การพัฒนาปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบคอลัมน์ฟองสำหรับเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย

Development of a Bubble Column Photobioreactor for Microalgal Culture

ฉัตรชัย กันยาวุธ*, อิทธิศักดิ์ เภาโพธิ์ และ อัจฉริย์ กรมเมือง

Chatchai Kunyawut*, Idtisak Paopo and Atchari Krommuang

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University

Received : 29 October 2018

Revised : 17 March 2019

Accepted : 5 April 2019

บทคัดย่อ

เครื่องปฏิกรณ์ใช้แสงแบบคอลัมน์ฟอง (Bubble column photobioreactor, BCPBR) ถูกพัฒนาเพื่อการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสีเขียวที่ให้อัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตจำเพาะและกรดไขมันสะสมสูง จุลสาหร่ายสีเขียวที่ศึกษาเป็นสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* (วว. TISTR 8551) BCPBR ทำจากคอลัมน์อะคริลิกใสทรงกระบอกปริมาตร 10 ลิตร อัตราส่วนความยาวต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 4.0 โดยประมาณ สภาวะการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเป็นแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องโดยใช้อาหารเหลวสูตร BG-11 ผสมสารละลายอาหารเสริม (Trace metal solution, TMS) 1 มิลลิลิตรต่อลิตรสารอาหารเหลว รักษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ไว้ที่ 6.5 – 8.5 และอุณหภูมิ 28 – 32 องศาเซลเซียส ความความขุ่นของเซลล์ (OD) เริ่มต้นของเซลล์จุลสาหร่ายเท่ากับ 0.1 ป้อนอากาศตลอด 24 ชั่วโมง ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวมีความเข้มของแสงโดยรวม 3,500 ลักซ์ ช่วงเวลาการให้แสงต่อมืดเท่ากับ 12 ชั่วโมง/12 ชั่วโมง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบบกะ 14 วัน และแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนอาหารเหลวทุก 3, 5 และ 7 วัน ผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลสาหร่ายมากที่สุดเท่ากับ 0.162 วัน$^{-1}$ โดยระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวมีผลกระทบต่อผลผลิตจำเพาะเฉลี่ยในช่วงที่มีเปลี่ยนสารอาหารเหลวเพียงเล็กน้อย ผลผลิตจำเพาะของจุลสาหร่ายจากการเพาะเลี้ยงแบบกะมีค่าเท่ากับ 0.742 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องทุกเงื่อนไขเนื่องจากระยะเวลาเพาะเลี้ยงในช่วงเปลี่ยนสารอาหารไม่นานเพียงพอที่ทำให้จุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมีความเหมาะสมมากกว่า อย่างไรก็ตามปริมาณกรดไขมันสะสมของจุลสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบต่อเนื่องนั้นมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยโดยมีปริมาณเพียงร้อยละ 20 – 26 ของน้ำหนักเซลล์แห้งสะสม

คำสำคัญ : จุลสาหร่ายสีเขียว, เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสง, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ผลผลิตจำเพาะ

*Corresponding author. E-mail : chatchai.k@ubu.ac.th

Abstract

A bubble column photobioreactor (BCPBR) was developed to cultivate microalgae providing high specific growth rate, specific productivity and fatty acid content. *Chlorococum humicola* TISTR 8551 was obtained from TISTR. The BCPBR was fabricated from a clear acrylic column with a working volume of 10 L and a column height to diameter ratio of 4.0. The microalgae was grown under batch and semi-continuous cultivations in BG-11 mixed with trace metal solution (TMS) 1 mL/1 L of culture broth while pH was maintained within a range of 6.5 – 8.5 at 28-32 ^{o}C. An initial optical density of cell was 0.1 and air was fed into the BCPBR for 24 h. Light was obtained from cool-white fluorescence with an intensity of 3,500 lux with light and dark period of 12 h/12 h. The culture period of batch cultivation was 14 days and these for semi-continuous cultivation were three culture broth replaced length of 3, 5 and 7 days. It was found that the highest specific growth rate of 0.162 day^{-1} was obtained from batch cultivation. The length of culture broth replacement exhibited little effect on the specific growth rate during semi-continuous cultivations. The specific productivity of 0.742 g L^{-1} day^{-1} gained from batch cultivation was higher than those of semi-continuous cultivations. This was due to all the length of culture broth replacement periods were not long enough to provide the algae to growth efficiently. These experimental results indicated that the batch cultivation was better condition. However, an amount of accumulated fatty acid obtained from both batch and semi-continuous cultivations was slightly different with 20-26 percent of accumulated cell dry weight.

Keywords : green microalgae, photobioreactor, specific growth rate, specific productivity

บทนำ

ปัจจุบันน้ำมันจากแหล่งธรรมชาติถูกนำมาใช้เพิ่มขึ้นเนื่องจากราคาน้ำมันดิบต่อบาเรลในตลาดโลกมีมูลค่าลดลงส่งซึ่งจะผลให้ปริมาณน้ำมันดิบสำรองของโลกลดลงไปอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้หลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยจำเป็นต้องแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทน (Renewable energy) ที่มีความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยหนึ่งในพลังงานทดแทนคือ ไบโอดีเซล (Biodiesel) ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuels) ที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตร เมื่อพิจารณาพืชที่สามารถนำมาผลิตเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงแล้วพบว่าจุลสาหร่าย (Microalgae) เป็นหนึ่งในแหล่งน้ำมันชีวภาพที่สำคัญเนื่องจากเซลล์และเยื่อเมนเบรน (Membrane) ของจุลสาหร่ายมีน้ำมันซึ่งประกอบด้วยลิปิด (Lipid) และกรดไขมัน (Fatty acids) เป็นองค์ประกอบจุลสาหร่ายสามารถสะสมน้ำมันโดยที่เก็บไว้ในเยื่อหุ้มเซลล์ในปริมาณมากถึงร้อยละ 50 – 70 โดยน้ำหนักแห้งเมื่อทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ปัจจุบันเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสง (Photobioreactor, PBR) ได้ถูกพัฒนาเพื่อนำมาใช้เพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายหลายชนิดเนื่องจากสามารถสร้างและบำรุงรักษาได้ง่าย สามารถกำหนดสภาวะการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วงที่จุลสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยทั่วไปแล้วเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟอง (BCPBR) นั้นไม่ใช้ใบพัดกวนผสมทำให้รักษาสภาวะการปลดเชื้อและการปนเปื้อนได้ (Williams, 2002) ทั้งนี้การกวนผสมภายในคอลัมน์ทำได้โดยการป้อนอากาศผ่านหัวพ่นก๊าซ (Sparger) ที่ติดตั้งบริเวณด้านล่างของคอลัมน์ซึ่งทำให้เกิดฟองอากาศไหลขึ้นไปยังส่วนบนของคอลัมน์ทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่อยู่ในฟองอากาศซึ่งแขวนลอยอยู่ในสารอาหารเหลวนั้นสามารถถ่ายเทไปยัง

เซลล์จุลสาหร่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ฟองอากาศยังช่วยให้เซลล์จุลสาหร่ายเกิดการเคลื่อนที่แบบสุ่มและกระจายตัวอยู่ภายในคอลัมน์ซึ่งทำให้ได้รับแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นได้ทั่วถึง การกวนผสมภายในคอลัมน์โดยใช้การป้อนอากาศนั้นสามารถควบคุมหรือลดผลกระทบจากแรงเฉือนที่มีต่อเซลล์สาหร่ายจากฟองอากาศได้โดยการพ่นอากาศด้วยอัตราการไหลหรือความเร็วผิว (Superficial velocity) ที่เหมาะสม (Yalada & Cremaschi, 2014) โดยทั่วไปแล้วการออกแบบ BCPBR สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายให้มีประสิทธิภาพนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยที่สำคัญ 2 ประการ คือ (1) พฤติกรรมทางชลศาสตร์ของของไหล (Hydrodynamics) ซึ่งเป็นรูปแบบการไหลแบบสองเฟส (Two-phase flow regime) ของของเหลวและก๊าซภายในคอลัมน์ และ (2) สัดส่วนหรือรูปทรงของคอลัมน์ (Kadic, 2014) โดยการไหลแบบฟองก๊าซขนาดเล็กแขวนลอย (Dispersed bubble regime) นั้นเป็นรูปแบบการไหลสองเฟสที่มีความเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย ซึ่งสามารถทำให้เกิดขึ้นได้ในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 100 เซนติเมตร และควบคุมให้ความเร็วผิวของอากาศที่ป้อนเข้าสู่ส่วนล่างของคอลัมน์มีค่าน้อยกว่า 2 เซนติเมตรต่อวินาที (Fan, 1989) ฟองอากาศจำนวนมากที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องนั้นโดยทั่วไปแล้วจะมีขนาดเล็กใกล้เคียงกันซึ่งช่วยให้เกิดการถ่ายเทมวลระหว่างจากเฟสก๊าซและของเหลวที่ผนังเซลล์ของจุลสาหร่ายได้ดี (ภายใต้สภาวะที่มีแรงเฉือนต่ำกระทำต่อเซลล์จุลสาหร่าย) ในขณะที่มีการเคลื่อนที่ของฟองอากาศยังช่วยให้ลดการเสียหายของเซลล์จุลสาหร่าย สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเชิงปริมาตรโดยรวมระหว่างเฟสก๊าซและของเหลว ($k_L a$) ภายในเครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์ฟองนั้นขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของฟองก๊าซและปริมาณของก๊าซที่อยู่ภายในคอลัมน์ (Gas hold-up) โดยที่การประเมินหาขนาดเฉลี่ยของฟองก๊าซรวมถึงรูปแบบการไหลวนของของเหลวภายในคอลัมน์นั้นทำได้ค่อนข้างยากในทางปฏิบัติ ดังนั้นสำหรับระบบการไหลแบบสองเฟสซึ่งเฟสของเหลวมีความหนืดค่อนข้างน้อยภายในคอลัมน์ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.08 – 11.6 เมตร ความสูง 0.3 – 21.0 เมตร ฟองก๊าซมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.0 มิลลิเมตร และความเร็วผิวของก๊าซที่ความดันบรรยากาศไม่เกิน 0.3 เมตรต่อวินาที $k_L a$ สามารถประเมินจากสมการที่ (1) โดยความเร็วเชิงเส้นของของเหลวหรือสารอาหารเหลวซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เคลื่อนที่ขึ้นภายในคอลัมน์นั้นสามารถประเมินได้จากสมการที่ (2) และเวลาที่ก๊าซผสมกับของเหลวหรือสารอาหารเหลวสามารถประเมินได้จากสมการที่ (3)

