



การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง

The Study of Optimum Conditions for *Chlorella vulgaris* by the Response Surface Experimental Design

กิตติพล กลีภรณ์^{1,2*} วีชระ เวียงแก้ว² ศิริวรรณ ศรีสรณ์² และ ชนาธิป สามารถ³

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ในถังปฏิกรณ์แบบกะขนาด 1 ลิตร ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ ทั้งนี้ปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ($T = 25-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น ($\text{pH} = 6-8$) และสัดส่วนโดยปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ($1.6 - 7.7\%$) โดยการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองของ Box-Behnken เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ในถังปฏิกรณ์แบบกะขนาด 1 ลิตร ที่มีการให้แสงตลอดเวลาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ $29.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.26 และอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์คือ 16.18 มล./นาที หรือสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์คือ 2.46% โดยสภาวะดังกล่าวให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะคือ 0.389 วัน^{-1}

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the optimum conditions for cultivation of *Chlorella vulgaris* in a 1-L bioreactor using statistical experimental design. The results were successfully determined by response surface methodology of Box-Behnken and will be used to design the pilot plant bioreactor. Experimental factors effecting the optimum conditions were the cultivation temperature of $25-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, the pH of 6-8 and the volumetric ratio of carbon dioxide of 1.6–7.7%. It was found that the optimum conditions for cultivation were 29.6°C , $\text{pH} = 7.26$ and the volumetric flow rate of carbon dioxide of 16.18 ml/min or carbon dioxide volumetric ratio of 2.63% giving a specific growth rate of 0.389 day^{-1} .

คำสำคัญ: การหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับยาลอเรลลา การออกแบบการทดลองทางสถิติ

Keywords: Optimum Conditions, *Chlorella vulgaris*, Experimental Design

¹ สาขาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม จตุจักร กรุงเทพฯ

² ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อ.องครักษ์ จ.นครนายก

³ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

* Corresponding Author, E-Mail: kittiponk@swu.ac.th

บทนำ

จุลสาหร่ายที่เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิดเช่นโปรตีน น้ำมัน และสารอื่นๆที่มีประโยชน์เช่น กรดแกมมาไลโนเลนิก (GLA) วิตามินบีและเบตาแคโรทีน เป็นต้น ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารเสริมสุขภาพที่มีราคาแพง อีกทั้งจุลสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโฟโตโทรฟิก (phototrophic) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวประเภทที่ใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ในการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศให้เป็นชีวมวลและผลิตภัณฑ์ต่างๆได้โดยก่อนการปฏิวัติอุตสาหกรรม ชั้นบรรยากาศของโลกมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 280 ppm แต่ในปัจจุบันปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นถึง 380 ppm ซึ่งปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นมากใน 2 ศตวรรษนี้ ทำให้อุณหภูมิเฉลี่ยของโลกสูงขึ้นกว่า 0.5°C (Mcciban, 2007) ทั้งนี้ในทางทฤษฎี จุลสาหร่ายสามารถลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศได้กว่า 4.5 L/m² y อีกทั้งสามารถเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายได้เป็นจำนวนมากในพื้นที่อันจำกัด จากคุณลักษณะที่ดีดังกล่าวจึงนับว่าจุลสาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่มีศักยภาพสูงที่สามารถนำมาใช้ในการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนแหล่งอาหาร พลังงาน และสามารถแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมของโลกได้ (Chisti, 2007)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานอันได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยผู้วิจัยยังไม่พบการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบพหุคูณเพื่อใช้ในการกำหนดค่าควบคุมสำหรับการปฏิบัติการในถังปฏิกรณ์เพื่อเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยการออกแบบการทดลองทางสถิตินี้จะเป็นวิธีการออกแบบการทดลองที่ทำให้ประหยัดทรัพยากรและสามารถใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์เพื่อประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายได้

