รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มศักยภาพผลผลิตไฮโดรเจนโดยเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33

The improvement of hydrogen production by mixed culture between anaerobic bacteria and photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas* sp. S12 and OS33

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

และ

ผศ. นิสา ไกรรักษ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

b00270220

RC0016 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556
คณะวิทยาศาสตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเพิ่มศักยภาพผลผลิตไฮโดรเจนโดยเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ) The improvement of hydrogen production by mixed culture between anaerobic bacteria and photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas* sp. S12 and OS33

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 293,400 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2556

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย
นาย สมชาย ไกรรักษ์ (หัวหน้าโครงการ)
หน่วยงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520, kksomcha@kmitl.ac.th
นาง นิสา ไกรรักษ์ (ผู้วิจัยร่วม)
หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131, nisa@buu.ac.th

คำสำคัญ (Keywords) ไบโอไฮโดรเจน การบำบัดน้ำเสีย จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium ที่มีแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ไม่พบการเจริญ แต่เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง และข้าว ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญ และสร้างไฮโดรเจน ดีขึ้นแต่ยังอยู่ในระดับต่ำ เนื่องจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เจริญช้ามาก เมื่อนำจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (*Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33) เลี้ยงเชื้อร่วมกับจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (ที่อยู่ในน้ำเสียแป้ง และข้าว จากการเตรียมเป็นเวลา 0 3 และ 5 วัน ตามลำดับ) พบว่าการใช้น้ำเสียแป้ง และข้าว ที่ผ่านการเตรียมเป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณกรดอินทรีย์เริ่มต้นเหมาะสมสำหรับให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้ จึงทำให้เชื้อเจริญอย่างรวดเร็ว และสร้างไฮโดรเจนดีขึ้น แต่ก๊าซที่ได้เป็นของผสม จึงหันมาใช้การเลี้ยงเชื้อร่วมแบบแยกส่วน (two phase system) เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตไฮโดรเจน โดยขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 และขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ซึ่งขวดเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 จะเชื่อมต่อกัน โดยมีเยื่อเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้นแยกระหว่างขวดทั้ง 2 ทำให้กรดอินทรีย์สามารถแพร่จากขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ไปยังขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 เพื่อให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้เพื่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน จึงได้เพียงไฮโดรเจนเพียงชนิดเดียวในขวดเลี้ยวเชื้อที่ 1 ผลการทดลองพบว่าการใช้น้ำเสียข้าว (อายุ 3 วัน) ทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสร้างไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 17 มล. และแหล่งคาร์บอนในน้ำเสียข้าวลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การผลิตไฮโดรเจนด้วยการเลี้ยงเชื้อแยกส่วนในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อครั้งเดียว และเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร พบว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงให้การสร้างไฮโดรเจน 25.5 มล. และ 21.8 มล. ตามลำดับ การเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีป้อนอาหารพบว่าความเข้มข้นจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง มีค่าสูงมาก จนส่งผลให้เกิดการบดบังแสง จึงทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เป็นผลมาจากความสมดุลของกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase ที่เกี่ยวข้องกับการนำพลังงานไปใช้เพื่อกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ทั้งในด้านการเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The co-culture of *Rhodopseudomonas* sp. S12 and OS33 was cultivated in AM medium containing 30 g/l of glucose, starch and rice as c-source, respectively. Their growth was not found when cultivated in glucose as c-source. However, their very slow growth and small amount of hydrogen were observed when cultivated in starch and rice one. Then, the mixed culture between anaerobic bacteria and photosynthetic bacteria (*Rhodopseudomonas* sp. S12 and OS33) was tested by cultivation with starch wastewater and rice wastewater, respectively. The starch wastewater and rice wastewater were prepared for 0, 3 and 5 days, respectively. It was found that the starch wastewater and rice wastewater, which prepared for 3 days, gave the optimal cultivation of mixed culture. The initial concentration of organic acids (in wastewaters) was utilized by the photosynthetic bacteria resulting in high growth and hydrogen production. However, the hydrogen was found in the form of mixed gases. The two phase system for the mixed culture of anaerobic bacteria and photosynthetic bacteria was experimented to enhance the hydrogen production. The cultivations of photosynthetic bacteria (*Rhodopseudomonas* sp. S12 and OS33) and anaerobic bacteria were performed individually separation in Bottle No.1 and No.2, respectively. Both cultivated bottles were connected through the 10 Kda membrane filter. Thus, the organic acids (from cultivated Bottle No. 2) could be utilized by the photosynthetic bacterium (in cultivated Bottle No. 1) by the osmosis through the 10 Kda membrane filter. The result showed that the maximum hydrogen production (17 ml) was observed when using rice wastewater (preparation for 3 days) for the mixed cultivation in the two phase system. Furthermore, the cultivation was tested in 2L bottle with batch and fed-batch cultivations. It was found that the hydrogen production, in bottle No.1, were 25.5 ml and 21.8 ml, respectively. The cell concentration of photosynthetic bacteria with fed-batch cultivation was higher than one with batch cultivation. The high cell concentration of photosynthetic bacteria caused the light shading resulting in the limitation of light-dependent hydrogen production. The growth of photosynthetic bacteria and hydrogen production were related to the balance of hydrogenase and nitrogenase activity those concerning the energy utilization in the cell.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย "การเพิ่มศักยภาพผลผลิตไฮโดรเจนโดยเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33" ดำเนินงานไปได้ด้วยดีโดยได้รับความสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัย และในทุกๆ ด้าน จนงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

