ผลของอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีขาวและการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola*

นายณัฐสิทธิ์ จำรัสฉาย

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 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effect of White LED Color Temperature and Airlift Photobioreactor Design on Growth and Carotenoids Production in Microalga *Chlorococcum humicola*

Mr. Nuttasit Jumruschai

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีขาวและการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola*
โดย	นายณัฐสิทธิ์ จำรัสฉาย
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กษิดิศ หนูทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. กษิดิศ หนูทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. อาทิวรรณ โชติพฤกษ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงกมล เรือนงาม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ณัฐสิทธิ์ จำรัสฉาย : ผลของอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีขาวและการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* (Effect of White LED Color Temperature and Airlift Photobioreactor Design on Growth and Carotenoids Production in Microalga *Chlorococcum humicola*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. กษิดิศ หนูทอง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. สรวิศ เผ่าทองศุข, 99 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิสีของแอลอีดีแสงสีขาวและการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ผลการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร พบว่าแสงสีขาวอมฟ้า (Daylight) ส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีกว่าการใช้แสงสีขาวเย็นตา (Cool white) และสีขาวอมเหลือง (Warm white) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากนั้นดำเนินการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ให้การไหลวนภายในที่มีประสิทธิภาพ ผลการดำเนินการพบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดไหลวนภายในขนาด 2 ลิตร ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บรรจุของเหลวที่ระดับความสูง 34 เซนติเมตร ใช้หัวจ่ายอากาศแบบหัวทรายทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ติดตั้งที่ความสูงจากก้นถัง 1.5 เซนติเมตร และใช้ท่อดราฟท์ขนาดความยาว 27 เซนติเมตร ติดตั้งภายในถังปฏิกรณ์ที่ความสูงในระดับเดียวกับหัวจ่ายอากาศ เกิดการไหลวนของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ได้ดีที่สุด และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงในข้างต้นด้วยแสงสีขาวอมฟ้าที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ โดยปรับอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R) และอัตราการไหลของอากาศ พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดไหลวนภายในที่ A_D/A_R เท่ากับ 3 และมีอัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 0.8 วีวีเอ็ม (1.6 ลิตร/นาที) ให้การไหลวนที่ดีและไม่ทำให้จุลสาหร่ายเกิดการตกตะกอนและเกาะติดบนผนังถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงในปริมาณมาก ส่งผลให้เติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์สูงที่สุด โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,360± 16.7 มิลลิกรัม/ลิตร และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 6.45 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร (4.78 ± 0.04 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) ข้อมูลที่ได้รับทั้งในส่วนของอุณหภูมิสีของแสงและการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงถูกนำมาใช้สร้างถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร และดำเนินการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 20,000 ลักซ์ ซึ่งพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายให้เติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดี โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,240 ± 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 4.40 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร (3.52 ± 0.05 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) และมีลูทีนและเบต้าแคโรทีนในปริมาณ 30 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5970168521 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: CAROTENOIDS PRODUCTION / CHLOROCOCCUM HUMICOLA / AIRLIFT PHOTOBIOREACTOR

NUTTASIT JUMRUSCHAI: Effect of White LED Color Temperature and Airlift Photobioreactor Design on Growth and Carotenoids Production in Microalga *Chlorococcum humicola*. ADVISOR: ASSOC. PROF. KASIDIT NOOTONG, Ph.D., CO-ADVISOR: SORAWIT POWTONGSOOK, Ph.D., 99 pp.

This research studied the effects of white LED color temperature and airlift photobioreactor design on growth and carotenoids production in microalga *Chlorococcum humicola*. Results of batch cultivation in 1-L stirred-tank photobioreactor found that daylight LED produced higher growth and carotenoids concentration than cool white and warm white LEDs. Then, the design of internal-loop airlift photobioreactor was conducted to obtain the condition that gave efficient liquid circulation. Dimensions of internal-loop airlift photobioreactor that yielded efficient liquid circulation were as followed: outer diameter 9 cm, liquid level height 34 cm, spherical stone diffuser (2 cm) located at 1.5 cm from bottom of photobioreactor and internal draft tube (height 27 cm and inner diameter 4.5 cm) located at the same level to stone diffuser. When performing microalgal cultivation using the described photobioreactor subjected to different downcomer to riser areal ratios (A_D/A_R) and aeration rates, it was A_D/A_R of 3.0 and aeration rate of 0.8 vvm (1.6 L/min) that produced the highest biomass and carotenoids concentration, with the average cell dried weight and carotenoids concentration measured at 1,360 ± 16.7 mg/L and 6.45 ± 0.04 mg/L (4.78 ± 0.04 mg/g-dw), respectively. Finally, the results of LED color temperature and photobioreactor design were combined and used for the cultivation in 60-L internal-loop airlift photobioreactor. The batch cultivation under light intensity of 20,000 lux finally gave cell dried weight concentration of 1,240 ± 10.0 mg/L and carotenoids concentration of 4.40 ± 0.04 mg/L (3.52 ± 0.05 mg/g-dw) without significant biomass sedimentation and attachment on photobioreactor wall. Lutein and beta-carotene were also identified at 30% and 8% of total carotenoids.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department:	Chemical Engineering	Student's Signature	.....
Field of Study:	Chemical Engineering	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2017	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กษิดิศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ ตลอดจนการแก้ไขปัญหาในการทำงานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.อาทิวรรณ โชติพฤกษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและความกรุณาตรวจทานวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์จุลสาหร่าย เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย และขอขอบพระคุณพี่ๆนักวิจัย ทุกท่านที่ห้องปฏิบัติการ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำใน เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย การวิเคราะห์ ตลอดจนการทำงานทุกด้านกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่กรุณามอบความรู้ด้านวิชาการและประสบการณ์ชีวิต รวมถึงคำปรึกษา และความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบุพการี และผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ช่วยอบรมสั่งสอนและให้การศึกษาแก่ข้าพเจ้า รวมทั้งรุ่นพี่ เพื่อน และรุ่นน้องทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจในการเรียนและการทำงานเสมอมา

Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญภาพ ..... ฎ
บทที่ 1 1
บทนำ 1
1.1 ความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย 4
1.3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิสีของแสงขาวที่เหมาะสมต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์ 4
1.3.2 การปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* 4
1.3.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีขนาดใหญ่ 5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
บทที่ 2 6
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. 6
2.2 รงควัตถุ 7
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย 12
2.5 อุณหภูมิสีของแสงสีขาว 12
2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง 14
2.6.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน (Stirred tank photobioreactor) 14
2.6.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Bubble column photobioreactor) 15
2.6.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบยกอากาศ (Airlift photobioreactor) 15
บทที่ 3 18
วิธีดำเนินงานวิจัย 18
3.1 การเพาะหัวเชื้อจุลสาหร่าย 18
3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิสีของแสงขาวที่เหมาะสมต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์ 19
3.3 การปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* 20
3.3.1 การศึกษาเบื้องต้นก่อนทำการเพาะเลี้ยงถึงความสามารถในการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก 20
3.3.2 ผลของอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R) 22
3.3.3 ผลของอัตราการไหล 23
3.4 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีขนาดใหญ่ 23
3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง 24
3.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง 24
3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ 24
3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ 25
3.6 แผนผังสรุปการดำเนินการวิจัย 26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

บทที่ 4 27

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง 27

4.1 ผลของอุณหภูมิสีของแสงขาวต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C.humicola* 27

4.1.1 การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน 27

4.1.2 การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ 35

4.2 การปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* 37

4.2.1 ความสามารถในการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเบื้องต้นก่อนทำการเพาะเลี้ยง 37

4.2.2 ผลของอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R) 42

4.2.3 ผลของอัตราการไหล 46

4.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีขนาดใหญ่ 53

บทที่ 5 62

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 62

5.1 สรุปผลการทดลอง 62

5.2 ข้อเสนอแนะ 66

รายการอ้างอิง 68

ภาคผนวก 73

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 99

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ตรวจพบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp..... 10

2.2 งานวิจัยที่ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย..... 10

2.3 งานวิจัยที่ศึกษาผลของความยาวคลื่นแสงต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย..... 11

2.4 งานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย..... 11

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย..... 12

2.6 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ส่งผลต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย..... 17

4.1 ชนิดของแคโรทีนอยด์จากการวิเคราะห์ HPLC จากตัวอย่างชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแสงขาวที่แตกต่างกัน..... 32

4.2 การไหลวนที่ความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์ที่แตกต่างกัน..... 39

4.3 สรุปผลการทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก..... 42

4.4 ความเร็วของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R และอัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน..... 50

4.5 ชนิดของแคโรทีนอยด์จากการวิเคราะห์ HPLC จากตัวอย่างชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร และ ขนาด 2 ลิตร..... 60

5.1 สรุปผลการศึกษาอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีสีขาวต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C.humicola*..... 64

5.2 สรุปผลการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C.humicola*..... 65

5.3 สรุปผลความเข้มข้นของลูทีนและเบต้าแคโรทีนจากการวิเคราะห์ HPLC..... 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 เซลล์จุลสาหร่าย *C.humicola*..... 6

2.2 ค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร..... 7

2.3 โครงสร้างของ แอลฟา-แคโรทีนและเบต้า-แคโร..... 8

2.4 ลักษณะโครงสร้างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแซนโทฟิลล์..... 9

2.5 ความยาวคลื่นที่อุณหภูมิสีของแสงแตกต่างกัน..... 13

2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน..... 14

2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ..... 15

2.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก..... 16

3.1 แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ..... 20

3.2 แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ขนาด 2 ลิตร (2 มิติ) 21

3.3 แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร (3 มิติ) 22

3.4 วัตถุทดสอบการไหล (ซ้าย: BCN-12 ขวา: เม็ดอะคริลิค)..... 22

4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน..... 28

4.2 สเปกตรัมของหลอดฟลูออเรสเซนต์..... 28

4.3 สเปรกตรัมของหลอดแอดอีดีที่อุณหภูมิสีแตกต่างกันเปรียบเทียบกับสเปรกตรัมที่จุลสาหร่าย *C. humicola* ดูดกลืน..... 29

4.4 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน..... 30

4.5 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน..... 31

4.6 โครมาโทแกรมของตัวอย่างจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน จากเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร..... 32

4.7 สเปกตรัมของแต่ละพีคจากเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร..... 34

4.8 โครมาโทแกรมจากเครื่อง HPLC ที่ 452 นาโนเมตร เมื่อความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์บีเท่ากันทุกชุดการทดลอง..... 35

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ..... 36
4.10 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ..... 37
4.11 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ชนิดของหัวจ่ายอากาศแตกต่างกัน..... 38
4.12 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์แตกต่างกัน..... 40
4.13 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ระยะห่างระหว่างหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์แตกต่างกัน..... 41
4.14 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ระยะห่างระหว่างท่อ ดราฟท์และระดับของเหลวแตกต่างกัน..... 41
4.15 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน..... 43
4.16 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน..... 44
4.17 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน..... 45
4.18 การเกาะติดที่ผนังของถังปฏิกรณ์ในแต่ละชุดการทดลองที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน..... 46
4.19 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน..... 48
4.20 ผลของอัตราการไหลของอากาศที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในช่วงการเติบโตคงที่ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก..... 49
4.21 การเกาะติดที่ผนังของถังปฏิกรณ์ที่อัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม (ซ้าย) และ 1.6 วีวีเอ็ม (ขวา)..... 49
4.22 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน..... 51
4.23 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน 52
4.24ก แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร..... 53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.24ข แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร..... 54
4.25 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เปรียบเทียบกับขนาด 2 ลิตร..... 55
4.26 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เปรียบเทียบกับขนาด 2 ลิตร..... 57
4.27 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เปรียบเทียบกับขนาด 2 ลิตร.... 57
4.28 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 10 ลิตร (ซ้าย) และ ขนาด 1 ลิตร (ขวา) สำหรับใช้เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร และขนาด 2 ลิตร ตามลำดับ..... 58
4.29 ภาพถ่ายจุลสาหร่าย *C. humicola* จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 4x ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร (ซ้าย) และจากหัวเชื้อจุลสาหร่าย (ขวา)..... 59
4.30 โครมาโทแกรมของตัวอย่างจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร และ ขนาด 2 ลิตร จากเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร..... 60
4.31 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร..... 61

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของงานวิจัย

แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นรงควัตถุที่สีเหลือง ส้ม หรือแดง มีหน้าที่ช่วยรับพลังงานแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงและทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากความเข้มแสงที่มากเกินไป (Cogdell, 1978) แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มแคโรทีน (เช่น เบต้าแคโรทีน และ อัลฟาแคโรทีน เป็นต้น) ซึ่งประกอบด้วยเส้นสายคาร์บอนไม่อิ่มตัวจำนวน 40 อะตอม และ (2) กลุ่มแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซินเจนเพิ่มเข้ามาในรูปของหมู่ไฮดรอกซิล (เช่น แอสตาแซนทิน ลูทีน และ ฟูโคแซนทิน เป็นต้น) (Westphal *et al*., 2015) สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ถูกนำมาใช้งานในหลายอุตสาหกรรม เช่น การผลิตอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์เนื่องจากแคโรทีนอยด์มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Johnson, 2002) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น เป็นส่วนผสมในอาหารเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำมีสีสันสวยงาม (Chavarria *et al*.,2013) และยังใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ปีกในการเร่งสีในไข่แดง (Karadas, 2006) เป็นต้น จากเหตุผลดังกล่าวทำให้สารกลุ่มแคโรทีนอยด์มีมูลค่าทางการตลาดสูงและอุปสงค์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Global industry analysts,Inc., 2016)

คลอโรคอคคัม (*Chlorococcum*) เป็นจุลสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวมีลักษณะเซลล์เดียว มีความสามารถในการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ สามารถเติบโตได้เร็ว ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดด่างและอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง และเพาะเลี้ยงได้ง่ายภายใต้สภาวะกลางแจ้ง (Zhang and Lee, 1999) จุดเด่นอีกประการหนึ่งของจุลสาหร่ายสกุลนี้คือมีน้ำหนักเซลล์มากและมีขนาดใหญ่ซึ่งทำให้เก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายโดยวิธีกรองหรือตกตะกอน (Wannasutthiwat, 2014) เมื่อเปรียบเทียบกับจุลสาหร่ายชนิดอื่นที่มีความสามารถสูงในการผลิตแคโรทีนอยด์เช่น *Dunaliella salina* เป็นสาหร่ายน้ำเค็มที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงแต่กลับเพาะเลี้ยงได้ยากเนื่องจากการควบคุมความเค็มให้สม่ำเสมอและยากต่อการพัฒนาให้สามารถเพาะเลี้ยงในปริมาณสูงและเพาะเลี้ยงในระบบกลางแจ้ง (Chen *et al*., 2009) *Haematococcus pluvialis* เป็นจุลสาหร่ายที่ได้รับความนิยมในการใช้ผลิตแอสตาแซนทินปัจจุบัน แต่มีการเติบโตที่ช้าและเติบโตในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่จำกัด (Issarapayup *et al*., 2009) จากการค้นคว้าพบว่าความเข้มแสงและคุณภาพแสงล้วนมีผลต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* โดยผลการศึกษาของ Wannasutthiwat (2014) พบว่าการ

เพิ่มความเข้มแสงจาก 3,500 – 100,000 ลักซ์ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน (Stirred tank photobioreactor) ที่เรียงต่อกันจำนวน 5 ถัง สามารถเพิ่มอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดของจุลสาหร่าย *C. humicola* จาก 0.36 – 1.04 วัน$^{-1}$ และเพิ่มความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ได้จาก 1.6 – 4.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ผลการศึกษาของ Phuphaibul (2016) พบว่าจุลสาหร่าย *C. humicola* สามารถเติบโตภายใต้แสงสีแดง (639 นาโนเมตร) และแสงสีขาว (442 – 655 นาโนเมตร) ที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ได้ดีมากกว่าแสงสีน้ำเงิน (460 นาโนเมตร) อย่างมีนัยสำคัญ แต่การผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ทำได้ดีที่สุดเมื่อใช้แสงสีน้ำเงินร่วมกับความเข้มแสงในระดับสูง อย่างไรก็ตามพบว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในงานวิจัยดังกล่าวด้วยแสงสีน้ำเงินมีปัญหาด้านการระบายความร้อนและควบคุมอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงมากกว่าแสงสีขาว รวมถึงการจัดหาหลอดไฟซึ่งจะเป็นปัญหามากขึ้นเมื่อทำการขยายขนาดการผลิต ในปัจจุบันหลอดไฟแสงสีขาวที่จำหน่ายในท้องตลาดพบว่ามี 3 แบบตามอุณหภูมิสีของแสง ได้แก่ ขาวอมเหลือง (Warm white) ขาวเย็นตา (Cool white) และขาวอมฟ้า (Daylight) โดยแต่ละอุณหภูมิสีของแสงจะให้ปล่อยความยาวคลื่นแสงที่เด่นออกมาแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ได้ เนื่องจากแสงขาวแต่ละแบบมีช่วงความยาวคลื่นที่เด่นชัดแตกต่างกัน เช่น แสงขาวอมเหลืองมีช่วงความยาวคลื่น 550 – 650 นาโนเมตร ที่เด่นชัด ขณะที่แสงขาวอมฟ้ามีช่วงความยาวคลื่น 400 – 500 นาโนเมตร ที่เด่นชัดกว่าช่วงอื่น (ภาคผนวก จ.) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเห็นความจำเป็นของการศึกษาผลกระทบของการใช้หลอดแสงสีขาวที่มีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาดและมีอุณหภูมิสีของแสงที่แตกต่างกันที่มีต่อการเติบโตและผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Chlorococcum*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นอกจากนี้งานวิจัยในอดีตยังได้รายงานปัญหาการตกตะกอนและการเกาะติดของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* บนผนังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง ในระหว่างการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงและมีอัตราการให้อากาศและกวนผสมไม่เพียงพอ ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียชีวมวลและลดปริมาณผลผลิตแคโรทีนอยด์ตามมา (Wannasutthiwat, 2014) ดังนั้นการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงให้เหมาะสมหรือการปรับปรุงถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่มีอยู่เดิมให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการพัฒนาการเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยด์จากจุลสาหร่ายสกุลนี้ งานวิจัยในอดีตนิยมใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนเพื่อเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ในระดับห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีการกวนผสมที่ดี (Liu and Lee, 1999; Zhang and Lee, 2001) อย่างไรก็ตามการใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดดังกล่าวอาจประสบปัญหาการขาดแสงเมื่อเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในระดับความหนาแน่นเซลล์สูงหรือเมื่อทำการขยายขนาดของถัง

ปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเพิ่มกำลังการผลิต จากการค้นคว้าเอกสารพบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift Photobioreactor) ประสบผลสำเร็จในการใช้งานเพื่อเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายหลายสกุล เช่น *Haematococcus pluvialis* (Kaewpintong *et al*., 2007) *Chaetoceros calcitrans* (Krichnavaruk *et al*., 2005) และ *Entomonies* sp. (Viriyayingsiri *et al*., 2016) เป็นต้น เนื่องจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงชนิดนี้อาศัยการเป่าอากาศลงในของเหลวโดยตรงเพื่อช่วยการกวนผสมและเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลของก๊าซ และของเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงมีทิศทางการไหลที่ค่อนข้างแน่นอนทำให้จุลสาหร่ายภายในได้รับแสงอย่างสม่ำเสมอ (Kaewpintong *et al*. 2007) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเกาะติดของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* เกิดขึ้นน้อยกว่าการใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบแผ่นแบน (Flat Panel Photobioreactor) ที่สภาวะการใช้งานคล้ายคลึงกัน (Wannasutthiwat, 2014) อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ยังมีข้อจำกัดอยู่ โดยขาดข้อมูลด้านการออกแบบที่จะช่วยให้เกิดการหมุนวนอากาศและของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ดีขึ้น ซึ่งช่วยให้จุลสาหร่ายเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้นตามมา จากการค้นคว้าพบว่าสัดส่วนระหว่างพื้นที่หน้าตัดของส่วนไหลลงต่อพื้นที่หน้าตัดของส่วนไหลขึ้น (Downcomer to Riser Areal Ratio, A_D/A_R) ความยาวของท่อดราฟท์ (Draft tube) และตำแหน่งของการติดตั้งท่อดราฟท์และหัวจ่ายอากาศ ส่งผลต่อลักษณะการหมุนวนของอากาศภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก (Monkonsit *et al.*, 2011; Merchuck *et al*., 2002) ดังนั้นการศึกษาผลกระทบของตัวแปรเหล่านี้ต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* จึงมีความจำเป็น นอกจากนีการศึกษาเกี่ยวกับจุลสาหร่ายสกุลนี้โดยงานวิจัยในอดีตนิยมทำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงระดับห้องปฏิบัติการซึ่งส่วนมากมีปริมาตรน้อยกว่า 2 ลิตร ดังนั้นจึงเห็นควรทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อให้ได้รับข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการขยายขนาดระบบในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิสีของแสงของหลอดแอลอีดีขาวต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola*

1.2.2 ปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกให้มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* ที่สูงขึ้น

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิสีของแสงขาวที่เหมาะสมต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์

ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบทช์ (Batch cultivation) ในถังปฏิกรณ์แบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 โดยให้แสงจากหลอดแอลอีดีขาวแตกต่างกัน 3 เฉดสี ได้แก่ สีขาวอมเหลือง (Warm white) สีขาวเย็นตา (Cool white) และสีขาวอมฟ้า (Day light) ควบคุมความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ เติมอากาศที่อัตรา 1.6 ลิตร/นาที และอุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส ทำการเปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Bubble Column Photobioreactor) ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงคล้ายคลึงกัน ทำการติดตามผลการทดลองโดยตรวจวัดอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์

1.3.2 การปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola*

ปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร โดยทำการทดลองเพื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพการไหลวนภายในถังดังนี้ 1) ทดสอบชนิดของหัวจ่ายอากาศ 2 ชนิดคือ แบบทรงกลม และแบบทรงกระบอก 2) ทดสอบขนาดของหัวจ่ายอากาศที่เหมาะสม 2 ค่าคือ 2 และ 3 เซนติเมตร 3) ปรับค่าความสูงของหัวจ่ายอากาศจากก้นถังแตกต่างกัน 3 ค่าคือ ตำแหน่งหัวจ่ายอากาศติดกับก้นถัง ตำแหน่งที่ยกสูงขึ้น 1.5 เซนติเมตร และ ตำแหน่งที่ยกสูงขึ้น 3 เซนติเมตร 4) ปรับความห่างระหว่างระดับของเหลวกับส่วนปลายของท่อดราฟท์แตกต่างกัน 3 ค่าคือ 3 5 และ 7 เซนติเมตร เมื่อได้ค่าที่เหมาะสมจึงเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบทช์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงและแสงสีขาวที่มีเฉดสีเหมาะสมตามผลการทดลองหัวข้อที่ 1.3.1 และทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของรูปแบบถังต่อการผลิตแคโรทีนอยด์และการเติบโตของจุลสาหร่ายดังนี้ ปรับค่า A_D/A_R แตกต่างกันทั้งหมด 3 ค่าคือ 1.7 3.0 และ 5.6 โดยใช้ท่อดราฟท์ขนาดเดียวกันที่ 27 เซนติเมตร (ส่วนปลายส่วนบนท่อห่างจากระดับของเหลวภายในถัง 3 เซนติเมตร) และติดตั้งที่ตำแหน่งปลายท่อส่วนล่างติดกับหัวจ่ายอากาศ จากนั้นเริ่มต้นการทดลองใหม่ครั้งที่สองโดยใช้ A_D/A_R ที่เหมาะสมและทำการปรับอัตราการไหลของอากาศทั้งหมด 4 ค่าคือ 0.5 0.8 1.25 และ 1.6 วีวีเอ็ม (1 1.6 2.5 และ 3.2 ลิตรต่อนาที) ทำการติดตามผลการทดลองโดยตรวจวัดอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และปริมาณแคโรทีนอยด์

1.3.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีขนาดใหญ่

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร ซึ่งออกแบบโดยอ้างอิงผลจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 1.3.2 และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 และมีการให้แสงจากหลอดไฟเฉดสีที่เหมาะสมจากหัวข้อ 1.3.1 ที่ระดับความเข้มแสง 20,000 ลักซ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* เป็นอีกหนึ่งทางเลือกของการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในอนาคต โดยผลการทดลองจากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการออกแบบและพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและนำไปสู่การขยายกำลังการผลิต ซึ่งจะช่วยสร้างรายได้เพิ่มเติมให้แก่เกษตรกรและผู้มีส่วนเกี่ยวข้อง เนื่องจากสามารถลดต้นทุนการผลิตแคโรทีนอยด์และลดการนำเข้าแคโรทีนอยด์จากต่างประเทศ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้รับคาดว่าจะเป็นข้อมูลเกี่ยวกับการเลือกใช้เฉดแสงสีขาวที่เหมาะสมต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* ซึ่งการเลือกใช้แสงสีขาวสามารถลดความซับซ้อนในการออกแบบและเพิ่มความสะดวกของการบริหารจัดการระบบเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายได้ อีกทั้งยังสามารถนำไปองค์ความรู้ที่ได้ไปอ้างอิงหรือประยุกต์ใช้กับการวิจัยในอนาคตที่ต้องการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

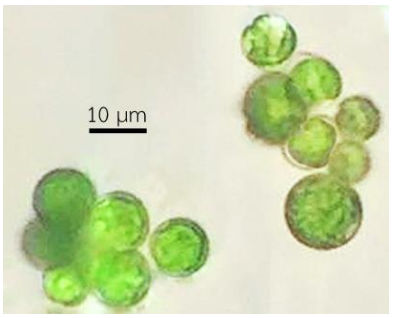
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไปของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp.

การจัดเรียงลำดับอนุกรมวิธานของจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. ตั้งแต่ดิวิชั่นลงไปถึงระดับสกุล (Peerapornpisan, 2003)

Division Chlorophyta
Class Chlorophyceae
Order Chlorococcales
Family Chlorococcaceae
Genus Chlorococcum

จุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างกลม ขนาดเซลล์ประมาณ 10-20 ไมโครเมตร มักพบเป็นกลุ่มโคโลนีประมาณ 2 ถึง 4 เซลล์ มีสารพวกเจลาตินหุ้มเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำจืดทั่วไป มีความสามารถสูงในการผลิตสารกลุ่มคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ เพาะเลี้ยงได้ง่ายเพราะสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้าง (pH 6.1 ถึง 9 , อุณหภูมิ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส) และเจริญเติบโตได้เร็วภายใต้สภาวะกลางแจ้ง มีน้ำหนักมากและขนาดใหญ่สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายด้วยวิธีการกรอง การตะกอนหรือการปั่นเหวี่ยง ลักษณะการดำรงชีวิตมักยึดเกาะตามผนังหรือพื้นผิวสัมผัสและสามารถตกตะกอนได้เองตามธรรมชาติ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Zhang *et al*., 1999)

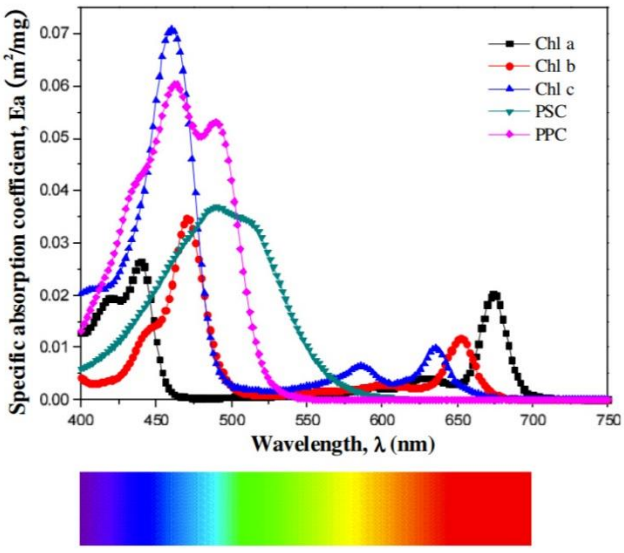


รูปที่ 2.1 เซลล์จุลสาหร่าย *C.humicola*

2.2 รงควัตถุ

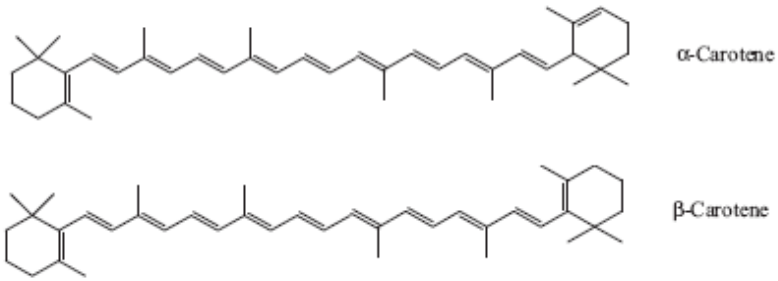
รงควัตถุคือสารสีที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่ายที่ถูกสะสมไว้ในส่วนของคลอโรพลาสต์ซึ่งทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสงเพื่อเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานเคมี สำหรับรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืชและจุลสาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) และ แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) (Masojidek *et al*., 2000; Yuan *et al*., 2002)

คลอโรฟิลล์ เป็นรงควัตถุที่มีสีเขียว ซึ่งเป็นรงควัตถุหลักในคลอโรพลาสต์ มีลักษณะเป็นสารจำพวกโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารละลายอินทรีย์ เช่น เมธานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเธอร์ เป็นต้น โดยคลอโรฟิลล์จะทำหน้าที่ดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีม่วง น้ำเงิน และแดง และจะสะท้อนแสงสีเขียวที่ดูดกลืนน้อยที่สุดออกมา ในส่วนของจุลสาหร่ายคลอโรคอคคัม ประกอบไปด้วย คลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีม่วง (400–450 นาโนเมตร) และสีแดง (650–700 นาโนเมตร) และเป็นรงควัตถุที่สามารถรับแสงได้โดยตรง ทำให้สามารถเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานเคมีได้โดยตรงในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่วนคลอโรฟิลล์ บี ทำหน้าที่ในการดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีน้ำเงิน (425–500 นาโนเมตร) และสีแดง (625–675 นาโนเมตร) และจะส่งต่อไปให้คลอโรฟิลล์ เอ ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ช่วงของการดูดกลืนแสงแสดงดังรูปที่ 2.2 (Lee *et al*.,2013)



