

4.4 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

ดำเนินการวิจัย ณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยผลของการดำเนินการมีดังต่อไปนี้

4.4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายและทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิตมวลและผลิตก๊าซรวมได้สูงสุด

ทำการศึกษาสาหร่าย 2 สายพันธุ์ คือ Amphora และ Spirulina เพื่อนำมาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตมวลและก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดจากสาหร่าย และทำการเปรียบเทียบอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและอัตราการผลิตมวลจากสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย 1 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตมวลและก๊าซรวมได้สูงสุดในสภาวะที่เหมาะสม

1. สภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพสูงสุด

1. นำอาหารเลี้ยงจุลสาหร่ายจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Amphora ปรับค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงจุลสาหร่าย โดยทำการทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส คงที่ตลอดเวลาการเลี้ยงโดยการปล่อยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงในขวดรูปชมพู่สำหรับเพาะเลี้ยง ขนาด 500 มิลลิลิตร

2. อาหารและสาหร่ายปริมาตร 300 มิลลิลิตรโดยค่าความเป็นกรด-เบส ที่จะทำการทดสอบได้แก่ค่าความเป็นกรด-เบสที่ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-เบสปริมาตรอาหารรวมสาหร่ายคือ 300 มิลลิลิตร

3. นำอาหารเลี้ยงจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Spirulina ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงจุลสาหร่าย โดยทำการทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส คงที่ตลอดเวลาการเลี้ยงโดยการปล่อยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงในขวดรูปชมพู่สำหรับเพาะเลี้ยง ขนาด 500 มิลลิลิตร

4. ซึ่งมีอาหารและสาหร่ายปริมาตร 300 มิลลิลิตรโดยค่าความเป็นกรด-เบสที่จะทำการทดสอบได้แก่ค่าความเป็นกรด-เบส ที่ 7, 8, 9, 10 และ 11 เลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-เบสปริมาตรอาหารรวมสาหร่ายคือ 300 มิลลิลิตร

5. นำไปเพาะเลี้ยงบนชั้นเขย่าที่ให้แสงด้านบน เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที

6. ทำการทดลองข้อ 1-5 สำหรับค่าความเป็นกรด-เบสที่ต่างกันเพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายบันทึกผลการทดลองทุก 12 ชั่วโมง

2. สภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมผลิตแก๊สรวมสูงสุด

1. นำจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Amphora ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของจุลสาหร่าย โดยทำการทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่ตลอดเวลาการเลี้ยงโดยการปล่อยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงในขวดขนาด 350 มิลลิลิตร

2. จุลสาหร่ายปริมาตร 300 มิลลิลิตรโดยค่าความเป็นกรด-เบส ที่จะทำการทดสอบได้แก่ค่าความเป็นกรด-เบส ที่ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10

3. นำจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Spirulina ปรับค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงจุลสาหร่าย โดยทำการทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส คงที่ตลอดเวลาการเลี้ยงโดยการปล่อยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงในขวดขนาด 350 มิลลิลิตร

4. มีอาหารและสาหร่ายปริมาณ 300 มิลลิลิตรโดยค่าความเป็นกรด-เบส ที่จะทำการทดสอบได้แก่ค่าความเป็นกรด-เบส ที่ 7, 8, 9, 10 และ 11
5. นำขวดสาหร่ายต่อเข้ากับชุดเก็บแก๊ส
6. นำไปเพาะเลี้ยงบนชั้นเขย่าที่ให้แสงด้านบน เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที
7. ทำการทดลองข้อ 1-6 สำหรับค่าความเป็นกรด-เบส ที่ต่างกัน เพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายบันทึกผลการทดลองทุก 1 ชั่วโมง
8. วิเคราะห์ผลเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่ดีที่สุดเพื่อนำไปศึกษาที่สภาวะต่อไป

4.4.2 หาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ ที่ใช้ในการฟอรั่มตัว

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวัสดุที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการตรึงเซลล์จุลสาหร่ายด้วยอัลจิเนท โดยจะใช้อัลจิเนทความเข้มข้น คือ อัลจิเนท 2 เปอร์เซ็นต์ (w / v) หยดลงในสารละลายของการฟอรั่มตัว 2 ชนิด คือ แคลเซียมคลอไรด์ (2, 4 เปอร์เซ็นต์) และสตรอนเทียมคลอไรด์ (2, 4 เปอร์เซ็นต์)

1. ชั่งอัลจิเนท 2 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร
2. ชั่งจุลสาหร่ายสไปรูลิน่า 1.5 กรัม (เปียก) ผสมกับสารละลายอัลจิเนทในข้อที่ 1
3. คนเบาๆ จนเป็นเนื้อเดียวกัน
4. ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
5. ดูดสารละลายอัลจิเนทที่ผสมกับเซลล์จุลสาหร่ายหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์
6. แช่สารละลายอัลจิเนทที่ผสมกับเซลล์จุลสาหร่ายที่หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ล้างเม็ดที่แช่ไว้ด้วยน้ำทะเล และนำมาเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงจุลสาหร่าย
8. วัดความแข็งแรงของเม็ดที่ตรึงด้วยอัลจิเนทและความมีชีวิตรอดของจุลสาหร่ายที่อยู่ในเม็ดตรึง

4.4.3 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนท

1. หาความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนทที่เหมาะสมกับสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

1. ชั่งอัลจิเนท 2 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร
2. ชั่งจุลสาหร่ายสไปรูลิน่า 1.5 กรัม (เปียก) ผสมกับสารละลายอัลจิเนทในข้อที่ 1
3. คนเบาๆ จนเป็นเนื้อเดียวกัน
4. ชั่งสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
5. ดูดสารละลายอัลจิเนทที่ผสมกับเซลล์จุลสาหร่าย หยดลงในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์
6. แช่สารละลายอัลจิเนทที่ผสมกับเซลล์จุลสาหร่าย ที่หยดลงในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. ล้างเม็ดที่แช่ไว้ด้วยน้ำทะเล และนำมาเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงจุลสาหร่าย
8. ทำซ้ำข้อ 1-7 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนทเป็น 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0% (w/v) ตามลำดับ
9. วัดความแข็งแรงของเม็ดที่ตรึงด้วยอัลจิเนทและความมีชีวิตรอดของจุลสาหร่ายที่อยู่ในเม็ดตรึง

2. หาปริมาณของจุลสาหร่ายที่เหมาะสม

เมื่อได้อัตราส่วนของอัลจิเนทที่เหมาะสมกับสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ 2% (w/v) แล้วจึงนำมาทำการหาปริมาณของจุลสาหร่ายที่เหมาะสมกับอัตราส่วนนี้ โดยทำการเปลี่ยนปริมาณของจุลสาหร่ายเป็น 0.750, 1.500, 1.875 และ 2.250 กรัม (เปียก) ตามลำดับ วัดความแข็งแรงของเม็ดที่ตรึงด้วยอัลจิเนทและความมีชีวิตรอดของจุลสาหร่ายที่อยู่ในเม็ดตรึง

3. ทหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอร์มตัวของอัลจิเนท

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วจะทำการหาระยะเวลาที่อัลจิเนทใช้ในการฟอร์มตัวกับสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ โดยเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการฟอร์มตัวคือ 2 และ 12 ชั่วโมงวัดความแข็งแรงของเม็ดที่ตรึงด้วยอัลจิเนทและความมีชีวิตรอดของจุลสาหร่ายที่อยู่ในเม็ดตรึง

4.4.4 การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนทและเคลือบด้วยไคโตซาน

1. อัลจิเนท (alginate 4%) 50 มิลลิลิตร และสตรอนเทียมคลอไรด์ (SrCl_2 4%) 100 มิลลิลิตร
2. กรองเซลล์สาหร่าย 300 มิลลิลิตร (1.5 กรัม (เปียก))
3. นำเซลล์สาหร่ายที่กรองได้ใส่ผสมลงไปอัลจิเนท คนเบาๆจนเป็นเนื้อเดียวกัน
4. หยดสารละลายอัลจิเนทที่ผสมกับเซลล์สาหร่ายเรียบร้อยแล้วลงในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์โดยใช้ เข็มฉีดยาเบอร์ 18 และ 22 ในการหยดซึ่งให้เม็ดตรึงมีขนาด 2.3 มิลลิเมตรและ 1.5 มิลลิเมตร
5. แช่ทิ้งไว้ในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. เตรียมไคโตซาน 0.2, 0.4, 0.6% (w/v) ตามลำดับ ละลายลงในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
7. นำสารละลายที่ได้มาปรับค่า pH ด้วย NaOH ให้มี pH ระหว่าง 5.7-6
8. นำสารละลายที่ได้ไปความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
9. จากนั้นทำให้สารละลายไคโตซานเย็นตัวลง
10. นำเม็ดอัลจิเนทที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ แช่ลงในสารละลายไคโตซานแล้วนำไปแช่ยา ที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
11. ล้างเม็ดตรึงและนำไปเลี้ยงตามปกติโดยแบ่งการเลี้ยง ดังนี้
 - ชุดที่ 1 เม็ดตรึงขนาด 2.3 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 1200 ลักซ์
 - ชุดที่ 2 เม็ดตรึงขนาด 2.3 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 1600 ลักซ์
 - ชุดที่ 3 เม็ดตรึงขนาด 2.3 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 2000 ลักซ์
 - ชุดที่ 4 เม็ดตรึงขนาด 2.3 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 4000 ลักซ์
 - ชุดที่ 5 เม็ดตรึงขนาด 2.3 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 6000 ลักซ์
 - ชุดที่ 6 เม็ดตรึงขนาด 2.3 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 8000 ลักซ์
 - ชุดที่ 7 เม็ดตรึงขนาด 1.5 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 4000 ลักซ์
 - ชุดที่ 8 เม็ดตรึงขนาด 1.5 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 6000 ลักซ์
 - ชุดที่ 9 เม็ดตรึงขนาด 1.5 มิลลิเมตร เลี้ยงโดยให้ออกซิเจนและแสงไฟ 8000 ลักซ์

4.4.5 การวัดผล

1. วัดขนาดของเม็ดตรัง

เป็นการวัดเพื่อดูว่าเม็ดตรังนั้นมีการหลุดสลายหรือไม่ โดยนำตัวอย่างเม็ดมา 10 เม็ด มาวัดขนาด โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ เกลี่ยค่าออกมาซึ่งทำการวัดผลแบบนี้ทุกวันเพื่อดูแนวโน้มของผลว่าเม็ดที่ผ่านการเคลือบนั้นจะรักษารูปร่างและขนาดได้เป็นระยะเวลาเท่าใด

2. การวัดความแข็งแรงของเม็ดตรังที่เคลือบไคโตซาน

การวัดความแข็งแรงของเม็ดตรัง ได้จากการวัดค่าความขุ่นที่เพิ่มขึ้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในเม็ดที่ตรึงโดยอาศัยหลักการคือสารแขวนลอยจะสามารถดูดกลืนแสงและกระจายแสงที่ผ่านตัวมันได้ซึ่งปริมาณแสงที่กระจายออกไปจะเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์ซึ่งค่าจะออกมาเป็นร้อยละของแสงที่ผ่านออกมา (% transmittance) แต่โดยทั่วไปจะนิยมอ่านเป็นค่าความขุ่น (optical density; OD) ซึ่งค่าความขุ่นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์ดังนั้นจึงอาศัยหลักการนี้ในการวัดการเปื่อยยุ่ยและการหลุดลอกของเม็ดอัลจินทที่ถูกเคลือบด้วยไคโตซานเพื่อดูว่าเม็ดมีการเปื่อยยุ่ยมากน้อยเพียงใดเมื่อเวลาผ่านไประยะเวลาหนึ่งถ้าอาหารที่เลี้ยงมีความขุ่นมากแสดงว่าเม็ดเปื่อยยุ่ยหลุดลอกออกมามาก แต่ถ้าอาหารที่ใช้เลี้ยงมีความขุ่นน้อยแสดงว่าเม็ดมีความแข็งแรงเปื่อยยุ่ยน้อยนั่นเองโดยจะทำการวัดทุกวัน วิธีการวัดมีดังนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงจุลสาหร่ายจากในขวดที่ทำการตรึงเซลล์และเคลือบไคโตซาน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงคิวเวตต์ (Cuvette)

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

3. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่าง

4. วัดค่าทุกวันเป็นเวลา 7 วันบันทึกค่าการดูดกลืนแสง

3. การวัดการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์จุลสาหร่ายภายในเม็ดตรัง

เป็นการดูว่าเมื่อได้ทำการตรึงจุลสาหร่ายด้วยอัลจินทและทำการเคลือบด้วยไคโตซานเพื่อเพิ่มความคงทนให้แก่เซลล์แล้วนั้นเซลล์สามารถเจริญต่อไปได้หรือไม่จึงทำการทดสอบดังนี้

1. นำเม็ดที่ตรึงเซลล์แล้วมาจำนวน 5 เม็ด ใส่ลงในสารละลาย 0.5 M ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-sodium citrate) 1 มิลลิลิตร

2. ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมงหรือจนกว่าเม็ดจะละลายหมด

3. เขย่าให้เข้ากัน

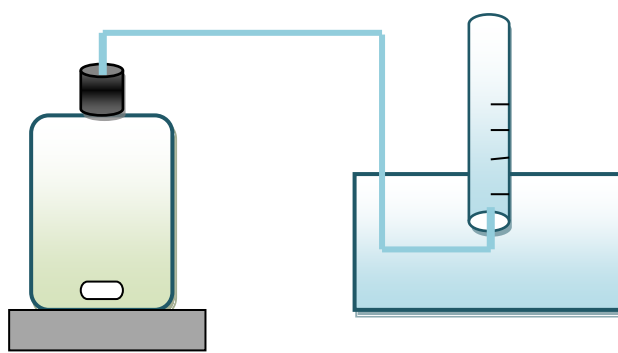
4. ใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์มาทำการนับด้วยกระຈຈး Haemocytometer

5. ทำการนับเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 7 วันบันทึกจำนวนเซลล์

4.4.6 เปรียบเทียบปริมาณแก๊สไฮโดรเจน

ทำการเปรียบเทียบปริมาณแก๊สไฮโดรเจนระหว่างเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ตรึงด้วยอัลจินทและเซลล์ที่ตรึงด้วยอัลจินทเคลือบไคโตซาน

1. นำสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ในขวดปริมาตร 350 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับชุดการเก็บก๊าซ (Guan et al, 2003) ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ชุดการเก็บแก๊สไฮโดรเจน

ชุดการเก็บแก๊สจะประกอบด้วย ขวดแก้วเลี้ยงสาหร่ายปริมาตร 350 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสาหร่ายปริมาตร 300 มิลลิลิตร และแท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar) ตั้งอยู่บนเครื่องปั่นหมุนด้วยแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) เพื่อให้สาหร่ายกระจายรับแสงอย่างสม่ำเสมอ ที่ปากขวดจะมีจุกยางปิดปากขวดไว้ โดยจุกยางนี้มีหลอดแก้วเสียบอยู่ ซึ่งหลอดแก้วจะเชื่อมต่อกับสายยางซิลิโคน ส่วนปลายสายยางอีกด้านหนึ่งต่อเข้าไปในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำอยู่ภายในแล้วคว่ำหัวลงในบีกเกอร์ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่ใส่น้ำไว้ 500 มิลลิลิตร ที่ปลายบิวเรตต้องจุ่มอยู่ในน้ำในบีกเกอร์ ส่วนปลายอีกด้านของบิวเรตต้องปิดให้สนิทด้วยพาราฟิน เพื่อไม่ให้แก๊สรั่วไหลออก

2. วัดปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยอ่านสเกลของบิวเรต ซึ่งเป็นปริมาตรน้ำที่ถูกแทนที่ด้วยแก๊สภายในบิวเรตนั่นเอง

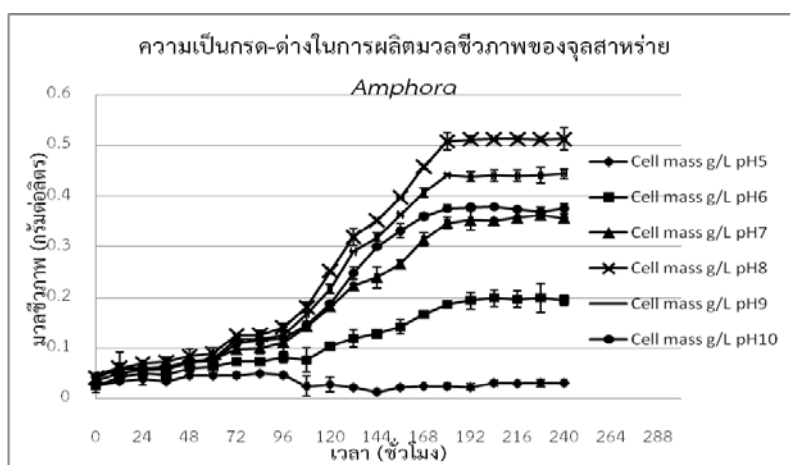
4.5 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.5.1 ผลการวิจัย

