



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบผลิตสารสีแอสตาแซนทีนจาก
สาหร่ายเซลล์เดียว *Haematococcus pluvialis* โดยการผลิตมวลชีวภาพ
สาหร่ายในถังปฏิกรณ์และการกระตุ้นให้เกิดสารสีในบ่อกลางแจ้ง

โดย นายประเสริฐ ภาวนันต์ และคณะ

กันยายน 2552

สัญญาเลขที่ RDG5020051

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบผลิตสารสีแอสตาแซนทีนจาก
สาหร่ายเซลล์เดียว *Haematococcus pluvialis* โดยการผลิตมวลชีวภาพ
สาหร่ายในถังปฏิกรณ์และการกระตุ้นให้เกิดสารสีในบ่อกลางแจ้ง

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. รศ.ดร.ประเสริฐ ภาวสันต์	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ดร.สรวิศ เผ่าทองสุข	ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้าน เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปโครงการ (Executive summary)

โครงการ “การพัฒนาระบบผลิตสารสีแอสตาแซนทิน จากสาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Haematococcus pluvialis* โดยการผลิตมวลชีวภาพสาหร่ายในถังปฏิกรณ์และการกระตุ้นให้เกิดสารสีในบ่อกลางแจ้ง” ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยฝ่ายเกษตร สัญญาเลขที่ RDG5020051 ระยะเวลาดำเนินโครงการ 2 ปี (1 กันยายน 2550 ถึง 31 สิงหาคม 2552) โดยมีเป้าประสงค์หลัก คือ การพัฒนาระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกให้เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเซลล์เดี่ยวของ *Haematococcus pluvialis* และสามารถปรับใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องด้วยสาหร่ายสกุลนี้สามารถผลิตสารสีแอสตาแซนทินที่มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง จึงมีการนำสารสีนี้มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหาร เครื่องสำอาง ฯลฯ ส่งผลให้สารสีแอสตาแซนทินมีมูลค่าสูง อย่างไรก็ตาม *H. pluvialis* จัดเป็นสาหร่ายน้ำจืดที่มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า และเป็นเซลล์ที่บอบบางไม่ทนต่อสภาวะการดำเนินงานที่รุนแรง อีกทั้งยังชอบเจริญเติบโตในสภาวะที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ (20-30°C) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายชนิดนี้ในประเทศไทยซึ่งมีภูมิอากาศเฉลี่ยต่อปีค่อนข้างสูง จึงยังไม่ประสบความสำเร็จ จำเป็นต้องมีการออกแบบระบบการควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ซึ่งในงานวิจัยนี้ ได้ออกแบบระบบโรงเรือนโอระเหยเพื่อช่วยปรับลดอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย

ภาพรวมของการทำการวิจัยของโครงการนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนหลัก งานส่วนแรกเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะเซลล์สีเขียวให้ได้ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตสูง ซึ่งจะทำให้การศึกษาหาสภาวะการเจริญที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะนี้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกแบบต่างๆ คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (Cylindrical airlift photobioreactor) ขนาด 3 และ 17 ลิตร และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกอีกชนิดหนึ่งซึ่งได้ทำการออกแบบใหม่เพื่อลดปัญหาของความสูงของถังปฏิกรณ์ชนิดแรกและประเด็นสำคัญเพื่อความสะดวกต่อการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง นั่นคือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกแนวระนาบ (Flat panel airlift photobioreactor) ขนาด 17 และ 90 ลิตร การศึกษาจะรวมถึงการคัดเลือกสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การปรับตัวแปรในการออกแบบ เช่น ค่าสัดส่วนพื้นที่อากาศไหลลงต่อพื้นที่อากาศไหลขึ้น (A_d/A_r) ในระบบ และการปรับสภาวะที่ใช้ในการดำเนินงาน เช่น ค่าอัตราเร็วการให้อากาศ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และค่าความเข้มข้นแสง เป็นต้น จากผลการทดลองสรุปผลได้ว่า สารอาหารสูตร F1 มีความเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายมากที่สุดและถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (FP-ALPBR) มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* ดีกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (C-ALPBR) สำหรับการปรับตัวแปรในการออกแบบและการปรับสภาวะที่ใช้ในการดำเนินงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (FP-ALPBR) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายคือ ค่าสัดส่วนพื้นที่อากาศไหลลงต่อพื้นที่อากาศไหลขึ้น (A_d/A_r) ในระบบเท่ากับ 0.4 ค่าอัตราเร็วการป้อนอากาศเท่ากับ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1% โดยปริมาตร และ

ค่าความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 2,000 ลักซ์ นอกจากนั้นแล้วยังได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในอุตสาหกรรมจริงได้ อย่างไรก็ตาม ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแวนเนา (FP-ALPBR) ขนาด 90 ลิตร (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 38×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.45 ต่อวัน) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะช้ากว่าถึงปฏิกรณ์รูปทรงเดียวกัน ขนาด 17 ลิตร (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 40×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.52 ต่อวัน) เล็กน้อย อาจเนื่องมาจากปัญหาการถ่ายเทมวล (mass transfer) ที่มักพบในระบบการผลิตขนาดใหญ่

งานในส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานส่วนที่ 1 คือนำเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ช่วงเซลล์สีเขียวความหนาแน่นสูงที่เพาะเลี้ยงได้ มาทำการกระตุ้นภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Stress conditions) ให้เกิดการเหนี่ยวนำการผลิตสารสีแอสตาแซนทิน ซึ่งได้ทำการศึกษาสองตัวแปรหลัก คือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น และระดับความเข้มข้นของสารอาหาร ในสภาวะควบคุมทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาวะทางธรรมชาติ จากผลการทดลองสรุปผลได้ว่า ผลของการเจือจางเซลล์เริ่มต้นเป็นสภาวะกระตุ้นที่ให้ปริมาณสารแอสตาแซนทินสูงที่สุดภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการคือ การเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า (ประมาณหนึ่งหมื่นเซลล์ต่อลิตร) และความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์ (หลอดฟลูออเรสเซนต์ 6 หลอด) ซึ่งให้สารแอสตาแซนทิน 5.39% ต่อน้ำหนักแห้งต่อเซลล์ หลังจากวันที่ 8 ของการกระตุ้น

งานในส่วนสุดท้ายทำการศึกษเพื่อหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธีดังนี้ Maceration, Soxhlet extraction, Ultrasonic-assisted extraction และ Microwave-assisted extraction พบว่าการใช้รังสีไมโครเวฟร่วมกับการใช้ตัวทำละลายอะซิโตน (Microwave-assisted extraction) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถสกัดเอาสารแอสตาแซนทินออกมาจากตัวเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ได้ในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่นๆ โดยสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีไมโครเวฟคือ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที ให้ค่า % recovery สูงถึง 74% (4.79 มิลลิกรัมต่อกรัม)

งานวิจัยของโครงการนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในประเทศไทยซึ่งยังไม่เคยมีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงมาก่อน และยังเป็นต้นแบบของการพัฒนาระบบขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งกำลังอยู่ในช่วงการศึกษาในปัจจุบัน ซึ่งได้ผลการดำเนินงานเป็นที่น่าพอใจ และได้ทำการจดสิทธิบัตรสิ่งประดิษฐ์นี้ไปแล้ว เมื่อวันที่ 19 สิงหาคม 2551 หมายเลข 0801004289

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายเซลล์เดียว *Haematococcus pluvialis* เนื่องด้วยจุลสาหร่ายสกุลนี้สามารถผลิตสารประกอบแอสตาแซนทีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง โดยการดำเนินงานแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน ในส่วนแรกคือส่วนของการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยได้ทำการศึกษาหาสภาวะการเจริญที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกแบบต่าง ๆ คือ แบบทรงกระบอก 3 ลิตรและ 17 ลิตร และแบบแผ่นแนวระนาบขนาด 17 และ 90 ลิตร จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า สารอาหารสูตร F1 มีความเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายมากที่สุด ส่วนถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกขนาด 3 ลิตรมีประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสูงที่สุด แต่ระบบรูปทรงนี้ไม่สามารถขยายขนาดได้ง่ายทำให้ไม่เหมาะกับการดำเนินงานในระดับอุตสาหกรรม ระบบแนวระนาบมีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่อยู่ในเกณฑ์ดี โดยระบบแนวระนาบขนาด 90 ลิตร ให้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงสุด 38×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.45 ต่อวัน ซึ่งช้ากว่าถังปฏิกรณ์รูปทรงเดียวกันขนาด 17 ลิตร (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 40×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.52 ต่อวัน) เล็กน้อย แสดงว่าระบบนี้สามารถขยายขนาดได้ง่ายเพียงเพิ่มความยาวของระบบออกไปตามขนาดปริมาตรที่ต้องการ สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายที่ใช้ในการดำเนินงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ คือ ค่าสัดส่วนพื้นที่อากาศไหลลงต่อพื้นที่อากาศไหลขึ้น (A_d/A_r) ในระบบเท่ากับ 0.4 ค่าอัตราเร็วการปั่นอากาศเท่ากับ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1% โดยปริมาตร และค่าความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 2,000 ลักซ์ นอกจากนั้นแล้ว ผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในอุตสาหกรรมจริงได้ งานในส่วนที่ 2 คือ การศึกษาสภาวะการเหนี่ยวนำการผลิตสารสีแอสตาแซนทีนของเซลล์จุลสาหร่าย ซึ่งได้ทำการศึกษาสองตัวแปรหลัก คือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น และระดับความเข้มข้นของสารอาหาร ในสภาวะควบคุมทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาวะทางธรรมชาติ จากผลการทดลองสรุปผลได้ว่า ผลของการเจือจางเซลล์เริ่มต้นเป็นสภาวะกระตุ้นที่ให้ปริมาณสารแอสตาแซนทีนสูงที่สุดภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการคือ การเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า (ประมาณหนึ่งหมื่นเซลล์ต่อลิตร) และความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์ (หลอดฟลูออเรสเซนต์ 6 หลอด) ซึ่งให้สารแอสตาแซนทีน 5.39% ต่อน้ำหนักแห้งต่อเซลล์หลังจากวันที่ 8 ของการกระตุ้น การศึกษาในส่วนสุดท้ายเป็นศึกษาเพื่อหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารแอสตาแซนทีนออกจากเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* พบว่าอะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดสารแอสตาแซนทีน ซึ่งการใช้รังสีไมโครเวฟร่วมกับการใช้ตัวทำละลายอะซิโตน เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถสกัดเอาสารแอสตาแซนทีนออกมาจากตัวเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ได้ในปริมาณสูงและเร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่นๆ โดยสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทีนด้วยวิธีไมโครเวฟคือ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที ให้ค่า % recovery สูงถึง 74% (4.79 มิลลิกรัมต่อกรัม)

Abstract

The cultivation of *Haematococcus pluvialis* NIESS144 alga was thoroughly investigated as a potential source of astaxanthin. The research could be structured into three stages. The first stage is the cultivation of vegetative motile cells of *H.pluvialis*. In this stage, the cells were cultivated with the optimal growth conditions in airlift photobioreactors. A comparative evaluation of the performance of the different airlift systems with different configuration was carried out, and the systems to be evaluated included the 3 and 17L cylindrical airlift photobioreactors (C-ALPBR) and 17 and 90L flat panel airlift photobioreactors (FP-ALPBR). The 3L C-ALPBR clearly outperformed the others but the difficulty regarding the scaleup of such system posed some serious concern. FP-ALPBR was proposed as an alternative cultivation system where the upscale was achieved simply by increasing the length of the reactor. The performance of the 90L system was still quite satisfactorily where the attainable maximum cell density of 41×10^4 cell mL⁻¹ and specific growth rate of 0.52 d⁻¹ were achieved. The optimum for the growth of *H.pluvialis* in the FP-ALPBR was obtained with the F1 medium where: pH = 7, light illumination at 2,000 Lux, aeration rate of 0.4 cm s⁻¹ and ratio of downcomer and riser of 0.4. Semi continuous cultures which could be periodically harvested were successfully implemented. Of all the systems investigated in this research, the 90L FP-ALPBR was found to be the most cost effective. The second stage is to determine suitable conditions for the induction of astaxanthin. In this stage, cells were grown as cyst and started to accumulate astaxanthin. This experiment was achieved in 1.5L bubble column photobioreactor. Parameters of interest included nutrient concentration, initial cell concentrations, light intensity and mode of illumination (indoor/outdoor). The maximum astaxanthin production at 5.39% by weight (dry) was obtained from indoor condition after 8 days at 10 times diluted final harvested cell concentration and 6.5 klux light intensity. In the last stage, various techniques were examined for the extraction of astaxanthin from the cells, i.e. solvent extraction, maceration, soxhlet extraction, ultrasound assisted extraction (UAE), and microwave assisted extraction (MAE). For all cases, acetone was found to give the highest astaxanthin recovery compared to the performances of other selected solvents, i.e. methanol, ethanol, and acetonitrile. Among the various methods, MAE provided the best extraction performance, with astaxanthin recovery of 74% (4.79 mg g^{-1}) being achieved at the extraction temperature of 75°C and 3 min extraction time.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. บทที่ 1 แนะนำ <i>Haematococcus pluvialis</i> และแอสตาแซนทีน	1
• มารู้จักกับ <i>Haematococcus pluvialis</i> และแอสตาแซนทีน	1
• เป้าประสงค์ของงานวิจัยและวัตถุประสงค์	2
• ผลที่คาดหวังจากโครงการนี้	3
• ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ	3
2. บทที่ 2 แอสตาแซนทีน (Astaxanthin)	4
• คุณสมบัติทางเคมีของแอสตาแซนทีน	4
• แหล่งของแอสตาแซนทีน	5
• ฮีมาโตคอกคัส พลูเวียลิส (<i>Haematococcus pluvialis</i>)	7
• แอสตาแซนทีนในจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i>	11
3. บทที่ 3 การผลิตแอสตาแซนทีนทางชีวภาพ	12
• กระบวนการผลิตสารแอสตาแซนทีนจากจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i>	12
• การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> ในระยะเวเจเตทีฟ	12
• การกระตุ้นจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> ให้สร้างแอสตาแซนทีน	13
• ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i>	25
4. บทที่ 4 การทดลอง	37
• โรงเรือนสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เขียว (vegetative motile cells)	37
• ระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i>	38
• วิธีการดำเนินการ	41
• ระบบการกระตุ้นการสะสมแอสตาแซนทีน	42
• การสกัดสารแอสตาแซนทีน	47

5. บทที่ 5 ผลการทดลอง	51
● สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> ในระยะเวเจเตทีฟ (Vegetative motile cell)	51
● สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i> ในระยะเซลล์สีแดงหรือระยะซิส (Cyst cell)	68
● การสกัดสารแอสตาแซนทีนจากเซลล์จุลสาหร่าย <i>H. pluvialis</i>	77
● ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์	79
6. บทที่ 6 บทสรุป	84
● โอกาสในการพัฒนาเชิงธุรกิจของระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย <i>Haematococcus pluvialis</i>	84
● แนวทางในการพัฒนาระบบ	84
7. เอกสารอ้างอิง	85
8. ภาคผนวก 1 การคำนวณและการวิเคราะห์ต่างๆ	90
9. ภาคผนวก 2 บทความสำหรับการเผยแพร่	95
10. ภาคผนวก 3 ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	102

บทที่ 1

แนะนำ *Haematococcus pluvialis* และแอสตาแซนทิน

สารแอสตาแซนทินอยู่ในกลุ่มของสารต่อต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระสูงมาก ปัจจุบันยังไม่สามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศ

1.1 มารู้จักกับ *Haematococcus pluvialis* และแอสตาแซนทิน

จุลสาหร่าย (microalga) มีความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์หรือสารประกอบทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงและมีคุณสมบัติต่อสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งมนุษย์ อาทิเช่น สารสีแคโรทีนอยด์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์ยา และสารเคมีอื่น ๆ รวมถึงการนำมาผลิตสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกทางชีวภาพ สารสีแอสตาแซนทินเป็นหนึ่งในสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่สามารถผลิตได้จากจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งมีรายงานว่าภายใต้สภาวะการกระตุ้นที่เหมาะสม สาหร่ายชนิดนี้สามารถผลิตสารแอสตาแซนทินได้สูงถึง 2-5% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ การสะสมของสารแอสตาแซนทินนี้เกิดขึ้นในสภาวะกระตุ้นบางประการ อาทิเช่น (1) สภาวะที่ขาดแคลนสารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (2) สภาวะที่ความเข้มแสงมากเกินไป (3) สภาวะที่มีอุณหภูมิไม่เหมาะสม เป็นต้น โดยสภาวะเหล่านี้จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเซลล์สีเขียวขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-20 μm) ซึ่งมีแฟลเจลล่าช่วยในการเคลื่อนที่ (green vegetative cell) เข้าสู่เซลล์ในระยะซิสต์ (cyst) ในระยะนี้เซลล์จะมีผนังเซลล์หนาขึ้น (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50-60 μm) พร้อมกันนั้นเซลล์จะสลัดแฟลเจลล่าทิ้งไป รวมทั้งจะมีการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงแอสตาแซนทินเกิดขึ้นกระจายอยู่ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ภายในเซลล์ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า สารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากจุลสาหร่าย *H. pluvialis* มีประสิทธิภาพดีกว่าที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีอื่น ๆ (เช่น สกัดจากเปลือกของสัตว์ทะเลประเภทกุ้ง หรือปู) เนื่องจากแอสตาแซนทินที่สะสมในจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบเอสเทอร์ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าแบบที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบอิสระที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (Lorenz and Cysewski, 2000)

แอสตาแซนทิน หรือ 3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ นับเป็นสารในกลุ่มสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง และใช้มากในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง โดยความสามารถในการทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระของสารแอสตาแซนทินมีค่าสูงกว่าสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ๆ ค่อนข้างมาก และมีค่าสูง 500 เท่าเมื่อเทียบกับวิตามินอี ดังเคยมีรายงานว่าสารแอสตาแซนทินนี้สามารถช่วยต่อต้านโรคมะเร็ง ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน ช่วยยับยั้งโรคหัวใจ และโรคเกี่ยวกับเส้นโลหิตอีกด้วย (Lorenz and Cysewski, 2000; Guerin and Huntley,

2003; Lopez et al., 2006) จึงนับว่าเป็นสารที่มีคุณค่าทางเวชศาสตร์ และนับว่าเป็นสารที่มีมูลค่าสูง (US\$2,500-3,000/kg) อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตสารนี้ในระดับอุตสาหกรรม และยังคงต้องพึ่งพาการนำเข้าของสารนี้

จุลสาหร่าย *H. pluvialis* จัดเป็นสาหร่ายน้ำจืด เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ในประเทศเขตร้อนจึงยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตสำหรับเซลล์ในระยะเซลล์สีเขียวอยู่ที่ประมาณ 20-25°C แต่จะมีค่าแตกต่างกันไปในช่วงการกระตุ้นสารแอสตาแซนทิน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทิน จึงจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน คือ (1) การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สีเขียวเพื่อเพิ่มมวลของสาหร่าย และ (2) การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะการกระตุ้นและสะสมสารแอสตาแซนทิน (Kobayashi et al., 1991; Harker et al., 1996 (a,b))

1.2 เป้าประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีเป้าประสงค์ในการเสนอรูปแบบการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* ที่มีประสิทธิภาพ โดยสร้างต้นแบบระบบโรงเรือนการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในรูปของโรงเรือนไอระเหย (evaporative green house) ซึ่งเป็นระบบผสมผสานระหว่างระบบแผ่นหลังคากรองแสงและระบบการลดอุณหภูมิด้วยไอน้ำ และทำการทดสอบระบบทั้งสองเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องปรับอากาศ การเพาะเลี้ยงเซลล์จะใช้ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก เนื่องจากเป็นระบบที่ออกแบบง่าย ราคาไม่แพง ให้การผสมผสานและการไหลวนที่ค่อนข้างดี มีแรงเฉือนต่ำ เหมาะกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ซึ่งเป็นเซลล์ที่บอบบางและไม่ทนต่อแรงเฉือน โดยเฉพาะในช่วงการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังเน้นที่การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบขนาดใหญ่ เพื่อเป็นต้นแบบของการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมของประเทศไทยต่อไป

งานวิจัยนี้ยังครอบคลุมถึงการศึกษาเบื้องต้นของการกระตุ้นสารแอสตาแซนทิน และการสกัดสารสีแอสตาแซนทินจากจุลสาหร่าย *H. pluvialis* โดยจะทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัดต่างๆ รวมถึงหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินเพื่อให้ได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินมากที่สุด

1.3 วัตถุประสงค์

1. ออกแบบและศึกษาสภาวะการดำเนินงานที่เหมาะสมสำหรับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift photobioreactor) ที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตสูง

2. ออกแบบและศึกษาสภาวะการดำเนินงานที่เหมาะสมสำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift photobioreactor) ในการกระตุ้นการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินในเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*
3. ศึกษาความเป็นไปได้เบื้องต้นในการสกัดสารแอสตาแซนทินจากเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*
4. ศึกษาความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ในการขยายขนาดของระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะเซลล์สีเขียวและระบบการกระตุ้นการสังเคราะห์สารสีแอสตาแซนทินจากเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

1.4 ผลที่คาดหวังจากโครงการนี้

1. ผลงานทางวิชาการในลักษณะของเอกสารวิชาการในระดับนานาชาติ
2. ต้นแบบของถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกสำหรับการเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ให้ความเข้มข้นและผลผลิตของเซลล์สูง และระบบการกระตุ้นสารแอสตาแซนทิน ที่สามารถนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้
3. สิทธิบัตรกระบวนการผลิตเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย

1.5 ดัชนีชี้วัดความสำเร็จ

1. ระบบการเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่สามารถผลิตเซลล์ได้ในความเข้มข้นที่สูง และระบบการเร่งสารแอสตาแซนทิน ที่มีราคาพอสมควร
2. ระบบการผลิตสารแอสตาแซนทิน ที่สามารถทำงานได้ต่อเนื่อง และสามารถทำงานได้ในทุกฤดูกาลของประเทศไทย

บทที่ 2

แอสตาแซนทิน (Astaxanthin)

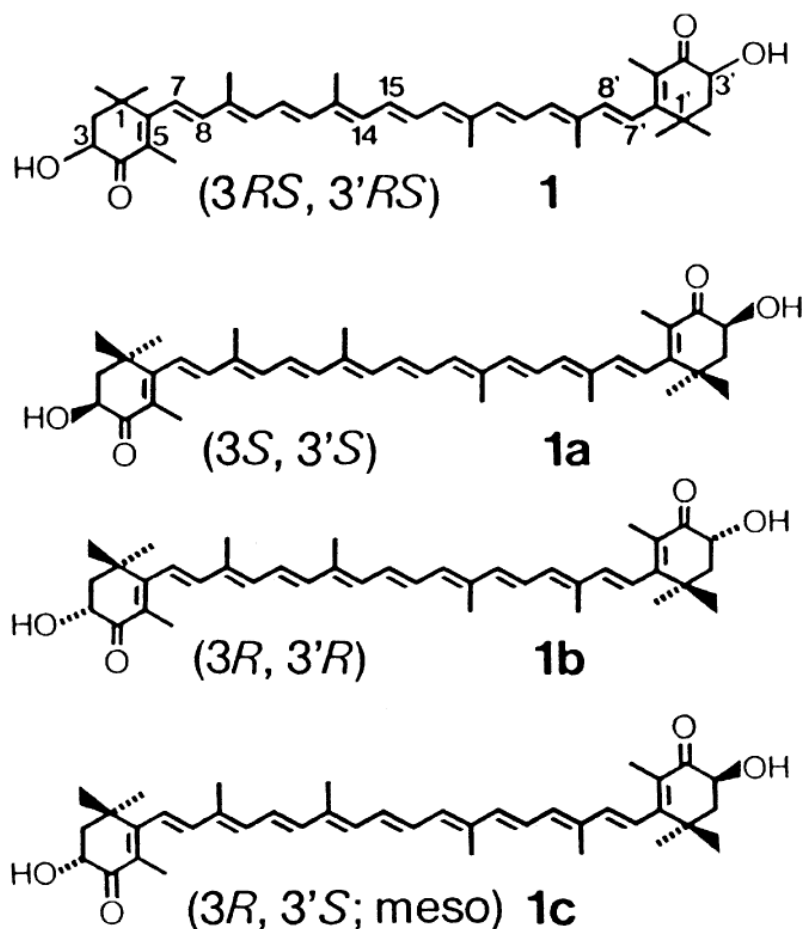
สารรงควัตถุสีแดง ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์ทะเล โดยเป็นองค์ประกอบในปลา และสัตว์น้ำต่าง ๆ เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทร้า และกุ้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่ออัตราการการอยู่รอด และเพิ่มสีสันให้กับสัตว์ทะเลเหล่านี้อีกด้วย ในปัจจุบันจึงมีความสนใจในการนำสารแอสตาแซนทินนี้มาใช้เป็นอาหารเสริมที่มีความสามารถเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ และยังนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ด้วย เช่น ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น

2.1 คุณสมบัติทางเคมีของแอสตาแซนทิน

แอสตาแซนทิน จัดเป็น คีโต-แคโรทีนอยด์ (keto-carotenoid) ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่ไม่สมมาตรกันที่ตำแหน่งของคาร์บอน โดยคาร์บอนสองอะตอมที่ตำแหน่งที่ 3 และ 3' สามารถจัดเรียงได้เป็นสี่รูปแบบ ทั้งการมองแบบ identical enantiomer (3S, 3S'; 3R, 3'R) และแบบ meso forms (3R, 3'S; 3'R, 3S) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

ข้อมูลเฉพาะของแอสตาแซนทิน

Name	: astaxanthin or 3,3'-dihydroxy- β - β -carotene-4,4' dione
Molecular formula	: $C_{40}H_{52}O_4$
Molecular weight	: 596.86
Melting point	: 224°C
Solubility	: dissolved at room temperature in non polar solvents (acetone, dimethyl sulfoxide)



รูปที่ 2.1 รูปแบบการจัดเรียงโมเลกุลของแอสตาแซนทิน

แอสตาแซนทินมีความสามารถในการดูดซับพลังงานที่มากเกินไปจากออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวและปล่อยออกมาเป็นพลังงานความร้อน และทำให้ออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยวเปลี่ยนกลับเป็นออกซิเจนก่อนที่แอสตาแซนทินจะกลับสู่สภาพเดิม ซึ่งความสามารถในการต่อต้านฟรีแรดิคอลนี้มีระดับสูงกว่าเบตา-แคโรทีน (beta-carotene) และสามารถป้องกันเปอร์ออกไซด์ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ไม่อิ่มตัวดีกว่าแคนตาแซนทิน (canthaxanthin) และเบตา-แคโรทีนหรือซีแซนทิน (zeaxanthin) ประมาณสิบเท่า นอกจากนั้นยังมีความสามารถยับยั้งเปอร์ออกไซด์ที่เป็นของเหลวได้ดีกว่าวิตามินเอ และยังสามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ต

2.2 แหล่งของแอสตาแซนทิน

แอสตาแซนทินที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีแหล่งที่มาสองแหล่งคือ แอสตาแซนทินจากการสังเคราะห์ทางเคมี และแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต

2.2.1 แอสตาแซนทินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี

แอสตาแซนทินจากการสังเคราะห์ทางเคมี อยู่ในรูปของแคโรฟิลล์สีชมพู (carophyll pink) ซึ่งมีแอสตาแซนทินเป็นส่วนประกอบอยู่ 8 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการสังเคราะห์แอสตาแซนทินทางเคมี มีกระบวนการซับซ้อนในขั้นตอนการผลิต และเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างอันตรายส่งผลให้แอสตาแซนทินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีมีราคาสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารแอสตาแซนทินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีมีประสิทธิภาพด้อยกว่าแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต จึงไม่เป็นที่นิยม และการสังเคราะห์แอสตาแซนทินในปัจจุบันมีแหล่งที่มาจากแหล่งธรรมชาติมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 แอสตาแซนทินที่ได้จากธรรมชาติ

ก. สัตว์น้ำเปลือกแข็ง

แอสตาแซนทินเป็นองค์ประกอบของเปลือกกุ้งซึ่งนำมาศึกษาความสามารถในการเป็นสารสีตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม แอสตาแซนทินที่ได้จากสัตว์น้ำเปลือกแข็งยังคงเป็นสัดส่วนน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณสัตว์น้ำที่นำมาสกัด และยังมีสิ่งเจือปนในรูปความชื้น ถ้า ไคติน และแร่ธาตุต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีปัญหาและข้อจำกัดในเรื่องของรูปแบบของวัตถุดิบที่จะใช้ในการผลิตด้วย

ข. จุลสาหร่าย

แอสตาแซนทินสามารถสกัดมาได้จากจุลสาหร่ายหลาย ๆ ชนิด ดังนี้ แอนคิสโตรเดสมัส บรานูอิ (*Ankistrodesmus branuii*), คลอเรลลา โซฟิงเลนซิส (*Chlorella zofinglensis*), ดูนาลิเอลล่า ซาลินา (*Dunaliella salina*), ยูกลีนา รูบินา (*Euglena rubida*) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม จุลสาหร่ายเหล่านี้สามารถผลิตและสะสมแอสตาแซนทินได้ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ผลิตแอสตาแซนทินในเชิงอุตสาหกรรม จุลสาหร่ายสีเขียวอีมาโตคอกคัส พลูเวียลิส (*H. pluvialis*) เป็นจุลสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมสารแอสตาแซนทินสูงประมาณ 10,000-40,000 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม) คิดเป็นประมาณ 2-5% ของน้ำหนักแห้ง นับเป็นจุลสาหร่ายที่สามารถสะสมแอสตาแซนทินในปริมาณที่มากที่สุด

ค. จุลชีพชนิดอื่น ๆ

แบคทีเรียบางชนิดเช่น มาโยโคแบคทีเรียม (*Mycobacterium lacticola*), เบรไวแบคทีเรียม (*Brevibacterium sp.*), เชื้อราในสกุล เพนิโอโฟรา (*Peniophora*), และโคปีพอด (Copepod) สามารถสะสมแอสตาแซนทินได้ อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้ยังมีระดับแคโรทีนอยด์ที่น้อยและมีอัตราการเจริญเติบโตช้า

นอกจากนี้ยังมีแหล่งของแอสตาแซนทินอื่น ๆ ดังแสดงสรุปในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แหล่งที่มาทางธรรมชาติของสารแอสตาแซนทิน

Source	Astaxanthin (µg/g cell)	Astaxanthin (%dry cell)	Reference
Bacteria			
<i>Brevibacterium sp.</i>	30		Simson et al., 1981
<i>Mycobacterium lacticola</i>	30		Simson et al., 1981
<i>Holobacterium salinarium</i>	265		Simson et al., 1981
Yeast			
<i>Phaffia rhodozyma</i>	200-300	0.02-0.03	Borowizka, 1989
Mold			
<i>Peniophora (Hymenomycetes)</i>	<50		Borowizka, 1989
Algae			
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	<50		Harker et al., 1996 (b)
<i>Euglena rubida</i>	<50		Harker et al., 1996 (b)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	7,000-55,000	1.5-3	Lorenz and Cysewski ., 2000

2.3 อีมาโตคอกคัส พลูเวียลิส (*Haematococcus pluvialis*)

อีมาโตคอกคัส พลูเวียลิส (*Haematococcus pluvialis*) อาจหมายถึง อีมาโตคอกคัส ลาคัสทริส (*Haematococcus lacustris*) หรือ สเฟียเรลลา ลาคัสทริส (*Sphaerella lacustris*) ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียว อยู่ในออคเตอร์ วอลโวเคลส์ (*Volvocales*) วงศ์ อีมาโตคอกคัสเคซิอี (*Haematococcus*) การจัดประเภททางวิทยาศาสตร์ของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* สามารถแบ่งได้ดังนี้:

Phylum : *Chlorophyta*
 Class : *Chlorophyceae*
 Order : *Volvocales*
 Family : *Haematococcaceae*
 Genus : *Haematococcus*
 Species : *Haematococcus pluvialis*

วงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* สามารถแบ่งออกเป็นสี่ช่วงดังนี้ (รูปที่ 2.2)

1. เวเจเททีฟ โมไทล์เซลล์ (Vegetative motile cell)

ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจุลสาหร่าย *H. pluvialis* จะสร้างคลอโรฟิลล์เอ และ บี และ แคโรทีนอยด์ โดยเฉพาะเบต้า-แคโรทีนและลูทีน โครงสร้างเซลล์จะมีลักษณะเป็นรูปไข่ สีเขียว และมีหนวดสองเส้นที่ใช้ในการเคลื่อนที่และจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูง (รูปที่ 2.2 และ 2.3 (ก))

2. เอนซิสเมนต์ (Encystment)

ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ร่วมกับการกระตุ้นด้วยแสง เซลล์จะสร้างแคโรทีนอยด์อีกชนิดหนึ่งคือแคนตาแซนทิน ในช่วงนี้เซลล์จะลดอัตราการเจริญเติบโตอย่างเห็นได้ชัด ลักษณะเซลล์เริ่มเป็นทรงกลม หนวดหลุดออกไป ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น (รูปที่ 2.2 และ 2.3 (ข))

3. ซีสต์ (Cyst)