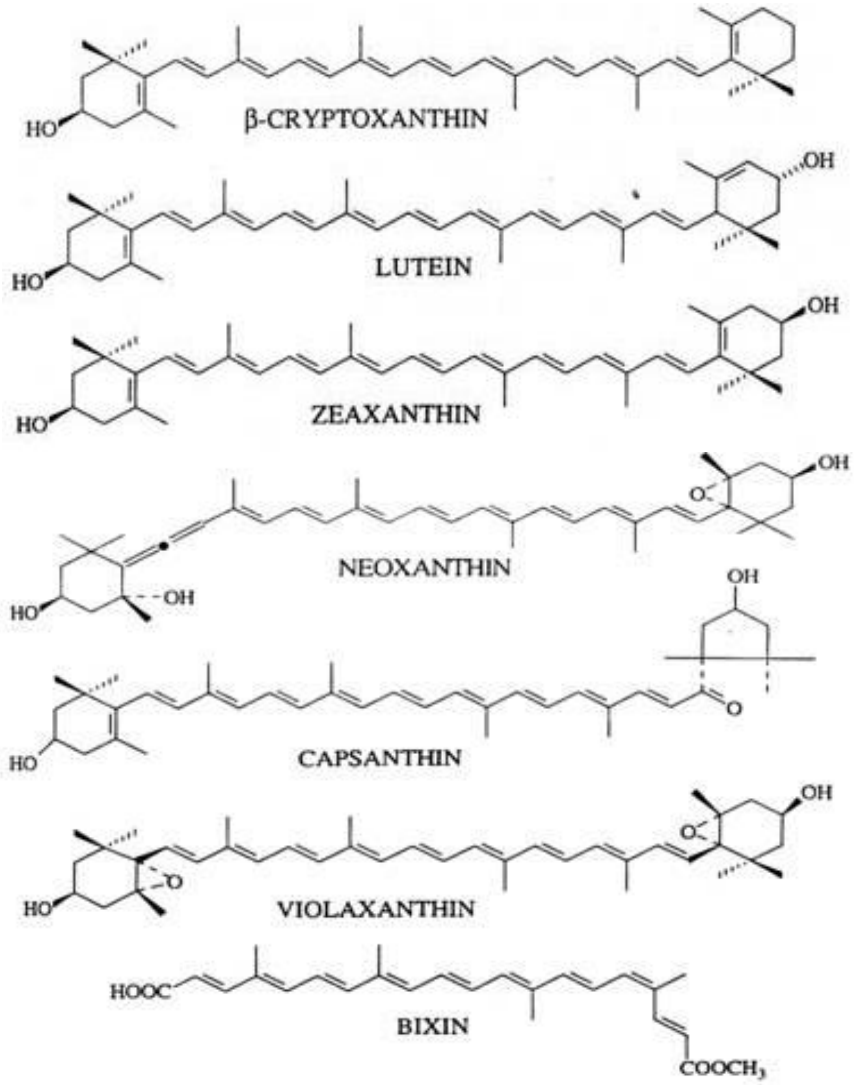
รูปที่ 2.2 ค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร (Lee *et al*.,2013)

แคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุที่มีสีเหลือง ส้ม หรือแดง มีลักษณะเป็นสารจำพวกไขมันที่มีโครงสร้างหลักเป็นสายไฮโดรคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม (Westphal *et al*., 2015) พบในสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ เช่น พืชชั้นสูง จุลสาหร่าย และแบคทีเรียบางชนิด มีหน้าที่เป็นตัวช่วยในการดูดกลืนแสง (Accessory light-harvesting pigment) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ยังช่วยในการป้องกันอันตรายจากสภาวะที่ความเข้มแสงสูงเกินไป (Photoprotective agents) ซึ่งทำให้จุลสาหร่ายเกิดความเครียด โดยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนที่ Primary and secondary carotenoids ทำหน้าที่ในการป้องกัน Photo – oxidation ซึ่งจะเกิดในช่วงเวลา 0 – 8 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 2 ขั้นตอนนี้เกิดจาก Primary carotenoids ลดลง ทำให้ secondary carotenoids เกิดการสะสมขึ้นแทนที่ Primary carotenoids เพื่อเป็นตัวช่วยที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะเกิดในช่วงเวลา 4 – 12 ชั่วโมง และขั้นตอนที่ 3 ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในช่วงเวลาตั้งแต่ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป (Hagen *et al*., 1993) โดยแคโรทีนอยด์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง (Primary and secondary carotenoids) จะดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีน้ำเงินที่ความยาวคลื่นช่วง 400 – 550 นาโนเมตร และแคโรทีนอยด์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกันอันตรายจากแสง (Photoprotective carotenoids) จะดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นช่วง 400 – 600 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2.2 (Lee *et al*.,2013) แคโรทีนอยด์แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แคโรทีน (Carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) แคโรทีน (Carotene) เป็นรงควัตถุที่มีสีส้ม หรือส้ม-แดง ซึ่งประกอบไปด้วย แอลฟา-แคโรทีน (alpha-carotene) และ เบต้า-แคโรทีน (Beta-carotene) เป็นองค์ประกอบหลัก มีลักษณะเป็นสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอมที่ไม่อิ่มตัว มีลักษณะโครงสร้างดังรูปที่ 2.3 เป็นสารจำพวกลิพิด (lipid) นิยมนำมาเป็นอาหารเสริม และยารักษาโรค เนื่องจากมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และยังเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (pro vitamin A) ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นเรตินอล (retinol) ได้ที่เยื่อบุผนังลำไส้เล็กและตับ พบได้ผักที่มีสีเขียวและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือส้ม (Westphal *et al*., 2015)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ แอลฟา-แคโรทีนและเบต้า-แคโร

แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นรงควัตถุที่มีสีสีเหลือง หรือส้ม-เหลือง มีลักษณะเป็นสายโซ่ของไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนที่อยู่ในรูปหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งแบ่งออกได้หลายประเภทตามลักษณะโครงสร้างดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแซนโทฟิลล์

ในส่วนของแคโรทีนอยด์ที่พบมากในจุลสาหร่ายสีเขียวกลุ่ม Chlorophyceae ได้แก่ ลูทีน (Lutein) แอนเทอราแซนทีน (Antheraxanthin) ซีแซนทีน (Zeaxanthin) และแอสต้าแซนทีน (Astaxanthin) เป็นต้น ในตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์ในกลุ่มแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ที่ตรวจพบในจุลสาหร่ายคลอโรคอคคัม (Bhagavathy *et al*., 2012)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ตรวจพบในจุลสาหร่าย *Chlorococcum* sp. (Bhagavethy *et al*., 2012)

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

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย

แสงสว่าง เป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มอัตราการเติบโตและมีผลต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีในจุลสาหร่าย การให้แสงสว่างควรใช้หลอดไฟที่ไม่ส่งผลกระทบต่ออุณหภูมิที่ทำการทดลองหรือส่งผลกระทบได้น้อย จากการทบทวนวรรณกรรมตัวแปรที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตได้แก่ ความเข้มแสงและความยาวคลื่น ดังตารางที่ 2.2 และ 2.3

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย (μmolPhoton/m^2s)

สกุล	การทดลอง	ความเข้มแสงที่เหมาะสม	อ้างอิง
Chlorella minutissima	33 - 420	33	(Singh, 2015)
Selenastrum minutum	30 - 456	365	(Bouterfas, 2016)
Cosmarium subprotumidum	30 - 456	360	(Bouterfas, 2016)
Chaetoceros calcitrans	40 - 600	200	(Krichnavaruk, 2005)
Amphora sp.	80 - 150	150	(Csavina, 2008)
Chlorococcum littorale	30 - 170	170	(Cassidy,2011)

ตารางที่ 2.3 งานวิจัยที่ศึกษาผลของความยาวคลื่นแสงต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย

สกุล	การทดลอง	ผลการทดลอง	อ้างอิง
Tetraselmis sp.	แสงสีแดงในช่วง 600-700 nm และแสงสีน้ำเงินในช่วง 420-450 nm	แสงสีน้ำเงินส่งผลต่อการเจริญเติบโตได้ดีกว่า	(Teo *et al*., 2014)
Nannochloropsis sp.	แสงสีขาว แสงสีแดง 680 nm และแสงสีน้ำเงิน 470 nm	อัตราการเจริญเติบโตในสภาวะแสงสีน้ำเงินดีที่สุด	(Das and Lei *et al*., 2011)
Chlorella sp.	แสงสีน้ำเงิน 450 nmและต่อด้วยสีแดง 660 nm เทียบกับแสงสีขาว	แสงสีน้ำเงินและต่อด้วยแสงสีแดงให้ชีวมวลมากว่าสีขาว	(Blair, 2014)
Chlorococcum sp.	เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีน้ำเงิน 460 nmแต่เตรียมหัวเชื้อจากแสงสีขาว เปรียบเทียบกับหัวเชื้อที่เตรียมจากแสงสีน้ำเงิน	อัตราการเติบโตจากหัวเชื้อที่เพาะด้วยแสงสีขาวสูงกว่าแสงสีน้ำเงิน	(Phuphaibul, 2016)

อุณหภูมิ สาหร่ายน้ำจืดเกือบทุกชนิดเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 15 ถึง 25 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส อาจทำให้สาหร่ายตาย แต่มีสาหร่ายบางชนิดสามารถทนอุณหภูมิสูงๆได้ดี จากการทบทวนวรรณกรรมสามารถสรุปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายแต่ละชนิดดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 งานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย

สกุล	การทดลอง (°C)	ผลที่เหมาะสม (°C)	อ้างอิง
Selenastrum minutum	20 - 35	35	(Singh, 2015)
Chlorella minutissima	10 - 35	30	(Singh, 2015)
Chlorella ellipsoidea	15 - 30	25	(Gonçalves, 2016)
Scenedesmus sp.	25 - 35	27.5	(Owen,2011)
Chlorococcum littorale	18 - 30	25	(Takenaka, 2015)

ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) เป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่ง สาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการ pH ในระดับที่แตกต่างกัน เช่นจุลสาหร่าย *scenedesmus* sp. ชอบน้ำที่สภาพเป็นเบสอ่อน ขณะที่สาหร่ายกลุ่ม desmid ชอบสภาพน้ำเป็นกรดอ่อน

นอกจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาแล้วยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย เช่น ความเค็ม ปริมาณแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย

ตารางที่ 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย

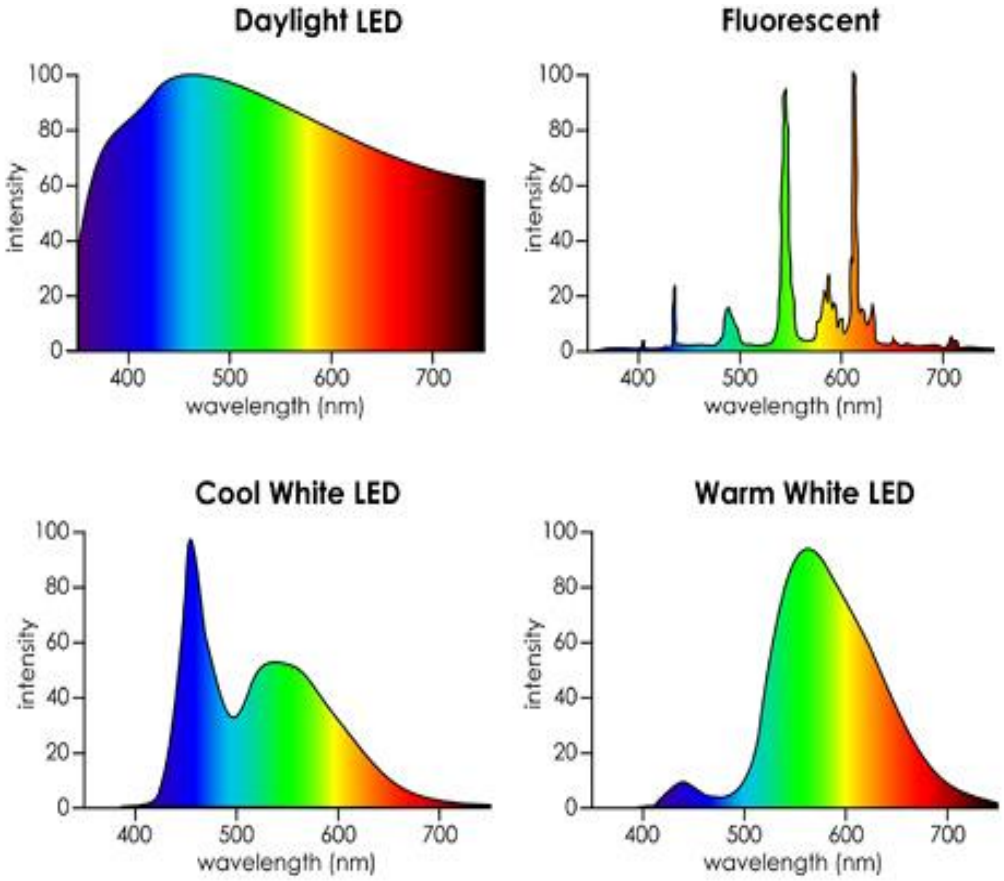
ปัจจัย	ผลของปัจจัย	อ้างอิง
ความเข้มแสง	เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้นปริมาตรการสะสมแคโรทีนอยด์สูงขึ้น ขณะที่คลอโรฟิลล์เอและบีลดลง	(Borowitzka and Borowitzka , 1988) (Powtongsook, 1993)
ความยาวคลื่นแสง	แสงสีน้ำเงินให้ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงสุด รองลงมาคือแสงสีขาว	(Phuphaibul, 2016) (Parjikolaei, 2013)
อาหาร	การจำกัดธาตุอาหารบางชนิดเช่น ฟอสเฟตและซัลเฟต ส่งผลให้อัตราการเติบโตลดลงแต่อัตราการสะสมแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น	(Phadwal and Singh, 2003) (Wannasutthiwat, 2014)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.5 อุณหภูมิสีของแสงสีขาว

เป็นระบบการวัดแสงสีขาวที่มีหน่วยวัดเป็นเคลวิน (K) มีที่มาจากการให้ความร้อนผ่านวัตถุสีดำทำให้มีการดูดซับความร้อนและเปล่งแสงขาวออกมาในโทนสีที่ต่างกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับค่าความยาวคลื่นที่ปล่อยออกมา โดยค่าองศาความร้อนที่น้อยจะปลดปล่อยแสงขาวที่มีความยาวคลื่นที่สูงเด่นกว่าความยาวคลื่นที่ต่ำทำให้ได้แสงโทนสีขาวอมเหลือง ขณะที่ค่าองศาความร้อนที่สูงจะมีความยาวคลื่นที่ต่ำเด่นกว่าทำให้ได้แสงโทนสีขาวอมฟ้า (The LESA Project, 2010) อุณหภูมิสีของแสงที่แตกต่างกันทำให้รงควัตถุในจุลสาหร่ายดูดกลืนแสงและสังเคราะห์แสงได้แตกต่างกัน จึงมีผลต่อการเติบโตและการผลิตรงควัตถุของจุลสาหร่าย ในปัจจุบันอุณหภูมิสีของแสงที่พบเจอได้บ่อยตามท้องตลาดคือแสงสี

ขาวอมเหลือง (Warm white) ที่มีอุณหภูมิสีของแสง 3,000 เคลวิน แสงสีขาวเย็นตา (Cool white) ที่มีอุณหภูมิสีของแสง 4,000 เคลวิน และแสงสีขาวอมฟ้า (Daylight) ที่มีอุณหภูมิสีของแสง 6,000 เคลวิน ซึ่งช่วงความยาวคลื่นของแต่ละอุณหภูมิสีของแสงแสดงดังรูปที่ 2.5 (Priest, J., 2018)

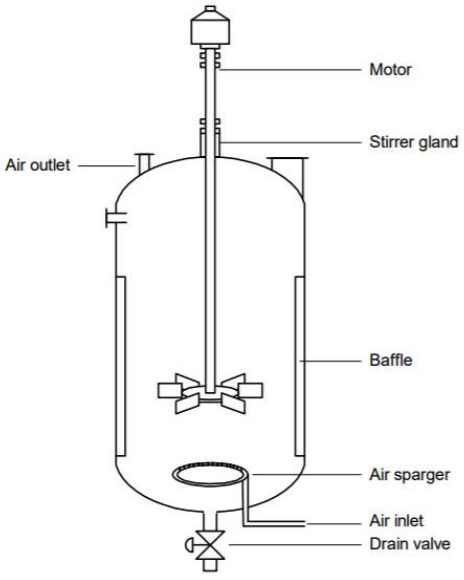


รูปที่ 2.5 ความยาวคลื่นที่อุณหภูมิสีของแสงแตกต่างกัน

2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง

2.6.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน (Stirred tank photobioreactor)

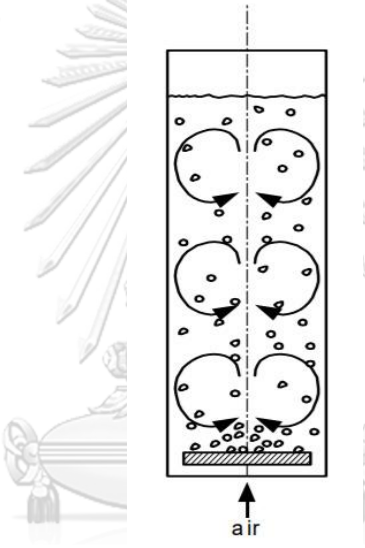
เป็นถังปฏิกรณ์ที่ถูกนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการมากที่สุด เนื่องจากสามารถประหยัดค่าใช้จ่าย ถังปฏิกรณ์ที่มีขนาดเล็กมักทำด้วยวัสดุแก้ว เช่นขวดดูแรนที่มีการปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก โดยสัดส่วนของส่วนสูงต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมักอยู่ในช่วง 2:1 ถึง 6:1 ถังกวนที่มีขนาดใหญ่มักติดตั้งตัวกั้น (Baffle) เพื่อป้องกันการเกิดวอร์เท็ค (Vortex) ตรงส่วนกลางของถังและช่วยในการผสมที่ดีขึ้น แต่ถังปฏิกรณ์ชนิดนี้มักไม่นิยมเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ปริมาณสูงเนื่องจากเกิดการผสมได้ไม่ดีนักและประสบปัญหาการกระจายตัวของอากาศที่ไม่เพียงพอ สาเหตุหลักคือไม่สามารถใช้ใบกวนที่มีขนาดใหญ่ซึ่งจะให้แรงเฉือนที่สูงซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ และเกิดการบดบังแสงจากเซลล์สาหร่ายด้วยกันเองได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น จากระบะการกวน รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน



รูปที่ 2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน (Scragg, 1991)

2.6.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Bubble column photobioreactor)

เป็นถังปฏิกรณ์ที่มีการเติมอากาศจากหัวจ่ายบริเวณก้นถัง รูปแบบการไหลของของเหลวภายในถังจะเป็นแบบไร้ทิศทาง เพื่อให้เกิดการแขวนลอยของเซลล์ภายในถังจำเป็นต้องมีการเติมอากาศด้วยอัตราที่สูง และต้องควบคุมไม่ให้เกิดฟองอากาศขนาดใหญ่ซึ่งทำให้อัตราการถ่ายเทอากาศลดลง ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้หัวจ่ายอากาศที่เหมาะสมและเติมอากาศด้วยอัตราที่เหมาะสมเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการดัดแปลงรูปแบบของถังปฏิกรณ์ให้มีลักษณะเป็นทรงกรวยบริเวณฐานเพื่อเพิ่มความเร็วของอากาศ ดังรูปที่ 2.7



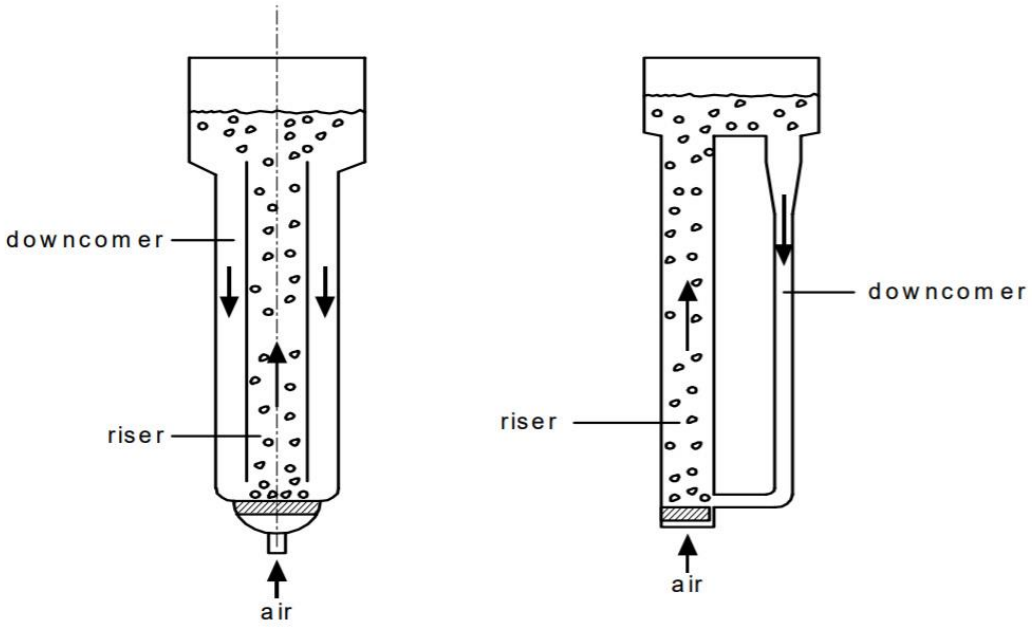
รูปที่ 2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ (Scragg, 1991)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.6.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบยกอากาศ (Airlift photobioreactor)

เป็นถังปฏิกรณ์ที่มีการเติมอากาศจากหัวจ่ายอากาศที่บริเวรก้นถังในลักษณะคล้ายกับแบบคอลัมน์เติมอากาศ แตกต่างตรงที่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกจะมีท่อดราฟท์ (Draft tube) อยู่ภายใน ซึ่งทำให้เกิดการไหลเวียนของน้ำอย่างมีทิศทาง สามารถช่วยลดปัญหาการขาดอาหารและการไหลเวียนของอากาศที่ไม่เพียงพอ นอกจากนี้ยังมีแรงเฉือนที่ต่ำเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย รูปแบบการไหลของของเหลวภายในถัง จะแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่มีการไหลขึ้น (Riser) จากผลของการให้อากาศ และส่วนที่มีการไหลลง (Downcomer) เป็นส่วนที่ไม่มีการให้อากาศ แสดงดังรูปที่ 2.8 หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก จะอาศัยความแตกต่างระหว่างความหนาแน่นของของเหลวเมื่อมีการเติมอากาศจากด้านล่างถัง ทำให้ส่วนก้นถังมีฟองอากาศจำนวนมากส่งผลให้

ของเหลวบริเวณนี้มีความหนาแน่นลดลงและเกิดการเคลื่อนตัวขึ้นสู่ด้านบนและของเหลวด้านข้างจึงไหลมาแทนที่ ประกอบกับส่วนของก้นถังมีความดันสูงกว่าด้านบนของถัง (ความดันจากความสูงของน้ำ) เมื่อของเหลวที่มีฟองอากาศละลายอยู่ไหลมาถึงด้านบน ฟองอากาศจะถูกปลดปล่อยออกมาเนื่องด้วยความดันที่ต่ำลงขณะที่ของเหลวนั้นมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น จึงตกสู่ส่วนล่างของถังอีกครั้ง ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกมีด้วยกัน 2 รูปแบบหลัก คือแบบมีท่อด้านใน (Internal-loop airlift photobioreactor) และแบบท่อด้านนอก (External-loop airlift photobioreactor) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก
(ซ้าย: Internal-loop airlift photobioreactor ขวา: External-loop airlift photobioreactor)
(Scragg, 1991)

จากการค้นคว้าพบงานวิจัยที่ศึกษาถึงอัตราการหมุนเวียนของของเหลวในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก พบว่าขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อัตราส่วนของพื้นที่หน้าตัดที่เกิดการไหลลงต่อพื้นที่หน้าตัดที่เกิดการไหลขึ้น (A_D/A_R) ขนาดของท่อดราฟ์ ตำแหน่งของการติดตั้งท่อดราฟท์ และอัตราการไหลอากาศ เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ส่งผลต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย

สกุล	การทดลอง	ผลการทดลอง	อ้างอิง
Skeletonema costatum	เพาะเลี้ยงในถังแบบอากาศยก ขนาด 3 L เส้นผ่านศูนย์กลางถัง 9.4 cm ความสูงถัง 60 cm ความยาวท่อดราฟ 40 cm ศึกษาผลของการเติมอากาศที่ 1, 1.5, 2 $cm.s^{-1}$ และ ผลของ A_D/A_R ที่ 0.98, 1.87, 3.27, และ 14.87	ที่ความเร็วการเติมอากาศ 1.5 $cm.s^{-1}$ และ A_D/A_R 3.27 ให้การเติบโตและผลผลิตของจุลสาหร่ายดีที่สุด	(Monkonsit, 2011)
Haematococcus pluvialis	เพาะเลี้ยงในถังแบบอากาศยก ขนาด 3 L เส้นผ่านศูนย์กลางถัง 10 cm ความสูงถัง 60 cm ความยาวท่อดราฟ 40 cm ตำแหน่งติดตั้งท่อดราฟท์ห่างจากหัวจ่ายอากาศ 4 cm ศึกษาผลของการเติมอากาศที่ 0.4-3 $cm.s^{-1}$ และผลของ A_D/A_R ที่ 0.9 และ 3.27	ที่ความเร็วการเติมอากาศ 0.4 $cm.s^{-1}$ และ A_D/A_R 3.2 ให้การเติบโตของจุลสาหร่ายดีที่สุด	(Kaewpintong, 2007)
Chlorococcum humicola	เพาะเลี้ยงในถังแบบอากาศยก ขนาด 2 L เส้นผ่านศูนย์กลางถัง 9 cm ความสูงถัง 45 cm ความยาวท่อดราฟ 25 cm A_D/A_R 3.18 ศึกษาผลของอัตราการไหลที่ 0.1, 0.3, 0.6, 0.8 และ 1.25 วีวีเอ็ม	ที่อัตราการเติมอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม ให้ผลการเติบโตและผลผลิตของจุลสาหร่ายสูงสุด	(Phuphaibul, 2016)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorococcum humicola* (TISTR Number 8461) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์หัวเชื้อจุลสาหร่ายและสถานที่ดำเนินการจากห้องปฏิบัติการของศูนย์เชี่ยวชาญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การเพาะหัวเชื้อจุลสาหร่าย

ทำการผสมหัวเชื้อจุลสาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 (ตารางที่ 3.1) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากขวดลูกชมพูด้วยจุกสำลีเพื่อป้องกันการสัมผัสกับสภาวะภายนอก เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงประมาณ 3,000 – 5,000 ลักซ์ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกสัปดาห์เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอในการทดลอง

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของอาหารสูตรมาตรฐาน BG-11 (Rippka *et al*., 1979)

ส่วนที่ 1: ส่วนประกอบอาหาร สูตร BG-11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

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

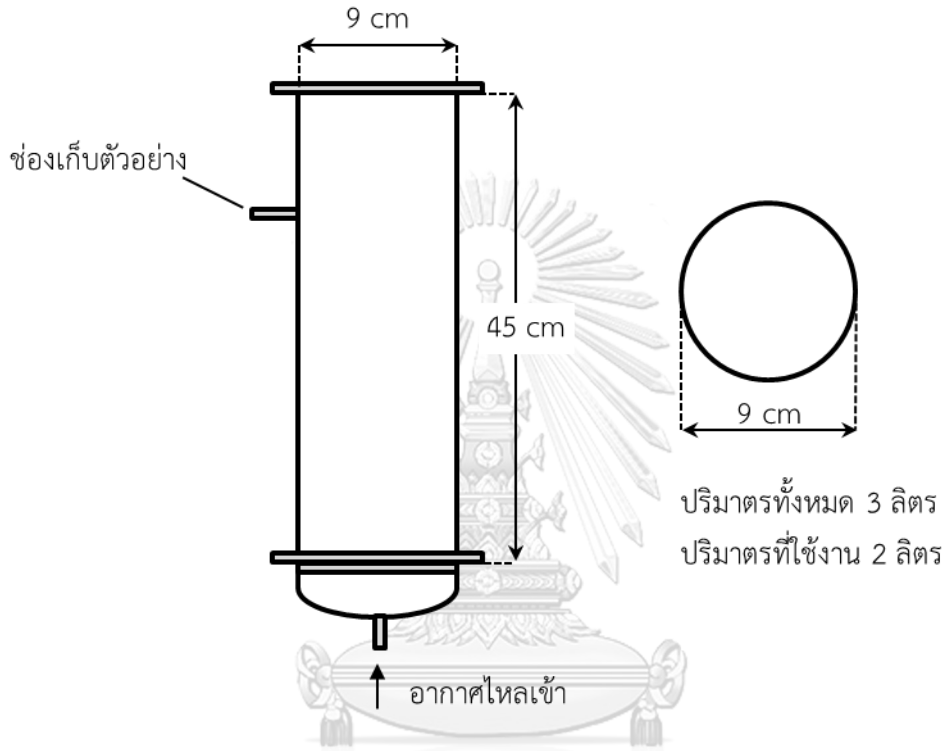
ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
H_3BO_3	2.860
$MnCl_2.4H_2O$	1.810
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.390
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222
$CuSO_4.5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.050

3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิสีของแสงขาวที่เหมาะสมต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์

ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิสีของแสงขาวต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* เริ่มต้นด้วยการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่ายตามวิธีการในหัวข้อ 3.1 จากนั้นผสมหัวเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึงความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน (ขวดดูแรน) มีการให้อากาศผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ที่อัตรา 45 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างโดยใช้หลอด แอลอีดี 3 เฉดสี คือ สีขาวอมเหลือง (Warm white) สีขาวเย็นตา (Cool white) และเฉดสีขาวอมฟ้า (Daylight) โดยควบคุมระดับความเข้มแสงที่ 5,000 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เป็นเวลา 15 วัน และเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 15 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ นอกจากนี้ยังดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ทำการทดลองซ้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศซึ่งมีปริมาตรใช้งาน 2.0 ลิตร และสร้างจากอะครีลิกใส (รูปที่ 3.1) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยโอโซนเป็นเวลา 30 นาที เริ่มการทดลองโดยการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่ายตามวิธีการในหัวข้อ 3.1 จากนั้นผสมหัวเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 ปริมาตร 1.8 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึงความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีการให้อากาศผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ที่อัตรา 0.8 วีวีเอ็ม (1.6 ลิตร/นาที) ควบคุมอุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างโดยใช้หลอด

แอลอีดี 3 เฉดสี คือ สีขาวอมเหลือง (Warm white) สีขาวเย็นตา (Cool white) และเฉดสีขาวอมฟ้า (Daylight) โดยควบคุมระดับความเข้มแสงที่ 5,000 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เป็นเวลา 15 วัน และเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 15 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ

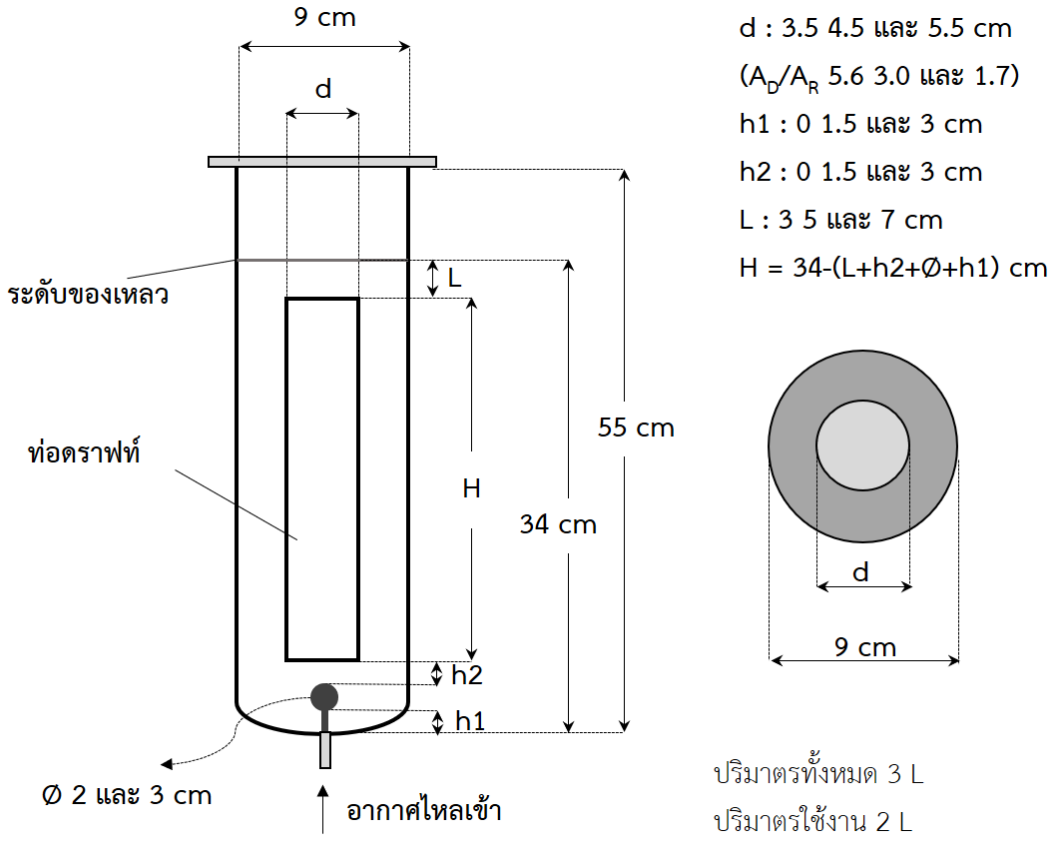
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 การปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola*

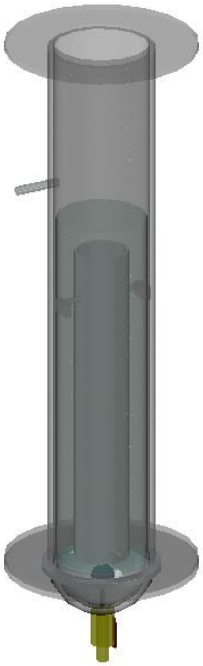
3.3.1 การศึกษาเบื้องต้นก่อนทำการเพาะเลี้ยงถึงความสามารถในการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก

ทำการทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร (รูปที่ 3.2 และ 3.3) ก่อนการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเมื่อมีการไหลวนของอากาศและของเหลวภายในถังที่ดีจะนำมาสู่การเติบโตของจุลสาหร่ายที่ดีด้วย ทำการทดลองโดยเติมน้ำประปาริมาตร 2 ลิตร ใส่วัตถุทดสอบเพื่อใช้ในการสังเกตการไหลวน ซึ่งวัตถุ

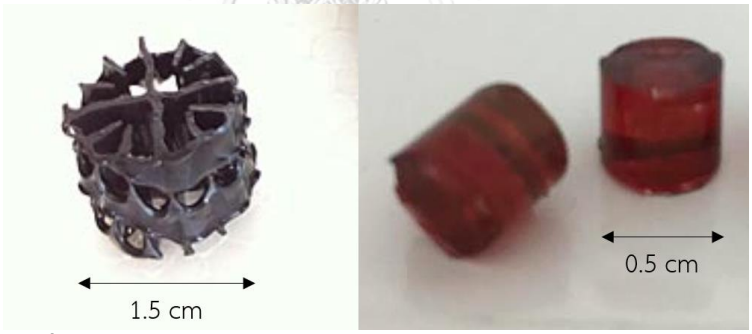
ทดสอบที่เลือกใช้คือ ตัวกรองชีวภาพชนิด BCN-012 ซึ่งทำจาก HDPE (มีความสามารถในการลอยน้ำ) และเม็ดอะคริลิคสีแดง (มีความสามารถในการจมตัว) ซึ่งมีขนาดดังรูปที่ 3.4 ให้อากาศในช่วง 0.5 - 2.5 ลิตร/นาที สังเกตรูปแบบการไหลและบันทึกวีดิโอ ทำการปรับเปลี่ยนรูปแบบของถังปฏิกรณ์ในส่วนดังต่อไปนี้ (1) ชนิดหัวจ่ายอากาศซึ่งทำการทดสอบ 2 ชนิด คือ หัวทรายแบบทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร และหัวทรายแบบทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร และสูง 3 เซนติเมตร (2) ขนาดของหัวจ่ายอากาศซึ่งใช้ 2 ขนาดคือ 2 และ 3 เซนติเมตร (3) ความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์ (h1) ซึ่งทำการทดสอบ 3 ค่าคือ ตำแหน่งหัวจ่ายอากาศติดกับก้นถัง ตำแหน่งที่ยกสูงขึ้น 1.5 เซนติเมตร และ ตำแหน่งที่ยกสูงขึ้น 3 เซนติเมตร (4) ระยะห่างระหว่างหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์ (h2) ซึ่งทำการทดสอบ 3 ค่า คือ หัวจ่ายอากาศติดกับท่อดราฟท์ หัวจ่ายอากาศห่างจากท่อดราฟท์ 1.5 เซนติเมตร และ 3 เซนติเมตร และ (5) ระยะห่างระหว่างท่อดราฟท์และระดับของเหลว (L) ซึ่งทำการทดสอบ 3 ค่า คือ ท่อดราฟท์ห่างจากระดับของเหลว (ก่อนเติมอากาศ) 3 5 และ 7 เซนติเมตร



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร (2 มิติ)



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร (3 มิติ)



รูปที่ 3.4 วัตถุทดสอบการไหล (ซ้าย: BCN-012 ขวา: เม็ดอะคริลิค)

3.3.2 ผลของอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R)

ดำเนินการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ตามวิธีการในหัวข้อที่ 3.1 จากนั้นผสมหัวเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร และ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปริมาตร 1.8 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่มีการปรับแต่งรูปแบบของถังให้มีการไหลวนดีที่สุด (จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.3.1) และมีการปรับค่า A_D/A_R แตกต่างกัน 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ 1.7 3.0 และ 5.6 ทำการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบทช์เป็นเวลา 15 วัน โดยใช้เฉดแสงสีขาวที่เหมาะสมจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 3.2 ที่ความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ มีการเติมอากาศด้วยอัตราคงที่ 0.8 วีวีเอ็ม

(1.6 ลิตร/นาที) และควบคุมอุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 15 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์

3.3.3 ผลของอัตราการไหล

ดำเนินการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ตามวิธีการในหัวข้อที่ 3.1 จากนั้นผสมหัวเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร และ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปริมาตร 1.8 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่มีการปรับแต่งรูปแบบของถังให้มีการไหลวนดีที่สุด (จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.3.1) และมีค่า A_D/A_R เหมาะสมที่สุด (จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.3.2) มีการเติมอากาศด้วยอัตราแตกต่างกัน 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ 0.5 วีวีเอ็ม (1 ลิตร/นาที) 0.8 วีวีเอ็ม (1.6 ลิตร/นาที) 1.25 วีวีเอ็ม (2.5 ลิตร/นาที) และ 1.6 วีวีเอ็ม (3.2 ลิตร/นาที) ทำการเพาะเลี้ยงในระบบแบบแบทช์เป็นเวลา 15 วัน โดยใช้เฉดแสงสีขาวที่เหมาะสมจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 3.2 ที่ความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ และควบคุมอุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 15 มิลลิลิตร ในแต่ละชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์

3.4 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีขนาดใหญ่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ดำเนินการเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ตามวิธีการในหัวข้อที่ 3.1 จากนั้นผสมหัวเชื้อปริมาตร 6 ลิตร และ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ปริมาตร 54 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร ซึ่งออกแบบโดยขยายกำลังการผลิตจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร โดยใช้ค่า A_D/A_R และรูปแบบการติดตั้งหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนเทียบกับความสูงของระดับของเหลวจากผลการทดลองในหัวข้อ 3.3.1 – 3.3.2 เพาะเลี้ยงแบบแบทช์เป็นเวลา 15 วัน ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการโดยใช้เฉดแสงสีขาวที่เหมาะสมจากผลการทดลองหัวข้อ 3.2 ที่ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 – 27 องศาเซลเซียส และมีอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมโดยอาศัยผลการทดลองจากหัวข้อ 3.3.3 ซึ่งเทียบต่อหน่วยปริมาตรถังปฏิกรณ์ (คำนวณต่อหน่วยวีวีเอ็ม) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 30 มิลลิลิตร เพื่อ

นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ นอกจากนี้ยังดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาน้ำหนักเซลล์แห้งดำเนินการตามวิธีการของ APHA (1998) โดยนำตัวอย่างน้ำ (5 มิลลิลิตร) มากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C แล้วจึงนำกระดาษกรองไปอบเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เปรียบเทียบน้ำหนักกระดาษกรองก่อนและหลังการอบ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (หน่วย: มิลลิกรัม/ลิตร) สามารถคำนวณได้จากสมการ น้ำหนักเซลล์แห้ง = (A-B) x (1,000/C) เมื่อ A คือ คือ น้ำหนักกระดาษกรองที่ผ่านการกรองหลังอบแห้ง (มิลลิกรัม) และ B คือ น้ำหนักกระดาษกรอง (มิลลิกรัม)และ C คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร) น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้รับสามารถนำไปคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_m) ได้จากสมการ $\mu_m = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1)$ เมื่อ X_1 และ X_2 คือ น้ำหนักเซลล์แห้งในระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่ระยะเวลา t_1 และ t_2 ตามลำดับ

3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์

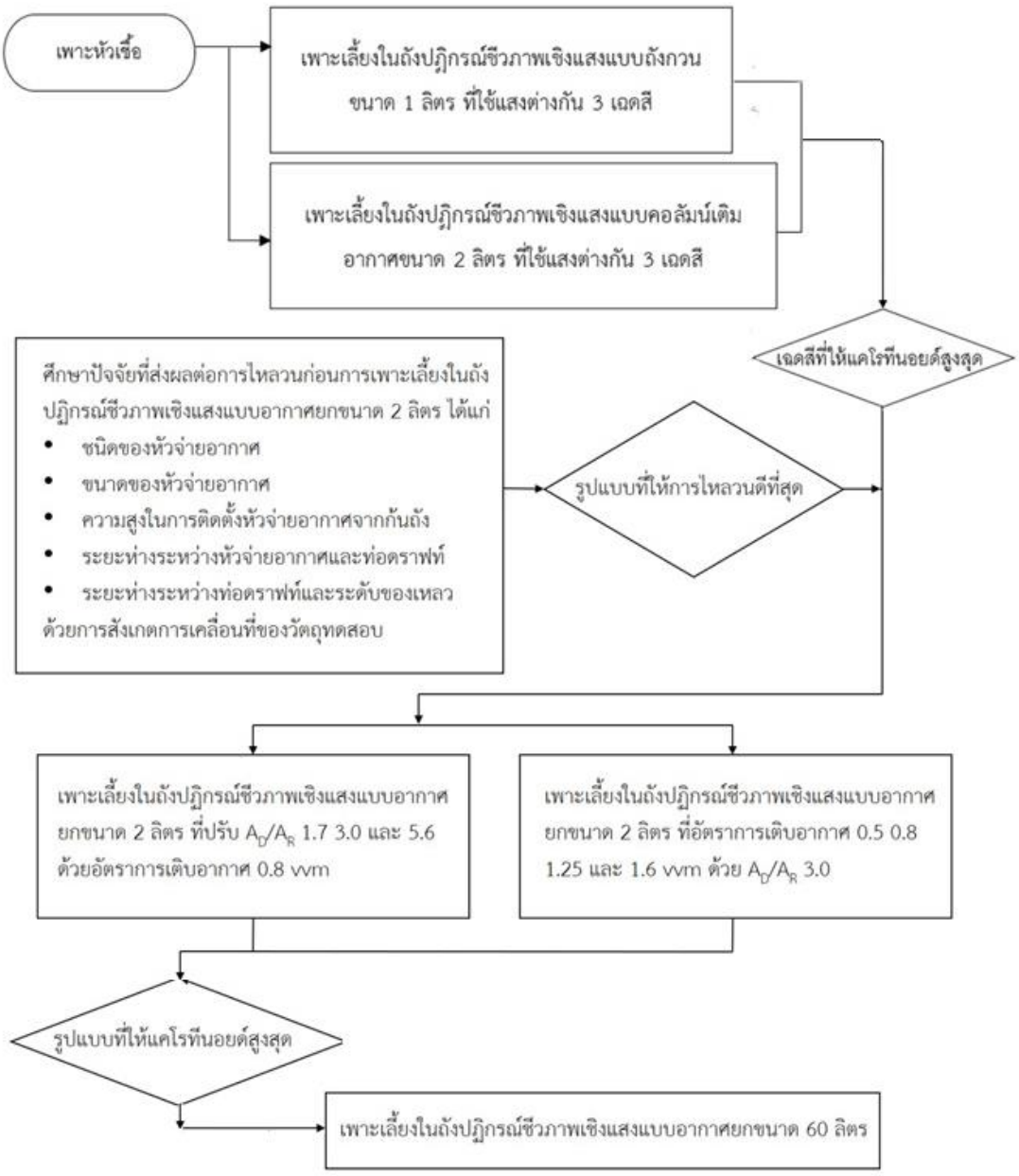
การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ดำเนินการตามวิธีการของ Strickland and Parsons (1972) โดยนำตัวอย่างน้ำประมาณ 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์แยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบดให้เซลล์แตกและเติมเมทานอลความเข้มข้น 99% โดยปริมาตร เพื่อสกัดคลอโรฟิลล์ สกัดจนสังเกตเห็นเซลล์ที่ใส แล้วนำตัวอย่างไปกรองก่อนนำของเหลวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 645 และ 630 นาโนเมตร ด้วย UV-Vis Spectrophotometer รุ่น PowerWave HT Microplate Spectrophotometer ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถคำนวณได้จากสมการ คลอโรฟิลล์เอ = $(11.6*E_{665}-1.31*E_{645}-0.014*E_{630})*V_a/V_b$ เมื่อ E_i คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ i นาโนเมตร และ V_a คือ ปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) และ V_b คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์ดำเนินการตามวิธีการของ Strickland and Parsons (1972) โดยใช้วิธีการเดียวกับการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ แต่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถคำนวณได้จากสมการ แคโรทีนอยด์รวม = $(4*E_{480})*V_a/V_b$ เมื่อ E_i คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ i นาโนเมตร และ V_a คือ ปริมาตรสารละลาย (มิลลิลิตร) และ V_b คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร) นอกจากนี้จะวิเคราะห์แยกชนิดของแคโรทีนอยด์และคำนวณหาปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด C-18 เฟสเคลื่อนเป็นแบบ isocratic ประกอบไปด้วย อะซิโตไนไตรล์ ไดคลอโรมีเทน เมทานอล และน้ำกลั่น (79.9, 10, 10, 0.1% โดยปริมาตรตามลำดับ) โดยมีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการฉีดตัวอย่างที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 452 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu ประกอบด้วย Photo-diode Array detector รุ่น SPD-M20A

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6 แผนผังสรุปการดำเนินการวิจัย



บทที่ 4

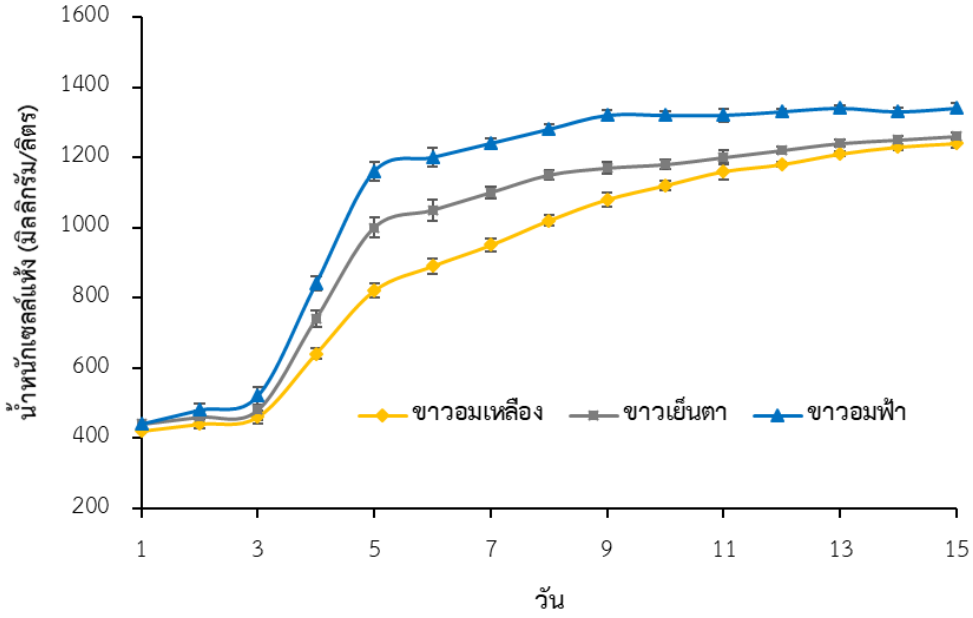
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ผลของอุณหภูมิสีของแสงขาวต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C.humicola*

4.1.1 การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน

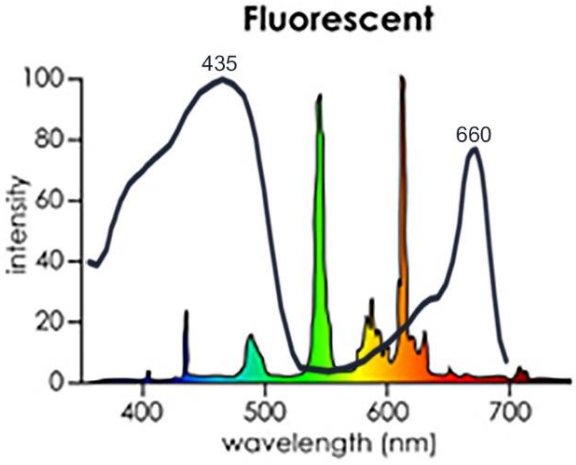
ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบกะ (Batch cultivation) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนซึ่งใช้ขวดแก้วดูแรนขนาด 1 ลิตร เป็นเวลา 15 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการให้อากาศที่อัตรา 45 ลิตร/ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส การปั่นกวน 300 รอบ/นาที และให้แสงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟแอลอีดีที่มีอุณหภูมิสีของแสงต่างกัน 3 เฉดสี (n = 3 ในแต่ละเฉดสี) คือ เฉดสีขาวอมเหลือง เฉดสีขาวเย็นตา และเฉดสีขาวอมฟ้า ผลการตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาวแต่ละเฉดสีมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน โดยในช่วงสามวันแรก น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากประมาณ 400 มิลลิกรัม/ลิตร ก่อนเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงวันที่ 3 – 5 หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลงจนค่อนข้างคงที่หลังจากวันที่ 13 น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่ซึ่งอยู่ในช่วงวันที่ 13 – 15 มีค่าเท่ากับ 1,340 ± 5.8 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับเฉดสีขาวอมฟ้า ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยเฉดสีขาวเย็นตาและเฉดสีขาวอมเหลืองซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,260 ± 10.0 และ 1,240 ± 15.3 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนของอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดซึ่งคำนวณจากข้อมูลการเติบโตระหว่างวันที่ 3 – 5 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวอมฟ้าจะให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.40 ± 0.05 วัน$^{-1}$ ซึ่งมากกว่าการใช้แสงสีขาวเย็นตา (0.36 ± 0.06 วัน$^{-1}$) และแสงสีขาวอมเหลือง (0.29 ± 0.04 วัน$^{-1}$) นอกจากนี้ข้อมูลการเติบโตที่ได้รับจากการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวอมฟ้ามีค่ามากกว่าผลการทดลองจากงานวิจัยในอดีตที่เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสกุลเดียวกันภายใต้แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสงใกล้เคียงกัน ซึ่งรายงานน้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 550 ± 10 มิลลิกรัม/ลิตร และ 0.35 วัน$^{-1}$ ตามลำดับ

(Wannasutthiwat , 2014) การเติบโตที่มีประสิทธิภาพมากกว่าในชุดทดลองที่ใช้เฉดสีขาวอมฟ้า คาดว่าเป็นผลจากหลอดแอลอีดีแบบสีขาวอมฟ้ามีช่วงความยาวคลื่นแสงที่หลากหลายกว่าหลอดฟลูออเรสเซนต์และหลอดแอดอีดีสีขาวเฉดสีอื่นดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 ทำให้จุลสาหร่ายซึ่งมีรงควัตถุที่หลากหลายได้รับแสงในช่วงที่เหมาะสมกับการดูดกลืนแสงของรงควัตถุแต่ละชนิดมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์สังเคราะห์แสงได้มากขึ้นและผลให้มีการเติบโตที่สูงกว่า

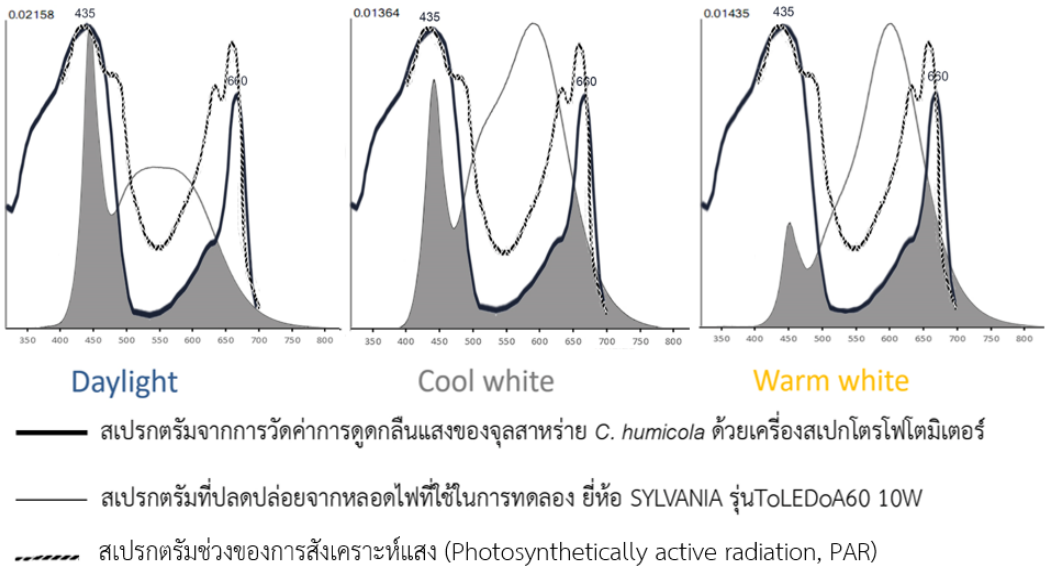


รูปที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



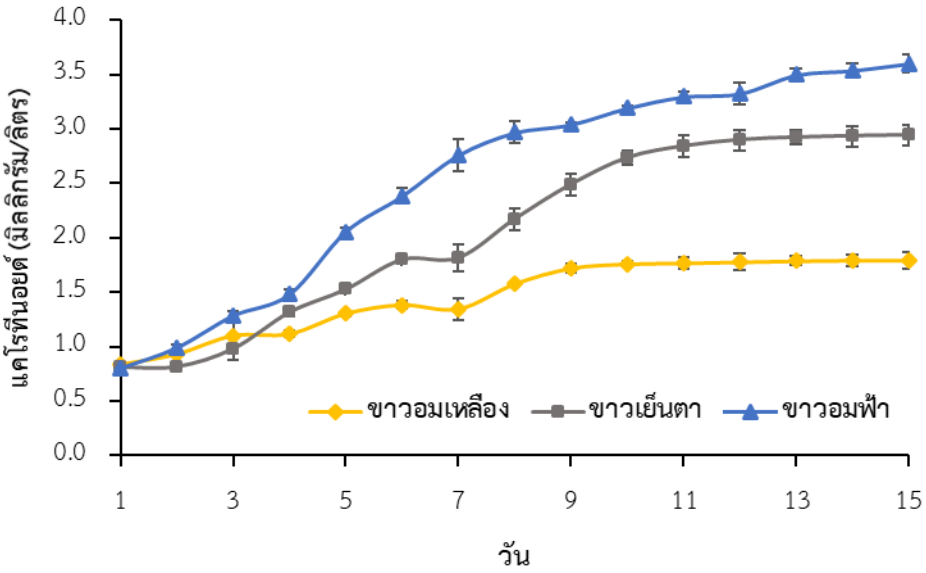
รูปที่ 4.2 สเปกตรัมของหลอดฟลูออเรสเซนต์ (Priest, 2015)



รูปที่ 4.3 สเปรกตรัมของหลอดแอดอีดีที่อุณหภูมิสีแตกต่างกันเปรียบเทียบกับสเปรกตรัมที่จุลสาหร่าย *C. humicola* ดูดกลืน (ข้อมูลสเปกตรัมจากบริษัท SYLVANIA ซึ่งเป็นผู้ผลิตหลอดแอลอีดี)

ในส่วนของการตรวจวัดความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอัตราที่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวที่แตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงด้วยแสงเฉดสีขาวอมฟ้าสามารถผลิตแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้เท่ากับ 3.55 ± 0.063 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าผลการเพาะเลี้ยงด้วยเฉดสีขาวเย็นตาและเฉดสีขาวอมเหลืองซึ่งได้รับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ 2.93 ± 0.050 และ 1.79 ± 0.023 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติชี้ว่าค่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ได้รับในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงด้วยเฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

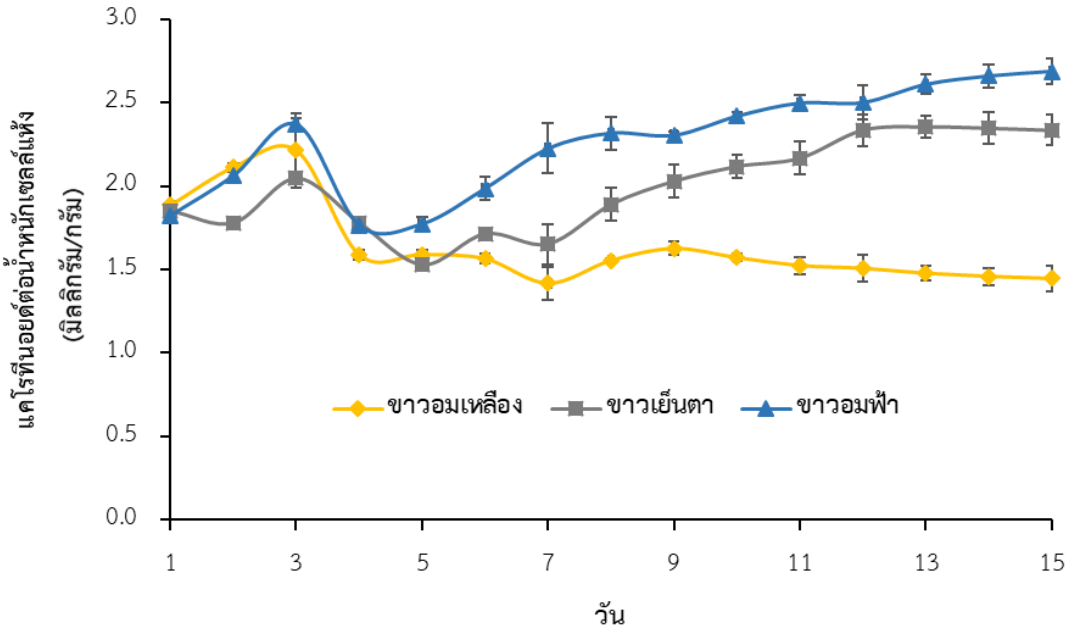
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน

รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเติบโตและการสะสมแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* จะเห็นว่าในช่วงหลังจากวันที่ 5 ชุดการทดลองที่ใช้แสงสีขาวอมฟ้ามีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งสูงสุดและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ใช้แสงสีขาวเย็นตา ขณะที่ในชุดการทดลองที่ใช้แสงสีขาวอมเหลืองมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 แสดงให้เห็นว่าสาเหตุที่ทำให้ชุดการทดลองที่ใช้แสงสีขาวอมฟ้าและแสงสีขาวเย็นตามีปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา (รูปที่ 4.4) นั้นเกิดขึ้นจากจุลสาหร่ายสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มขึ้นรวมถึงผลของปริมาณเซลล์ของจุลสาหร่ายที่มากขึ้นเช่นกัน ส่วนชุดการทดลองที่ใช้แสงสีขาวอมเหลืองปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลานั้นเกิดขึ้นจากปริมาณเซลล์ของจุลสาหร่ายที่เพิ่มขึ้นเป็นหลัก ซึ่งการสะสมของแคโรทีนอยที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใช้แสงเฉดสีขาวอมฟ้าคาดว่าเป็นผลจากแสงสีขาวอมฟ้ามีความยาวคลื่นช่วงสีน้ำเงิน (400-500 นาโนเมตร) เด่นกว่าความยาวคลื่นช่วงอื่น ขณะที่แสงสีขาวอมเหลืองมีความยาวคลื่นช่วงสีน้ำเงินต่ำและเด่นในช่วงสีเขียวเหลือง (550-600 นาโนเมตร) ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งช่วงการดูดกลืนแสงของแคโรทีนอยด์นั้นอยู่ในช่วงสีน้ำเงิน (400-550 นาโนเมตร) เมื่อจุลสาหร่ายได้รับการกระตุ้นจากแสงในช่วงที่เหมาะสมต่อการดูดกลืนแสงของแคโรทีนอยด์ส่งผลให้มีการผลิตแคโรทีนอยด์มากขึ้น และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Phuphaibul (2016) ที่เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ด้วยแสงสีน้ำเงิน 5,000 ลักซ์ ให้ผลการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด

(เมื่อเปรียบเทียบกับแสงสีแดงและแสงสีขาว) แต่การเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีน้ำเงินเพียงอย่างเดียวให้ผลการเติบโตต่ำกว่าแสงสีแดงและแสงสีขาว ส่งผลต่อความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวอมฟ้าที่สามารถทำให้จุลสาหร่ายเติบโตได้ดีและสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ต่อเซลล์ได้ดี จึงให้ผลความเข้นข้นของแคโรทีนอยด์ที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีน้ำเงินเพียงอย่างเดียว