$$k_L a = 0.32 U_G^{0.7} \tag{1}$$

$$U_L = 0.9 \left(g D U_G \right)^{0.33} \tag{2}$$

$$t_m = 1.1 \left(\frac{H}{D} \right) \left(g U_G D^{-2} \right)^{-0.33} \tag{3}$$

โดยที่ U_G และ U_L คือ ความเร็วผิวของก๊าซที่ความดันบรรยากาศ และความเร็วเชิงเส้นของของเหลว (เมตรต่อวินาที) ตามลำดับ g คือ ความเร่งเนื่องจากแรงโน้มถ่วงของโลก (เมตรต่อวินาที^{2}) H และ D คือ ความสูงและเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์ ตามลำดับ t_m คือ เวลาที่ก๊าซผสมกับของเหลวภายในคอลัมน์ (วินาที) (Doran, 2013) สัดส่วนหรือรูปทรงของคอลัมน์เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญในการรักษารูปแบบการไหลแบบสองเฟสภายในคอลัมน์ให้เป็นแบบฟองก๊าซขนาดเล็กแขวนลอยที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยอัตราส่วนระหว่างความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง ($H:D$) ที่เหมาะสมของเครื่องปฏิกรณ์

ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองที่ใช้สำหรับกระบวนการผลิตทางชีวภาพนั้นควรมีค่าอยู่ในช่วง 2 – 5 เนื่องจากเป็นสัดส่วนของคอลัมน์ซึ่งฟองก๊าซจะยังคงไม่เกิดการรวมตัวกันที่บริเวณส่วนบนของคอลัมน์ (Kantarci *et al*., 2004) โดยทั่วไปแล้วสภาวะการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ (1) การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิด (Closed system) โดยมีการเติมสารอาหารเหลวเมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเพียงครั้งเดียวซึ่งเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อผลิตชีวมวลและแคโรทีนอยด์ โดยทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งอัตราการเติบโตของจุลสาหร่ายมีแนวโน้มลดลงจนเป็นศูนย์เนื่องจากเกิดสภาวะขาดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น ธาตุไนโตรเจนซึ่งอยู่ในรูปไนตรท (Nitrate, NO_3^-) และธาตุฟอสฟอรัสซึ่งอยู่ในรูปฟอสเฟต (Phosphate, PO_4^{3-}) หรือเกิดสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และ (2) การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิดโดยจะมีการป้อนสารอาหารเหลวเข้าและดึงสารอาหารเหลวออกจากระบบการเพาะเลี้ยงตลอดเวลาอย่างสมดุล ทำให้การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบกึ่งต่อเนื่องสามารถควบคุมให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะทวีคูณ (Exponential phase) ตลอดเวลา โดยทั่วไปแล้วการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องจะให้ผลผลิตต่อหน่วยเวลา (Productivity) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะเนื่องจากธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายนั้นถูกป้อนเข้าสู่ระบบในแต่ละรอบการเปลี่ยนสารอาหารเหลว

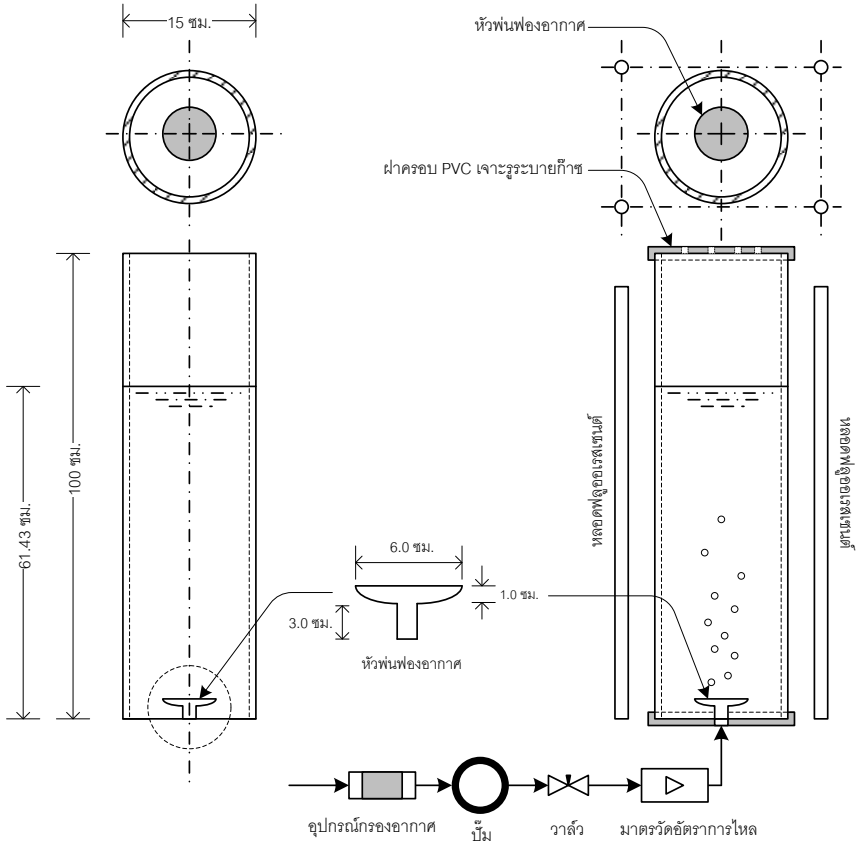
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟองสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* โดยพิจารณาจากพฤติกรรมทางชลศาสตร์ของของไหลและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ผลผลิตจำเพาะ (Specific productivity) และปริมาณกรดไขมันสะสมมีค่าสูง

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องปฏิกรณ์

เครื่องปฏิกรณ์แบบ BCPBR และอุปกรณ์เชื่อมต่อสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในงานวิจัยนี้ (ดังแสดงในภาพที่ 1) ทำจากคอลัมน์พลาสติกชนิดอะคริลิกใสทรงกระบอกมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร เมื่อเติมของอาหารเหลวปริมาตร 10 ลิตร ในคอลัมน์จะทำให้มีความสูงเท่ากับ 61.43 เซนติเมตร ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างความสูงของของเหลวในคอลัมน์ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางจะได้เท่ากับ 4.0 โดยประมาณ ซึ่งอยู่ในช่วงของอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื่องจากในระหว่างที่มีการป้อนอากาศหรือก๊าซเข้าสู่ด้านล่างของคอลัมน์จะทำให้เกิดการขยายตัวของความสูงของของเหลวในคอลัมน์ประมาณร้อยละ 5-10 ของความสูงของของเหลวก่อนป้อนก๊าซ ดังนั้นจึงออกแบบให้คอลัมน์มีความสูงสุทธิเท่ากับ 100 เซนติเมตร เพื่อป้องกันการพัดพา (Entrainment) ของเหลวออกจากคอลัมน์ ที่ส่วนล่างของคอลัมน์ติดตั้งหัวพ่นอากาศชนิดออริฟิสแผ่นเรียบแข็ง (Rigid orifice sparger) ผลิตจากวัสดุชนิดเซรามิกที่มีความหนา 1.0 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 เซนติเมตร รูพรุนของหัวพ่นอากาศมีขนาดเฉลี่ย 80 ไมโครเมตร ฟองอากาศที่ได้มีขนาดระหว่าง 1.0-6.0 มิลลิเมตร โดยระดับของหัวพ่นฟองอากาศติดตั้งสูงจากพื้นล่างของคอลัมน์ 3 เซนติเมตร และติดตั้งปั๊มสูบอากาศโดยที่ด้านทางเข้าปั๊มติดตั้งอุปกรณ์กรองอากาศขนาดเล็กมีรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากอนุภาคฝุ่นละออง เชื้อรา และจุลินทรีย์เข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ อากาศถูกป้อนเข้าสู่ส่วนล่างของคอลัมน์และถูกรักษาความเร็วผิวไม่ให้มากกว่า 2 เซนติเมตรต่อวินาที เพื่อทำให้การไหลเป็นแบบฟองก๊าซขนาดเล็กแขวนลอยและลดจำนวนเซลล์จุลสาหร่ายที่อาจได้รับความเสียหายจากแรงเฉือนของฟองอากาศ เนื่องจากสารอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความหนืดใกล้เคียงกับความหนืดของน้ำที่อุณหภูมิห้องดังนั้นในการทดสอบพฤติกรรมทางชลศาสตร์ของของไหล