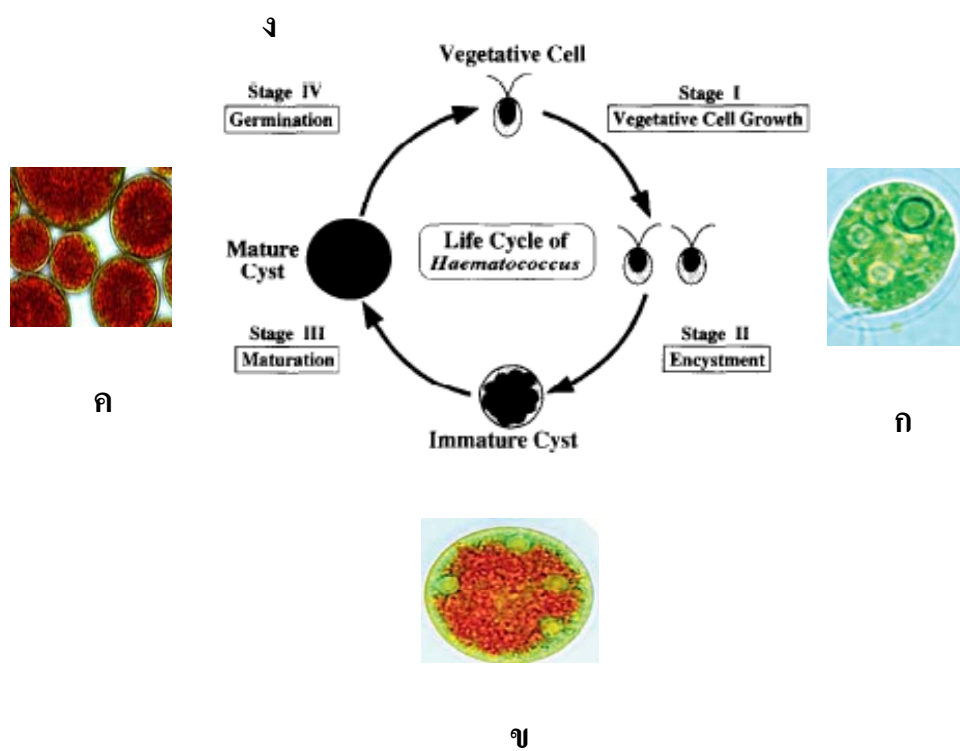
ในระยะนี้เซลล์เริ่มสะสมปริมาณแอสตาแซนทิน โดยจะเริ่มเกิดขึ้นที่บริเวณรอบนิวเคลียสก่อน และเกิดการสะสมต่อเนื่องอย่างรวดเร็วจนเซลล์กลายเป็นสีแดงกระจายอยู่ทั่วไซโทพลาสซึม (Mature cyst) ในช่วงที่เซลล์เป็นสีแดงอย่างสมบูรณ์ เซลล์จะมีองค์ประกอบของแอสตาแซนทินสูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และมีกรดไขมันเกิดขึ้นด้วย (รูปที่ 2.2 และ 2.3 (ค))

ลักษณะภายนอกของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* (ในระยะซีสต์) เป็นดังนี้

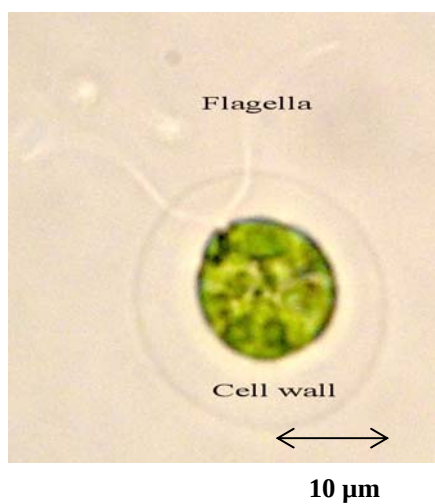
- สีแดง ถึง แดงเข้ม
- ขนาดตัว 20-50 ไมครอน
- น้ำ 4-9 เปอร์เซ็นต์
- ความหนาแน่น 0.303-0.435 กรัมต่อมิลลิลิตร

4. เจอร์มิเนชัน (Germination)

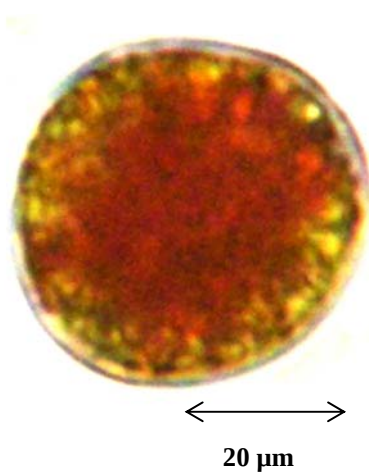
ในช่วงระยะสุดท้ายนี้เซลล์จะเริ่มสร้างคลอโรฟิลล์และโปรตีน และเริ่มสลายแคโรทีนอยด์ อย่างไรก็ตาม เซลล์ในระยะเจอร์มิเนชัน (Germination) สามารถกลับมาเจริญในระยะเวเจเททีฟ โมไทล์เซลล์ (Vegetative motile cell) ได้ ถ้าสภาวะแวดล้อมกลับมาอุดมสมบูรณ์และเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (ง)



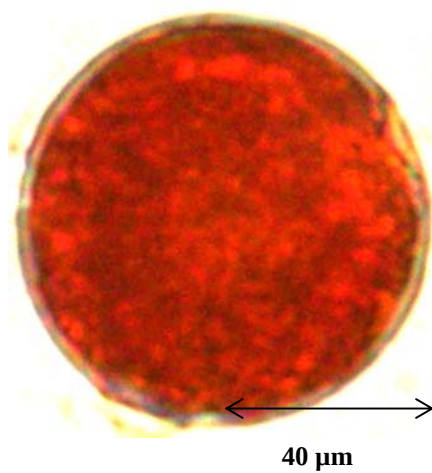
รูปที่ 2.2 วงจรชีวิตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis*



ก. เวเจเตทีฟ โมไทล์เซลล์ (Vegetative motile cell)



ข. เอนซิสเมนต์ (Encystment)

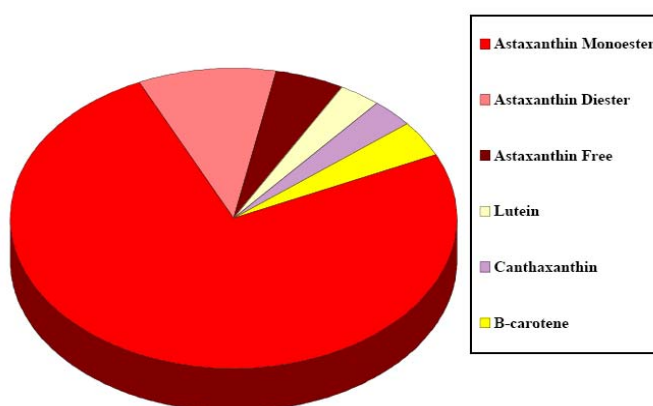


ค. ซีสต์ (Cyst)

รูปที่ 2.3 ลักษณะของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ระยะต่าง ๆ

2.4 แอสตาแซนทีนในจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

H. pluvialis เป็นแหล่งของแอสตาแซนทีนตามธรรมชาติที่มีความเข้มข้นสูง ประมาณ 7,000-55,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเซลล์ แอสตาแซนทีนนี้จัดเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่งในหลายชนิด ซึ่งแคโรทีนอยด์ที่สำคัญเช่น เบตา-แคโรทีน ลูทีน แคนตาแซนทีน (แอสตาแซนทีนที่เป็นโมโนเอสเทอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ แอสตาแซนทีนที่เป็นไดเอสเทอร์ 10 เปอร์เซ็นต์ แอสตาแซนทีนอิสระ 5 เปอร์เซ็นต์ และที่เหลือ 15 เปอร์เซ็นต์ประกอบด้วย เบตา-แคโรทีน ลูทีน แคนตาแซนทีน และแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ๆ) องค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ในจุลสาหร่าย *H. pluvialis* แสดงไว้ในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 องค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ในจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

บทที่ 3

การผลิตสารแอสตาแซนทินทางชีวภาพ

บทนี้ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* และการกระตุ้นให้เกิดการสะสมของสารแอสตาแซนทิน เพื่อให้ผู้อ่านมีพื้นฐาน ก่อนที่จะเข้าสู่เนื้อหาที่มีความซับซ้อนมากขึ้นในบทต่อไป

3.1 กระบวนการผลิตสารแอสตาแซนทินจากจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

การสะสมของสารแอสตาแซนทินในจุลสาหร่าย *H. pluvialis* มีความแตกต่างกันตามกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไปจะแบ่งเป็นสองขั้นตอน ในขั้นตอนแรกการเลี้ยงเซลล์เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์เวเจเตทีฟให้ได้เซลล์ในปริมาณมากหรือที่มีความเข้มข้นสูง และขั้นที่สองเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ซิสต์ (cyst) นั่นคือการกระตุ้นให้เซลล์สร้างและสะสมแอสตาแซนทิน ซึ่งขั้นตอนการกระตุ้นการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเติมเกลือระหว่างการเพาะเลี้ยง การจำกัดสารอาหาร เช่น ปริมาณไนเตรต ปริมาณฟอสเฟต หรือการควบคุมสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ แสง ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น

3.2 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะเวเจเตทีฟ

การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้เซลล์ที่อยู่ในช่วงเวเจเตทีฟหรือช่วงเซลล์สีเขียว ให้มีความเข้มข้นสูง โดยในการเพาะเลี้ยงจะทำการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ เช่น แสง อุณหภูมิ สารอาหาร และปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยตารางที่ 3.1 เป็นตารางสรุปผลการรายงานสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในช่วงเซลล์สีเขียว

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในช่วงเซลล์สีเขียว

Factors	Range
Light	2-24 klux
Temperature	15-28°C
pH	6-8
Nutrients	
1) Macronutrients	
Carbon	1-4 g/l CH_3COONa
Nitrogen	0.25-1.5 g/l NaNO_3
Phosphorous	0.075-4 g/l K_2HPO_4
2) Micronutrients	
Iron	2.5-5mg/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Boron	2.8-5.7mg/l H_3BO_4
Manganese	0.73-3.6mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Copper	8-770 μg /l $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Vitamins	
B ₁	0.336-26.7 mg/l
B ₁₂	0.004-0.27 mg/l

3.3 การกระตุ้นจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ให้สร้างแอสตาแซนทีน

ขั้นตอนนี้มีเป้าหมายให้เกิดการสร้างและสะสมแอสตาแซนทีนในจุลสาหร่าย *H. pluvialis* การสะสมของแอสตาแซนทีนสามารถกระตุ้นได้โดยตัวแปรด้านสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น แสง อัตราการให้อากาศ สารอาหาร และปัจจัยอื่น ๆ ดังจะได้ให้รายละเอียดต่อไป ส่วนตารางที่ 3.2 แสดงสรุปผลการรวบรวมข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นสร้างสารแอสตาแซนทีนในจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมในกระตุ้นจุลสำหรับ *H. pluvialis* ให้สร้างสารแอสตาแซนทิน

Factor	Ranges	Refferance
Light	3-18 klux	Qinglin et al.,2007
	0.01-0.6 klux	Katsuda et al., 2006
	3.28-11.03 klux	Kim et al., 2006
	2-11.5 klux	Fabregas et al., 1998
	0.1-4.45 klux	Harker et al., 1996 (a,b)
	3.4-14.05 klux	Kobayashi et al., 1991
N-deficient	0-300 mg/l NaNO ₃	Qinglin et al.,2007
	0-1000 mg/l NaNO ₃	Orosa et al., 2004
	4.97-12.4 mg/l NaNO ₃	Sarada et al.,2001
	100-1,640 mg/l C ₂ H ₃ O ₂ Na	Gong and Chen, 1998
	0-510 mg/l NaNO ₃	Harker et al., 1996 (a,b)
P-deficient	147.9-591.6 mg/l K ₂ HPO ₄	Harker et al.,1996 (a,b)
Salinity	2.5-20 mg/l NaCl	Sarada et al., 2001
	0-5.85 g/l NaCl	Harker et al.,1996 (a,b)
	0-7.45 g/l KCl	Harker et al.,1996 (a,b)
pH	6.8-11	Lababpour et al., 2005
	5-9	Sarada et al.,2001
iron	5-20.02 mg/l FeSO ₄ .7H ₂ O	Harker et al.,1996 (a,b)

3.3.1 แสง

แสงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้เกิดการสะสมสารแอสตาแซนทินในจุลสาหร่าย *H. pluvialis* และได้มีการวิจัยเพื่อหาช่วงความเข้มของแสงที่ทำให้ได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) สูงที่สุด ซึ่งความเข้มของแสงที่ได้คือ 1.5 กิโลลักซ์ และความเข้มของแสงที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สร้างและสะสมแอสตาแซนทินเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3-18 กิโลลักซ์ ความเข้มของแสงที่มีค่าสูงจะทำให้เซลล์ที่อยู่ในช่วงเวเจเตทีฟเปลี่ยนโครงสร้างไปอยู่ในช่วงซีสต์ พร้อมกันนั้นจะมีการสร้างแคโรทีนอยด์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแสงที่ให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดแคโรทีนอยด์คือแสงสีน้ำเงิน เมื่อแสงมีความเข้มข้นสูงถึง 0.19 กิโลลักซ์ จะกระตุ้นให้เซลล์สร้างและสะสมแอสตาแซนทินได้ความเข้มข้นประมาณ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตารางที่ 3.3 แสดงผลของความเข้มแสงต่อการสร้างแอสตาแซนทิน

3.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตและการสะสมสารแอสตาแซนทินในจุลสาหร่ายหลายชนิดและสำหรับจุลสาหร่าย *H. pluvialis* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะเซลล์สีเขียวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 15-27 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในการกระตุ้นให้เซลล์สร้างและสะสมสารแอสตาแซนทินเฉลี่ยจะสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส

3.3.3 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่าง เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสะสมสารแอสตาแซนทิน ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* อยู่ที่ประมาณ 7.0 และเมื่อความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำกว่า 5 หรือสูงกว่า 9 จะส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต โดยความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสะสมสารแอสตาแซนทินจะอยู่ในช่วงประมาณ 7 เช่นกัน โดยได้ความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน 5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตารางที่ 3.4 แสดงผลของกรด-ด่างต่อการสร้างแอสตาแซนทิน

3.3.4 สารอาหาร

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบ่งออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือ สารอาหารหลัก (macronutrient) และสารอาหารรอง (micronutrient) สารอาหารหลักจะมีอัตราส่วนที่สูงกว่าใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ไนโตรเจน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และอื่น ๆ เป็นต้น ส่วนสารอาหารรองมีความสำคัญเช่นกันแต่มีความต้องการปริมาณน้อย ตัวอย่างเช่น เหล็ก โบรอน แมกนีเซียม ทองแดง และวิตามินบี 12 เป็นต้น

ตารางที่ 3.3 ผลของความเข้มแสงต่อการสร้างแอสตาแซนทีน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthi n ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Qinglin et al., 2007	Flask 500 ml	BBM ^a	-	18	-	-	23.8	methanol+ 5% NaOH	-	56	13
Katsuda et al., 2006	Flask 200 ml	Kobayashi's basal medium	1.33	0.6	Continu- ous light	6.8	20	methanol	50	29	12.5
Lababpour et al., 2005	Flask 200 ml	Kobayashi's basal medium	0.2	0.19	Blue LEDs	6.8	20	methanol	-	70	16.67
Kim et al., 2006	Bubble column	MBBM ^b	5	11.03	Flashing light	6.5	23	acetone	4.5	0.466	30

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) ผลของความเข้มแสงต่อการสร้างแอสตาแซนทีน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Dominguez- Bocanegra et al., 2004	Flask 200 ml	BAR medium	-	17.25	Continu- ous light	-	28	hexane:acet one:alcohol (100: 70:70)	-	9.8	8
Choi et al., 2003	Bubble column 2 l	FBBM ^c	1	7	Continu- ous Light	-	25	-	15	40	17
Fabregas et al., 1998	Mini- reactor 70ml	Fabregas 's medium	10	11.5	Day light 12 hr.	7.2- 7.5	25	acetone: methanol (1:2)	-	19.05	7
Olaizola, 2000	airlift reactor	MBBM ^b	1.87	-	Sun light	-	-	-	-	8.4	-

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) ผลของความเข้มแสงต่อการสร้างแอสตาแซนทิน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Kobayashi et al., 1997	Flask 250 ml	Fe ²⁺ Rich medium	5	14.05	Day light 24 hr.	-	-	acetone	-	2.5	8
Harker et al, 1996 (b)	Flask 250 ml	BBM	8	4.45	Cool white fluores- cent	-	22	Acetone 100%	6.5	25	20

^a Bold basal medium

^b Modified bold basal medium

^c Fortified bold basal medium

ตารางที่ 3.4 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสร้างแอสทีนแซนทีน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Lababpour et al., 2005	Flask 200 ml	Kobayashi' basal medium	2	0.4	Floures- cent lamp	6.8	20	0.1 ml methanol in NaOH 5mM	-	0.08	-
Sarada et al., 2001	Flask	BM ^d (0.25%NaCl in 4.4mM Sodium acetate)	-	-	-	7	25	acetone	-	5.4	10

^d Basal medium

- สารอาหารหลัก (Macronutrient)

ก. ไนโตรเจน (Nitrogen)

จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสารอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง อย่างไรก็ตามการสะสมแอสตาแซนทีนจะมีปริมาณสูงเมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน และมีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ปราศจากการเติมสารที่อาหารโพแทสเซียมในเตรตจะได้ปริมาณแอสตาแซนทีนสูงถึง 49.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยังมีหลายงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาการ จำกัดปริมาณไนโตรเจน ดังสรุปในตารางที่ 3.5

ข. ฟอสฟอรัส (Phosphorus)

การจำกัดปริมาณฟอสเฟตเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้สำหรับการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการสะสมแอสตาแซนทีน โดยมีรายงานการได้ปริมาณแอสตาแซนทีนสูงถึง 13.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีการ จำกัดฟอสเฟตนี้ อย่างไรก็ตามการจำกัดปริมาณฟอสเฟตจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เหมือนกับการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ตารางที่ 3.6 แสดงผลของการจำกัดปริมาณฟอสเฟตต่อการสร้าง แอสตาแซนทีน

- สารอาหารรอง (Micronutrient)

ก. เหล็ก (Iron)

การสร้างสารแอสตาแซนทีนของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* จะเกิดขึ้นได้ดีในสารอาหารที่มีเหล็ก เป็นส่วนประกอบ เนื่องจากสูตรของสารอาหารที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบจะแตกตัวให้หมู่ไฮดรอกซิล ซึ่ง หมู่ไฮดรอกซิลจะไปกระตุ้นให้จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สร้างสารแอสตาแซนทีน

ข. วิตามิน (Vitamin)

มีสารอาหารอนินทรีย์บางชนิดที่จุลสาหร่าย *H. pluvialis* มีความต้องการ เช่น วิตามินบี 12 และ วิตามินบี 1 เป็นต้น

ค. เกลือ (Salinity)

เกลือเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ได้ปริมาณของสารแอสตาแซนทีนสูงขึ้น แต่การใช้เกลือในการ กระตุ้นนี้จะทำให้มีอัตราการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้มีรายงานว่า การใช้โซเดียมคลอไรด์ใน การเพิ่มความเค็มจะกระตุ้นการสร้างแคโรทีนอยด์ (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าการใช้ โพแทสเซียมคลอไรด์ (17.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตารางที่ 3.7 แสดงผลของความเค็มต่อการสร้าง สารแอสตาแซนทีน

ตารางที่ 3.5 ผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนต่อการสร้างแอสตาแซนทิน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Qinglin et al., 2007	Flask 500 ml	BBM	-	18	-	-	23.8	methanol+ 5% NaOH	-	33	13
Orosa et al., 2004	Mini- reactor 400 ml	BBM	-	3.5	Daylight 12 hr.	7	18	acetone	-	12.05	9-11
Sarada et al., 2001	Flask	BM	-	1.5	-	-	25	acetone	-	8	10
Boussiba, 2000	-	BG-11	35	5	-	-	-	DMSO	30	7.5	12
Fabregas et al., 1998	Mini- reactor 70ml	Fabregas 's medium	10	11.5	Day light 12 hr.	7.2- 7.5	25	acetone: methanol (1:2)	-	49.52	14

ตารางที่ 3.5 (ต่อ) ผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนต่อการสร้างแอสตาแซนทิน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Harker et al, 1996 (b)	Flask 250 ml	BBM (nitrate =0)	1	1.75	Cool white fluores- cent	-	22	Acetone 100%	5	17.5	30

ตารางที่ 3.6 ผลของการจำกัดปริมาณฟอสเฟตต่อการสร้างแอสตาแซนทิน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Boussiba, 2000	-	BG-11	35	5	-	-	-	DMSO	30	13.75	12
Harker et al, 1996 (b)	Flask 250 ml	BBM (nitrate =0)	1	1.75	Cool white fluores- cent	-	22	Acetone 100%	5	8.75	30

ตารางที่ 3.7 ผลของความเข้มต่อการสร้างสารแอสตาแซนทิน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^4$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^4$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Sarada et al., 2001	Flask	BM	-	1.5	-	-	25	Acetone	-	1.25	12
Harker et al., 1996 (b)	Flask 250 ml	BBM (nitrate =0)	1.25	1.75	Cool white fluores- cent		22	Acetone 100%	5	25	30

3.4 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

ในปัจจุบันระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวมีอยู่หลายรูปแบบ รูปแบบระบบเปิด (open system) อาทิเช่น การเพาะเลี้ยงแบบบ่อเปิด (open pond) หรือบ่อเพาะเลี้ยงนั้นเป็นระบบที่ง่ายและเก่าแก่ที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย อีกทั้งยังเป็นระบบที่มีราคาต้นทุนที่ใช้ในการติดตั้งและดำเนินงานต่ำ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของการผสมผสานภายในระบบ และไม่สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้ เช่น การส่องสว่างของแสง อุณหภูมิ และการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงจึงทำได้ยาก นอกจากนี้ยังเป็นระบบที่มีโอกาสปนเปื้อนกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้ง่าย ด้วยเหตุดังกล่าวรูปแบบการเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิด (open system) จึงไม่เหมาะสำหรับเซลล์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ หรือเซลล์ที่ให้ผลผลิตราคาแพง อย่างไรก็ตามระบบนี้เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความแข็งแรงและมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว มีสภาวะการเจริญเติบโตที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ประเภทอื่นๆ

สำหรับการเพาะเลี้ยงระบบปิด (closed system) อาทิเช่น ระบบถังปฏิกรณ์ ซึ่งเป็นระบบที่ได้รับค่านิยมในการนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้อย่างสม่ำเสมอและยังเป็นระบบที่มีโอกาสปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ต่ำ

ตารางที่ 3.8 แสดงบทสรุปข้อดีและข้อด้อยของการเพาะเลี้ยงระบบเปิดและระบบปิด

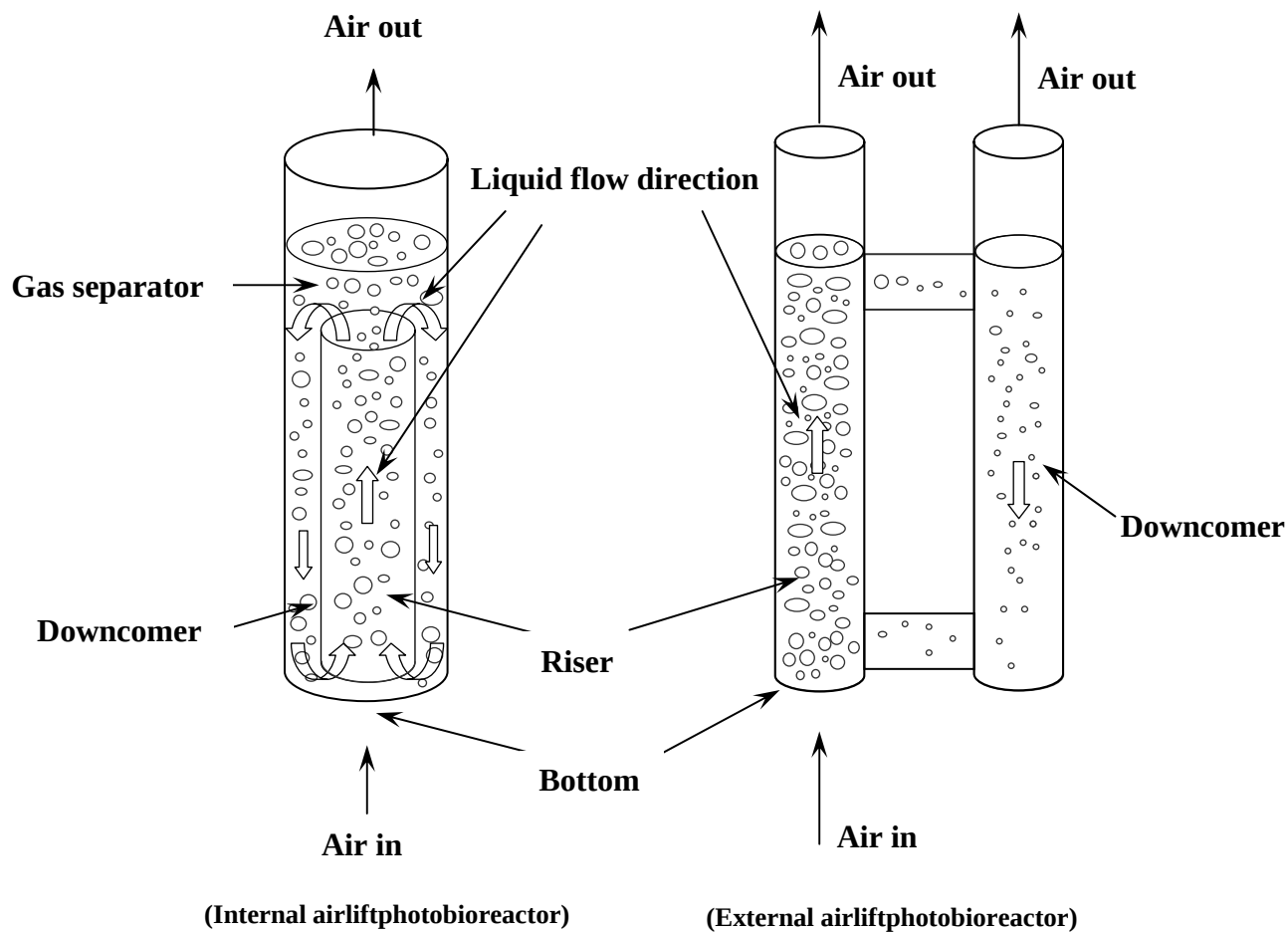
3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ระยะเวเจเตทีฟในระบบถังปฏิกรณ์

เนื่องจากจุลสาหร่าย *H. pluvialis* เป็นเซลล์ที่บอบบางในระยะการเจริญเติบโตและมีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับจุลชีพชนิดอื่นๆ และยังเป็นสาหร่ายน้ำจืดที่มีสภาวะการเพาะเลี้ยงปกติ จึงมีโอกาสดังกล่าวที่จะถูกปนเปื้อนด้วยเซลล์อื่นที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจึงต้องทำในระบบปิด ข้อมูลจากการวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงรูปแบบของการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายระบบปิดหลายรูปแบบ อาทิเช่น ระบบแบบแผ่นแบน ระบบถังเป่าอากาศทรงสูง หรือระบบท่อยาว และระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (airlift photobioreactor) เป็นต้น

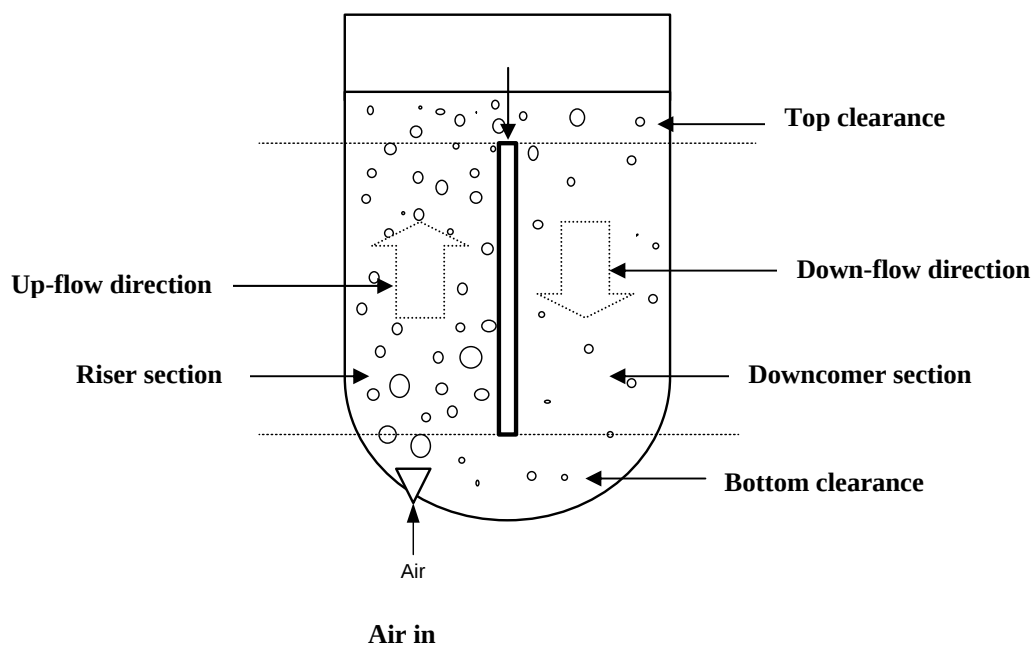
ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (airlift photobioreactor) เป็นรูปแบบหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายค่อนข้างดี และเป็นระบบที่ออกแบบง่าย ราคาไม่แพง นอกจากนี้ยังให้การผสมผสานและการไหลวนที่ค่อนข้างดี มีแรงเฉือนต่ำ เหมาะกับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* เนื่องจากในช่วงระยะของการเจริญเติบโต (green vegetative motile cell) เซลล์สาหร่ายชนิดนี้จะมีผนังเซลล์บอบบางและไม่ทนต่อแรงเฉือน โดยรูปที่ 3.1 (ก และ ข) แสดงให้เห็นถึงรูปแบบต่างๆ ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ส่วนตารางที่ 3.9 แสดงผลงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ระยะเวเจเตทีฟในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่างๆ

ตารางที่ 3.8 ข้อดีและข้อด้อยของการเพาะเลี้ยงระบบเปิดและระบบปิด

Parameter	Open pond	Closed system
Contamination	Extremely high	Low
Space required	high	Low
Water losses	Extremely high	Almost none
CO ₂ losses	high	Almost none
Weather dependence	absolute	Insignificant, because closed configuratuions allow production also during bad weather
Species	Are restricted to few algal varieties	May be cultivated
Biomass concentration	low	high
Efficiency of treatment process	Low	high



รูปที่ 3.1(ก) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (cylindrical airlift photobioreactor)



รูปที่ 3.1 (ข) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (flat panel airlift photobioreactor)

ตารางที่ 3.9 ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะการเจริญเติบโต

References	Reactor	Volume	Medium	Condition	Modes of operation						Maximum cells density ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹)	Productivity of cells ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹ day ⁻¹)	Specific growth rate (d ⁻¹)
					Light intensity (KLux)	Light source	pH	Temp. (°C)	Aeration rate	Agitation rate (rpm)			
Ranjbar et al., 2008	Airlift photobio reactor ($A_d/A_r = 1.1$) * Keep nitrate conc. at 8 mM (300 mL)	1 L	Standard inorganic medium	Autotrophic (batch) CO ₂	1-2.4	fluorescent lamps	7.5	20	0.072-0.125 cm s ⁻¹		70	7.20	0.20
Ranjbar et al., 2007	Bubble column photobio reactor	1.6 L	Standard inorganic medium	Autotrophic CO ₂	1 - 2.4	fluorescent lamps	8	20	0.067 - 0.1 cm s ⁻¹		50 - 60	4.80	0.22
Kaewpintong et al., 2007	Airlift photobio reactor	3 L	Modified F 1 (Added Vit. B12)	Autotrophic 1%CO ₂	1	fluorescent lights	7	27	0.4 cm s ⁻¹		7.7	0.55	0.45

ตารางที่ 3.9 (ต่อ) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะการเจริญเติบโต

References	Reactor	Volume	Medium	Condition	Modes of operation						Maximum cells density ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹)	Productivity of cells ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹ day ⁻¹)	Specific growth rate (d ⁻¹)
					Light intensity (KLux)	Light source	pH	Temp. (°C)	Aeration rate	Agitation rate (rpm)			
Suh et al., 2006	A novel double-layered photobio reactor	11 L	Bold's Basal medium (BBM)	Autotrophic 5%CO ₂	2 - 3	white fluorescent lamps	6.5	25	100 mL min ⁻¹		5.5	0.62	0.30
Garcia et al., 2006	Airlift tubular photobio-reactor	55 L	Inorganic medium free acetate	Autotrophic (batch) CO ₂ (Outdoor)	50-2000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$		8	20	500 mL min ⁻¹		45	7.00	0.30
	Bubble column photobio reactor	55 L	Inorganic medium free acetate	Autotrophic (batch) CO ₂ (Outdoor)	50-2000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$		8	20	500 mL min ⁻¹		25	4.00	0.22
Kang et al., 2006	Flask	250 mL	Primary treated piggery wastewater (PTP) *Diluted 4 fold	Autotrophic (batch) 5%CO ₂	2.5	white fluorescent lamps	7.5	23	65 mL min ⁻¹		11	1.33	0.25

ตารางที่ 3.9 (ต่อ) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะการเจริญเติบโต

References	Reactor	Volume	Medium	Condition	Modes of operation						Maximum cells density ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹)	Productivity of cells ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹ day ⁻¹)	Specific growth rate (d ⁻¹)
					Light intensity (KLux)	Light source	pH	Temp. (°C)	Aeration rate	Agitation rate (rpm)			
Sang Lee et al., 2006	Bubble column photobio reactor	2.5 L	Modified Bold's Basal medium (MBBM)	Autotrophic (batch) 5%CO ₂	35 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	white fluorescent lamps	7	25	100 mL min ⁻¹		6.5	0.92	0.31
Vega-Estrada et al., 2005	Airlift photobio reactor (split plate) ($A_d/A_r = 0.376$)	2 L	Bold's Basal medium (BBM)	Autotrophic (batch)	8.5	white fluorescent lamps		26-28	250 mL min ⁻¹		11	1.00	0.26
Del Rio et al., 2005	Bubble column photobio reactor	2 L	Basal medium	Sodium nitrate	autotrophic (continuous) CO ₂	1220 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	white fluorescent lamps	7	25		20	0.30	0.28
Dominguez - Bocanegra et al., 2004	Flask	1000 mL	Bold's Basal medium (BBM)										
Fabregas et al., 2001	Tube	70 mL	OHM medium	Autotrophic (batch) CO ₂	2	white fluorescent lamps	7.2 - 7.8	25	15 L hr ⁻¹		6.25	0.45	0.13