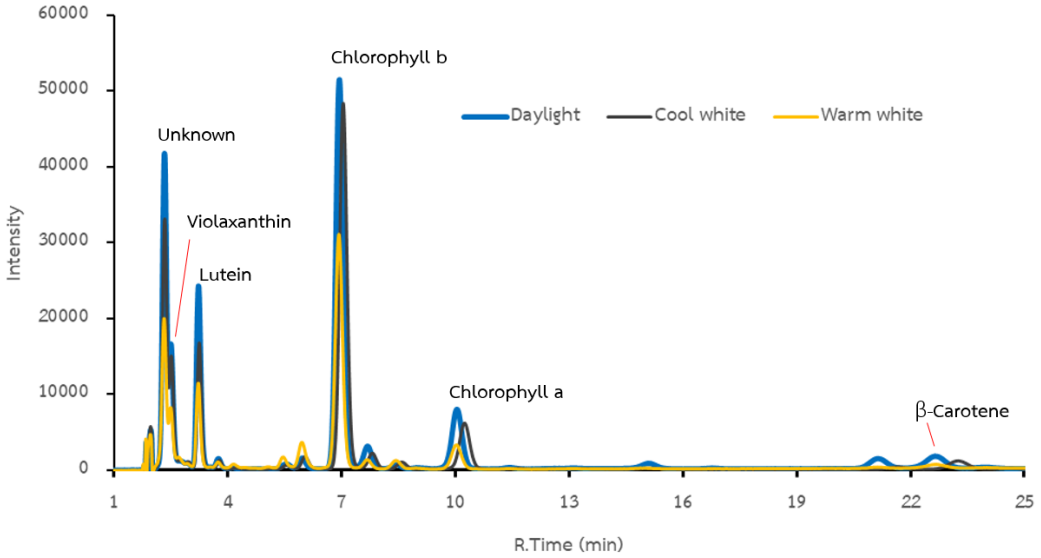


รูปที่ 4.5 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.6 แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC ของตัวอย่างชีวมวลจุลสาหร่าย *C. humicola* ในวันที่ 15 ของการทดลอง ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาวแต่ละเฉดสี จะเห็นว่าโครมาโทแกรมของแต่ละชุดการทดลองมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ในการระบุชนิดของแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์อาศัยการเปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC (รูปที่ 4.8) กับข้อมูลสเปกตรัมที่ใช้สำหรับจำแนกชนิดของรงควัตถุจากหนังสือ Phytoplankton pigments in oceanography : Guidelines to modern methods (R.F.C. Mantoura and S.W. Wright, 1997) โดยพีคที่เด่นชัดและสามารถระบุชนิด ได้แก่ วิโอลาแซนทิน (Violaxanthin) ที่เวลา 2.5 นาที ลูทีน (Lutein) ที่เวลา 3.2 นาที คลอโรฟิลล์บี (Chlorophyll b) ที่เวลา 6.9 นาที คลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll a) ที่เวลา 10.0 นาที และ เบต้า-แคโรทีน (Beta-carotene) ที่เวลา 23.5 นาที ซึ่งพบแคโรทีนอยด์ วิโอลาแซนทินประมาณ 18 – 20% ลูทีนประมาณ 20 – 25% และ เบต้า-แคโรทีนป

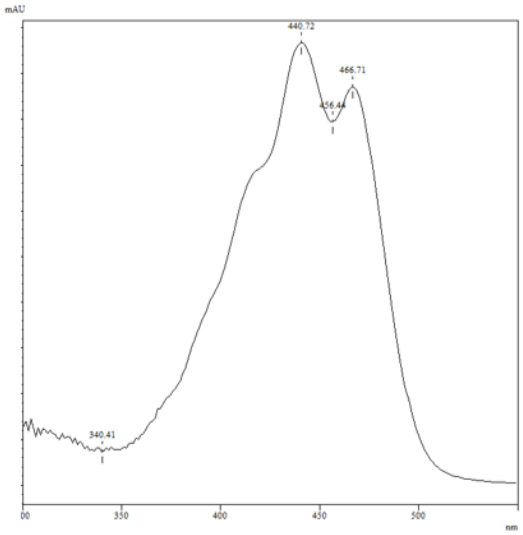
ระมาณ 3 – 7% ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด อย่างไรก็ตามพบว่ามีแคโรทีนอยด์ถึงประมาณ 46 – 51% ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ตรวจพบสเปกตรัมแต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ (Unknown) และมีแคโรทีนอยด์อีกประมาณ 3 – 5% ที่ตรวจพบพีคแต่ไม่พบสเปกตรัมที่ชัดเจนจึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้เช่นกัน



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของตัวอย่างจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวน จากเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร

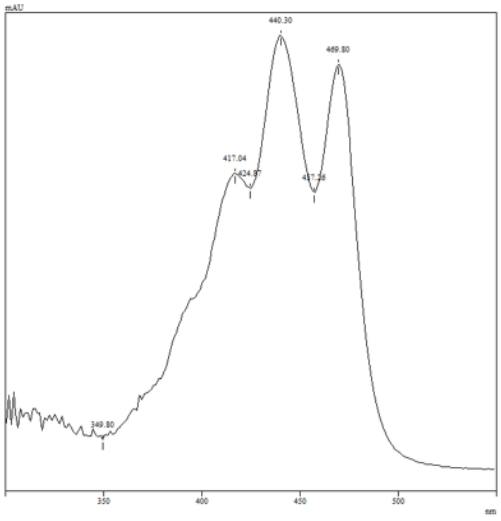
ตารางที่ 4.1 ชนิดของแคโรทีนอยด์จากการวิเคราะห์ HPLC จากตัวอย่างชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแสงขาวที่แตกต่างกัน (แสดงการคำนวณในภาคผนวก ค.)

แคโรทีนอยด์	% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด		
	ขาวอมฟ้า	ขาวเย็นตา	ขาวอมเหลือง
Unknown	47.41	50.76	51.18
Violaxanthin	16.34	16.82	18.66
Lutein	24.93	22.39	19.22
Beta-carotene	5.89	5.07	3.51
อื่นๆ	5.42	4.96	7.42



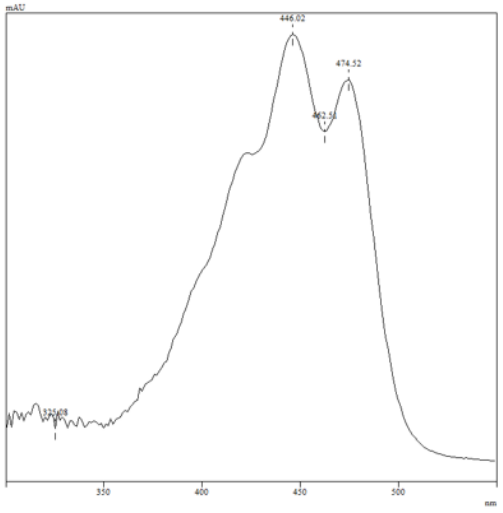
Unknown

Retention time : 2.329 min



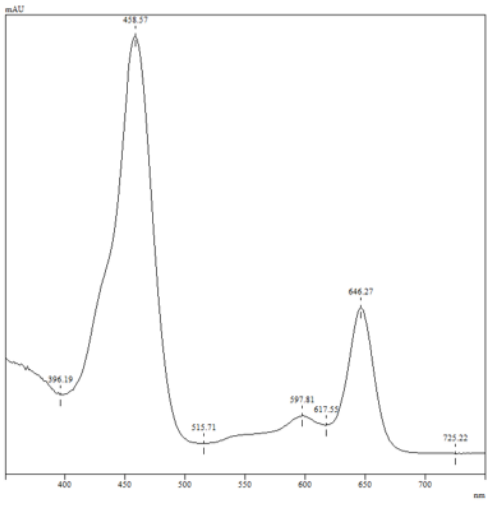
Violaxanthin

Retention time : 2.498 min



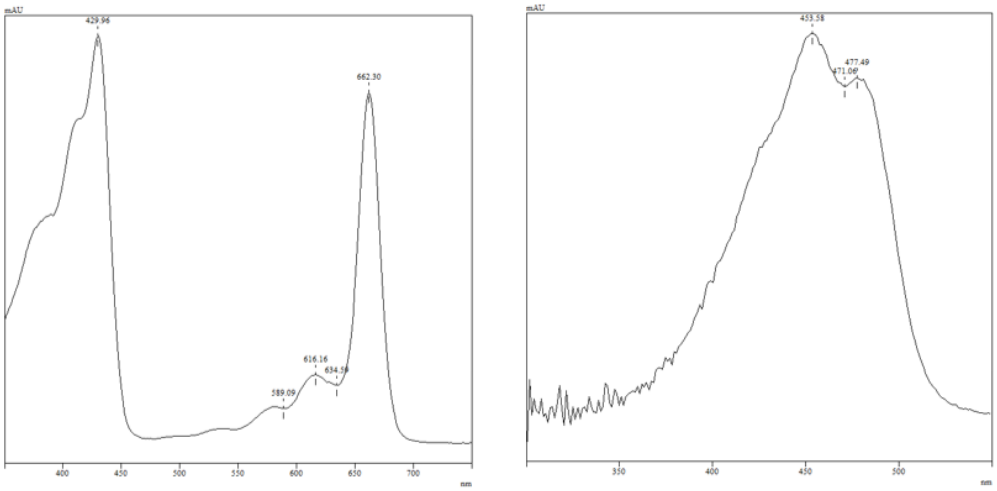
Lutein

Retention time : 3.226 min



Chlorophyll b

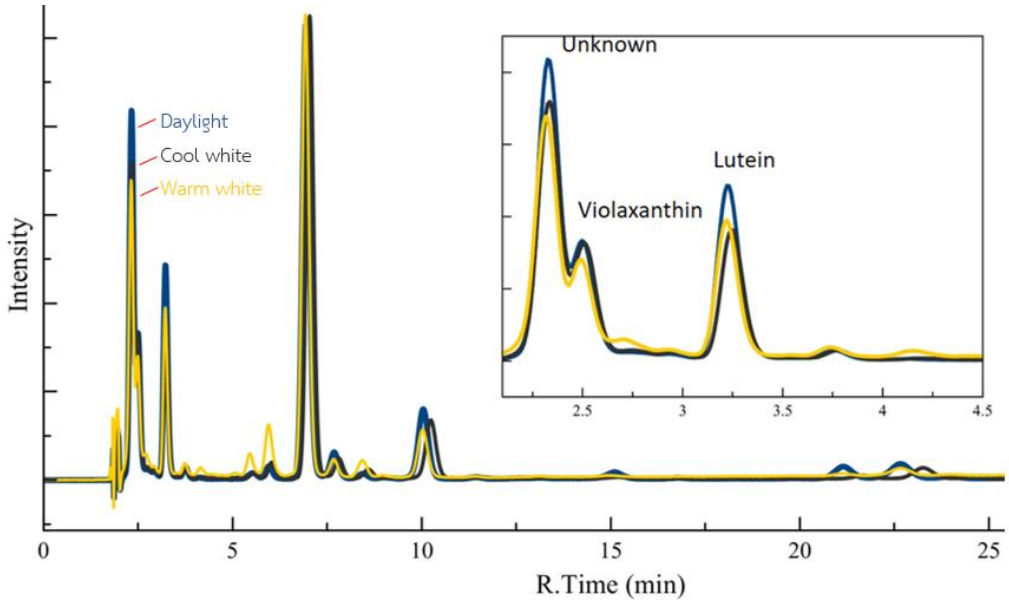
Retention time : 6.940 min



รูปที่ 4.7 สเปกตรัมของแต่ละพีคจากเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร

รูปที่ 4.8 แตกต่างจากรูปที่ 4.6 โดยพิจารณาในเชิงของอัตราส่วนที่ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์บีเท่ากันทุกชุดการทดลอง จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในภาพรวมของแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกัน โดยที่ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวอมฟ้ามีความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดสูงสุด ในขณะที่ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงในด้วยแสงสีขาวเย็นตาและแสงสีขาวอมเหลืองมีความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูงสุดจากการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวอมฟ้านั้นเกิดขึ้นจากทั้งผลของอัตราการเติบโตที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆและผลของแสงที่เพิ่มความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อหน่วยเซลล์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



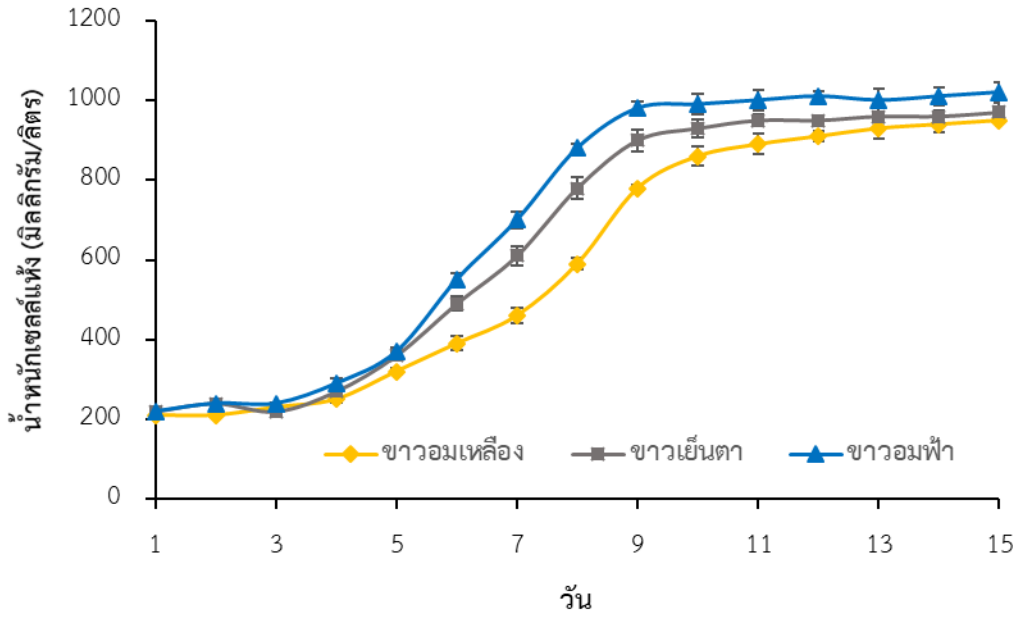
รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมจากเครื่อง HPLC ที่ 452 นาโนเมตร เมื่อความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์บีเท่ากันทุกชุดการทดลอง

4.1.2 การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ

เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 15 วัน ด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน BG-11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เติมหัวเชื้ออายุหนึ่งสัปดาห์ (200 มิลลิลิตร) และอาหารเลี้ยงเชื้อ (1,800 มิลลิลิตร) ลงในถังปฏิกรณ์ ที่มีการให้อากาศผ่านตัวกรองด้วยอัตรา 1.6 ลิตร/นาที สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟแอลอีดี ที่มีอุณหภูมิสีของแสงต่างกัน 3 เฉดสี (n = 3 ในแต่ละเฉดสี) คือ เฉดสีขาวอมเหลือง เฉดสีขาวเย็นตา และเฉดสีขาวอมฟ้า ระหว่างการทดลองได้เก็บตัวอย่างน้ำ (15 มิลลิลิตร) จากทุกชุดการทดลองทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักแห้งเซลล์และปริมาณแคโรทีนอยด์

จากรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าผลของอุณหภูมิสีของแสงนั้นส่งผลต่อการเติบโตของจุลสาหร่าย *C. humicola* โดยมีแนวโน้มในลักษณะคล้ายคลึงกับผลจากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบถังกวน ในช่วงสี่วันแรก น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากประมาณ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ก่อนจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงวันที่ 4 – 8 หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลงจนค่อนข้างคงที่หลังจากวันที่ 13 ค่าเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,010 ± 5.8 มิลลิกรัม/ลิตร

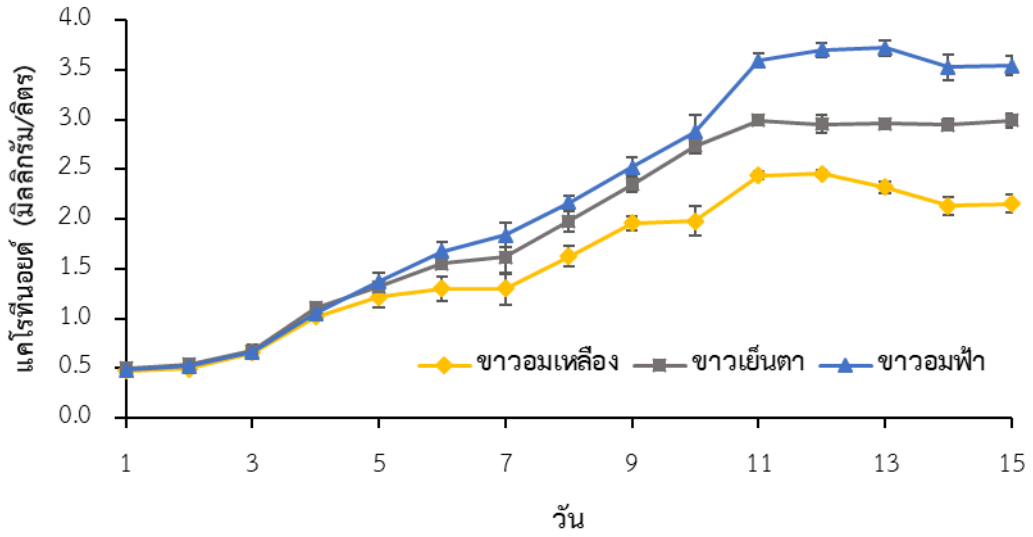
สำหรับเฉดสีขาวอมฟ้า ซึ่งมีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เฉดสีขาวเย็นตาและเฉดสีขาวอมเหลืองที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 960 ± 5.1 และ 940 ± 5.8 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนของอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดซึ่งคำนวณจากข้อมูลการเติบโตระหว่างวันที่ 4 – 8 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวอมฟ้าจะให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.32 ± 0.01 วัน$^{-1}$ ซึ่งมากกว่าการใช้แสงสีขาวเย็นตา (0.30 ± 0.02 วัน$^{-1}$) และแสงสีขาวอมเหลือง (0.26± 0.03 วัน$^{-1}$) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนพบว่ามีอัตราการเติบโตที่ลดลง อาจเนื่องมาจากถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เติมอากาศนั้นมีขนาดที่ใหญ่กว่าซึ่งอาจทำให้เซลล์ได้รับแสงที่ทั่วถึงได้น้อยกว่าประกอบกับมีเพียงการให้อากาศเท่านั้นที่ช่วยในการผสมภายในถังทำให้ความสามารถในการได้รับแสงและอาหารลดน้อยลง จึงควรติดหัวจ่ายอากาศที่ช่วยให้มีการกระจายตัวของอากาศและเกิดการไหลเวียนภายในถังได้มากขึ้น



รูปที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ

รูปที่ 4.10 แสดงความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์เติมอากาศ จะเห็นว่าแต่ละชุดการทดลอง ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอัตราที่แตกต่างกัน และมีอัตราการผลิตที่ช้าลงหลังวันที่ 10 โดยที่การเพาะเลี้ยงด้วยแสงเฉดสีขาวอมฟ้าสามารถผลิตแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 3.5 ± 0.1 มิลลิกรัม/

ลิตร ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงด้วยเฉดสีขาวเย็นตา (2.9 ± 0.07 มิลลิกรัม/ลิตร) และเฉดสีขาวอมเหลือง (2.2 ± 0.09มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมีแนวโน้มและความเข้มของแคโรทีนอยด์ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบถังกวน



รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้เฉดแสงสีขาวที่แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อพิจารณจากการเพาะเลี้ยงทั้งสองรูปแบบของถังปฏิกรณ์ให้ข้อสรุปว่าแสงสีขาวอมฟ้าให้ผลการผลิตแคโรทีนอยด์และมีการเติบโตของจุลสาหร่ายดีที่สุด จึงนำแสงสีขาวอมฟ้ามาใช้ในการเพราะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกต่อไป

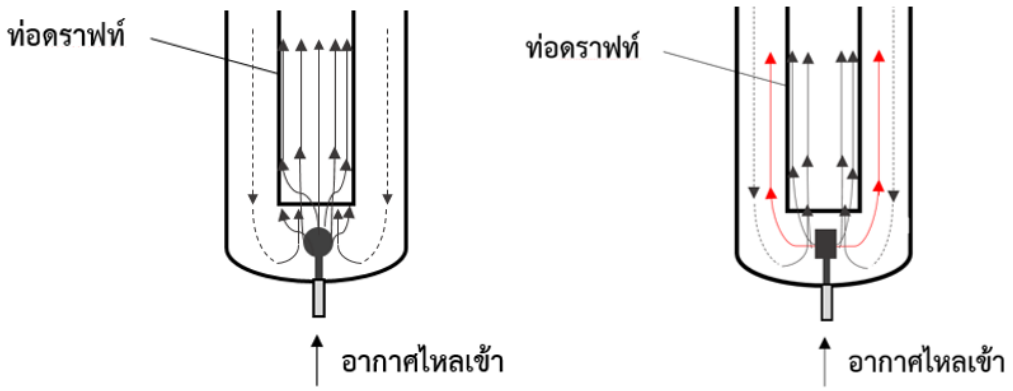
4.2 การปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola*

4.2.1 ความสามารถในการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกเบื้องต้นก่อนทำการเพาะเลี้ยง

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่มีการปรับเปลี่ยนรูปแบบของถังปฏิกรณ์ ด้วยการสังเกตรูปแบบการไหลของวัตถุทดสอบ 2 ชนิด คือ ตัวกรองชีวภาพชนิด BCN-012 และเม็ดอะคริลิค โดยวัตถุทดสอบที่เลือกใช้จะแสดงผลของรูปแบบการไหลแตกต่างกัน ซึ่งการไหลของของเหลวที่ดีคือ การไหลในทิศทางลง (Downcomer) สามารถทำให้ตัวกรองชีวภาพชนิด BCN-012 ที่ลอยน้ำได้เกิดการจมตัวและเกิดการไหลวน ขณะที่การไหลของของเหลวในทิศทางขึ้น (Riser) สามารถทำให้เม็ดอะคริลิคที่จมน้ำเกิดการไหลขึ้นสู่ด้านบนได้เนื่องจากผลของแรงยก เมื่อเปรียบเทียบวัตถุทดสอบกับจุลสาหร่ายที่มีขนาดเล็กกว่า การไหลวนที่สามารถผลักดันให้ BCN-012 จมตัวและเม็ดอะคริลิคขึ้นสู่ด้านบนย่อมสามารถทำให้จุลสาหร่ายไหลวนได้เช่นกัน

1) ชนิดหัวจ่ายอากาศ (หัวทรายทรงกลม และ หัวทรายทรงกระบอก)

หัวทรายแบบทรงกลมสามารถกระจายอากาศในทิศทางที่หลากหลายกว่าหัวทรายทรงกระบอก เนื่องจากหัวทรายทรงกระบอกมีการกระจายอากาศเฉพาะด้านข้างเท่านั้น (ไม่มีการกระจายอากาศจากด้านบน) ดังรูปที่ 4.11 ส่งผลให้การกระจายอากาศในส่วนของ Riser น้อยกว่าการกระจายอากาศด้วยหัวทรายทรงกลม และยังเกิดโอกาสที่ฟองอากาศจะเล็ดลอดออกจากส่วนของ Riser สู่ Downcomer อันทำให้การไหลวนภายในถังลดลง



รูปที่ 4.11 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ชนิดของหัวจ่ายอากาศแตกต่างกัน

2) ขนาดของหัวจ่ายอากาศ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 และ 3 เซนติเมตร)

จากผลการทดสอบการไหลวนที่มีการปรับเปลี่ยนชนิดของหัวจ่ายอากาศที่แตกต่างกัน หัวจ่ายอากาศแบบหัวทรายทรงกลมให้ผลการไหลวนที่ดีกว่าจึงเลือกนำหัวทรายทรงกลมที่มีขนาดแตกต่างกันมาทำการทดสอบการไหลวน ผลปรากฏว่า หัวจ่ายอากาศที่มีขนาด 3 เซนติเมตรสามารถกระจายตัวของอากาศได้กว้างกว่าขนาด 2 เซนติเมตร ซึ่งในกรณีที่ติดตั้งท่อดราฟท์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร หัวจ่ายอากาศขนาด 3 เซนติเมตร สามารถกระจายอากาศได้ดีกว่า 2 เซนติเมตร แต่ในกรณีที่ติดตั้งท่อดราฟท์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 และ 3.5 เซนติเมตร หัวจ่ายอากาศขนาด 3 เซนติเมตรมีโอกาสทำให้อากาศเล็ดลอดออกจากส่วน Riser สู่ Downcomer ทำให้การไหลวนลดลง (เมื่อติดตั้งหัวจ่ายอากาศติดกับท่อดราฟท์หรือระยะ h2=0) ดังนั้นเพื่อความเหมาะสมในการดำเนินการทดลองขั้นถัดไปจึงเลือกใช้หัวจ่ายอากาศขนาด 2 เซนติเมตร

3) ความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์ (h1)

ทำการทดสอบการไหลวนด้วยการปรับเปลี่ยนความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์ที่ตำแหน่งหัวจ่ายอากาศติดกับก้นถัง (h1=0) ตำแหน่งที่ยกสูงขึ้น 1.5 เซนติเมตร (h1=1.5) และตำแหน่งที่ยกสูงขึ้น 3 เซนติเมตร (h1=3) ผลการไหลวนของ BCN-12 และเม็ดอะคริลิค แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยรอบของการไหลวนคือการเคลื่อนที่ของวัตถุทดสอบจากตำแหน่งเริ่มต้นผ่านส่วนของ Riser และ Downcomer จนกลับมาตำแหน่งเดิม ที่อัตราการไหลของอากาศ 2.5 ลิตร/นาที และ A_D/A_R เท่ากับ 3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

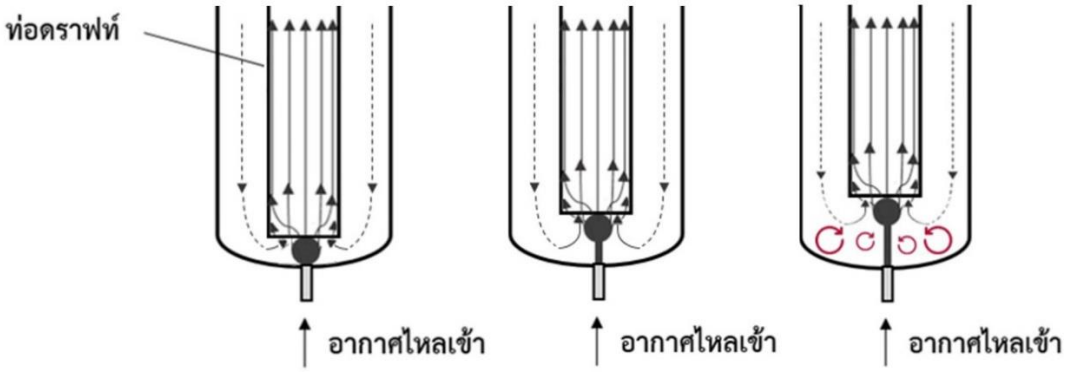
ตารางที่ 4.2 การไหลวนที่ความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์ที่แตกต่างกัน

วัตถุทดสอบ	อัตราการไหลวนเฉลี่ย (รอบ/นาที)		
	h1= 0 cm	h1= 1.5 cm	h1= 3 cm
BCN-12	7± 0.58^{c}	9± 1.53^{b}	11± 1.53^{a}
เม็ดอะคริลิค	7± 1.53^{b}	10± 1.53^{a}	1± 0.58^{c}

a b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05)

จากตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาการไหลวนของวัตถุทดสอบทั้งสองชนิดจะเห็นได้ว่าความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศที่ทำให้วัตถุทดสอบมีการไหลวนดีที่สุดคือ ตำแหน่งที่ยกสูงขึ้น 1.5 เซนติเมตร

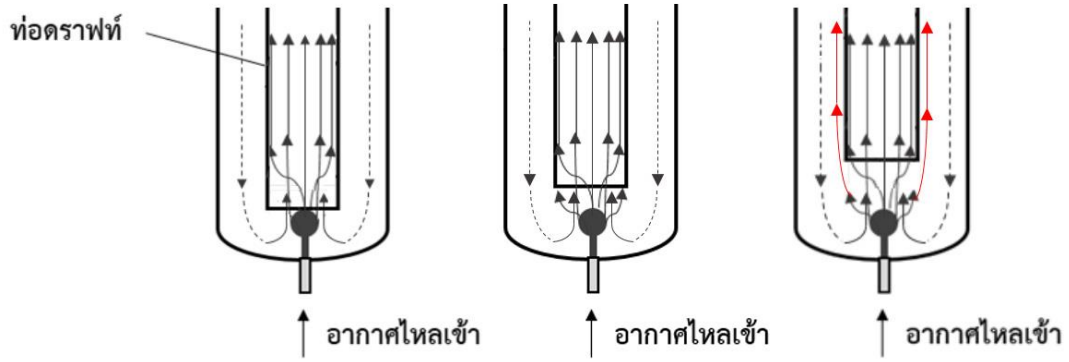
จากรูปที่ 4.12 ที่ตำแหน่งหัวจ่ายอากาศติดกับก้นถังและที่ตำแหน่งยกสูงขึ้น 3 เซนติเมตร จะเกิดแรงยกที่ต่ำกว่าทำให้เม็ดอะคริลิคที่มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำลอยขึ้นตามการไหลขึ้นของน้ำ (Riser) ได้ยากกว่าจึงเกิดการไหลวนที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ยังสังเกตพบมุมอับที่ทำให้เม็ดอะคริลิคไม่สามารถลอยขึ้นได้เมื่อติดตั้งหัวจ่ายอากาศที่ตำแหน่งสูงขึ้น 3 เซนติเมตร ขณะที่ BCN-12 มีอัตราการไหลวนที่ดีขึ้นเมื่อเพิ่มระยะความสูง แสดงให้เห็นว่า BCN-12 ซึ่งมีความหนาแน่นต่ำกว่าน้ำหรือสามารถลอยได้น้ำได้รับผลจากการไหลลงของน้ำ (Downcomer) ที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความสูงของหัวจ่ายอากาศ



รูปที่ 4.12 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์แตกต่างกัน

4) ระยะห่างระหว่างหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์ (h2)

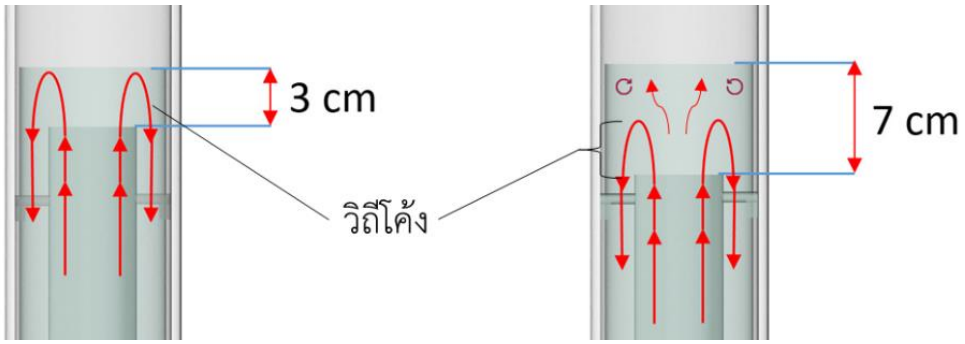
ทำการทดสอบการไหลวนด้วยการปรับเปลี่ยนระยะห่างระหว่างหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์ที่ หัวจ่ายอากาศติดกับท่อดราฟท์ (h2=0) หัวจ่ายอากาศห่างจากท่อดราฟท์ 1.5 เซนติเมตร (h2=1.5) และ 3 เซนติเมตร (h2=3) แสดงผลดังรูปที่ 4.13 โดยที่หัวจ่ายอากาศติดกับท่อดราฟท์และหัวจ่ายอากาศห่างจากท่อดราฟท์ 1.5 เซนติเมตร ให้ผลการไหลวนของวัตถุทดสอบที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไม่ทำให้เกิดการเล็ดลอดของฟองอากาศจากส่วนของ Riser สู่ Downcomer ขณะที่ระยะห่างหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์ 3 เซนติเมตรให้การไหลวนที่ต่ำที่สุดเนื่องจากเกิดการเหลื่อมล้ำของฟองอากาศ