แบบสองเฟสภายในคอลัมน์ที่ความเร็วผิวของอากาศที่ป้อนเข้าสู่ BCPBR ในช่วง 0.1 – 0.3 เซนติเมตรต่อวินาที จึงดำเนินการโดยใช้น้ำ การวัดขนาดของฟองอากาศทำโดยการบันทึกภาพนิ่งด้วยกล้องถ่ายภาพเคลื่อนไหวดิจิตอลความเร็วสูงที่ความสูง 10, 30 และ 50 เซนติเมตร จากหัวพ่นฟองอากาศ โดยติดแถบวัดขนาดภายในคอลัมน์เพื่อแก้ไขความผิดพลาดของมิติของฟองอากาศ การวัดขนาดที่ระดับความสูงต่าง ๆ นั้นวัดจากฟองอากาศจำนวน 200 ฟองโดยประมาณ



ภาพที่ 1 เครื่องปฏิกรณ์แบบ BCPBR และอุปกรณ์ประกอบ

การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย

หัวเชื้อจุลสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* TISTR 8551 ที่ใช้ในการทดลองได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยนำมาขยายต่อในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเลี้ยงแบบบริสุทธิ์ชนิดเดียว (Pure culture) ด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายชนิดเหลวสูตร BG-11 (Boussiba & Vonshak, 1991) ผสมด้วย TMS 1 มิลลิลิตรต่อลิตรสารอาหารเหลว ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารอาหารเหลวให้อยู่ในช่วง 6.5 – 8.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1.0 M ให้แสงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิดแสงสีขาวที่ให้ความสว่าง 3,500 ลักซ์ รักษาอุณหภูมิเพาะเลี้ยงไว้ที่ 28 – 32 องศาเซลเซียส ป้อนอากาศตลอด 24 ชั่วโมง นำหัวเชื้อจุลสาหร่ายที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่โดยใช้อาหารเหลวปริมาตร 300 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะแบบกะเป็นเวลา 14 วัน โดยการเติมสารอาหารเหลวที่ผสมด้วย TMS ที่เวลาเริ่มต้นเพียงครั้งเดียว ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับการเพาะขยายจำนวนเซลล์จุลสาหร่ายและเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลักษณะการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายก่อนที่นำไปเพาะเลี้ยงใน BCPBR

การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายใน BCPBR นั้นเริ่มต้นด้วยการเติมสารอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 10 ลิตร ผสมด้วย TMS 1 มิลลิลิตรต่อลิตรสารอาหารเหลว จากนั้นเติมหัวเชื้อสาหร่ายที่มีค่าความขุ่นของเซลล์ (Cell optical density, OD) เท่ากับ 0.1 ลงใน BCPBR ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบกะเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 – 32 องศาเซลเซียส ป้อนอากาศเข้าสู่ส่วนล่างของ BCPBR ผ่านหัวพ่นอากาศด้วยความเร็วผิว 0.1 – 0.3 เซนติเมตรต่อวินาที ให้แสงสว่างโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มของแสง 3,500 ลักซ์ ช่วงเวลาในการให้แสงต่อมืดเท่ากับ12 ชั่วโมง/12 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวปริมาตร5 มิลลิลิตร ทุกวันเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ที่ศึกษา สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะแบบกึ่งต่อเนื่องนั้นในช่วงแรกทำการเพาะเลี้ยงภายใต้เงื่อนไขเช่นเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบกะเมื่อครบ 9 วัน ซึ่งเป็นวันที่จุลสาหร่ายยังคงอยู่ในช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณและมีจำนวนเซลล์เพียงพอสำหรับการเก็บเกี่ยวออกไปและเหลือไว้สำหรับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะกึ่งต่อเนื่อง การเก็บเกี่ยวเซลล์จุลสาหร่ายทำโดยเทสารอาหารเหลวที่มีเซลล์จุลสาหร่ายอยู่ด้วยออกจากเครื่องปฏิกรณ์ด้วยปริมาตร5 ลิตร (คิดเป็นร้อยละ 50 ของปริมาตรสารอาหารเหลวที่เวลาเริ่มต้น) จากนั้นเติมสารอาหารเหลวที่ผสมด้วย TMS ใส่ใน BCPBR ให้มีปริมาตร 10 ลิตร (เท่ากับปริมาตรสารอาหารเหลวตอนเริ่มต้น) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเช่นเดียวกันกับสภาวะก่อนเปลี่ยนสารอาหารเหลว ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์จุลสาหร่ายและเปลี่ยนสารอาหารเหลว 3 รอบ โดยรอบในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวมีระยะเวลา 7 วัน ซึ่งกำหนดจากจำนวนวันที่จุลสาหร่ายเจริญเติบโตในระยะทวีคูณ (วันที่ 3 – 9) ของการเพาะเลี้ยงในช่วงแรก นอกจากนี้ยังกำหนดให้รอบในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวมีระยะเวลา 3 และ 5 วัน เพื่อศึกษาผลกระทบของระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลสาหร่าย ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ของที่ศึกษาทุก 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายใช้วิธีทางอ้อมโดยการวัดค่า OD (Wannasutthiwat, 2014) ร่วมกับการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (APHA, 1999) โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) และผลผลิตจำเพาะ (Specific productivity) ของจุลสาหร่ายสามารถประเมินได้จากสมการที่ (4) และ (5)

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \tag{4}$$

$$SP = \frac{N_2 - N_1}{t_2 - t_1} \tag{5}$$

โดยที่ μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลสาหร่าย (วัน$^{-1}$) SP คือ ผลผลิตจำเพาะ (กรัมต่อลิตรต่อวัน) N_2 และ N_1 คือ ความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่าย (กรัมต่อลิตร) ที่เวลาเพาะเลี้ยง t_2 และ t_1 (วัน) ตามลำดับ การประเมินหา μ นั้นใช้ข้อมูลการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในระยะทวีคูณ (Vaičiulytė *et al*., 2014) ความเข้มข้นของไนเตรทในสารอาหารเหลววิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน 4500 – NO_3^- B. Nitrogen (Nitrate) Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method (APHA, 1999) ความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารอาหารเหลววิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน II.2.I Determination of Reactive phosphorus (Strickland & Parson, 1972) และปริมาณกรดไขมันในเซลล์จุลสาหร่ายวิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Blight & Dyer (1959) พารามิเตอร์ทุกเทอมในข้างต้นถูกนำมาวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนด้วยวิธีมาตรฐานทางสถิติ

ผลการวิจัย

พฤติกรรมทางชลศาสตร์ของของไหลแบบสองเฟสใน BCPBR

ภาพที่ 2 แสดงรูปแบบการไหลของฟองอากาศและน้ำภายใน BCPBR ที่ความเร็วผิว 0.1 – 0.3 เซนติเมตรต่อวินาที พบว่ามีฟองอากาศขนาด 1.0 – 4.0 มิลลิเมตร เกิดขึ้นจำนวนมากและไหลขึ้นไปยังส่วนบนของคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นรูปแบบการไหลของของไหลสองเฟสที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย ฟองอากาศที่เกิดขึ้นใน BCPBR มีขนาดเฉลี่ย 3.0 มิลลิเมตร อยู่ในช่วง 1.5 – 3.5 มิลลิเมตร ของขนาดฟองอากาศที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย (Yang *et al*., 2018) ซึ่งช่วยให้การถ่ายเทมวลระหว่างเฟสก๊าซกับของเหลวภายในเซลล์ของจุลสาหร่ายเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ที่บริเวณใกล้หัวพ่นอากาศนั้นมีฟองขนาดใหญ่เกิดขึ้นจำนวนหนึ่งซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของฟองอากาศขนาดเล็กในขณะที่ยังคงมีฟองอากาศขนาดเล็กในสัดส่วนที่มากกว่าเคลื่อนที่ขึ้นไปยังส่วนบนของคอลัมน์ ฟองอากาศขนาดใหญ่นี้ทำให้เกิดการกวนผสมและเหนี่ยวนำให้น้ำหรือสารอาหารเหลวที่ด้านข้างหัวพ่นอากาศไหลเคลื่อนที่ขึ้นและช่วยลดการสะสมของเซลล์จุลสาหร่ายที่บริเวณส่วนล่างของคอลัมน์ เนื่องจากความหนืดสารของอาหารเหลวสูตร BG-11 มีค่าค่อนข้างน้อยและใกล้เคียงกับน้ำที่อุณหภูมิห้องดังนั้นจึงสามารถประเมินหาค่าของสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเชิงปริมาตรโดยรวมระหว่างเฟสก๊าซและของเหลว ($k_L a$) ความเร็วของของเหลว (U_L) และเวลาในการกวนผสม (t_m) ได้ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 2.54×10^{-3} – 5.48×10^{-3} วินาที$^{-1}$, 10.0 – 16.0 เซนติเมตรต่อวินาที และ 134 – 277 วินาที ตามลำดับ