ตารางที่ 3.9 (ต่อ) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะการเจริญเติบโต

References	Reactor	Volume	Medium	Condition	Modes of operation						Maximum cells density ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹)	Productivity of cells ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹ day ⁻¹)	Specific growth rate (d ⁻¹)
					Light intensity (KLux)	Light source	pH	Temp. (°C)	Aeration rate	Agitation rate (rpm)			
Fabregas et al., 2000	Tube	70 mL	OHM medium	Autotrophic 5%CO ₂	2	fluorescent lamps	< 8	25	250 mL min ⁻¹		3.8	0.76	0.27
Tripathi et al., 1999	Flask		Bold's Basal medium (BBM)	Autotrophic	1.5			25			1.5	0.15	0.04
Fabregas et al., 1998	Mini-reactor	70 mL	F1 medium	Autotrophic (batch) CO ₂	2	fluorescent lamps	7.2 - 7.8	25	15 L hr ⁻¹		6	0.43	0.10
Grunewald et al., 1997	Flask	100 mL	Bold's Basal medium (BBM)	Autotrophic (batch)	7.5	white lights		20			2.9	0.85	0.49
Harker et al., 1996a	Airlift photobio reactor	30 L	Basal medium	Added NaCl	Autotrophic (batch)	2.5	fluorescent lamps		90-180 L hr ⁻¹		2.5	0.12	0.13

ตารางที่ 3.9 (ต่อ) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะการเจริญเติบโต

References	Reactor	Volume	Medium	Condition	Modes of operation						Maximum cells density ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹)	Productivity of cells ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹ day ⁻¹)	Specific growth rate (d ⁻¹)
					Light intensity (KLux)	Light source	pH	Temp. (°C)	Aeration rate	Agitation rate (rpm)			
Hata et al., 2001	Flask	500 mL	Basal medium	Hetero-trophic (fed batch)			8	25		40	10	1.12	0.29
Tripathi et al., 1999	Flask		KM1 medium	Hetero-trophic	1.5			25			4.35	0.87	0.29
Chen et al., 1997	Stirred tank	3.7 L		Hetero-trophic (batch)			7	25	100 L hr ⁻¹	400	0.7	0.09	0.32

ตารางที่ 3.9 (ต่อ) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะการเจริญเติบโต

References	Reactor	Volume	Medium	Condition	Modes of operation						Maximum cells density ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹)	Productivity of cells ($\times 10^5$ cell mL ⁻¹ day ⁻¹)	Specific growth rate (d ⁻¹)
					Light intensity (KLux)	Light source	pH	Temp. (°C)	Aeration rate	Agitation rate (rpm)			
Katsuda et al., 2006	Glass vessels	55 mL	Kobayashi's basal medium	Mixotrophic	0.1-0.6	fluorescent lamps or Blue flashing light LED (100 Hz)	6.8	20			4.3	1.50	0.67
Kobayashi et al., 1997	Flask	200 mL	Basal medium	Mixotrophic	1.5	fluorescent lamps	6.8	20			7	1.50	0.57
Chen et al., 1997	Stirred tank	3.7 L		Mixotrophic (batch)	8.5	fluorescent lamps	7	25	100 L hr ⁻¹	400	1.45	0.23	0.44
Chumpolkulwong et al., 1997			Basal medium	} Added sodium acetate	7			20			5.5	1.17	0.34
Tjahjono et al., 1994	Flask	200 mL	Basal medium					20			5.22	1.40	0.55

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ระยะชีสต์ในระบบถังปฏิกรณ์

สำหรับขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อให้เกิดการสะสมสารแอสตาแซนทิน วิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปก็คือการกระตุ้นด้วยแสง การจำกัดไนเตรตและ/หรือฟอสเฟต การเพิ่มอุณหภูมิ และอื่น ๆ เป็นต้น ในขั้นตอนนี้นักทำเป็นระบบปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เชื้อรา และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่นๆ ที่มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีกว่าจุลสาหร่าย *H. pluvialis* โดยเฉพาะการปนเปื้อนของโปรโตซัว (Protozoan) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถทำลายสาหร่ายได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมดภายในเวลา 72 ชั่วโมง ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยาน (Airlift photobioreactor) ถังปฏิกรณ์แบบอัดอากาศ เช่น ถังปฏิกรณ์แบบเป่าอากาศ (Bubble column bioreactors) และถังปฏิกรณ์แบบทิวบูลาร์ (Tubular bioreactors) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะชีสต์นี้ เนื่องจากมีแรงเฉือน (Shear stress) น้อยกว่าถังกวนใบพัด (Stirrer tank) และมีราคาถูกกว่าถังปฏิกรณ์ชนิดอื่นๆ ถังปฏิกรณ์ชนิดนี้ถูกใช้กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบปิดที่อยู่ภายในอาคารในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระดับอุตสาหกรรม

ในปี 2005 มีข้อมูลการทดสอบแสงในการกระตุ้นให้จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สร้างสารแอสตาแซนทินโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบเป่าอากาศ (Bubble column bioreactors) ขนาด 2 ลิตร สภาวะที่ใช้ในการทดลองคือให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 11.03 กิโลลักซ์ ผลการศึกษาพบว่าได้ความเข้มข้นของสารแอสตาแซนทิน 0.466 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 30 วัน

ในปี 2006 เซนกัน Lopez et al. ทำการเปรียบเทียบการกระตุ้นให้เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ผลิตสารแอสตาแซนทิน โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่าง ๆ กัน ผลปรากฏว่า ถังปฏิกรณ์แบบทิวบูลาร์ได้ความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน 9.23 ไมโครกรัมแอสตาแซนทินต่อมิลลิลิตร และถังปฏิกรณ์แบบเป่าอากาศ (Bubble column bioreactors) ได้ความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน 1.54 ไมโครกรัมแอสตาแซนทินต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามในปี 2007, Ranjbar et al. ได้รายงานว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเป่าอากาศ (bubble column) สามารถให้ความเข้มข้นขององค์ประกอบของสารแอสตาแซนทินสูงถึง 390 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ ตารางที่ 3.10 แสดงผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อกระตุ้นการผลิตสารแอสตาแซนทิน

ตารางที่ 3.10 ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อกระตุ้นการผลิตสารแอสตาแซนทิน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell ($\times 10^5$ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells ($\times 10^5$ cells/ml)	Astaxanthin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp ($^{\circ}\text{C}$)				
Ranjbar et al, 2007	Bubble column 1L	Standard Inorganic medium	-	2.43	Fluorescent lamps	7.5	20	-	6×10^6	390	35
Garcia-Malea et al., 2006	Bubble column 55L	Inorganic medium free of acetate	10	2-100	Daylight	8	20	acetone	25	1.54	16
Garcia-Malea et al., 2006	Tubular reactor 55 L	Inorganic medium free of acetate	10	2-100	Daylight	8	20	acetone	45	9.23	16

ตารางที่ 3.10 (ต่อ) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อกระตุ้นการผลิตสารแอสตาแซนทีน

Ref.	Reactor	Medium	Initial cell (x10 ⁴ cells/ml)	Condition				Solvent	Final cells (x10 ⁴ cells/ml)	Astaxanthin (µg/ml)	Time (days)
				Light Intensity (klux)	Light source	pH	Temp (°C)				
Kim et al., 2006	Bubble column 2L	Modified bold basal medium	50	11.03	Continuo us and flashing light	6.5	23	acetone	45	0.466	30
Zhang et al., 1999	Stirrer tank 3.7 L 350 rpm	Hong Kong medium	0.22	-	-	7	30	-	15	64.4	20
Harker et al., 1996 (b)	Bubble column 30L	Bold basal medium + NaCl	1.25	2.5	Fluoresce nt light	7	-	acetone	1.5	18	55

บทที่ 4

การทดลอง

*ส่วนนี้เป็นการให้รายละเอียดของการทดลองทั้งหมดที่น่าเสนอใน
รายงานฉบับนี้ เริ่มตั้งแต่ระบบการควบคุมอุณหภูมิ ระบบการ
เพาะเลี้ยง และการกระตุ้นสารแอสตาแซนทิน*

4.1 โรงเรือนสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เขียว (vegetative motile cells)

อุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียวถูกควบคุมอยู่ในช่วง 25 ± 5 องศาเซลเซียส โดยทำการเพาะเลี้ยงในโรงเรือนระเหยแบบไอน้ำ (green evaporation room) ซึ่งเป็นระบบปรับอากาศที่อาศัยหลักการระเหยน้ำผ่านสื่อการระเหยน้ำ (Cell pad) เมื่อใบพัดซึ่งติดอยู่ด้านหลังของห้องหมุนทำงานส่งผลให้อากาศภายนอกถูกดูดเข้ามาผ่านสื่อ Cell pad ที่มีน้ำไหลหล่อเลี้ยงอยู่ซึ่งติดอยู่ด้านหน้าของห้อง โดยน้ำที่ไหลผ่านสื่อ Cell pad นี้จะดึงความร้อนจากอากาศเพื่อใช้เปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นไอ ทำให้อากาศที่ผ่านสื่อ Cell pad มีอุณหภูมิต่ำลง นอกจากนั้นแล้ว ระบบดังกล่าวยังประหยัดพลังงานโดยใช้กระแสไฟฟ้าเพียง 5-10% ของระบบปรับอากาศที่ใช้คอมเพรสเซอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



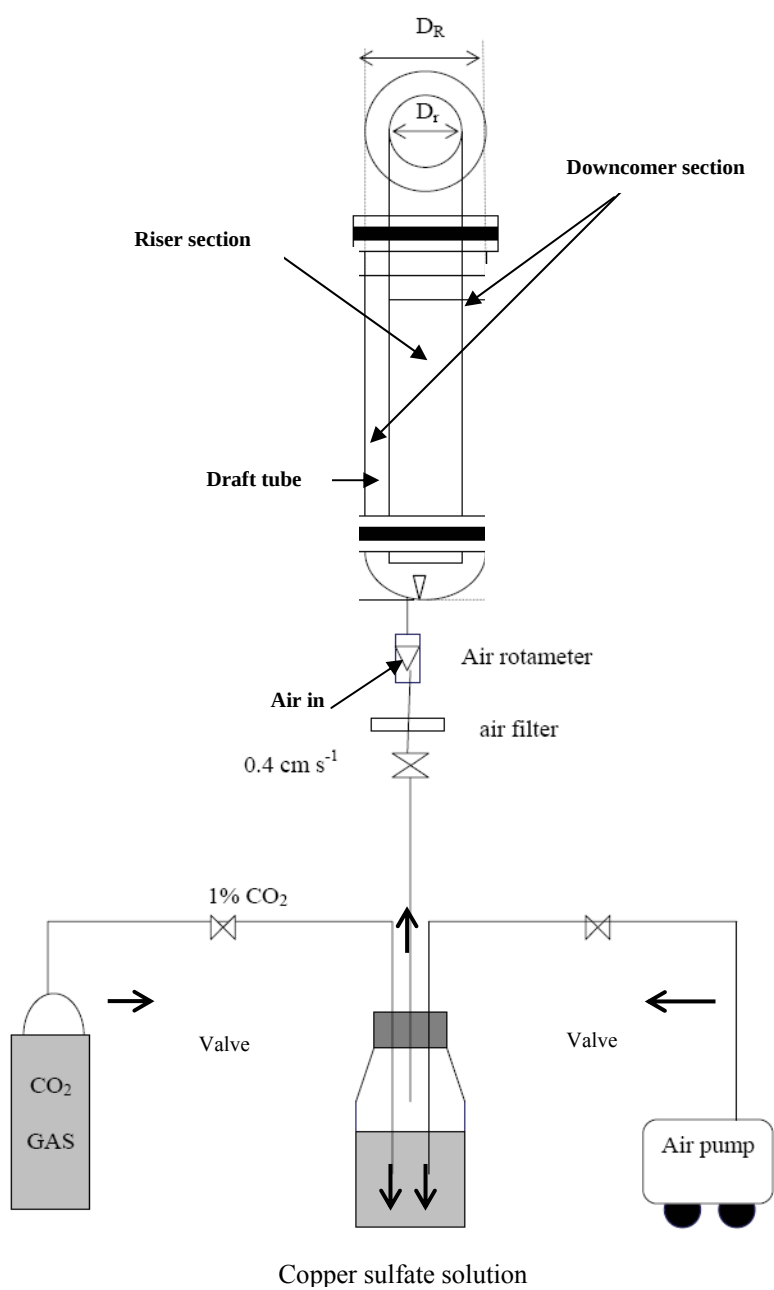
รูปที่ 4.1 โครงสร้างระบบโรงเรือนแบบไอระเหย (green evaporative room)

4.2 ระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis*

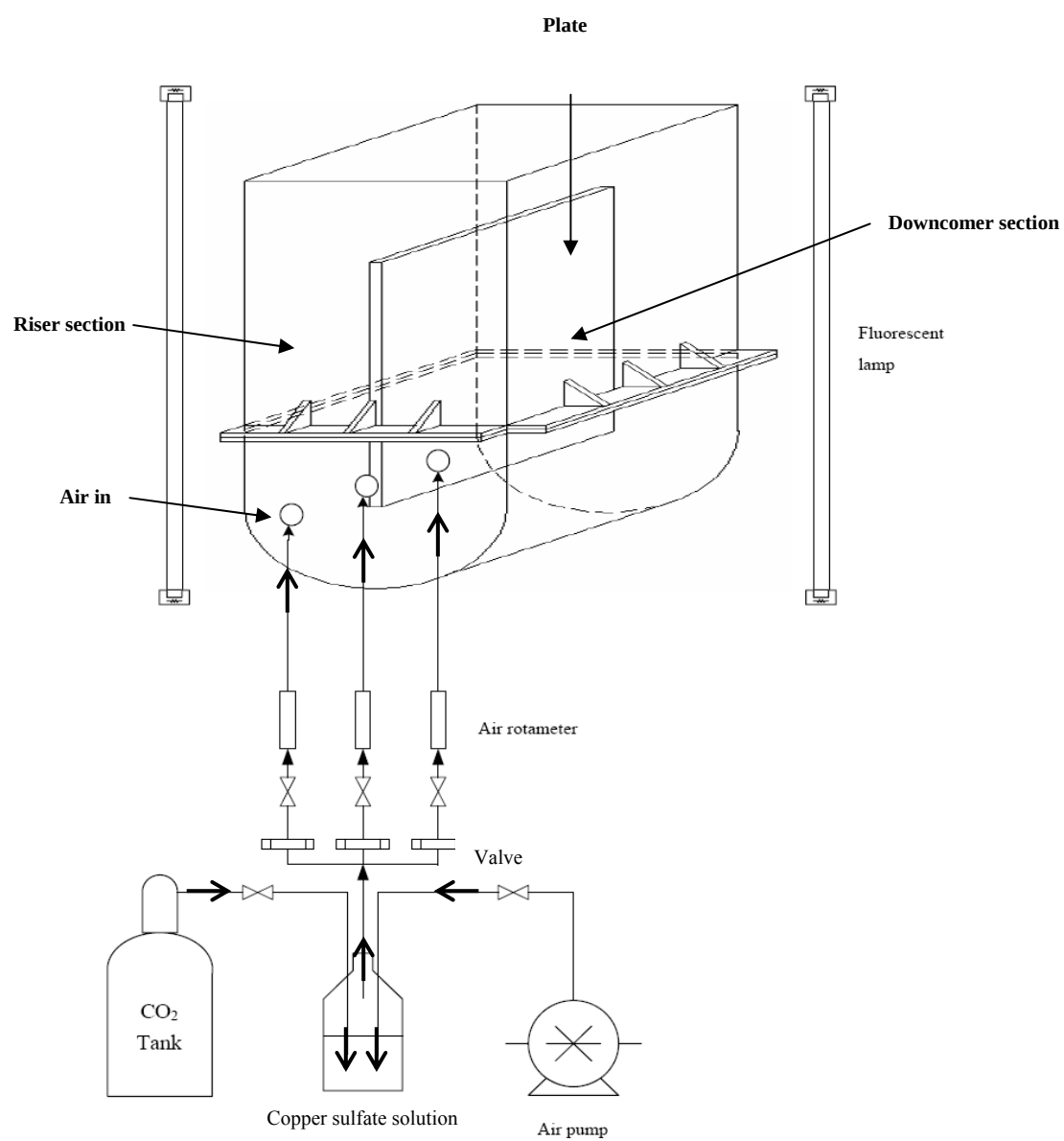
รูปแบบของถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (cylindrical airliftphotobioreactor) ขนาด 3 และ 17 ลิตร และถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (flat panel airliftphotobioreactor) ขนาด 17 และ 90 ลิตร ระบบการติดตั้งแสดงในรูป 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ถังปฏิกรณ์ทั้งสองรูปแบบทำมาจากวัสดุอะคริลิกใส การไหลวนของของเหลวภายในระบบทำโดยการให้อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร โดยจะไหลผ่านตัวควบคุมอัตราการไหล (flow meter) ต่อจากนั้นจะไหลผ่านเข้าสู่ตัวกรองหยاب และตัวกรองละเอียด (0.22 μm Gelman filter) ตามลำดับ เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนที่มาจากอากาศ และไหลเข้าทางด้านล่างของตัวถังปฏิกรณ์ แหล่งของแสงที่ใช้ในการทดลองนี้คือหลอดฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งจะทำให้การติดตั้งทางด้านข้างของตัวถังปฏิกรณ์ โดยความเข้มแสงสามารถปรับได้โดยการปรับจำนวนหลอดและระยะห่างระหว่างหลอดไฟกับผิวด้านข้างของถังปฏิกรณ์ ความเข้มแสงในที่นี้วัดโดยใช้เครื่อง Digital LX-5 Lux meter ในหน่วยของ ลักซ์ (Lux) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นหน่วย ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยใช้สมการแสดงความสัมพันธ์ดังนี้ (Thimijan and Royal , 1982)

$$1 \mu\text{mol (m}^{-2} \text{s}^{-1}) = 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1} = \frac{119.7}{\lambda} \text{ W m}^{-2} = 74 \text{ Lux} \quad (4.1)$$

โดย λ คือ ความยาวคลื่นของแสงสีขาวอยู่ในช่วง 400-700 นาโนเมตร (Visible light)



รูปที่ 4.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (Cylindrical airlift photobioreactor)



รูปที่ 4.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (Flat panel airlift photobioreactor)

4.3 วิธีการดำเนินการ

4.3.1 การเตรียมถังปฏิกรณ์

ระบบถังปฏิกรณ์ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 4.2 ต้องผ่านการทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนในระบบถังปฏิกรณ์โดยใช้ไอน้ำร้อนพ่นเข้าไปในระบบประมาณ 10-15 นาที หลังจากนั้น เติมน้ำลงในถังปฏิกรณ์จนได้ปริมาตรที่ต้องการ และเติมคลอรีน (โซเดียมไฮโปคลอไรต์) ลงไปเพื่อเป็นการกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่เจือปนอยู่ในน้ำ และใช้โพแทสเซียมไอโอไดร์เพื่อทดสอบปริมาณคลอรีนที่หลงเหลืออยู่ในน้ำ ถ้ายังมีคลอรีนตกค้างอยู่สารละลายจะปรากฏเป็นสีเหลือง (นั่นคือยังใช้ไม่ได้ ต้องไม่ให้เกิดสีเหลือง)

4.3.2 การเพาะเลี้ยงที่ดำเนินงานแบบกะ (Batch cultivation)

ในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ใช้ระบบถังปฏิกรณ์ดังรายละเอียดในหัวข้อที่ 4.2 และ 4.3.1 เติมหาอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับสายสูตร F1 ลงในถังปฏิกรณ์ พร้อมทั้งใส่หัวเชื้อของเซลล์จุลสำหรับ *H. pluvialis* ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือประมาณ 10% ของปริมาตรของถังปฏิกรณ์ โดยมีสภาวะการดำเนินงานดังนี้

- สัดส่วนของพื้นที่อากาศไหลลงต่อพื้นที่อากาศไหลขึ้น (A_d/A_r) ระหว่าง 0.1-3.0
- เป่าอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร ที่อัตราเร็วหอบเป่า (superficial velocity) ในช่วง 0-2 เซนติเมตรต่อวินาที
- ปรับความเข้มแสงที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วง 10-100 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที
- ควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25 ± 5 องศาเซลเซียส

และในช่วงดำเนินการ มีการตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์และนำไปวิเคราะห์ ตามรายละเอียดในภาคผนวก

4.3.3 การเพาะเลี้ยงที่ดำเนินงานแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous cultivation)

การเพาะเลี้ยงแบบนี้ยังคงใช้ระบบถังปฏิกรณ์ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 4.2 และ 4.3.1 โดยทำความสะอาดระบบและเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในขณะที่ทำการตรวจวัดความหนาแน่นของเซลล์ ถ้าพบว่ามีเซลล์ที่เริ่มสลัดหนวดในระบบ ให้ทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ใหม่ให้เท่ากับ 0.2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการดูดสารอาหารเดิมทิ้งไป และเติมสารอาหาร F1 ใหม่เข้ามาแทนที่ปริมาตรเดิมที่ดูดทิ้งไป

4.4 ระบบการกระตุ้นการสะสมแอสตาแซนทิน

หลังจากที่ในหัวข้อที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ได้ทำการศึกษาหาสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะเซลล์สีเขียวให้ได้ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตตามต้องการแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เปลี่ยนสภาพจากเซลล์สีเขียวมีหนวดให้เข้าสู่ระยะสีส้ม เพื่อให้มีการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินขึ้นมาในเซลล์ โดยในการทดลองนี้ จะทำการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ (outdoor conditions) กับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ (indoor conditions) ดังแสดงในรูปที่ 4.4 - 4.6

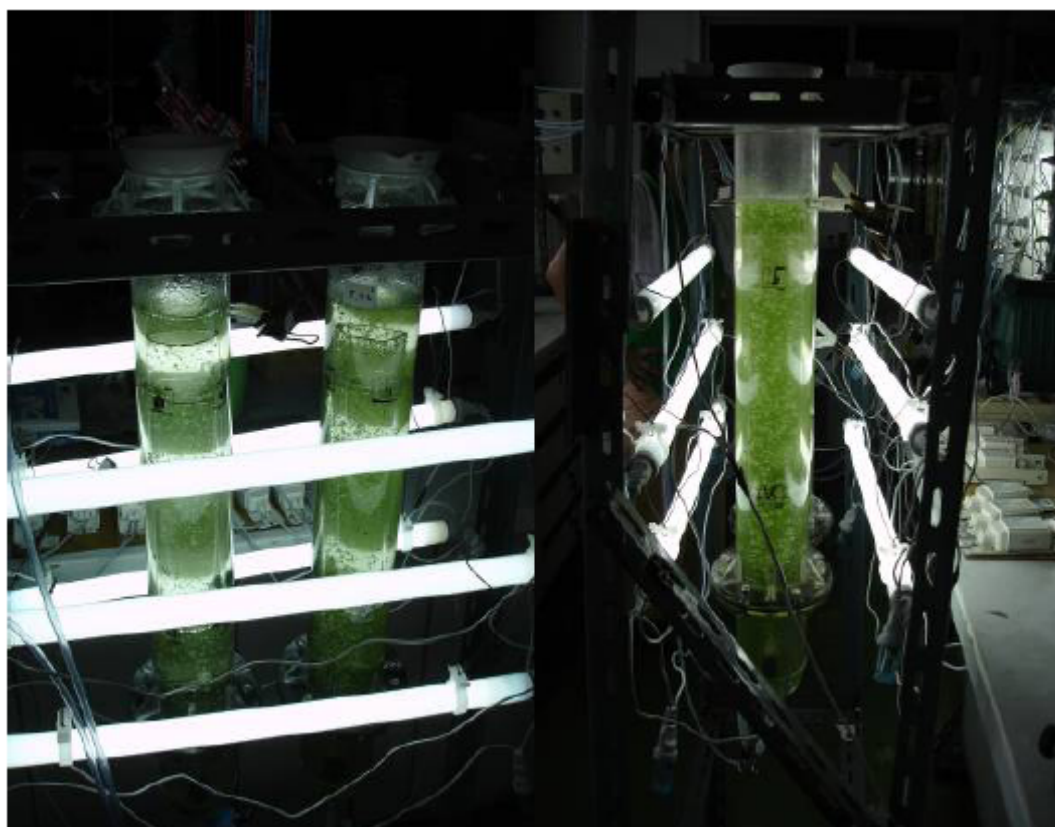
การเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ เป็นการใช้ถังปฏิกรณ์ชนิดเป่าอากาศแบบกรวย (cone bottom bubble photobioreactor) ปริมาตร 1.5 ลิตร ทำมาจากโพลีเอทิลีน เทเรทาเลท (Polyethylene terethalate) (กว้าง 8 และสูง 32 เซนติเมตร) เป่าอากาศทางด้านล่างของถังปฏิกรณ์ โดยไหลผ่านตัวควบคุมอัตราการไหล (flow meter) ต่อจากนั้นจะไหลผ่านเข้าสู่ตัวกรองหยาบ และตัวกรองละเอียด (0.22 μm Gelman filter) ตามลำดับ เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนที่มาจากอากาศ โดยใช้แสงธรรมชาติเป็นแหล่งของแสง และสำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ (indoor conditions) ถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงประกอบด้วยถังปฏิกรณ์ชนิดเป่าอากาศแบบกรวย ปริมาตร 1.5 ลิตร (cone bottom bubble photobioreactor) ถังปฏิกรณ์ชนิดเป่าอากาศ ปริมาตร 2.7 ลิตร (bubble photobioreactor) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง ปริมาตร 2.7 ลิตร (cylindrical airlift photobioreactor) แสงที่ใช้ในการทดลองนี้คือหลอดฟลูออเรสเซนต์ 18 และ 36 วัตต์ ซึ่งจะทำให้การติดตั้งทางด้านข้างของถังปฏิกรณ์ โดยความเข้มแสงสามารถปรับได้โดยการปรับระยะห่างระหว่างหลอดไฟกับผิวด้านข้างของถังปฏิกรณ์ ซึ่งสามารถใช้เครื่องมือ Digital LX-5 Lux meter



รูปที่ 4.4 ชุดการทดลองการเหนี่ยวนำให้เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สะสมสารแอสตาแซนทีน ในถังปฏิกรณ์ชนิดเป่าอากาศแบบกรวย ปริมาตร 1.5 ลิตร ที่ทำการเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 4.5 ชุดการทดลองการเหนี่ยวนำให้เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สะสมสารแอสตาแซนทีน ในถังปฏิกรณ์ชนิดเป่าอากาศแบบกรวย ปริมาตร 1.5 ลิตร ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ



(ก)

(ข)

รูปที่ 4.6 ชุดการทดลองการเหนี่ยวนำให้เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สะสมสารแอสตาแซนทีน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง ปริมาตร 2.7 ลิตร (ก) และถังปฏิกรณ์ชนิดเป่าอากาศ ปริมาตร 2.7 ลิตร (ข) ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

4.4.1 การเตรียมถังปฏิกรณ์

ให้ติดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ตามรายละเอียดในรูปที่ 4.4-4.6 เติมน้ำลงในถังปฏิกรณ์จนได้ปริมาตรที่ต้องการเพาะเลี้ยง ทำการกำจัดสิ่งเจือปนในระบบถังปฏิกรณ์โดยใช้ระบบโอโซนเข้าไปในระบบประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อัตราการไหล 200,000 มิลลิลิตรต่อนาที และเป่าอากาศผ่านตัวกรองอากาศเป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโอโซนที่ตกค้างในระบบ

4.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายโดยทำการเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ (outdoor conditions)

- ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารอาหาร

นำเซลล์สาหร่ายในระยะซีสต์ มากรองด้วย Nylon filter (diameter 10 μ m) และนำมาเจือจางด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านระบบการกำจัดสิ่งเจือปน เจือจางสารอาหารลงด้วยความเข้มข้น 5, 10, และ 15 เท่า

- ศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์

นำเซลล์สาหร่ายในระยะซีสต์ มากรองด้วย Nylon filter (diameter 10 μm) เตรียมสารละลายความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10, 20 และ 25 เท่า โดยเจือจางด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านระบบการกำจัดสิ่งเจือปนในสารละลายหัวเชื้อเริ่มต้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายโดยทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (indoor condition)

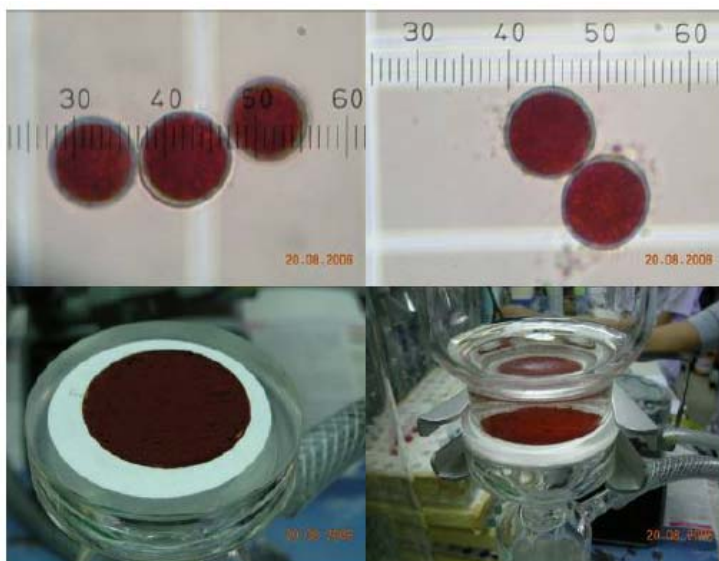
- ศึกษาผลของความเข้มข้นแสงต่อความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

นำเซลล์สาหร่ายในระยะซีสต์ มากรองด้วย Nylon filter (diameter 10 μm) โดยใช้ผลการทดลองที่เหมาะสมซึ่งได้จากหัวข้อ 4.4.2 (ผลของความเข้มข้นของสารอาหาร) เตรียมสารละลายความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10, 20 และ 25 เท่า โดยเจือจางด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านระบบการกำจัดสิ่งเจือปนในสารละลายหัวเชื้อเริ่มต้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มแสงที่ใช้ในการศึกษา ทำโดยปรับจำนวนหลอดฟลูออเรสเซนต์ 0, 2, 4 และ 6 หลอด ตามลำดับ

- ศึกษาผลของความเข้มข้นแสงต่อความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกเจือจาง

นำเซลล์สาหร่ายในระยะซีสต์ มากรองด้วย Nylon filter (diameter 10 μm) โดยใช้ผลการทดลองที่เหมาะสมซึ่งได้จากหัวข้อ 4.4.2 (ผลของความเข้มข้นของเซลล์) นำเซลล์ที่กรองได้มาเจือจางด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านระบบการกำจัดสิ่งเจือปน ที่ความเข้มข้น 5, 10, และ 15 เท่า ความเข้มแสงที่ใช้ในการศึกษา ทำโดยปรับจำนวนหลอดฟลูออเรสเซนต์ 0, 2, 4 และ 6 หลอด ตามลำดับ

หมายเหตุ: รูปที่ 4.7 แสดงเซลล์ในระยะซีสต์และการกรองเซลล์



รูปที่ 4.7 เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะซีสต์และแสดงการกรองเซลล์ด้วย Nylon filter (diameter 10 μm)

4.5 การสกัดสารแอสตาแซนทิน

เป็นที่ทราบกันดีว่าสารแอสตาแซนทินพบมากในเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ซึ่งมีสารแอสตาแซนทินสะสมอยู่ประมาณ 0.5-5.0% โดยน้ำหนัก อย่างไรก็ตามสาหร่ายชนิดนี้มีผนังเซลล์ที่หนาจึงยากที่จะดึงหรือสกัดสารแอสตาแซนทินออกจากเซลล์ ดังนั้นจึงมีรายงานวิจัยทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น สกัดสารด้วยตัวทำละลาย สกัดด้วยน้ำมันพืช สกัดภายใต้ความดัน และสกัดภายใต้สภาวะวิกฤติวดยิ่ง นอกจากนั้นแล้ว ยังมีงานวิจัยจำนวนหนึ่งทำการสกัดสารที่มีคุณค่าจากพืชและเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยใช้วิธีที่นอกเหนือจากวิธีดังกล่าวข้างกล่าวคือ การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด และการใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยในการสกัด โดยวิธีการสกัดด้วยวิธีนี้คลื่นเหนือเสียงจะผลิตคลื่นความถี่ซึ่งสามารถทำลายผนังเซลล์และสามารถสกัดสารจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกได้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนมวลสาร ในขณะที่การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดจะผลิตความร้อนขึ้นภายในเซลล์อย่างรวดเร็วและเกิดความดันภายในเซลล์ทำให้แตก จึงสามารถดึงสารจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกอย่างรวดเร็ว ทั้งสองวิธีนี้มีประโยชน์ในแง่ใช้เวลา น้อย ใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อย และให้อัตราการสกัดสูง

งานวิจัยนี้ ส่วนหนึ่งเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินเพื่อให้ได้ปริมาณสารแอสตาแซนทินมากที่สุด โดยเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมคือ วิธีการแช่หรือจุ่มในตัวทำละลาย (Maceration) และ วิธีสกัดด้วยชุดอุปกรณ์ซอกเลต (Soxhlet)

4.5.1 ที่มาของแอสตาแซนทิน

เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* แห่งที่ผ่านการกระตุ้นแล้ว ก่อนนำมาใช้ควรเก็บไว้ในที่แห้ง อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของตัวอย่าง ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เอทานอล อะซีโทน อะซีโตน และอะซีโตนไไตรล์ และเมทานอล สารแอสตาแซนทินมาตรฐาน ความบริสุทธิ์ 92% ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน จัดซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich

4.5.2 วิธีการทดลอง

4.5.2.1 วิธีการแช่หรือจุ่มในตัวทำละลาย (Maceration)

ซึ่งเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* 0.1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ตวงตัวทำละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ นำไปวางไว้ในรางน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดอยู่ในช่วง 0 ถึง 60 นาที เปลี่ยนชนิดตัวทำละลายเป็น เมทานอล เอทานอล อะซีโตนไไตรล์ และอะซีโตน โดยตัวแปรที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 หลังจากนั้นนำสารที่สกัดได้พร้อมกากมากรองผ่านกระดาศกรองแบบ syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