รูปที่ 4.13 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ระยะห่างระหว่างหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์แตกต่างกัน

5) ระยะห่างระหว่างท่อดราฟท์และระดับของเหลว (L)

ทำการทดสอบการไหลวนด้วยการปรับเปลี่ยนระยะห่างระหว่างท่อดราฟท์และระดับของเหลวที่ ท่อดราฟท์ห่างจากระดับของเหลว (ก่อนเติมอากาศ) 3 5 และ 7 เซนติเมตร แสดงผลดังรูปที่ 4.14 เมื่อเพิ่มอัตราการเติมอากาศ จาก 0.5 – 2.5 ลิตร/นาที สังเกตเห็นวิถีโค้งของการเคลื่อนที่ของวัตถุทดสอบ (จากส่วน Riser สู่ Downcomer) ที่สูงขึ้น โดยที่อัตราการเติมอากาศ 2.5 ลิตร/นาที ส่งผลเกิดให้วิถีโค้งสูงสุด ที่ความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร (เริ่มวัดจากปลายส่วนยอดของท่อดราฟท์) ซึ่งที่ระยะห่างจากระดับของเหลว 3 5 และ 7 เซนติเมตร ให้ความสูงของวิถีโค้งที่เท่ากัน ส่งผลให้ที่ระยะห่างจากระดับของเหลว 5 และ 7 เซนติเมตร เกิดการหลุดออกจากวิถีโค้งของวัตถุทดสอบและเกิดเป็นมุมอับขึ้นบริเวณใกล้ผิวของเหลวสังเกตได้จาก BCN-12 จมตัวได้ยากขึ้น ดังนั้นที่ระยะห่างจากระดับของเหลว 3 เซนติเมตรจึงให้การไหลวนที่ดีกว่า



รูปที่ 4.14 การทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ระยะห่างระหว่างท่อดราฟท์และระดับของเหลวแตกต่างกัน

จากการทดสอบการไหลวนสามารถสรุปผลที่จะนำไปใช้ในการดำเนินการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายดังตารางที่ 4.3 และสามารถนำผลที่ได้มาคำนวณหาความยาวของท่อดราฟท์ที่เหมาะสมได้เท่ากับ 26 – 27 เซนติเมตร

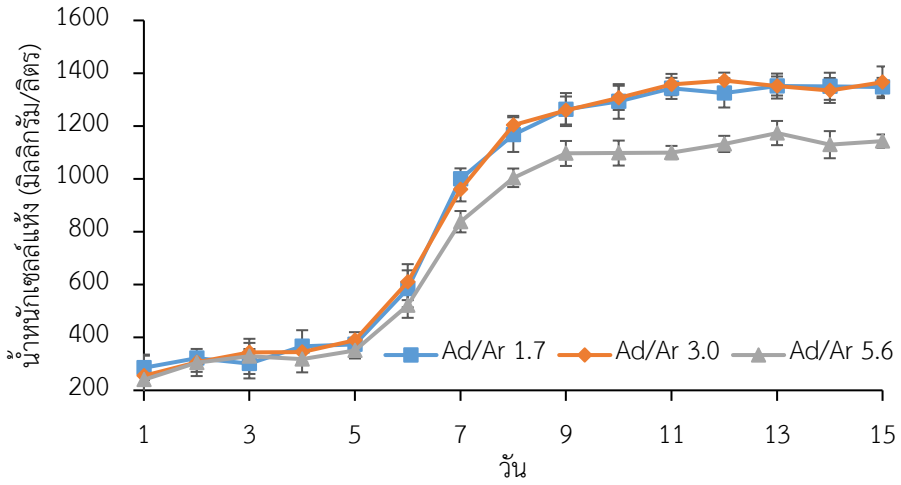
ตารางที่ 4.3 สรุปผลการทดสอบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก

ปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบ	ผลที่เหมาะสม
ชนิดหัวจ่ายอากาศ	หัวทรายแบบทรงกลม
ขนาดของหัวจ่ายอากาศ	2 เซนติเมตร
ความสูงในการติดตั้งหัวจ่ายอากาศจากก้นถังปฏิกรณ์ (h1)	1.5 เซนติเมตร
ระยะห่างระหว่างหัวจ่ายอากาศและท่อดราฟท์ (h2)	0 – 1.5 เซนติเมตร
ระยะห่างระหว่างท่อดราฟท์และระดับของเหลว (L)	3 เซนติเมตร

4.2.2 ผลของอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R)

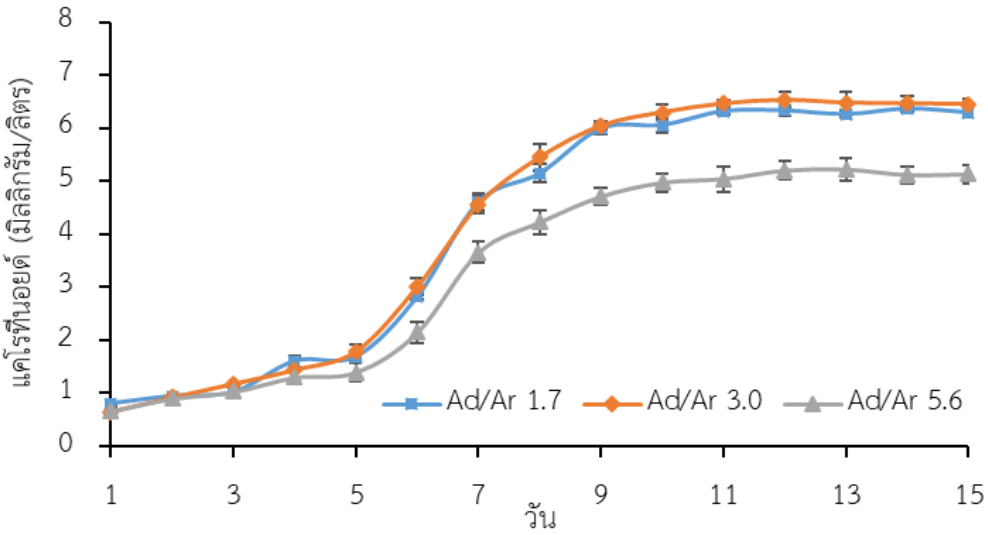
ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบกะ (Batch cultivation) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่มีการไหลวนดีที่สุดจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.2.1 โดยในแต่ละชุดการทดลองมีการปรับอัตราส่วน A_D/A_R แตกต่างกัน 3 ค่า คือ 1.7 3.0 และ 5.6 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มีการให้อากาศที่อัตรา 0.8 วีวีเอ็ม (1.6 ลิตร/นาที) อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟแอลอีดีที่มีอุณหภูมิสีของแสงเหมาะสมที่สุดจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 (แสงสีขาวอมฟ้า) ผลการตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.15 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกันมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน โดยในช่วงสี่วันแรก น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากประมาณ 250 – 350 มิลลิกรัม/ลิตร ก่อนเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงวันที่ 5 – 8 หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลงจนค่อนข้างคงที่หลังจากวันที่ 11 น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่ซึ่งอยู่ในช่วงวันที่ 11 – 15 มีค่าเท่ากับ 1,340 ± 12.24 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับ A_D/A_R เท่ากับ 1.7 ซึ่งใกล้เคียงกับที่ A_D/A_R เท่ากับ 3 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,360± 16.73 มิลลิกรัม/ลิตร และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยถังปฏิกรณ์ที่มี A_D/A_R เท่ากับ 5.6 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วง

การเติบโตคงที่เท่ากับ 1,130 ± 25.10 มิลลิกรัม/ลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเพาะเลี้ยงที่ A_D/A_R เท่ากับ 1.7 และ 3 ($p < 0.05$) ในส่วนของอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดซึ่งคำนวณจากข้อมูลการเติบโตระหว่างวันที่ 5 – 8 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยถังปฏิกรณ์ที่มี A_D/A_R เท่ากับ 1.7 จะให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.36 ± 0.01 วัน$^{-1}$ ซึ่งใกล้เคียงกับที่ A_D/A_R เท่ากับ 3 (0.37 ± 0.02 วัน$^{-1}$) และที่ A_D/A_R เท่ากับ 5.6 (0.34 ± 0.02 วัน$^{-1}$)



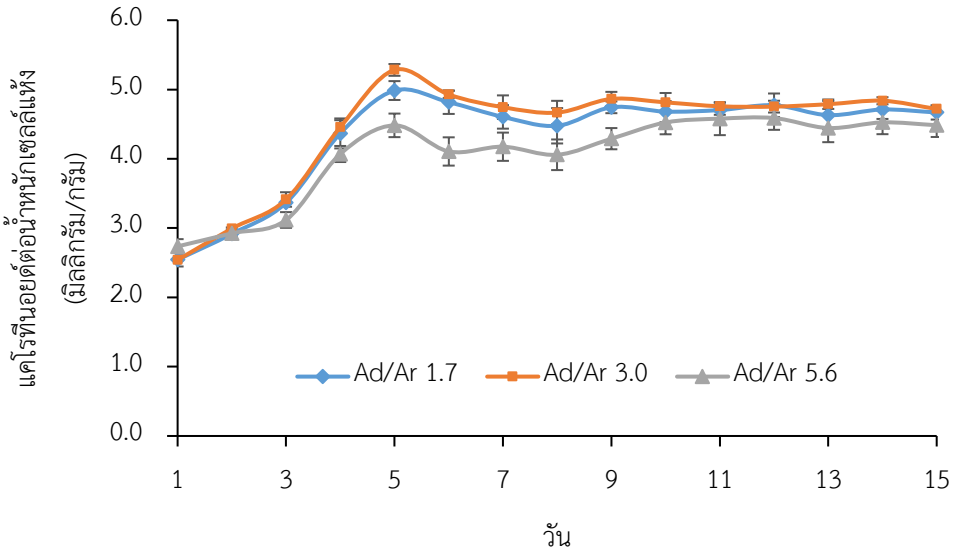
รูปที่ 4.15 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน

ในส่วนของการตรวจวัดความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.16 พบว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอัตราที่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่ปรับค่า A_D/A_R แตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงที่ค่า A_D/A_R เท่ากับ 3 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงที่สุดและได้เท่ากับ 6.45 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าผลการเพาะเลี้ยงค่า A_D/A_R เท่ากับ 1.7 เพียงเล็กน้อยและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งได้ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ 6.30 ± 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ A_D/A_R เท่ากับ 5.6 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งได้ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ 5.14 ± 0.07 มิลลิกรัม/ลิตร



รูปที่ 4.16 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน

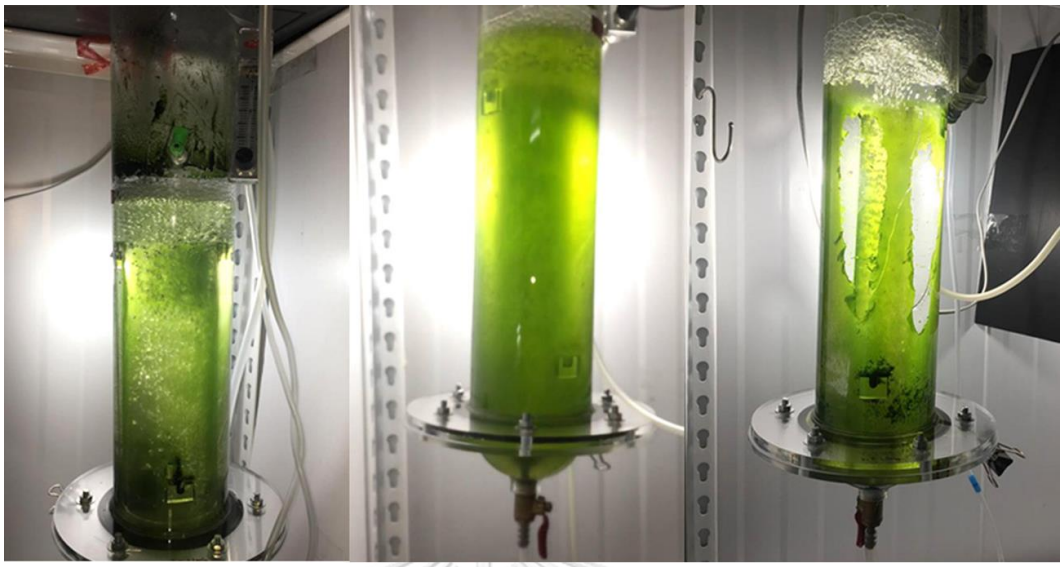
ในส่วนของปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งซึ่งแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่ปรับค่า A_D/A_R แตกต่างกัน โดยในช่วง 5 วันแรกเซลล์มีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งชุดการทดลองที่ใช้ A_D/A_R เท่ากับ 5.6 มีการสะสมแคโรทีนอยด์ในอัตราที่ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้ A_D/A_R เท่ากับ 1.7 และ 5.6 เล็กน้อย หลังจากนั้นการสะสมแคโรทีนอยด์เริ่มคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง และการผลิตแคโรทีนอยด์ในอัตราที่ใกล้เคียงกันมากขึ้นในช่วงวันที่ 10 – 15 ซึ่งมีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย 4.69 ± 0.05 4.78 ± 0.04 และ 4.52 ± 0.05 มิลลิกรัม/กรัม สำหรับที่ A_D/A_R เท่ากับ 1.7 3 และ 5.6 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงแสดงให้เห็นว่าผลของค่า A_D/A_R ที่ส่งผลต่อความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (รูปที่ 4.16) เกิดจากการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์เท่านั้น ไม่ได้ส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อเซลล์



รูปที่ 4.17 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน

ในการเพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน สังเกตพบว่าจุลสาหร่ายมีการเกาะติดผนังของถังปฏิกรณ์ในแต่ละชุดการทดลองด้วยปริมาณที่แตกต่างกัน โดยในชุดการทดลองที่ใช้ค่า A_D/A_R เท่ากับ 5.6 มีการเกาะติดที่ผนังและท่อดราฟท์ส่วนนอกมากที่สุด ดังรูปที่ 4.18 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้ค่า A_D/A_R เท่ากับ 1.7 และ 3 มีการเกาะติดที่น้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งการเกาะติดของจุลสาหร่ายจะเกิดการบดบังแสงทำให้เซลล์สามารถสังเคราะห์แสงได้น้อยลงจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ชุดการทดลองที่ใช้ค่า A_D/A_R เท่ากับ 5.6 ให้ผลการเติบโตและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ที่ต่ำกว่า (ในทุกชุดการทดลองจะเพิ่มขั้นตอนการเขาะสาหร่ายที่เกาะติดผนังก่อนเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ผล 1 ครั้งต่อวัน) นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ค่า A_D/A_R เท่ากับ 1.7 มีจุลสาหร่ายเติบโตในบริเวณผนังส่วนบนของถังปฏิกรณ์ ดังรูปที่ 4.18 ซึ่งเกิดจากการฟุ้งกระจายของฟองอากาศที่มากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ทำให้จุลสาหร่ายบางส่วนในบริเวณนี้ได้รับอาหารน้อยลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



A_D/A_R 1.7 A_D/A_R 3.0 A_D/A_R 5.6

รูปที่ 4.18 การเกาะติดที่ผนังของถังปฏิกรณ์ในแต่ละชุดการทดลองที่ค่า A_D/A_R แตกต่างกัน

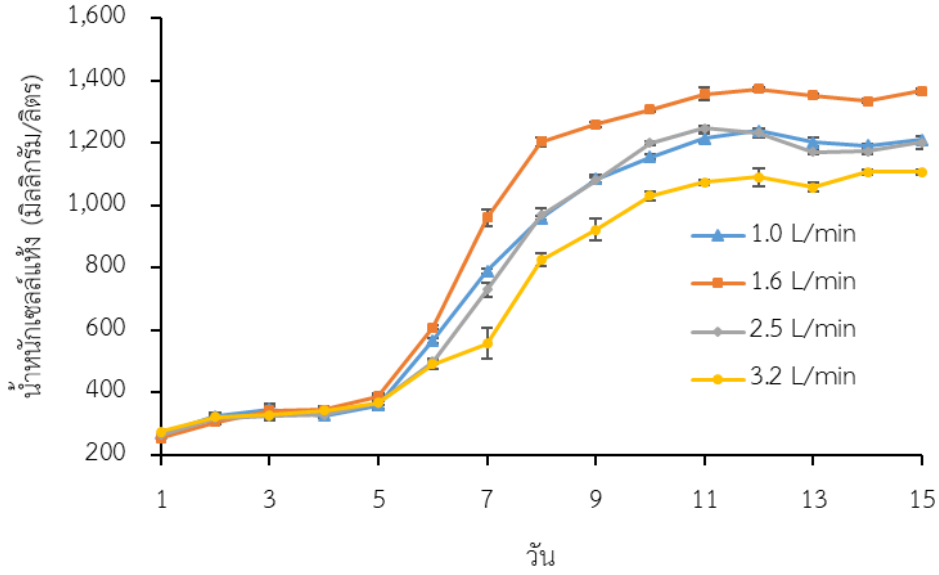
สามารถสรุปได้ว่าผลของอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R) ที่แตกต่างกันทำให้จุลสาหร่ายมีการเติบโตและให้ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์แตกต่างกัน โดยชุดการทดลองที่ใช้ A_D/A_R เท่ากับ 3 ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดและมีการเกาะติดของจุลสาหร่ายที่ผนังน้อยที่สุด จึงมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงที่กำลังการผลิตที่สูงขึ้น และนำมาศึกษาวิจัยในลำดับถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.2.3 ผลของอัตราการไหล

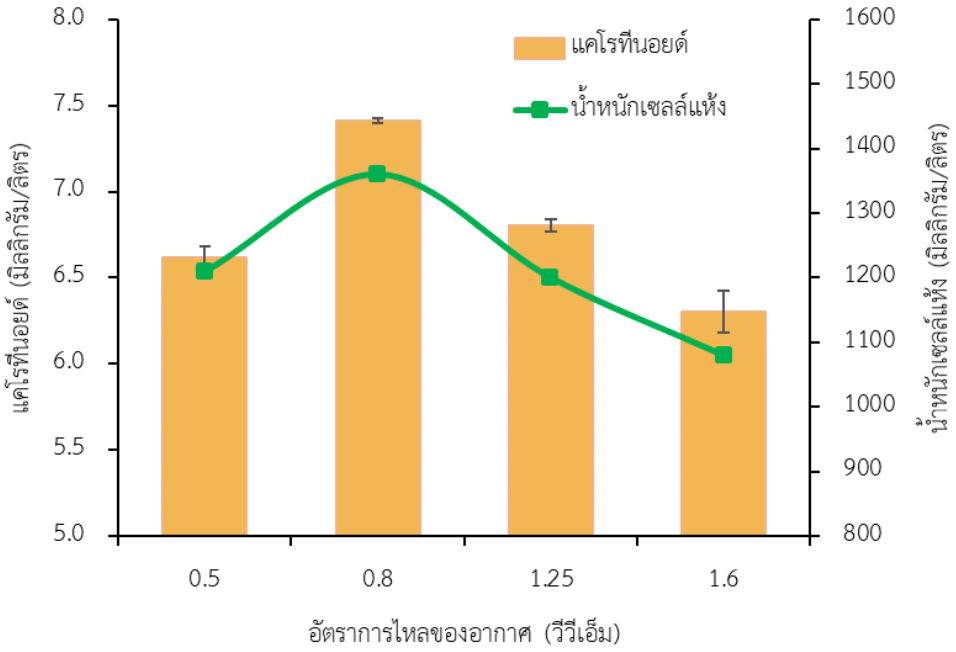
ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบกะ (Batch cultivation) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่มีการไหลวนดีที่สุดจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.2.1 และใช้ A_D/A_R เท่ากับ 3 โดยมีการให้อากาศที่อัตราการไหลแตกต่างกันคือ 0.5 0.8 1.25 และ 1.6 วีวีเอ็ม (1.0 1.6 2.5 และ 3.2 ลิตร/นาที) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟแอลอีดีที่มีอุณหภูมิสีของแสงเหมาะสมที่สุดจากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 (แสงสีขาวอมฟ้า) ผลการตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่อัตรากาไหลของอากาศแตกต่างกัน มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน โดยในช่วงห้าวันแรก น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก

ประมาณ 270 – 370 มิลลิกรัม/ลิตร ก่อนเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงวันที่ 5 – 9 หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลงจนค่อนข้างคงที่หลังจากวันที่ 11 น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่ซึ่งอยู่ในช่วงวันที่ 11 – 15 มีค่าเท่ากับ 1,360 ± 16.7 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับชุดการทดลองที่ใช้อัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม (1.6 ลิตร/นาที) ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้อัตราการไหลของอากาศ 0.5 1.25 และ 1.6 วีวีเอ็ม ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,210 ± 19.0 1,200 ± 33.2 และ 1,080 ± 26.6 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนของอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดซึ่งคำนวณจากข้อมูลการเติบโตระหว่างวันที่ 5 – 8 พบว่าชุดการทดลองที่ใช้อัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม จะให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.37 ± 0.01 วัน$^{-1}$ ซึ่งมากกว่าการใช้อัตราการไหลของอากาศ 0.5 วีวีเอ็ม (0.31 ± 0.02 วัน$^{-1}$) อัตราการไหลของอากาศ 1.25 วีวีเอ็ม (0.33± 0.01วัน$^{-1}$) และอัตราการไหลของอากาศ 1.6 วีวีเอ็ม (0.26 ± 0.01 วัน$^{-1}$) นอกจากนี้ข้อมูลการเติบโตที่ได้รับจากงานวิจัยนี้มีค่ามากกว่าผลการทดลองจากงานวิจัยในอดีตที่เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสกุลเดียวกันภายใต้แสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสงใกล้เคียงกันและเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ประเภทเดียวกัน ซึ่งรายงานน้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 550 ± 10 มิลลิกรัม/ลิตร และ 0.35 วัน$^{-1}$ ตามลำดับ (Wannasutthiwat , 2014) และมากกว่างานวิจัยในอดีตที่ศึกษาผลของอัตราการไหลของอากาศภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกที่มีขนาดใกล้เคียงกันและให้แสงด้วยสภาวะใกล้เคียงกัน โดยที่อัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็มให้การเติบโตสูงที่สุดสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่งรายงานน้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ 895 ± 55.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ 0.25 วัน$^{-1}$ ตามลำดับ (Phuphaibul, 2016) จะเห็นได้ว่าผลของการปรับปรุงรูปแบบการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์สามารถเพิ่มชีวมวลหรือทำให้จุลสาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีขึ้น

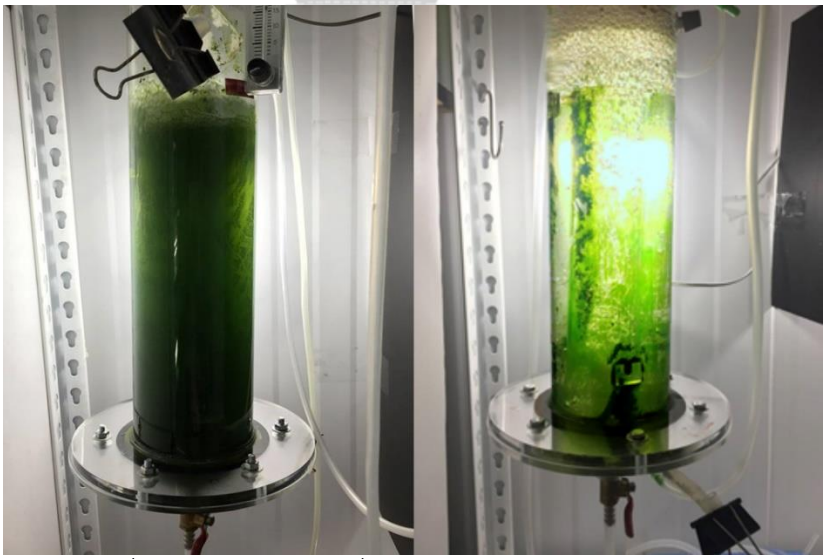


รูปที่ 4.19 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน

จากรูปที่ 4.20 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของอากาศจาก 0.5 วีวีเอ็ม เป็น 0.8 วีวีเอ็ม ให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากที่ 0.5 วีวีเอ็ม ของเหลวในถังปฏิกรณ์มีการไหลวนที่แย่กว่าและสังเกตพบการตกตะกอนบางส่วนบริเวณก้นถังปฏิกรณ์ เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของอากาศเป็น 0.8 วีวีเอ็ม ทำให้เกิดการไหลวนที่ดีขึ้น ส่งผลให้จุลสาหร่ายได้รับแสงอย่างทั่วถึง และยังลดข้อจำกัดในการถ่ายเทมวลแก๊สและสารอาหาร อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอัตราการเติมอากาศจาก 0.8 วีวีเอ็ม เป็น 1.25 และ 1.6 วีวีเอ็มตามลำดับ กลับให้ผลน้ำเซลล์แห้งที่ลดลง คาดว่าเกิดจากอัตราการเติมอากาศที่สูงจะทำให้เกิดแรงเฉือน (Shear force) ที่สูง ซึ่งส่งผลต่อการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเซลล์เช่น มีการแบ่งเซลล์ที่ลดลง และสังเกตพบว่าที่อัตราการไหลของอากาศสูงจะทำให้การเกาะติดที่ผนังของถังปฏิกรณ์เพิ่งสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ดังรูปที่ 4.21 อันเป็นสาเหตุของการบดบังแสงและทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง ซึ่งหากพิจารณาย้อนถึงผลของอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R) สาเหตุที่ทำให้ชุดการทดลองที่ค่า A_D/A_R สูง (ขนาดท่อดราฟท์เล็ก) จะเกิดการเกาะติดที่ผนังถังปฏิกรณ์สูงเช่นกัน อาจเป็นสาเหตุเดียวกันของแรงเฉือนเนื่องจากความเร็วของอากาศและของเหลวภายที่ส่งผลต่อการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเซลล์ โดยความเร็วของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์สามารถตรวจวัดได้จากการบันทึกวีดิโอของการไหลวนของวัตถุทดสอบ (เศษกระดาษชำระเนื่องจากมีความสามารถในการดูดซับจึงไม่มีผลของการจมตัวและการลอยตัวเกี่ยวข้อง) และผ่านการคำนวณ ได้ดังตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.20 ผลของอัตราการไหลของอากาศที่มีต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในช่วงการเติบโตคงที่ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก



รูปที่ 4.21 การเกาะติดที่ผนังของถังปฏิกรณ์ที่อัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม (ซ้าย) และ 1.6 วีวีเอ็ม (ขวา)

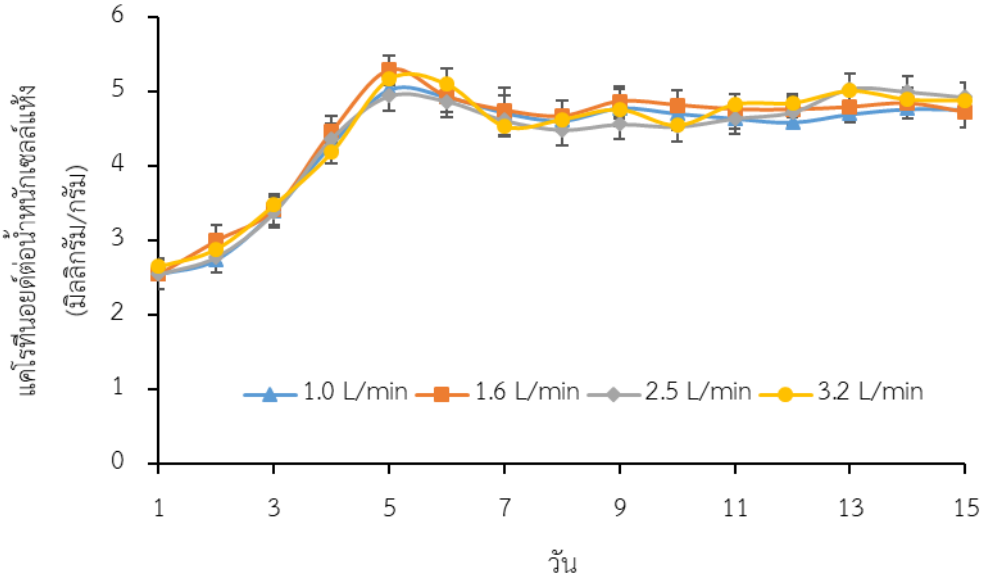
ตารางที่ 4.4 ความเร็วของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่ค่า A_D/A_R และอัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน

อัตราการไหลของอากาศ (vvm)	A_D/A_R	Riser (cm/s)	Downcomer (cm/s)
0.5	3	26.32	9.12
0.8*	3	30.86	9.47
1.25	3	37.88	10.96
1.6	3	41.14	11.23
0.8	5.6	33.64	9.21
0.8	1.7	30.11	10.02

*สภาวะการทดลองที่ให้การเติบโตและความเข้มข้นแคโรทีนอยด์สูงสุด

รูปที่ 4.20 ยังแสดงในส่วนของการตรวจวัดความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มในอัตราที่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน เช่นเดียวกับผลน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 0.8 วีวีเอ็ม สามารถผลิตแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงที่สุดและได้เท่ากับ 6.45 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าผลการเพาะเลี้ยงด้วยอัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 0.5 1.25 และ 1.6 วีวีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งได้ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ 5.75 ± 0.06 5.92 ± 0.03 และ 5.40 ± 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในส่วนของปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งซึ่งแสดงในรูปที่ 4.22 พบว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน โดยในช่วง 5 วันแรกเซลล์มีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นการสะสมแคโรทีนอยด์เริ่มคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สำหรับทุกชุดการทดลอง โดยมีแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย 4.81 ± 0.10 มิลลิกรัม/กรัม แสดงให้เห็นว่าผลของอัตราการไหลของอากาศที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์เป็นหลักและส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อเซลล์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