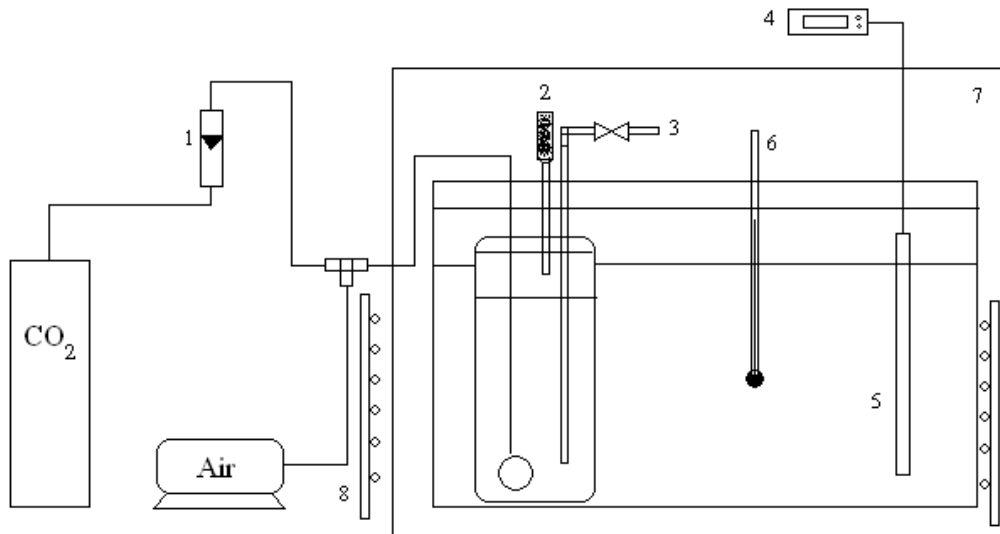
วิธีดำเนินงาน

1. วิธีการเตรียมสายพันธุ์จุลสาหร่าย

จุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยทำการเก็บสายพันธุ์จุลสาหร่ายบนอาหารแข็งเอียงสูตร BG-11 ที่เททับด้วยกลีเซอรอล เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อนำสายพันธุ์จลินทรีย์มาใช้ทดลอง ทำการเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 ลูบ ลงบนอาหารแข็งสูตร BG-11 ปล่อยให้เติบโตภายใต้แสง warm white เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำละลายจุลสาหร่ายในอาหารแข็งด้วยอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 5 มล. ถ่ายลงบนขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 100 มล. ปล่อยให้เติบโตภายใต้แสง Warm white เป็นเวลา 7 วัน ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ในถังปฏิกรณ์ขนาด 1 ลิตร (دنกุล และคณะ, 2551)

2. วิธีการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตรเป็นโถแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว สูง 12 นิ้ว ฝาเป็นไม้มีการเจาะรูขนาด 5 มม. จำนวน 4 รูเพื่อใส่สายยางสำหรับป้อนอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าและสำหรับเป็นทางออกของก๊าซขาออก และใส่สายยางสำหรับเก็บตัวอย่าง ชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร ถูกติดตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิซึ่งควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 25-40°C ± 0.5°C ควบคุมความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6-8 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำการป้อนอากาศที่อัตราการไหลคงที่ที่ 600 มล./นาที และควบคุมอัตราการไหลโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 10-50 มล./นาที ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1.6% - 7.7% โดยปริมาตร ให้แสงไฟจากหลอด warm white ที่ให้ค่าความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ดังแสดงในรูปที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่ายเป็นเวลา 7 วัน โดยติดตามการเติบโตของจุลสาหร่ายด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ทุก 24 ชั่วโมง



รูปที่ 1 โดอะแกรมของระบบการเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย

- 1 = โรตاميเตอร์สำหรับควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- 2 = ทางออกของก๊าซขาออก
- 3 = ช่องเก็บตัวอย่าง
- 4 = อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ
- 5 = แท่งกำเนิดความร้อนสำหรับควบคุมอุณหภูมิ
- 6 = เทอร์มิเตอร์
- 7 □ 8 = แผงควบคุมไฟ 3000 ลักซ์

3. วิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

งานวิจัยนี้อาศัยการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ด้วยวิธีของ Box-Behnken จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางสถิติมินิแทบ (Minitab) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์คอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ปัจจัย อาศัยการทำทดลองทั้งสิ้นจำนวน 15 การทดลอง โดยเป็นการทดลองที่ตำแหน่งกึ่งกลางซึ่งทำซ้ำจำนวน 3 การทดลอง โดยผลการทดลองที่ตำแหน่งกึ่งกลางจะถูกนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสมบูรณ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กับผลการทดลองโดยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้สามารถแสดงได้ดังสมการ (Montgomery, 1997)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_{x_i} + \sum \beta_{x_i^2} + \sum \beta_{x_i x_j} + \epsilon \tag{1}$$

เมื่อ Y = น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน

$\beta_0, \beta_{x_i}, \beta_{x_i^2}, \beta_{x_i x_j}$ = สัมประสิทธิ์ของเทอมค่าคงที่เชิงเส้นกำลังสอง และ ความสัมพันธ์ร่วมตามลำดับ

X_i = ปัจจัยที่ศึกษา

ผลการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ถูกนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยการทดสอบความแปรปรวน (ANOVA) และทดสอบความสมบูรณ์ของสมการ (Lack of fit) (ประไพศรี และพงค์ชนัน, 2551) และแสดงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ต่อความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วันด้วยรูปกราฟ 3 มิติและกราฟคอนทัวร์ และสมการคณิตศาสตร์ที่ได้จากสมการที่ (1) จะถูกนำไปหาสภาวะที่เหมาะสม โดยอาศัยสมการที่ (2)

$$0 = \frac{\partial Y}{\partial x_i} = \beta_i \frac{\partial x_j}{\partial x_i} + \beta_{ii} \frac{\partial x_{ii}}{\partial x_i} + \beta_{ij} \frac{\partial x_i x_j}{\partial x_i} \tag{2} □$$

3.2 วิธีที่ยืนยันสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ

การยืนยันสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ทำได้โดยการทำการทดลองตามสถานะเหมาะสมที่ได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์สถิติมินิแทบ รุ่นที่ 13 ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยการทดสอบค่าเฉลี่ย โดยมีการตั้งสมมติฐานหลักว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.926 g/L ซึ่งแสดงได้ดังสมการที่ (3) ดังนี้

$$\begin{aligned} H_0 : \mu &= 1.926 \\ H_1 : \mu &\neq 1.926 \end{aligned} \quad (3)$$

เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบน้อยกว่า 30 ($n < 30$) จะใช้ค่าสถิติที่ใช้ทดสอบดังสมการที่ (4) ดังนี้

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}} \quad (4)$$

เมื่อ \bar{x} = ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเซลล์แห้ง
 μ = ค่าเฉลี่ยของประชากร □

S = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

n = จำนวนตัวอย่าง

โดยการทดสอบมีค่าองศาความเป็นอิสระ ($n-1$) เป็นค่าทดสอบ ซึ่งจะปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0) เมื่อค่าสถิติทดสอบเป็นดังสมการที่ (5)

$$t \geq t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \quad (5)$$

เมื่อ α = ระดับนัยสำคัญ

ทั้งนี้จะได้ช่วงความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งของประชากรแสดงได้ดังสมการที่ (6) (สายชล, 2551) (ประไพศรี และ พงศ์ชนัน, 2551)

$$\bar{x} - t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

ผลการศึกษา

1. การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง และสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ทำการศึกษาอิทธิพลอุณหภูมิใน

การเพาะเลี้ยง ($T = 25-40^\circ\text{C}$) ค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้น ($\text{pH} = 6 - 8$) และสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (1.6-7.7%) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะปริมาตร 1 ลิตร ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 ผลการทดลองของน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Chlorella vulgaris* เมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 1 ลิตร ที่มีการควบคุมอุณหภูมิค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น อัตราการไหลโดยปริมาตรของคาร์บอนไดออกไซด์ ตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