จากนั้นเก็บสารตัวอย่างที่กรองได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ตารางที่ 4.1 สภาวะที่ใช้สกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการสกัด	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ตัวทำละลาย
Maceration	30, 45 และ 60	5, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90	เมทานอล เอททานอล อะซีโตไนไตรล์ และอะซีโตน
Soxhlet	ที่จุดเดือดของตัวทำละลาย	4 ชั่วโมง	เมทานอล เอททานอล อะซีโตไนไตรล์ และอะซีโตน
Ultrasonic	30, 45 และ 60	5, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90	เมทานอล เอททานอล อะซีโตไนไตรล์ และอะซีโตน
Microwave	30, 45, 60, 75 และ 78	5, 15, 30, 45 และ 60	เมทานอล เอททานอล อะซีโตไนไตรล์ และอะซีโตน

4.5.2.2 สกัดด้วยชุดอุปกรณ์ซอกเลท (Soxhlet)

ซังเซลล์จุลสำหรับ *H. pluvialis* 0.5 กรัม ใส่ลงใน thimble cartridge แล้ววางไว้ส่วนกลางของชุดอุปกรณ์ซึ่งต่อกับขวดกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ประกอบชุดอุปกรณ์เข้าด้วยกันแล้วนำไปวางไว้ในอุปกรณ์ให้ความร้อน ระยะเวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง รอจนกระทั่งตัวทำละลายส่วนบนใส หลังจากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้เป็น เมทานอล เอททานอล อะซีโตไนไตรล์ และอะซีโตน ตามลำดับ ต่อมานำสารในขวดกลมมาผ่านกระดาศกรองแบบ syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วเก็บสารที่กรองได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

4.5.2.3 สกัดด้วยคลื่นเหนือเสียง (Ultrasonic)

ซังเซลล์จุลสำหรับ *H. pluvialis* 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดสีชาขนาด 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางไว้ตรงกลางของอ่างกำเนิดคลื่นเหนือเสียง (รุ่น 275DAE ขนาด 23.5 ซม.×13.3 ซม.×10.2 ซม.) ใช้กำลังไฟ 270 วัตต์ การทดลองในส่วนนี้จะใช้อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัดค่าในช่วง 15 ถึง 90 นาที เปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้เป็น เมทานอล เอททานอล อะซีโตไนไตรล์ และอะซีโตน โดยตัวแปรที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดด้วยคลื่นเหนือเสียง (ultrasonic) หลังจากนั้นนำสารที่ได้กรองผ่านกระดาศกรองแบบ syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บสารที่กรองได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดด้วยคลื่นเหนือเสียง (Ultrasonic)

Type of solvents	Dipole moment (D)	Surface tension (mN/cm)	Vapor pressure (mmHg)	Viscosity (cP)
Methanol	2.69	22.6	127.05	0.6
Ethanol	2.87	23.7	59.02	1.2
Acetonitrile	1.66	19.1	88.47	0.38
Acetone	3.92	23.7	229.52	0.32

4.5.2.4 สกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave)

ซึ่งเซลล์จุลสำหรับ *H. pluvialis* 0.1 กรัม ใส่ลงในกระบอกขนาด 100 มิลลิลิตร ในการทดลองส่วนนี้ การทดลองหนึ่งครั้งจะใช้กระบอกสีขาวสำหรับใส่ตัวอย่าง 6 หลอด ใส่ตัวทำละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตรในแต่ละกระบอกซึ่งได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตนไนไตรล์ และอะซิโตน

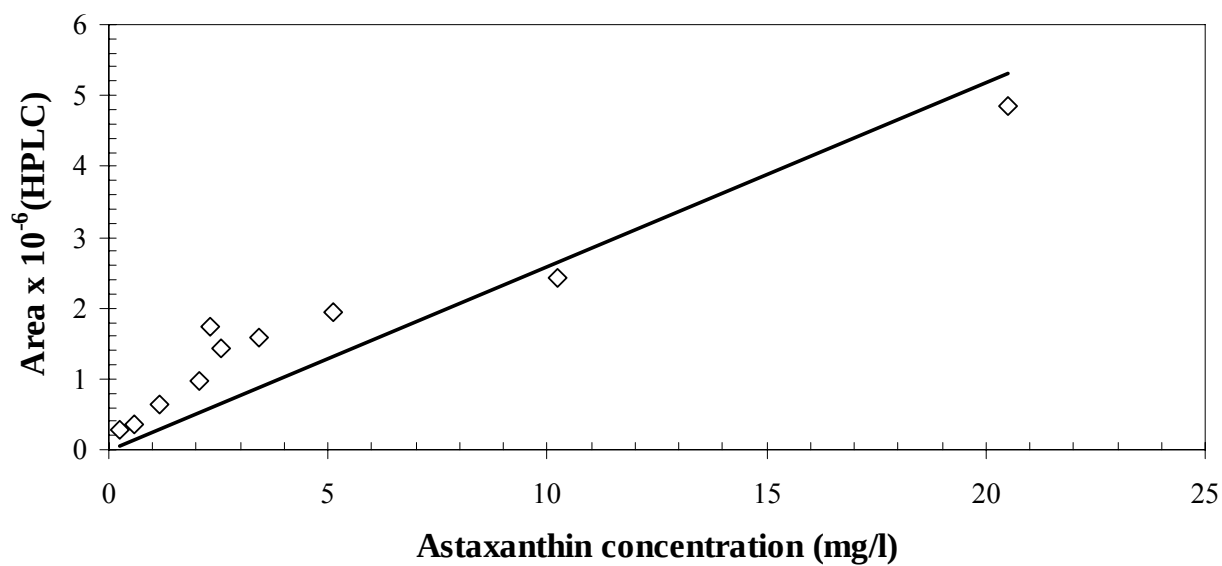
ทุกการทดลองใช้กำลังไฟ 60% ของกำลังไฟสูงสุด 1,200 วัตต์ และใช้เวลาในการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิประมาณ 2 นาที เวลาที่ใช้ในการสกัดอยู่ในช่วง 15 ถึง 60 นาที และเปลี่ยนอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส โดยตัวแปรที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 หลังจากนั้นนำสารที่ได้กรองผ่านกระดาดกรองแบบ syringe ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บสารที่กรองได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ: ในการทดลองแต่ละวิธีของการสกัดจะแบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกหาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้มากที่สุด และส่วนที่สองใช้ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินมากที่สุดมาใช้ เพื่อมาศึกษาหาเวลา และอุณหภูมิที่สามารถสกัดสารแอสตาแซนทินได้มากที่สุดต่อไป โดยในแต่ละส่วนทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอสตาแซนทิน

วิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินที่ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) คอลัมน์ที่ใช้คือ C18 ขนาด 4.6×150 mm ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เมทานอลผสมกับน้ำอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร ซึ่งมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่ได้ของแต่ละตัวทำละลายเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของสารแอสตาแซนทินมาตรฐานของแต่ละตัวทำละลาย ในการหาประสิทธิภาพในการสกัดจะนำมาเทียบกับปริมาณสารแอสตาแซนทินทั้งหมดที่อยู่ในสารหยาบซึ่งหาได้จากวิธีใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดโดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายสกัดจนสารกลายเป็นสีขาว กราฟรูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟจากเครื่อง HPLC กับปริมาณสารแอสตาแซนทิน โดยเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้คำนวณจากสมการที่ (4.2)

$$\% \text{recovery} = \frac{\text{astaxanthin from the extraction}}{\text{total astaxanthin in the alga}} \times 100 \quad (4.2)$$



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟจากเครื่อง HPLC กับปริมาณสารแอสตาแซนทีน

บทที่ 5

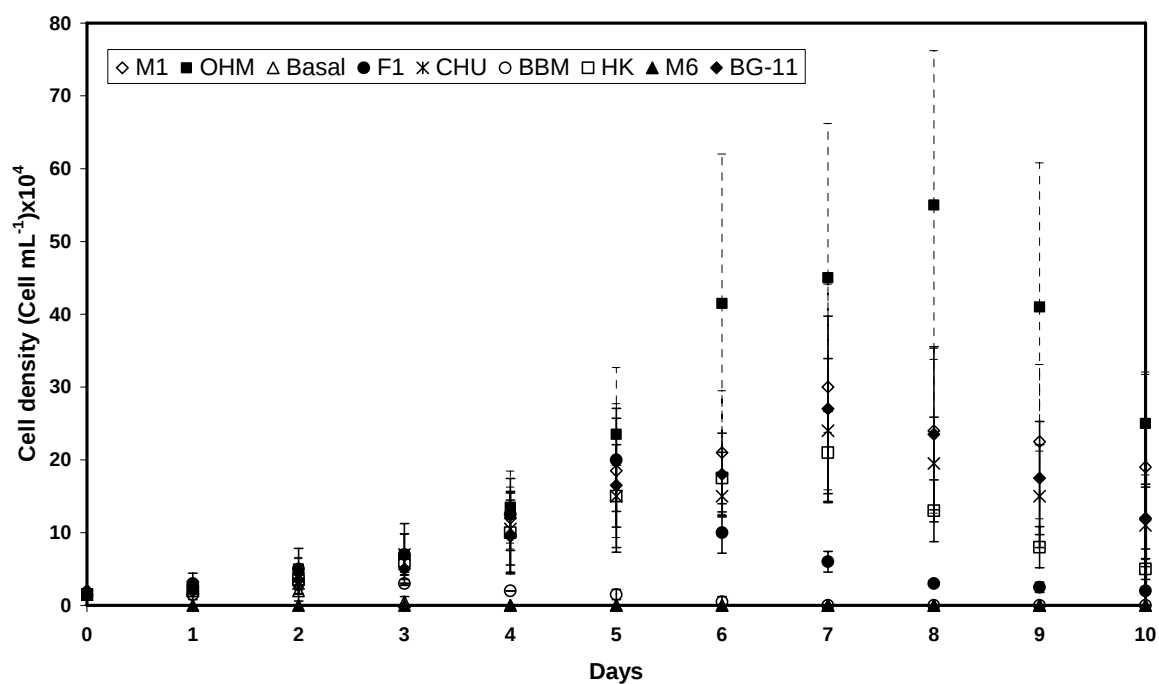
ผลการทดลอง

การผลิตแอสตาแซนทีนจากจุลสาหร่าย *H. pluvialis* เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของจุลสาหร่ายนี้ให้มีปริมาณมาก ๆ (หัวข้อ 5.1) ต่อด้วยการกระตุ้นสารสีแอสตาแซนทีน (หัวข้อ 5.2) และการสกัดสารแอสตาแซนทีนออกจากเซลล์ของจุลสาหร่ายนี้ (หัวข้อ 5.3) บทนี้จะได้กล่าวถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินงานในขั้นตอนเหล่านี้อย่างละเอียด

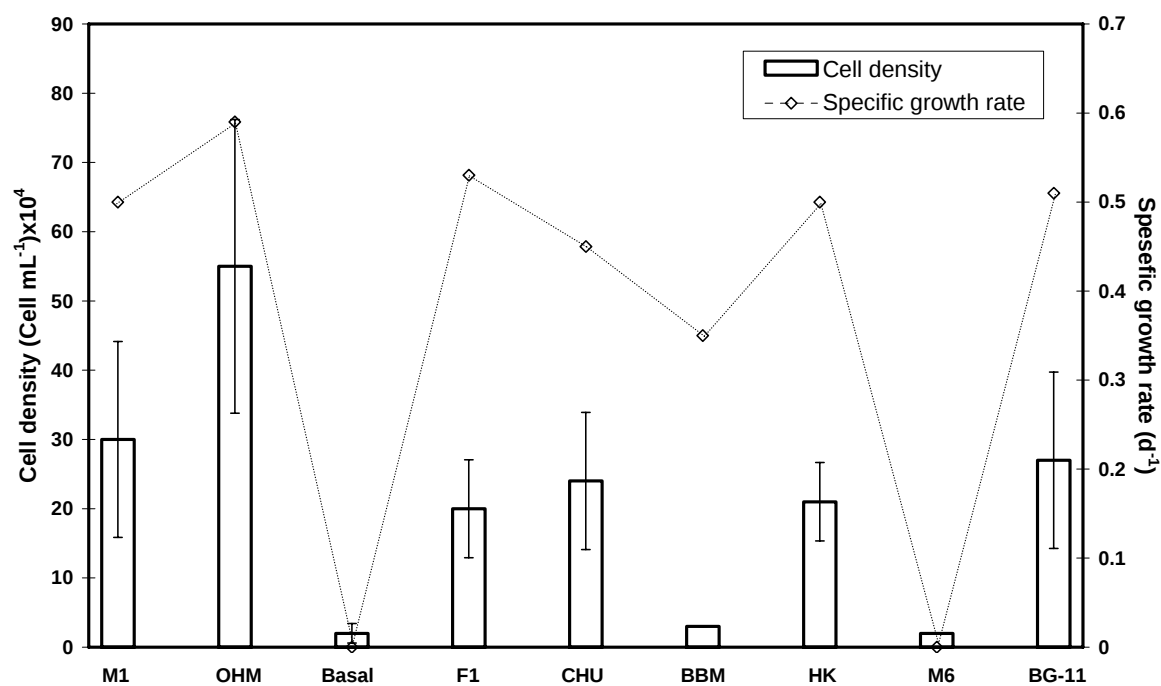
5.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะเวเจเททีฟ (Vegetative motile cell)

5.1.1 สารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

การทดลองในส่วนนี้จะทำการศึกษาเพื่อหาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตในระยะเซลล์สีเขียวหรือเวเจเททีฟ (Vegetative motile cell) โดยได้ทำการทดสอบสูตรสารอาหารทั้งสิ้น 9 สูตร ตามที่ได้มีการอ้างอิงไว้ในบทความวิชาการต่าง ๆ ดังนี้ M1 (Feng Chen medium; Chen F. et al., 1997), OHM (Optimal *Haematococcus* Medium; Fabregas J. et al., 2000), Basal medium (Hata N. et al., 2001), F1 (Kaewpintong K. et al., 2007), CHU (Modified Chu media; Fabregas J. et al., 1998 and 2000), BBM (Bold Basal Medium; Fabregas J. et al., 1998 and 2000), HK (Hong Kong medium; Zhang X. et al., 1999), M6 (Xiandi Gong medium; Gong X. and Chen F. 1998) และ BG-11 (Dominguez-Bocanegra A.R. et al., 2004) องค์ประกอบของสูตรอาหารแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 5.1 ในการทำการทดลองนี้ จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในขวดแก้วใส (Duran) ขนาด 2 ลิตร ดำเนินการแบบกะ (Batch mode) โดยให้อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราเร็วในการเป่าอากาศ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที (คิดเป็นอัตราการไหล = 38 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อวินาที) และความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ผลการทดลองการเจริญเติบโตแสดงดังกราฟรูปที่ 5.1 และความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะแสดงดังกราฟรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.1 การเจริญเติบโตของ *H. pluvialis* ในสูตรอาหารแต่ละชนิด



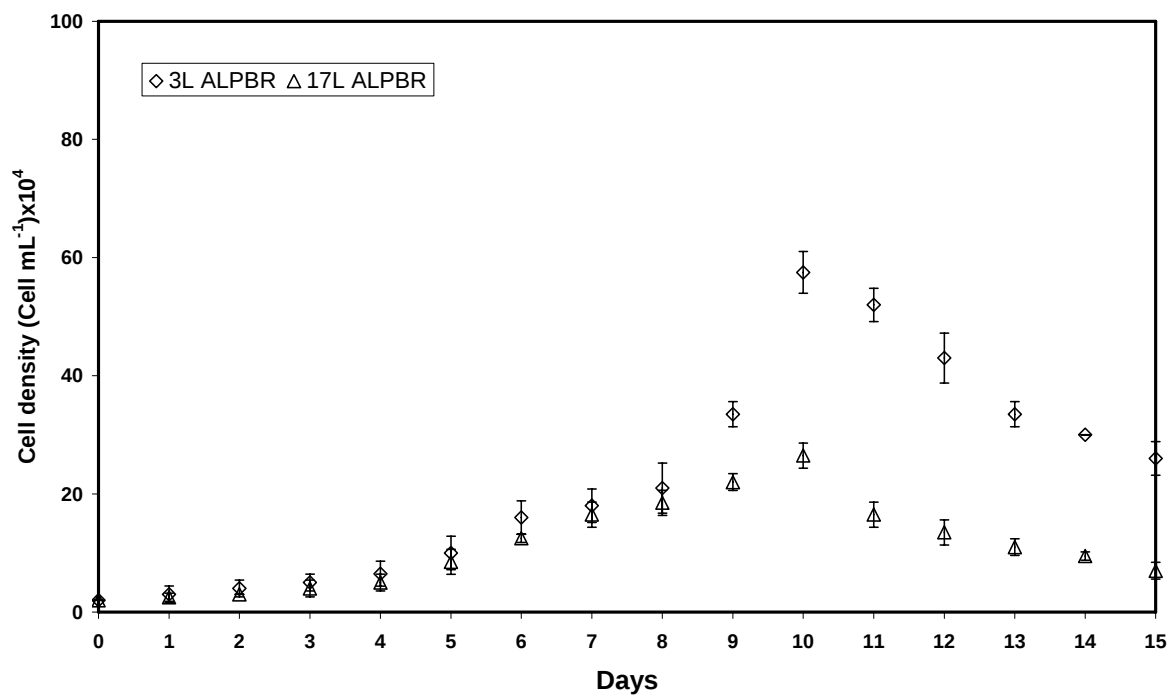
รูปที่ 5.2 ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในสูตรอาหารแต่ละชนิด

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารอาหารสูตร OHM เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* โดยการเพาะเลี้ยงในระบบขนาด 2 ลิตร ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 55×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.59 ต่อวัน รองลงมาคือสารอาหารสูตร M1 ที่ให้ผลการดำเนินการใกล้เคียงกับ OHM คือความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 30×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.50 ต่อวัน ส่วนสารอาหารอื่นๆ เรียงลำดับตามผลการเพาะเลี้ยงดังนี้ สารอาหารสูตร BG-11 (ความหนาแน่นของเซลล์ 27×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.51 ต่อวัน) สารอาหารสูตร CHU (ความหนาแน่นของเซลล์ 24×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.45 ต่อวัน) สารอาหารสูตร HK (ความหนาแน่นของเซลล์ 21×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.50 ต่อวัน) สารอาหารสูตร F1 (ความหนาแน่นของเซลล์ 20×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.53 ต่อวัน) ซึ่งในกลุ่มนี้สารอาหารสูตร F1 มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.53 ต่อวัน อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารสามสูตรที่เหลือนั้นพบว่าไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เนื่องจากได้ความหนาแน่นของเซลล์ต่ำมาก ดังนี้ สารอาหารสูตร BBM ได้ความหนาแน่นของเซลล์ 3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.35 ต่อวัน ส่วนสารอาหารสูตร Basal และสารอาหารสูตร M6 พบว่าเซลล์จุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้ไม่ดีและจะค่อย ๆ เริ่มตายในวันต่อมา จึงให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับศูนย์

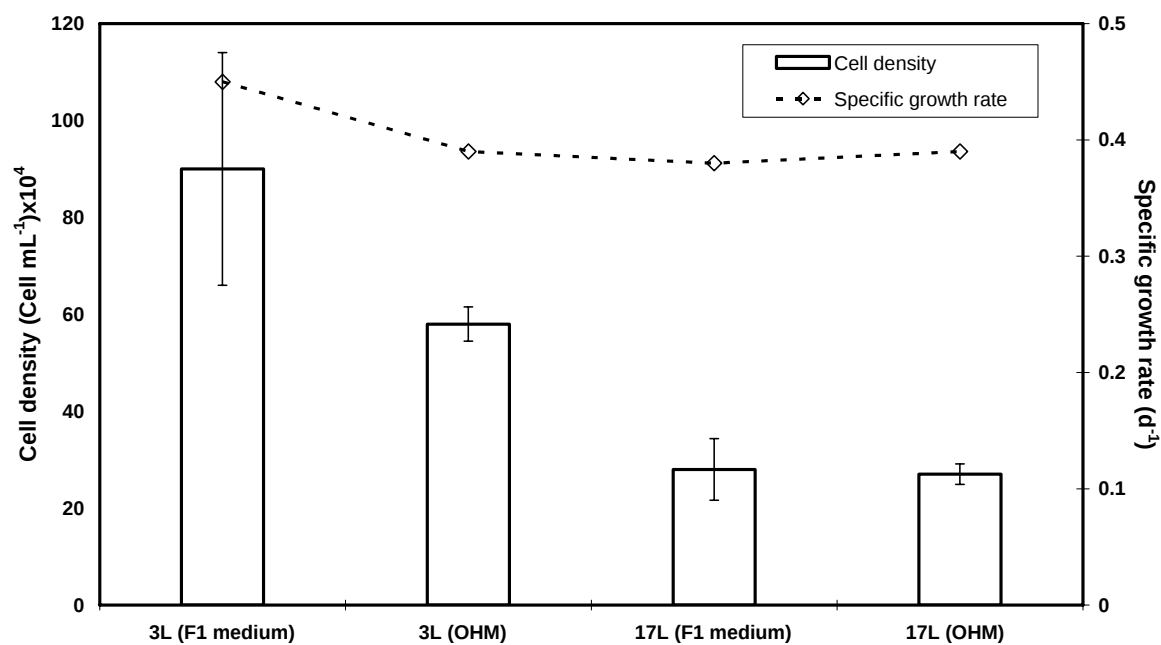
เมื่อพิจารณาถึงผลที่ได้ข้างต้น สารอาหารสูตร OHM จึงเป็นสารอาหารที่เหมาะสมและได้รับเลือกให้นำมาใช้ในการทดลองถัดไป (หัวข้อ 5.1.2) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (Cylindrical airlift photobioreactor) ขนาด 3 และ 17 ลิตร ต่อไป โดยจะนำผลการทดลองที่ได้นี้มาเปรียบเทียบกับผลการทดลองโดยสารอาหาร F1 ตามที่มีรายงานใน Keawpintong et al. (2007)

5.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (Cylindrical airlift photobioreactor)

การทดลองในหัวข้อนี้เป็นการนำผลของสารอาหารที่ได้จากการทดลองในหัวข้อข้างต้น นั่นคือการนำสารอาหารสูตร OHM มาทำการเพาะเลี้ยงในระบบที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยได้ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (Cylindrical airlift photobioreactor) ขนาด 3 ลิตร และ 17 ลิตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะการดำเนินการแบบกะโดยให้อากาศที่ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราเร็วในการเป่าอากาศ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที และความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ตามที่ Keawpintong et al. (2007) ได้เสนอไว้ ผลการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายแสดงดังกราฟรูปที่ 5.3 สำหรับผลการทดลองกราฟรูปที่ 5.4 เป็นการเปรียบเทียบผลของสารอาหารระหว่างสูตร OHM และ F1 ซึ่งแสดงถึงความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ



รูปที่ 5.3 การเจริญเติบโตของ *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง ขนาด 3 ลิตร และ 17 ลิตร (โดยใช้สารอาหารสูตร OHM)



รูปที่ 5.4 ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ของสารอาหารสูตร F1 และ OHM ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูงขนาด 3 ลิตร และ 17 ลิตร

ผลการทดลองจากกราฟรูปที่ 5.3 และ 5.4 แสดงให้เห็นถึงผลการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง โดยใช้สารอาหารสูตร OHM เปรียบเทียบกับการใช้สารอาหารสูตร F1 ซึ่งพบว่า ผลการดำเนินงานในระบบถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกโดยใช้สารอาหารสูตร OHM มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงต่ำกว่าการใช้สารอาหารสูตร F1 สรุปได้ดังนี้

วิธีการเพาะเลี้ยง	ขวดแก้วใส	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก			
ขนาดระบบ (ลิตร)	2	3		17	
ชนิดสารอาหาร	OHM	OHM	F1	OHM	F1
ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (เซลล์ต่อมิลลิเมตร)	55×10^4	55×10^4	90×10^4	25×10^7	28×10^4
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)	0.59	0.39	0.45	0.39	0.38

ผลการทดลองนี้แสดงผลอย่างมีนัยสำคัญว่า ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* น่าจะมีอิทธิพลและส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายมากกว่าผลของชนิดสารอาหาร ซึ่งผลการใช้สารอาหารทั้งสูตร OHM และสูตร F1 นั้นให้ผลการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบขนาดใหญ่ เช่น ระบบขนาด 17 ลิตร ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของสารอาหารสูตร F1 และ OHM ดังแสดงในตารางที่ 5.1 พบว่ามีส่วนประกอบของสารเคมีที่เหมือนกันและมีปริมาณใกล้เคียงกัน ยกเว้นองค์ประกอบของสารเคมีสองชนิดที่มีปริมาณแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดคือ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งสารอาหารสูตร OHM ใช้ในปริมาณที่มากกว่าสารอาหารสูตร F1 เกือบ 10 เท่า อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้รับแสดงให้เห็นว่าสารอาหาร OHM ไม่ได้ให้ผลการเจริญเติบโตของ *H. pluvialis* ที่ดีกว่าสารอาหารสูตร F1 อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้สารอาหารสูตร F1 จึงมีความเหมาะสมกว่าในแง่ของการคำนวณทางเศรษฐศาสตร์

สำหรับสารอาหารสูตร M1, CHU, HK และ BG-11 นั้น ไม่ได้รับเลือกเพื่อพิจารณา เนื่องจากเป็นสารอาหารที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำกว่าสารอาหารสูตร F1 นอกจากนี้ยังมีความซับซ้อนในขั้นตอนการเตรียมสูตรสารอาหารทั้ง 4 สูตรนี้ เนื่องจากจำเป็นต้องมีขั้นตอนทำการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเพื่อปรับค่าการละลายขององค์ประกอบต่าง ๆ ทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ง่าย

5.1.3 การเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (Flat panel airlift photobioreactor)

ผลการทดลองในหัวข้อ 5.1.2 แสดงให้เห็นว่าระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* นอกจากนี้รูปทรงของถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการ

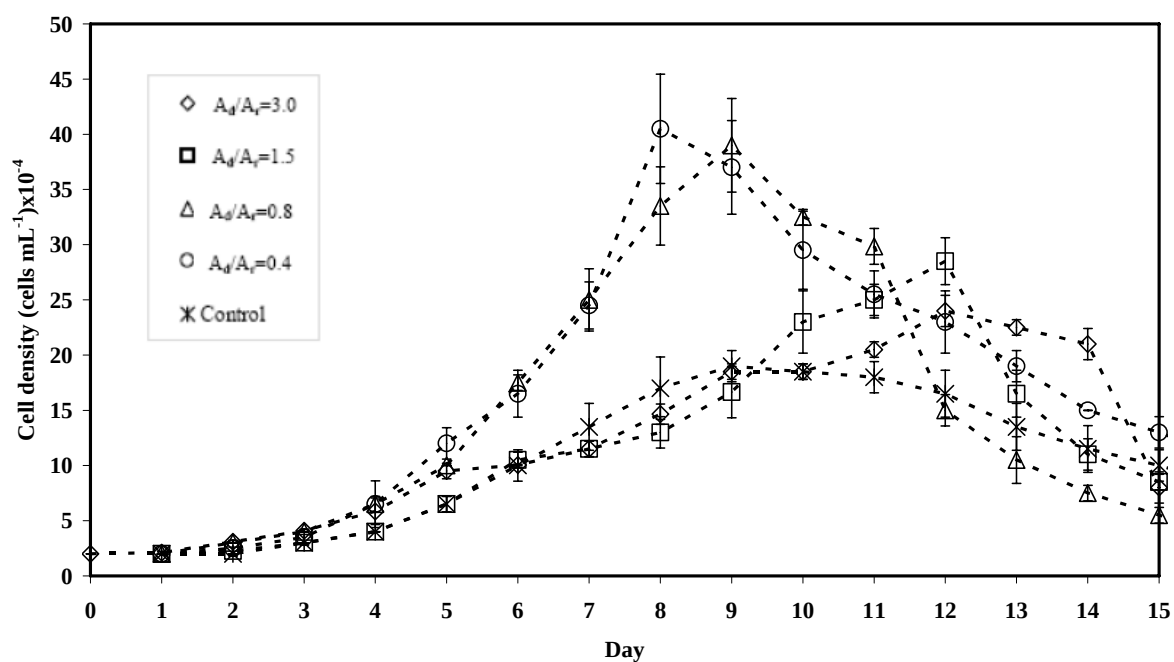
เพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เป็นอีกตัวแปรที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการออกแบบรูปทรงของถังปฏิกรณ์ขึ้นมาใหม่ โดยยังอาศัยพื้นฐานองค์ความรู้เดิมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงอากาศยก จากที่ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (Cylindrical airlift photobioreactor) ในการทดลองครั้งก่อน ที่มีปัญหาการขยายขนาดเนื่องจากแรงดันของระบบที่เพิ่มขึ้นตามความสูงของคอลัมน์ ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย ทำให้เซลล์จุลสาหร่ายเจริญเติบโตได้ไม่ดี เปลี่ยนมาเป็นรูปทรงแนวระนาบ (Flat panel airlift photobioreactor) เพื่อให้สามารถเพิ่มขนาดได้ง่าย (Scale up) เมื่อต้องการเพิ่มกำลังการผลิตให้ได้ปริมาณเซลล์มากขึ้น โดยการเพิ่มเฉพาะด้านความยาวของระบบ ซึ่งการขยายขนาดถังปฏิกรณ์รูปทรงนี้จะไม่ส่งผลต่อระดับแรงดันภายในระบบ โดยที่ขนาดของถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการทดลองคือ 17 ลิตร (ขนาดเท่ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (Cylindrical airlift photobioreactor) เพื่อสะดวกในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง) และขนาด 90 ลิตร (เพื่อทดสอบสมรรถนะการดำเนินงานของระบบขนาดใหญ่)

ในการทดลองจะใช้สารอาหารสูตร F1 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (Flat panel airlift photobioreactor) ขนาด 17 ลิตร และ 90 ลิตร ตามลำดับ โดยได้ทำการศึกษาผลของสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) ผลของอัตราเร็วการเป่าอากาศ (U_{sg}) และความเข้มแสง (I)

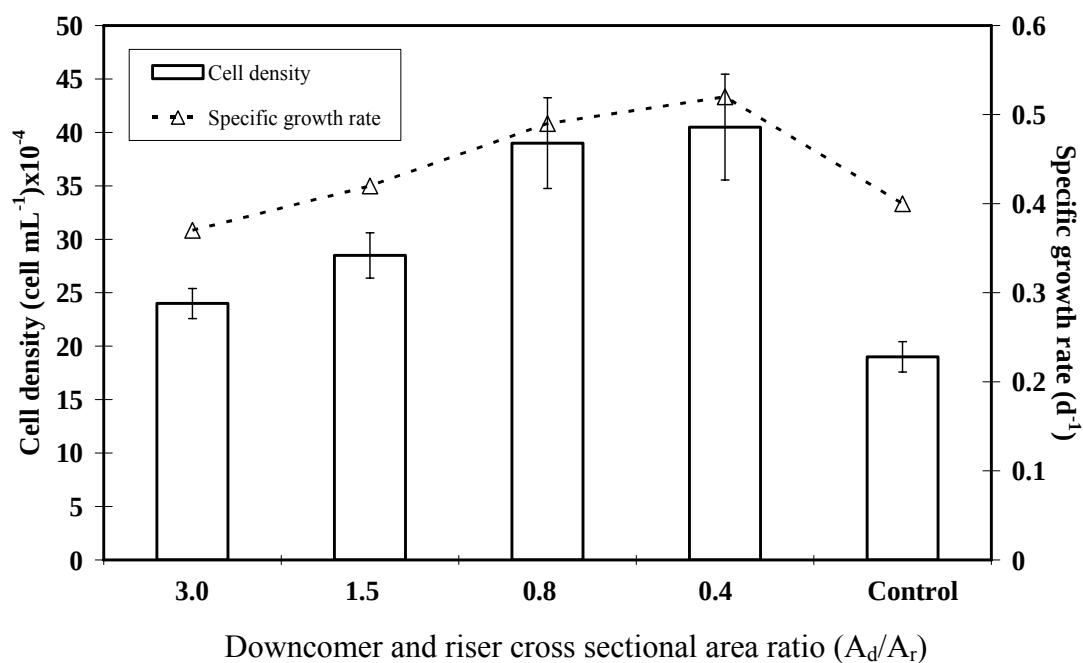
5.1.3.1 ผลของสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r)

การศึกษาผลของสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในระบบถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก โดยทำการศึกษาสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) ที่ 3.0, 1.5, 0.8 และ 0.4 ตามลำดับ และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ชนิด Bubble column (ไม่ได้ใส่แผ่นในแนวระนาบ) ซึ่งสภาวะในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สามารถสรุปได้ดังนี้ สารอาหารสูตร F1 ให้อากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้อากาศที่ความเร็ว 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที และความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 5.5 และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะแสดงดังผลกราฟรูปที่ 5.6

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) ที่ให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สูงสุด คือ 0.4 (ความหนาแน่นเซลล์ 41×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.52 ต่อวัน) รองมาคือที่สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) เท่ากับ 0.8, 1.5, และ 3.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบเป่าอากาศ (Bubble column) ดังแสดงในตารางที่ 5.2



รูปที่ 5.5 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ใน FP-ALPBR ที่มีสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) ต่างๆ (Control คือการเพาะเลี้ยงใน Bubble column)