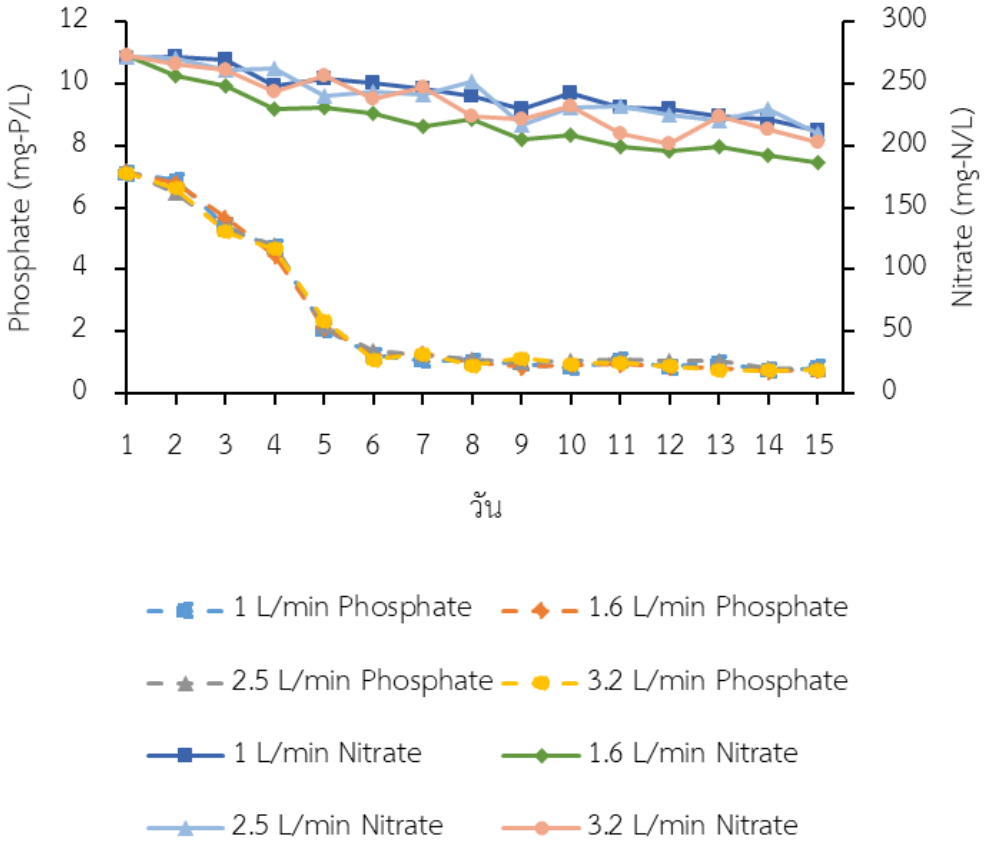
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.22 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน

ในส่วนของตรวจวัดความเข้มข้นของสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนเตรทและฟอสเฟต แสดงดังรูปที่ 4.23 ตลอดการทดลองพบว่าจุลสาหร่ายมีการใช้ไนโตรเจนในการเติบโต โดยในวันแรกของการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของไนเตรทในทุกชุดการทดลองประมาณ 270 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ลิตร จากนั้นค่อยๆลงลงจนวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ในชุดการทดลองที่ใช้อัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม สังเกตพบว่ามีความเข้มข้นของไนเตรทลดลงมากกว่าชุดการทดลองอื่น อาจเป็นผลมาจากการเติบโตที่มากกว่าทำให้มีการนำไนโตรเจนไปใช้ในการเติบโตมากกว่าชุดการทดลองอื่น และมีความเข้มข้นที่เหลือในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงประมาณ 170 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ลิตร (ลดลงประมาณ 37%) ขณะที่ความเข้มข้นที่เหลือในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงในชุดการทดลองอื่นประมาณ 200 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ลิตร (ลดลงประมาณ 26%) ในส่วนของฟอสเฟตมีแนวโน้มการลดลงที่ใกล้เคียงกันของแต่ละชุดการทดลอง โดยในวันแรกของการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของฟอสเฟตประมาณ 7 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส/ลิตร จากนั้นลงลงอย่างต่อเนื่องจนความเข้มข้นที่เหลือในวันที่ 6 ประมาณ 1 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส/ลิตร และค่อยๆลดลงจนเข้าใกล้ศูนย์ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาควบคู่กับการเติบโตของจุลสาหร่ายพบว่าสารอาหารหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ยังคงมีเพียงพอและไม่ใช่ปัจจัยจำกัดของการเติบโต ซึ่งข้อมูลความเข้มข้นของสารอาหารหลักที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยที่ผ่านมา โดยมีการเพาะเลี้ยง *C. humicola* ใน

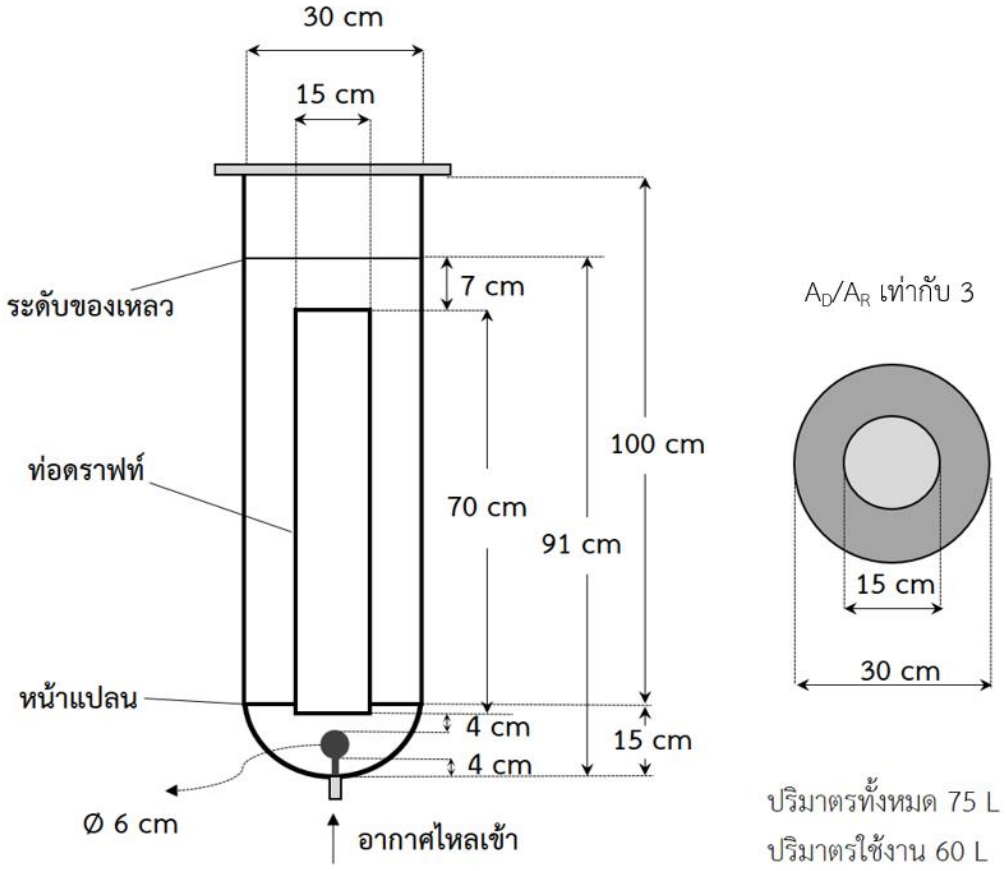
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกด้วยแสงสีแดง ขาวและน้ำเงินที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ (Phuphaibul, 2016)



รูปที่ 4.23 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน

4.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีขนาดใหญ่

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร ซึ่งใช้ข้อมูลการทดลองจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ในหัวข้อที่ 4.2 ในการขยายกำลังการผลิต (Scale up) โดยระยะความสูง (แนวตั้ง) แต่ละส่วนสามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนเทียบกับขนาดความสูงของระดับของเหลว และระยะเส้นผ่านศูนย์กลาง (แนวนอน) สามารถคำนวณได้จากค่า A_D/A_R ผลการออกแบบแสดงดังรูปที่ 4.24ก และ 4.24ข



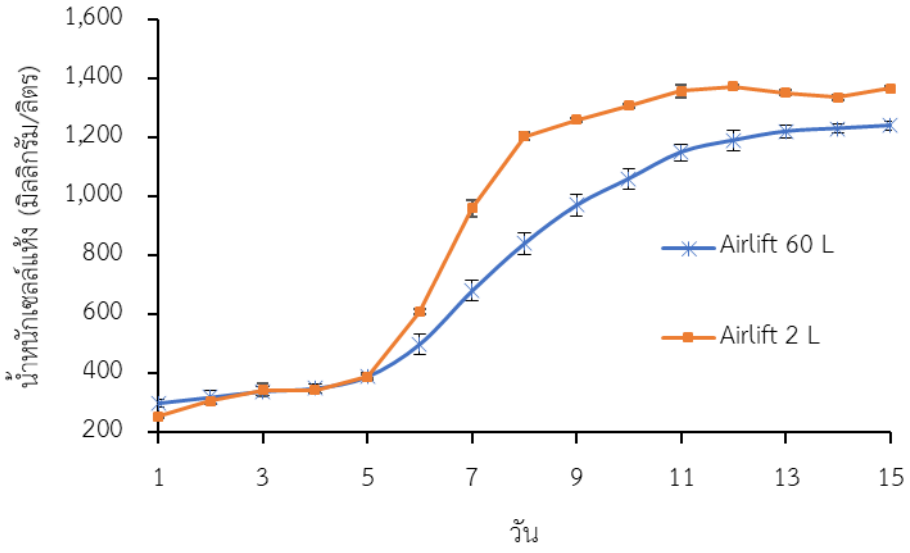
รูปที่ 4.24ก แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร

รูปที่ 4.24ข แผนภาพแสดงขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร

จากนั้นดำเนินการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบกะ (Batch cultivation) โดยอาศัยปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของอากาศสามารถให้อากาศได้สูงสุดที่อัตรา 0.3 วีวีเอ็ม (20 ลิตร/นาที) เนื่องด้วยข้อจำกัดของอุปกรณ์ มีการให้แสงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงคงที่ 20,000 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟแอลอีดีที่มีอุณหภูมิสีของแสงแบบขาวอมฟ้า ผลการตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.25 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร มีแนวโน้มเล็กน้อยในช่วงห้าวันแรกซึ่งใกล้เคียงกับผลจากถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร จากประมาณ 300 – 350 มิลลิกรัม/ลิตร ก่อนเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในช่วงวันที่ 5 – 11 ซึ่งแตกต่างกับผลจากจากถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร ที่มีช่วงการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) ที่สั้นกว่าคือประมาณช่วงวันที่ 5 – 8 หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลงจนค่อนข้างคงที่หลังจากวันที่ 12 น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่ซึ่งอยู่ในช่วงวันที่ 12 – 15 มีค่าเท่ากับ 1,220 ± 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยถังปฏิกรณ์ขนาด 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลิตร ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,360 ± 16.7 มิลลิกรัม/ลิตร ในส่วนของอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดซึ่งคำนวณจากข้อมูลการเติบโตระหว่างวันที่ 5 – 11 พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตรที่ให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.20 ± 0.001 วัน$^{-1}$ ซึ่งต่ำกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงด้วยถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร (0.37 ± 0.01 วัน$^{-1}$) อย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจากการบดบังแสงกันเองของจุลสาหร่ายที่มีปริมาณสูงภายในถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร ทำให้จุลสาหร่ายที่อยู่ด้านในของถังปฏิกรณ์ได้รับแสงสว่างที่ลดลงและมีการสังเคราะห์แสงที่ลดลงจึงมีอัตราการเติบโตจำเพาะที่ต่ำ อย่างไรก็ตามจากการสังเกตรูปแบบการไหลภายในถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร ให้ผลการไหลวนที่ดี ไม่เกิดการตกตะกอนของจุลสาหร่าย และมีการเกาะติดผนังของจุลสาหร่ายเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้จึงเสนอแนะให้ปรับความเข้มแสงเพิ่มขึ้นมากกว่า 20,000 ลักซ์ หรือมีการพัฒนารูปแบบการให้แสงสว่าง เช่น การให้แสงสว่างจากภายในถัง เป็นต้น

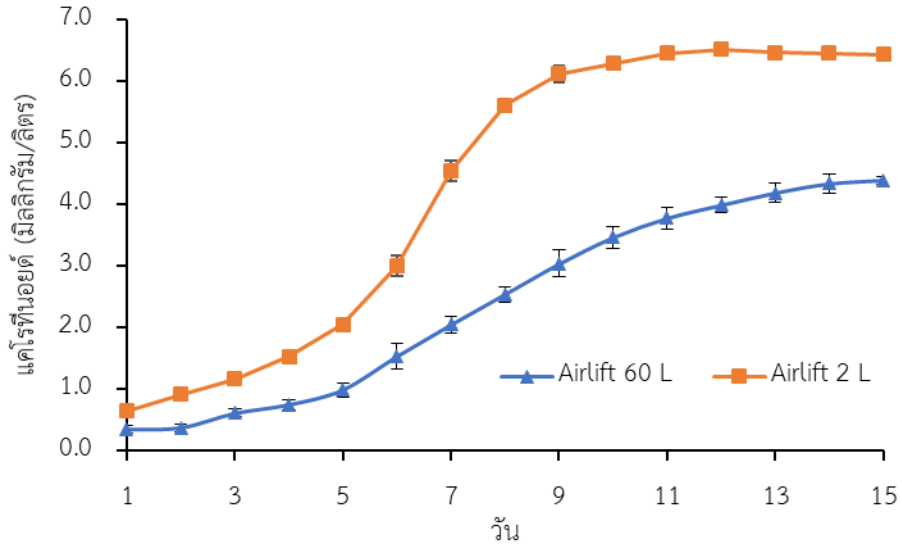


รูปที่ 4.25 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เปรียบเทียบกับขนาด 2 ลิตร

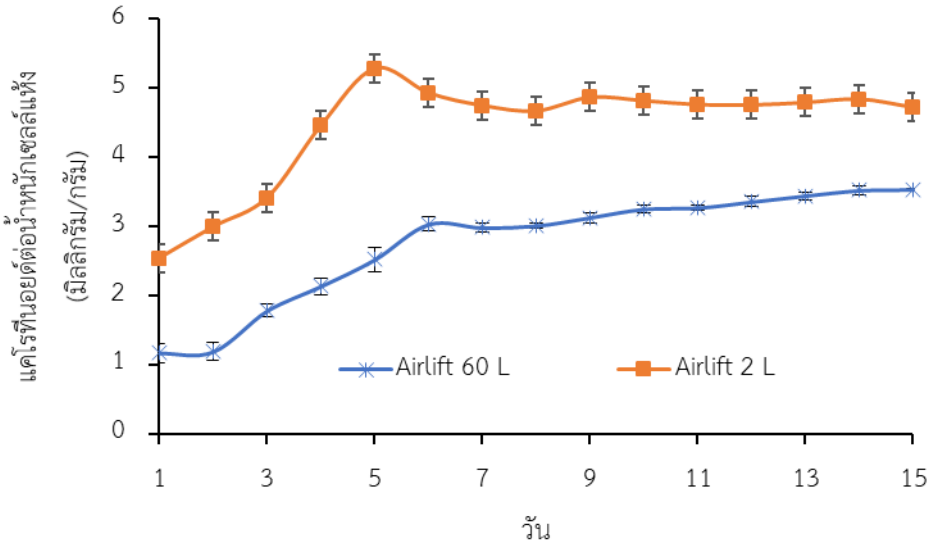
ในส่วนของการตรวจวัดความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.26 พบว่าความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดช่วงการทดลอง และสามารถผลิตแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้เท่ากับ 4.40 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตรอย่างชัดเจนที่ช่วงหลังจากวันที่ 8 การผลิตแคโรทีนอยด์จะค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการทดลองและมีความเข้มข้นเท่ากับ 6.45 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสาเหตุที่ทำให้การผลิตแคโรทีนอยด์ภายในถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร ต่ำ

กว่าถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร คาดว่าเป็นผลจากทั้งการเติบโตที่ต่ำกว่าสังเกตได้จากผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและรวมถึงการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อเซลล์ที่ต่ำกว่าเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.27 จะเห็นได้ว่าตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร ต่ำกว่าถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร คาดว่าเป็นผลมาจากหัวเชื้อจุลสาหร่ายที่เตรียมด้วยขนาดแตกต่างกัน กล่าวคือการเพาะเลี้ยงภายในถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร จำเป็นต้องใช้หัวเชื้อถึง 6 ลิตร (เพาะเลี้ยงจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 10 ลิตร ที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์) ขณะที่ถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร ใช้ปริมาณหัวเชื้อเพียง 200 มิลลิลิตร (เพาะเลี้ยงจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์) ดังรูปที่ 4.28 จะเห็นได้ว่าอาจมีการบดบังแสงจากการเกาะติดที่ผนังของถังปฏิกรณ์รวมถึงการบดบังแสงจากจุลสาหร่ายที่มีปริมาณสูงขึ้นสำหรับการเตรียมด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 10 ลิตร ดังนั้นปริมาณการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อที่แตกต่างกันนี้จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพของหัวเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงในการทดลอง เมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มและอัตราการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่ามีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน โดยในช่วง 5 วันแรกเซลล์มีการสะสมแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นการสะสมแคโรทีนอยด์เริ่มคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในช่วงคงที่เท่ากับ 3.50 ± 0.05 มิลลิกรัม/กรัม สำหรับถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร ขณะที่ถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงคงที่สูงกว่า (4.78 ± 0.04 มิลลิกรัม/กรัม) จึงเสนอแนะให้มีการจัดเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่ายที่มีการให้แสงสว่างที่เหมาะสมกับปริมาณการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงรูปแบบถังปฏิกรณ์ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อที่ปริมาณสูง เช่นใช้ถังปฏิกรณ์ที่มีระยะความสูงถังต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง (H/D) ที่มากขึ้น เป็นต้น

CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.26 ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เปรียบเทียบกับขนาด 2 ลิตร

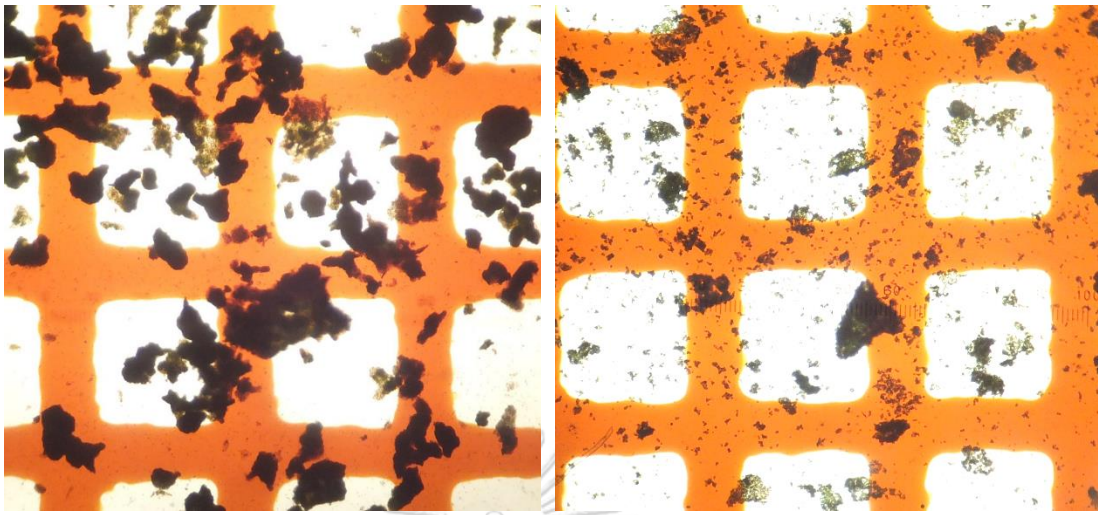


รูปที่ 4.27 ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหลักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เปรียบเทียบกับขนาด 2 ลิตร

รูปที่ 4.28 การเตรียมหัวเชื้อจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 10 ลิตร (ซ้าย) และ ขนาด 1 ลิตร (ขวา) สำหรับใช้เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร และขนาด 2 ลิตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าเซลล์ของจุลสาหร่าย *C. humicola* มีการเกาะกลุ่มกันมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร ดังรูปที่ 4.29 ซึ่งเป็นรูปที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขาย 4 เท่า บนแผ่นสไลด์นับจำนวน Sedgewick counting chamber โดย 1 ช่องสี่เหลี่ยมมีขนาด 0.75 มิลลิเมตร x 0.75 มิลลิเมตร จะเห็นได้ว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เกาะกลุ่มกันจนมีขนาดประมาณ 0.1 – 0.7 มิลลิเมตร ขณะที่เซลล์จากหัวเชื้อก่อนทำการเพาะเลี้ยง มีขนาดส่วนใหญ่ประมาณ 5 – 100 ไมโครเมตร และสูงสุดไม่เกิน 0.3 มิลลิเมตร ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เซลล์มีการเกาะกลุ่มขนาดใหญ่นี้อาจเกิดจากอัตราการไหลของอากาศที่สูง ทำให้เซลล์มีการปรับตัวเพื่อลดลงการปะทะกับแรงเฉือน การที่เซลล์มีการเกาะกลุ่มกันมีข้อดีคือทำให้สามารถเก็บเกี่ยวได้ง่ายขึ้น เช่น การตกตะกอน แต่มีข้อเสียคืออาจส่งผลให้การสังเคราะห์แสงของเซลล์ที่อยู่ด้านในของกลุ่มลดลงเนื่องจากการโอกาสในการรับแสงที่น้อยลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



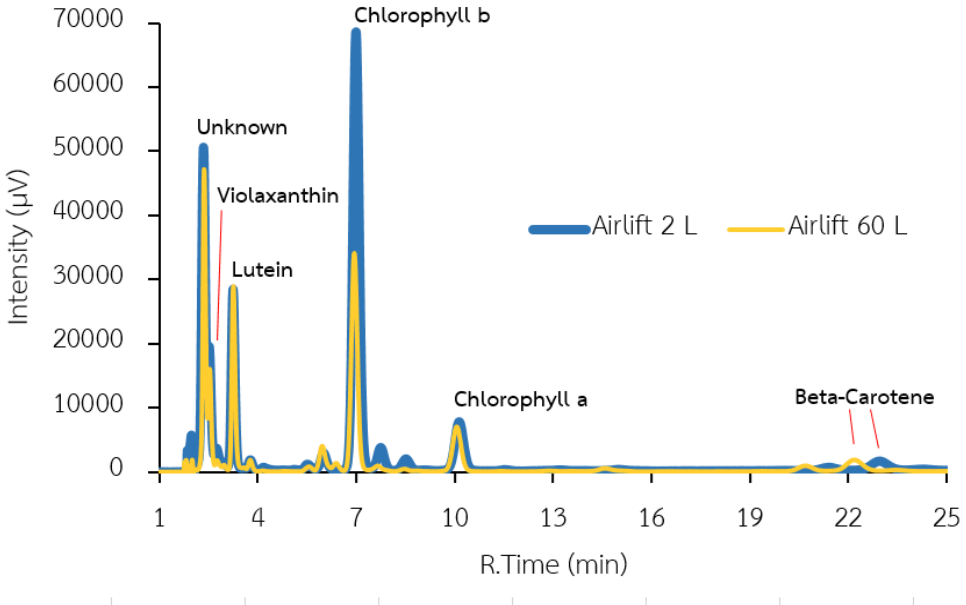
รูปที่ 4.29 ภาพถ่ายจุลสาหร่าย *C. humicola* จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 4x ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร (ซ้าย) และจากหัวเชื้อจุลสาหร่าย (ขวา)

ในส่วนของการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC จากตัวอย่างวันสุดท้ายที่เพาะเลี้ยงในปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร เปรียบเทียบกับตัวอย่างวันสุดท้ายที่เพาะเลี้ยงในปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ให้ผลแสดงดังโครมาโทแกรม (รูปที่ 4.30) จะเห็นได้ว่าโครมาโทแกรมของทั้งสองชุดการทดลองมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าแคโรทีนอยด์ที่สามาราถระบุชนิดได้เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งประกอบด้วย วิโอลาแซนทิน (Violaxanthin) ที่เวลา 2.5 นาที ลูทีน (Lutein) ที่เวลา 3.2 นาที คลอโรฟิลล์บี (Chlorophyll b) ที่เวลา 6.9 นาที คลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll a) ที่เวลา 10.0 นาที และ เบต้า-แคโรทีน (Beta-carotene) ที่เวลา 22.6 นาที ซึ่งตัวอย่างวันสุดท้ายที่เพาะเลี้ยงในปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร ตรวจพบลูทีนและเบต้า-แคโรทีน (ประมาณ 31 และ 8 % ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามลำดับ) ซึ่งมีสัดส่วนมากกว่าตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร (ประมาณ 26 และ 7 % ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่ามีแคโรทีนอยด์จากทั้งสองชุดการทดลองถึงประมาณ 42 – 45 % ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ตรวจพบสเปกตรัมแต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ (Unknown) และมีแคโรทีนอยด์อีกประมาณ 5 – 7% ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ตรวจพบพีคแต่ไม่พบสเปกตรัมที่ชัดเจนจึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้เช่นกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.5 ชนิดของแคโรทีนอยด์จากการวิเคราะห์ HPLC จากตัวอย่างชีวมวลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร และ ขนาด 2 ลิตร

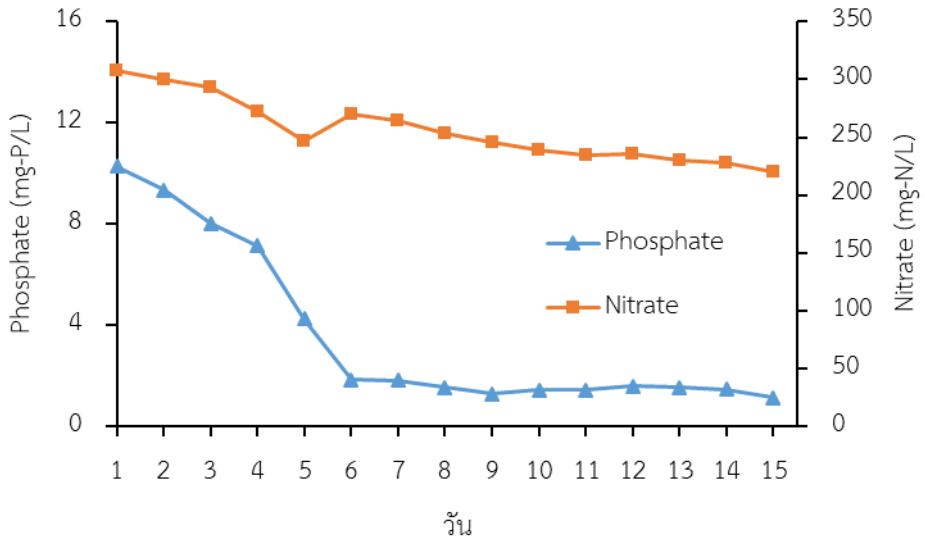
แคโรทีนอยด์	% ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด	
	ขนาด 60 ลิตร	ขนาด 2 ลิตร
Unknown	42.75	49.68
Violaxanthin	14.21	15.11
Lutein	30.48	24.12
Beta-carotene	7.51	5.28
อื่นๆ	5.05	5.81



รูปที่ 4.30 โครมาโทแกรมของตัวอย่างจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร และ ขนาด 2 ลิตร จากเครื่อง HPLC ที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร

ในส่วนของตรวจวัดความเข้มข้นของสารอาหารหลัก ได้แก่ ไนเตรทและฟอสเฟต แสดงดังรูปที่ 4.31 ตลอดการทดลองพบว่าจุลสาหร่ายมีการใช้ไนโตรเจนในการเติบโต โดยในวันแรกของการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของไนเตรทประมาณ 300 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ลิตร จากนั้นค่อยๆลงลงจนวันสุดท้ายของ

การเพาะเลี้ยง และมีความเข้มข้นที่เหลือในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงประมาณ 220 มิลลิกรัมไนโตรเจน/ลิตร (ลดลงประมาณ 27%) ในส่วนของฟอสเฟตมีแนวโน้มการลดลงในช่วง 6 วันแรกอย่างต่อเนื่อง โดยในวันแรกของการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของฟอสเฟตประมาณ 7 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส/ลิตร จากนั้นลงลงอย่างต่อเนื่องจนความเข้มข้นที่เหลือในวันที่ 6 ประมาณ 1.8 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส/ลิตร และค่อยๆลดลงจนในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความเข้มข้นที่เหลือในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงประมาณ 1 มิลลิกรัมฟอสฟอรัส/ลิตร เมื่อพิจารณาควบคู่กับการเติบโตของจุลสาหร่าย พบว่าไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ยังคงมีเพียงพอและไม่ใช่ปัจจัยจำกัดของการเติบโต ขณะที่ฟอสเฟตนั้นลดลงอย่างรวดเร็วและมีปริมาณที่น้อยในช่วงหลังจากวันที่ 6 ซึ่งปริมาณฟอสเฟตที่ต่ำอาจส่งผลต่อการสร้าง DNA และ RNA ของจุลสาหร่าย เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าฟอสเฟตมีแนวโน้มที่ลดลงอย่างรวดเร็วและมีปริมาณที่น้อยเช่นเดียวกัน อาจเป็นผลจากเปลี่ยนสภาพของฟอสเฟตเป็นรูปแบบอื่น จึงเสนอแนะให้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมฟอสเฟตเป็นระยะ (fresh batch) และปริมาณที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.31 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* เพื่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูงขึ้น โดยอาศัยปัจจัยจากอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีสีขาวและการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาผลของอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีสีขาวที่มีต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C. humicola* ผลการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบแบทช์เป็นเวลา 15 วัน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร พบว่าแสงสีขาวอมฟ้าที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ ส่งผลต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีกว่าการใช้แสงสีขาวเย็นตาและขาวอมเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.40 ± 0.05 วัน$^{-1}$ (0.36 ± 0.06 และ 0.29 ± 0.04 วัน$^{-1}$ สำหรับแสงสีขาวเย็นตาและขาวอมเหลืองตามลำดับ) และน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,340 ± 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร (1,260 ± 10.0 และ 1,240 ± 15.3 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับแสงสีขาวเย็นตาและขาวอมเหลืองตามลำดับ) และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 3.55 ± 0.063 มิลลิกรัม/ลิตร (2.93 ± 0.050 และ 1.79 ± 0.023 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับแสงสีขาวเย็นตาและขาวอมเหลืองตามลำดับ) และปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.65 ± 0.04 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (2.35 ± 0.01 และ 1.46 ± 0.02 สำหรับแสงสีขาวเย็นตาและขาวอมเหลืองตามลำดับ) และมีลูทีนและเบต้าแคโรทีนในปริมาณ 25 และ 6 % ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามลำดับ (22 และ 5 % ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสำหรับแสงสีขาวเย็นตา 19 และ 4 % ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสำหรับแสงสีขาวอมเหลือง)

2. การศึกษาความสามารถในการไหลวนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตรเบื้องต้นก่อนทำการเพาะเลี้ยง ด้วยการสังเกตรูปแบบการไหลของวัตถุทดสอบ 2 ชนิด คือ ตัวกรองชีวภาพชนิด BCN-012 และเม็ดอะคริลิค บันทึกผลด้วยวีดิโอ พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บรรจุของเหลวที่ระดับความสูง 34 เซนติเมตร ใช้หัวจ่ายอากาศแบบหัวทรายทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ติดตั้งที่ความสูงจากก้นถัง 1.5 เซนติเมตร และใช้ท่อดราฟท์ขนาดความยาว 27 เซนติเมตร ติดตั้งภายในถังปฏิกรณ์ที่ความสูงในระดับเดียวกับหัวจ่ายอากาศ เกิดการไหลวนของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ได้ดีที่สุด