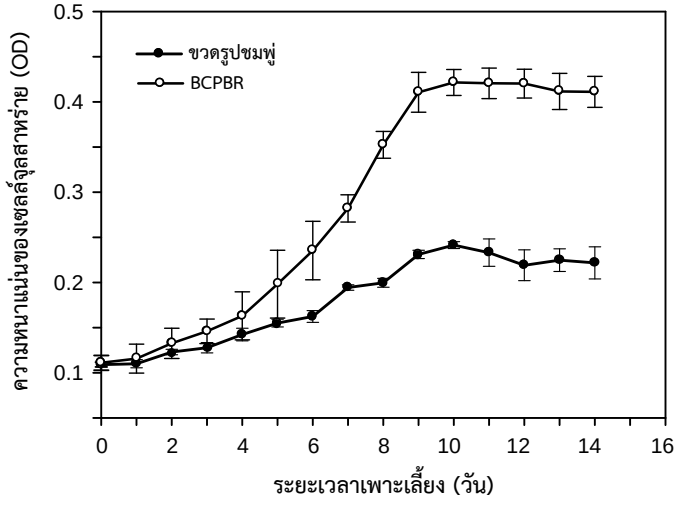
0.1 เซนติเมตร/วินาที 0.2 เซนติเมตร/วินาที 0.3 เซนติเมตร/วินาที

ภาพที่ 2 พฤติกรรมการไหลแบบสองเฟสของฟองอากาศและน้ำที่ความเร็วผิว 0.1 – 0.3 เซนติเมตรต่อวินาที

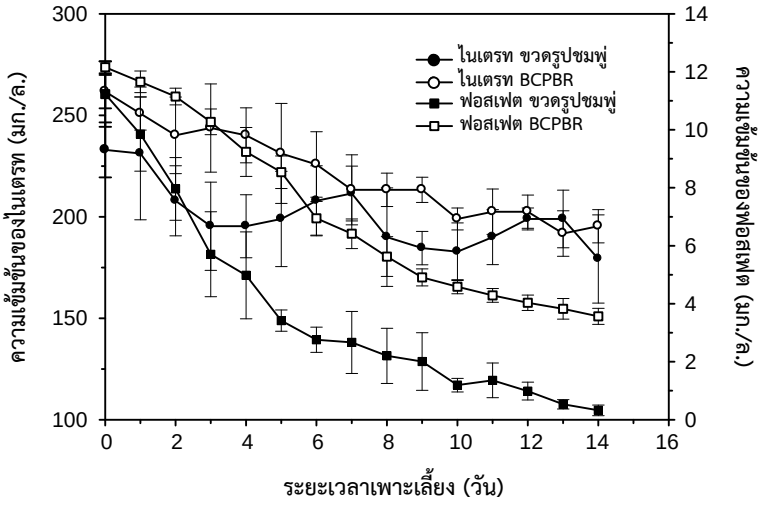
ผลการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่อง

ภาพที่ 3 แสดงให้เห็นถึงความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* ที่วัดในรูปของ OD ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกะเป็นระยะเวลา 14 วันในรูปชมพู่และ BCPBR สำหรับการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่จะพบว่าจุลสาหร่ายมีระยะการเจริญเติบโตเป็น 4 ระยะ โดยมีระยะการปรับตัว 1 – 2 วันแรก จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณในวันที่ 3 – 10 จึงเข้าสู่ระยะคงตัว (Stationary phase) ในวันที่ 11 – 12 และเข้าสู่ระยะตาย (Death phase) วันที่ 13 – 14 ซึ่งเป็นระยะที่อัตราการตายของเซลล์จุลสาหร่ายมากกว่าอัตราการเจริญเติบโต ข้อมูลที่ได้นี้ถูกนำไปกำหนดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบกะใน BCPBR ที่บรรจุด้วยอาหารเหลวปริมาตร 10 ลิตร เมื่อพิจารณา

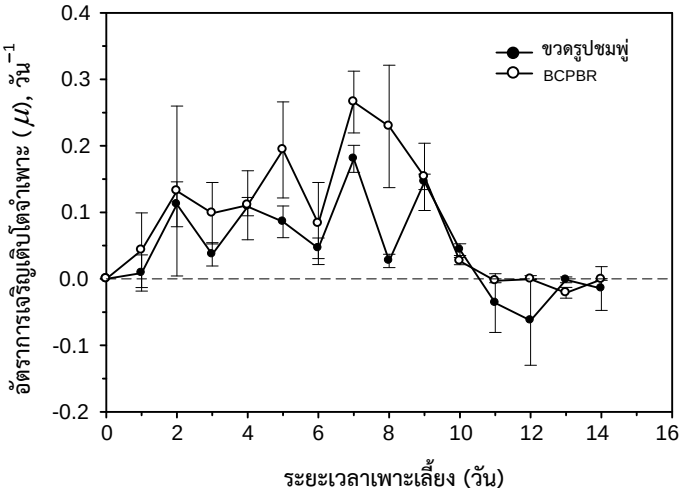
ภาพที่ 3 พบว่าจุลสาหร่ายมีรูปแบบการเจริญเติบโตเช่นเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 300 มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไนตรทและฟอสเฟตที่คงเหลือในสารอาหารเหลวพบว่าเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง 14 วัน (ดังแสดงในภาพที่ 4) พบว่าการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่และใน BCPBR นั้นมีความเข้มข้นของไนตรทคงเหลือใกล้เคียงกันโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 179.21±21.73 และ 195.33±8.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตคงเหลือมีปริมาณแตกต่างกันค่อนข้างมากโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.32±0.18 และ 3.56±0.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายใน BCPBR มีการใช้ฟอสเฟตน้อยกว่ากรณีเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ในขณะที่จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณมากกว่าดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบกะ 14 วัน

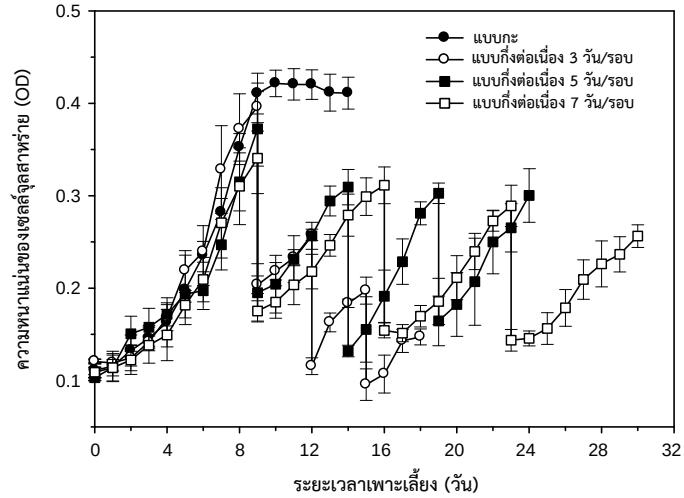


ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตคงเหลือในสารอาหารเหลว

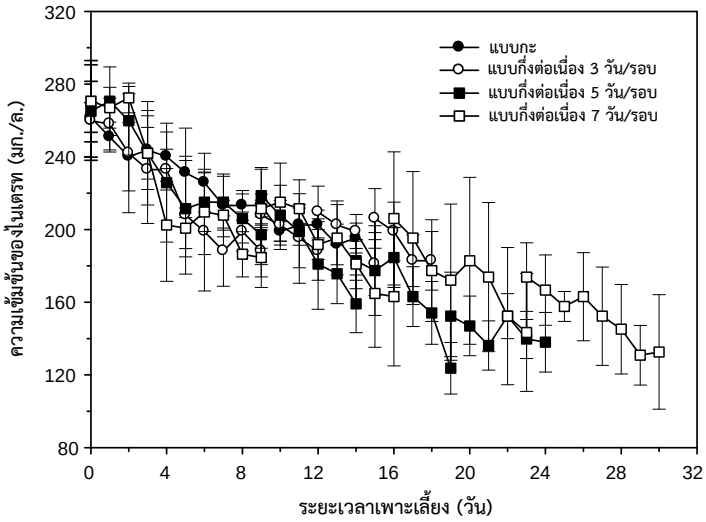


ภาพที่ 5 μ ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะแบบกะในขวดรูปชมพู่และ BCPBR