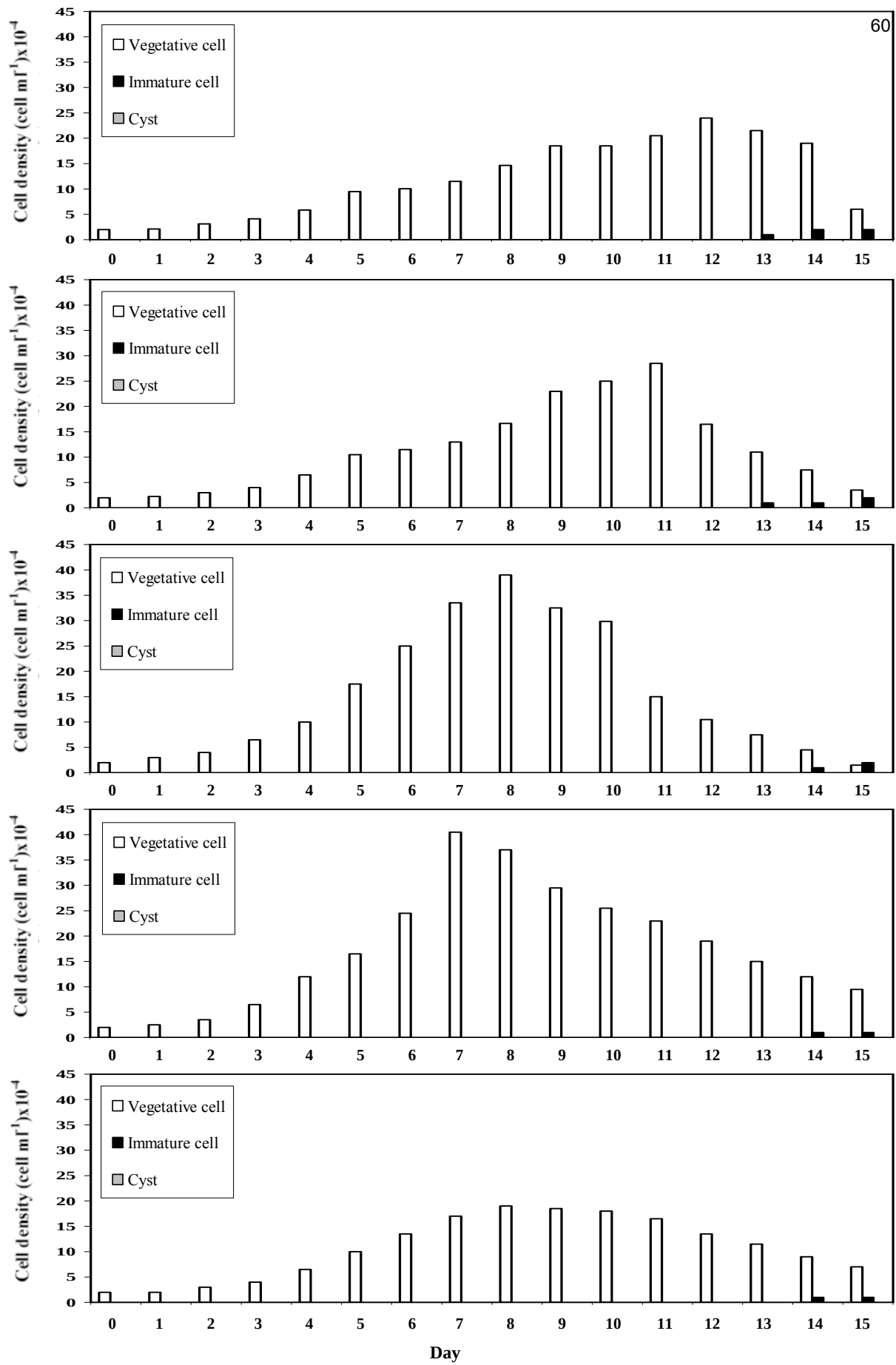
รูปที่ 5.6 ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ใน FP-ALPBR ที่มีสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) ต่างๆ

ตารางที่ 5.2 ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (Flat panel airlift photobioreactor)

สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
0.4	41×10^4	0.52
0.8	39×10^4	0.49
1.5	29×10^4	0.42
3.0	24×10^4	0.37
0.0*	19×10^4	0.40

* หมายเหตุ ถังปฏิกรณ์แบบเป่าอากาศ (Bubble column)

จากผลการทดลอง พบว่าที่สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) น้อย (เท่ากับ 0.4) หรือการมีพื้นที่ส่วนให้อากาศ (A_r) กว้างจะให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ดีที่สุด เนื่องจากในกรณีนี้ อัตราการไหลของของเหลวภายในระบบจะต่ำ ส่งผลให้มีแรงเฉือน (Shear stress) ต่ำ ซึ่งเป็นสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* มากนัก ยิ่งไปกว่านั้น ของเหลวในส่วนพื้นที่ไม่ได้ให้อากาศ (Downcomer) มีความเร็วค่อนข้างสูง ส่งผลดีต่อกลุ่มของเซลล์สาหร่ายที่รวมตัวกันที่ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ ทำให้เกิดการฟุ้งกระจายของตะกอน นอกจากนั้นยังส่งผลให้เกิดการไหลวนของเซลล์ภายในระบบในระดับที่น่าพอใจ (ไม่เกิดตะกอน หรือมีในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย) เซลล์จึงมีการไหลวนเพื่อไปรับแสงตามแนวความสูงของระบบได้ อย่างไรก็ตาม ยังพบการรวมตัวของเซลล์เกิดเป็นตะกอนที่ด้านล่างของถังปฏิกรณ์บ้าง เมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะที่สลับหนด (Immature cell) (ประมาณวันที่ 10) เนื่องจากเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นจึงมีโอกาที่จะตกมารวมกันที่ก้นของถังปฏิกรณ์ และจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันสุดท้ายที่ทำการเก็บเกี่ยว (15 วัน) ดังนั้นระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบที่มีสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) น้อย (เท่ากับ 0.4) จึงมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* มากที่สุด

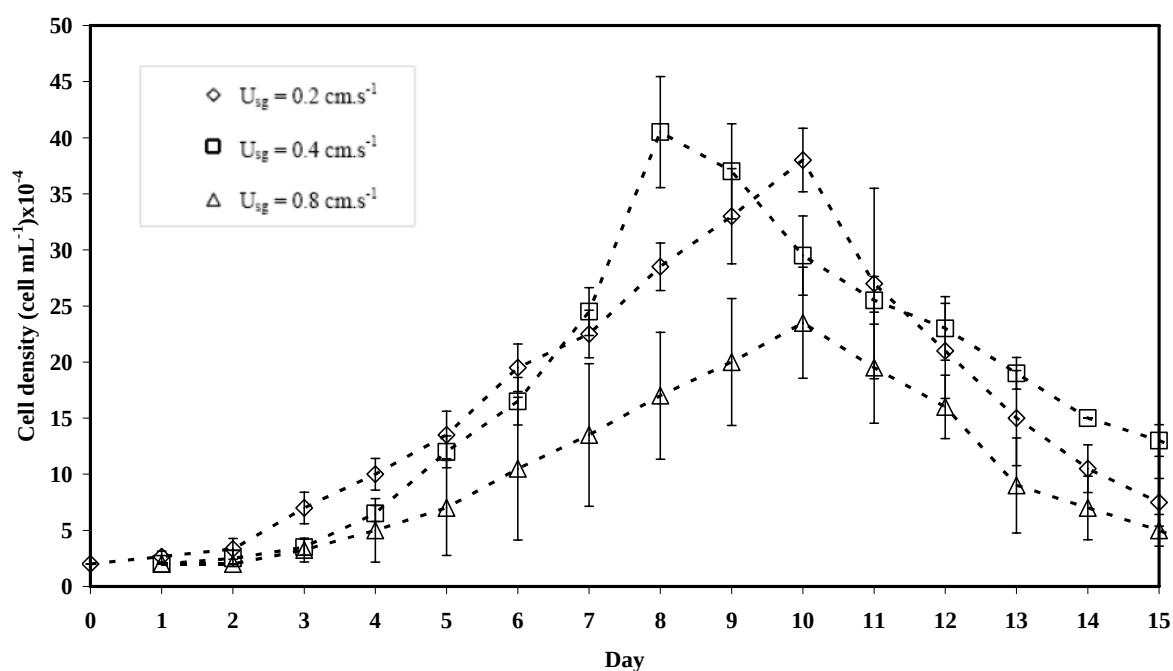


รูปที่ 5.7 ผลของ A_5/A_7 ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปทรงทางกายภาพของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

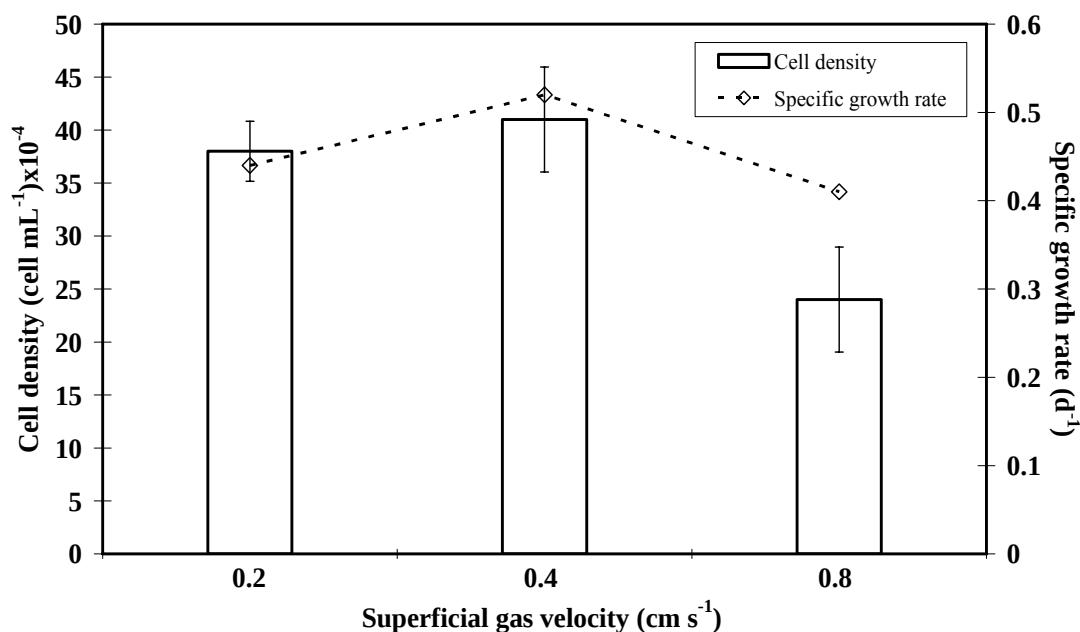
ผลการทดลองกราฟรูปที่ 5.7 เป็นการสำรวจผลของสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะทางกายภาพของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ซึ่งลักษณะของเซลล์ที่ทำการติดตามตรวจวัดคือ 1. เซลล์สีเขียวเคลื่อนที่ได้ มีแฟลเจลล่า (Vegetative motile cell) 2. เซลล์สีเขียวอยู่นิ่ง ไม่มีแฟลเจลล่า (Immature cell) และ 3. เซลล์เริ่มเปลี่ยนสีแดง (Cyst cell) จากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) ไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* และเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ vegetative cell และในช่วงวันท้าย ๆ ของการเก็บเกี่ยวจะพบเซลล์ในระยะ immature cell บ้าง อย่างไรก็ตาม ไม่พบเซลล์สีแดงเลยตลอดระยะเวลาการเก็บเกี่ยว 15 วัน

5.1.3.2 ผลของการให้อากาศ

เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในช่วงระยะ vegetative cell เป็นช่วงที่เซลล์มีสีเขียว และมีแฟลเจลล่า 1 คู่ สำหรับการเคลื่อนที่ ซึ่งถึงแม้ว่าเซลล์จุลสาหร่ายจะสามารถเคลื่อนที่ได้เอง แต่ก็ยังมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ไม่มากนักและอาจเกิดการตกตะกอนหากทิ้งไว้ในน้ำที่นิ่ง การให้อากาศจะส่งผลทำให้ระบบมีการไหลวนของของเหลวและมีการถ่ายเทก๊าซได้ดีมากขึ้น และช่วยเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* โดยในระบบที่สนใจนี้เราทำการศึกษาพฤติกรรมการเจริญเติบโตของเซลล์ที่อัตราเร็วของการให้อากาศที่ 0.2, 0.4 และ 0.8 เซนติเมตรต่อวินาที ตามลำดับ สมภาวะการเพาะเลี้ยงคือ สารอาหารสูตร F1 สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) เท่ากับ 0.4 (จากการทดลองที่ 5.1.3.1) ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1% โดยปริมาตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.8 และรูปที่ 5.9



รูปที่ 5.8 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญเติบโตของ *H. pluvialis*



รูปที่ 5.9 ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ *H. pluvialis* ที่ความเร็วการให้อากาศต่างๆ กัน

จากผลการทดลองพบว่า อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* คือที่ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 41×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.52 ต่อวัน) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaewpintong et al. (2007) และ Issarapayup et al. (2009) รองลงมาคืออัตราการให้อากาศที่ 0.2 เซนติเมตรต่อวินาที ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ลดต่ำลง อาจจะเป็นผลมาจากระบบมีการหมุนเวียนของของเหลวและการแลกเปลี่ยนก๊าซไม่ดีพอ แต่ในขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศให้สูงถึง 0.8 เซนติเมตรต่อวินาที การเจริญเติบโตของ *H. pluvialis* กลับมีค่าลดลงเช่นกัน เนื่องจากเป็นอัตราการให้อากาศที่สูงมากเกินไป จึงเกิดแรงเฉือน ส่งผลในการทำลายเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความบอบบาง

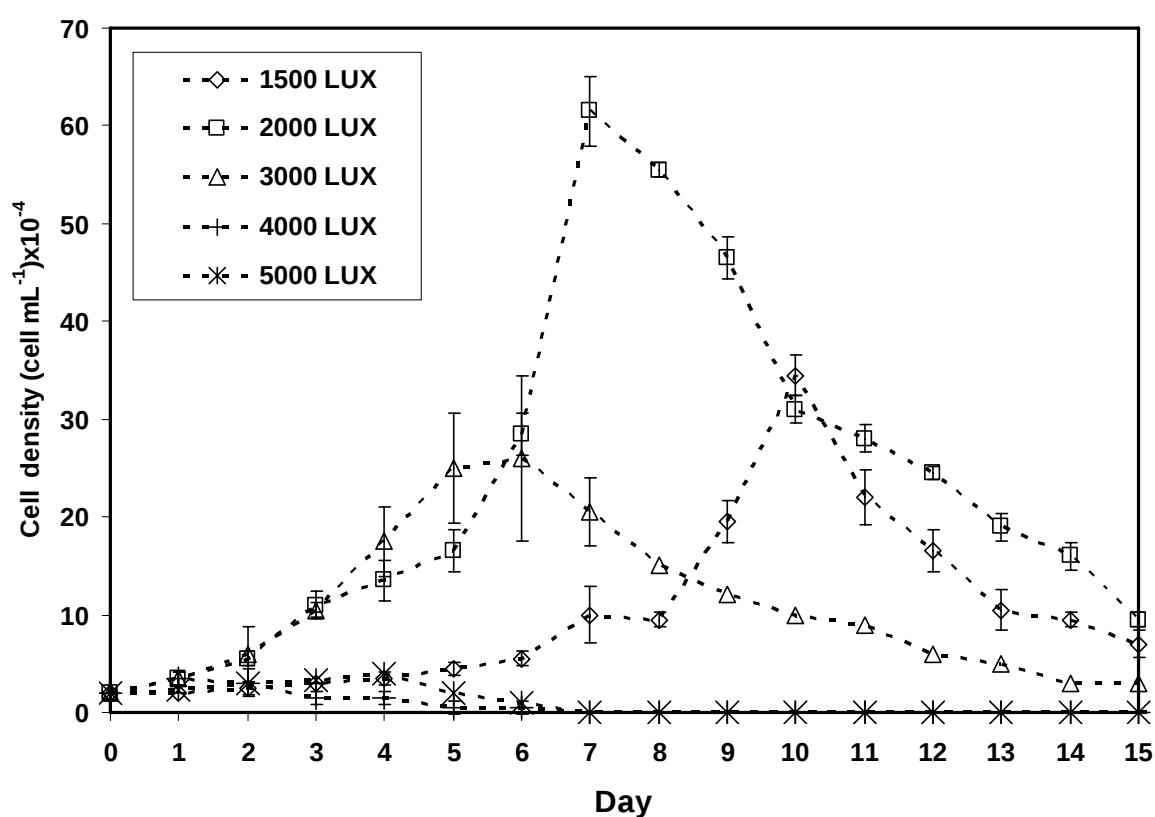
ตารางที่ 5.3 ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ในการศึกษาผลของอัตราการให้อากาศ

อัตราการให้อากาศ (เซนติเมตรต่อวินาที)	ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
0.2	38×10^4	0.44
0.4	41×10^4	0.52
0.8	24×10^4	0.41

5.1.3.3 ผลของความเข้มแสง (Light intensity)

แสงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มแสงต่างๆ กัน เริ่มตั้งแต่ 1500 จนถึง 4000 ลักซ์ สภาวะการเพาะเลี้ยงคือ สารอาหารสูตร F1 สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) เท่ากับ 0.4 (จากการทดลองที่ 5.1.3.1) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที (จากการทดลองที่ 5.1.3.2) และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1% โดยปริมาตร ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 5.10

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ความเข้มแสงที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายมากที่สุด คือ ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 64×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.60 ต่อวัน ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaewpintong et al. (2007) และ Issarapayup et al. (2009) รองลงมาคือที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 36×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.45 ต่อวัน) และ 3,000 ลักซ์ (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 25×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.51 ต่อวัน) ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มแสง 4,000 และ 5,000 ลักซ์ เป็นความเข้มแสงที่มากเกินไป ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*



รูปที่ 5.10 ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

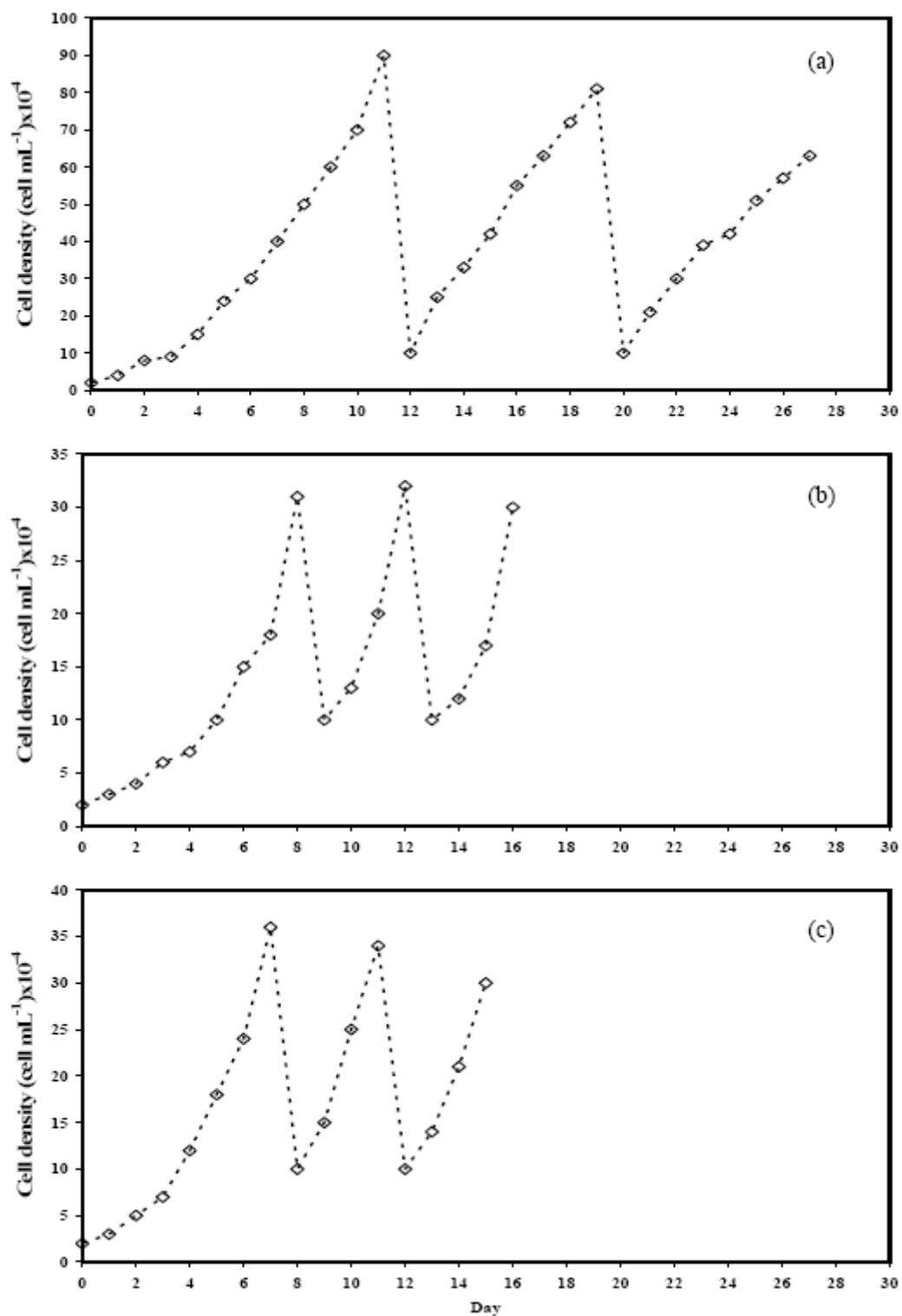
5.1.4 การผลิตแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous cultivation)

การทำการทดลองเพื่อศึกษาการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการทดสอบศักยภาพในการผลิตในระบบการผลิตขนาดใหญ่ และยังเป็นงานดำเนินการผลิตที่มีความประหยัด ทั้งในแง่ปริมาณการใช้สารอาหารและระยะเวลาในการผลิต โดยจะทำการทดลองในถังปฏิกรณ์อากาศยก 3 ชนิด ดังนี้ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (C-ALPBR) ขนาด 3 ลิตร และ 17 ลิตร และถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกชนิดแนวระนาบ ขนาด 17 ลิตร (FP-ALPBR) ตามลำดับ ผลการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ใน 3L C-ALPBR แสดงดังกราฟรูปที่ 5.11 (a) และ 17L C-ALPBR แสดงดังกราฟรูปที่ 5.11(b) โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงคือ สารอาหารสูตร F1 สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_0/A_r) เท่ากับ 3.0 อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครโมลฟอสเฟตต่อตารางเมตรต่อวินาที (ประมาณ 2,000 ลักซ์) และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1% โดยปริมาตร ส่วนกราฟรูปที่ 5.11 (c) แสดงการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ใน 17L FP-ALPBR ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงดังนี้คือ สารอาหารสูตร F1 สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_0/A_r) เท่ากับ 0.4 (จากการทดลองที่ 5.1.3.1) อัตราการเป่าอากาศเท่ากับ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที (จากการทดลองที่ 5.1.3.2) ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครโมลฟอสเฟตต่อตารางเมตรต่อวินาที (ประมาณ 2,000 ลักซ์) (จากการทดลองที่ 5.1.3.3) และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1% โดยปริมาตร

ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* มีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (logarithmic phase) จนถึงช่วงปลายระยะการเจริญเติบโต (early stationary phase) ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 90×10^4 , 32×10^4 และ 35×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 3L ALPBR, 17L ALPBR และ 17L FP-ALPBR ตามลำดับ โดยระบบ 3L ALPBR ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 9-11 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ 17L ALPBR และ 17L FP-ALPBR ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดในช่วงวันที่ 6-8 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อถึงระยะที่ได้จำนวนเซลล์สูงสุดแล้ว จึงทำการเก็บเกี่ยวหรือ subculture เซลล์ โดยในแต่ละครั้งของการเก็บเกี่ยวจะต้องคำนวณให้ในกะถัดไปมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากันทุกครั้งที่ 10×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5.4 ค่าความหนาแน่นของเซลล์เฉลี่ยและค่าอัตราการผลิตเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่อง

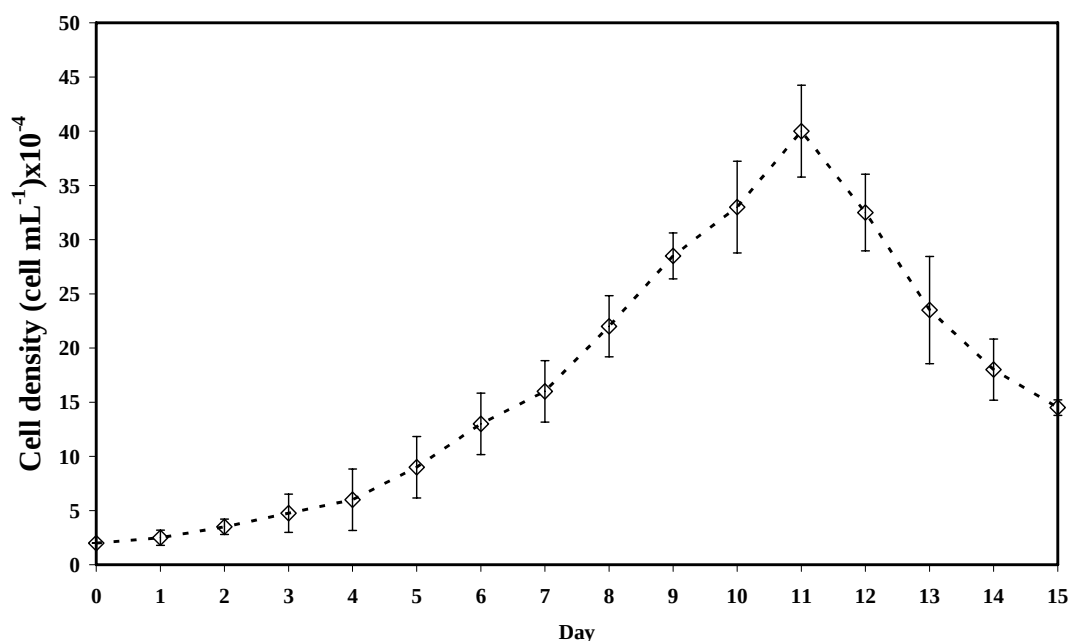
ชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบอากาศยก	ความหนาแน่นเซลล์เฉลี่ยทั้ง 3 รอบ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการผลิตเซลล์ (เซลล์ต่อลิตรต่อวัน)
ทรงกระบอกแนวสูง ขนาด 3 ลิตร	70×10^4	9×10^7
ทรงกระบอกแนวสูง ขนาด 17 ลิตร	30×10^4	7×10^7
ทรงแนวระนาบ ขนาด 17 ลิตร	32×10^4	7.7×10^7



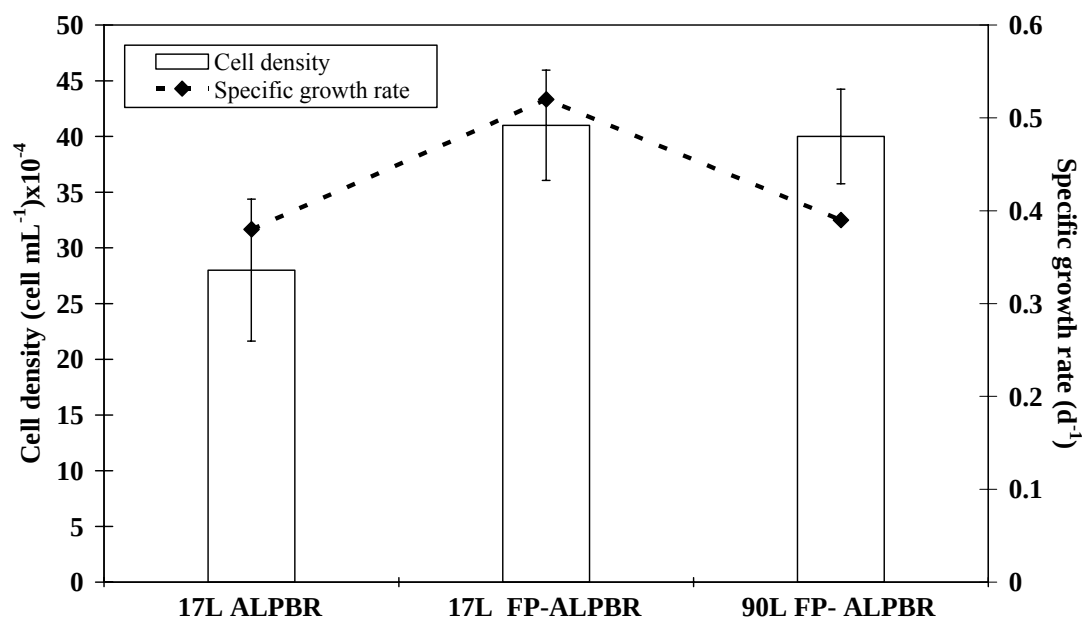
รูปที่ 5.11 การผลิตแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก 3 รูปแบบ คือ (a) 3L C-ALPBR; (b) 17L C-ALPBR และ (c) ใน 17L FP-ALPBR

5.1.4 ประสิทธิภาพของระบบการเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบขนาด 90 ลิตร (Flat panel airlift photobioreactor)

การทดลองในหัวข้อนี้จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผลิตรวมถึงประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปขยายกำลังผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ในส่วนของถังปฏิกรณ์ที่เลือกใช้จะเป็นถังปฏิกรณ์แนวระนาบ เนื่องจากจุดเด่นที่สะดวกต่อการขยายขนาดโดยเพิ่มเฉพาะความยาวของถัง โดยเพิ่มขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพอากาศยกชนิดแนวระนาบ (FP-ALPBR) เป็น 90 ลิตร สภาวะการเพาะเลี้ยงคือ สารอาหารสูตร F1 สัดส่วนพื้นที่ไม่ให้อากาศต่อพื้นที่ให้อากาศ (A_d/A_r) เท่ากับ 0.4 (จากการทดลองที่ 5.1.3.1) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที (จากการทดลองที่ 5.1.3.2) ความเข้มแสงเท่ากับ 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (ประมาณ 2,000 ลักซ์) (จากการทดลองที่ 5.1.3.3) และความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1% โดยปริมาตร ผลการทดลองในกราฟรูปที่ 5.12 แสดงความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบ 90 ลิตรนี้ และรูปที่ 5.13 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ต่าง ๆ กัน



รูปที่ 5.12 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ใน FP-ALPBR ขนาด 90 ลิตร



รูปที่ 5.13 ความหนาแน่นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ต่าง ๆ กัน

จากผลการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (FP-ALPBR) ขนาด 90 ลิตร ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 38×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.45 ต่อวัน ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5.12 และเมื่อนำดัชนีการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* มาเปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงขนาดเล็กกว่า นั้นคือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (FP-ALPBR) ขนาด 17 ลิตร (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 40×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.52 ต่อวัน) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (C-ALPBR) ขนาด 17 ลิตร (ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด 28×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.35 ต่อวัน) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5.13 ผลการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (FP-ALPBR) มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* สูงกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง (C-ALPBR) อย่างไรก็ตาม ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบ (FP-ALPBR) ขนาด 90 ลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะช้ากว่าถังปฏิกรณ์รูปทรงเดียวกัน ขนาด 17 ลิตร เล็กน้อย อาจเนื่องมาจากปัญหาการถ่ายเทมวล (mass transfer) ที่มักพบในระบบการผลิตขนาดใหญ่

5.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ในระยะเซลล์สีแดงหรือระยะซิส (Cyst cell)

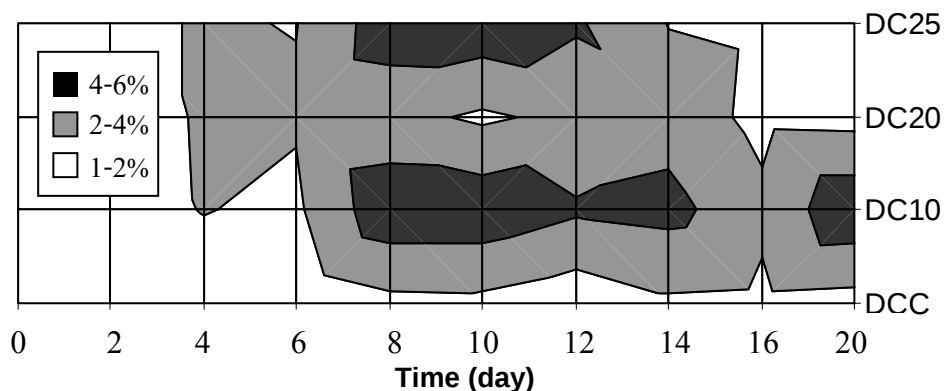
เมื่อนำ *H. pluvialis* ในระยะเซลล์สีเขียวความหนาแน่นสูงที่เพาะเลี้ยงได้ในหัวข้อ 5.1 มาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Stress conditions) เช่น ปริมาณความเข้มแสงสูง ความเข้มข้นของสารอาหารต่ำ เป็นต้น จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการผลิตสารสีแดงแซนทิน การทดลองในหัวข้อนี้ได้เสนอสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการผลิตสารสีแดงแซนทินทั้งในสภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการและสภาวะทางธรรมชาติ เช่น ความเข้มข้นของสารอาหาร ปริมาณเซลล์เริ่มต้น และความเข้มแสง (เฉพาะในห้องปฏิบัติการ)

5.2.1 ผลการดำเนินงานผลิตสารสีแดงแซนทินในถังปฏิกรณ์ชนิดเป่าอากาศ

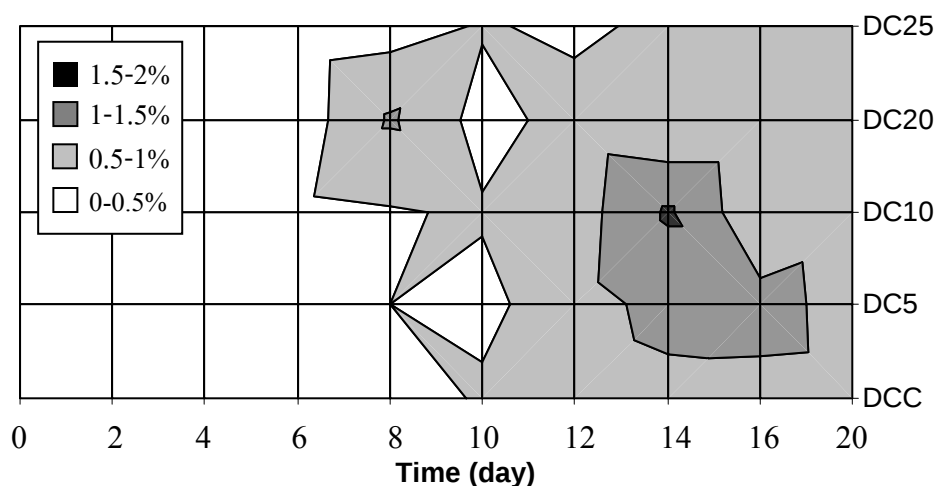
การดำเนินงานในส่วนนี้ได้ศึกษาผลของการเจือจางความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นและการเจือจางความเข้มข้นของสารอาหารต่อการสังเคราะห์สารสีแดงแซนทินของเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ทั้งภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการและสภาวะทางธรรมชาติ ซึ่งจะนำเซลล์ *H. pluvialis* ที่ได้จากการทดลองในส่วน 5.1 มาใช้เพื่อทดสอบการสร้างสารสีแดงแซนทิน โดยเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนี้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางสารอาหาร และ/หรือ ความเข้มข้นของเซลล์ลงด้วยน้ำเปล่า ผลการทดลองสรุปปริมาณการสร้างสารสีแดงแซนทินภายใต้สภาวะการกระตุ้นที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์แตกต่างกัน และภายใต้สภาวะการกระตุ้นที่สภาพการเจือจางสารอาหารแตกต่างกัน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเป่าอากาศ สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ แสดงดังตารางที่ 5.5 และ 5.6 ตามลำดับ