3. การศึกษาผลของอัตราส่วนพื้นที่ที่ของเหลวไหลลงต่อพื้นที่ที่ของเหลวไหลขึ้น (A_D/A_R) และผลของอัตราการไหลของอากาศ โดยเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C. humicola* แบบแบทช์ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่มีการไหลวนดีที่สุด โดยในแต่ละชุดการทดลองมีการปรับอัตราส่วน A_D/A_R แตกต่างกัน 3 ค่า คือ 1.7 3.0 และ 5.6 และมีการให้อากาศที่อัตราการไหลแตกต่างกันคือ 0.5 0.8 1.25 และ 1.6 วีวีเอ็ม (1.0 1.6 2.5 และ 3.2 ลิตร/นาที) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาวอมฟ้า ความเข้มแสงคงที่ 5,000 ลักซ์ พบว่าที่ A_D/A_R เท่ากับ 3 และอัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 0.8 วีวีเอ็ม (1.6 ลิตรต่อนาที) ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,360± 16.7 มิลลิกรัม/ลิตร และความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 6.45 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร (4.78 ± 0.04 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. การศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกที่มีขนาดใหญ่ โดยทำการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร ซึ่งใช้ข้อมูลการทดลองจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่ให้ผลการทดลองดีที่สุด และเพาะเลี้ยงในสภาวะใกล้เคียงกัน ที่ความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 20,000 ลักซ์ พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ สามารถเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายให้เติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดี ไม่เกิดการจมตัวของจุลสาหร่ายที่ก้นถังและมีการเกาะติดที่ผนังถังปฏิกรณ์เล็กน้อย โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงการเติบโตคงที่เท่ากับ 1,240 ± 10.0 มิลลิกรัม/ลิตร ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์เท่ากับ 4.40 ± 0.04 มิลลิกรัม/ลิตร (3.52 ± 0.05 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) และมีลูทีนและเบต้าแคโรทีนในปริมาณ 30 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามลำดับ

ตารางที่ 5.1 สรุปผลการศึกษาอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีสีขาวต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C.humicola*

ระบบ	สภาวะ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/L)	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/L)
ถังปฏิกรณ์แบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร	แสงสีขาวอมฟ้า (Daylight) 5,000 ลักซ์	1,340	3.55
ถังปฏิกรณ์แบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร	แสงสีขาวเย็นตา (Cool white) 5,000 ลักซ์	1,260	2.93
ถังปฏิกรณ์แบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร	แสงสีขาวอมเหลือง (Warm white) 5,000 ลักซ์	1,240	1.79

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5.2 สรุปผลการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย *C.humicola*

ระบบ	สภาวะ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/L)	ความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/L)
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร	A_D/A_R = 1.7 อัตราการไหลของอากาศ 1.6 L/min (0.8 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	1,340	6.30
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร	A_D/A_R = 3.0 อัตราการไหลของอากาศ 1.6 L/min (0.8 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	1,360	6.45
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร	A_D/A_R = 5.6 อัตราการไหลของอากาศ 1.6 L/min (0.8 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	1,130	5.14
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร	A_D/A_R = 3.0 อัตราการไหลของอากาศ 1.0 L/min (0.5 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	1,210	5.75
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร	A_D/A_R = 3.0 อัตราการไหลของอากาศ 2.5 L/min (1.25 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	1,200	5.92
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร	A_D/A_R = 3.0 อัตราการไหลของอากาศ 3.2 L/min (1.6 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	1,080	5.40

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร	A_D/A_R = 3.0 อัตราการไหลของอากาศ 20 L/min (0.3 vvm) ขาวอมฟ้า 20,000 ลักซ์	1,240	4.40

ตารางที่ 5.3 สรุปผลความเข้มข้นของลูทีนและเบต้าแคโรทีนจากการวิเคราะห์ HPLC (452 nm)

ระบบ	สภาวะ	ลูทีน (mg/L)	เบต้าแคโรทีน (mg/L)
ถังปฏิกรณ์แบบถังกวน ขนาด 1 ลิตร	300 rpm อัตราการไหลของอากาศ 0.8 L/min (0.8 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	0.9	0.2
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร	A_D/A_R = 3.0 อัตราการไหลของอากาศ 1.6 L/min (0.8 vvm) ขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์	1.6	0.4
ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร	A_D/A_R = 3.0 อัตราการไหลของอากาศ 20 L/min (0.3 vvm) ขาวอมฟ้า 20,000 ลักซ์	1.4	0.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการเพาะเลี้ยง *C.humicola* ด้วยแสงสีขาวที่อุณหภูมิสีสามเฉดสีพบว่าแคโรทีนอยด์ที่จุลสาหร่ายสามารถผลิตได้ประกอบด้วยไวโอลาแซนทีน ลูทีนและเบต้าแคโรทีน ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าจุลสาหร่าย *C.humicola* สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น เช่น แอสต้าแซนทีน ซีแซนทีน เป็นต้น จึงอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ เช่น การปรับความเข้มแสง การใช้แสงที่ความยาวคลื่นอื่นๆ เป็นต้น

2. จากการเพาะเลี้ยง *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร พบว่ามีการเกาะติดที่ผนังถังปฏิกรณ์สำหรับที่ค่า A_D/A_R เท่ากับ 5.6 และที่อัตราการไหลของอากาศสูงกว่า 1.6 ลิตรต่อนาที ซึ่งหากสามารถลดการเกาะติดที่ผนังถังปฏิกรณ์ เช่น การเคลือบด้วยสารที่ไม่มีขั้ว การใส่วัตถุที่มีความสามารถในการเซาะผนังให้ไหลวนไปกับการเพาะเลี้ยง อาจทำให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างออกไป

3. จากการเพาะเลี้ยง *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยหัวเชื้อที่ขยายจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 10 ลิตร ส่งผลให้มีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร จึงเพื่อให้ได้หัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น อาจมีการย่อยการขยายปริมาณจากถังปฏิกรณ์ขนาด 10 ลิตร 1 ถังเป็น ถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร 5 ถัง เป็นต้น หรือเปลี่ยนรูปแบบของถังที่ใช้เพาะเลี้ยงหัวเชื้อให้มีความสามารถในการได้รับแสงและอาหารที่ทั่วถึงมากขึ้น เช่น มีการปรับเปลี่ยนขนาดความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง (H/D) ที่เพิ่มขึ้น หรือแม้แต่การเพิ่มความเข้มแสงให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อปริมาณสูง เป็นต้น

4. การปรับปรุงการเพาะเลี้ยง *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร อาจเพิ่มความเข้มแสงที่มากขึ้นจาก 20,000 ลักซ์ เพื่อให้เซลล์ในส่วนด้านในของถังปฏิกรณ์ได้รับแสงที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของอัตราการไหลที่เพิ่มสูงขึ้นกว่า 20 ลิตร/นาที

5. การเกาะกลุ่มของเซลล์จุลสาหร่ายที่เพิ่มขึ้นในการเพาะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร อาจส่งผลต่อความคลาดเคลื่อนในการเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ผล จึงควรเก็บตัวอย่างที่ปริมาณมากขึ้นเช่น 50–100 มิลลิลิตร/วัน และก่อนการวิเคราะห์ควรผ่านการโฮโมจิไนซ์ (Homogenize) หรือโซนิเคท (Sonicate) ให้จุลสาหร่ายเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อความเท่าเทียบกันของการสุ่มตัวอย่าง

รายการอ้างอิง

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) (2012): S1-S7.

Blair, M.F., Kokabian, B., and Gude, V.G. Light and growth medium effect on Chlorella vulgaris biomass production. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2(1) (2014): 665.

Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. Dunaliella. In :Borowizka M.A.,Borowitzka L.J.(eds.). Micro-algal Biotechnology. (1988): 27-58.

Bouterfas, R., Belkoura, M., and Dauta, A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. Limnetica, 25 (3) (2016): 647.

Cassidy, K.O. Evaluating Algal Growth at Different Temperatures. Master's Thesis. Biosystems and Agricultural Engineering in the College of Engineering at the University of Kentucky, 2011.

Chaoruangrit, L., Tapaneeyaworawong, P., Powtongsook, S. and Sanoamuang, L.O. Alternative microalgal diets for cultivation of the fairy shrimp Branchinella thailandensis (Branchiopoda: Anostraca).The European Aquaculture Society. 26 (1) (2017): 37-37.

Chen, H., Jiang, JG. and Wu, GH. Effects of salinity changes on the growth of Dunaliella salina and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase.J Agric Food Chem. 57(14) (2009): 82.

Cogdell R.J.. Carotenoids in photosynthesis. Biological Sciences. 2(9) (1978): 145.

Das, P., Lei, W., Aziz, S.S. and Obbard, J.P. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. Bioresource Technology. 102(4) (2011): 3883.

Garcia-Chavarria, M. and Lara-Flores. The use of carotenoid in aquaculture. Research Journal of Fisheries and Hydrobiology. 8(2) (2013): 38-49.

Global industry analysts,Inc. The global carotenoids market (MCP-1700).Market Research. (2016).

Gonçalves, A.L., José, C., Pires, M., and Simões, M. The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach. RSC Advances. 27(1) (2016).

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.

Issarapayup, K., Powtongsook, S., and Pavasant, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Heamatococcus pluvialis*. J Biotechnol.142(3-4) (2009):227.

J.C. Merchuk and M. Gluz. Bioreactors, Airlift reactors. Encyclopedia of Bioprocess Technology. (2002): 320-394.

Janae L. Csavina. The Optimization of Growth Rate and Lipid Content from Select Algae Strains. Master 'Thesis, Department of Civil Engineering and the Russ College of Engineering and Technology. Faculty of the Russ College of Engineering and Technology of Ohio University, 2008.

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

Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., and Pavasant, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. Bioresource Technology. 98(2) (2007): 288-295.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

Krichnavaruk, S., Loataweesup, W., Powtongsook, S., and Pavasant, P. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. Chemical Engineering Journal. 105(3) (2005): 91-98.

Lee, E., Heng, R.L. and Pilon, L. Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer. 114 (2013): 122-135.

Mantoura, R. F. C. and Wrigh, S. W., Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. SCOR and UNESCO, 1997.

Masojídek, J., Torzillo, G., Kopecký, J., KoblížekL, M., Lukavská, A. and Sacchi, A. 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(3) (2000): 417-426.

Minguez-Mosquera, M.I. and Hornero-Mendez, D.Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers ,paprika, and oleoresin by reversed phase HPLC. J. Agric Food Chem.41 (1993): 1616-1620.

Monkonsit, S., Powtongsook, S., and Pavasant, P. Comparison between Airlift Photobioreactor and Bubble Column for *Skeletonema costatum* cultivation. Engineering Journal. 15(4) (2011): 53-64.

Parjikolaei, B.R., Kloster, L., Bruhn, A., Rasmussen, M.B., Frette, X.C., and Christensen, K.V. Effect of Light Quality and Nitrogen Availability on the Biomass Production and Pigment Content of Palmariapalmata (Rhodophyta). Chemical Engineering Transactions. 32 (2013): 967-972.

Peerapornpisan, Y. Phycology, ed. 1. 2003, Chaingmai: Department of Biology, Departments of Faculty of Science, Chiang Mai University.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Phuphaibul, P. Effects of aeration rate and light wavelength on growth and carotenoids production in microalga *Chlorococcum humicola* in photobioreactor. Master's Thesis, Department of Chemical Engineering faculty, Chulalongkorn, University, 2016.

Powtongsook, S. and Wisessang, S. Strain selection and culture of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) for beta-carotene production. Master's Thesis, Department of Chemical Engineering faculty, Chulalongkorn, University, 1993.

Priest, J. The DIY decorator's eco-friendly lighting dilemma. Housecraft. (2015)

Singh, S.P. and Singh, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 50(1) (2015): 431.

Takenaka, M., Sato, Y., Lee Smith R., and Inomata, H. Effects of light intensity and temperature on photoautotrophic growth of a green microalga, *Chlorococcum littorale.* Biotechnology Reports. (2015).

Teo, C.L., Idris, A., Wahidin, S., and Lai, L.W. Effect of Different Light Wavelength on the Growth of Marine Microalgae. Journal Teknologi. 67(3) (2014); 97.

Viriyayingsiri, T., Sittplangkoon, P., Powtongsook, S., and Nootong, K. Continuous production of diatom Entomoneis sp. in mechanically stirred tank and flat-panel airlift photobioreactors. Preparative Biochemistry & Biotechnology. 46(7) (2016): 740-746.

Wannasutthiwat, S. Growth and enhancement of carotenoids production in microalga *Chlorococcum humicola* in continuous cultivation. Master's Thesis, Department of Chemical Engineering faculty, Chulalongkorn, University, 2014.

Westphal A.N. and Böhm V. Carotenoids: Properties, distribution, bioavailability, metabolism and health effects. Ernaehrungs Umschau. 11(1) (2015): 196-207.

Yuan, J.P., Chen, F., Liu, X. and Li, X.Z. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. Food Chemistry. 76(3) (2002): 319-325.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Zhang, D.H. and Lee, Y.K. Ketocarotenoid production by a mutant of *Chlorococcum* sp. In an outdoor tubular photobioreactor. Biotechnology Letters. 21(1) (1999): 7.

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry weight)

(APHA, 1992)

อุปกรณ์และสารเคมี

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

วิธีการวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง

1. กระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 103 – 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ และนำไปเก็บไว้ที่ Vacuum dessicator
2. เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 5 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างน้ำกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบแห้งจากข้อ 1
4. ล้างเซลล์บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น
5. นำกระดาษกรองมาอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 103 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่
6. น้ำหนักเซลล์แห้งคือผลต่างของน้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์กับน้ำหนักกระดาษกรองเริ่มต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์ความเข้มข้นคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

(Strickland and Parsons et al., 1972)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. UV-Vis Spectrophotometer
2. เครื่อง Centrifuge
3. เครื่อง Vortex
4. ชุดเครื่องแก้วทดลอง
5. แท่งแก้วบดสาร
6. สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 98% โดยปริมาตร

วิธีการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

1. เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 1.5 มิลลิลิตร
2. นำตัวอย่างน้ำประมาณ 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลวใส
3. บดเซลล์ให้แตกด้วยแท่งแก้ว
4. เติมสารละลายเมทานอลเข้มข้น 98% โดยปริมาตร ในปริมาณเท่ากับตัวอย่างน้ำเริ่มต้น
5. นำไป vortex ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเก็บไว้ในที่เย็น 24 ชั่วโมง
6. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที (สังเกตเห็นเซลล์สีขาวตกตะกอน)
7. นำตัวอย่างของเหลวที่สกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV–VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 480 630 645 และ 665 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ช่วงความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง

1.คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) ช่วงความยาวคลื่น 630 645 และ 665 นาโนเมตร

2.แคโรทีนอยด์ (Total carotenoids) ช่วงความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

วิธีการคำนวณ

Total carotenoids (µg/mL) = $(4*E480)\cdot V_a/V_b$

Chlorophyll A (µg/mL) = $(11.6*E_{665}-1.31*E_{645}-0.014*E_{630})\cdot V_a/V_b$

สำหรับ cuvette ความกว้าง 1 เซนติเมตร

เมื่อ V_a คือปริมาตรสารละลาย (mL)

V_b คือปริมาตรของเหลวตัวอย่าง (mL)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ HPLC

(Chaoruangrit, L et al., 2017)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่อง HPLC (Shimadzu Model Photodiode array detector SPD-M20A)
2. เครื่อง Centrifuge
3. เครื่อง Vortex
4. กระดาษกรอง Nylon membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
5. ชุดเครื่องแก้วทดลอง
6. แท่งแก้วบดสาร
7. สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 98% โดยปริมาตร
8. ขวดบรรจุสารสำหรับ HPLC (Shimadzu)

วิธีการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

1. นำตัวอย่างน้ำประมาณ 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากของเหลวใส
2. บดเซลล์ให้แตกด้วยแท่งแก้ว
3. เติมสารละลายเมทานอลเข้มข้น 98% โดยปริมาตร ในปริมาณเท่ากับตัวอย่างน้ำเริ่มต้น
4. นำไป vortex ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเก็บไว้ในที่เย็น 24 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที (สังเกตเห็นเซลล์สีขาวตกตะกอน)
6. นำตัวอย่างของเหลวที่สกัดได้มากรองด้วยตัวกรอง Nylon membrane บรรจุใส่ขวดตัวอย่างเฉพาะของเครื่อง HPLC และนำเข้าเครื่อง พร้อมทำการวิเคราะห์ที่ base line 452 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิธีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ด้วย HPLC

1. นำตัวอย่างที่สกัดมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วย C-18 คอลัมน์และ Photo Diode Array Detector รุ่น SPD-M20A
2. เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างน้ำกลั่น เมทานอล อะซิโตไนไตรล์ และไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 1:10:79:10 ตามลำดับ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที
3. ทำการฉีดตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 30 นาที
4. ทำการจำแนกชนิดสารกลุ่มแคโรทีนอยด์อาศัยการเปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC กับข้อมูลสเปกตรัมที่ใช้สำหรับจำแนกชนิดของรงควัตถุจากหนังสือ Phytoplankton pigments in oceanography : Guidelines to modern methods (R.F.C. Mantoura and S.W. Wright, 1997)
5. คำนวณความเข้มข้นของลูทีนและเบต้าแคโรทีนจากกราฟสอบเทียบจากมาตรฐาน (รูปที่ ค.1 และ ค.2)

วิธีการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมดของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1. รวบรวมข้อมูลโครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้กราฟของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ base line 440 นาโนเมตร
2. พื้นที่ใต้กราฟของแคโรทีนอยด์ที่สามารถระบุชนิดได้จะถูกคูณด้วย Relative response factor (ดังตารางที่ ค.1) เพื่อปรับค่าให้อยู่ใน base line เดียวกัน เนื่องจากแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดกลืนแสงแต่ละช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน
3. รวมค่าพื้นที่ใต้กราฟของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดซึ่งถูกปรับค่าแล้ว ได้เป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด
4. คำนวณเปอร์เซ็นต์จากสมการ

$$\% \text{ of total carotenoid} = (A_{carotenoid}/A_{total})*100$$

เมื่อ $A_{carotenoid}$ คือพื้นที่ใต้กราฟที่ถูกปรับค่าแล้วของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิด

A_{total} คือผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟถูกปรับค่าแล้วของแคโรทีนอยด์ทุกชนิด

TABLE 16.4 Pigment concentrations from the HPLC analysis of the seawater sample shown in Figure 16.7[a] using canthaxanthin as internal standard.

HPLC peak no. (see Fig. 16.7)	Pigment	Peak area A_p (μV.s)	Relative response factor f_p^b (ND)[b]	Pigment concentration in seawater[c] C_p (ng.l^{-1})
5	Chl c_3	70.06	0.55	152
6b	Chl c_{1+2}	55.00	0.63	139
7	Perid	24.12	1.49	143
9	But-fuco	20.73	1.24	102
10	Fuco	17.94	1.09	78
15	Hex-fuco	94.94	1.26	478
26	Diadino	43.44	0.86	148
33	Lut	2.41	0.72	7
33	Zea	3.70	0.86	13
IS	Cantha	50.76	1.00	202
37	Chl *b*	5.86	2.51	59
41	Chl *a*	85.78	2.89	989
52	β,β-Car	4.13	0.77	13

ตารางที่ ค.1 Relative response factor ซึ่งใช้ canthaxanthin เป็น internal standard (R.F.C. Mantoura and S.W. Wright, 1997: หน้า 424)

Table IV. Range of Amount of Pigment Used for the Calibration and Individual Response Factors

pigment	range of wt injected, μg	range of wt ratios[a]	response factor	coeff of correln
neoxanthin	1.62–30.85	0.056–1.056	1.988	0.9987
capsorubin	1.15–17.22	0.039–0.590	1.755	0.9975
violaxanthin	2.36–47.24	0.081–1.617	1.177	0.9986
capsanthin	3.21–83.57	0.110–2.861	1.230	0.9991
zeaxanthin	2.37–45.02	0.081–1.541	1.069	0.9988
β-cryptoxanthin	1.93–50.33	0.066–1.723	1.057	0.9984
β-carotene	1.94–50.58	0.067–1.732	1.047	0.9998

ตารางที่ ค.2 Relative response factor ซึ่งใช้ β-apo-8'-carotenal เป็น internal standard (Minguez-Mosquera, M.I. and Hornero-Mendez, D., 1993)

หมายเหตุ : ค่า response factor สำหรับ violaxanthin ไม่ปรากฏในตารางที่ ค.1 ดังนั้นค่าที่ใช้ในการคำนวณจึงได้จากการคำนวณขึ้นใหม่โดยใช้ข้อมูล β –carotene จากตารางที่ ค.1 และ ค.2 ดังนี้ (1.177*0.77)/1.047 = 0.87

การคำนวณวิธีนี้จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ที่สมบูรณ์เมื่อสามารถระบุชนิดของ Unknown1 ซึ่งเป็นสารที่พบได้มากในจุลสาหร่าย *C.humicola* สังเกตได้จากค่าพื้นที่ใต้กราฟ

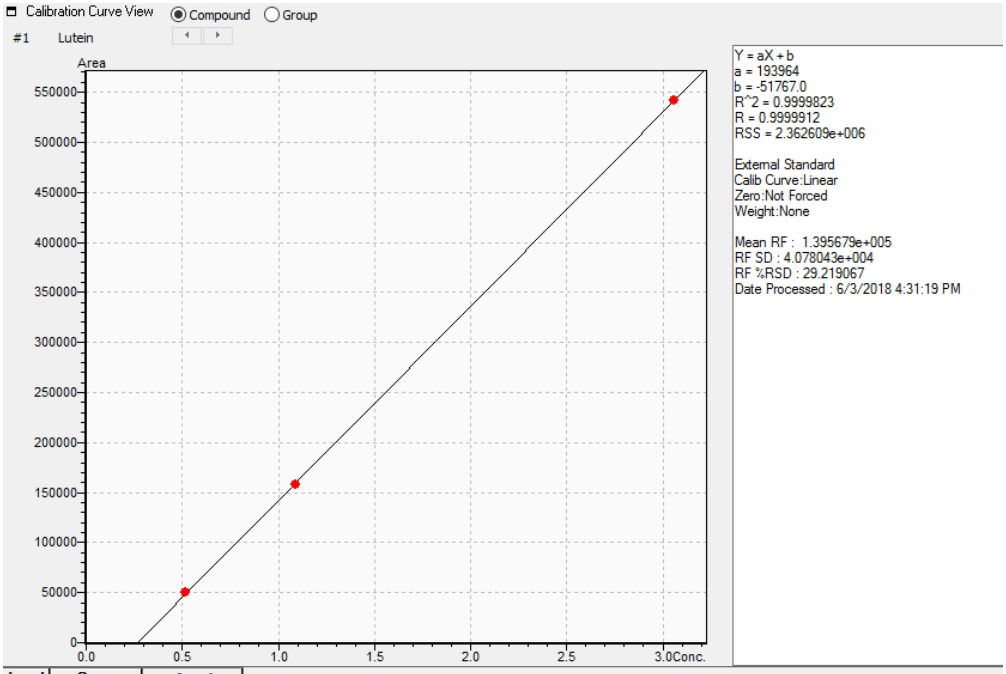
Area (440 nm)	1 L Stirred tank			2 L Airlift	60 L Airlift
Carotenoids	Daylight	Cool white	Warm white	Daylight	Daylight
Unknown1	295529	293411	197096	453101	269667
Violaxanthin	117109	117163	86575	158425	103002
Unknown2	15031	13512	12701	20192	14687
Unknown3	4916	4265	4897	10134	5944
Lutein	215863	179714	102783	305540	267027
Unknown4	13846	10881	10987	22700	11240
Chlorophyll b	714837	684295	428556	963535	453282
Chlorophyll a	151614	119519	58943	150069	129492
Beta-carotene	47686	38072	17561	62532	61479

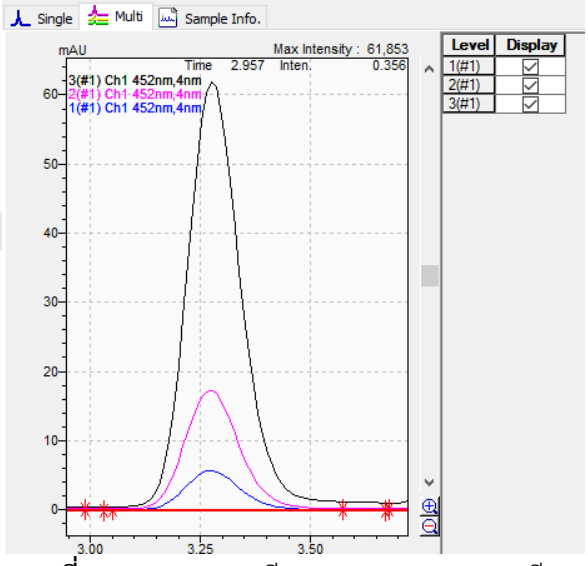
ตารางที่ ค.3 พื้นที่ใต้กราฟของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดในชุดการทดลองที่แตกต่างกันจากการวิเคราะห์ผล HPLC ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

ตัวอย่างการคำนวณ

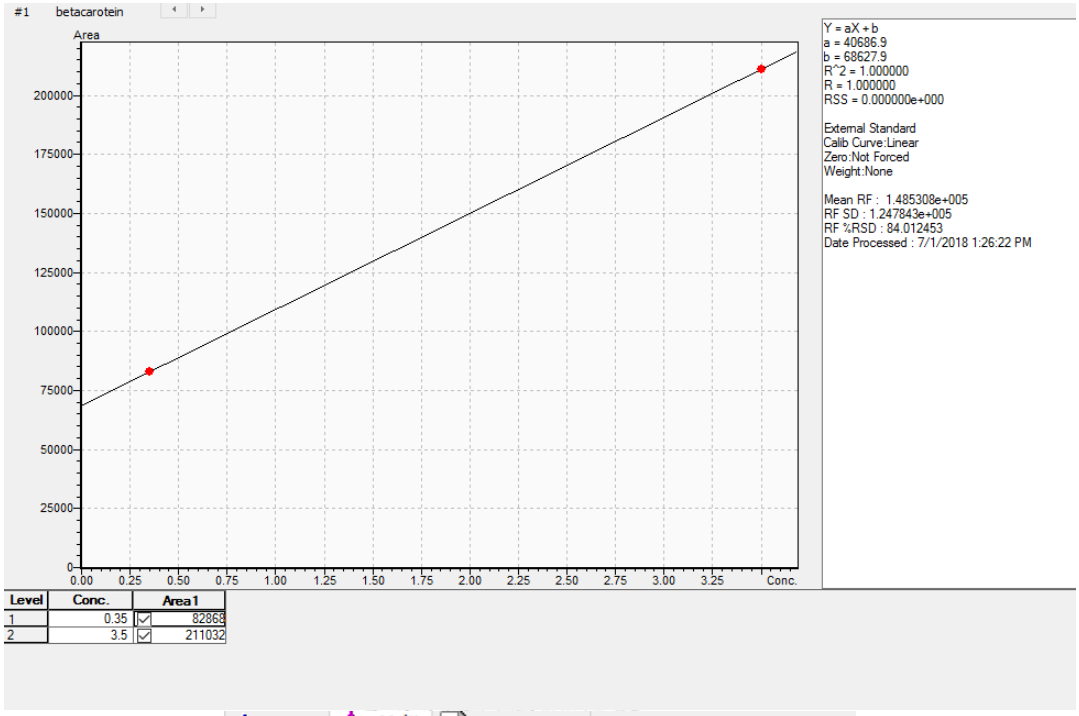
เช่นที่การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ด้วยแสงสีขาวอมฟ้า (Daylight)

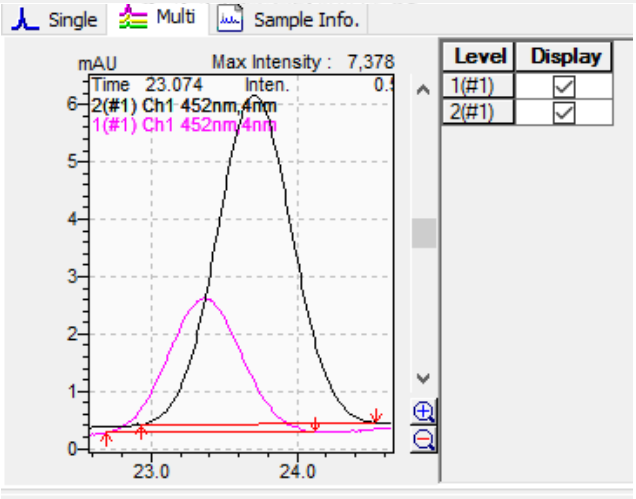
ชนิดของแคโรทีนอยด์	พื้นที่ใต้กราฟที่สามารถปรับค่าได้	% of total carotenoid
Unknown1	295529	(295529/623345)*100= 47.41
Violaxanthin	117109*0.87=101884	(101884/623345)*100= 16.34
Unknown2	15031	(15031/623345)*100= 2.41
Unknown3	4916	(4916/623345)*100= 0.79
Lutein	215863*0.72=155421	(155421/623345)*100= 24.93
Unknown4	13846	(13846/623345)*100= 2.22
Beta-carotene	47686*0.77=36718	(36718/623345)*100= 5.89
Total	**623345**	**100**





รูปที่ ค.1 กราฟสอบเทียบของสารมาตรฐานลูทีน





รูปที่ ค.2 กราฟสอบเทียบของสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและฟอสเฟตในอาหาร BG-11

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

อุปกรณ์และสารเคมี

1. UV-Vis Spectrophotometer
2. กระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 47 มิลลิเมตร
3. ชุดเครื่องแก้วทดลอง
4. Ammonium molybdate: $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$
5. Sulfuric Acid: H_2SO_4
6. Ascorbic Acid
7. Potassium antimony tartrate: $K(SbO)C_4H_4O_6.0.5H_2O$

วิธีการเตรียมสารละลายรีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

1. Ammonium molybdate: $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$
   - ละลาย Ammonium molybdate 15 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดทึบแสง)

2. Sulfuric Acid: H_2SO_4
   - เติม Sulfuric Acid ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดแก้วและเก็บไว้ในที่เย็น)

3. Ascorbic Acid
   - ละลาย Ascorbic Acid (AR grade) 27 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกและเก็บไว้ในที่เย็น)

4. Potassium antimony tartrate: $K(SbO)C_4H_4O_6.0.5H_2O$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- ละลาย Potassium antimony tartrate 0.34 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร (เก็บไว้ในขวดพลาสติกหรือขวดแก้ว)

5. Mixed Reagent
   - นำ Ammonium molybdate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ Sulfuric Acid ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Ascorbic Acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ Potassium antimony tartrate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: Mixed Reagent ปริมาตรดังกล่าวใช้ได้กับตัวอย่างน้ำจำนวน 50 ตัวอย่าง ไม่ควรเก็บไว้เกิน 6 ชั่วโมงและควรเตรียมสำหรับการวิเคราะห์ใหม่ทุกครั้ง

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standards) ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต

1. เตรียมสารละลายไนเตรทจากสารละลาย (KNO_3)NO_3^- ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร
2. เตรียมสารละลายฟอสเฟตจากสารละลาย
3. PO_4 ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร
4. เติมรีเอเจนต์ในสารละลายฟอสเฟตในอัตราส่วนรีเอเจนต์ต่อสารตัวอย่าง 1:10 ทิ้งไว้ 10 นาที ไม่เกิน 2 ชั่วโมง ขณะที่สารละลายไนเตรทไม่มีการเติมรีเอเจนต์
5. นำสารทั้งสองชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยไนเตรทวัดในช่วง 220 และ 275 นาโนเมตร และฟอสเฟตในช่วงความคลื่น 885 นาโนเมตร
6. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นไนเตรทและฟอสเฟต

ขั้นตอนการวิเคราะห์ไนเตรท

1. กรองของเหลวตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร
2. Dilute สารละลายตัวอย่าง 50 เท่า
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโมเมตร
4. คำนวณผลที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ขั้นตอนการวิเคราะห์ฟอสเฟต

1. กรองของเหลวตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/C ขนาด 25 มิลลิเมตร
2. เติมรีเอเจนต์ลงในตัวอย่างด้วยอัตราส่วนของรีเอเจนต์ต่อปริมาณของเหลวตัวอย่าง 1:10
3. ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex
4. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที และไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร
6. คำนวณผลที่ได้เทียบกับค่ามาตรฐาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

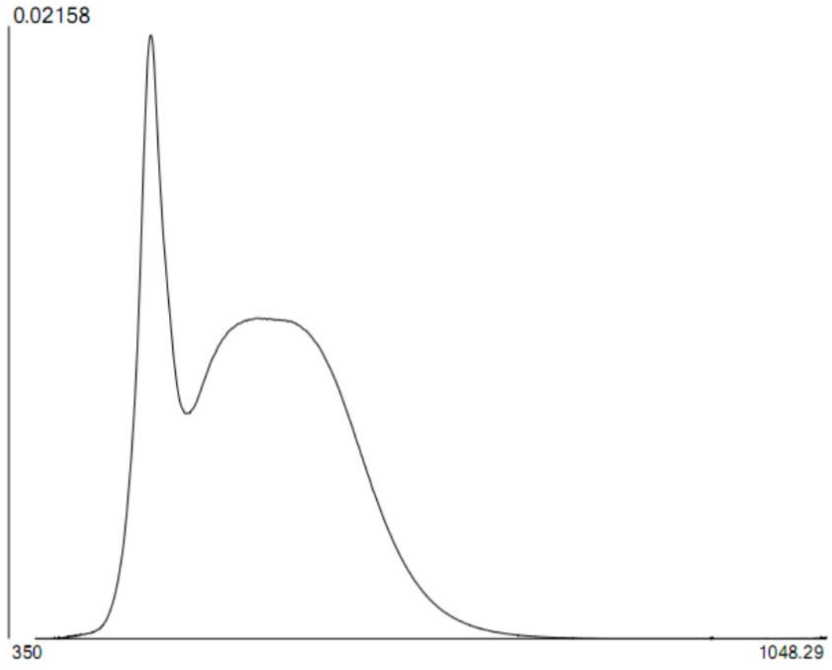
ภาคผนวก จ.