4.5.1.1 การเปรียบเทียบและคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตมวลและแก๊สไฮโดรเจนได้สูงสุด

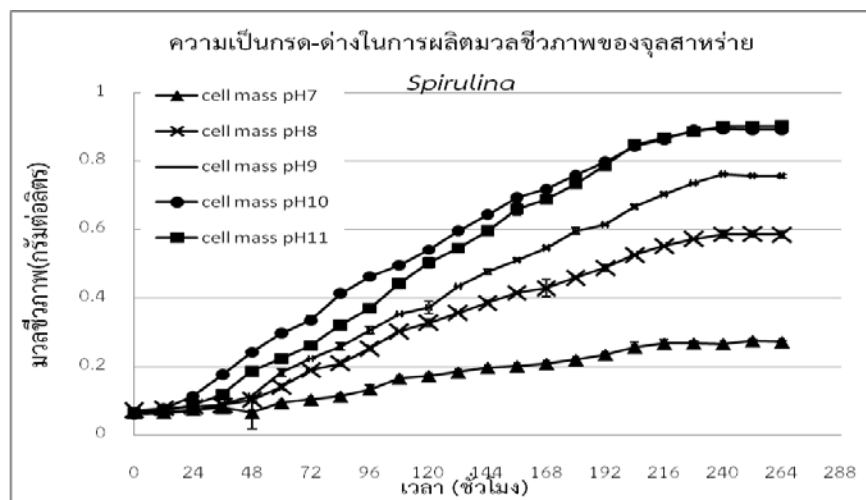
1. การหาสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตมวลชีวภาพของจุลสาหร่ายสูงสุด

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อ ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตมวลชีวภาพและแก๊สรวมสูงสุด อันดับแรกที่จะทำการศึกษาคือ ศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมที่สามารถทำให้จุลสาหร่ายผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุด อันเนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-เบส มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย ซึ่งจุลสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีอัตราการเจริญเติบโตในค่าความเป็นกรด-เบสที่แตกต่างกัน โดยศึกษาจุลสาหร่าย 2 สายพันธุ์คือ แอมฟอรัรา (Amphora sp.) จะทำการทดลองปรับค่ากรด-เบส เป็น 6 ค่า คือ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 และ สไปรูลินา (Spirulina sp.) จะทำการทดลองปรับค่ากรด-เบส เป็น 5 ค่า คือ 7, 8, 9, 10 และ 11 โดยจะนำสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์มาใส่ในขวดชมพูปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยทำการวัดผลการทดลองทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายซึ่งเปรียบเทียบจากน้ำหนักแห้งของสาหร่าย โดยค่าที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 ดังนี้



รูปที่ 4.4 สภาพความเป็นกรด-เบส ต่อการเพิ่มมวลชีวภาพของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Amphora sp.

รูปที่ 4.4 แสดงผลศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการเพิ่มมวลชีวภาพของจุลสาหร่าย Amphoras sp. ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ซึ่งมีผลต่อเลี้ยงเพื่อการผลิตมวลชีวภาพทุกๆ 12 ชั่วโมง จะสังเกตได้ว่าค่าความเป็นกรด-เบส 5 ในช่วงเวลาที่ 0-12 จุลสาหร่ายสามารถผลิตมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากนั้นจะมีปริมาณการผลิตมวลชีวภาพที่คงที่ ในช่วงเวลาที่ 12-100 ชั่วโมง ในช่วงเวลาที่ 100 เป็นต้นไป ปริมาณการผลิตมวลชีวภาพมีอัตราการผลิตที่ลดลงเล็กน้อย และมีปริมาณการผลิตที่คงที่จนถึงชั่วโมงที่ 240 และที่ค่าความเป็นกรด-เบสที่ 6 ถึง 10 จะสามารถแบ่งการผลิตมวลชีวภาพออกเป็น 3 ช่วง เท่าๆกัน ดังนี้ ช่วงแรกชั่วโมงที่ 0-48 ช่วงที่สองชั่วโมงที่ 60-192 และช่วงสุดท้ายชั่วโมงที่ 192-240 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 180 โดยสามารถผลิตได้ปริมาณสูงสุดที่ 0.51 กรัมต่อลิตร ถัดมาที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 192 สามารถผลิตได้สูงสุดที่ 0.32 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 8 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 192 สามารถผลิตได้สูงสุดที่ 0.61 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 9 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 204 สามารถผลิตได้สูงสุดที่ 0.58 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายที่ค่าความเป็นกรด-เบส 9 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 192 สามารถผลิตได้ปริมาณสูงสุดที่ 0.44 กรัม จึงสรุปได้ว่าการเลี้ยง จุลสาหร่าย Amphora sp. ในค่าความเป็นกรด-เบส 8 มีปริมาณการเพิ่มมวลชีวภาพได้ดีที่สุด



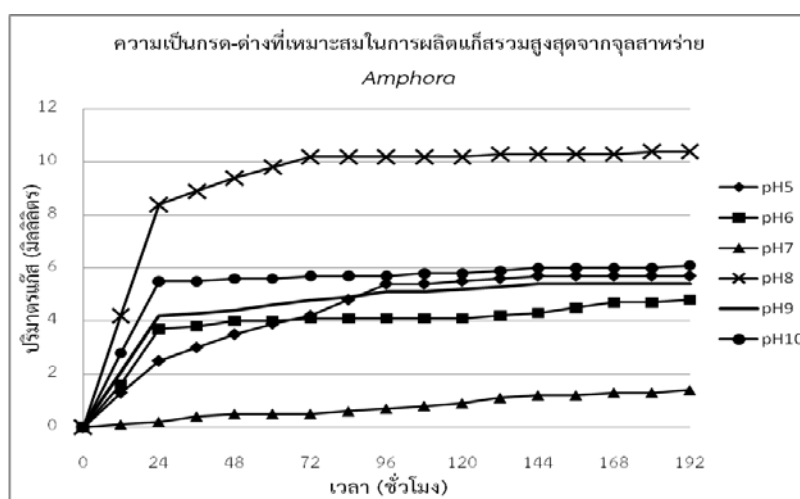
รูปที่ 4.5 สภาพความเป็นกรด-เบส ต่อการเพิ่มมวลชีวภาพของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Spirulina sp.

รูปที่ 4.5 แสดงผลการหาสภาวะความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมในการเพิ่มมวลชีวภาพของจุลสาหร่าย Spirulina sp. ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ซึ่งมีผลต่อการเลี้ยงเพื่อการผลิตมวลชีวภาพทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส 11 มีอัตราการผลิตมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มขึ้นในปริมาณมาก โดยสามารถแบ่งช่วงอัตราการผลิตมวลชีวภาพ ได้เป็น 3 ช่วงๆเท่าๆกัน คือ ช่วงแรก 0-48 ชั่วโมง เป็นช่วงที่ยังไม่มีอัตราการเพิ่มของมวลชีวภาพ ช่วงที่สอง คือชั่วโมงที่ 60-228 เป็นช่วงที่มีอัตราการผลิตมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และช่วงสุดท้ายคือ ชั่วโมงที่ 228-264 เป็นช่วงสุดท้าย ที่มีอัตราการผลิตมวลชีวภาพที่คงที่กล่าวคือ จุลสาหร่ายจะหยุดการผลิตมวลชีวภาพในช่วงเวลานี้ ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 7 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 228 สามารถผลิตได้สูงสุดที่ 0.27 กรัมต่อลิตร ถัดมาที่ค่าความเป็นกรด-เบส 8 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 240 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดที่ 0.59 กรัมต่อลิตร ถัดมาที่ค่าความเป็นกรด-เบส 9 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 240 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดที่ 0.76 กรัมต่อลิตร ถัดมาที่ค่าความเป็นกรด-เบส 10

สามารถผลิตมวลชีวภาพ ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 240 สามารถผลิตได้สูงสุดที่ 0.90 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายที่ค่าความเป็นกรด-เบส 11 สามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 240 สามารถผลิตได้สูงสุดที่ 0.905511 กรัมต่อลิตร จึงสรุปได้ว่าการเลี้ยงจุลสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 10 และ 11 มีอัตราการเพิ่มมวลชีวภาพได้ดีที่สุดและสามารถผลิตมวลชีวภาพได้ใกล้เคียงกัน

2 สภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สรวมสูงสุดจากจุลสาหร่าย

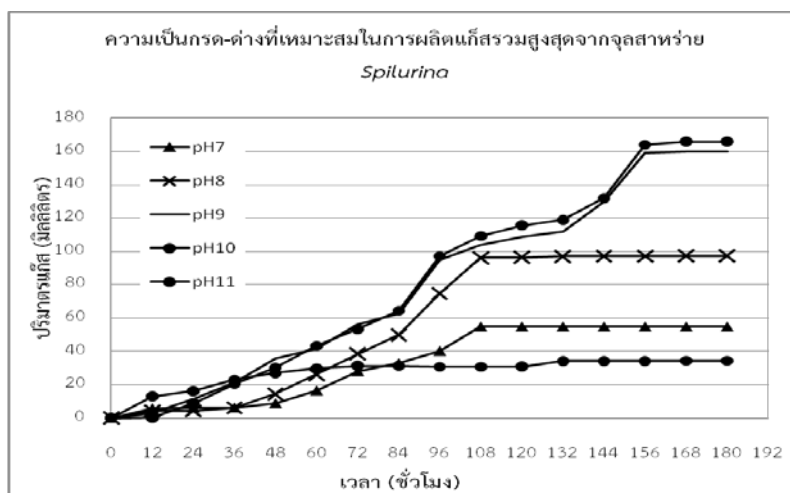
การทดลองนี้ทำขึ้น เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตแก๊สรวมสูงสุด อันเนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-เบส มีผลต่อการผลิตแก๊สรวมของจุลสาหร่าย ซึ่งจุลสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีอัตราการผลิตแก๊สรวม ในค่าความเป็นกรด-เบสที่แตกต่างกัน โดยศึกษาจุลสาหร่าย 2 สายพันธุ์ คือ *Amphora* sp. จะทำการทดลองปรับค่ากรด-เบส เป็น 6 ค่า คือ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 และ *Spirulina* sp. จะทำการทดลองปรับค่ากรด-เบส เป็น 5 ค่า คือ 7, 8, 9, 10 และ 11 โดยนำจุลสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์มาใส่ในขวด 300 มิลลิลิตร และต่อเข้ากับชุดเก็บแก๊ส โดยทำการวัดผลการทดลองทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญเติบโตของจุลสาหร่าย ซึ่งเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งของจุลสาหร่าย โดยค่าที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 ดังนี้



รูปที่ 4.6 สภาพความเป็นกรด-เบส ต่อการเพิ่มแก๊สรวมของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Amphora* sp.

รูปที่ 4.6 แสดงผลการศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สรวมของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Amphoras* sp. ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ต่อการผลิตแก๊สรวมทุกๆ 12 ชั่วโมง จะสังเกตได้ว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส 5 จุลสาหร่าย *Amphora* sp. ผลิตแก๊สรวมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-24 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 144 และจะผลิตแก๊สคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งมีปริมาณแก๊สทั้งหมด 5.7 มิลลิลิตร ลำดับต่อมาค่าความเป็นกรด-เบส 6 จุลสาหร่าย *Amphora* sp. ผลิตแก๊สรวมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-60 และหลังจากนั้นจะมีปริมาณการผลิตแก๊สคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งมีปริมาณแก๊สทั้งหมด 4.8 มิลลิลิตร ลำดับต่อมาค่าความเป็นกรด-เบส 7 จุลสาหร่ายผลิตแก๊สรวมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดช่วง 0-180 ซึ่งมีปริมาณแก๊สทั้งหมด 1.4 มิลลิลิตร ลำดับต่อมา ค่าความเป็นกรด-เบส 8 จุลสาหร่ายผลิตแก๊สไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจะมีการผลิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 60 และผลิตจนคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งมีปริมาณแก๊สทั้งหมด 10.4 มิลลิลิตร ลำดับต่อมา ค่าความเป็นกรด-เบส 9 จุลสาหร่ายผลิตแก๊สไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นจะผลิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนการผลิตคงที่ในชั่วโมงที่ 180 ซึ่งมี

ปริมาณแก๊สทั้งหมด 5.4 มิลลิลิตร ลำดับสุดท้าย ค่าความเป็นกรด-เบส 10 จุลสาหร่ายผลิตแก๊สไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-36 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นจะมีปริมาณการผลิตที่ค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 132 และจะผลิตคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งปริมาณแก๊สทั้งหมด 6.1 มิลลิลิตร จะสรุปได้ว่า จุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Amphora sp.* สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส 8



รูปที่ 4.7 สภาพความเป็นกรด-เบส ต่อการเพิ่มแก๊สรวมของจุลสาหร่าย สายพันธุ์ *Spilurina sp.*

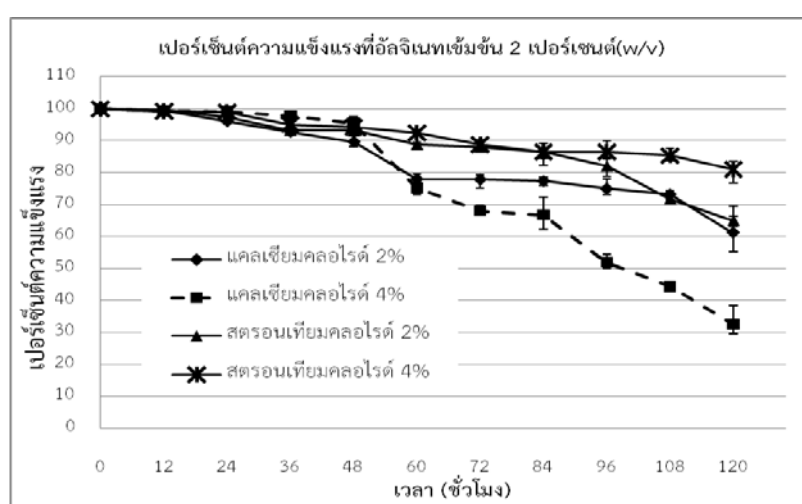
รูปที่ 4.7 แสดงผลศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะในการเพิ่มแก๊สรวมของจุลสาหร่าย *Spilurina sp.* ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ต่อการผลิตแก๊สรวมทุก 12 ชั่วโมง จะสังเกตได้ว่า ค่าความเป็นกรด-เบส 7 จุลสาหร่าย *Spilurina sp.* ผลิตแก๊สรวมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-48 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจะผลิตแก๊สเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 60-96 ชั่วโมง และจะผลิตแก๊สแบบคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งมีปริมาณแก๊สทั้งหมด 55 มิลลิลิตร ลำดับต่อมา ค่าความเป็นกรด-เบส 8 จุลสาหร่าย *Spilurina sp.* ผลิตแก๊สรวมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-36 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจุลสาหร่าย *Spilurina sp.* จะผลิตแก๊สเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 48-108 และจะผลิตคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งปริมาณแก๊สทั้งหมด 97.4 มิลลิลิตร ลำดับต่อ ค่าความเป็นกรด-เบส 9 จุลสาหร่าย *Spilurina sp.* ผลิตแก๊สรวมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-36 ชั่วโมงแรกและหลังจากนั้นจะผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 120 จะผลิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 144 และหลังจากนั้นจะผลิตแบบคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งปริมาณแก๊สทั้งหมด 160 มิลลิลิตร ลำดับต่อมา ค่าความเป็นกรด-เบส 10 จุลสาหร่ายผลิตแก๊สรวมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจะผลิตแก๊สเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 156 และจะผลิตแบบคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งปริมาณแก๊สทั้งหมด 166 มิลลิลิตร ลำดับสุดท้าย ค่าความเป็นกรด-เบส 11 จุลสาหร่าย *Spilurina sp.* ผลิตแก๊สเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 0-36 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นจะผลิตแก๊สเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 120 และจะผลิตแก๊สคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 180 ซึ่งปริมาณแก๊สทั้งหมด 34.3 มิลลิลิตร จะสรุปได้ว่าจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Spilurina sp.* สามารถผลิตแก๊สรวมได้สูงที่ค่าความเป็นกรด-เบส 10

4.5.1.2 หาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ ที่ใช้ในการฟอร์มตัว

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวัสดุที่ดี และเหมาะสมที่สุดในการตรึงเซลล์จุลสาหร่ายด้วยอัลจิเนท โดยจะใช้อัลจิเนทความเข้มข้น คือ อัลจิเนท 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หยดลงในสารละลายของการฟอร์มตัว 2 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ (2, 4 เปอร์เซ็นต์) และสตรอนเทียมคลอไรด์ (2, 4 เปอร์เซ็นต์) โดยพิจารณาด้วยกัน 2 ด้าน ด้านแรกพิจารณาในเรื่องของความแข็งแรงของเม็ด พิจารณาที่

