d)**	**Carotenoids (mg/L/d)**	**Carotenoids: Chlorophylls**	**Chlorophylls (mg/g.dw/d)**	**Carotenoids (mg/g.dw/d)**
1	0.331	0.093	0.101	7.753	2.175
2	2.395	0.742	0.112	6.622	2.053
3	1.847	0.541	0.105	7.121	2.085
4	1.445	0.536	0.134	4.387	1.628
5	0.697	0.326	0.169	2.173	1.018

ตารางที่ ฉ-9 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก อาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 58 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2

วันที่	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
4/6/2558	1.523±0.109	0.482±0.030	0.317±0.016	19.664±1.403	6.227±0.384
5/6/2558	1.158±0.131	0.347±0.086	0.296±0.050	15.980±1.804	4.785±1.187
6/6/2558	1.267±0.200	0.436±0.065	0.344±0.008	9.387±1.484	3.228±0.483
7/6/2558	1.990±0.073	0.680±0.077	0.341±0.027	18.336±0.677	6.265±0.708
8/6/2558	0.985±0.142	0.330±0.079	0.332±0.038	9.351±1.348	3.136±0.750
11/6/2558	2.239±0.087	0.902±0.028	0.403±0.005	8.703±0.336	3.507±0.108
Productivity (day^{-1})					
วันที่	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
4/6/2558	0.861	0.274	0.115	5.120	1.633
5/6/2558	1.531	0.420	0.099	8.156	2.237
6/6/2558	2.835	0.734	0.093	8.149	2.111
7/6/2558	3.374	0.935	0.100	8.341	2.312
8/6/2558	3.428	0.982	0.103	6.270	1.795
11/6/2558	6.037	1.994	0.119	5.986	1.977

ตารางที่ ฉ-10 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก อาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.2

วันที่	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
4/6/2558	2.391±0.325	0.762±0.087	0.320±0.011	14.223±1.932	4.535±0.515
5/6/2558	4.253±0.319	1.167±0.114	0.274±0.012	22.657±1.701	6.214±0.607
6/6/2558	7.875±0.153	2.040±0.027	0.259±0.005	22.636±0.439	5.864±0.077
7/6/2558	9.372±0.196	2.598±0.075	0.277±0.007	23.170±0.483	6.422±0.185
8/6/2558	9.523±0.200	2.7270.104±	0.286±0.011	17.417±0.366	4.987±0.191
11/6/2558	16.769±0.076	5.538±0.020	0.330±0.000	16.628±0.076	5.491±0.020
Productivity (day^{-1})					
วันที่	Chlorophylls (mg/L)	Carotenoids (mg/L)	Carotenoids: Chlorophylls	Chlorophylls (mg/g.dw)	Carotenoids (mg/g.dw)
4/6/2558	0.548	0.174	0.114	7.079	2.242
5/6/2558	0.417	0.125	0.107	5.753	1.722
6/6/2558	0.456	0.157	0.124	3.379	1.162
7/6/2558	0.716	0.245	0.123	6.601	2.256
8/6/2558	0.354	0.119	0.119	3.366	1.129
11/6/2558	0.806	0.325	0.145	3.133	1.263

ตารางที่ ฉ-11 คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลสาหร่าย *C. humicola* ด้วยระบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก อาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ อัตราการเจือจาง 0.35 ต่อวันจากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.3