ข้อมูลพื้นฐานของหลอดไฟแอลอีดี

(บริษัท เฟโล ซีลวาเนีย ประเทศไทย จำกัด)

The Report of Test Lamp

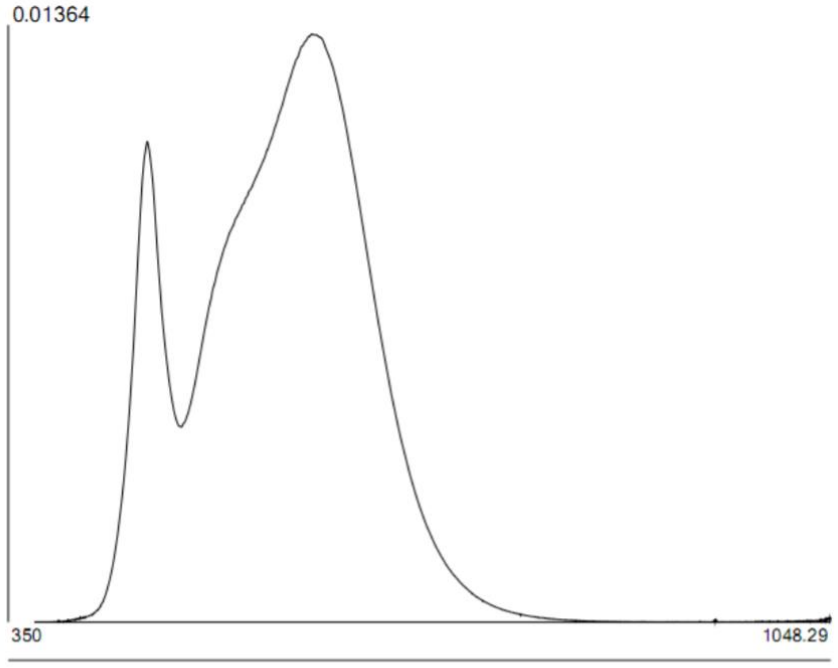
Type	10W
Sample No.	1800258a08
Test Date	2018-03-01 11:54:01
Wave Length Range (nm)	350.00nm--1048.29nm
Color Coodinates	x=0.3135, y=0.3326
Color Temperature (K)	6435.0
Luminous Flux (Lm)	878.00
Corrected Luminou (Lm)	878.00
Rendering Index	87.05
Color Tolerance	3.3
Voltage (V)	229.73
Circuit Current (A)	0.0423
Circuit Wattage (W)	9.19
Circuit Power Factor	0.9500
Lamp Voltage (V)	230.01
Lamp Current (A)	0.0421
Lamp Wattage (W)	9.15
Lamp Power Factor	0.9400
Luminous Efficeney (Lm/W)	95.96



(operation)

The Report of Test Lamp

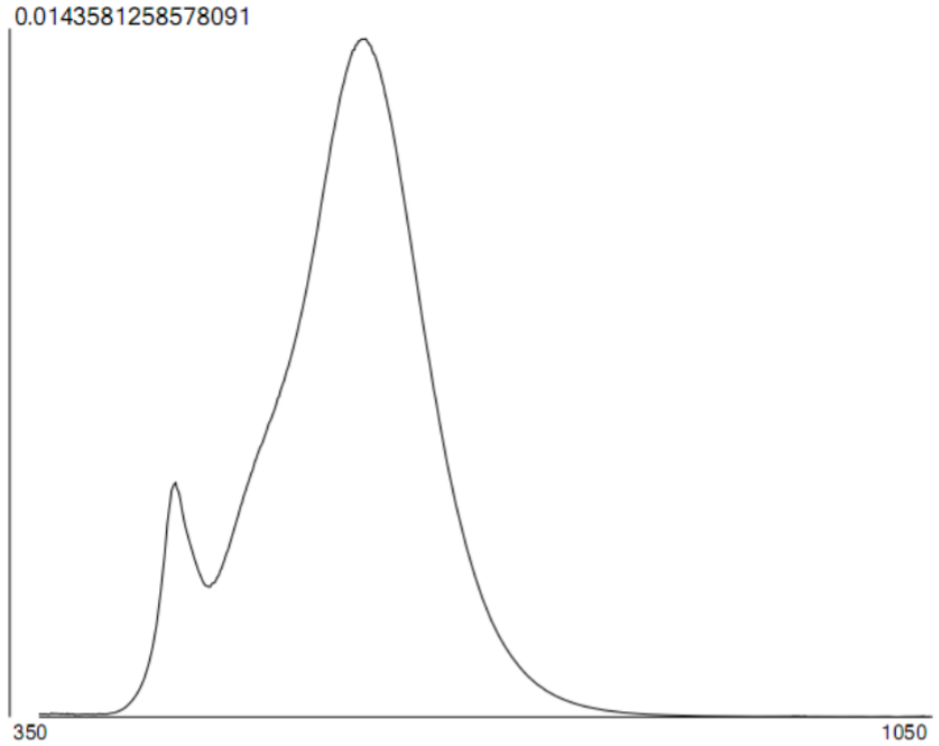
Type	10W
Sample No.	1800311a08
Test Date	2018-03-09 12:09:41
Wave Length Range (nm)	350.00nm--1048.29nm
Color Coodinates	x=0.3841, y=0.3806
Color Temperature (K)	3930.0
Luminous Flux (Lm)	890.00
Corrected Luminou (Lm)	890.00
Rendering Index	84.21
Color Tolerance	2.4
Voltage (V)	229.65
Circuit Current (A)	0.0425
Circuit Wattage (W)	9.29
Circuit Power Factor	0.9500
Lamp Voltage (V)	229.95
Lamp Current (A)	0.0423
Lamp Wattage (W)	9.26
Lamp Power Factor	0.9500
Luminous Efficeney (Lm/W)	96.11



(operation)

The Report of Test Lamp

Type	10W
Sample No.	1701410a01
Test Date	2017-05-21 17:16:54
Wave Length Range (nm)	350.00nm--1050nm
Color Coodinates	x=0.4589, y=0.4143
Color Temperature (K)	2740.0
Luminous Flux (Lm)	829.00
Corrected Luminou (Lm)	829.00
Rendering Index	79.94
Color Tolerance	2.7
Voltage (V)	229.96
Circuit Current (A)	0.0422
Circuit Wattage (W)	9.20
Circuit Power Factor	0.9500
Lamp Voltage (V)	229.96
Lamp Current (A)	0.0422
Lamp Wattage (W)	9.21
Lamp Power Factor	0.9500
Luminous Efficeney (Lm/W)	90.01

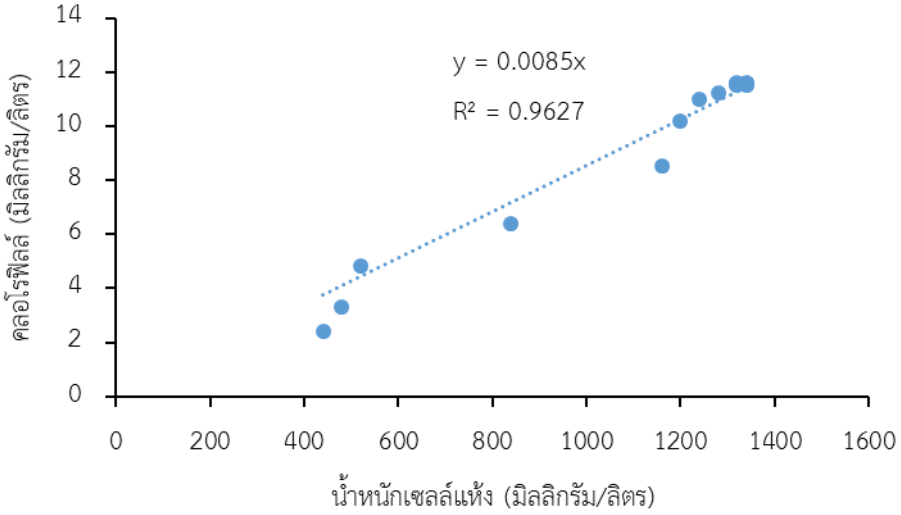


(operation)

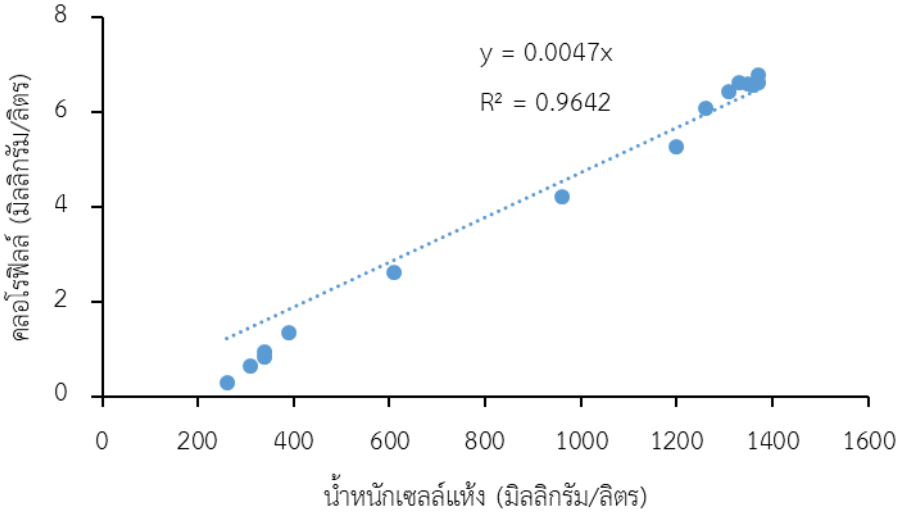
ภาคผนวก ฉ.

การติดตามผลการทดลอง

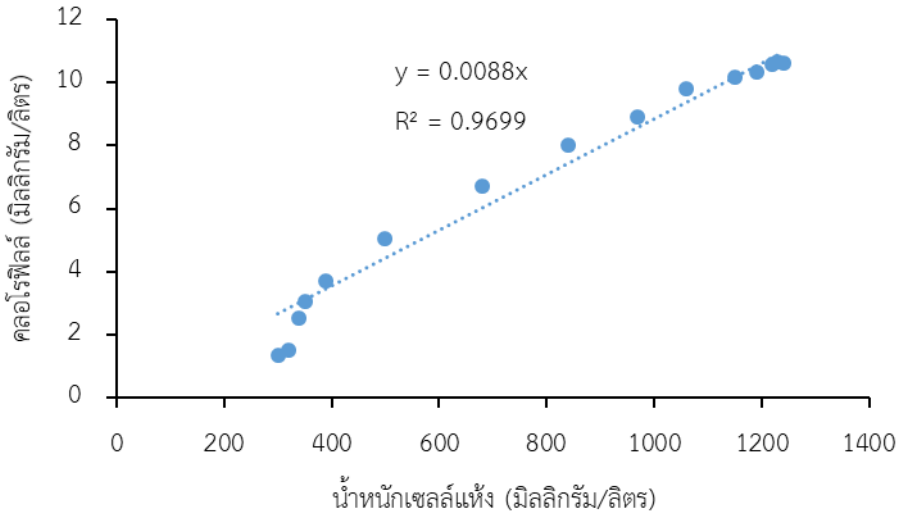
1. การวิเคราะห์ชีวมวลจากการวัดคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll determination)



รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานชีวมวลของจุลสาหร่าย *C.humicola* ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศถังกวนขนาด 1 ลิตร ด้วยแสงสีขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์

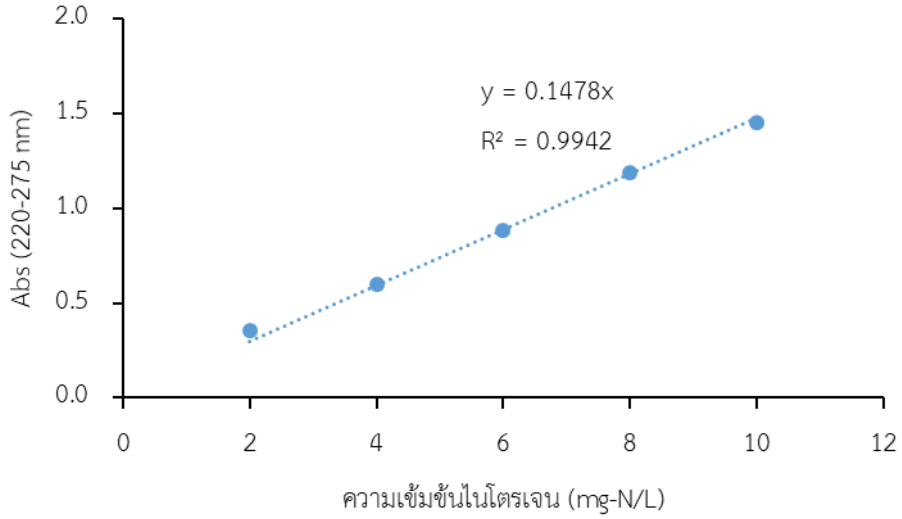


รูปที่ ฉ.2 กราฟมาตรฐานชีวมวลของจุลสาหร่าย *C.humicola* ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่ A_D/A_R 3 อัตราการเติมอากาศ 1.6 ลิตร/นาที ด้วยแสงสีขาวอมฟ้า 5,000 ลักซ์

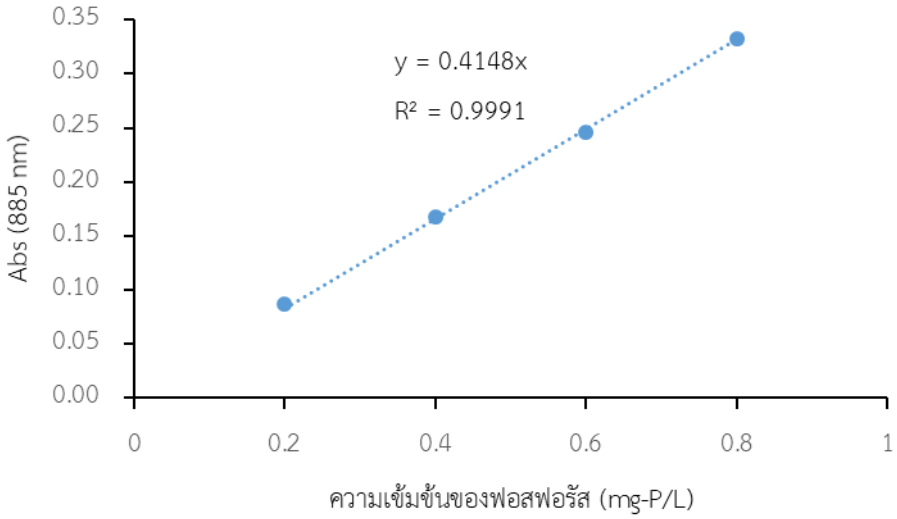


รูปที่ ฉ.3 กราฟมาตรฐานชีวมวลของจุลสาหร่าย *C.humicola* ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร ที่ A_D/A_R 3 อัตราการเติมอากาศ 20 ลิตร/นาที ด้วยแสงสีขาวอมฟ้า 20,000 ลักซ์

2. ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน



รูปที่ ฉ.4 กราฟมาตรฐานสารละลายไนเตรท



รูปที่ ฉ.5 กราฟมาตรฐานสารละลายฟอสเฟต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ช.

ผลการเติบโตของจุลสาหร่ายโดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ ช-1 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิสีของแสงแตกต่างกัน

วัน	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/l)			S.D.		
	Warm white	Cool white	Daylight	Warm white	Cool white	Daylight
1	420	420	440	9.41	11.55	7.24
2	440	440	460	17.42	19.17	13.40
3	460	460	480	25.34	27.88	19.50
4	640	640	740	20.54	22.60	15.80
5	820	820	1000	26.50	29.15	20.38
6	890	890	1050	27.55	30.30	21.19
7	950	950	1100	15.34	16.88	18.41
8	1020	1020	1150	13.47	14.81	16.16
9	1080	1080	1170	16.35	17.98	19.61
10	1120	1120	1180	12.02	13.23	14.43
11	1160	1160	1200	19.03	20.93	22.84
12	1180	1180	1220	8.04	8.85	6.19
13	1210	1210	1240	9.30	10.23	7.16
14	1230	1230	1250	10.42	11.47	8.02
15	1240	1240	1260	15.28	10.00	11.75

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช-2 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิสีของแสงแตกต่างกัน

วัน	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/l)			S.D.		
	Warm white	Cool white	Daylight	Warm white	Cool white	Daylight
1	210	220	220	0.71	2.83	4.24
2	210	240	240	2.12	2.12	2.83
3	230	220	240	0.71	2.12	1.41
4	250	270	290	7.78	10.61	13.44
5	320	360	370	7.78	13.44	11.31
6	390	490	550	17.68	17.68	16.26
7	460	610	700	19.80	25.46	19.80
8	590	780	880	15.56	27.58	12.02
9	780	900	980	7.78	26.87	16.26
10	860	930	990	24.04	23.33	24.75
11	890	950	1000	26.16	13.44	25.46
12	910	950	1010	14.14	11.31	11.31
13	930	960	1000	27.58	12.73	28.28
14	940	960	1010	21.21	14.85	22.63
15	950	970	1020	9.19	24.75	26.16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช-3 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่ใช้แสง Daylight และอัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม ที่ A_D/A_R แตกต่างกัน

วัน	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/l)			S.D.		
	A_D/A_R =1.7	A_D/A_R =3.0	A_D/A_R =5.6	A_D/A_R =1.7	A_D/A_R =3.0	A_D/A_R =5.6
1	280	250	240	45.83	80.21	47.26
2	320	300	300	20.00	36.06	51.32
3	300	340	330	55.68	36.06	66.58
4	360	340	320	61.10	45.09	50.00
5	370	380	350	20.82	30.55	30.55
6	580	610	520	70.00	68.07	47.26
7	1000	960	840	40.41	45.09	40.41
8	1160	1200	1000	65.57	35.12	35.12
9	1260	1260	1100	62.45	52.92	47.26
10	1290	1310	1100	65.57	45.83	47.26
11	1340	1360	1100	40.00	40.41	25.17
12	1320	1370	1130	55.08	30.00	30.55
13	1350	1350	1170	36.06	47.26	45.83
14	1350	1330	1130	51.32	47.26	51.32
15	1340	1370	1140	35.12	60.00	25.17

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช-4 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่ใช้แสง Daylight และ A_D/A_R =3 ที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน

วัน	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/l)				S.D.			
	0.5 vvm	0.8 vvm	1.25 vvm	1.6 vvm	0.5 vvm	0.8 vvm	1.25 vvm	1.6 vvm
1	270	260	270	280	7.07	7.07	7.07	7.07
2	330	310	320	320	7.07	7.07	7.07	14.14
3	350	340	320	330	7.07	21.21	14.14	14.14
4	330	340	330	340	7.07	7.07	7.07	14.14
5	360	390	370	370	14.14	7.07	7.07	21.21
6	570	610	500	490	7.07	7.07	7.07	14.14
7	790	960	730	560	7.07	28.28	21.21	49.50
8	960	1200	970	830	7.07	14.14	21.21	21.21
9	1080	1260	1080	920	14.14	7.07	7.07	35.36
10	1160	1310	1200	1030	7.07	7.07	7.07	14.14
11	1210	1360	1250	1070	14.14	21.21	7.07	7.07
12	1240	1370	1230	1090	7.07	7.07	14.14	28.28
13	1200	1350	1170	1060	14.14	7.07	7.07	14.14
14	1190	1330	1170	1110	7.07	7.07	7.07	7.07
15	1210	1370	1200	1110	14.14	7.07	21.21	7.07

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช-5 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร

วัน	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/L)	S.D.
1	300	14.14
2	320	21.21
3	340	14.14
4	350	14.14
5	390	14.14
6	500	35.36
7	680	35.36
8	840	35.36
9	970	35.36
10	1060	35.36
11	1150	28.28
12	1190	35.36
13	1220	21.21
14	1230	14.14
15	1240	14.14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ซ.

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

ตารางที่ ซ-1 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบถังกวนขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิสีของแสงแตกต่างกัน

วัน	แคโรทีนอยด์ (mg/l)			S.D.		
	Warm white	Cool white	Daylight	Warm white	Cool white	Daylight
1	0.834	0.814	0.802	0.02	0.03	0.02
2	0.930	0.818	0.990	0.02	0.03	0.02
3	1.100	0.982	1.284	0.22	0.02	0.04
4	1.116	1.316	1.480	0.03	0.04	0.04
5	1.304	1.526	2.056	0.03	0.03	0.04
6	1.384	1.798	2.382	0.03	0.02	0.07
7	1.346	1.816	2.758	0.10	0.12	0.15
8	1.577	2.172	2.964	0.01	0.10	0.10
9	1.721	2.490	3.040	0.04	0.10	0.02
10	1.760	2.734	3.192	0.02	0.07	0.02
11	1.768	2.840	3.296	0.05	0.10	0.05
12	1.778	2.898	3.325	0.08	0.10	0.10
13	1.788	2.921	3.496	0.04	0.07	0.06
14	1.794	2.934	3.537	0.05	0.10	0.07
15	1.793	2.941	3.601	0.08	0.09	0.08

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ-2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์เติมอากาศขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิสีของแสงแตกต่างกัน

วัน	แคโรทีนอยด์ (mg/l)			S.D.		
	Warm white	Cool white	Daylight	Warm white	Cool white	Daylight
1	0.476	0.504	0.484	0.04	0.02	0.03
2	0.496	0.544	0.520	0.03	0.05	0.06
3	0.658	0.675	0.663	0.02	0.03	0.07
4	1.019	1.107	1.052	0.03	0.04	0.04
5	1.218	1.321	1.376	0.10	0.05	0.08
6	1.302	1.557	1.678	0.12	0.06	0.09
7	1.301	1.616	1.841	0.16	0.17	0.12
8	1.629	1.978	2.169	0.10	0.10	0.07
9	1.959	2.351	2.522	0.07	0.08	0.10
10	1.982	2.735	2.876	0.15	0.07	0.17
11	2.440	2.992	3.596	0.04	0.04	0.07
12	2.460	2.957	3.701	0.03	0.09	0.07
13	2.320	2.962	3.720	0.06	0.05	0.08
14	2.132	2.948	3.528	0.09	0.06	0.13
15	2.156	2.991	3.544	0.09	0.07	0.10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ-3 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่ใช้แสง Daylight และอัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม ที่ A_D/A_R แตกต่างกัน

วัน	แคโรทีนอยด์ (mg/l)			S.D.		
	A_D/A_R =1.7	A_D/A_R =3.0	A_D/A_R =5.6	A_D/A_R =1.7	A_D/A_R =3.0	A_D/A_R =5.6
1	0.726	0.648	0.657	0.10	0.01	0.10
2	0.940	0.916	0.893	0.02	0.02	0.03
3	1.012	1.172	1.024	0.11	0.10	0.01
4	1.600	1.536	1.294	0.12	0.10	0.22
5	1.865	2.058	1.574	0.17	0.09	0.14
6	2.815	3.004	2.142	0.20	0.05	0.17
7	4.604	4.556	3.499	0.20	0.17	0.17
8	5.228	5.617	4.076	0.22	0.17	0.26
9	5.990	6.124	4.705	0.15	0.10	0.09
10	6.054	6.291	4.967	0.17	0.14	0.15
11	6.316	6.457	5.037	0.24	0.05	0.07
12	6.326	6.523	5.196	0.17	0.09	0.17
13	6.259	6.471	5.216	0.20	0.07	0.20
14	6.363	6.458	5.112	0.17	0.05	0.14
15	6.290	6.445	5.127	0.17	0.05	0.10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ-4 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่ใช้แสง Daylight และ A_D/A_R =3 ที่อัตราการไหลของอากาศแตกต่างกัน

วัน	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/l)				S.D.			
	0.5 vvm	0.8 vvm	1.25 vvm	1.6 vvm	0.5 vvm	0.8 vvm	1.25 vvm	1.6 vvm
1	0.683	0.648	0.676	0.728	0.02	0.01	0.13	0.06
2	0.892	0.916	0.882	0.928	0.04	0.01	0.04	0.02
3	1.179	1.172	1.095	1.146	0.02	0.09	0.13	0.02
4	1.406	1.536	1.433	1.436	0.04	0.09	0.13	0.02
5	1.806	2.058	1.810	1.905	0.10	0.05	0.12	0.03
6	2.794	3.004	2.436	2.505	0.04	0.17	0.01	0.08
7	3.723	4.556	3.365	2.527	0.23	0.17	0.01	0.26
8	4.422	5.617	4.343	3.817	0.03	0.10	0.14	0.05
9	5.182	6.124	4.931	4.390	0.21	0.13	0.04	0.00
10	5.437	6.291	5.430	4.684	0.09	0.05	0.06	0.15
11	5.633	6.457	5.781	5.183	0.10	0.09	0.05	0.07
12	5.681	6.523	5.818	5.284	0.11	0.05	0.11	0.03
13	5.645	6.471	5.901	5.299	0.15	0.02	0.08	0.03
14	5.675	6.458	5.857	5.416	0.10	0.06	0.10	0.06
15	5.755	6.445	5.916	5.402	0.03	0.04	0.15	0.09

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ-5 ปริมาณแคโรทีนอยด์ของจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร

วัน	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (mg/L)	S.D.
1	0.355	0.07
2	0.379	0.06
3	0.614	0.06
4	0.754	0.08
5	0.994	0.11
6	1.536	0.21
7	2.050	0.13
8	2.544	0.13
9	3.038	0.22
10	3.468	0.18
11	3.782	0.18
12	3.996	0.13
13	4.195	0.16
14	4.345	0.15
15	4.402	0.06

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฌ.
ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก

ตารางที่ ฌ-1 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรทและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 2 ลิตร ที่ใช้แสง Daylight และ A_D/A_R =3 และอัตราการไหลของอากาศ 0.8 วีวีเอ็ม

วัน	ไนเตรท (mg-N/L)		ฟอสเฟต (mg-P/L)	
	ค่าเฉลี่ย	S.D.	ค่าเฉลี่ย	S.D.
1	273.330	1.181	7.140	0.01
2	256.000	10.486	6.781	0.23
3	248.660	9.037	5.671	0.25
4	230.000	11.547	4.464	0.23
5	230.403	8.956	2.117	0.05
6	225.588	11.786	1.276	0.06
7	215.248	14.024	1.265	0.01
8	221.668	15.674	1.010	0.05
9	205.102	10.251	0.856	0.11
10	208.735	13.789	0.921	0.09
11	198.925	17.441	0.943	0.10
12	195.274	16.034	0.856	0.15
13	199.688	13.258	0.840	0.16
14	191.775	18.993	0.722	0.07
15	185.845	13.773	0.751	0.00

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ฌ-2 ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของไนเตรทและฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *C.humicola* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกขนาด 60 ลิตร

วัน	ไนเตรท (mg-N/L)		ฟอสเฟต (mg-P/L)	
	ค่าเฉลี่ย	S.D.	ค่าเฉลี่ย	S.D.
1	307.71	4.98	10.28	0.67
2	300.114	13.09	9.343	0.47
3	293.569	14.17	8.013	0.47
4	272.221	13.59	7.128	0.70
5	246.544	24.88	4.233	0.67
6	269.544	15.13	1.828	0.12
7	263.94	19.21	1.795	0.11
8	253.547	6.87	1.514	0.12
9	245.758	14.25	1.255	0.09
10	239.154	6.75	1.412	0.12
11	234.646	11.19	1.414	0.11
12	235.657	14.75	1.566	0.21
13	230.457	7.64	1.519	0.20
14	227.576	11.75	1.444	0.23
15	220.465	11.34	1.126	0.09

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐสิทธิ์ จำรัสฉาย เกิดเมื่อวันที่ 14 มิถุนายน 2536 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช จบการศึกษาระดับมัธยมต้นและมัธยมปลายจากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ นครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2558 ต่อมาเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2559 ในระหว่างการศึกษาได้มีการเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายในหัวข้อผลของเฉดสีของแสงสีขาวต่อการเติบโตและผลผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย Chlorococcum humicola ในงานประชุมวิชาการการวิทยาศาสตร์ทางทะเล ครั้งที่ 6 ระหว่างวันที่ 18-20 มิถุนายน 2561 ณ โรงแรมเฮอริเทจ บางแสน พร้อมได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานระดับดีเด่นประเภทบรรยาย

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

Jumruschai N., Powtongsook S., Nootong K. Effects of Color Shade of White Light on Growth and Carotenoids Production in Chlorococcum humicola. Proceedings of the 6th Marine Science Conference, Bangsaen Heritage Hotel, Chon Buri, Thailand

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University