ค่าความชุ่มชื้นของอาหารโดยจะทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายที่ผ่านการตรึงแล้วทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดความชุ่มชื้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งการวัดความชุ่มชื้นเป็นวิธีการโดยอ้อมที่แสดงให้เห็นถึงปริมาณของแข็งที่เพิ่มขึ้นในอาหาร และปริมาณของแข็งที่เพิ่มขึ้นเหล่านี้เอง จะเป็นตัวสะท้อนกลับให้เห็นถึงปริมาณการสลายตัวหรือการหลุดลอกของเม็ดได้ ด้านที่สองที่จะพิจารณา คือ เรื่องของการมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเก็บตัวอย่างเม็ดที่ตรึงทุกๆ 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการแตกเม็ดที่ตรึงด้วยไตรโซเดียมซิเตรท เมื่อเม็ดแตกแล้วก็นำไปนับจำนวนเซลล์ด้วยกระจก้นเซลล์ โดยนับผ่านกล้องจุลทรรศน์ จำนวนเซลล์ที่นับได้จะแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ในเม็ดตรึงนั้นๆ ซึ่งก็จะสะท้อนให้เห็นถึงการมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตของเซลล์ ผลการประเมินในด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นนั้นแสดงได้ดังนี้

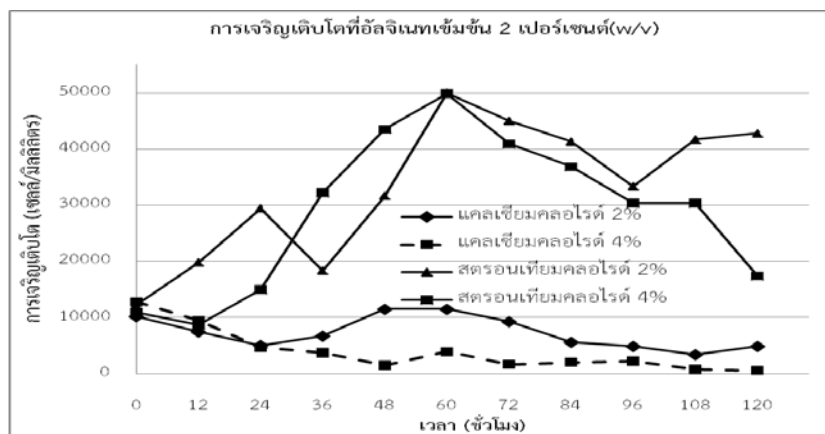
1. เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงของเม็ดอัลจินท



รูปที่ 4.8 ความแข็งแรงของเม็ดอัลจินทเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ ที่สารละลายต่างๆ

รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงกับระยะเวลา พบว่าในช่วง 48 ชั่วโมงแรก เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงค่อนข้างคงที่ และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในชั่วโมงที่ 60 เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมงพบว่า ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซนต์ที่เวลา 120 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงเท่ากับ 61.22 เปอร์เซนต์ ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซนต์ 120 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงเท่ากับ 32.53 เปอร์เซนต์ ส่วนที่ความเข้มข้นของสตรอนเทียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซนต์ ที่เวลา 120 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงเท่ากับ 65.01 เปอร์เซนต์ และความเข้มข้นของสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซนต์ ที่เวลา 120 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงเท่ากับ 80.97 เปอร์เซนต์ตามลำดับ จากค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงดังกล่าวจะเห็นได้ว่า การใช้สตรอนเทียมคลอไรด์ให้ความแข็งแรงมากที่สุด อย่างไรก็ตามจำเป็นที่จะต้องดูอัตราการเจริญเติบโตควบคู่กันไปด้วย

2. การมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย



รูปที่ 4.9 การมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายของเม็ดอัลจินทเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่สารละลายต่างๆ

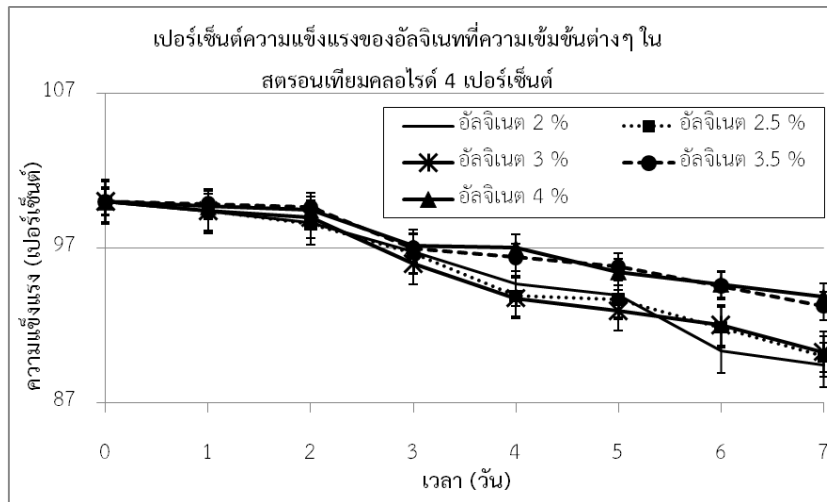
รูปที่ 4.9 เมื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายที่ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆกัน นำมาพล็อตกราฟจะได้เส้นกราฟ 4 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของ แกลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 10,185.18 เซลล์/มิลลิลิตร และจะค่อยๆลดลงเหลือ 5,000 เซลล์/มิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงมีปริมาณเซลล์ สูงสุดคือ 11,481.48 เซลล์/มิลลิลิตร เส้นต่อมาคือแกลเซียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 12,777.77 เซลล์/มิลลิลิตร และมีการลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 120 คือ 555.55 เซลล์/มิลลิลิตร ส่วน สตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 12,222.22 เซลล์/มิลลิลิตร และ สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 50,000 เซลล์/มิลลิลิตร และลดลง และเพิ่มขึ้นในเวลาต่อมา จนชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 42,777.77 เซลล์/มิลลิลิตร เส้นสุดท้ายสตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์มี ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10,925.92 เซลล์/มิลลิลิตร มีปริมาณเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 49,814.81 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของเซลล์ภายในเม็ดแล้วพบว่า การอยู่รอดของ เซลล์เรียงลำดับได้ดังนี้ สตรอนเทียมคลอไรด์ 2, 4 เปอร์เซ็นต์ และแกลเซียมคลอไรด์ 2, 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์มาเป็นสารละลายที่ใช้ในการฟอร์มตัว

4.5.1.3 การตรึงเซลล์ด้วยอัลจินท

เมื่อได้ความเข้มข้นของสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ที่เหมาะสมคือ 4 เปอร์เซ็นต์ จึงนำ อัตราส่วนนี้มาทำการหาความเข้มข้นของสารละลายอัลจินท เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ทำให้เม็ดที่ ตรึงด้วยอัลจินทมีความแข็งแรงมากที่สุด จากนั้นจึงทำการหาปริมาณของจุลสาหร่ายที่ใช้ในการตรึงเซลล์ และทำการหาระยะเวลาที่ใช้ในการแช่เม็ดอัลจินทลงในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ ตามลำดับ ซึ่งผล การทดลองแสดงดังนี้

1. หาความเข้มข้นของสารละลายอัลจินทที่เหมาะสม

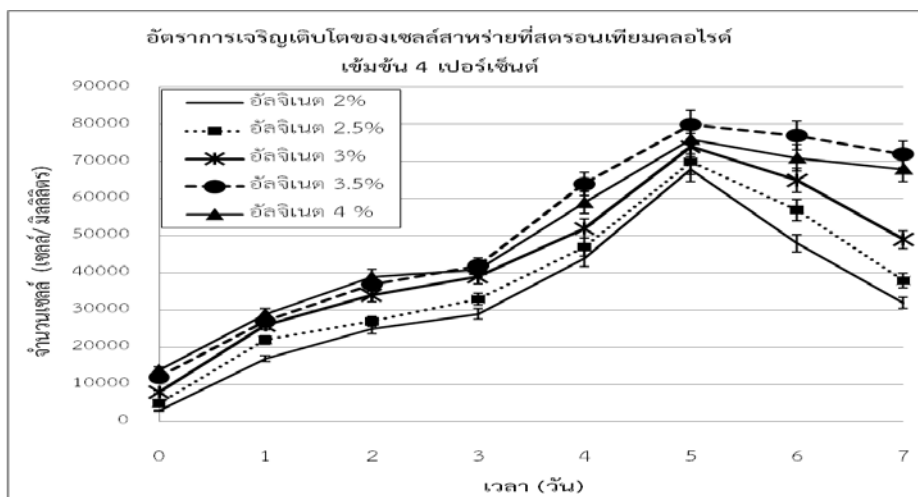
- เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงของเม็ดอัลจินท



รูปที่ 4.10 ความแข็งแรงของเม็ดอัลจิเนท เมื่อความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนท 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ

รูปที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการย่อยสลายกับเวลา พบว่าในช่วง 4 วันแรก เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายค่อนข้างคงที่ และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 5 ลักษณะกราฟสามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วงคือ ความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนทที่ 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ค่าการย่อยสลายเท่ากับ 93.97, 93.68 และ 92.96 เปอร์เซ็นต์ ส่วนช่วงที่ 2 เป็นความเข้มข้นของสารละลาย อัลจิเนทที่ 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการสลายตัวเท่ากับ 95.78 และ 95.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีอัตราการสลายตัวที่ลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 7 ค่าอัตราการสลายตัวของสารละลายอัลจิเนทที่ 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ค่าการย่อยสลายเท่ากับ 89.46, 90.01 และ 90.29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนช่วงที่ 2 เป็นความเข้มข้นของสารละลาย อัลจิเนทที่ 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการสลายตัวเท่ากับ 93.25 และ 93.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนทที่ 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ อัตราการสลายตัวของอัลจิเนทมีการสลายตัวได้น้อยกว่าช่วงแรกและมีค่าใกล้เคียงกัน จากค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการสลายตัวซึ่งแสดงถึงความแข็งแรงของเม็ดอัลจิเนทดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ถ้าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอัลจิเนทมาก อัตราการสลายตัวหรือความแข็งแรงก็มีมาก แต่เมื่อเวลาผ่านไปความแข็งแรงจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moreira S.M และคณะ (Moreira S.M et al., 2006) ที่กล่าวว่า ความแข็งแรงของเม็ดจริงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนท และผลการทดลองรูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของอัลจิเนทที่ 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ทำให้ความแข็งแรงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ โดยผู้วิจัยสนใจในความเข้มข้นของอัลจิเนทที่ร้อยละ 4 มากกว่า ร้อยละ 3.5 เนื่องจากเมื่อทิ้งไว้ระยะเวลานานมากกว่านี้ที่ความเข้มข้นของอัลจิเนทที่ 4 เปอร์เซ็นต์มีแนวโน้มที่แข็งแรงกว่า

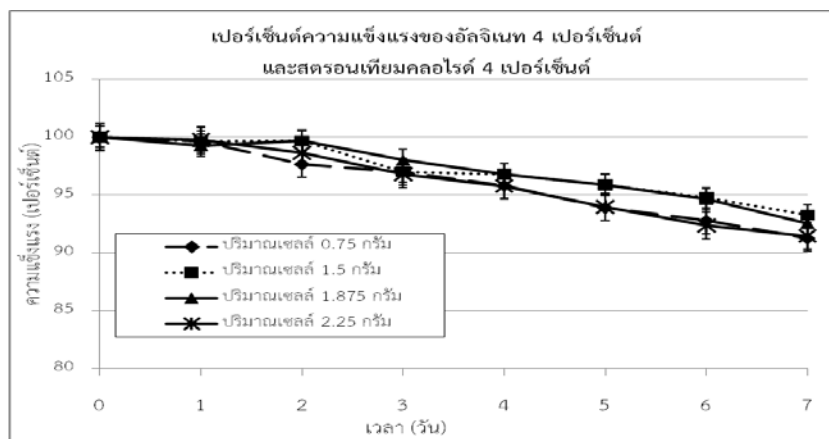
- การมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย



รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโตของสาหร่าย เมื่อความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนต 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ

รูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์สาหร่ายกับเวลา เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายที่ความเข้มข้นของอัลจิเนตต่างๆ พบว่า ในช่วง 5 วันแรก อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายมีค่าเพิ่มขึ้นที่ทุกความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนต 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ คือ 68000, 70000, 74000, 80000 และ 76000 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน พบว่า มีค่าอัตราการเจริญเติบโตคือ 32000, 38000, 49000, 72000 และ 68000 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเซลล์ที่ความเข้มข้นของอัลจิเนตต่ำมีปริมาณเซลล์มาก เนื่องจากเราสนใจความเข้มข้นอัลจิเนตที่ 3.5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ พิจารณาค่าการเจริญเติบโตหรือการอยู่รอด พบว่าอัลจิเนต 3.5 เปอร์เซ็นต์มีการเจริญเติบโตดีกว่าการใช้อัลจิเนต 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moreira S.M และคณะ (2006) ที่พบว่า การอยู่รอดหรืออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนต อาจเป็นเพราะอัลจิเนตที่เข้มข้นมากเวลาฟอร์มตัวเกิดโครงสร้างที่ทำให้เนื้ออัลจิเนตมาก ส่งผลให้ขนาดของรูเล็กลง เมื่อขนาดของรูเล็กลงสารอาหารและอากาศก็ซึมผ่านเข้าไปได้ยาก จึงอาจทำให้เซลล์ไม่โตหรือเจริญเติบโตได้ช้าลง ทั้งนี้เราได้ให้ความสนใจทางด้านความแข็งแรงประกอบด้วย (ซึ่งพบว่าอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์นั้นมีความแข็งแรงกว่า) และพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายที่อัลจิเนตเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์นั้น ไม่ได้ต่างกับอัตราการเจริญเติบโตของอัลจิเนตเข้มข้น 3.5 มีนัยยะสำคัญทางสถิติ ดังนั้นเราจึงเลือกความเข้มข้นของอัลจิเนต 4 เปอร์เซ็นต์ หยดในสารละลายสตรอนเทียม 4 เปอร์เซ็นต์

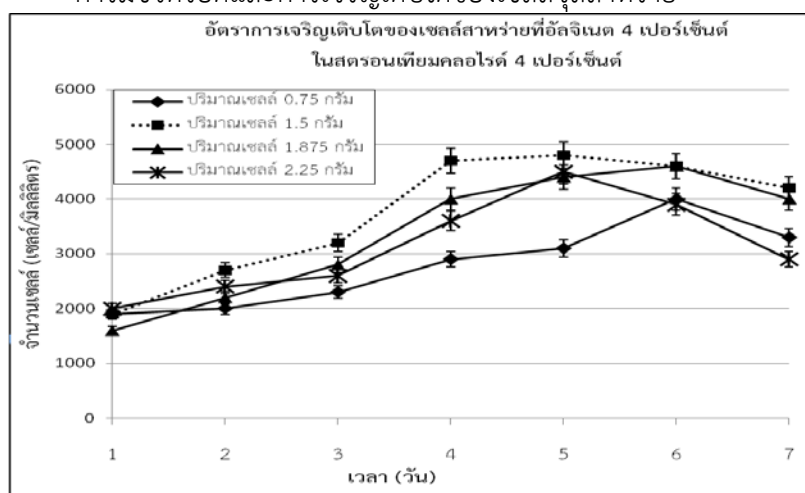
2. ปริมาณของเซลล์จุลสาหร่ายที่ใช้ในการตรึงเซลล์
 - เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงของเม็ดอัลจิเนต



รูปที่ 4.12 ความแข็งแรงของเม็ดอัลจิเนท เมื่อปริมาณของเซลล์จุลสาหร่าย 0.75, 1.5, 1.875 และ 2.35 กรัม (แห้ง) ในอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร

รูปที่ 4.12 พบว่า อัตราการสลายตัวของปริมาณของเซลล์จุลสาหร่ายมีแนวโน้มลดลง ในช่วง 2 วันแรกค่าอัตราการสลายตัวของปริมาณเซลล์ที่ใช้ทั้ง 4 มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 7 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายปริมาณของเซลล์จุลสาหร่าย เท่ากับ 91.25, 93.25, 92.54 และ 91.46 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สามารถเรียงลำดับอัตราการย่อยสลายปริมาณของเซลล์จุลสาหร่ายที่ดีที่สุดที่ควรเลือกใช้คือ 1.5, 1.875, 2.35 และ 0.75 กรัมต่ออัลจิเนท 100 มิลลิลิตร อัตราการย่อยสลายปริมาณของเซลล์จุลสาหร่ายนี้มีค่าใกล้เคียงกันอันเนื่องมาจากปริมาณของอัลจิเนทที่ใช้มีความเข้มข้นเท่ากัน และพบว่าปริมาณความเข้มข้นของจุลสาหร่ายไม่ส่งผลต่อกระบวนการสลายตัวของอัลจิเนทมากนักเพราะการสลายตัวขึ้นอยู่กับปริมาณของอัลจิเนทที่ใช้ ถ้าเม็ดอัลจิเนทไม่แข็งแรงอัตราการย่อยสลายของอัลจิเนทจะมีค่าลดลงอย่างมาก ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมคือสัดส่วนความเข้มข้นของอัลจิเนท 4 เปอร์เซ็นต์ หยดในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเซลล์จุลสาหร่ายที่เหมาะสมคือ 1.5 กรัม (แห้ง) ต่ออัลจิเนท 100 มิลลิลิตร

- การมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย



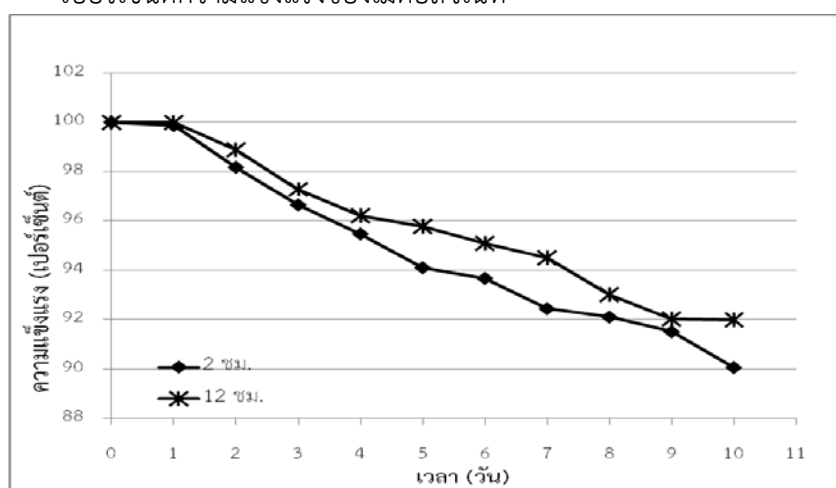
รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย ในปริมาณของเซลล์จุลสาหร่าย 0.75, 1.5, 1.875 และ 2.35 กรัม (แห้ง) ตามลำดับ

รูปที่ 4.13 ศึกษาเกี่ยวกับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายที่ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (น้ำหนักกรัมแห้ง) ที่เหมาะสม พบว่า ปริมาณความเข้มข้นเซลล์ 0.75, 1.5, 1.875 และ 2.25 กรัม ในช่วง 4 วันแรก เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น โดยในวันที่ 4 ปริมาณเซลล์ 1.5 กรัม เซลล์มีการ

เจริญเติบโตสูงสุด คือ 4,800 เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนปริมาณเซลล์ 2.25 กรัม เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดในวันที่ 5 คือ 4,500 เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนปริมาณเซลล์ 0.75 กรัม เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดในวันที่ 6 คือ 4,000 เซลล์/มิลลิลิตร และปริมาณเซลล์ 1.875 กรัม เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดในวันที่ 6 คือ 4,600 เซลล์/มิลลิลิตร จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สำหรับที่ปริมาณเซลล์ 1.5 กรัม มีการอยู่รอดของเซลล์ภายในเม็ดอัลจิเนทเมื่อเทียบกับปริมาณเซลล์ตัวอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของเซลล์ภายในเม็ดอัลจิเนท พบว่าสามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ ปริมาณเซลล์ 1.5, 1.875, 2.25 และ 0.75 กรัม ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาวะที่เหมาะสมหรือปริมาณของจุลสาหร่ายที่อยู่ในเม็ดอัลจิเนท ถ้ามีปริมาณที่ไม่เหมาะสม เช่น พื้นที่ในเม็ดที่จะทำให้จุลสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ได้นั้นมีปริมาณจำกัด อัตราการเจริญเติบโตจะต่ำ การรับอาหารอาจได้ไม่เต็มที่ จึงจะส่งผลกระทบต่ออยู่รอดของจุลสาหร่ายภายในเม็ดอัลจิเนท ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสัดส่วนความเข้มข้นของอัลจิเนท 4 เปอร์เซ็นต์ หยดในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเซลล์แห้งที่ใช้คือ 1.5 กรัมต่ออัลจิเนท 100 มิลลิลิตร

3. ระยะเวลาที่ทำการแช่เม็ดอัลจิเนทในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์

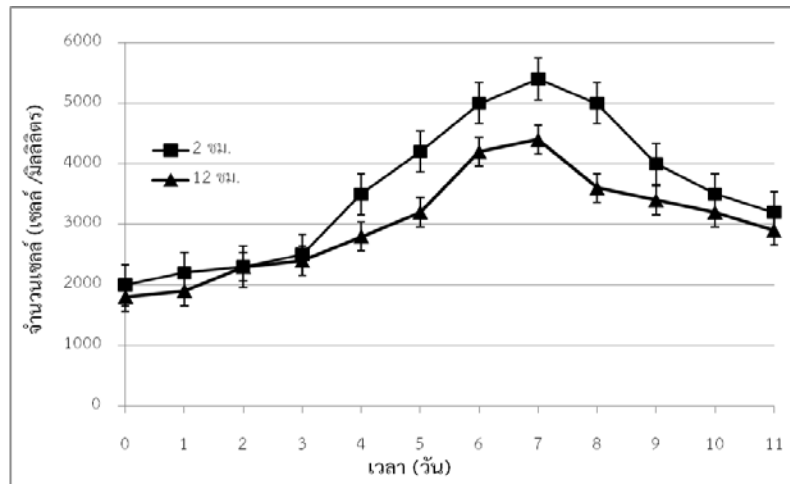
- เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงของเม็ดอัลจิเนท



รูปที่ 4.14 ความแข็งแรงของเม็ดจุลสาหร่ายถูกแช่ในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่ 2 และ 12 ชั่วโมง

รูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่า ในช่วง 4 วันแรก อัตราการสลายตัวของเม็ดที่แช่ทั้ง 2 และ 12 ชั่วโมง มีอัตราใกล้เคียงกัน แต่ในวันที่ 5 พบว่าการแช่เม็ดอัลจิเนทที่ 2 ชั่วโมง อัตราการย่อยสลายของเม็ดอัลจิเนทเท่ากับ 95.77 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการสลายตัวของเม็ดอัลจิเนทจะค่อยๆ ลดลง แต่ไม่มาก และในวันที่ 7 เท่ากับ 95.49 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแช่เม็ดอัลจิเนทที่ 12 ชั่วโมง ในวันที่ 5 – 8 อัตราการย่อยสลายของเม็ดอัลจิเนทมีค่าสลายตัวไม่มาก วันที่ 5 เท่ากับ 95.77 ในวันที่ 7 เท่ากับ 94.50 และยังสามารถเลี้ยงสาหร่ายเพื่อดูแนวโน้มอัตราการย่อยสลายของเม็ดอัลจิเนท ทำให้ทราบว่าเมื่อแช่ในระยะเวลาสั้นขึ้น อัตราการย่อยสลายของจุลสาหร่ายจะค่อยๆ ลดลง และตายในที่สุด ดังนั้นอัตราการย่อยสลายของเม็ดอัลจิเนทที่แช่สารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการย่อยสลายน้อยกว่าระยะเวลา 2 ชั่วโมง

- การมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย



รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโตของเม็ดจุลสาหร่ายที่ถูกแช่ในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ เวลา 2 และ 12 ชั่วโมง

รูปที่ 4.15 พบว่า ในช่วงที่วันที่ 1 –3 อัตราการอยู่รอดหรือการเจริญโตของสาหร่ายที่แช่ทิ้งไว้ในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 2 และ 12 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกันคือ 2500 และ 2400 เซลล์/มิลลิลิตร มีการเจริญเติบโตของสาหร่ายอย่างต่อเนื่องจนในวันที่ 7 อัตราการอยู่รอดหรือการเจริญโตของสาหร่ายที่ 2 ชั่วโมงมีการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด คือ 5400 เซลล์/มิลลิลิตร และที่ 12 ชั่วโมงก็มีการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด คือ 4400 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งการแช่อัลจีเนท 3.5 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงดีกว่า 12 ชั่วโมง เนื่องจากถ้าแช่อัลจีเนทเป็นเวลานานๆจะทำให้อัลจีเนทเกิดการขาดอาหาร ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลสาหร่ายมีค่าน้อยกว่าการแช่ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ได้ศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อดูแนวโน้มอัตราการเจริญเติบโตทำให้ทราบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายจะค่อยๆลดลง และตายในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tam N.F.Y., และคณะ (2000) ที่พบว่า การแช่เม็ดอัลจีเนทที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง เม็ดอัลจีเนทจะมีความแข็งแรงมากจะส่งผลต่อการลดอัตราการย่อยสลายเม็ดอัลจีเนทลงไม่มาก เพราะสภาพเม็ดมีความแข็งแรงการเปื่อยยุ่ยของเม็ดจึงมีค่าไม่มาก แต่เซลล์จุลสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ไม่ดี ซึ่งจากการทดลองต้องการความอยู่รอดของเซลล์จุลสาหร่าย จึงเลือกใช้เวลาแช่ 2 ชั่วโมง จากการศึกษาปัจจัยต่างๆจากหัวข้อข้างต้นทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของอัลจีเนท 4 เปอร์เซ็นต์ หยดในสารละลายสตรอนเทียม 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้คือ 1.5 กรัม (แห้ง) และทำการแช่เม็ด อัลจีเนททิ้งไว้ในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.5.1.4 การตรึงเซลล์ด้วยอัลจีเนท และเคลือบด้วยไคโตซาน

เนื่องจากการตรึงด้วยอัลจีเนทเคลือบด้วยไคโตซานนั้นมีความหนาของชั้นอัลจีเนท และไคโตซานทำให้แสงไม่สามารถเข้าถึงเซลล์จุลสาหร่ายได้ การทดลองนี้จึงได้ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้จุลสาหร่ายได้รับแสงและเจริญได้ดี

1. การตรึงเซลล์จุลสาหร่ายสไปรูลีนาด้วยอัลจีเนท และเคลือบด้วยไคโตซาน

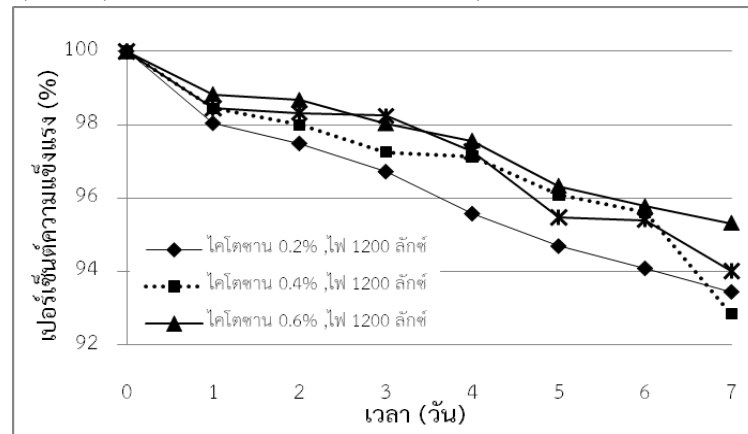
ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเคลือบเม็ดตรึงอัลจีเนท และแสงไฟที่เหมาะสมต่อการเจริญและรอดชีวิตของเซลล์ในเม็ดตรึงโดยพิจารณา ดังนี้คือ

- พิจารณาด้านความแข็งแรงของเม็ด

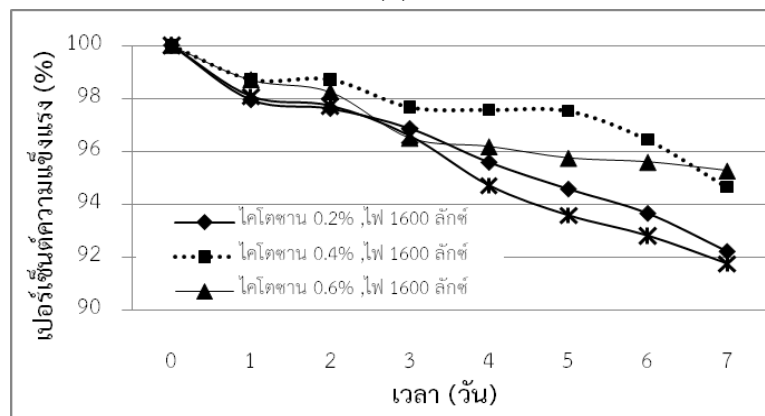
โดยดูจากค่าความชื้นของอาหารที่ทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์จุลสาหร่ายทุกวัน นำไปวัดค่าความชื้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ซึ่งการวัดค่าความชื้นเป็นวิธีการโดยอ้อมที่แสดงให้เห็น

ถึงปริมาณของแข็งที่เพิ่มขึ้นในอาหารซึ่งปริมาณของแข็งที่เพิ่มขึ้นเหล่านี้เป็นตัวสะท้อนกลับให้เห็นถึงปริมาณการสลายตัวหรือการหลุดลอกของเม็ดตรงที่เคลือบด้วยไคโตซานนั่นเอง

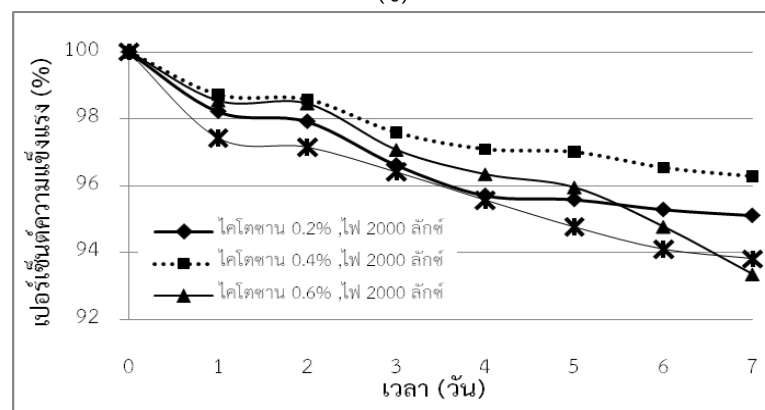
- 1) พิจารณาด้านความแข็งแรงของเม็ดตรงอัลจินท-ไคโตซานที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.2%, 0.4%, 0.6% และที่ความเข้มแสง 1200, 1600 และ 2000 ลักซ์



(ก)



(ข)



(ค)

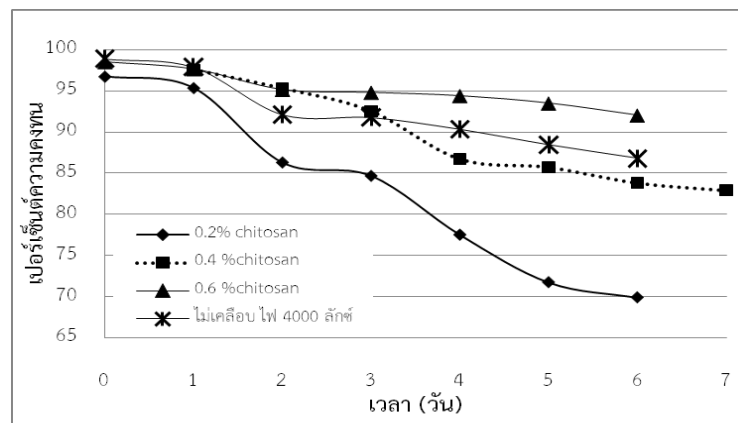
รูปที่ 4.16 ความแข็งแรงของเม็ดตรงอัลจินท-ไคโตซานที่ความเข้มข้นของไคโตซานต่างๆ และที่ความเข้มแสง (ก) 1200 ลักซ์ (ข) 1600 ลักซ์ และ (ค) 2000 ลักซ์

รูปที่ 4.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง (%) กับเวลา ที่ความเข้มแสง ต่างๆ จะเห็นว่ากราฟรูปที่ 4.16(ก), (ข) และ(ค) มีลักษณะที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ กราฟมีแนวโน้มที่ค่อยๆ ลดลง เมื่อเวลานานขึ้น เนื่องจากเม็ดตรงมีการหลุดลอกออก ซึ่งถ้ามองโดยภาพรวมจะเห็นว่าที่ความเข้มแสง 1200 ลักซ์ เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงของแต่ละเส้นมีความใกล้เคียงกันจึงมาพิจารณาที่ความเข้มแสง