วันที่เพาะเลี้ยง	**Chlorophylls (mg/L)**	**Carotenoids (mg/L)**	**Carotenoids: Chlorophylls**	**Chlorophylls (mg/g.dw)**	**Carotenoids (mg/g.dw)**
9	5.15	1.57	0.31	12.29	3.75
10	4.93	1.48	0.30	11.77	3.53
11	5.08	1.60	0.32	11.08	3.48
ค่าเฉลี่ย	5.05±0.14	1.55±0.03	0.31±0.01	11.71±0.31	3.59±0.07
Productivity (day^{-1})					
วันที่	**Chlorophylls (mg/L)**	**Carotenoids (mg/L)**	**Carotenoids: Chlorophylls**	**Chlorophylls (mg/g.dw)**	**Carotenoids (mg/g.dw)**
9	1.85	0.57	0.11	4.43	1.35
10	1.77	0.53	0.11	4.24	1.27
11	1.83	0.57	0.11	3.99	1.25
ค่าเฉลี่ย	1.82±0.04	0.56±0.02	0.11±0.00	4.22±0.22	1.29±0.05

ภาคผนวก ช

ความเข้มข้นของธาตุอาหารไนเตรทและฟอสเฟต

ตารางที่ ช-1 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปไนเตรทในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบตช์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.1

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg N/L)			ค่าเฉลี่ย (mg/L)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
17/04/2557	253.378	241.892	243.243	246.171±6.278
18/04/2557	217.741	214.314	214.516	215.524±1.923
19/04/2557	213.508	214.113	212.903	213.508±0.605
20/04/2557	214.516	211.315	212.097	212.642±1.669
21/04/2557	209.274	209.073	210.484	209.610±0.763
22/04/2557	199.597	196.371	198.790	198.253±1.679
23/04/2557	196.371	195.564	196.796	196.244±0.626
24/04/2557	192.540	191.734	191.532	191.936±0.533
25/04/2557	189.718	189.315	191.129	190.054±0.953
26/04/2557	187.314	183.415	181.348	184.026±3.030
27/04/2557	185.625	181.368	178.984	181.992±3.364
28/04/2557	181.250	176.008	174.395	177.218±3.584
29/04/2557	175.369	174.863	169.987	173.406±2.972
30/04/2557	168.432	173.226	171.957	171.205±2.484
31/04/2557	167.339	172.984	168.952	169.758±2.908

ตารางที่ ช-2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปฟอสเฟต ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบตช์ จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1.1

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ฟอสเฟต (mg N/L)			ค่าเฉลี่ย (mg/L)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
17/04/2557	7.09	7.06	7.09	7.08±0.002
18/04/2557	6.98	6.13	6.23	6.45±0.047
19/04/2557	6.21	6.24	6.57	6.34±0.020
20/04/2557	6.38	6.32	6.16	6.29±0.011
21/04/2557	5.9	5.13	5.8	5.61±0.042
22/04/2557	5.23	5.14	5.32	5.23±0.009
23/04/2557	0.85	0.7	0.9	0.81±0.010
24/04/2557	0.62	0.08	0.71	0.47±0.034
25/04/2557	0.86	0.74	0.56	0.72±0.015
26/04/2557	0.59	0.53	0.59	0.57±0.003
27/04/2557	0.69	0.88	0.36	0.64±0.026
28/04/2557	0.32	0.56	0.38	0.42±0.012
29/04/2557	0.44	0.5	0.44	0.46±0.003
30/04/2557	0.42	0.44	0.44	0.43±0.001
31/04/2557	0.4	0.42	0.41	0.41±0.001

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ ช-3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่อง ด้วยอาหารสูตร BG-11 จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (ค่าเฉลี่ยของอาหารทั้ง 3 ชุดความเข้มแสง)

ขวดเพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg/L)	ฟอสเฟต (mg/L)
เริ่มต้น	268.10±8.78	4.00±0.02
1	250.46±17.17	3.10±0.03
2	238.37±36.44	2.06±0.03
3	238.52±0.01	1.07±0.03
4	251.76±19.00	0.49±.05
5	229.80±50.94	0.33±0.00

ตารางที่ ช-4 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่อง ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 (ค่าเฉลี่ยของอาหารทั้ง 3 ชุดความเข้มแสง)

ขวดเพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg/L)	ฟอสเฟต (mg/L)
เริ่มต้น	9.95±0.02	4.7±0.10
1	5.62±0.06	1.0±0.05
2	4.91±0.07	0.7±0.00
3	0.55±0.03	0.5±0.02
4	0.74±0.04	0.3±0.01
5	0.66±0.00	0.2±0.04

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช-5 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ปกติ เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงที่สภาวะความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ (วันที่ 20/03/2558 - 24/03/2558)

ขวด	วันที่	ไนเตรท (mg N/L)			ค่าเฉลี่ย
1	20/3/2558	210.01	189.55	189.86	196.47±11.73
	22/3/2558	192.07	186.40	190.49	189.65±2.93
	24/3/2558	204.66	191.75	192.07	196.16±7.36
2	20/3/2558	187.34	193.95	198.36	193.22±5.55
	22/3/2558	182.93	181.36	182.62	182.30±0.83
	24/3/2558	180.73	195.21	179.16	185.03±8.85
3	20/3/2558	103.59	105.16	115.87	108.21±6.68
	22/3/2558	104.22	103.90	106.42	104.85±1.37
	24/3/2558	108.63	107.37	113.35	109.78±3.15
4	20/3/2558	98.55	94.14	96.66	96.45±2.21
	22/3/2558	93.83	91.62	92.57	92.67±1.11
	24/3/2558	98.55	94.14	97.61	96.77±2.32
5	20/3/2558	84.38	79.35	108.63	90.79±15.66
	22/3/2558	79.66	80.29	79.03	79.66±0.63
	24/3/2558	84.70	82.81	83.44	83.65±0.96
ขวด	**วันที่**	**ฟอสเฟต (mg P/L)**			**ค่าเฉลี่ย**
1	22/3/2558	3.42	3.87	3.71	4.02±0.23
2	22/3/2558	2.32	2.55	2.19	3.67±0.18
3	22/3/2558	2.14	1.87	1.95	2.35±0.14
4	22/3/2558	1.29	1.11	1.21	1.20±0.09
5	22/3/2558	0.91	0.87	0.68	0.82±0.12

ตารางที่ ช-6 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบต่อเนื่องด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มี $NaNO_3$ 5% เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงที่สภาวะความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ (วันที่ 20/03/2558-24/03/2558)

ขวด	วันที่	ไนเตรท (mg N/L)			ค่าเฉลี่ย
1	20/03/2558	7.193	7.113	7.076	7.13±0.06
	22/03/2558	7.187	7.138	7.249	7.19±0.06
	24/03/2558	7.639	7.590	7.429	7.55±0.11
2	20/03/2558	0.954	0.929	0.954	0.95±0.01
	22/03/2558	1.152	1.053	1.022	1.08±0.07
	24/03/2558	1.010	1.029	0.991	1.01±0.02
3	20/03/2558	0.576	0.558	0.830	0.65±0.15
	22/03/2558	1.016	1.016	1.029	1.02±0.01
	24/03/2558	0.570	0.471	0.465	0.50±0.06
4	20/03/2558	0.446	0.471	0.428	0.45±0.02
	22/03/2558	0.756	0.830	0.787	0.79±0.04
	24/03/2558	1.115	0.651	0.682	0.82±0.26
5	20/03/2558	0.260	0.242	0.471	0.32±0.13
	22/03/2558	0.465	0.310	0.242	0.34±0.11
	24/03/2558	0.663	0.737	0.694	0.70±0.04
ขวด	**วันที่**	**ฟอสเฟต (mg P/L)**			**ค่าเฉลี่ย**
1	22/03/2558	3.08	3.12	3.20	3.13±0.06
2	22/03/2558	1.97	1.82	1.63	1.80±0.17
3	22/03/2558	2.08	2.05	2.17	2.10±0.06
4	22/03/2558	1.01	1.11	0.99	1.04±0.06
5	22/03/2558	0.96	1.07	1.05	1.03±0.06

ตารางที่ ช-7 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 58 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ อัตราการเจือจาง 0.35 ต่อวัน