ผลของการเจือจางเซลล์เริ่มต้น สภาวะที่ให้ปริมาณสารสีแดงแซนทินสูงที่สุดภายใต้การดำเนินการในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 8 วัน ที่สภาวะควบคุมดังนี้คือ การเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า (ประมาณหนึ่งหมื่นเซลล์ต่อลิตร) และความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์ (หลอดฟลูออเรสเซนต์ 6 หลอด) ซึ่งให้สารสีแดงแซนทิน 5.39% ต่อน้ำหนักแห้งต่อเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 5.5 และ รูปที่ 5.14 สำหรับสภาวะที่ให้ปริมาณสารสีแดงแซนทินสูงที่สุดภายใต้สภาวะทางธรรมชาติ (อุณหภูมิเฉลี่ยในตอนกลางวันประมาณ 30-34 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสง 100-120 กิโลลักซ์) คือ ตัวอย่างที่ทำการเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า โดยได้ปริมาณสารสีแดงแซนทิน 1.56% ต่อน้ำหนักแห้ง หรือ 0.26 มิลลิกรัม/10⁶ เซลล์ หลังจาก 14 วันของการกระตุ้น ดังแสดงในรูปที่ 5.15 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจือจางเซลล์เริ่มต้นก่อนข้างมีความสำคัญ โดยเซลล์ที่ถูกเจือจางจะให้ผลที่ดีในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูงซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มีการสร้างสารสีแดงแซนทินมากขึ้น เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* จะสร้างสารสีแดงแซนทินภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือสภาวะความเข้มแสงสูง ขาดแคลนสารอาหาร ความเค็มสูง และ/หรืออุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น โดยภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมเหล่านี้ จะเกิดสารประกอบที่เรียกว่า reactive oxygen species (ROS)

ซึ่งถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ สารนี้จะกระตุ้นยีนส์ที่ควบคุมเซลล์ให้มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ นอกจากนี้ Boussiba (2000) ได้แสดงให้เห็นว่า ROS และ O_2 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างสารแอสตาแซนทินด้วย อย่างไรก็ตาม ความเข้มแสงที่สูงมากจนเกินไปสามารถทำให้เซลล์ตายได้เช่นกัน



รูปที่ 5.14 ผลของความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นภายใต้สภาวะการควบคุมภายในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์ ต่อปริมาณการสร้างสารแอสตาแซนทิน (%): DCC ควบคุม; DC10 เจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า (1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร); DC20 เจือจางเซลล์เริ่มต้น 20 เท่า (5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร); DC25 เจือจางเซลล์เริ่มต้น 25 เท่า (4×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 5.15 ผลของความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นภายใต้สภาวะทางธรรมชาติ ต่อปริมาณการสร้างสารแอสตาแซนทิน (%): DCC ควบคุม; DC10 เจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า (1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร); DC20 เจือจางเซลล์เริ่มต้น 20 เท่า (5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร); DC25 เจือจางเซลล์เริ่มต้น 25 เท่า (4×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 5.5 การสะสมแอสตาแซนทีนใน *H.pluvialis* ภายใต้สภาวะกระตุ้นที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์แตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเป่าอากาศ

Units	650 lux				2.73 klux				4.83 klux				6.5 klux			
	(ambient condition)				(2 fluorescent lamps)				(4 fluorescent lamps)				(6 fluorescent lamps)			
	DCC	DC10	DC20	DC25	DCC	DC10	DC20	DC25	DCC	DC10	DC20	DC25	DCC	DC10	DC20	DC25
Average cell concentration ($\times 10^4$ cells/ml)	9.31	2.48	2.08	1.49	9.07	0.52	0.83	1.182	8.73	0.99	0.38	0.36	8.46	1.12	0.77	0.52
Maximum astaxanthin concentration (mg/l)	9.85	44.5	53.3	66.4	17.9	56.8	95.7	104.4	16.19	64	62.5	88.2	21.2	92	77.4	103
Maximum astaxanthin productivity (mg/l day)	2.66	0.38	0.23	0.19	2.57	0.58	0.42	0.47	2.82	0.77	0.74	0.33	3.82	1.15	0.76	0.62
Maximum astaxanthin content (mg/ 10^6 cells)	0.11	0.21	0.22	0.28	0.2	1.17	0.64	0.46	0.19	0.65	0.73	1.05	0.28	0.91	0.53	0.87
Maximum % astaxanthin (% g astaxanthin/g cell)	0.7	1.26	1.32	1.69	1.2	5.3	3.9	2.79	1.13	3.95	3.65	6.46	1.71	5.39	3.24	5.3
Maximum % astaxanthin accumulation rate (% g astaxanthin/day g cell)	0.05	0.09	0.11	0.12	0.09	0.44	0.28	0.279	0.063	0.49	0.46	0.65	0.12	0.67	0.23	0.53

หมายเหตุ DCC การเพาะเลี้ยงที่สภาวะควบคุม ไม่มีการเจือจางเซลล์ ได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
 DC10 การเพาะเลี้ยงที่มีการเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า ได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
 DC20 การเพาะเลี้ยงที่มีการเจือจางเซลล์เริ่มต้น 20 เท่า ได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
 DC25 การเพาะเลี้ยงที่มีการเจือจางเซลล์เริ่มต้น 25 เท่า ได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 4×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

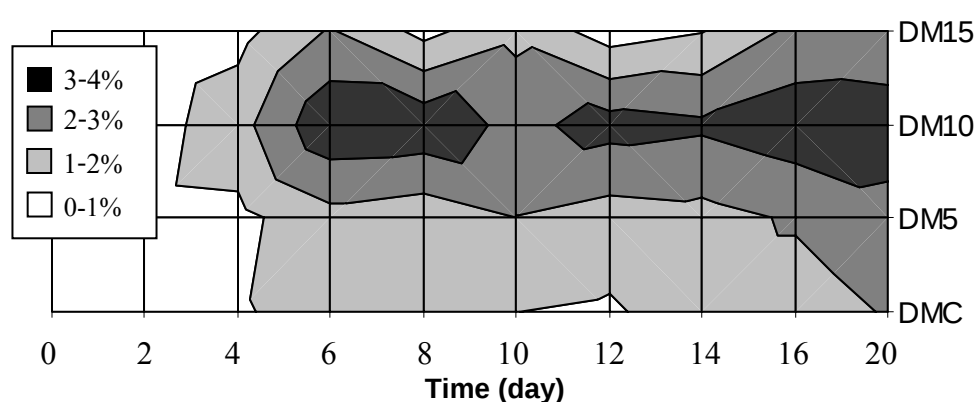
ตารางที่ 5.6 การสะสมแอสตาแซนทีนใน *H.pluvialis* ภายใต้สภาวะกระตุ้นที่สภาพการเจือจางสารอาหารแตกต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเป่าอากาศ

Units	650 lux (ambient condition)				2.73 klux (2 fluorescent lamps)				4.83 klux (4 fluorescent amps)				6.5 klux (6 fluorescent lamps)			
	DMC	DM5	DM10	DM15	DMC	DM5	DM10	DM15	DMC	DM5	DM10	DM15	DMC	DM5	DM10	DM15
Average cell concentration ($\times 10^4$ cells/ml)	2.29	0.73	0.26	0.10	4.10	0.96	1.06	0.31	1.67	0.93	1.13	1.24	1.31	1.03	0.24	0.20
Maximum astaxanthin concentrations (mg/l)	2.77	1.80	0.71	0.24	4.36	2.15	2.75	0.64	2.36	6.18	5.80	5.69	3.88	4.70	1.50	0.92
Maximum astaxanthin productivity (mg/l day)	0.33	0.12	0.06	0.04	0.72	0.21	0.23	0.25	0.33	0.34	0.58	0.57	0.46	0.61	0.25	0.14
Maximum astaxanthin content (mg/ 10^6 cells)	0.10	0.22	0.15	0.25	0.14	0.29	0.36	0.16	0.28	0.44	0.51	0.61	0.34	0.44	0.62	0.38
Maximum % astaxanthin (% g astaxanthin/g cell)	0.63	1.37	0.89	1.49	0.86	1.76	2.21	0.96	0.85	1.33	2.58	2.08	2.08	2.70	3.81	2.34
Maximum % astaxanthin accumulation rate (% g astaxanthin/day g cell)	0.04	0.08	0.07	0.09	0.05	0.10	0.18	0.05	0.09	0.07	0.16	0.26	0.12	0.15	0.64	0.13

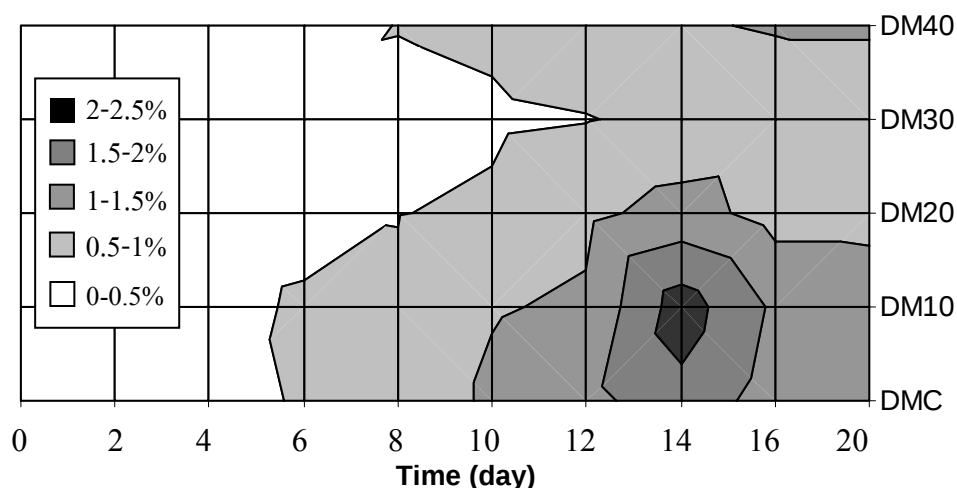
หมายเหตุ	DMC	คือสภาพสารอาหารหลังจากการเพาะเลี้ยง
	DM 5	คือสภาพสารอาหารหลังการเพาะเลี้ยง และเจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า (โดยปริมาตร)
	DM10	คือสภาพสารอาหารหลังการเพาะเลี้ยง และเจือจางด้วยน้ำ 10 เท่า (โดยปริมาตร)
	DM15	คือสภาพสารอาหารหลังการเพาะเลี้ยง และเจือจางด้วยน้ำ 15 เท่า (โดยปริมาตร)

สำหรับผลของการเจือจางสารอาหาร สภาวะที่ให้ปริมาณสารแอสตาแซนทินสูงที่สุดภายใต้การควบคุมในห้องปฏิบัติการคือ การเจือจางสารอาหาร 10 เท่าและใช้ความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์ ซึ่งให้ปริมาณสารแอสตาแซนทิน 3.81% ของน้ำหนักแห้งในวันที่ 6 ของการกระตุ้น ดังแสดงในตารางที่ 5.6 และ รูปที่ 5.16 สำหรับสภาวะที่ให้ปริมาณสารแอสตาแซนทินสูงที่สุดภายใต้สภาวะทางธรรมชาติ (อุณหภูมิเฉลี่ยในตอนกลางวันประมาณ 33-35 องศาเซลเซียส และมีความเข้มแสง 110-150 กิโลลักซ์) คือ ที่การเจือจางสารอาหาร 10 เท่า ได้ปริมาณสารแอสตาแซนทิน 0.36 มิลลิกรัม/10⁶ เซลล์ หรือ 2.24% ต่อน้ำหนักแห้ง โดยใช้เวลาการกระตุ้น 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 5.17

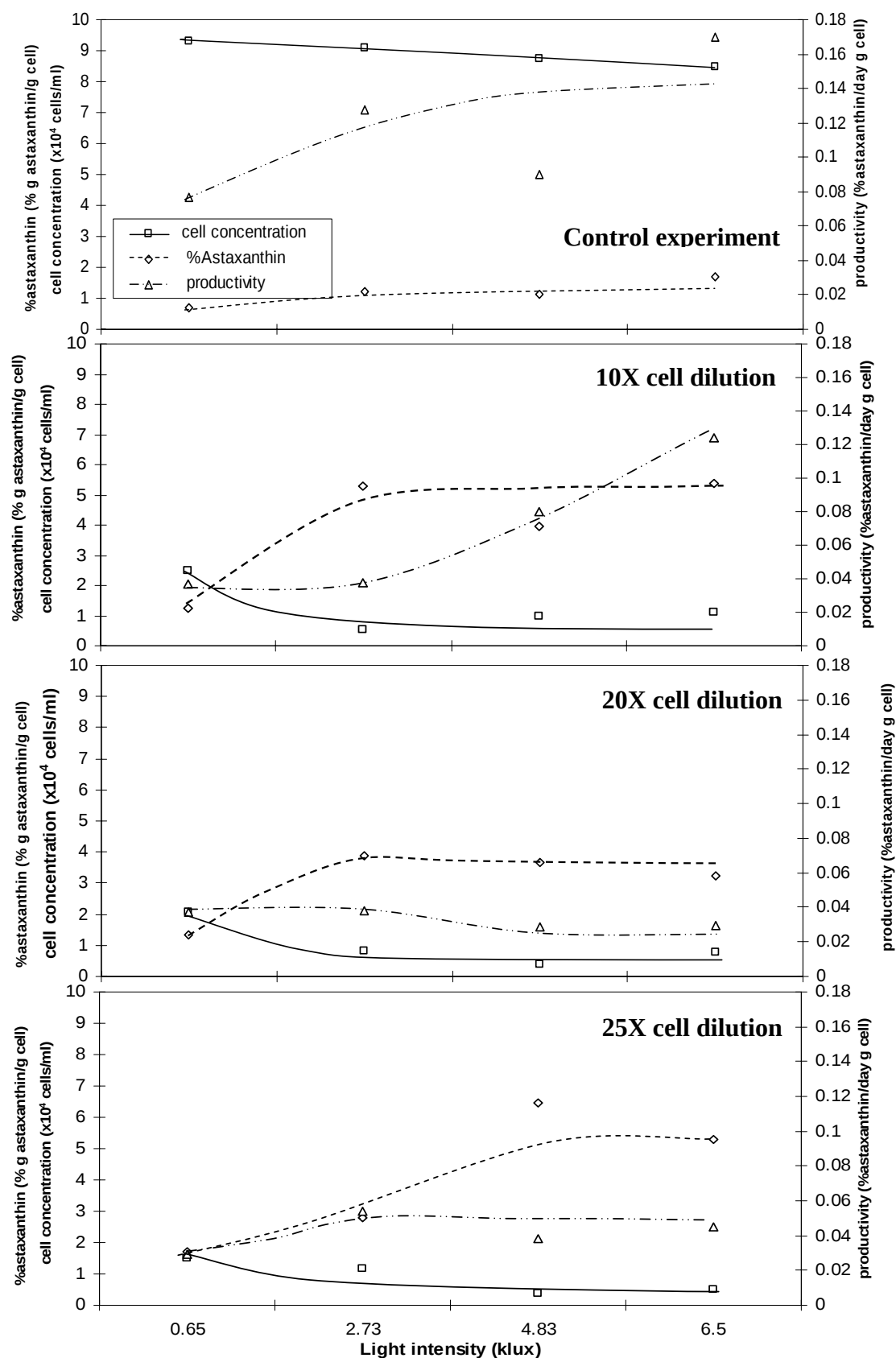
สำหรับอัตราการผลิตสารแอสตาแซนทิน (productivity) ในสภาวะที่มีการเจือจางเซลล์เริ่มต้นและสารอาหารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในปริมาณแสงที่แตกต่างกัน สามารถสรุปได้กราฟรูปที่ 5.18 และ 5.19 ตามลำดับ



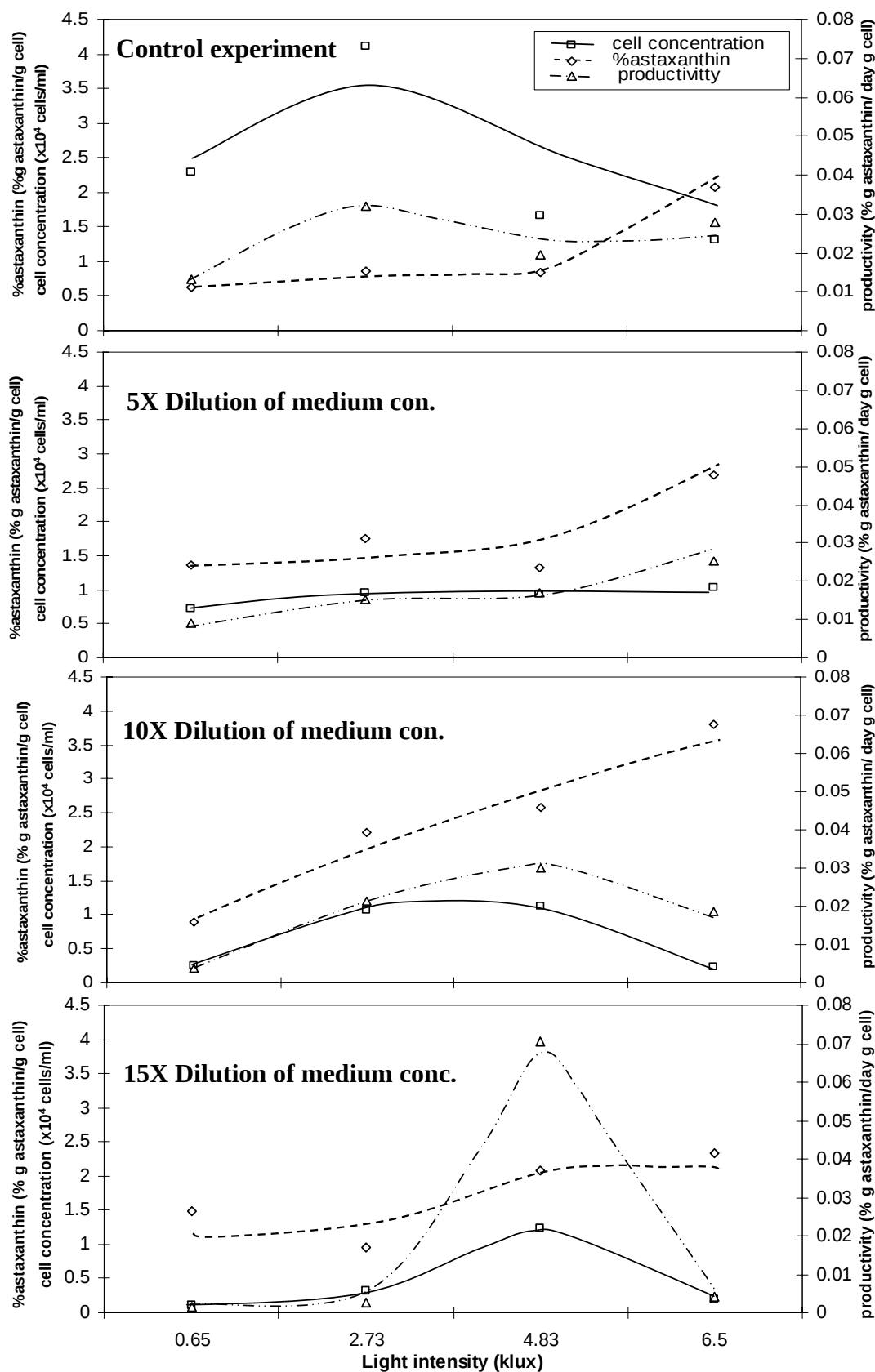
รูปที่ 5.16 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ทำการเจือจางสารอาหารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์ ต่อบริมาณการสร้างสารแอสตาแซนทิน (%): DMC ควบคุม; DM5 เจือจาง 5 เท่า; DM10 เจือจาง 10 เท่า; DM15 เจือจาง 15 เท่า



รูปที่ 5.17 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ทำการเจือจางสารอาหารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะทางธรรมชาติ ต่อบริมาณการสร้างสารแอสตาแซนทิน (%): DMC ควบคุม; DM5 เจือจาง 5 เท่า; DM10 เจือจาง 10 เท่า; DM15 เจือจาง 15 เท่า



รูปที่ 5.18 อัตราการผลิตสารแอสตาแซนทีน (productivity) ในการทำการเจือจางเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ในถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ ขนาด 1.5 ลิตร

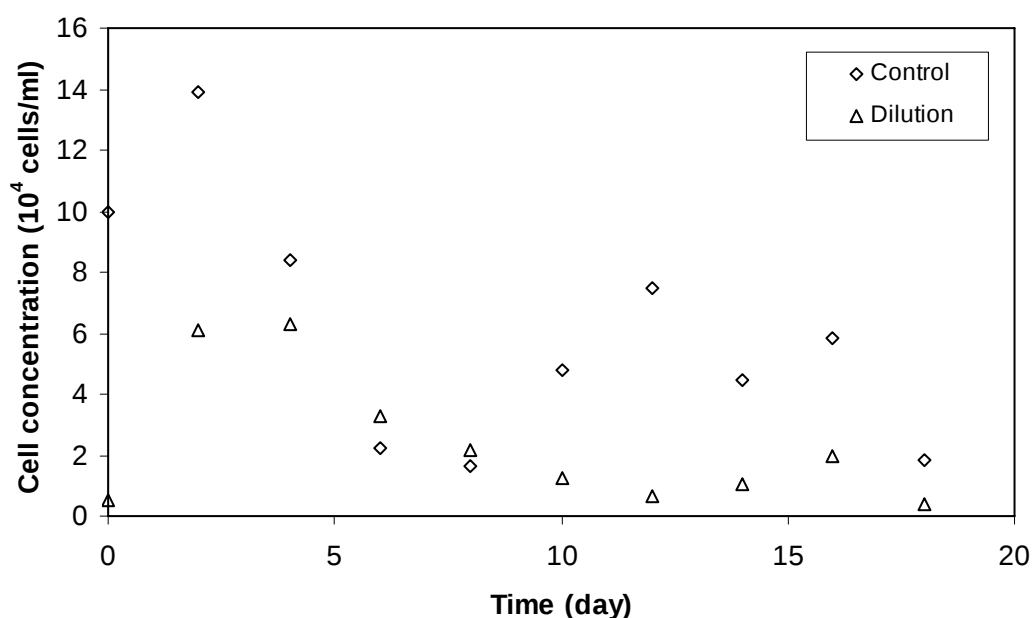


รูปที่ 5.19 อัตราการผลิตสารแอสตาแซนทีน (productivity) ในการทำการเจือจางสารอาหารที่ความเข้มข้นต่างๆ ในถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ ขนาด 1.5 ลิตร

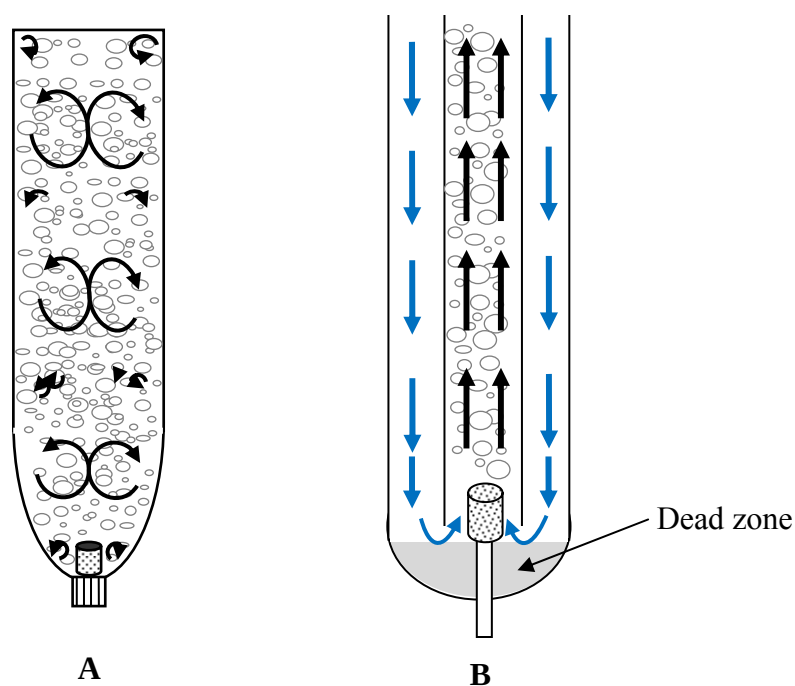
5.2.2 ผลการดำเนินงานผลิตสารแอสตาแซนทีนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift photobioreactor)

การทดลองการกระตุ้นให้เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* สร้างสารแอสตาแซนทีนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูง ขนาด 2.7 ลิตร จะใช้สภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบเป่าอากาศ (bubble column) ขนาด 1.5 ลิตร คือ การเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า และการเจือจางสารอาหาร 10 เท่า ที่ความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์ อัตราการไหลของอากาศ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อวินาที และ อัตราการไหลของอากาศต่อพื้นที่หน้าตัด เท่ากับ 1.28 เซนติเมตรต่อวินาที ซึ่งมากกว่าความเร็วที่ใช้ในถังปฏิกรณ์แบบฟองอากาศ (0.4 เซนติเมตรต่อวินาที) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการตกตะกอนของเซลล์

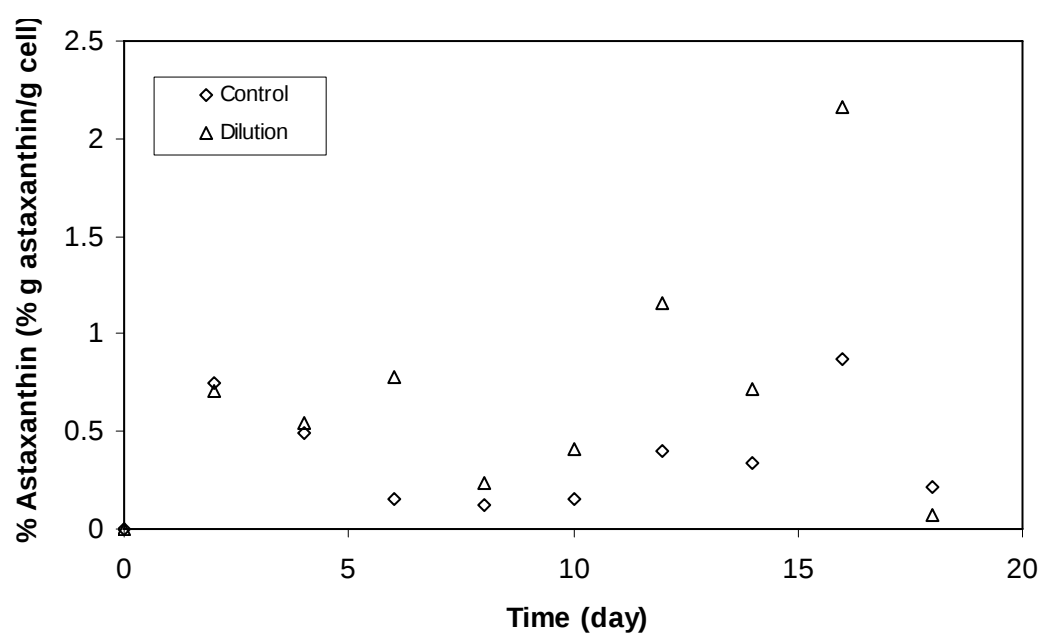
ความเข้มข้นของเซลล์ในช่วงแรกของการทดลองลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5.20 เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมอย่างรุนแรง นอกจากนี้การตกตะกอนของเซลล์เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ตาย ที่เป็นเช่นนั้นอาจเนื่องมาจากข้อด้อยในการออกแบบระบบถังปฏิกรณ์ที่มีจุดอับ (dead zone) อยู่ที่ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ส่งผลให้เซลล์จับตัวกันและตกตะกอน (รูปที่ 5.21) กราฟรูปที่ 5.22 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารแอสตาแซนทีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและได้ปริมาณมากที่สุดคือ 4.79 มิลลิกรัมแอสตาแซนทีน/ลิตร หรือ 2.16% ของน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 16 ของการกระตุ้น



รูปที่ 5.20 ความหนาแน่นของเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ขนาด 2.7 ลิตร ในสภาวะทำการเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า และเจือจางสารอาหาร 10 เท่า ที่ความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์



รูปที่ 5.21 Dead zone ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (Airlift photobioreactor); A = bubble column photobioreactor; B = airlift photobioreactor



รูปที่ 5.22 ปริมาณสารแอสตาแซนทีนที่ผลิตได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก ขนาด 2.7 ลิตร ในสภาวะทำการเจือจางเซลล์เริ่มต้น 10 เท่า และเจือจางสารอาหาร 10 เท่า ที่ความเข้มแสง 6.5 กิโลลักซ์

5.3 การสกัดสารแอสตาแซนทินจากเซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis*

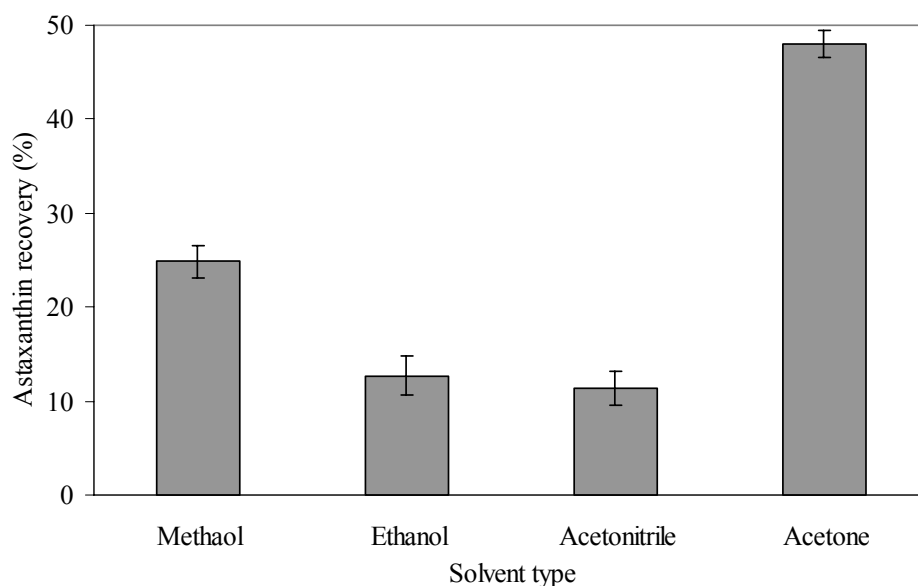
เซลล์แห้งของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่มีแอสตาแซนทินได้ถูกสั่งซื้อมาจาก Cyanotech Corporation, Hawaii Ocean, Science and Technology Park, USA ถูกเก็บรักษาอยู่ในถุงอลูมิเนียมทึบแสงที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ และนำมาสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีต่าง ๆ กัน โดยตัวทำละลายสำหรับการทดลองนี้ประกอบด้วย เมทานอล เอทานอล อะซิโตน และอะซิโตนไไตรด์ สั่งซื้อมาจากบริษัท Fisher-Science และสารแอสตาแซนทินมาตรฐาน ความบริสุทธิ์ 92% สั่งซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich

กรรมวิธีการสกัดสารแอสตาแซนทินออกจาก เซลล์จุลสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ได้ทำการทดสอบในที่นี้ประกอบไปด้วย วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Maceration) การสกัดด้วยตัวทำละลายที่จุดเดือด (Soxhlet extraction) การใช้คลื่นเสียงเพื่อช่วยเร่งการสกัด (Ultrasonic-assisted extraction) และ การใช้คลื่นไมโครเวฟเพื่อช่วยเร่งการสกัด (Microwave-assisted extraction) พบว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟ ร่วมกับการใช้ตัวทำละลายอะซิโตน เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถสกัดเอาสารแอสตาแซนทินออกจากตัวเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* ได้ในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่น ๆ โดยไม่ทำให้สูญเสียสมบัติทางเคมีของสารแอสตาแซนทิน ตารางที่ 5.7 เป็นตารางสรุปผลการสกัดด้วยอะซิโตนในสภาวะต่าง ๆ และผลการสกัดที่ได้