การทดลองที่	อุณหภูมิ (°C)	ค่าความเป็นกรดต่าง	CO ₂ (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)
1	25	7	7.7	0.681
2	25	6	4.65	1.303
3	32.5	8	1.6	1.651
4	32.5	6	1.6	1.534
5	40	6	4.65	0.000
6	25	7	1.6	1.649
7	32.5	8	7.7	1.692
8	40	7	1.6	0.000
9	32.5	7	4.65	1.890
10	40	8	4.65	0.000
11	40	7	7.7	0.000
12	32.5	7	4.65	1.750
13	25	8	4.65	1.351
14	32.5	6	7.7	1.289
15	32.5	7	4.65	1.709

จากการทดลองทางสถิติตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box - Behnken จะได้ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการที่ (1) และค่าทางสถิติต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์และค่าสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน ของ *Chlorella vulgaris* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะขนาด 1 ลิตร

Term	Coef	T	P
Constant	-17.615	-3.367	0.020
Temp	1.0799	8.636	0.000
pH	1.1375	0.916	0.402
CO ₂	-0.3947	-1.675	0.155
Temp*Temp	-0.0185	-12.293	0.000
pH*pH	-0.0803	-0.949	0.386
CO ₂ *CO ₂	-0.0173	-1.907	0.115
Temp*pH	-0.0016	-0.148	0.888
Temp*CO ₂	0.0106	2.979	0.031
pH*CO ₂	0.0234	0.880	0.419

$$S = 0.162448 \quad R^2 = 98.29\% \quad R^2 (\text{adjust}) = 95.21\%$$

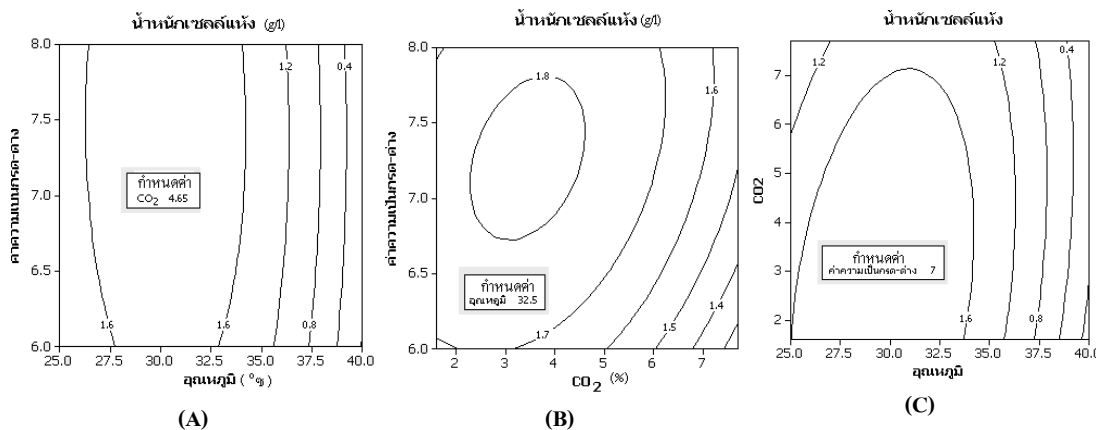
เมื่อ	T	=	ค่าสถิติ T
	P	=	ค่าสถิติ P
	S	=	ค่าผิดพลาดมาตรฐานของ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์
	R ²	=	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ
	R ² -adj	=	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้

ดังนั้นจะได้สมการทางคณิตศาสตร์ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน ด้วยวิธีผลต่างกำลังสองน้อยที่สุด (Box et.al, 1993) ซึ่งแสดงได้ดังสมการที่ (7)

$$Y = -17.615 + 1.0799T + 1.1375pH - 0.3947CO_2 - 0.0185T^2 - 0.0803pH^2 - 0.0173CO_2^2 \quad (7)$$

$$- 0.0016 T \times pH + 0.0106 T \times CO_2 + 0.0234 pH \times CO_2$$

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้สามารถนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน กับปัจจัยต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 (A) แสดงกราฟพื้นผิวที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงและค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น
 (B) แสดงกราฟพื้นผิวที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น
 (C) แสดงกราฟพื้นผิวที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิ