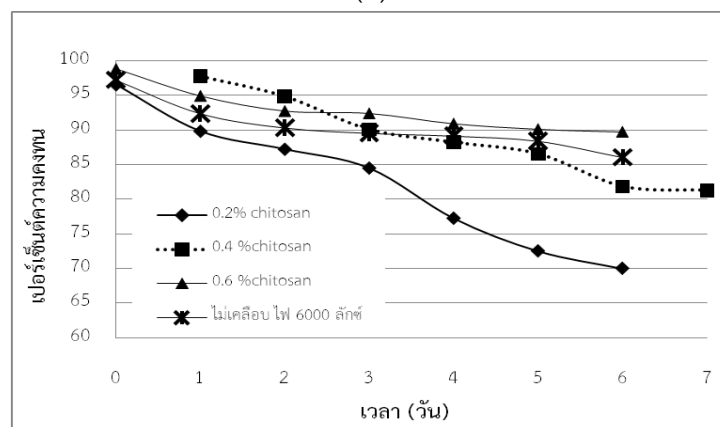
1600 และ 2000 ลักซ์ พบว่า เม็ดตรึงอัลจิเนทที่ไม่ได้เคลือบด้วยไคโตซานนั้นมีเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเม็ดตรึงที่เคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ ไคโตซานมีผลต่อความแข็งแรงของเม็ดตรึง และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงของเม็ดตรึงด้วย ความเข้มข้นของไคโตซานจะเห็นได้ว่า ไคโตซานเข้มข้น 0.4 % ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงของเม็ดตรึง สูงที่สุด และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มแสงไฟพบว่าที่ 2000 ลักซ์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงสูงสุดเมื่อ เทียบกับแสงไฟค่าอื่น

จากการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของไคโตซานมีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง กับเวลา ซึ่งไคโตซาน 0.4% ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงสูงสุด รองมาคือไคโตซาน 0.6% ส่วนไคโตซาน 0.2% และเม็ดตรึงอัลจิเนทไม่เคลือบไคโตซานให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงน้อยที่สุด

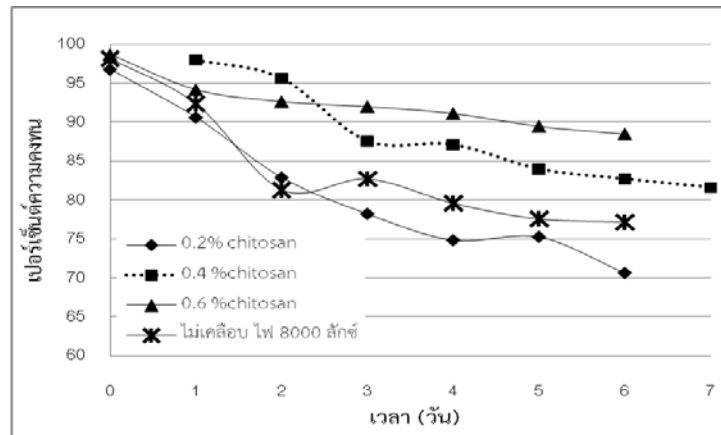
- 2) พิจารณาด้านความแข็งแรงของเม็ดตรึงอัลจิเนท-ไคโตซาน เม็ดตรึงมีขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.2%, 0.4%, 0.6% และที่ความเข้ม แสง 4000, 6000 และ 8000 ลักซ์



(ก)



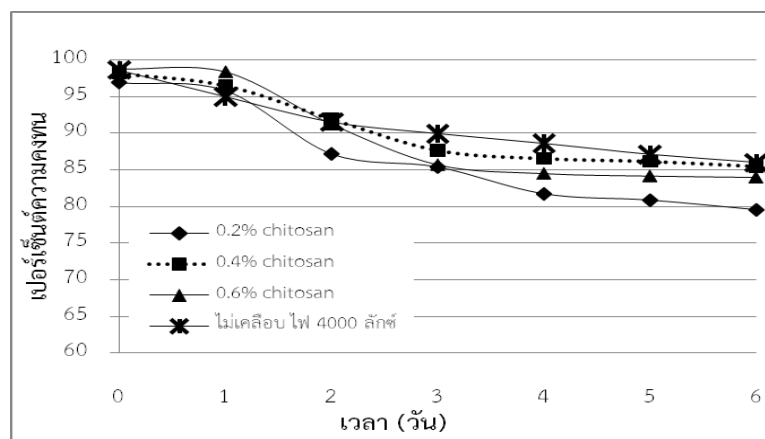
(ข)



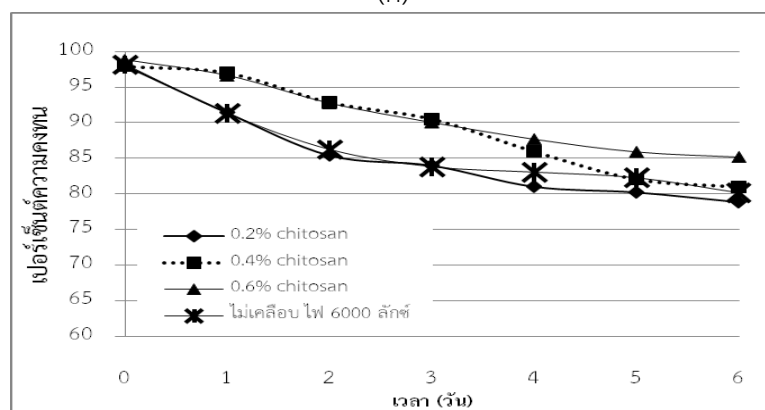
(ค)

รูปที่ 4.17 ความแข็งแรงของเม็ดตรึงอัลจินเนท-ไคโตซานที่ความเข้มข้นของไคโตซานต่างๆ เม็ดตรึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร และที่ความเข้มแสง (ก) 1200 ลักซ์ (ข) 1600 ลักซ์ และ (ค) 2000 ลักซ์

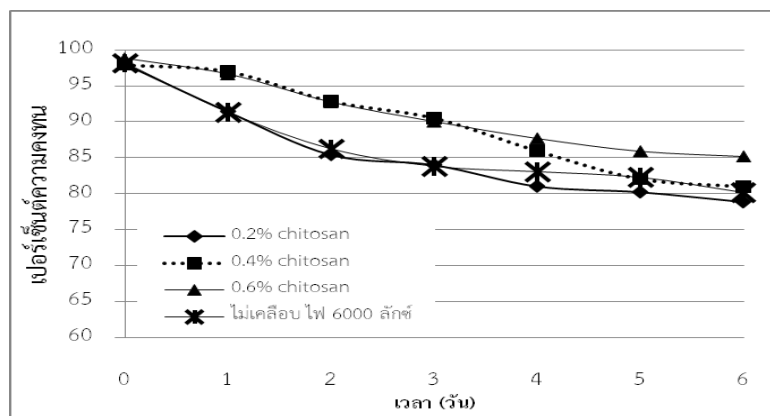
3) พิจารณาด้านความแข็งแรงของเม็ดตรึงอัลจินเนท-ไคโตซาน เม็ดตรึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.2%, 0.4%, 0.6% และที่ความเข้มแสง 4000, 6000 และ 8000 ลักซ์



(ก)



(ข)



(ค)

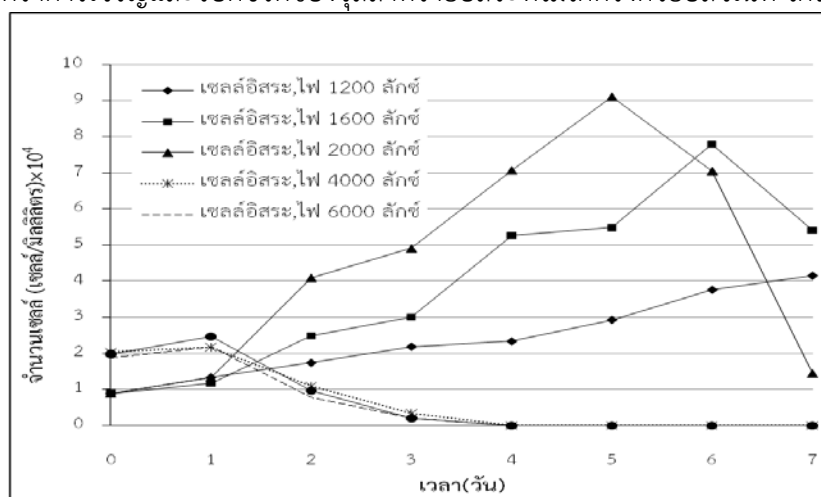
รูปที่ 4.18 ความแข็งแรงของเม็ดตรึงอัลจินท-ไคโตซานที่ความเข้มข้นของไคโตซานต่างๆ เม็ดตรึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร และที่ความเข้มแสง (ก) 1200 ลักซ์ (ข) 1600 ลักซ์ และ (ค) 2000 ลักซ์

พิจารณาจากรูปที่ 4.17-4.18 ความแข็งแรงของเม็ดตรึงอัลจินท-ไคโตซาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร ที่เคลือบด้วยไคโตซานเข้มข้น 0.2%, 0.4% และ 0.6% ที่ความเข้มแสง 4000, 6000 และ 8000 ลักซ์ ดังรูปที่ 4.17-4.18 จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน เม็ดตรึงมีการหลุดลอกบ้างเล็กน้อย และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงโดยภาพรวมของเม็ดตรึงอยู่ที่ 70-99% ซึ่งเป็นค่าที่เรายอมรับได้ และเป็นที่น่าพอใจเป็นอย่างมาก และจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าขนาดของเม็ดตรึงและความเข้มข้นไม่มีผลต่อความแข็งแรงและความคงทนของเม็ดตรึง แต่การเคลือบเม็ดตรึงด้วยสารละลายไคโตซานนั้นสามารถเพิ่มความแข็งแรงและความคงทนรวมถึงยืดอายุการใช้งานให้แก่เม็ดตรึงได้ในระยะยาว

- พิจารณาจากการเจริญและการรอดชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย

เก็บตัวอย่างเม็ดตรึงอัลจินทและเม็ดตรึงอัลจินทที่เคลือบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.2%, 0.4%, 0.6% ที่ความเข้มแสงต่างๆทุกวัน จากนั้นละลายเม็ดตรึงด้วยไตรโซเดียมซิเตรท เมื่อเม็ดตรึงละลายนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วยกระจก้นเซลล์ โดยนับผ่านกล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้จำนวนเซลล์ที่นับได้จะแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ที่เพาะเลี้ยง หรือในเม็ดตรึงนั้นๆ ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงการเจริญและการมีชีวิตรอดของเซลล์ ผลการประเมินในด้านต่างๆที่กล่าวข้างต้นนั้นแสดงได้ดังนี้

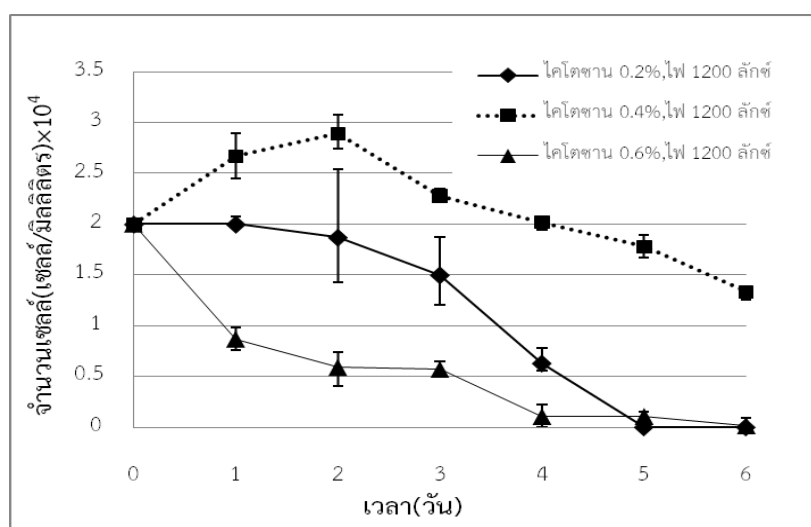
1) อัตราการเจริญและรอดชีวิตของจุลสาหร่ายอิสระที่ไม่ได้ตรึงด้วยอัลจินท-ไคโตซาน



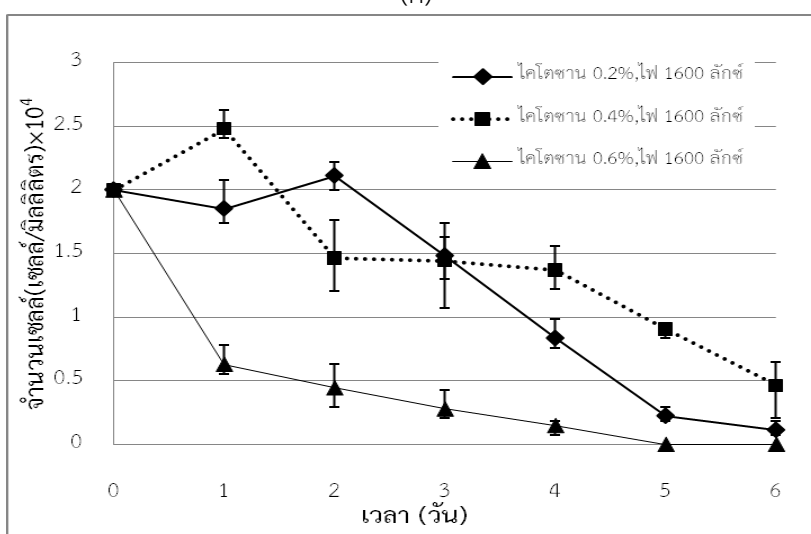
รูปที่ 4.19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับเวลาของเซลล์อิสระ

รูปที่ 4.19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับเวลา ที่ความเข้มแสงต่างๆดังนี้ 1200, 1600, 2000, 4000, 6000 และ8000 ลักซ์ พบว่า ที่ความเข้มแสง 1200,1600, 2000 ลักซ์ เซลล์มีการเจริญในระยะเริ่มต้นที่ใกล้เคียงกันและเริ่มแตกต่างกันในวันที่ 3 เป็นต้นไป โดยเซลล์มีการเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆในทุกวัน และปริมาณอาหารก็จะลดลงเรื่อยๆ ซึ่งที่ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เซลล์มีการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีที่สุด มีจำนวนเซลล์มากที่สุดและปริมาณอาหารหมดเร็วที่สุด จึงได้ทดลองเพิ่มความเข้มแสงเป็น 4000, 6000 และ8000 ลักซ์ เพื่อศึกษาการเจริญและอยู่รอดของเซลล์ พบว่าการเพิ่มความเข้มแสงไม่ได้ส่งผลให้เซลล์จุลสาหร่ายเจริญได้ดีขึ้น แต่เซลล์จุลสาหร่ายกลับมีจำนวนเซลล์ลดน้อยลง การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงมีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์จุลสาหร่าย เนื่องจากแสงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์จุลสาหร่าย ความเข้มแสงที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์จุลสาหร่ายเจริญและเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดคือที่ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ รองลงมาคือที่ความเข้มแสง 1600 ลักซ์ และ 1200 ลักซ์

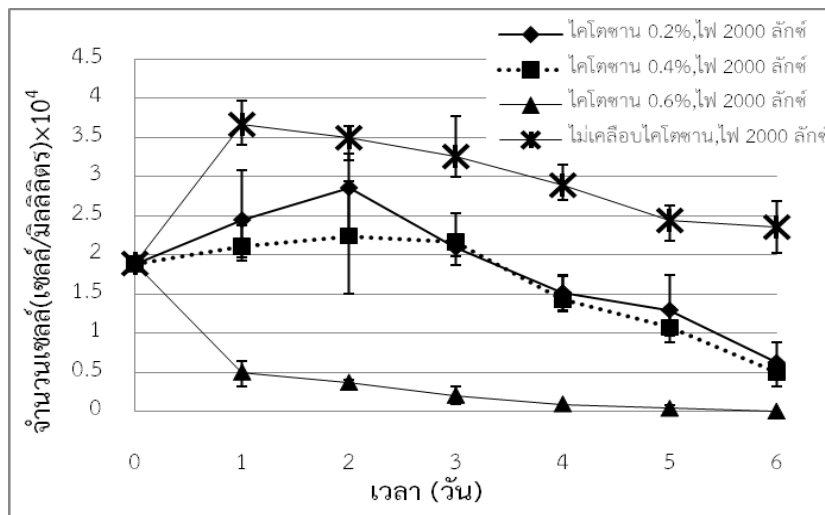
2) อัตราการเจริญและรอดชีวิตของจุลสาหร่ายที่อัลจินเทเข้มข้น 4%, ความเข้มแสง 1200, 1600 และ 2000 ลักซ์ เม็ดตรงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร



(ก)



(ข)