ตารางที่ 5.7 สภาวะการสกัดสารแอสตาแซนทินที่ได้ในปริมาณสูงสุดในแต่ละวิธีการสกัด

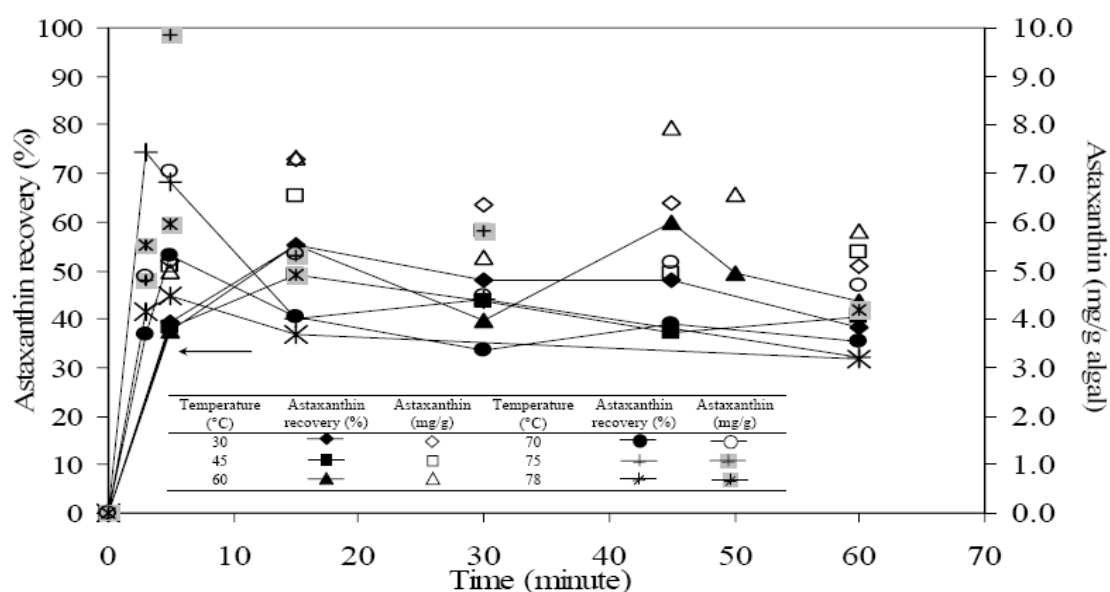
Extraction methods	Solvent	Time/flow rate (minute)	Temperature (°C)	Recovery (%)
Maceration	Acetone	15	45	57
Soxhlet	Acetone	240	56.5	70
Ultrasonic	Acetone	60	45	73
Microwave	Acetone	5	75	74

กราฟรูปที่ 5.23 เป็นผลของการใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิด ร่วมกับการใช้ไมโครเวฟในการสกัดสารแอสตาแซนทิน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 นาที พบว่าตัวทำละลายอะซิโตน สามารถสกัดเอาสารแอสตาแซนทินออกจากตัวเซลล์สาหร่ายได้ดีที่สุด คือสูงถึง 48 % รองลงมาคือ เมทานอล เอทานอล และอะซิโตนไไตรด์ เท่ากับ 25%, 13% และ 11% ตามลำดับ การที่ตัวทำละลายอะซิโตนสามารถสกัดเอาสารแอสตาแซนทินออกจากตัวเซลล์สาหร่ายได้สูงถึง 48 % เป็นผลของความสามารถในการละลายของสารแอสตาแซนทินในตัวทำละลาย



รูปที่ 5.23 ผลของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในการสกัดสารแอสตาแซนทินร่วมกับการใช้ไมโครเวฟ

ผลการทดลองกราฟรูปที่ 5.24 และตารางที่ 5.8 เป็นผลของการใช้ตัวทำละลายอะซิโตนในการสกัด และศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการทำไมโครเวฟต่อปริมาณแอสตาแซนทินที่สกัดได้ พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการใช้ในการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยวิธีไมโครเวฟคือ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที ให้ค่า %recovery สูงถึง 74% (4.79 มิลลิกรัมต่อกรัม) การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ตัวทำละลายมีความหนืดลดลงส่งผลให้การแพร่ของโมเลกุลของสารเพิ่มขึ้น จึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของสารกับตัวทำละลาย อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 78 °C พบว่าเกิดการเสถียรภาพของแอสตาแซนทิน (Degradation)



รูปที่ 5.24 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการทำไมโครเวฟต่อปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้

ตารางที่ 5.8 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการสกัดแอสตาแซนทินด้วยคลื่นไมโครเวฟ

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (นาที)	% recovery แอสตาแซนทินสูงสุด
30	15	55
45	15	49.25
60	45	59.57
70	5	53
75	3	74
78	แอสตาแซนทินสูญเสียสภาพ	

5.4 ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

เพื่อแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการลงทุนการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในการผลิตสารแอสตาแซนทิน จึงได้มีการจัดทำข้อมูลการวิเคราะห์ค่าความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์เบื้องต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* โดยเปรียบเทียบเฉพาะช่วงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์สีเขียว (vegetative motile cell) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกต่างรูปแบบที่มีการใช้งานในที่นี้ (ในหัวข้อที่ 5.1) คือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูงขนาด 3 และ 17 ลิตร และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบขนาด 17 และ 90 ลิตร และตั้งข้อกำหนดว่า กำลังการผลิตเซลล์สาหร่าย 3.6×10^{10} เซลล์ หรือน้ำหนักแห้ง 18 กรัม และกำหนดให้อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย เช่น ถังปฏิกรณ์ ปัม และ หลอดไฟ ฯลฯ มีอายุการใช้งาน 10 ปี และสำหรับห้องควบคุมอุณหภูมิแบบไอระเหย (Construction cost) กำหนดให้มีอายุการใช้งาน 20 ปี (1 ปี เท่ากับ 300 วัน) ดังแสดงในตารางที่ 5.9 เมื่อพิจารณาค่าการลงทุนต่อรอบการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์สาหร่ายแห้ง 18 กรัม พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูงขนาด 3 ลิตร ใช้เงินลงทุน 4,150 บาท (14 รอบการเพาะเลี้ยง) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดทรงกระบอกแนวสูงขนาด 17 ลิตร ใช้เงินลงทุน 2,600 บาท (8 รอบการเพาะเลี้ยง) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบขนาด 17 ลิตร ใช้เงินลงทุน 1,630 บาท (6 รอบการเพาะเลี้ยง) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกชนิดแนวระนาบขนาด 90 ลิตร ใช้เงินลงทุน 565 บาท (1 รอบการเพาะเลี้ยง) ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ระบบแนวระนาบขนาด 90 ลิตร ถือว่าเป็นทางเลือกที่มีความประหยัดและมีค่าความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ในการผลิตเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* ในระยะการเจริญเติบโตมากที่สุด

เมื่อนำระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก ระบบแนวระนาบขนาด 90 ลิตร มาพิจารณาค่าความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์เบื้องต้นตั้งแต่นั้นตอนแรกในการผลิตเซลล์สีเขียวเพื่อให้ได้ความหนาแน่นสูง จนกระทั่งนำเซลล์สีเขียวไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินในระยะเซลล์สีแดง และทำให้เซลล์แห้ง ซึ่งในการวิเคราะห์นี้จะถือว่าเซลล์สีแดงแห้งเป็น end product เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องด้วยในขั้นตอนของการสกัดเพื่อให้ได้สารแอสตาแซน

หินออกมาแล้วยังไม่สามารถประเมินราคาได้ เพราะการทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเพียงระดับห้องปฏิบัติการ (small scale) และเป็นการสกัดในเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นสารแอสตาแซนทินจึงยังไม่ใช่ end product ในการวิเคราะห์ค่าความคุ้มค่าทุนในครั้งนี้ สำหรับราคาการซื้อขายของเซลล์สีแดงแห้งของจุลสาหร่าย *H.pluvialis* อยู่ที่ประมาณ 3,500 บาทต่อกิโลกรัมมวลสาหร่ายแห้ง (Hawaii) ตารางที่ 5.10 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าความคุ้มค่าทุนทางเศรษฐศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกกระบบแนวระนาบขนาด 90 ลิตร โดยคำนึงถึงว่าจะต้องมีกำลังการผลิตเซลล์สาหร่ายแดงแห้งเท่าไร จึงจะคุ้มค่า ซึ่งกำหนดให้อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย เช่น ถังปฏิกรณ์ บั๊ม และ หลอดไฟ ฯลฯ มีอายุการใช้งาน 10 ปี และสำหรับห้องควบคุมอุณหภูมิแบบไอระเหย (Construction cost) กำหนดให้มีอายุการใช้งาน 20 ปี (1 ปี เท่ากับ 300 วัน) ผลจากการวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อให้คุ้มค่าทุนการผลิตในตารางที่ 5.10 แสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกกระบบแนวระนาบขนาด 90 ลิตร จำนวน 6 ถังต่อ 1 ห้องควบคุมอุณหภูมิแบบไอระเหย ซึ่งในแต่ละถังสามารถผลิตเซลล์สาหร่ายแห้งได้ 3.85 กิโลกรัมกรัมต่อปี (ซึ่งคิดเป็นรายได้ต่อปีประมาณ 13,500 บาท) สำหรับรายจ่ายหลักๆ ประกอบด้วยค่าสารอาหาร 1,800 บาทต่อปี ค่าไฟฟ้าทั้งหมดประมาณ 7,100 บาทต่อปี ค่าน้ำประมาณ 120 บาทต่อปี และค่าอื่นๆ ประมาณ 3,000 บาทต่อปี ซึ่งค่าใช้จ่ายทั้งสิ้นรวมเป็นจำนวนเงินประมาณ 12,000 บาทต่อปี จึงคิดเป็นกำไรประมาณ 1,500 บาทต่อปี รูปที่ 5.25 แสดงสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ค่าใช้จ่ายในแต่ละรายการการผลิตเซลล์สาหร่ายแห้งได้ 3.85 กิโลกรัมกรัมต่อปีในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกกระบบแนวระนาบขนาด 90 ลิตร อย่างไรก็ตาม ในการเพาะเลี้ยงจริงในระดับอุตสาหกรรม จะต้องใช้แสงไฟหลอดฟลูออเรสเซนต์ร่วมกับแสงธรรมชาติ กล่าวคือ ตอนกลางวันจะใช้แสงจากแหล่งทางธรรมชาติ ส่วนในตอนกลางคืนจะใช้แหล่งของแสงคือหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เช่นเดิม ซึ่งจะเป็นการลดพลังงานไฟฟ้าลงถึงประมาณ 50% ส่งผลให้ค่าการดำเนินการผลิต (operating cost) ลดลง

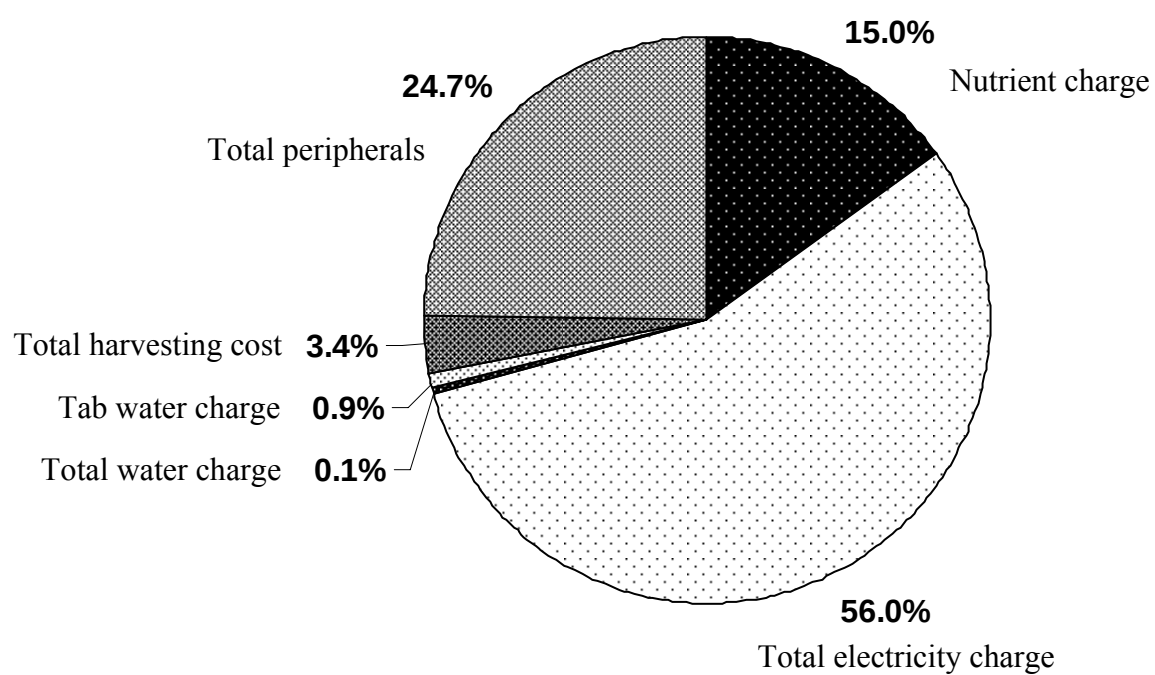
ตารางที่ 5.9 ผลการวิเคราะห์ค่าความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* ปริมาณ 3.6×10^{10} เซลล์ หรือ 18 กรัม ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก

		3 l	17 l	17 l	90 l
		C-ALPBR	C-ALPBR	FP-ALPBR	FP-ALPBR
Harvested cell concentration (cell ml ⁻¹)		9.00E+05	2.80E+05	4.00E+05	4.00E+05
Effective volume (l)	[A]	3	17	17	90
Cycle time (d)	[B]	10	9	8	11
Productivity (cells d ⁻¹)	[C]	2.70E+08	5.29E+08	8.50E+08	3.27E+09
Specific productivity (cell l ⁻¹ d ⁻¹)	[D]	9.00E+04	3.11E+04	5.00E+04	3.64E+04
Cultivation time (d)	[E= (3.6*10 ¹⁰)÷C]	1.33E+02	6.81E+01	4.24E+01	1.10E+01
Number of cycle (-)	[F= E÷B]	1.33E+01	7.56E+00	5.29E+00	1.00E+00
Total volume of water used (l)	[G= A*F]	4.00E+01	1.29E+02	9.00E+01	9.00E+01
Cost of water, 0.06 THB l ⁻¹	[H= 0.06*G]	2.40E+00	7.71E+00	5.40E+00	5.40E+00
Cost of nutrient, 1 THB l ⁻¹	[I= G*1]	4.00E+01	1.29E+02	9.00E+01	9.00E+01
Power of air compressor (W)	[J]	60	120	120	100
Power of light source (W)	[K]	72	72	72	144
Total electrical unit (units)	[L= (J+K)*(E*24)÷1000]	4.22E+02	3.14E+02	1.95E+02	6.44E+01
Electrical cost, 3 THB per unit	[M= 3*L]	1.27E+03	9.41E+02	5.85E+02	1.93E+02
Reactor cost (THB d ⁻¹)	[N]	1.00E+00	1.67E+00	1.67E+00	4.00E+00
Pump cost (THB d ⁻¹)	[O]	2.00E-01	6.00E-01	6.00E-01	8.80E-01
Lamp cost (THB d ⁻¹)	[P]	1.30E-01	1.00E-01	1.30E-01	2.70E-01
Construction cost (THB d ⁻¹)	[Q]	2.00E+01	2.00E+01	2.00E+01	2.00E+01
Total operating cost (THB)	[R= H+I+M]	1.31E+03	1.08E+03	6.81E+02	2.89E+02
Total investment cost (THB)	[S= E*(N+O+P+Q)+R]	4.15E+03	2.60E+03	1.63E+03	5.65E+02

ตารางที่ 5.9 ผลการวิเคราะห์ค่าความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกกระบบแนวระนาบ ขนาด 90 ลิตร

	Cost	Unit
Area	0.27	m ²
Reactor Area	0.09	m ²
Height	1	m
Volume	0.09	m ³
growth rate	0.45	d ⁻¹
Max cell density	4.00E+05	cell/mL
Dry weight (at Max cell density)	0.15	g/L
Initial cell density	2.00E+04	cell/mL
Harvesting period	1.10E+01	d
Harvesting volume	8.55E-02	m ³
Productivity	1.28E+01	g dry cell/d
	3.85E+03	g dry cell/year
Nutrient requirements for the cultivation at the target productivity		
Nutrient charge	1800	B/year
Electricity requirements		
1. lighting	1036.8	kWh
2. Fan	447	kWh
3. Controlling system	36	kWh
4. Air pump	720	kWh
Total electricity requirements	2239.8	kWh
Electricity charge	3	B/kWh
Total Electricity Charge	6719.4	B/year
Water requirements		
1. Nutrient solution	200	L
2. Washing activity	1000	L
Total water consumption	1200	L
Water charge	10	B/cum.
Total Water Charge	12	B/year
Tab water charge	108	B/year
Harvesting method		
1. Chemical requirements	0	B/year
2. Electricity requirements	403.2	B/year
Total harvesting cost	403.2	B/year
Other requirements (peripherals)		
1. Air filter	1	Units
2. Air filter cost	700	B/unit
3. Total air filter cost	700	B/year
4. Reactor	6	Units
5. Reactor life time	10	Years
6. Reactor charge (=Reactor cost/Life time)	1000	B/year
7. Air pump	1	Units
8. Air pump life time	10	Years
9. Air pump charge	265	B/year
10. Construction	1	Units
11. Construction life time	20	Years
10. Construction charge	1000	B/year
Total peripherals	2965	B/year
Total all expends	12007.6	B/year
Product sell	13475	B/year
Profit margin	1467.4	B/year

* Base on 90 L FP-ALPBR 6 units



รูปที่ 5.25 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ค่าใช้จ่ายในแต่ละรายการการผลิตเซลล์สาหร่ายแห้งของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* 3.85 กิโลกรัมกรัมต่อปี ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกระบบแนวระนาบขนาด 90 ลิตร

บทที่ 6

บทสรุป

6.1 โอกาสในการพัฒนาเชิงธุรกิจของระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย

Haematococcus pluvialis

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ในระบบขนาดใหญ่ในประเทศไทยมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูง ระบบที่นำเสนอนี้สามารถขยายขนาดกำลังการผลิตได้ง่ายโดยการเพิ่มความยาวของถังปฏิกรณ์ออกไปได้เรื่อย ๆ ซึ่งในการทดลองนี้ได้มีการเปรียบเทียบพฤติกรรมของการเพาะเลี้ยงในระบบที่มีการขยายขนาดจาก 17 ลิตรเป็น 90 ลิตร และได้ผลการดำเนินงานเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากผลการเจริญเติบโตในระบบขนาด 90 ลิตรมีค่าสูงกว่าการเจริญเติบโตใน 17 ลิตร และเมื่อประเมินทางเศรษฐศาสตร์ยังพบว่าระบบขนาดใหญ่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าระบบขนาดเล็กอย่างมีนัยสำคัญ

อย่างไรก็ตาม การดำเนินงานในส่วนของการกระตุ้น ยังคงได้ผลที่ไม่น่าพอใจนัก เนื่องจากเซลล์มีอัตราการตายค่อนข้างสูง ถึงแม้ว่าสุดท้ายแล้วจะได้สารแอสตาแซนทินต่อเซลล์ในปริมาณที่น่าพอใจก็ตาม ในปัจจุบัน ทีมวิจัยยังคงดำเนินการเพื่อแก้ปัญหาในส่วนนี้ โดยวิเคราะห์ปัญหาเบื้องต้นถึงสาเหตุการตายของเซลล์ที่น่าจะเกิดเนื่องจากการย้ายระบบการเพาะเลี้ยง และการเปลี่ยนแปลงสภาวะการดำเนินงานอย่างกะทันหัน ซึ่งปัญหานี้ น่าจะแก้ได้โดยการให้มีการดำเนินงานอย่างต่อเนื่อง นั่นคือ เมื่อเซลล์ผ่านช่วงของการเจริญเติบโตแล้ว ให้มีการไหลของเซลล์ผ่านเข้าสู่ระบบการกระตุ้นเซลล์ เพื่อลดความเสี่ยงจากการหยุดเดินระบบและการตกตะกอนของเซลล์

ในส่วนของการสกัดนั้น ในขณะที่ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินงานในระดับการทดลองแล้ว และทีมวิจัยยังคงดำเนินงานเพื่อพัฒนาระบบการสกัดที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้สามารถปรับใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม

6.2 แนวทางในการพัฒนาระบบ

การดำเนินงานในส่วนต่อไปของทีมวิจัย คือ การพัฒนาความรู้ในส่วนของการกระตุ้นสารแอสตาแซนทิน โดยมีเป้าหมายในการลดอัตราการตายของเซลล์ ซึ่งจะทำความคุ้นเคยกับการติดตั้งระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์สีเขียวของ *Haematococcus pluvialis* ในระดับอุตสาหกรรม และได้มีผู้ประกอบการที่สนใจได้เข้ามาเยี่ยมชมระบบการเพาะเลี้ยงที่สร้างขึ้น และได้พัฒนาโครงการวิจัยร่วมต่อเนื่องกับทีมวิจัยโดยกำหนดเป้าหมายในการขยายผลการดำเนินงานที่ชัดเจน ดังจะได้รายงานกับสกว.ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Borowitzka, M.A. Fat, oils and hydrocarbon. 1989. Cambridge: Cambridge university press.
- Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* 108: 111-117.
- Chen, F., Chen, H., Gong, X. 1997. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and theological behavior of the cell suspension. *Bioresouce Technology* 62:19-24.
- Choi, S.L., Suh, I.S., and Lee C.G. 2003. Lummostatic operation of bubble column photobioreactor for *Haematococcus pluvialis* culture using a specific light uptake rate as a control parameter. *Enzyme and Microbial Technology*.33: 403-409.
- Chumpolkulwong, N., Kakizono, T., Handa, T., Nishio, N. 1997. Isolation and characterization of compactin resistant mutants of an astaxanthin sythesizing green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters* 19(3):229-302.
- Del Rio, E., Acien, F. G., Garcia-Malae, M. C, Rivas, J., Molina- Grima, E., Guerrero, M. G. 2005. Efficient one step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. Published online 3 June 2005 in Wiley InterScience.
- Dominguez-Bocanegra, A.R., Guerrero Legarreta, I., Martinez Jeronimo, F. and Tomasini Campocosio, A. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 92:209-214.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Garcia-Alvarez, D., Lamela, T., Otero, A., 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*. 20: 623–626.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., Otero, A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology Biotechnology* 53:530-535.

- Fabregas, J., Otero, A., Dominguez, A. 2001. Two-stage culture for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology* 89:65-57.
- Garcia-Malea, M.C., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Ceron, M.C., Molina, E. 2006. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. *Enzyme and Microbial Technology* 38 : 981–989.
- Guerin, M., and Huntley, M.E. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 2: 210-6.
- Gong, X., Chen, F. 1998. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochemistry* 33(4):385-391.
- Grunewald, K., Hagen, C., Braune, W. 1997. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*. *European Journal of Phycology* 32:387-392.
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 21: 210–216.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Yong, A.J. 1996(a). Autotrophic growth and carotenoid production of in 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82(2):113-118.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Yong, A.J. 1996(b). Factor responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 55:207-214.
- Hata, N., Ogbonna, J.C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka. 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophicphotoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology* 13:395-402.
- Issarapayup, K., Powtongsook, S., Pavasant, P. 2009. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology* 142: 227-232.

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

Kang, C. D., An J. Y., Park, T. H., Sim, S. J. 2006. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal* 31: 234-238.

Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, Katoh, K. 2006. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 81–86.

Kim, Z.H., Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, C.G. 2006. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology* 39:414-419.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. 1991. Astaxanthin production by green algal, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71(5):335-339.

Kobayashi, M., Kumurira, Y., Kakizono, T. Nishio, N., Tsuji, Y. 1997. Morphology change in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84:94-97.

Lababpour, A., Shimahara, K., Hada, K., Katsuda, T., Kyoui, Y., and Katoh, S. 2005. Fed-Batch Culture under Illumination with Blue Light Emitting Diodes (LEDs) for Astaxanthin Production by *Haematococcus pluvialis*. *Bioscience and Bioengineering* 3: 339-342.

Lopez, G.M., Sanchez, E., Lopez, J.L., Fernandez, F.G., Sevilla, J.M., Rivasb, J.,Guerrero, M.G., Grima, E.M. 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of Biotechnology* 123 : 329–342.

Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology* 18(4):160-7.

Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*. 12: 499-506.

Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., and Abalde, J. 2004. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 96: 373-378.

Qinglin, D., Xueming, Z., Xiangying, X., Jianzhong, H., and Jixian, G., 2007. Concomitant NH_4^+ Secretion During Astaxanthin Synthesis in *Haematococcus pluvialis* Under High Irradiance and Nitrogen Deficient Conditions. *Chemical Engineering* 15: 162-166.

Ranjbar, R., Inoue, R., Shiraishi, H., Katsuda, T. and Katoh, S. 2007. "High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor." *Journal of Biochemical Engineering*.

Ranjbar, R., Inoue, R., Katsuda, T., Yamaji, H., and Katoh, S. 2008. "High efficiency production of astaxanthin in airlift photobioreactor." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106(2): 204-207

Sang Lee, H., Won Seo, M., Hun Kim, Z., Gyun Lee., C. 2006. Determining the best specific light uptake rates for the lumostatic cultures in bubble column photobioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 447-452.

Sarada, R., Tripathi, U., and Ravishankar, G.A. 2001. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry* 37: 623-627.

Simson, K.L., Katayama, T., and Chichester, C.O. 1981. Carotenoid in fish feeds. In J.C. Bauernfeind (ed.), *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*, pp. 463-538. New York USA: Academic Press Inc.

Strickland, J.D.H., and Parson, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd ed. Ottawa: Fisheries Research board of Canada.

Suh, I.S., Joo, H.N., Lee, C.G. 2006. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *Journal of Biotechnology* 125(4):540-546.

Tjahjono, A.E., Kakizono, T., Hayama, Y., Nishio, N., Nagai, S. 1994. Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77(4):352-357.

Thimijan, R.W., and Royal, D.H. 1982. Photometric, Radiometric and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for interconversion. *HortScience* 18: 818-822.

Tripathi, U., Sarada, R., Rao, S.R., Ravishankar, G.A. 1999. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology* 68 :197-199.

Vega Estrada, J., Montes Horcasitas, M. C., Dominguez Bocanegra, A.R., Canizares Villanueva, R.O. 2005. *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Applied Microbiology Biotechnology*. 68:31-35.

Zhang, X.W., Gong, X.F., Chen, F. 1999. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23:691-696.

ภาคผนวก 1

การคำนวณและการวิเคราะห์ต่าง ๆ

1. ความหนาแน่นเซลล์ (Cell density)

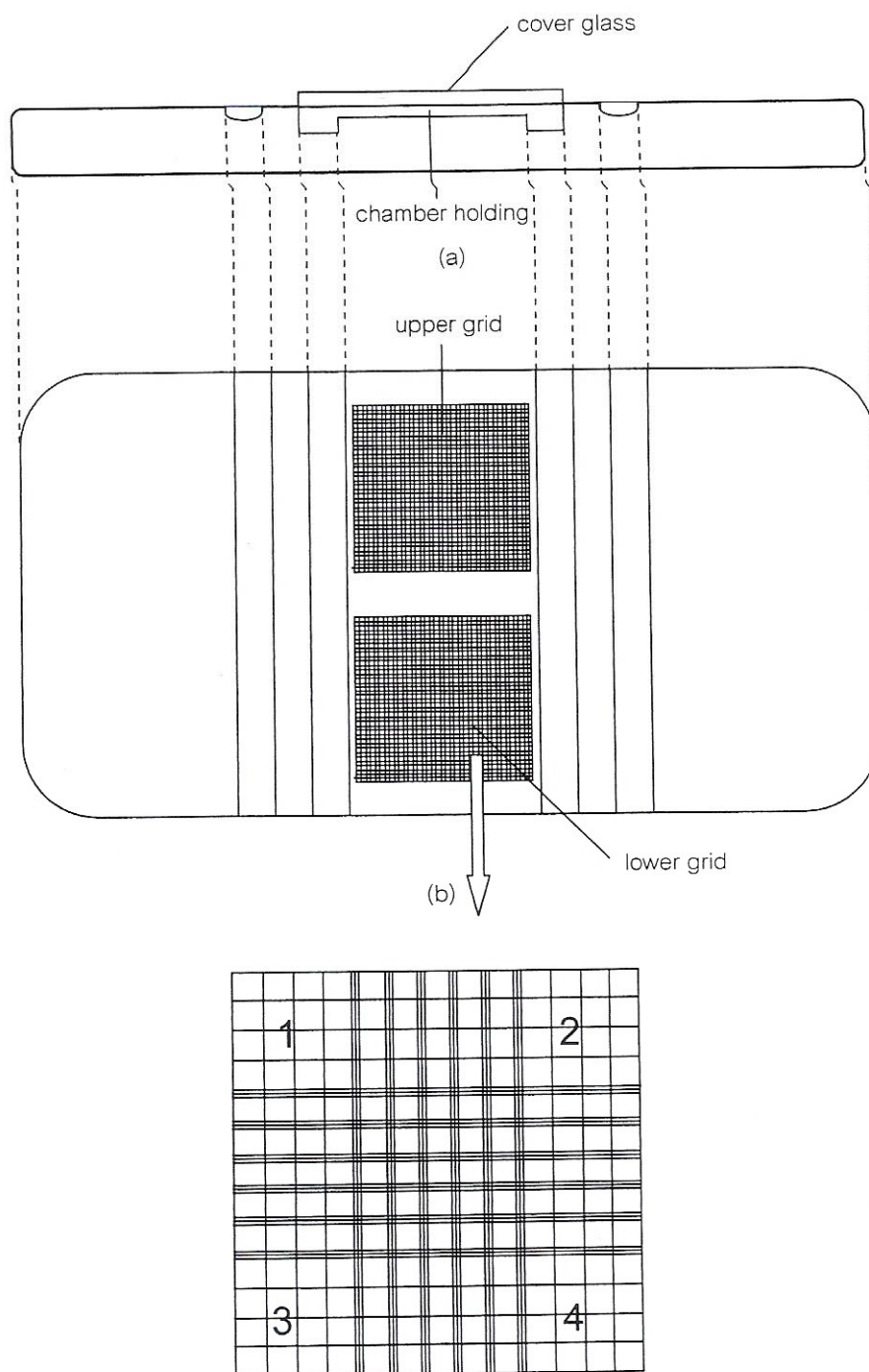
ความหนาแน่นเซลล์ของจุลสาหร่าย *H. pluvialis* ทั้งในระหว่างการเจริญเติบโตเซลล์สีเขียวและระยะเซลล์สีแดง สามารถนับได้โดยใช้เครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือดแดง Neubauer Haemocytometer แสดงดังรูปผ.1 และมีวิธีการวัดคร่าว ๆ ดังนี้

- 1) นำสารละลายเซลล์ตัวอย่างประมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงในเครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือดแดง Neubauer Haemocytometer
- 2) นำแผ่น Cover slip ปิดที่ด้านบนของเครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือดแดง Neubauer Haemocytometer สารละลายเซลล์ตัวอย่างจะกระจายไปทั่วแผ่น
- 3) นำเครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือดแดง Neubauer Haemocytometer มาส่องผ่านด้วยเครื่องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ผ.2
- 4) คำนวณความหนาแน่นเซลล์โดยใช้สูตรคำนวณที่ ผ.1

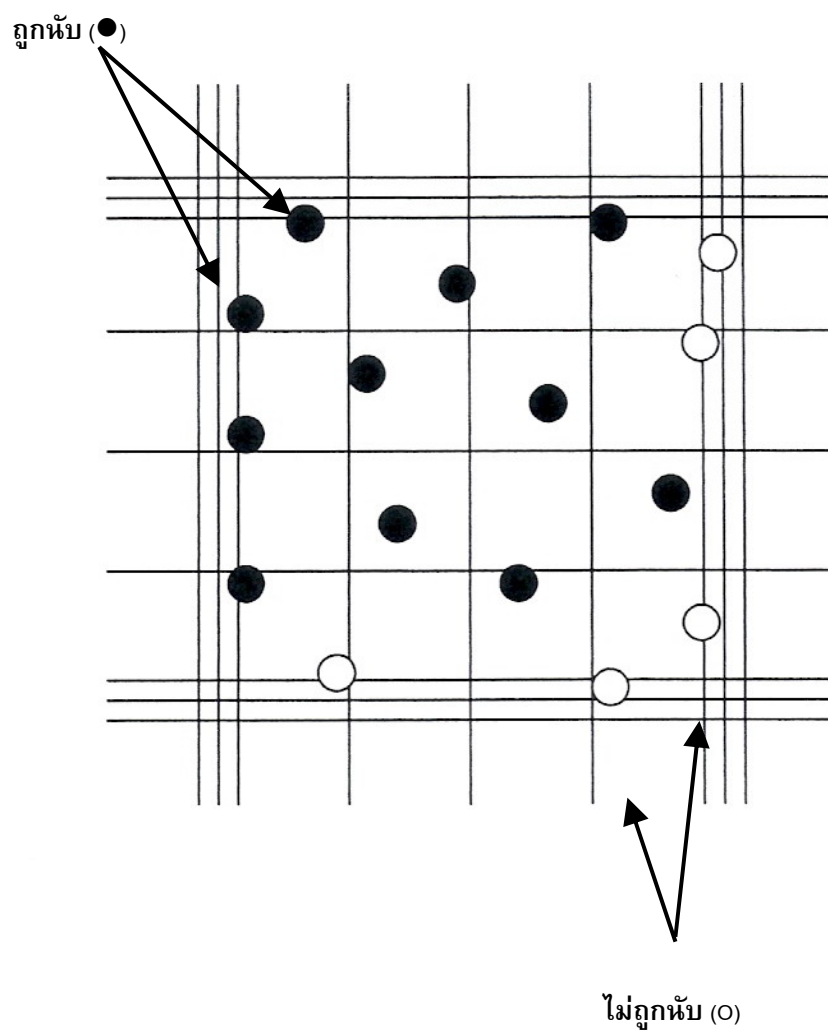
$$N = \frac{n_1 + n_2}{8} \times 10^4 \quad (\text{ผ.1})$$

โดยที่ N คือ จำนวนเซลล์เฉลี่ย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

n_1 และ n_2 คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน upper grid และ lower grid (เซลล์)



รูปที่ ผ.1 เครื่องมือนับเซลล์เม็ดเลือดแดง Neubauer Haemacytometer (a) ภาพถ่ายด้านบนของอุปกรณ์ (b) ภาพ grid ขยาย แสดงตัวอย่างการนับจำนวนเซลล์ในช่องที่ 1, 2, 3 และ 4



รูปที่ ผ.2 ตัวอย่างการนับจำนวนเซลล์สำหรับ

2. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* สามารถคำนวณได้จากสมการที่ผ.2

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{ผ.2})$$

โดยที่ μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

N_1 และ N_2 คือ ความหนาแน่นของเซลล์ที่เวลา t_1 และ t_2 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
 t คือ เวลา (วัน)

3. อัตราการผลิต (Productivity)

อัตราการผลิตของเซลล์จุลสาหร่าย *H.pluvialis* สามารถคำนวณได้จากสมการที่ผ.3

$$\text{Productivity} = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{ผ.3})$$