จากรูปที่ 2 (A)-(C) พบว่าน้ำหมักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วันจะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิประมาณ 30°C ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 ในขณะที่สัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์พบว่าให้ค่าที่ดีที่สุดในการเติบโตของเซลล์จุลสาหร่ายไม่แน่นอนกล่าวคือในรูปที่ 2 (B) พบว่าที่สัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็น 3.5 ให้น้ำหมักเซลล์แห้งสูงสุด แต่ในรูปที่ 2 (C) พบว่าที่สัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำกว่า 3% กลับให้น้ำหมักเซลล์แห้งสูงสุดซึ่งแสดงให้เห็นอิทธิพลปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันของปัจจัย (interaction effect) ของสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยอาศัยสมการที่ (2) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมจริงต่อไป นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าเซลล์จุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40°C ทั้งนี้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงพบว่า เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงมากที่สุดเนื่องจากเป็นปัจจัย

มีค่าสถิติ $p = 0.000$ ที่ระดับนัยสำคัญสูงกว่า 99% ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นในช่วงที่เลือกทำการทดลองแทบจะไม่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเนื่องจากมีค่าสถิติ $p = 0.402$ และ 0.386 สำหรับเทอมเชิงเส้น และเทอมกำลังสอง ทั้งนี้อาจเกิดจากการปรับค่าความเป็นกรดต่างโดยใช้สารบัฟเฟอร์เฉพาะช่วงเริ่มต้นอาจไม่สามารถควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในถึงปฏิกรณ์ได้เมื่อทำการป้อนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ถึงปฏิกรณ์

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์นี้มีความสมบูรณ์ของข้อมูลการทดลองกับค่าที่ได้จากแบบจำลองที่ค่า 98.28% ของผลการทดลองทั้งหมด ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ (R^2 -adj) จะมีค่าเป็น 95.19% ซึ่งค่าดังกล่าวสามารถใช้เปรียบเทียบกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์รูปแบบอื่น การทดสอบความแปรปรวน (ANOVA) และทดสอบความสมบูรณ์ของสมการ (Lack of fit) แสดงได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทดสอบความแปรปรวนและความสมบูรณ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

Source of Variance	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	7.58485	7.58485	0.84276	31.94	0.001
Linear	3	3.31706	2.14602	0.71534	27.11	0.002
Square	3	4.01251	4.01251	1.33750	50.68	0.000
Interaction	3	0.25528	0.25528	0.08509	3.22	0.120
Residual Error	5	0.13195	0.13195	0.02639		
Lack-of-Fit	3	0.11393	0.11393	0.03798	4.22	0.198
Pure Error	2	0.01801	0.01801	0.00901		

ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเทอมกำลังสองของปัจจัยในสมการที่ (6) มีอิทธิพลสูงสุดต่อน้ำหมักเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงได้ในเวลา 7 วัน ($p = 0.000$) ที่ระดับนัยสำคัญ 99.9% ในขณะที่เทอมเชิงเส้นของปัจจัยมีอิทธิพลในลำดับถัดมา ($p = 0.002$) ที่ระดับนัยสำคัญสูงกว่า 99% ในขณะที่เทอมอิทธิพลร่วมของปัจจัยแทบจะไม่มีอิทธิพลต่อน้ำหมักเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงได้ในเวลา 7 วัน

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ได้

การทดสอบความสมบูรณ์ของแบบจำลอง (Lack of fit) พิจารณาได้จากค่าสถิติ P ซึ่งมีค่าเป็น 0.198 ซึ่งค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้มีความสมบูรณ์กับข้อมูล (P -lack of fit > 0.01) ที่ระดับนัยสำคัญ 99.9%