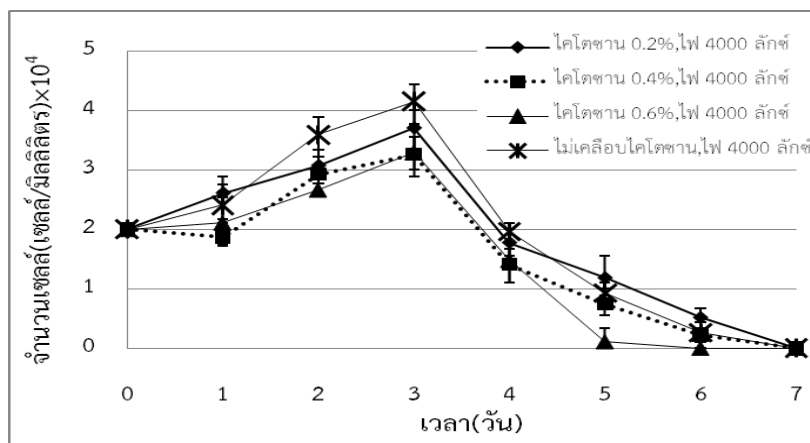


(ค)

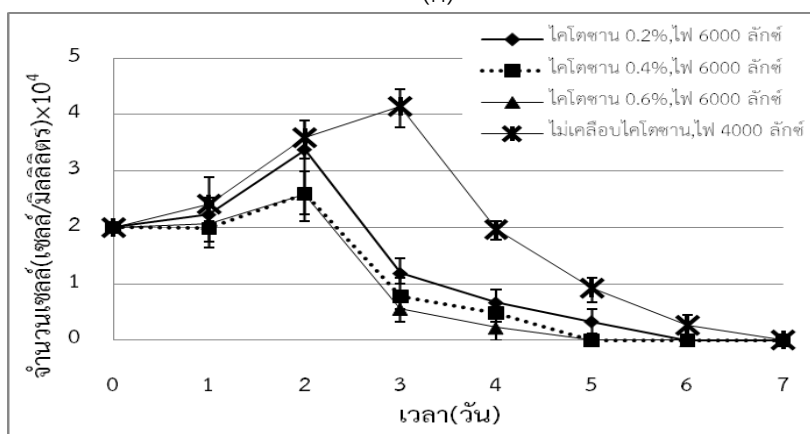
รูปที่ 4.20 การเจริญและรอดชีวิตของจุลสาหร่ายที่อัลจินเทเข้มข้น 4% เม็ดตริงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร ที่ความเข้มแสง (ก) 1200 ลักซ์ (ข) 1600 ลักซ์ และ (ค) 2000 ลักซ์

รูปที่ 4.20 (ก), (ข) และ (ค) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญ และการรอดชีวิตของเซลล์จุลสาหร่ายในเม็ดตริงอัลจินเท-โคโคซานที่ความเข้มข้นของโคโคซานแตกต่างกันนี้คือ 0.2%, 0.4% และ 0.6% ซึ่งในก่อนหน้านี้ได้ศึกษาด้านความแข็งแรงของเม็ดตริงอัลจินเท-โคโคซานพบว่าโคโคซานเข้มข้น 0.6% ไม่เหมาะแก่การเคลือบเม็ดตริงอัลจินเทเนื่องจากมีค่าความชุ่มสูง เม็ดตริงไม่แข็งแรงหลุดลอกมาก และพบว่าความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นความเข้มแสงที่ดีที่สุดในการทดลอง เนื่องจากค่าความชุ่มที่วัดได้มีค่าน้อยที่สุด เม็ดตริงมีการหลุดล่อนน้อยจึงมีความแข็งแรงมาก ดังนั้นการศึกษ้อัตราการเจริญและการรอดชีวิตของเซลล์ในเม็ดตริงอัลจินเท-โคโคซานจึงสนใจไปที่โคโคซานเข้มข้น 0.2% และ 0.4% และที่ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ และพบว่าทั้งสองความเข้มข้นเซลล์มีอัตราการเจริญและรอดชีวิตที่คล้ายๆกันใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เม็ดตริงอัลจินเท-โคโคซานที่โคโคซานเข้มข้น 0.4% เซลล์มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆอย่างต่อเนื่องถึง 3 วันและเซลล์มีการรักษาการรอดชีวิตโดยจำนวนเซลล์ค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องในแต่ละวันซึ่งแตกต่างจากโคโคซานเข้มข้น 0.2% ที่มีอัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นเพียง 2 วันและอัตราการเจริญลดลงอย่างรวดเร็ว

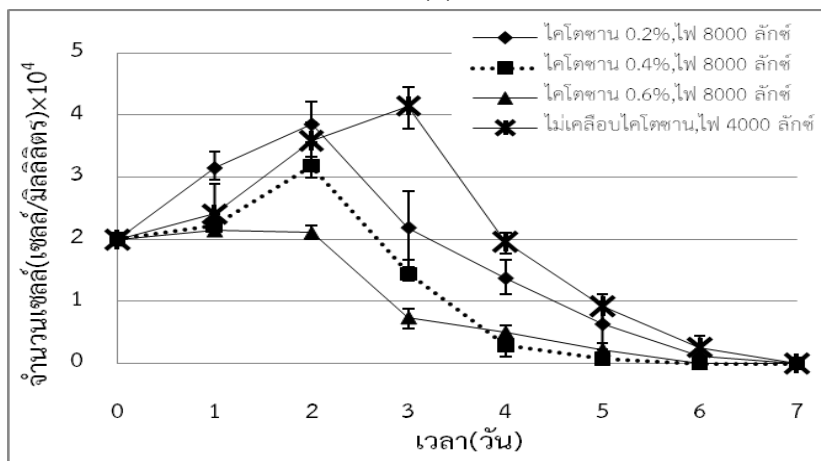
3) อัตราการเจริญและรอดชีวิตของจุลสาหร่ายที่อัลจินเทเข้มข้น 4% ความเข้มแสง 4000, 6000 และ 8000 ลักซ์ เม็ดตริงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 4.21 และ 4.22



(ก)

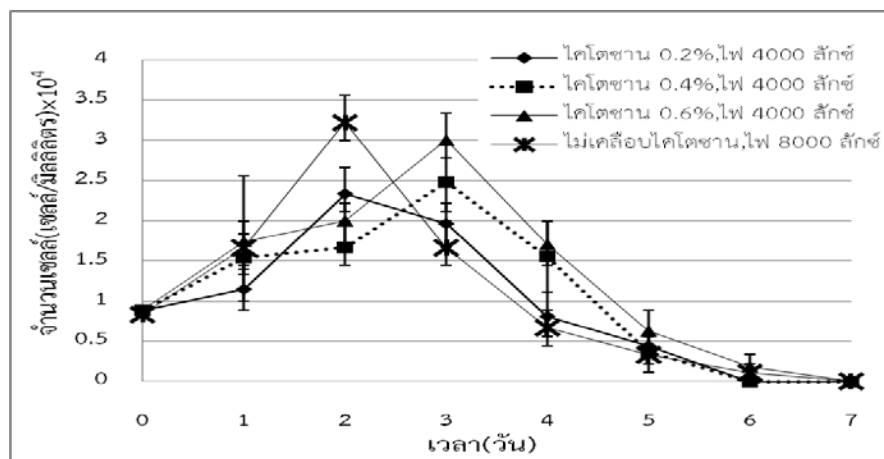


(ข)

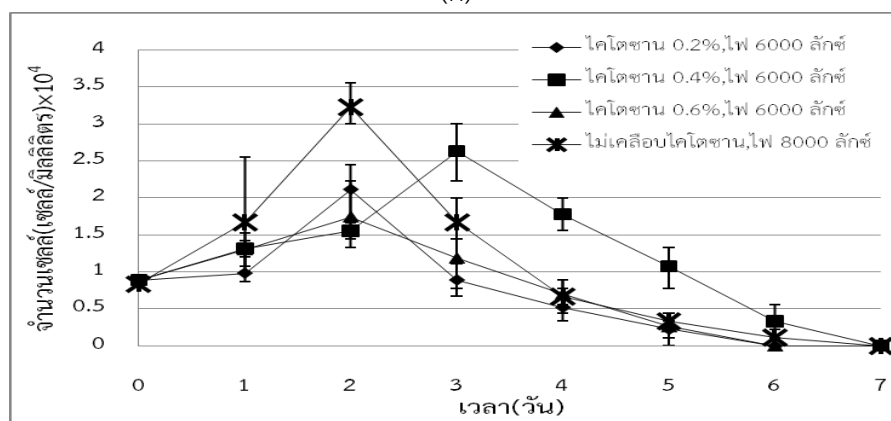


(ค)

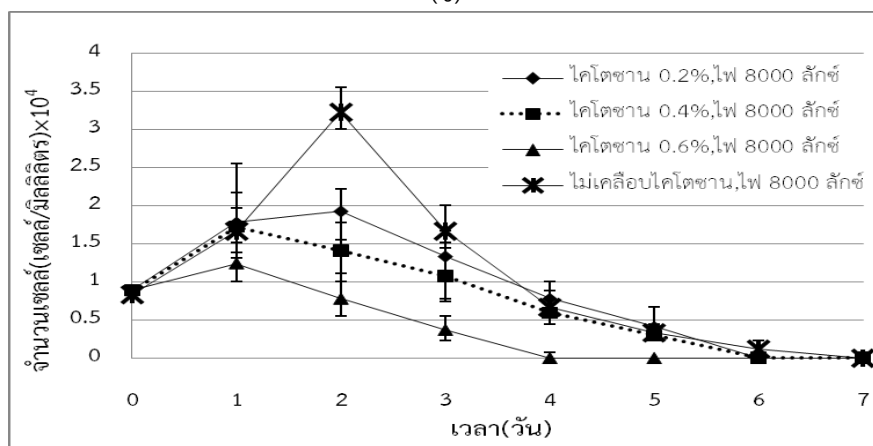
รูปที่ 4.21 การเจริญและรอดชีวิตของจุลสาหร่ายที่อัลจินเทเข้มข้น 4% เม็ดตริงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร ที่ความเข้มแสง (ก) 4000 ลักซ์ (ข) 6000 ลักซ์ และ (ค) 8000 ลักซ์



(ก)



(ข)



(ค)

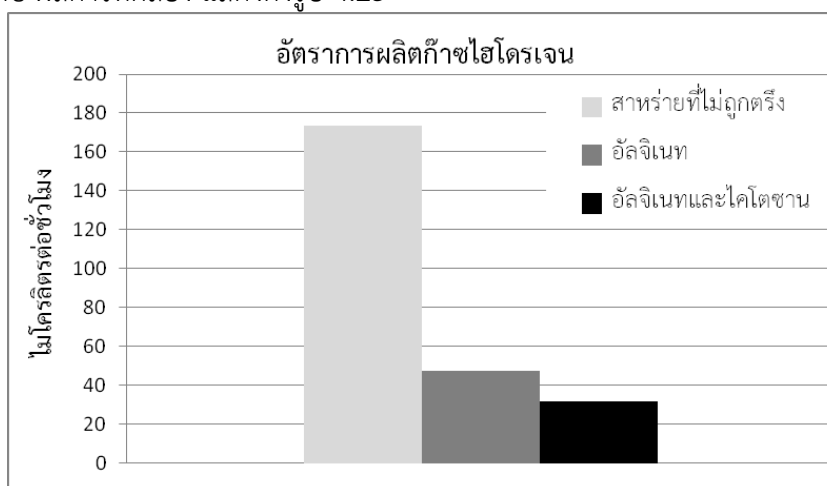
รูปที่ 4.22 การเจริญและรอดชีวิตของจุลสาหร่ายที่อัลจินทเข้มข้น 4% เม็ดตรงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร ที่ความเข้มแสง (ก) 4000 ลักซ์ (ข) 6000 ลักซ์ และ (ค) 8000 ลักซ์

รูปที่ 4.21-4.22 พบว่า เม็ดตรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร เซลล์มีการเจริญและอยู่รอดดีกว่า เม็ดตรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 มิลลิเมตร และเม็ดตรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร ที่เคลือบไคโตซานเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์เลี้ยงที่ความเข้มแสง 6000 ลักซ์ เซลล์จุลสาหร่ายมีอัตราการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นจนถึงวันที่ 3 เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นกว่า 270% ซึ่งมากกว่าที่สภาวะอื่นๆ เนื่องจากเม็ดตรงขนาดเล็กนั้นสารอาหารสามารถซึมแพร่ผ่านสู่เซลล์สาหร่ายได้ดีกว่าเม็ดตรงขนาดใหญ่และที่ความเข้มแสง 6000 ลักซ์ มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์

สาหร่ายในเม็ดตริง ยิ่งความเข้มข้นมากก็ยิ่งเป็นการเพิ่มอนุมูลให้แก่เซลล์สาหร่ายซึ่งเป็นผลที่ไม่ดีทำให้สาหร่ายไม่สามารถเจริญได้และนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ รูปร่างของเซลล์สาหร่ายได้

4.5.1.5 ทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่ถูกตริง

หลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตริงเซลล์สาหร่ายเพื่อยังผลให้อยู่ได้นานขึ้น ขั้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่ถูกตริงในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วย การตริงโดยอัลจินท (ใช้อัลจินทความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ในสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ และเม็ดตริงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร) และตริงโดยใช้อัลจินทเคลือบด้วยไคโตซาน (ใช้อัลจินทความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ในสตรอนเทียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตรและเคลือบด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์) และทำการเก็บก๊าซไฮโดรเจนเป็นระยะเวลา 5 วันและประเมินค่าอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจน พบว่าเซลล์ของจุลสาหร่ายที่ถูกตริงด้วยอัลจินท และอัล-จินทเคลือบด้วยไคโตซาน สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนออกมาได้ โดยอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่ไม่ถูกตริงอยู่ที่ 173.3 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง ส่วนอัตราของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่ถูกตริงด้วยอัลจินท และอัลจินทเคลือบด้วยไคโตซาน อยู่ที่ 47.5 และ 31.6 ไมโครลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ผลการทดลอง แสดงดังรูป 4.23



รูปที่ 4.23 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนระหว่างเซลล์เปล่า เซลล์ที่ตริงด้วยอัลจินทและเซลล์ที่ถูกตริงด้วยอัลจินทเคลือบไคโตซาน

4.5.2 อภิปรายผลการทดลอง

4.5.2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายและทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิตมวลและผลิตแก๊สรวมได้สูงสุด

1. การเปรียบเทียบและคัดเลือกสายพันธุ์จุลสาหร่ายที่สามารถผลิตมวลชีวภาพสูงสุดในสภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตมวลชีวภาพและแก๊สไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยทำการคัดเลือกจากจุลสาหร่าย สองสายพันธุ์ คือ Amphora และ Spirulina โดยทำการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการผลิตมวลชีวภาพ และแก๊สไฮโดรเจนสูงสุด 2 สภาวะ คือ 1. ศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบส ที่มีผลต่อการผลิตมวลชีวภาพสูงสุด และ 2. ศึกษาสภาวะค่าความเป็นกรด-เบส ที่มีผลต่อการผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงสุด และเมื่อทำการศึกษาสภาวะทั้งสองแล้วจะทำการเปรียบเทียบและคัดเลือกสายพันธุ์จุลสาหร่ายที่สามารถผลิตมวลชีวภาพและผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้สูงสุด ลำดับแรกที่จะทำ