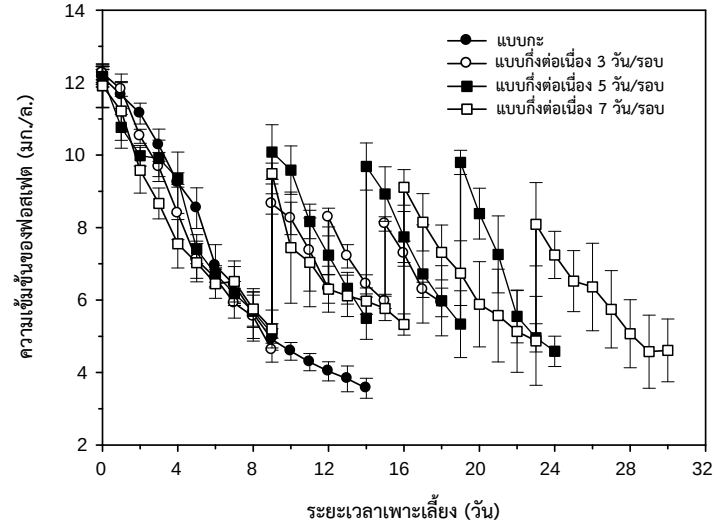
ภาพที่ 5 แสดงค่า μ ของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะแบบกะในขวดรูปชมพู่และ BCPBR เมื่อพิจารณาในช่วงวันที่ 3 – 10 ซึ่งจุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณนั้นพบว่า μ ของจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงใน BCPBR มีค่ามากกว่าในขวดรูปชมพู่ ในขณะที่มีเพียงวันที่ 9 และ 10 ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะทวีคูณเท่านั้นที่ μ มีค่าใกล้เคียงกันทั้งใน BCPBR และขวดรูปชมพู่ แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะใน BCPBR มีประสิทธิภาพสูงกว่าในขวดรูปชมพู่ (ซึ่งสอดคล้องกับค่า OD ของจุลสาหร่ายที่แสดงในภาพที่ 3) สำหรับกรณีที่ μ มีค่าต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับศูนย์ในช่วงวันที่ 10 – 14 นั้น เนื่องจากจุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะคงตัวและระยะตาย เมื่อประเมินหา μ ของจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่และ BCPBR ที่เจริญเติบโตในระยะทวีคูณพบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.090 และ 0.162 วัน$^{-1}$ ตามลำดับ โดย μ เฉลี่ยของ BCPBR มีค่ามากกว่ากรณีของขวดรูปชมพู่ถึงร้อยละ 44.44



ภาพที่ 6 ความหนาแน่นของเซลล์จุลสาหร่ายที่การเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่อง



ภาพที่ 7 ความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลือในการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่อง



ภาพที่ 8 ความเข้มข้นของฟอสเฟตคงเหลือในการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่อง

ภาพที่ 6 แสดงค่า OD ของเซลล์จุลสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวในแต่ละรอบการเพาะเลี้ยง 3, 5 และ 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแบบกะซึ่งจะพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบละ 3 วันนั้น OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงแต่ละรอบนั้นมีค่าน้อยกว่า OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันสุดท้ายของรอบก่อนหน้าที่จะมีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว โดย OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันที่ 9 ก่อนเปลี่ยนสารอาหารเหลวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40±0.03 และ OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันสุดท้ายของรอบที่ 1 (วันที่ 12) รอบที่ 2 (วันที่ 15) และรอบ 3 (วันที่ 18) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.26±0.01,

0.20±0.02 และ 0.15±0.01 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงซึ่งมีระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบละ 5 วัน และ 7 วันนั้น OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงแต่ละรอบนั้นมีค่าใกล้เคียงกับ OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันสุดท้ายของรอบก่อนหน้าที่จะมีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว โดย OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันที่ 9 ก่อนเปลี่ยนสารอาหารเหลวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.37±0.04 และ OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันสุดท้ายของรอบที่ 1 (วันที่ 14) รอบที่ 2 (วันที่ 19) และรอบ 3 (วันที่ 24) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.31±0.02, 0.30±0.01 และ0.30±0.03 ตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงซึ่งมีระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบละ 7 วันนั้น OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันที่ 9 ก่อนเปลี่ยนสารอาหารเหลวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.341±0.038 และ OD ของเซลล์จุลสาหร่ายในวันสุดท้ายของรอบที่ 1 (วันที่ 16) รอบที่ 2 (วันที่ 23) และรอบ 3 (วันที่ 30) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.31±0.02, 0.29±0.02 และ 0.27±0.01 ตามลำดับ

ภาพที่ 7 และ 8 แสดงความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตที่คงเหลือในสารอาหารเหลวภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องในช่วง 9 วันแรก (วันที่ 1 – 9) นั้นดำเนินการภายใต้สภาวะเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมีความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตคงเหลือในสารอาหารเหลวมากกว่ากรณีการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องในระหว่างวันที่ 1– 9 เมื่อประเมินหาค่า μ ของจุลสาหร่ายในระหว่างวันที่ 1 – 9 สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบกะพบมีค่าเท่ากับ 0.158 วัน$^{-1}$ และการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว 3, 5 และ 7 วันต่อรอบ มีค่าเท่ากับ 0.150, 0.148 และ 0.146 วัน$^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากรณีการเพาะเลี้ยงแบบกะเพียงเล็กน้อย (คิดเป็นร้อยละ 5.06 – 7.59) แสดงให้เห็นว่าเซลล์จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบกะมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงมากกว่า โดยอาจมีเซลล์ของจุลสาหร่ายที่ได้รับแสงในสัดส่วนที่มากกว่าส่งผลให้ใช้ไนเตรทและฟอสเฟตในสารอาหารเหลวด้วยปริมาณที่น้อยกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในวันที่ 9 พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมีความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลือมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหาร 3, 5 และ 7 วันต่อรอบ คิดเป็นร้อยละ 7.56 – 13.46 และมีความเข้มข้นของฟอสเฟตคงเหลือน้อยกว่ากรณีแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหาร 3, 5 และ 7 วันต่อรอบ คิดเป็นร้อยละ 3.28 – 5.61 ซึ่งมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงในช่วง 9 วันแรกของการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องนั้นจุลสาหร่ายใช้ธาตุอาหาร (ไนเตรทและฟอสเฟต) ในปริมาณที่แตกต่างไม่มาก ซึ่งสอดคล้องกับการที่ μ ในระหว่างวันที่ 1 – 9 ของการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องซึ่งมีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาภาพที่ 7 พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบละ 3 วันนั้นในวันที่ 18 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงรอบที่ 3 มีความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลืออยู่ในสารอาหารเหลวนั้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 182.78±16.13 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลือในสารอาหารเหลวในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงแบบกะที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 195.33±8.21 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบละ 5 และ 7 วันนั้นในวันที่ 24 และวันที่ 30 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงรอบที่ 3 นั้นมีความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลืออยู่ในสารอาหารเหลวน้อยกว่าโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 137.98±16.43 และ 132.98±31.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวช่วยให้จุลสาหร่ายใช้ไนเตรทได้มากขึ้น นอกจากนี้ในระหว่างวันที่ 9 – 24 ของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องพบว่าความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลือในสารอาหารเหลวที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว 5 วันต่อรอบมีปริมาณต่ำกว่ากรณีที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว 7 วันต่อรอบ แสดงให้เห็นว่ามีการใช้ไนเตรทในการเจริญเติบโตในปริมาณที่มากกว่า อย่างไรก็ตามสำหรับการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยน

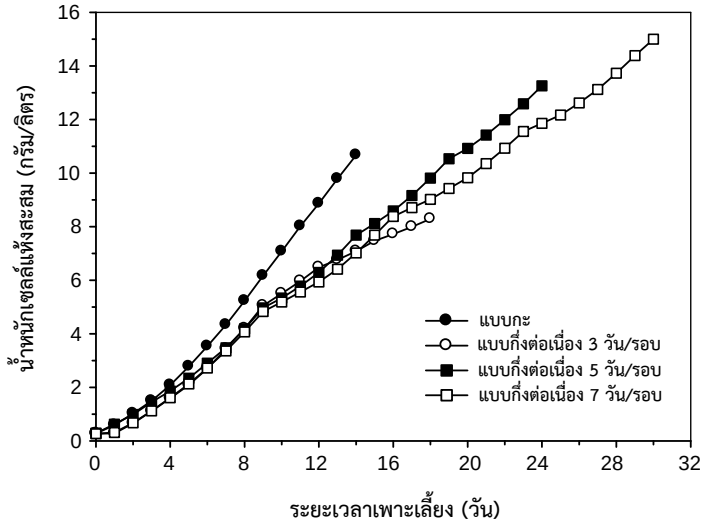
สารอาหารเหลว 3 วันต่อรอบนั้นพบว่ามีความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลือในปริมาณที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนสารอาหาร 5 และ 7 วันต่อรอบในระหว่างวันที่ 12 – 18 ทั้งนี้เป็นผลมากจากการมีระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารที่สั้นกว่า โดยในวันที่ 12 – 15 นั้นอยู่ในช่วงที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนสารอาหาร 3 วันต่อรอบ ในขณะที่วันที่ 12 – 14 และวันที่ 12 – 16 นั้นอยู่ในช่วงปลายของการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่การเปลี่ยนสารอาหารเหลว 5 และ 7 วันต่อรอบ ตามลำดับ จึงทำให้มีความเข้มข้นของไนเตรทคงเหลือในสารอาหารเหลวในปริมาณที่น้อยกว่า สำหรับวันที่ 15 – 18 นั้นเป็นการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงที่การเปลี่ยนสารอาหาร 3 วันต่อรอบ ซึ่งอยู่ในช่วงต้นของการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบที่ 2 (ในวันที่ 16 – 18) ของการเพาะเลี้ยงที่การเปลี่ยนสารอาหารเหลว 7 วันต่อรอบ ทำให้มีความเข้มข้นไนเตรทคงเหลือในสารอาหารเหลวในปริมาณใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามวันที่ 16 – 18 นั้นเป็นช่วงกลางถึงช่วงปลายของการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว 5 วันต่อรอบ จึงทำให้มีความเข้มข้นไนเตรทคงเหลือในสารอาหารเหลวในปริมาณที่น้อยกว่า และเมื่อพิจารณาภาพที่ 8 พบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตคงเหลือในสารอาหารเหลวในวันสุดท้ายของแต่ละรอบการเปลี่ยนสารอาหารเหลวใกล้เคียงกันโดยและมีค่าเฉลี่ยของ 3 รอบการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.07±0.33, 5.14±0.64 และ 4.94±0.80 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบละ 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตที่คงเหลือในสารอาหารเหลวในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงแบบกะก่อนที่จะทำการเปลี่ยนสารอาหารเหลวเพียงเล็กน้อย (4.91±0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อประเมินหาค่า μ เฉลี่ย 3 รอบการเปลี่ยนสารอาหารเหลวของจุลสาหร่ายในช่วงที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.133, 0.100 และ 0.085 วัน$^{-1}$ สำหรับกรณีของการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบละ 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่ง μ เฉลี่ยมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวต่อรอบเพิ่มขึ้น

น้ำหนักเซลล์แห้งสะสม ปริมาณกรดไขมันสะสม และผลผลิตจำเพาะ

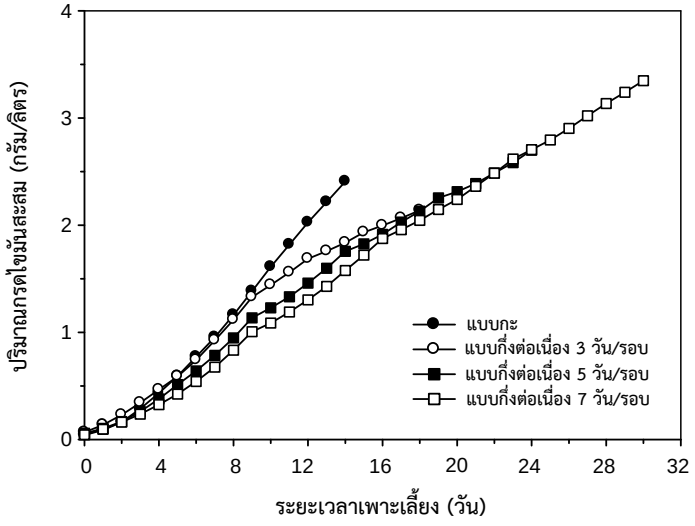
ภาพที่ 9 และ 10 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมในเซลล์จุลสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่อง จะพบว่าในระหว่างวันที่ 9 – 14 นั้นน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมของการเพาะเลี้ยงแบบกะนั้นมีปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3, 5 และ 7 วัน โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงแบบกะในวันที่ 14 มีค่าเท่ากับ 10.667 และ 2.407 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3 วันนั้นเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในวันที่ 18 พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมในปริมาณที่น้อยกว่ากรณีของการเพาะเลี้ยงแบบกะ 14 วัน (โดยมีค่าเท่ากับ 8.287 และ 2.138 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่การเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 5 และ 7 วันนั้นต้องทำการเพาะเลี้ยงถึงวันที่ 21 ถึงทำให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงแบบกะ 14 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงพบว่าน้ำเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมของจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 5 และ 7 วันนั้นพบว่ามีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะดังแสดงในตารางที่ 1 เนื่องจากจากการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานกว่าทำให้มีปริมาณเซลล์จุลสาหร่ายโดยรวมมากกว่า เมื่อพิจารณา SP ของเซลล์จุลสาหร่ายที่แสดงในตารางที่ 1 จะพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.742 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3, 5 และ 7 วัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.460, 0.540 และ 0.500 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ

ตารางที่ 1 น้ำเซลล์แห้งสะสม ปริมาณกรดไขมันสะสม และผลผลิตจำเพาะของเซลล์จุลสาหร่าย

สภาวะการเพาะเลี้ยง	น้ำเซลล์แห้งสะสม (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดไขมันสะสม (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตจำเพาะ (SP) (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
แบบกะ	10.667	2.407	0.742
แบบกึ่งต่อเนื่อง 3 วัน/รอบ	8.287	2.138	0.460
แบบกึ่งต่อเนื่อง 5 วัน/รอบ	13.253	2.700	0.540
แบบกึ่งต่อเนื่อง 7 วัน/รอบ	15.000	3.348	0.500



ภาพที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้งสะสมของเซลล์จุลสาหร่ายภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่อง



ภาพที่ 10 ปริมาณกรดไขมันสะสมในเซลล์จุลสาหร่ายภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่อง

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้เครื่องปฏิกรณ์แบบ BCPBR ที่ปริมาตรของเหลว 10 ลิตรนั้นถูกออกแบบให้มีอัตราส่วนของความสูงของเหลวภายในคอลัมน์ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางมีค่าเท่ากับ 4 โดยประมาณ ภายใต้สภาวะซึ่งสารอาหารเหลวมีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำที่อุณหภูมิห้องและอากาศถูกป้อนเข้าสู่ส่วนล่างของคอลัมน์ผ่านหัวพ่นอากาศที่ความเร็วผิว (U_G) ในช่วง 0.1 – 0.3 เซนติเมตรต่อวินาที ความเร็วเชิงเส้นของของเหลว (U_L) ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยฟองอากาศให้ไหลขึ้นไปยังส่วนบนของคอลัมน์มีค่าอยู่ในช่วง 10.0 – 16.0 เซนติเมตรต่อวินาที พบว่าของไหลสองเฟสภายใน BCPBR ที่ออกแบบนี้จะเป็นแบบฟองก๊าซแขวนลอยขนาดเล็กซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมการไหลของน้ำและฟองอากาศที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเป็นรูปแบบการไหลที่มีความเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย เมื่อพิจารณาเวลากวนผสม (t_m) ระหว่างของเหลวและฟองอากาศอย่างทั่วถึงภายใน BCPBR ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 134 – 277 วินาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shaikh & Al-Dahhan (2007) สำหรับสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเชิงปริมาตรโดยรวมระหว่าง CO_2 และสารอาหารเหลว (k_La) ภายใน BCPBR นั้นมีค่าในช่วง 2.54×10^{-3} – 5.48×10^{-3} วินาที$^{-1}$ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Merchuk *et al*. (2000) และ Khoo *et al*. (2016) โดยทั่วไปแล้ว k_La สามารถทำให้มีค่าเพิ่มขึ้นได้โดยเพิ่มอัตราการไหลของอากาศที่ป้อนเข้าสู่ BCPBR (U_G มีค่าเพิ่มขึ้น) อย่างไรก็ตามการเพิ่มอัตราการไหลของอากาศเข้าสู่ BCPBR อาจส่งผลกระทบให้เซลล์จุลสาหร่ายถูกทำลายหรือเสียหายเนื่องจากแรงเฉือนจากฟองอากาศที่มีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้แล้วงานวิจัยของ Khoo *et al*. (2016) ยังชี้ให้เห็นว่า k_La นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับ U_G เพียงอย่างเดียวแต่ยังขึ้นอยู่กับพฤติกรรมทางชลศาสตร์ของของไหลสองเฟสภายใน BCPBR การป้อนอากาศด้วย U_G มีค่าสูง (เช่น 0.4 – 0.5 เซนติเมตรต่อวินาที) จะทำให้มีฟองอากาศขนาดใหญ่ภายในคอลัมน์ซึ่งเกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของฟองอากาศขนาดเล็ก โดยฟองอากาศขนาดใหญ่เหล่านี้นอกจากจะลดพื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลเชิงปริมาตรโดยระหว่างเฟสก๊าซ-ของเหลวง (ส่งผลให้ k_La มีค่าลดลง) ยังอาจขัดขวางการส่องผ่านของแสงเข้าไปสู่บริเวณแกนกลางของคอลัมน์ทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงโดยรวมของจุลสาหร่ายลดลง (Krichnavaruk *et al*., 2005) ดังนั้นการป้อนอากาศด้วย U_G ในช่วง 0.1 – 0.3 เซนติเมตรต่อวินาที ต่อเนื่องตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อให้มีการไหลแบบแบบฟองก๊าซแขวนลอยขนาดเล็กภายในคอลัมน์จึงเป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย

การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* ภายใต้สภาวะแบบกะใน BCPBR และขวดรูปชมพู่นั้นพบว่าจุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณใน BCPBR ได้ดีกว่า (ดังแสดงในภาพที่ 3) โดย OD ของเซลล์จุลสาหร่ายมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.422±0.014 และ 0.241±0.004 ใน BCPBR และขวดรูปชมพู่ตามลำดับ โดยทั่วไปแล้วในการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายนั้นไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นในธาตุอาหารที่มีความสำคัญ โดยไนโตรเจนนั้นจำเป็นต้องใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนสำหรับกระบวนการแบ่งเซลล์ ถ้าหากมีธาตุไนโตรเจนซึ่งอยู่ในรูปของไนเตรทไม่เพียงพอจะทำให้การแบ่งเซลล์ของจุลสาหร่ายมีอัตราลดลงและจะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ลิปิดและกรดไขมันขึ้นภายในเซลล์ ในขณะที่ธาตุฟอสฟอรัสซึ่งอยู่ในรูปของฟอสเฟตนั้นจุลสาหร่ายจำเป็นต้องใช้ในการสะสมพลังงานภายในเซลล์ในระหว่างที่มีการสังเคราะห์แสงโดยอยู่ในรูปของอะดีโนซินไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP) นิโคตินเอไมด์อะดีโนซินไดนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate, NADPH) ฯลฯ ซึ่งจุลสาหร่ายจำเป็นต้องใช้ฟอสเฟตในปริมาณที่มาก การขาดแคลนฟอสเฟตในสารอาหารเหลวจะส่งผลกระทบต่อจุลสาหร่ายเช่นเดียวกันกับไนเตรท (Monkonsit *et al*., 2011) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไนตรทคงเหลือในสารอาหารเหลวพบว่าเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง (ดังแสดงในภาพที่ 4) พบว่าจุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงใน BCPBR และขวดรูปชมพู่นั้นมีการใช้ไนตรทในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 25 และ 23

ตามลำดับ (ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีปริมาณไนเตรทที่มากเกินพอในสารอาหารเหลว) ในขณะที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตคงเหลือในสารอาหารเหลวนั้นมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 29 และ 3 ใน BCPBR และขวดรูปชมพู่ตามลำดับ การลดลงอย่างรวดเร็วของฟอสเฟตในสารอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่นั้นสาเหตุหลักอาจเกิดขึ้นจากการตกตะกอนของเกลือฟอสเฟตเนื่องจากสารอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่มีสภาพความเป็นด่าง (Alkalinity) มากกว่าใน BCPBR ในช่วงที่จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณถึงระยะตาย (Krichnavaruk *et al*., 2005; Monfet & Unc, 2017) ดังนั้นการขาดแคลนฟอสเฟตในสารอาหารเหลวในระดับที่สูงกว่าจึงส่งผลให้จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่มีค่า μ เฉลี่ยน้อยกว่ากรณีที่เพาะเลี้ยงใน BCPBR ถึง 1.8 เท่า (μ เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.162 และ 0.090 วัน$^{-1}$ สำหรับกรณี BCPBR และขวดรูปชมพู่ตามลำดับ) ชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายใน BCPBR นั้นสามารถรักษาสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายได้ดีกว่าซึ่งเป็นผลมาจากการที่ BCPBR มีประสิทธิภาพการกวนผสมภายในและมีการถ่ายเทมวลระหว่างเฟสก๊าซ-ของเหลวที่สูงกว่า

ในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายภายใต้สภาวะกึ่งต่อเนื่องซึ่งทำการเปลี่ยนสารอาหารเหลวในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกันกับสภาวะแบบกะนั้นเมื่อพิจารณาภาพที่ 3 จะพบว่าวันที่ 9 เป็นวันที่จุลสาหร่ายมี OD เท่ากับ 0.4 (ร้อยละ 97 ของ OD สูงสุดที่ได้ในการเพาะเลี้ยงวันที่ 10) ซึ่งมีปริมาณของเซลล์จุลสาหร่ายมากเพียงพอสำหรับการเก็บเกี่ยวออกไปร้อยละ 50 และยังคงมีเซลล์จุลสาหร่ายเหลืออยู่เพียงพอที่จะทำการเพาะเลี้ยงต่อไปได้อีกหลังจากที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวใหม่ เมื่อพิจารณา OD ของเซลล์จุลสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีระยะเวลาในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวในแต่ละรอบการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งจะพบว่าการเพาะเลี้ยงที่มีระยะเวลาเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3 วันนั้นมีค่า OD ในวันเริ่มต้นของการเปลี่ยนสารอาหารเหลวลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่มีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงค่อนข้างสั้นหลังจากที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทำให้จุลสาหร่ายมีช่วงเวลาในการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณไม่เพียงพอต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้กลับไปเท่ากับจำนวนเซลล์ของจุลสาหร่ายในวันแรกของการเริ่มต้นเปลี่ยนสารอาหารเหลว (วันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงในช่วงแรก) ดังนั้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงหลังจากการเปลี่ยนสารอาหารเหลวเป็น 5 และ 7 วัน จึงทำให้จุลสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตจนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 74 และ 70 (ค่าเฉลี่ยของ 3 รอบของการเปลี่ยนสารอาหารเหลว) ตามลำดับ ซึ่งยังคงมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่นานพอที่จะทำให้จุลสาหร่ายมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นไปเท่ากับวันที่ 9 ซึ่งเป็นวันก่อนที่จะมีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงขึ้นเป็น 5 และ 7 วันนั้นอาจเพียงพอที่จะทำให้จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงหรือมากกว่าการเพาะเลี้ยงในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงช่วงแรกซึ่งเป็นสภาวะแบบกะ การเพิ่มระยะเวลาการเปลี่ยนสารอาหารเหลวเป็น 9 วันต่อรอบ อาจช่วยให้จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตโดยมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงหรือมากกว่าวันที่ 9 (ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว) โดยความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในสารอาหารเหลวจะยังคงมีปริมาณที่เพียงพอสำหรับเพิ่มระยะเวลาเพาะเลี้ยงขึ้นอีก 2 วัน เมื่อพิจารณาแนวโน้มการลดลงของความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตที่คงเหลือในสารอาหารเหลวดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 ทั้งนี้จะต้องควบคุมสภาพเป็นด่างของสารอาหารเหลวไม่มีค่า pH มากกว่า 8.5 โดยเฉพาะในช่วงปลายของรอบการเปลี่ยนสารอาหาร (วันที่ 7 – 9) เพื่อลดการสูญเสียฟอสเฟตในสารอาหารเหลวจากการตกตะกอนในรูปของเกลือฟอสเฟตซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการใช้ไนเตรทในกระบวนการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่าย เมื่อพิจารณาการใช้ไนเตรทและฟอสเฟตในการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายในช่วงที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 พบว่าการใช้ไนเตรทและฟอสเฟตใน 3 รอบของการเปลี่ยนสารอาหารเหลวของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่

มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3 วันนั้นมีปริมาณที่แตกต่างกันเล็กน้อย และพบว่าเกิดขึ้นกับการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 5 และ 7 วันด้วยเช่นกัน โดยค่า μ เฉลี่ยของ 3 รอบของการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3 วัน (รอบที่ 1 วันที่ 9 – 12, รอบที่ 2 วันที่ 12 – 15 และรอบที่ 3 วันที่ 15 –18) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.133 วัน$^{-1}$ ซึ่งมากกว่ากรณีที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 5 วัน (รอบที่ 1 วันที่ 9 – 14, รอบที่ 2 วันที่ 14 – 19 และรอบที่ 3 วันที่ 19 – 24) และ 7 วัน (รอบที่ 1 วันที่ 9 – 16, รอบที่ 2 วันที่ 16 – 23 และรอบที่ 3 วันที่ 23 – 30) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.100 และ 0.085 วัน$^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 7 วัน นั้น μ เฉลี่ยของ 3 รอบมีค่าน้อยที่สุด การเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3 วันทำให้ความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตคงเหลือในสารอาหารเหลวในวันสุดท้ายของรอบการเพาะเลี้ยงก่อนที่จะมีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวในรอบถัดไปนั้นมีปริมาณมากกว่ากรณีที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 5 และ 7 วัน และจากการที่จุลสาหร่ายมีช่วงการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณที่สั้นเพียง 3 วันทำให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นไม่มากดังแสดงในภาพที่ 6 หลังจากที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวจึงทำให้มีเซลล์ของจุลสาหร่ายใน BCPBR น้อยกว่า ปัจจัยทั้งสองนี้ส่งผลให้เซลล์จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวทุก 3 วันนั้นมีแนวโน้มที่จะได้รับสารอาหาร (ไนเตรทและฟอสเฟต) และแสงสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงอย่างทั่วถึง ทำให้ μ เฉลี่ยของ 3 รอบของการเพาะเลี้ยงที่มีค่ามากที่สุด อย่างไรก็ตามจาก OD ของจุลสาหร่ายที่แสดงในภาพที่ 6 ชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีระยะการเปลี่ยนสารอาหารเหลวที่ค่อนข้างสั้นนั้นถึงแม้ว่าจะทำให้ได้ μ เฉลี่ยต่อรอบที่ค่ามากแต่มีจำนวนเซลล์ของจุลสาหร่ายลดลงอย่างต่อเนื่องในการเปลี่ยนสารอาหารเหลวรอบถัดไป

เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมดังแสดงในภาพที่ 9 และ 10 จะพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสะสมและปริมาณกรดไขมันสะสมมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องในวันที่ 14 เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องนั้นมีปริมาณเซลล์จุลสาหร่ายน้อยกว่าในช่วงที่มีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนสารอาหารเหลวจะทำให้มีความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในระบบการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าจุลสาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตโดยมี μ เฉลี่ยต่อรอบโดยมีค่าใกล้เคียงกับ μ ของการเพาะเลี้ยงแบบกะก่อนเปลี่ยนสารอาหารเหลว (ซึ่ง μ เท่ากับ 0.162 วัน$^{-1}$) ถ้าระยะเวลาของรอบของการเพาะเลี้ยงมีไม่มากเพียงพอจึงส่งผลให้ SP ของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องมีค่าน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ การเพิ่มระยะเวลาในแต่ละรอบการเปลี่ยนสารให้ใกล้เคียงหรือเท่ากับช่วงเวลาที่จุลสาหร่ายเจริญเติบโตในระยะทวีคูณของการเพาะเลี้ยงแบบกะก่อนที่จะมีการเปลี่ยนสารอาหารเหลวนั้นอาจส่งผลให้การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องมีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยมีค่า OD มากกว่า OD ของวันที่สุดท้ายก่อนที่จะมีการเปลี่ยนสารอาหารเหลว เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดไขมันสะสมน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบกะมีระยะเวลาเพาะเลี้ยงโดยรวมสั้นกว่า อย่างไรก็ตามสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนสารอาหารทุก 7 วันนั้นพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งและกรดไขมันสะสมมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะเพียงเล็กน้อย (1.5 และ 1.4 เท่า ตามลำดับ) ในขณะที่มีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่าถึง 2 เท่า เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันสะสมที่สกัดได้จากเซลล์จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเปลี่ยนอาหารเหลวในแต่ละรอบการเพาะเลี้ยง 3, 5 และ 7 วัน พบว่ามีเฉลี่ยร้อยละ 22.56, 25.80, 20.37 และ 22.32 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยและแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องภายใต้สิ่งแวดล้อมที่มีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายอย่างเพียงพอโดยเฉพาะไนโตรเจน (เช่น ในสารอาหารเหลวสูตร BG-11) นั้นมีผลกระทบต่อปริมาณกรดไขมันในเซลล์จุลสาหร่ายไม่มาก การกระตุ้นให้จุลสาหร่ายมีการสะสมน้ำมันในเซลล์

เพิ่มขึ้นจึงควรเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่จุลสาหร่ายมีความเครียด เช่น ขาดแคลนธาตุอาหารไนโตรเจนในสารอาหารเหลวและได้รับแสงที่มีความเข้มมากขึ้น (Hata *et al*., 2001) โดยทั่วไปแล้วกรดไขมันที่สกัดได้จากจุลสาหร่ายหลายสายพันธุ์นั้นมีปริมาณในช่วงร้อยละ 5.0 – 68.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพแล้วกรดไขมันที่สกัดได้จากเซลล์จุลสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องในงานวิจัยนี้ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 20 – 26 ของน้ำหนักเซลล์แห้งนั้นจึงมีค่าค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกับจุลสาหร่าย *Chlorococcum sp*. (ร้อยละ 19.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) (Chen *et al*., 2011)

สรุปผลการวิจัย

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพใช้แสงแบบคอลัมน์ฟองที่ออกแบบโดยพิจารณาปัจจัย 2 ประการ คือ พฤติกรรมทางชลศาสตร์และสัดส่วนของคอลัมน์ นั้นมีรูปแบบการไหลของของไหลสองเฟสเป็นแบบฟองก๊าซขนาดเล็กแขวนลอยซึ่งเป็นรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย โดยสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเชิงปริมาตรโดยรวมระหว่างเฟสก๊าซและของเหลวมีค่าเท่ากับ 2.54×10^{-3} – 5.48×10^{-3} วินาที$^{-1}$ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* ภายใต้สภาวะแบบกะในเครื่องปฏิกรณ์พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการในขวดรูปชมพู่ถึง 1.8 เท่า เนื่องจากการกวนผสมและถ่ายเท CO_2 เข้าสู่สารอาหารเหลวและเซลล์จุลสาหร่ายในเครื่องปฏิกรณ์มีประสิทธิภาพในมากกว่ากว่าในขวดรูปชมพู่ การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายในเครื่องปฏิกรณ์ภายใต้สภาวะแบบกึ่งต่อเนื่องพบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและผลผลิตจำเพาะน้อยกว่าสภาวะแบบกะเนื่องจากการเพาะเลี้ยงในช่วงเปลี่ยนสารอาหารเหลวนั้นสั้นกว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงก่อนที่จะทำการเปลี่ยนสารอาหารส่งผลให้จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณไม่เพียงพอ นอกจากนี้แล้วการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorococcum humicola* ภายใต้สภาวะแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องซึ่งสารอาหารเหลวมีธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในปริมาณมากที่เพียงพอนั้นพบว่ามีปริมาณกรดไขมันสะสมในเซลล์จุลสาหร่ายแตกต่างกันเล็กน้อยโดยมีปริมาณเพียงร้อยละ 20-26 ของน้ำหนักเซลล์แห้งสะสม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2561

เอกสารอ้างอิง

APHA. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: American Water Works Association and Water Pollution Control Federation.

Blight, E.G. & Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911-917.

Boussiba, A. & Vonshak, A., (1991). Astaxantin accumulation in the green alga *Haematococcus pluviaris*. *Plant Cell Physiology*, *32*(7), 1077-1082.

Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J. , & Chang, J.-S., (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, *102*, 71-81.

Doran, P.M., (2013). *Bioprocess Engineering Principles* (2nd edition). United Kingdom: Elsevier Ltd.

Fan, L.S., (1989). *Gas Liquid-Solid Fluidization Engineering*. (H. Brenner Editor, 1st edition). United Kingdom: Butterworth-Heinemann.

Hata, N., Ogbonna, J.C., Haswgawa, Y., Taroda, H. & Tanaka, H., (2001). Production of astraxantin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heteroytopic-photoautotropic culture. *Journal of Applied Phycology*, *13*, 393-402.

Kadic, E., (2014). *An introduction to bioreactor hydrodynamics and gas-liquid mass transfer*. New Jersey: Wiley.

Kantarci, N., Borak, F., & Ulgen, K.O., (2004). Bubble column reactors Review*. Process Biochemistry*, *40*, 2263-2283.

Khoo, C.G., Lam, M.K. & Lee, K.T., (2016). Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella Vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): Hydrodynamics and gas–liquid mass transfer study. *Algal Research,* 15, 65-76.

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

Merchuk, J.C., Gluz, M. & Mukmenev, I., (2000). Comparison of photobioreactor for cultivation of microalga *Porphyridium sp*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *75*, 1119-1126.

Monfet, E. & Unc., A., (2017). Defining wastewaters used for cultivation of algae. *Algal Research*, *24*, 520-528.

Monkonsit, S., Powtongsook, S. & Pavasant, P. (2011). Comparison between airlift photobioreactor and bubble column for Skeletonema costatum cultivation. *Engineering Journal*, *15*(4), 53-64.

Shaikh, A. & Al-Dahhan, M.H., (2007). A review on flow regime transition in bubble columns. *International Journal of Chemical Reactor Engineering,* 5*,* R5, 1-70*.*

Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R., (1972). *A Practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada. Canada: Alger Press Ltd.

Wannasutthiwat, S., (2014). *Growth and enhancement of carotenoids production in microalga Chlorococcum Humicola in continuous condition*. MEng Thesis. Bangkok: Graduate school, Chulalongkorn University. (in Thai)

Vaičiulytė, S., Padovani, G., Kostkevičienė, J. & Carlozzi, P., (2014). Batch growth of *Chlorella Vulgaris* CCALA 869 versus semi-continuous regimen for enhancing oil-rich biomass productivity. *Energies*, *7*, 3840-3857.

Williams, J.A., (2002). Keys to bioreactor selections*. Chemical Engineering Progress*, *98*(3), 34-41.

Yadala, S. & Cremaschi, S*.,* (2014)*.* Design and optimization of artificial cultivation units for algae production*. Energies*, *78*, 23-39*.*

Yang, Z., Pei, H., Han, F., Wang, Y., Hou, Q. & Chen, Y., (2018). Effects of air bubble size on algal growth rate and lipid accumulation using fine-pore diffuser photobioreactors. *Algal Research*, *32*, 293-299.