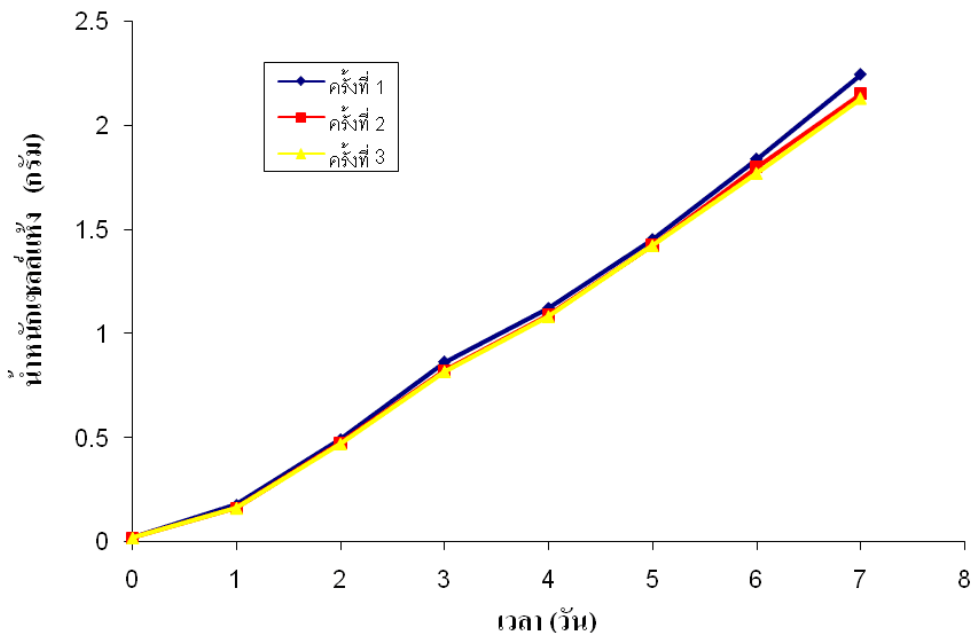
เมื่อนำสมการที่ (7) ศึกษาค่าสภาวะที่เหมาะสมด้วยโปรแกรมมินิแทบ จะได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* เป็นดังนี้

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง	=	29.6 °C
ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น	=	7.26
สัดส่วนโดยปริมาตรของคาร์บอนไดออกไซด์	=	2.46%
โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน	=	1.926 กรัม/ลิตร

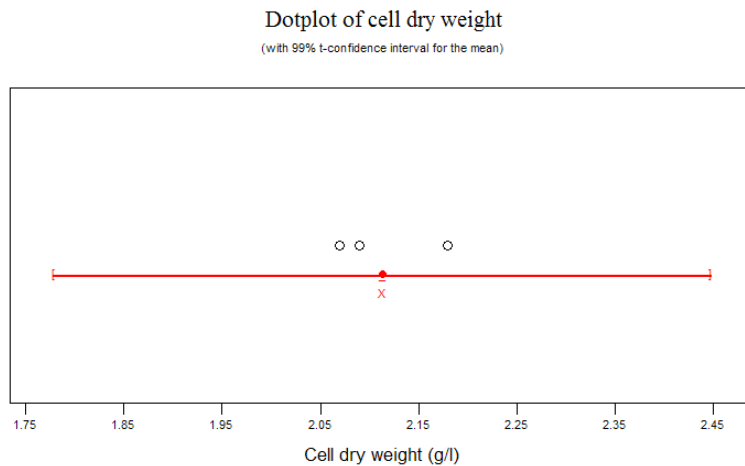
2.การยืนยันสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella Vulgaris* ด้วยวิธีทางสถิติ