การเปรียบเทียบคือ การศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบสที่มีผลต่อการผลิตมวลชีวภาพสูงสุด พบว่าความสัมพันธ์ถึงปริมาณการผลิตมวลชีวภาพและอัตราการผลิตมวลชีวภาพเฉลี่ย ของจุลสาหร่าย 2 ชนิด เป็นเวลา 240 ชั่วโมง โดยมีค่าความเป็นกรด-เบส ที่แตกต่างกัน ปริมาณ 300 มิลลิลิตร สภาพความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของจุลสาหร่าย Amphora คือ ค่าความเป็นกรด-เบส 8 (มวลชีวภาพ 0.61 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.011 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-เบส 9 (มวลชีวภาพ 0.58 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.011 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-เบส 6 (มวลชีวภาพ 0.51 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.008 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-เบส 10 (มวลชีวภาพ 0.43 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.009 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-เบส 7 (มวลชีวภาพ 0.31 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.010 ต่อชั่วโมง) สุดท้ายคือ ค่าความเป็นกรด-เบส 5 (มวลชีวภาพ 0.031 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.0007 ต่อชั่วโมง) ส่วนจุลสาหร่าย Spilurina สามารถเพิ่มจำนวนจุลสาหร่ายได้สูงสุดในสภาพความเป็นกรด-เบส 10 (มวลชีวภาพ 0.89 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.01 ต่อชั่วโมง) และสภาพความเป็นกรด-เบส 11 (มวลชีวภาพ 0.90 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.01 ต่อชั่วโมง) เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้จุลสาหร่าย Spilurina เจริญเติบโตได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t-test) รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-เบส 9 (มวลชีวภาพ 0.76 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.01 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-เบส 8 (มวลชีวภาพ 0.59 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.008 ต่อชั่วโมง) สุดท้ายคือ ค่าความเป็นกรด-เบส 7 (มวลชีวภาพ 0.27 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต 0.005 ต่อชั่วโมง) เมื่อสังเกตจากกราฟทั้ง 2 รูป จะพบว่าจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Spilurina มีการผลิตมวลชีวภาพได้ดีที่สุดในค่าความเป็นกรด-เบส 10 และ 11 ซึ่งมีปริมาณและอัตราการผลิตมวลชีวภาพสูงสุดเมื่อเทียบกับจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Amphora ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 8 สรุปได้ว่า จุลสาหร่ายสายพันธุ์ Spirulina เป็นจุลสาหร่ายที่ผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดเมื่อเทียบกับจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Amphora และสามารถผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส 10 และ 11 เจริญเติบโตได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t-test) โดยจุลสาหร่ายมีปริมาณการผลิตมวลชีวภาพ 0.08 กรัมแห้งต่อลิตรต่อวัน คิดเป็นอัตราการโตจำเพาะ 0.01 ต่อชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Carlos Jimenez และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าจุลสาหร่ายสายพันธุ์ Spirulina platensis ผลิตมวลชีวภาพสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส อยู่ระหว่าง 9.5-10.5 ปริมาณการผลิตมวลชีวภาพ 0.027 กรัมแห้งต่อลิตรต่อวันเพาะเลี้ยงในธาตุอาหารสูตร Zarrouk's medium เป็นระยะเวลา 13 วัน ซึ่งมีปริมาณการผลิตที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับผลการทดลอง และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abuzer Celekli และคณะ (2009) ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด-เบส 10 และ 0.5 กรัมฟอสเฟตต่อลิตร มีปริมาณการผลิตมวลชีวภาพ 0.2066 กรัมแห้งต่อลิตรต่อวัน ซึ่งมีปริมาณการผลิตที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับผลการทดลอง และคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Kemka H. Ogbonda และคณะ (2007) มีปริมาณการผลิตมวลชีวภาพ 0.12 กรัมแห้งต่อลิตรต่อวัน ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 9 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณการผลิตที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับผลการทดลอง

2. การเปรียบเทียบและคัดเลือกสายพันธุ์จุลสาหร่ายที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงสุดในสภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้สูงสุด จากจุลสาหร่ายสองสายพันธุ์ คือ Amphora และ Spilurina พบว่าปริมาณการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนเฉลี่ย ของจุลสาหร่าย 2 ชนิด เป็นเวลา 180 ชั่วโมง โดยมีค่าความเป็นกรด-เบส ที่แตกต่างกัน ปริมาณ 300 มิลลิลิตร สภาพความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงสุดของจุลสาหร่าย Amphor คือ ค่าความเป็นกรด-เบส 8 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 10.4

มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.004 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-เบส 9 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 6.1 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.005 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-เบส 10 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 5.7 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.004 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-เบส 5 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 5.4 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.007 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-เบส 6 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 4.8 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.006 ต่อชั่วโมง) และสุดท้ายคือค่าความเป็นกรด-เบส 7 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 1.4 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.01 ต่อชั่วโมง) ส่วนสภาพความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงสุดของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Spilurina* คือค่าความเป็นกรด-เบส 9 (แก๊สทั้งหมด 160 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.02 ต่อชั่วโมง) และค่าความเป็นกรด-เบส 10 (แก๊สทั้งหมด 166 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.04 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-เบส 8 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 97.4 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.02 ต่อชั่วโมง) รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-เบส 7 (ปริมาณแก๊สทั้งหมด 55 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.001 ต่อชั่วโมง) และสุดท้ายคือค่าความเป็นกรด-เบส 11 ปริมาณแก๊สทั้งหมด 34.3 มิลลิลิตร อัตราการผลิตแก๊สเฉลี่ย 0.005 ต่อชั่วโมง) เมื่อสังเกตจากกราฟทั้ง 2 รูปจะพบว่าจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Spilurina* มีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ดีที่สุดในค่าความเป็นกรด-เบส 9 และ 10 ซึ่งมีปริมาณและอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเทียบกับจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Amphora* ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 8 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า จุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Spirulina* เป็นจุลสาหร่ายที่ผลิตแก๊สรวมได้สูงสุดเมื่อเทียบกับจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Amphora* สามารถผลิตแก๊สรวมสูงสุด 0.9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงหรือ 640 $\mu\text{L/g}$ Chl *a/h* ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 9 และ 10 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ A.U. Juantorena และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายแต่ละชนิด ซึ่งหนึ่งในนั้นคือจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Spirulina maxima* 2342 ปริมาตรเพาะเลี้ยง 20 ลิตร โดยใช้ค่าความเป็นกรด-เบส 10.16 ± 0.05 และมวลชีวภาพ (0.32 ± 0.05 g) ระยะเวลาในการทำการทดลอง 29 ชั่วโมง ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าจุลสาหร่ายสามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบสดังกล่าว และกับงานวิจัยของ Cherdasak Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) โดยทำการศึกษาจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Tetraspora* sp. ค่าความเป็นกรด-เบส 5.75-9.30 พบว่าอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจน 423–1511 $\mu\text{L/mg}$ Chl *a/h* ซึ่งอัตราการผลิตนี้มีอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่ดีกว่าจุลสาหร่ายสายพันธุ์ชนิดอื่น และทำการทดลองโดยใช้กระบวนการเขย่าพร้อมให้แสงจุลสาหร่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเพื่อผลิตแก๊สไฮโดรเจน และเปรียบเทียบกับจุลสาหร่าย *Spirulina* ที่ได้ทำการศึกษาโดยทดลองเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตแก๊สรวมโดยเครื่องปฏิกรณ์ชนิด Helical-tubular Photo-bioreactor พบว่าจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Spirulina* สามารถผลิตแก๊สรวมได้ 11.45 mL/g algae/day ซึ่งเป็นการเทียบกับน้ำหนักของจุลสาหร่ายที่ใช้ผลิต และหากเทียบกับ น้ำหนักคลอโรฟิลล์จะพบว่าจุลสาหร่ายสามารถผลิตแก๊สรวมได้ 640 $\mu\text{L/g}$ Chl *a/h* โดยอาจถือว่าปริมาณแก๊สรวมที่ผลิตได้ยังอยู่ในช่วงที่จุลสาหร่ายจากงานวิจัยของ Cherdasak Maneeruttanarungroj และคณะ (2010) สายพันธุ์ *Tetraspora* sp.

4.5.2.2 หาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ ที่ใช้ในการฟอรั่มตัว

การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ ที่ใช้ในการฟอรั่มตัว โดยมีการวัดความแข็งแรงและการเจริญของเซลล์จุลสาหร่ายนั้น พบว่าในด้านความแข็งแรงนั้นสตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 4% ให้ความแข็งแรงสูงสุดคือ 80.87% ส่วนรองมาคือ สตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 2% ให้ความแข็งแรง 65.01% ทั้งนี้ไม่สามารถวิเคราะห์ด้านความแข็งแรงเพียงอย่างเดียว ต้องการวิเคราะห์ด้านการเจริญเติบโตด้วย พบว่าที่สตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 2% มีปริมาณเซลล์

4.2x10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนที่สตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 4% มีปริมาณเซลล์ 1.7x10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร ดังนั้นสารละลายและสัดส่วนที่เหมาะสมที่ใช้ในการฟอร์มตัวคือ สารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 4% ถึงแม้ว่าการเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายในชั่วโมงที่ 120 นั้นจะน้อยกว่าสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์เข้มข้น 2% แต่การเจริญเติบโตในชั่วโมงที่ 60 นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน

4.5.2.3 การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนท

ในส่วนของการเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนทต่างกันั้นจะส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของอัลจิเนท ดังผลการทดลองซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายในการฟอร์มตัวเท่ากัน แต่ความเข้มข้นของอัลจิเนทต่างกัน ความแข็งแรงของเม็ดตรึงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของอัลจิเนทที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moreira S.M และคณะ (2006) ที่พบว่า ความแข็งแรงของเม็ดตรึงจะเพิ่มขึ้นกับการเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนท ส่วนในเรื่องของการอยู่รอดหรืออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นกลับเป็นไปในทางตรงข้ามกันกล่าวคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนท การเจริญเติบโตของเซลล์จะลดลง อาจเป็นเพราะอัลจิเนทที่เข้มข้นมากสามารถฟอร์มตัวเกิดโครงสร้างได้ดี ความเข้มข้นที่มากทำให้เนื้ออัลจิเนทมาก ดังนั้นจึงส่งผลให้ขนาดของรูเล็กลง เมื่อขนาดของรูเล็กลงสารอาหาร และอากาศก็ซึมผ่านเข้าไปได้ยาก ส่งผลให้เซลล์ไม่โตหรือเจริญเติบโตได้ช้าลง ในส่วนของปริมาณเซลล์จุลสาหร่ายที่ใช้ในการตรึงต่างกันส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของอัลจิเนท ในส่วนของเวลาในการแช่เม็ดของอัลจิเนทในระยะเวลาที่ห่างกันมากๆ ก็ส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของอัลจิเนท คือที่ความเข้มข้นของ อัลจิเนทเท่ากัน แต่ระยะเวลาที่แช่เม็ดอัลจิเนทในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์ต่างกัน ความแข็งแรงของเม็ดที่ตรึงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้แช่เม็ดอัลจิเนทที่นานขึ้น ส่วนในเรื่องของการอยู่รอดหรืออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน กล่าวคือ ระยะเวลาในการแช่ที่ใช้เวลาน้อย อัตราการเจริญเติบโตของอัลจิเนทจะเกิดการฟอร์มตัวได้ดีกว่าการแช่ที่ระยะเวลานานๆ เพราะสาหร่ายที่อยู่ในอัลจิเนทจะเกิดการขาดสารอาหารทำให้มีการเจริญเติบโตได้ไม่ดี

4.5.2.4 การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนทและเคลือบด้วยไคโตซาน

1. การตรึงเซลล์อัลจิเนท – ไคโตซาน

การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนทเป็นการเก็บเซลล์ไว้ภายในเม็ดตรึง ซึ่งเป็นการจำกัดพื้นที่ของเซลล์เพื่อให้สะดวกต่อการเก็บเกี่ยวหรือนำไปใช้งาน และลดการปนเปื้อนของสิ่งเจือปนต่างๆ รวมทั้งยังช่วยต่อการประมวลผลของจำนวนเซลล์ ซึ่งการนำอัลจิเนทไปใช้งานนั้นอัลจิเนทจะฟอร์มตัวเป็นเจลโดยใช้ Ca^{2+} , Sr^{2+} หรือ Cu^{2+} เป็นต้น โครงสร้างของอัลจิเนทเมื่อเกิดการฟอร์มตัวในสารละลาย CaCl_2 จะมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) โดยมี Ca^{2+} เกาะอยู่กับหมู่คาร์บอกซิลของอัลจิเนท และอัลจิเนทที่หยดลงในแคลเซียมคลอไรด์จะเกิดเป็นเม็ดที่มีพื้นผิวเป็นประจุลบ หลังจากนั้นนำมาตรึงกับสารละลายไคโตซานจะเกิดโครงสร้างเชื่อมขวางเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง ซึ่งโครงสร้างจับกันด้วยหมู่คาร์บอกซิลของกรดอัลจินิก และหมู่กรดอะมิโนของไคโตซาน และพื้นผิวกลายเป็นประจุบวกเนื่องจากกรดอะมิโนที่มีอยู่ในไคโตซานเป็นจำนวนมาก การตรึงเม็ดปิดอัลจิเนทกับสารละลายไคโตซานเป็นอีกวิธีการเพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดตรึงอัลจิเนท จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมในการเคลือบเม็ดตรึงอัลจิเนทเพื่อเพิ่มความแข็งแรงและรอดชีวิตของเซลล์โดยความเข้มข้นของไคโตซานที่ทำการศึกษามีดังนี้คือ 0.2%, 0.4% และ 0.6% ไคโตซาน เม็ดตรึงมีขนาด 2.3 มิลลิเมตรและ 1.5 มิลลิเมตร เลี้ยงเม็ดตรึงเซลล์ที่ความเข้มแสง 1200, 1600, 2000, 4000, 6000 และ 8000 ลักซ์ พบว่าความเข้มข้นของไคโตซาน ที่เหมาะสมในการเคลือบเม็ดตรึงอัลจิเนทคือ 0.4% เนื่องจากเป็นสภาวะที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงสูงที่สุด เม็ดตรึงมีความแข็งแรงและหลุดลอกน้อย ซึ่งสภาวะนี้มีแนวโน้มในการยืดอายุการใช้งานของเม็ดตรึงให้นานขึ้น

ความเข้มข้นของไคโตซานมีผลต่อความแข็งแรงของเม็ดตรึงอัลจิเนท เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิ-เมอร์ธรรมชาติที่มีประจุบวกจึงเป็นสารที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) เมื่อนำเม็ดตรึงอัลจิเนท-ไคโตซานไปเลี้ยงในอาหารจึงทำให้เม็ดตรึงที่มีความเข้มข้นของไคโตซานมาก มีความสามารถในการดูดน้ำได้ดีกว่าเม็ดตรึงที่มีความเข้มข้นของไคโตซานน้อย จึงเป็นผลให้ความแข็งแรงของเม็ดตรึงลดลง เม็ดตรึงหลุดลอกออกมาได้มาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ S.K. Bajpai และคณะ (2006) ที่พบว่าการเคลือบเม็ดตรึงด้วยไคโตซานที่มีความเข้มข้นมาก จะส่งผลให้เม็ดตรึงหลุดลอกและเปื่อยยุ่ยได้ง่าย

2. การเจริญและการรอดชีวิตของเซลล์จุลสาหร่ายในเม็ดตรึงอัลจิเนท -ไคโตซาน

จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการเคลือบเม็ดตรึงอัลจิเนท ให้มีความแข็งแรง มีอัตราการเจริญและการรอดชีวิตของเซลล์จุลสาหร่าย ในด้านความแข็งแรงพบว่าการเคลือบด้วยไคโตซานเข้มข้น 0.4% เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดเนื่องจากเม็ดตรึงที่ได้มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง (% Hardness) สูงที่สุด และเมื่อศึกษาอัตราการเจริญและการรอดชีวิตของเซลล์ในเม็ดตรึงขนาด 2.3 มิลลิเมตรและ 1.5 มิลลิเมตร เลี้ยงที่ความเข้มแสง 1200, 1600, 2000, 4000, 6000 และ 8000 ลักซ์ พบว่าเม็ดตรึงขนาด 1.5 มิลลิเมตร เลี้ยงที่ความเข้มแสง 6000 ลักซ์ เซลล์มีอัตราการเจริญและการอยู่รอดดีที่สุด ซึ่งอยู่ได้ 3-4 วัน แล้วค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการที่เซลล์มีอัตราการเจริญที่เพิ่มขึ้นเพียง 3 วันนั้นอาจเป็นผลมาจากหลายปัจจัย ปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายให้มีการเจริญและการอยู่รอดได้นั้นก็ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น แสงเนื่องจากสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นพืชที่เจริญด้วยการสังเคราะห์แสง ความเข้มของแสงที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการคือ 2500 – 10000 ลักซ์ หากเลี้ยงโดยใช้แสงแดด ความเข้มแสงควรมากกว่า 10 กิโลลักซ์ อุณหภูมิที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 32-35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง ควรอยู่ในช่วง 8.5-10 จุลสาหร่ายจึงจะสามารถเจริญได้ดี (Thida และคณะ, 2003) รวมถึงความลึกของการเพาะเลี้ยง ความปั่นป่วน ปริมาณสารอาหาร ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้น และความหนาแน่นของชีวมวลกับการปรับตัวให้เข้ากับแสง ซึ่งพบว่าความหนาแน่นของจุลสาหร่ายมีผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดยในการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ จะทำให้ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของแสงที่ตกกระทบลงบนพื้นผิวต่อเซลล์มีปริมาณสูงเมื่อสาหร่ายเจริญ จึงทำให้การเพาะเลี้ยงโดยใช้ความเข้มแสงเท่าเดิม ไม่เพียงพอต่อปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Gittelsohn และคณะ, 1996, Grobbelaar และคณะ, 2007) ซึ่งจากงานวิจัยที่กล่าวมานั้นมีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้คือความเข้มแสงที่มีอัตราการเจริญและการรอดชีวิตที่ดีที่สุดคือ 6000 ลักซ์ ซึ่งเป็นความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ภายในเม็ดตรึง ซึ่งผู้วิจัยได้เสนอแนวทางในการทดลองต่อไปว่านี้ต้องมีการศึกษาการควบคุมให้เซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอและนานยิ่งขึ้นในที่สุดนี้ โดยศึกษาการใช้ธาตุอาหารของจุลสาหร่ายเพื่อจะควบคุมระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร จากข้อมูลผู้วิจัยได้เสนอว่าควรจะเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วันเพื่อจะทำให้จุลสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตต่อไป หรือศึกษาการเพิ่มแหล่งอาหารจากทางอื่น เป็นต้น