N_1 และ N_2 คือ ความหนาแน่นของเซลล์ที่เวลา t_1 และ t_2 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
 t คือ เวลา (วัน)

4. เซลล์สาหร่ายแห้ง (Cell dry weight)

- 1) นำสารละลายเซลล์ตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 10 ไมโครเมตร
- 2) นำไปอบในตู้อบความร้อน 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
- 3) นำไปใส่ในตู้อบความชื้นเพื่อรอให้อุณหภูมิลดลง
- 4) ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเครื่องชั่งดิจิตอลที่มีความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 5) นำมาคำนวณโดยใช้สมการที่ผ.4

$$\% \text{ Dry weight} = \frac{C \times V}{G} \times 100 \quad (\text{ผ.4})$$

โดยที่ C คือ ความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรสารละลายเซลล์ตัวอย่างที่นำมากรอง (มิลลิลิตร)

G คือ น้ำหนักของกระดาษกรองรวมกับเซลล์สาหร่ายแห้ง – น้ำหนักของกระดาษกรอง

5. การตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์และแอสตาแซนทิน

- 1) นำสารละลายเซลล์สาหร่ายตัวอย่างปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที
- 2) ทิ้งส่วนใส แล้วเติมตัวทำละลายอะซิโตน 2-3 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอน
- 3) นำตะกอนมาปั่นด้วยเครื่อง homogenizer เพื่อให้ผนังเซลล์แตก

- 4) นำสารละลายผสม มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที
- 5) เก็บส่วนสารละลายใสซึ่งตัวทำละลายอะซิโตนและสารประกอบคลอโรฟิลล์ละลายอยู่
- 6) นำสารละลายตัวอย่างไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrometer ที่ความยาวคลื่น 665, 645 และ 473 นาโนเมตร เพื่อตรวจวัดสารประกอบ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และ แอสตาแซนทิน ตามลำดับ
- 7) นำมาคำนวณค่าความเข้มข้นโดยใช้สมการของ Strickland and Person (1972) (สมการที่ผ.5)

$$\frac{\text{mg pigment}}{m^3} (\mu g L^{-1}) = \frac{C}{V} \quad (\text{ผ.5})$$

โดยที่ C คือ ค่าที่ได้จากสมการด้านล่าง
 V คือ ปริมาตรสารละลายเซลล์ตัวอย่างที่นำมากรอง (มิลลิลิตร)

$$C(\text{chlophyll } a) = 11.6E_{6650} - 1.31E_{6450} - 0.14E_{6300} \quad (\text{ผ.5.1})$$

$$C(\text{chlophyll } b) = 20.7E_{6450} - 4.34E_{6650} - 4.42E_{6300} \quad (\text{ผ.5.2})$$

$$C(\text{total carotenoid}) = 4.0E_{4800} \quad (\text{ผ.5.3})$$

โดยที่ E_i คือ extinction values, at wavelengths indicated by the subscripts (A°)

ภาคผนวก 2

บทความสำหรับการเผยแพร่

“Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*” Kerati Issarapayup, Sorawit Powtongsook, and Prasert Pavasant, *Journal of Biotechnology* 142(3-4), July 2009, 227–232



Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*

Kerati Issarapayup^a, Sorawit Powtongsook^{b,c}, Prasert Pavasant^{a,*}

^a Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^c National Center of Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2008

Received in revised form 23 April 2009

Accepted 28 April 2009

Keywords:

Airlift photobioreactor

Vegetative cells

Astaxanthin

Bioprocess design

Microalga

ABSTRACT

The novel flat panel airlift photobioreactor (FP-ALPBR) was proposed as an alternative system for the cultivation of *Haematococcus pluvialis* NIES-144. Changes in the efficiency of the system were tested in response to variations in two engineering parameters; the ratio between the downcomer and riser cross-sectional areas (A_d/A_r) and the size of the system (as determined by the length of the panel) and to one operating parameter; the superficial gas velocity (u_{sg}). The best growth performance was obtained by operating the system at a superficial velocity of 0.4 cm s^{-1} and with a downcomer-to-riser cross-sectional area ratio of 0.4. The 17-l FP-ALPBR system was capable of giving reasonable growth characteristics with a maximum cell density of $4.1 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ and specific growth rate of 0.52 day^{-1} being achieved. A similar level of performance was obtained from the 90-l FP-ALPBR system, i.e., cell density $\sim 40 \times 10^4 \text{ cell ml}^{-1}$ but with a slight decrease in specific growth rate to 0.39 day^{-1} . The performances of these two differently sized FP-ALPBRs were compared with two conventional cylindrical airlift photobioreactors (C-ALPBRs) of different dimensions. The 90-l FP-ALPBR exhibited reasonably good performance when compared with the two 17-l systems (both C- and FP-ALPBRs); however, the best growth rate was observed using the 3-l C-ALPBR. Semi-continuous cultures, which could be periodically harvested at a reasonably high growth rate, were successfully created. Of all the systems investigated in this study, the 90-l FP-ALPBR was found to be the most cost-effective, as it could cultivate 18 g of alga for approximately US\$ 21.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Astaxanthin is known to possess superior antioxidant activity to other carotenoids, is used as a potential anticarcinogen, as a pigment in feeds for farmed fish, and as a supplementary additive in the food industry (Guerin et al., 2003). An alternative pathway for astaxanthin production, the induction of stress in the green alga *Haematococcus pluvialis* was reported to be capable of producing as high as 1.5–3.0% astaxanthin by weight (Lorenz and Cysewski, 2000). Due to its slow growth, susceptibility to contamination, and preference for low growth temperature (Harker et al., 1996a,b), the high productivity cultivation of such alga needs to be carried out in closed systems with good environmental control (Kaewpintong et al., 2006).

There have been a few reports on the cultivation of *H. pluvialis*, but most of them only carried out experiments in small-scale laboratories (Kobayashi et al., 1997; Fabregas et al., 2001; Hata et al., 2001). However, the performance of large-scale systems is sig-

nificantly different (Wongsuchoto et al., 2003; Ugwu et al., 2008; Ruen-ngam et al., 2008), and quite often the productivity of the alga varies inversely with the size of the reactor (Harker et al., 1996a; Del Rio et al., 2005, 2008; Kaewpintong et al., 2006; Garcia-Malea et al., 2005, 2006, 2009; Ranjbar et al., 2008).

This work intended to provide a simpler method of scaling up the airlift photobioreactor (ALPBR) without losing its hydrodynamic properties. This was achieved by designing the airlift as a rectangular column (described here as a "flat plate airlift photobioreactor", FP-ALPBR) in which the length could be adjusted to accommodate the requirement for different volumes. First, the FP-ALPBR system was tested to determine the optimal downcomer-to-riser area ratio for the cultivation of this alga, and thereafter the performance of the system at different scales was evaluated and compared to the conventional cylindrical airlift systems.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and inoculum preparation

H. pluvialis (NIES-144) was obtained from the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 6870; fax: +66 2 218 6877.
E-mail address: Prasert.p@chula.ac.th (P. Pavasant).

Table 1
Geometric details of airlift photobioreactors (ALPBRs).

	Symbol	3 l C-ALPBR	17 l C-ALPBR	17 l FP-ALPBR	90 l FP-ALPBR
Total volume (l)		3.6	19	19	95
Working volume (l)		3	17	17	90
Column height (cm)	H_R	60	120	50	50
Column length (cm)	L_R	–	–	20	100
Column width (cm)	W_R	–	–	20	20
Draft tube height (cm)	H_T	40	100	30	30
Bottom clearance (cm)	H_B	5	10	10	10

University, Thailand. The initial inoculum of *H. pluvialis* was cultivated in the standard sterilized F1 medium (Fabregas et al., 1998, 2000) composed of (mg l⁻¹): 9.87 CaCl₂·2H₂O, 410 KNO₃, 30 Na₂HPO₄, 2.22 C₆H₅FeO₇·5H₂O, 16.41 MgSO₄·7H₂O, 0.008 CuSO₄·5H₂O, 0.08 Na₂MoO₄·2H₂O, 0.66 MoO₃, 0.05 Cr₂O₃, 0.036 SeO₂, 0.0078 CoCl₂·6H₂O, 6 NH₄Fe(C₆H₅O₇), and (μg l⁻¹): 12 vitamin B₁₂. This culture was then up-scaled to 5-l and 10-l autoclavable glass bottles before being transferred to the airlift photobioreactor. Only green motile cells from the exponential growth phase were used as inoculums in these experiments.

2.2. Bioreactor set-up

The column and draft tube were made of clear acrylic plastic with thicknesses of 5 and 2 mm, respectively. Table 1 displays the geometric details of this reactor. The 3-l and 17-l cylindrical airlift photobioreactors (C-ALPBRs) were of cylindrical geometry, whereas the 17-l and 90-l flat plate airlift photobioreactors (FP-ALPBRs) were rectangular and of variable width. A schematic diagram of the FP-ALPBR is displayed in Fig. 1. The ratio between the downcomer and riser cross-sectional areas (A_d/A_r) was varied from 0.1 to 0.3 by changing the draft tube (in C-ALPBRs) or the vertical plate position (in FP-ALPBRs). The liquid culture in the system was agitated by passing air bubbles through the porous gas sparger at the bottom of the riser section. Air from an air compressor was sterilized

with a 0.22-μm Gelman filter, metered through a flowmeter. The CO₂-enriched air was also sterilized using a 0.22-μm Gelman filter and mixed with air before entering the system. The concentration of CO₂ was 1% by volume. This level did not significantly affect the pH as CO₂ was continuously taken up by the algae during the course of cultivation. The temperature of the culture was maintained at 25 °C using the vacuum-evaporating system.

Light for the ALPBR was supplied from two vertical 18-W fluorescent lamps installed on both sides of the column. The distance of each lamp from the outer surface of the column was varied between 1 and 5 cm depending on the light intensity required at the reactor surface. The illumination intensity was measured with a digital LX-5 Lux meter (model LX-50 Digicon) inside the empty column and the average values were reported.

2.3. Determination of suitable operating conditions

Experiments were carried out to determine the effects on cell growth of varying certain design/operating parameters, i.e., the superficial gas velocity and the ratio between the downcomer and riser cross-sectional area. It is worth noting here that the superficial velocity in the airlift system was calculated based on the riser cross-sectional area (Chisti, 1989). In batch operations, the culture was grown in the bioreactor until the stationary phase was reached, whereas in the semi-continuous mode, the cultivation was started off as a batch culture, and when the cell concentration reached the required value, 50% of the volume of culture broth was harvested and replaced with fresh medium. Each day the algal cell density was measured microscopically using an improved Neubauer hemocytometer (BOECO Germany). From the cell density, the specific growth rate (μ ; day⁻¹) was calculated using the following equation:

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

where N_1 and N_2 (cell ml⁻¹) are cell density at time t_1 and t_2 (days). The cell productivity (cells ml⁻¹ day⁻¹) was calculated from:

$$\text{Productivity} = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

where C_1 and C_2 (cells ml⁻¹) are cell density at time t_1 and t_2 (days). Note that all experiments were carried out in duplicate.

3. Results and discussion

3.1. Performance of flat plate airlift photobioreactor (FP-ALPBR)

One of the main design parameters that was varied in the airlift system was the downcomer-to-riser cross-sectional area ratio (A_d/A_r). For these experiments, this parameter could be altered from 0.4 to 3.0 by simply changing the position of the separation plate that was installed along the length of the reactor. For comparison, cultivation was also carried out in the bubble column, in the same column as the 17-l FP-ALPBR but without installation of the separation plate (labeled as "control" in Fig. 2). The superficial velocity was kept at 0.4 cm s⁻¹, based on a previous report by Kaewpintong

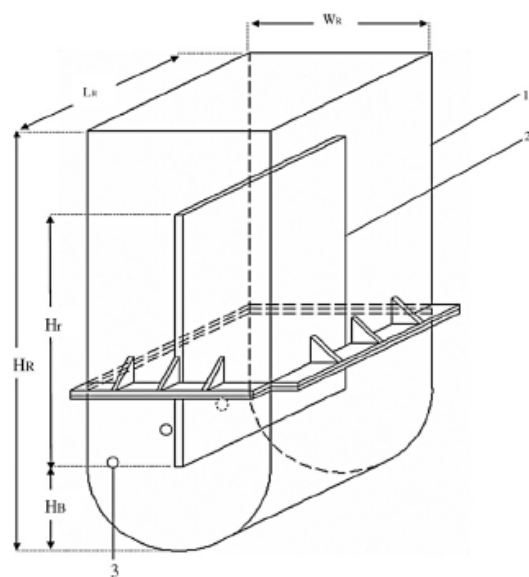


Fig. 1. Schematic diagram of flat plate airlift photobioreactor (FP-ALPBR): reactor column (1), vertical plate (2), spargers (3), column height (H_R), column length (L_R), column width (W_R), plate height (H_T), bottom clearance (H_B).

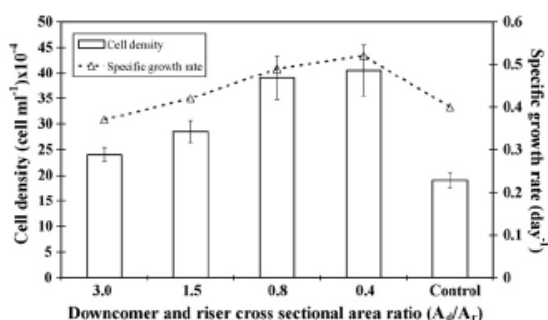


Fig. 2. Effect of downcomer and riser cross-sectional area (A_d/A_r) on cell density of *H. pluvialis* in 17I FP-ALPBR.

et al. (2006). Other conditions which were controlled were 1% CO_2 in the air supply, pH 7, and the light intensity of the fluorescence lamps (approximately $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

As demonstrated in Fig. 2, the highest values of cell density ($4.1 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$) and specific growth rate (0.52 day^{-1}) were obtained using the FP-ALPBR with the lowest value of A_d/A_r tested (0.4). In descending order, the next best results were obtained with A_d/A_r of 0.8 (cell density: $3.9 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$; specific growth rate: 0.49 day^{-1}), followed by A_d/A_r of 1.5 (cell density: $2.9 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$; specific growth rate: 0.42 day^{-1}), and A_d/A_r of 3.0 (cell density: $2.4 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$; specific growth rate: 0.37 day^{-1}). As expected, the bubble column produced the poorest performance (cell density: $1.9 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$; specific growth rate: 0.40 day^{-1}). In all experiments, after the first few days of cultivation, cell aggregation could be observed at the bottom of the column and this sedimentation increased continually to the final stage (day 15). The precipitation was minimized in the airlift using an A_d/A_r of 0.4, as the small downcomer induced a high liquid velocity (at the downcomer side) which then supported the uplift of the cell aggregates. Therefore, cell cultivation was simply promoted by keeping the downcomer-to-riser cross-sectional area ratio to a minimum (in this case, equal to 0.4).

Fig. 3 demonstrates the morphological changes observed in *H. pluvialis* from green vegetative cell to immature cells and cyst cells. This shows that the morphological changes to *H. pluvialis* were not particularly obvious during the growth stage, with only a few immature cells being observed at the end of each batch (around days 13–15). The effect of varying A_d/A_r on changes to *H. pluvialis* morphology, was investigated. However, the results were quite similar to each other across the whole range of A_d/A_r values tested. Cysts were never observed during the course of these experiments. Hence, only the green vegetative cells were measured and reported in the following discussion.

3.2. Effect of superficial velocity

During the vegetative growth stage of *H. pluvialis*, cells have two flagella and can move independently. Hence, despite the absence of circulation, the cells can move to the location most suitable for their growth (perhaps to a region of high light intensity and nutrient concentration). Nevertheless, such movement is quite slow and could be affected significantly by the liquid flow induced by aeration.

The following experiment was performed using the 17-I FP-ALPBR with A_d/A_r of 0.4, illuminated at $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and at pH 7. Fig. 4 illustrates the growth of *H. pluvialis* in the 17-I FP-ALPBR operating at different aeration rates (measured in terms of superficial gas velocity). It was evident that the optimal aeration rate was 0.4 cm s^{-1} . This resulted in a high cell density

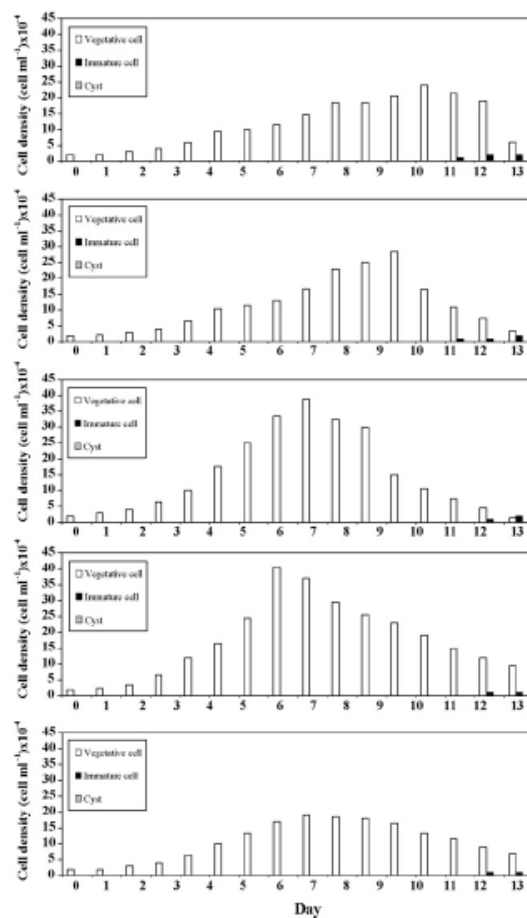


Fig. 3. Effect of downcomer and riser cross-sectional area (A_d/A_r) on morphology of *H. pluvialis* in 17I FP-ALPBR.

($4.1 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$) and specific growth rate (0.52 day^{-1}) that was equivalent to results obtained by Kaewpintong et al. (2006) using a smaller airlift system (3-I C-ALPBR). This level of growth is, however, relatively high compared to other examples reported in the literature. Reducing the aeration rate to 0.2 cm s^{-1} caused a decrease in cell density and specific growth rate (to $3.8 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$ and 0.44 day^{-1} , respectively), which could be due to an inadequate

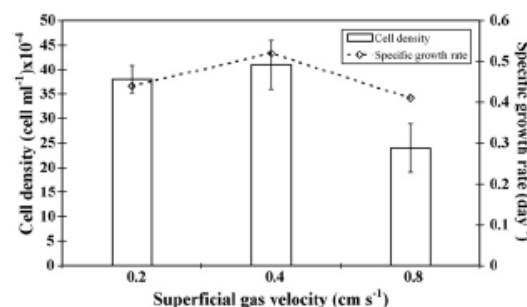


Fig. 4. Effect of aeration on cell density of *H. pluvialis* in 17I FP-ALPBR.

level of circulation in the system. When the aeration rate was increased above 0.4 cm s^{-1} , the growth rate seemed to slow down quite significantly, and at 0.8 cm s^{-1} , the system could only reach a maximum cell density of $2.4 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$ and specific growth rate of 0.41 day^{-1} . Although increasing the aeration rate gave rise to the mass transfer which prevented the accumulation of metabolic gases such as oxygen, a marked slowing in the growth rate also occurred. This might be explained by the excessive shear force which is induced at a high aeration rate. These results are in good agreement with previous reports that *H. pluvialis* cells are highly shear-sensitive and also that the shear stress caused by aeration can adversely affect cell growth (Gudin and Chaumont, 1991; Hata et al., 2001).

3.3. Semi-continuous cultivation of *H. pluvialis* in airlift systems

Semi-continuous cultivation was conducted in order to test the viability of a large-scale culture system that could operate more economically. The three types of airlift mentioned above – 3-l, 17-l C-ALPBR, and 17-l FP-ALPBR – were compared. The ratio between downcomer-to-riser cross-sectional area for these airlifts was fixed at 0.4. Cultivation of *H. pluvialis* in 3-l (Fig. 5a) and 17-l C-ALPBR (Fig. 5b) was carried out under the optimal conditions reported by Kaewpintong et al. (2006). Fig. 5c shows the semi-continuous cultivation in 17-l FP-ALPBR which was also operated at the same optimal conditions, i.e., $u_{sg} = 0.4 \text{ cm s}^{-1}$, light intensity = $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and pH 7.

At the beginning of the cultivation, the culture was allowed to grow until the maximum cell density for each system was attained,

i.e., 9.0×10^5 , 3.2×10^5 , and $3.5 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$ in 3-l, 17-l C-ALPBRs and 17-l FP-ALPBR, respectively. For the 3-l system, the highest cell density occurred after 6–8 days of cultivation. Thereafter, the culture was partially harvested where the harvested volume was calculated such that the initial cell concentration for the next cycle was maintained at $1.0 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$. The harvested volume was replaced with the newly prepared medium. The culture was then left to grow in each system until it reached the exponential growth phase or near the stationary phase (to ensure that cells were most active), whereupon the next harvest was carried out. The harvested cell densities (from Cycle 2 onwards) obtained from 3-l, 17-l C-ALPBRs and 17-l FP-ALPBR, were approximately 7.0×10^5 , 3.0×10^5 and $3.2 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$, respectively. Observation of the cells revealed that they maintained their vegetative form when this harvesting cycle was used. For the 3-l system, the cell density increased to the same level as in the previous cycle within a 7-day period, whereas each cycle required only about 3–4 days in the two 17-l systems. The productivities of semi-continuous cultures in 3-l, 17-l C-ALPBRs and 17-l FP-ALPBR were 1.2×10^5 , 0.7×10^5 and $0.77 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1} \text{ day}^{-1}$, respectively. This level of productivity was the same order of magnitude as that reported by Hata et al. (2001) ($1.1 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1} \text{ day}^{-1}$) using a small-scale (500 ml Erlenmeyer flask) semi-continuous culture.

3.4. Performance of the up-scale 90-l FP-ALPBR on cultivation of *H. pluvialis*

The 90-l airlift system was constructed to the specifications listed in Table 1 (denoted by the symbol 90-l FP-ALPBR). To date, this is perhaps the largest closed system used for *H. pluvialis* cultivation. The cultivation process was conducted with all operating conditions optimized (see Sections 3.1 and 3.2, i.e., $A_d/A_r = 0.4$, $u_{sg} = 0.4 \text{ cm s}^{-1}$, light intensity = $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and pH 7). With proper control of contamination, this system could be operated successfully. The performance of the 90-l airlift system is compared to that of other airlift systems in Fig. 6. Note that the results in Fig. 6 were obtained from separate “batch” experiments (triplicates), independent of the semi-continuous experiments whose results are illustrated in Fig. 5. Although these results indicated that the best performance was achieved using the 3-l C-ALPBR, the 90-l FP-ALPBR could achieve a reasonably high cell density of $4.0 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ with a specific growth rate of 0.39 day^{-1} . This was even greater than that obtained from the smaller scale 17-l C-ALPBR. It should be noted that the liquid level in the 17-l C-ALPBR was quite high (around 1.2 m) when compared to the other airlift systems tested in this study, and this could potentially be responsible for the relatively low growth rate

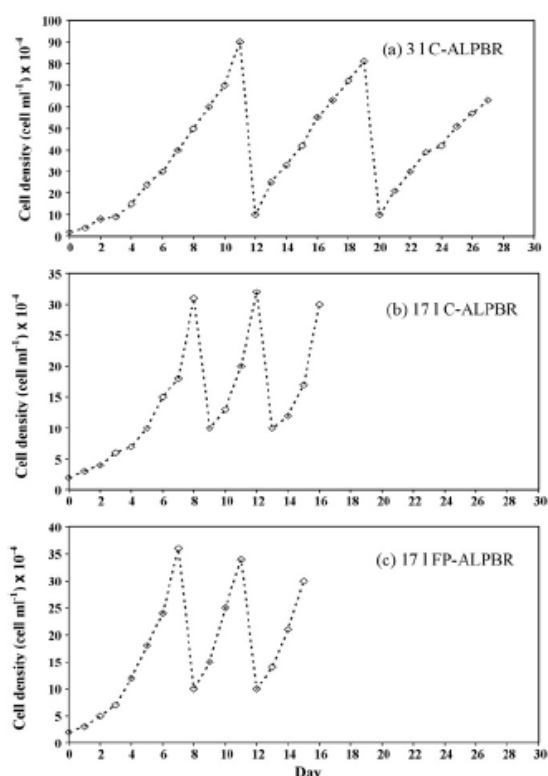


Fig. 5. Semi-continuous cultivation of *H. pluvialis* in the different airlift systems.

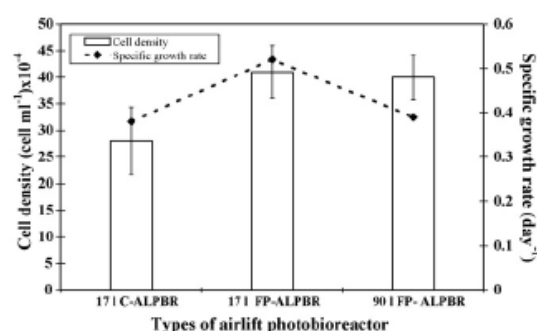


Fig. 6. Maximum cell density and specific growth rate of *H. pluvialis* in 17-l C-ALPBR, 17-l FP-ALPBR and 90-l FP-ALPBR; at suitable condition $u_{sg} = 0.4 \text{ cm s}^{-1}$, pH 7, light intensity = $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Table 2
Economic analysis for the cultivation of 3.6×10^{10} cells or 18 g of *Haematococcus pluvialis* in the various ALPBR systems.

		3 I C-ALPBR	17 I C-ALPBR	17 I FP-ALPBR	90 I FP-ALPBR
Harvested cell concentration (cell ml ⁻¹)		9.00E+05	2.80E+05	4.00E+05	4.00E+05
Effective volume (l)	[A]	3	17	17	90
Cycle time (days)	[B]	10	9	8	11
Productivity (cells day ⁻¹)	[C]	2.70E+08	5.29E+08	8.50E+08	3.27E+09
Specific productivity (cell l ⁻¹ day ⁻¹)	[D]	9.00E+04	3.11E+04	5.00E+04	3.64E+04
Cultivation time (days)	[E = (3.6 × 10 ¹⁰)/C]	1.33E+02	6.81E+01	4.24E+01	1.10E+01
Number of cycle	[F = E/B]	1.33E+01	7.56E+00	5.29E+00	1.00E+00
Total volume of water used (l)	[G = A × F]	4.00E+01	1.29E+02	9.00E+01	9.00E+01
Cost of water (1.7 × 10 ⁻³ US\$ l ⁻¹)	[H = 1.7 × 10 ⁻³ × G]	6.80E-02	2.19E-01	1.53E-01	1.53E-01
Cost of nutrient (2.8 × 10 ⁻² US\$ l ⁻¹)	[I = G × 2.8 × 10 ⁻²]	1.12E+00	3.60E+00	2.52E+00	2.52E+00
Power of air compressor (W)	[J]	60	200	200	400
Power of light source (W)	[K]	72	72	72	144
Total electrical unit (units)	[L = (J + K) × (E × 24)/1000]	4.22E+02	4.44E+02	2.76E+02	1.44E+02
Electrical cost (8.5 × 10 ⁻² US\$/unit)	[M = 8.5 × 10 ⁻² × L]	3.59E+01	3.78E+01	2.35E+01	1.22E+01
Reactor cost (US\$ day ⁻¹)	[N]	1.58E-01	2.20E-01	2.20E-01	4.06E-01
Pump cost (US\$ day ⁻¹)	[O]	2.82E-02	5.64E-02	5.64E-02	1.13E-01
Lamp cost (US\$ day ⁻¹)	[P]	2.26E-02	1.89E-02	2.26E-02	3.67E-02
Total operating cost (US\$)	[Q = H + I + M]	3.71E+01	4.16E+01	2.62E+01	1.49E+01
Total investment cost (US\$)	[R = E × (N + O + P) + Q]	6.49E+01	6.17E+01	3.88E+01	2.10E+01

Remark: 1 US\$ = 35.45 Thai Baht (rate at 26th February 2009).

of the alga. The growth rate obtained using the 90-I FP-ALPBR (0.39 day⁻¹) was slightly lower than that obtained from the 17-I FP-ALPBR (0.52 day⁻¹), possibly due to the inevitable non-uniformity of fluid flow in the large-scale system.

3.5. Economic considerations

An economical analysis of the various airlift systems used for cultivating *H. pluvialis* is displayed in Table 2. This analysis was based on the cost of producing 3.6×10^{10} cells (the quantity obtained from one batch of the 90-I FP-ALPBR), and the calculations were performed using the local utility costs in Thailand in 2008. The life-span of the reactor, pump, etc. was assumed to be 3 years (based on 300 operating days per annum). The results reveal that although operation of the 90-I FP-ALPBR involved higher utility costs, the unit cost of production in this large-scale system was comparatively low due to the large number of cells produced per batch. This compared favorably to the smaller systems which required several batches just to give the same quantity of cells. Hence, the 90-I FP-ALPBR should be considered the most attractive system, both in terms of investment and operating costs. In other words, the faster growth rate produced in the 3-I C-ALPBR and the 17-I FP-ALPBR could be offset by the larger harvesting volume in the 90-I system.

4. Conclusion

The successful use of the 3-I cylindrical airlift photobioreactor (C-ALPBR) to cultivate *H. pluvialis* by Kaewpintong et al. (2006) led to speculation that this system could be used on a larger scale. Enlarging the system to 17-I, caused a decline in performance in terms of cell growth rate, thus suggesting that a reduction in the performance of the system was a corollary of expansion. The alternative design of the airlift system proposed in this study – flat panel airlift photobioreactor (FP-ALPBR) – included a scale-up which could be achieved simply by increasing the length of the reactor. It was proven that with a proper ratio between downcomer and riser, the 90-I FP-ALPBR performed just as well as the 17-I FP-ALPBR, albeit with a marginally slower growth rate. However, the latter discrepancy was easily offset by a larger harvesting volume, and a simple economic analysis clearly indicated that the large-scale 90-I FP-ALPBR was the most cost-effective system evaluated in this study.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge financial support from the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund), Thailand Research Fund (TRF) and Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST).

References

- Chisti, M.Y., 1989. Airlift Bioreactors. Elsevier, New York, pp. 119–123.
- Del Rio, E., Acien, F.G., Garcia-Malea, M.C., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M.G., 2005. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 808–815.
- Del Rio, E., Acien, F.G., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M.G., 2008. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 397–402.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Garcia-Alvarez, D., Lamela, T., Otero, A., 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* 20, 623–626.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Masada, A., Otero, A., 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 530–535.
- Fabregas, J., Otero, A., Dominguez, A., 2001. Two-stage culture for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *J. Biotechnol.* 89, 57–65.
- Garcia-Malea, M.C., Acien, F.G., Del Rio, E., Fernandez, J.M., Rivas, J., Carmen Ceron, M., Guerrero, M.G., Molina-Grima, E., 2009. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2), 651–657.
- Garcia-Malea, M.C., Brindley, C., Del Rio, E., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Molina, E., 2005. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochem. Eng. J.* 26, 107–144.
- Garcia-Malea, M.C., Del Rio, E., Casas, J.L., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Rivas, J., Guerrero, M.G., Molina, E., 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J. Biotechnol.* 123, 329–342.
- Gudin, C., Chaumont, D., 1991. Cell fragility-The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 38, 145–151.
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., 2003. *Haematococcus pluvialis*: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 21, 210–216.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Yong, A.J., 1996a. Autotrophic growth and carotenoid production in 30 liter air-lift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 82 (2), 113–118.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Yong, A.J., 1996b. Factor responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 55, 207–214.
- Hata, N., Ogonna, J.C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H., 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *J. Appl. Phycol.* 13, 395–402.
- Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., Pavasant, P., 2006. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresour. Technol.* 98 (2), 288–295.
- Kobayashi, M., Kumura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y., 1997. Morphology change in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 94–97.
- Lorenz, R.T., Cysewski, G.R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18 (4), 160–167.

- Ranjbar, R., Inoue, R., Shiraishi, H., Katsuda, T., Katoh, S., 2008. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematooccus pluviialis* in a bubble column photobioreactor. *Biochem. Eng. J.* 39 (3), 575–580.
- Ruen-ngam, D., Wongsuchoto, P., Limpanuphap, A., Charinpanitkul, T., Pavasant, P., 2008. Influence of salinity on bubble size distribution and gas–liquid mass transfer in airlift contactors. *Chem. Eng. J.* 141, 222–232.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* 99, 4021–4028.
- Wongsuchoto, P., Charinpanitkul, T., Pavasant, P., 2003. Bubble size distribution and gas–liquid mass transfer in airlift contactors. *J. Chem. Eng.* 92, 81–90.

ภาคผนวก 3

**ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่
ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ**

กิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินการ			
	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 6-12	เดือนที่ 12-18	เดือนที่ 18-24
1.1 การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยง <i>H. pluvialis</i> ในระดับห้องปฏิบัติการ				
1.2 การเพาะเลี้ยงในระดับ 3 ลิตร				
1.3 การเพาะเลี้ยงในระดับ 17 ลิตร				
1.4 การเพาะเลี้ยงในระบบแนวนราบเพื่อช่วยในการขยายขนาด				
2.1 การศึกษาผลของตัวแปรในการกระตุ้นสารสีในระดับ ห้องปฏิบัติการ				
2.2 การศึกษาการกระตุ้นสารสีในป๋อกลางแจ้ง				
3.1 การทบทวนผลการสกัดสารแอสตาแซนทินด้วยตัวทำละลายชนิด ต่างๆ	ยกเลิกจากมติการประชุม			
3.2 การศึกษาการสกัดสารแอสตาแซนทิน ด้วยวิธีไมโครเวฟ	ยกเลิกจากมติการประชุม			
3.3 ศึกษาเทคนิคในการตรวจวัดสารแอสตาแซนทินด้วย HPLC				
4.1 ศึกษาถึงต้นทุนและผลได้ที่จะได้รับการผลิต เพื่อหาจุดคุ้มทุน และตอบคำถามเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการลงทุน				

หมายเหตุ แถบสีเทา แสดงถึงแผนการวิจัยที่กำหนดไว้

 แถบสีดำ แสดงถึงแผนการวิจัยที่ได้ทำจริง

 ในหัวข้อที่ 3.1 และ 3.2 ถึงแม้ว่าจะมีมติยกเลิกแล้ว แต่ได้ทำการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการออกแบบระบบต่อไป