เพื่อทำการยืนยันสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่จะให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน จึงทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงที่สภาวะที่เหมาะสมซ้ำจำนวน 3 การทดลอง โดยได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorella Vulgaris* ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการทดสอบสมมติฐานค่าเฉลี่ย ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานดังสมการที่ (3) โดยจะได้ค่าสถิติ $t = 5.40$ และ $t_{\alpha/2} = 6.965$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ ($H_0 = 1.926$) นั่นคือค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน คือ 1.926 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยในการทดลองพบว่าที่ระดับความเชื่อมั่นดังกล่าวมีช่วงของค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วันในช่วง 1.78 ถึง 2.45 กรัมต่อลิตร ซึ่งช่วงความเชื่อมั่นสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4 ซึ่งเพาะเลี้ยงจุลสาหร่าย *Chlorella Vulgaris* ในถังปฏิกรณ์แบบท่อที่มีการให้แสง (Tubular photoreactor) ที่สัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็น 2% พบว่าให้ค่าการเติบโตจำเพาะที่ 0.36 วัน^{-1} ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ ประกอบกับในงานวิจัยนี้ทำการเพาะเลี้ยงในอ่างน้ำคুমอุณหภูมิซึ่งมีความหนากว่า 10 ซม. จึงทำให้ความสามารถในการใช้แสงของจุลสาหร่าย *Chlorella Vulgaris* ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น



รูปที่ 3 ผลการเติบโตของจุลสาหร่าย *Chlorella Vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (29.6 °C ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.26 และสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2.46%)



รูปที่ 4 ช่วงของค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วันในสภาวะที่เหมาะสมของจุลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากข้อมูลในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella Vulgaris*

บทสรุปและวิจารณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken มีสภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 29.6°C ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.26 และสัดส่วนโดยปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์คือ 2.46% โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วันจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ คือ 1.926 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการทดลองเพื่อยืนยันปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงได้พบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพาะเลี้ยงได้ใช้เวลา 7 วันอยู่ในช่วง 1.78 ถึง 2.45 กรัมต่อลิตร ที่ระดับนัยสำคัญ 99% และจะได้อัตราการเติบโตจำเพาะคือ 0.389 วัน⁻¹

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายดนุกุล เลิศวนิชพัฒนกุล และนางสาวศิริลักษณ์ นิยมการ สำหรับการจัดเตรียมข้อมูลในงานวิจัยนี้ งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนสนับสนุนงานวิจัย เงินรายได้คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2552

เอกสารอ้างอิง

- ดนุกุล เลิศวนิชพัฒนกุล ศิริลักษณ์ นิยมการ และกิตติพล กลสิการ์ (2551). การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากจุลสาหร่าย. เอกสารรวบรวมงานวิจัยของภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีการศึกษา 2551
- ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และพงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์. (2551). การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ท็อป, 277-280.
- สายชล สิ้นสมบุญทอง. (2551). สถิติวิศวกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์, 274-276.
- สุณี รักษาเกียรติศักดิ์. (2547). การใช้โปรแกรม SPSS และ Epi Info สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 1-20
- Aloice, W.M. and Noike, T. (1993). Effect of glucose loading on the growth behavior of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria in mixed culture. *Wat. Res.* Vol.28(5): 1001-1008.

- Box, G.E., Hunter W.G., and Hunter, J.S (1993). Statistics for Experimenters. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Carberry, J.B. and Green, R.W. (1992). Model of algal bacterial clay wastewater treatment system. Wat. Sci. Technol. Vol.26(7-8): 1697-1706.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25: 294-306.
- Mcciban, B. (2007). สมการใหม่ของวิกฤตคาร์บอนในการแก้ปัญหาสภาวะโลกร้อน. วารสารเนชั่นแนลจีโอกราฟิฉบับภาษาไทย. ตุลาคม: 43-69.
- Ortiz, E., Casazza, A. Aliakbarian, B. Perego, P., Converti A. and Carvalho, J.C. (2010). Growth and lipid composition of *Chlorella Vulgaris* cultivated in a tubular photobioreactor fed with CO₂-enriched air. Special Abstract. Journal of Biotechnology. S1-S576.