4.5.2.5 ทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่ถูกตรึง

ในทดสอบการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่อนำจุลสาหร่ายมาตรึงด้วยอัลจิเนท และอัลจิเนทร่วมกับไคโตซาน ผู้วิจัยมีความพึงพอใจในผลการทดลอง เนื่องจากลักษณะของการผลิตแก๊สไฮโดรเจนสามารถออกมาอย่างสม่ำเสมอจากจุลสาหร่ายที่ถูกตรึง โดยอัตราของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท และอัลจิเนทเคลือบด้วยไคโตซาน อยู่ที่ 47.5 และ 31.6 ไมโครลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ถึงแม้จะมีอัตราที่ต่ำกว่าอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่ไม่ถูกตรึงซึ่งอยู่ที่ 173.3 ไมโครลิตรต่อชั่วโมงก็ตาม แต่จุลสาหร่ายที่ถูกตรึงมีความได้เปรียบที่สามารถนำไปทดลองเพื่อเปลี่ยน

อาหารและคงสภาพอยู่ได้นานกว่า และจะสะท้อนให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในภาพรวมมากกว่า อีกทั้งยังสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในด้านอาหารและการควบคุม รวมถึงประหยัดเนื้อที่ของการเลี้ยงอีกด้วย ซึ่งจะต้องศึกษาการใช้ธาตุอาหารของสาหร่ายในเม็ดตรึงเพื่อจะควบคุมระยะเวลาการเปลี่ยนถ่ายอาหารของจุลสาหร่ายต่อไป

4.6 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

4.6.1 สรุปผลการทดลอง

4.6.1.1 การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนท

เมื่อกล่าวโดยรวมจากผลการทดลองที่ได้ทำให้สรุปได้ว่าความคงตัวของเม็ดตรึงนั้นขึ้นอยู่กับหลายๆปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของความเข้มข้นของตัวอัลจิเนท, ปริมาณเซลล์จุลสาหร่าย, เวลาที่ใช้ในการขึ้นรูป ฯลฯ ปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของเม็ด อัตราการเจริญเติบโตหรือการอยู่รอดของเซลล์ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของอัลจิเนท 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หยดในสารละลายสตรอนเทียม 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาณเซลล์ที่ใช้คือ 1.5 กรัม (แห้ง) ต่ออัลจิเนท 100 มิลลิลิตร และทำการแช่เม็ดอัลจิเนททิ้งไว้ในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.6.1.2 การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนทเคลือบไคโตซาน

จากผลการทดลองที่ได้ทำให้สรุปได้ว่า การเพิ่มความแข็งแรงของเม็ดตรึงอัลจิเนทด้วยสารละลายไคโตซานนั้นความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานมีผลต่อความแข็งแรงของเม็ดตรึงโดยการเคลือบเม็ดตรึงด้วยไคโตซานที่มีความเข้มข้นมากเกินไปก็จะส่งผลให้เม็ดตรึงมีความไม่แข็งแรง หลุดลอกได้ง่าย ส่วนเม็ดตรึงที่เคลือบด้วยไคโตซานที่มีความเข้มข้นพอเหมาะนั้น จะมีผลให้เม็ดตรึงอัลจิเนทมีความแข็งแรงและมีอายุการใช้งานได้นานขึ้น อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติบางประการของไคโตซาน และ การทดลองยังพบว่าความเข้มแสงไฟมีผลต่ออัตราการเจริญและการรอดชีวิตของเซลล์ เนื่องจากที่ความเข้มแสงสูงเซลล์มีอัตราการเจริญที่เพิ่มขึ้นและการรอดชีวิตสูงกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ ความเข้มข้นของอัลจิเนท 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) หยดให้เม็ดตรึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร ในสารละลายสตรอนเทียม 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาณเซลล์ที่ใช้คือ 1.5 กรัม (แห้ง) ต่ออัลจิเนท 100 มิลลิลิตร และทำการแช่เม็ดอัลจิเนททิ้งไว้ในสารละลายสตรอนเทียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเคลือบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงที่ความเข้มแสง 6000 ลักซ์

4.6.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารถตอบโจทย์ของการวิจัยที่ตั้งไว้ได้เป็นอย่างดีและครบถ้วน เนื่องจากสามารถใช้อัลจิเนทร่วมกับไคโตซานในการตรึงเซลล์จุลสาหร่ายเพื่อสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายได้ง่ายกว่าวิธีดั้งเดิม ทำให้ประหยัดเนื้อที่และลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินการได้มาก และเซลล์จุลสาหร่ายที่ถูกตรึงนั้นได้ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ แต่ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ยังมีปริมาณที่ไม่มากนัก โดยในหลังจากงานวิจัยชิ้นนี้จบลง เพื่อให้สามารถพัฒนาต่อไปและใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนจริงในอนาคต ยังจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกในส่วนของการศึกษาการใช้ธาตุอาหารของเซลล์สาหร่ายที่ถูกตรึง รวมถึงกลไกและเมแทบอลิซึมของจุลสาหร่ายที่ถูกตรึง เนื่องจากผลการทดลองเมื่อเซลล์สาหร่ายถูกตรึงแล้วจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกกว่า 270 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะไม่มีการเจริญเติบโต โดยผู้วิจัยคาดว่าอัตราการใช้อาหารของสาหร่ายเมื่อถูกตรึงจะไม่เหมือนกับเซลล์สาหร่ายแบบอิสระ โดยจะต้อง

มีการศึกษาต่อไปเพื่อจะทำให้สามารถควบคุมระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารของจุลสาหร่ายให้ดียิ่งขึ้น และจะสะท้อนให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีมากยิ่งขึ้น

4.7 บรรณานุกรม

- อาภารัตน์ มหาจันทร์, สาหร่ายคำตอบสุดท้ายของพลังงาน, พิมพ์ครั้งที่ 1, กรุงเทพฯ:กองพัฒนาธุรกิจและการตลาด, 2552.
- Aguilar-May B., Sánchez-Saavedra M.P., Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongates*, J Appl Phycol 21 (2009):353-360.
- Akhtar N., Iqbal J., Iqbal M. (2004) Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: Characterization studies. J. Hazard. Mater. B108, 85-94
- Bailliez C, Largeau C, Casadevall E. 1985 Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. Appl Microbiol Biotechnol 23, 99–105.
- Bojan T., Fessehay W.Z., Geoffrey C.M., Klaus H. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. International Journal of Hydrogen Energy 36 (2011): 7872-7876.
- Bryant D.A., Frigaard N.U. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated, Trends Microbiol., 14 (11) (2006): 488.
- Demirbas A., Fatih Demirbas M., Importance of algae oil as a source of biodiesel, Energy Conversion and Management 52 (2011): 163–170.
- Dennis D. Wykoff, John P. Davies, Anastasios Melis, and Arthur R. Grossman (1998) The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 117: 129–139.
- Dimitris, C., Sawaminee, N., Domonique, L., Michael, T.C., Vataliy, V.K. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. Department of Food and Nutritional Sciences, The University of Reading, P.O. Box 226, Reading RG6 6AP, UK (2012): 1281-1287.
- Dutta D., De D., Chaudhuri S. Bhattacharya S.K., Hydrogen production by Cyanobacteria, Microbial Cell Factories. 4 (2005): 3-6.
- E.D.G. Danesi, C.O. Rangel-Yagui, J.C.M. Carvalho, S. Sato. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes, 580-B.16, São Paulo 05508-900, SP, Brazil. 2004. 329–335.
- Florin L, Tsokoglou A, Happe T (2001) A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. J Biol Chem 276:6125–6132.

- Fierro S, Sánchez-Saavedra M.P., Copalcúa C. Nitrate and phosphate removal by chitosan Immobilized *Scenedesmus*. *Bioresource Technology* 99 (2008):1274–1279
- Gaffron H (1939) Reduction of CO₂ with H₂ in green plants. *Nature* 143:204–205.
- Gaffron H. (1940) Carbon dioxide reduction with molecular hydrogen in green algae, *Am. J. Botany* 27, 273–283.
- Gaffron, H. Rubin, J. (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, *J. Gen. Physiol.* 26, 219–240.
- Ghirardi ML, Togasaki RK, Seibert M (1997) Oxygen sensitivity of algal H₂-production. *Appl Biochem Biotech* 63:141–151.
- Ghirardi ML, Zhang L, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E, Melis A (2000) Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends Biotechnol* 18: 506–511.
- Gittelsohn, A., H. Quiang and A. Richmond . Photic Volume in Photobioreactors Supporting Ultrahigh Population Densities of the Photoautotroph *Spirulina platensis*. Remote Sensing Laboratory¹ and Microalgae Biotechnology Laboratory², J. Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boker Campus 84990, Israel. 1996. 62(5):1570.
- Guana Y., Deng M., Yu X., Zhang W. Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*. *Biochemical Engineering Journal* 19 (2004):69–73
- J. U. Grobbelaar. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds. Department of Plant Sciences, University of the Free State, PO Box 339, Bloemfontein 9300, South Africa. 2007. 19:591–598.
- Happe T, Kaminski A (2002) Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 269: 1022–1032.
- Happe T, Naber JD (1993) Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Euro J Biochem* 214:475–481.
- Happe T, Mosler B, Naber JD (1994) Induction, localization and metal content of hydrogenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 222:769–775.
- Hahn J.J., Ghirardi M.L., Jacody W.A., Immobilized algal cell used for hydrogen production, *Biochemical Engineering Journal* 37 (2010):75–79.
- Jangiam W., Tongtubtin P., and Peanpun M. (2010) Effects of culture and conditions on Biological hydrogen production from *Amphora* sp. *Proceedings of 3rd RC-NRM*. Bayview hotel, Langkawi, Malaysia. October, 25–26, 2010. 145–147.
- Jangiam W., Tongtubtin P., and Peanpun M. (2010) Effects of culture and conditions on Biological hydrogen production from *Anacystis* sp. *Proceeding of the 2nd Asian Conference on Innovative Energy and Environmental Chemical*

- Engineering. Laguna Beach Resort, Phuket, Thailand, 12-14 October, 2010. 479-482.
- J. H. Reith, R.H. Wijffels and H. Barten (2003) Biomethane and Biohydrogen Book, Chapter 6, 124-145.
- Jianlong W., Horan N., Stentiford E., Yi Q., The radial distribution and bioactivity of *Pseudomonas* sp immobilized in calcium alginate gel beads, Process Biochemistry 35 (1999):465–469.
- Jiménez-Pérez M.V., Sánchez-Castillo P., Romera O., Fernández-Moreno D., Pérez-Martínez C. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure, Enzyme and Microbial Technology 34 (2004):392–398.
- John J. Hahn., Maria L. Ghirardi., William A. Jacoby, Immobilized algal cells used for hydrogen Production, Biochemical Engineering Journal 37 (2007):75–79.
- Jiménez-Pérez M.V., Sánchez-Castillo P., Romera O., Fernández-Moreno D., Pérez – Martínez C.(2004) Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. Enzyme and Microbial Technology 34:392-398
- Kamp C, Silakov A, Winkler M, Reijerse EJ, Lubitz W, Happe T (2008) Isolation and first EPR characterization of the [FeFe]-hydrogenases from green algae. Biochim Biophys Acta 1777:410–416.
- Kruse O, Rupprecht J, Bader KP, Thomas-Hall S, Schenk PM, Finazzi G, Hankamer B (2005) Improved photobiological H₂ production in engineered green algal cells. J Biol Chem 280:34170–34177.
- K.S. Patel S., J. Purohit H., C. Kalia V. (2010) Dark fermentative hydrogen production by defined mixed microbial cultures immobilized on lingo-cellulosic waste materials. Hydrogen energy 35: 10674-10681
- Kumar N., Das D.(2001) Electron microscopy of hydrogen producing immobilized *E. cloacae* IY-BT 08 on natural polymers. Hydrogen Energy 26:1155-1163
- Rangsayatorn N., Pokethitiyook P., Upatham E.S., Lanza G.R.(2004) Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel. Environment International 30:57-63
- Lau PS, Tam NFY, Wong YS.1998 Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technol **63**, 115–121.
- Laurinavichene T, Tolstygina I, Tsygankov A (2004) The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biotechnol 114:143–151.

- Majeti N.V Ravi Kumar., A review of chitin and chitosan applications. Department of Chemistry, University of Roorkee, Roorkee 247 667, India (2000).1–27.
- Markov S.A., Bazin M.J., Hall D.O.(1995) Hydrogen photoproduction and carbon dioxide uptake by immobilized *Anabaena variabilis* in a hollow-fiber photobioreactor. *Enzyme and Microbial. Technology* 17:306-310
- Melis A, Happe T (2004) Trails of green alga hydrogen research—from Hans Gaffron to new frontiers. *Photosynth Res* 80:401–409.
- Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 122:127–135.
- Melis A, Seibert M, Happe T (2004) Genomics of green algal hydrogen research. *Photosynth Res* 82:277–288.
- Moreira S.M., Moreira-Santos M., Guilhermino L., Ribeiro R., Immobilization of the marine Microalga *Phaeodactylumtricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability, *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006):135–141.
- Mus F, Cournac L, Cardellini V, Caruana A, Peltier G (2005) Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1708:322–332.
- Moreno-Garrido I.(2008) Microalgae immobilization: Current techniques and use. *Bioresource Technology* 99: 3949-3964
- S.K. Bajpai , Rasika Tankhiwale., Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1, Polymer Research Laboratory, Department of Chemistry, Government Model Science College (Autonomous), Jabalpur, MP 482001, India (2006). 645–658
- Patel K.S.-S., Purohit H-J., Kalia C-V., Dark fermentative hydrogen production by defined mixed microbial culture immobilized on lingo-cellulosic waste materials, *Hydrogen energy* 35 (2010):10674-10681.
- Prashanth K.V. Harish, Tharanathan R.N. (2007) Chitin/chitosan:modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Science & Technology* 18:117-131.
- Rangsayatorn N., Pokethitiyook P., Upatham E.S., Lanza G.R., Cadmium biosorption by cell of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel, *Environment international* 30 (2004):57-63.
- Rai LC, Mallick N. 1992 Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. *World J Microbiol Biotechnol* 8, 110–114.
- Ravi Kumar M.N.V. (2000) A review of chitin and chitosan application. *Reactive & Functional Polymers* 46:1-27

- Rühle T, Hemschemeier A, Melis A, Happe T (2008) A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. BMC Plant Biol 8:107
- Sang-Sook P., Seong-Gyu S., Wild reed of Sunche on Bay: Potential bio-energy source, Renewable Energy (2011):1-5.
- Schnackenberg, J., Schulz, R., Senger, H. (1993) Characterization and purification of a hydrogenase from the eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus*, FEBS Lett. 327, 21–24.
- Skjånes K, Knutsen G, Källqvist T, Lindblad P (2008) H₂ production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for bioreactor design. Int J Hydrogen Energy 33: 511–521.
- Takeshita T, Tanaka K, Ishizaki A, Stanbury PF (1993) Development of a dissolved hydrogen sensor and its application to evaluation of hydrogen mass transfer. J Ferment Bio eng 76: 148–150.
- Tsygankov A, Kosourov S, Tolstygina I, Ghirardi ML, Seibert M (2006) Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions. Int J Hydrogen Energy 31:1574–1584.
- Wang Y.-Z., Liao Q., Zhu X., Tian X., Zhang C. (2010) Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 in an immobilized-cell photobioreactor. Bio resource Tech 101:4034-4041
- Winkler M, Heil B, Heil B, Happe T (2002a) Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*. Biochim Biophys Acta 1576:330–334.
- Winkler M, Hemschemeier A, Gotor C, Melis A, Happe T (2002b) [Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur-deprivation. Int J Hydrogen Energy 27:1431–1439.
- Winkler M, Maeurer C, Hemschemeier A, Happe T (2002c) The isolation of green algal strains with outstanding H₂-productivity. In: Miyake J, Igarashi Y, Roegner M (eds) Biohydrogen III. Elsevier Science, Oxford, pp 103–115.
- Xie G.J., Liu B.F., Ding J., Ren H.Y., Xing D.F. Ren N.Q. (2011) Hydrogen production by photo-fermentative bacteria immobilized on fluidized bio carrier. Hydrogen energy:1-6
- Zhang H., Brunsb M.A., Logana B.E., Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor, WATER RESEARCH, 40 (2006): 728–734.
- Zhang L., Happe T, Melis A (2002) Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). Planta 214:552–561.

Zirngibl, C., VanDongen, W., Schwörer, B., VonBunau, R., Richter, M., Klein, A., Thauer, R. K. (1992) H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea, Eur. J. Biochem. 208, 511–520.