วันที่เพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg N/L)	ฟอสเฟต (mg P/L)
2/6/2558	250.94±13.56	3.49±0.04
3/6/2558	277.41±14.61	3.32±0.04
4/6/2558	252.82±4.03	0.63±0.06
5/6/2558	244.96±3.41	0.37±0.01
6/6/2558	253.49±4.34	0.41±0.19
7/6/2558	249.17±5.99	0.32±0.04
8/6/2558	230.34±2.49	0.32±0.03
9/6/2558	230.68±4.99	0.17±0.03
10/6/2558	187.60±7.64	0.15±0.02
11/6/2558	170.43±3.70	0.16±0.02
12/6/2558	161.35±0.96	0.13±0.02

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช-8 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบตช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ด้วยอาหารสูตร BG-11 เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อัตราไหลของอากาศ 138 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความเข้มแสง 100,000 ลักซ์ อัตราการเจือจาง 0.35 ต่อวัน

วันที่เพาะเลี้ยง	ไนเตรท (mg N/L)	ฟอสเฟต (mg P/L)
2/6/2558	250.61±1.53	3.17±0.18
3/6/2558	236.43±5.72	3.10±0.14
4/6/2558	257.36±2.98	2.40±0.16
5/6/2558	222.37±4.01	1.87±0.02
6/6/2558	233.22±2.64	0.26±0.00
7/6/2558	237.76±6.18	0.30±0.02
8/6/2558	238.43±10.90	0.14±0.01
9/6/2558	231.12±2.83	0.30±0.01
10/6/2558	186.82±10.97	0.19±0.01
11/6/2558	172.20±1.83	0.19±0.03
12/6/2558	155.70±3.73	0.13±0.02

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ซ

ตารางที่ ซ-1 ผลการศึกษาเบื้องต้นของรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงและอัตราไหลของอากาศต่อการฟุ้งกระจายของเซลล์จุลสาหร่าย *C. humicola* (จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3)

รูปแบบ	Air flow rate (L/h.)	ซ้ำ 1 OD 680	ซ้ำ 2 OD 680	ซ้ำ 3 OD 680	ซ้ำ 4 OD 680	ค่าเฉลี่ย
Airlift type I	58	0.319	0.317	0.304	0.316	0.314±0.007
	67	0.331	0.331	0.346	0.335	0.336±0.007
	82	0.333	0.344	0.349	0.343	0.342±0.007
	106	0.361	0.337	0.343	0.352	0.348±0.011
	138	0.353	0.348	0.365	0.354	0.355±0.007
Bubble Column	58	0.156	0.173	0.149	0.164	0.161±0.010
	67	0.206	0.217	0.210	0.230	0.216±0.011
	82	0.220	0.224	0.223	0.228	0.224±0.003
	106	0.267	0.250	0.263	0.256	0.259±0.008
	138	0.299	0.284	0.289	0.302	0.294±0.008
Airlift type II	58	0.108	0.098	0.112	0.156	0.119±0.026
	67	0.175	0.163	0.196	0.215	0.187±0.023
	82	0.229	0.199	0.188	0.209	0.206±0.017
	106	0.213	0.229	0.231	0.239	0.228±0.011
	138	0.261	0.248	0.253	0.288	0.263±0.018

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศุทธินี วรรณสุทธิวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม 2533 ที่จังหวัดชลบุรี จบการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนชลกันยานุกูล จังหวัดชลบุรี และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปี พ.ศ. 2555 หลังจากนั้นได้รับการคัดเลือกเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

Wannasutthiwat S., Powtongsook S., Nootong K. Enhancement of carotenoid production in Chlorococcum Humicola – A Preliminary study. Proceedings of the 40th Congress on Science and Technology of Thailand (STT40) Khon Kaen, Thailand, December 2nd- 4th, 2014 (Oral presentation)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University