ผศ. นิสา ไกรรักษ์

(คณะผู้วิจัย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค

สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของโครงการวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....4
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน.....4
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....5
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....6
2.1 กระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน (Fermentative Process of H_2 Production).....7
2.2 กระบวนการทางชีวเคมี (Biochemical process).....9
2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก.....14
2.4 แนวทางการเพิ่มศักยภาพกระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก.....21
2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง.....23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....28
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....28
3.2 การกลายพันธุ์ และการคัดแยกเชื้อ.....28
3.3 ศึกษาคุณสมบัติการเจริญและการสร้างก๊าซของจุลินทรีย์กลายพันธุ์.....28
3.3 การเตรียมหัวเชื้อ.....29
3.4 ศึกษาการเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง.....29
3.5 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และ
จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม.....30
3.6 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และ
จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม แบบแยกส่วน.....30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ผสม แบบแยกส่วนในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2000 มล. ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อครั้งเดียว (batch cultivation) 31
3.8 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ผสม แบบแยกส่วนในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2000 มล. ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) 32
3.7 การวิเคราะห์ 33
บทที่ 4 ผลการทดลอง 35
4.1 จุลินทรีย์กลายพันธุ์ 35
4.2 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง 36
4.3 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง 40
4.4 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง แบบแยกส่วน 50
4.5 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ในขวด 2 ลิตร แบบแยกส่วน 58
บทที่ 5 สรุป และวิจารณ์ 66
5.1 สรุปผลการทดลอง 66
5.2 ข้อเสนอแนะ 66
เอกสารอ้างอิง 70
ภาคผนวก ก 77
ภาคผนวก ข. 78
ภาคผนวก ค. 84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ของเสียและของเหลือทิ้งต่างๆ ที่สามารถใช้เป็นสับสเตรท สำหรับผลิตไฮโดรเจน.....13
ตารางที่ 2.2 วิธีเตรียมสับสเตรทสำหรับผลิตไฮโดรเจน.....15
ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้กลูโคส มีเทน และไฮโดรเจน.....25
ตารางที่ 2.4 แสดงตัวให้อิเล็คตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง.....25
ตารางที่ 4.1 ผลการเจริญและการสร้างก๊าซของจุลินทรีย์กลายพันธุ์ และสายพันธุ์พ่อแม่.....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 (a) แสดงการเจริญในสภาพไม่ใช้อากาศเพื่อผลิตกรดอินทรียน์ และสร้างมีเทน ในระหว่างการย่อยสลายสารอินทรีย์ (b) วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนโปรตอนเป็นไฮโดรเจนในระหว่างการย่อยสลายสับสเตรท 8

ภาพที่ 2.2 แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากสับสเตรทที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ (a) การผลิตไฮโดรเจน และ (b) ประสิทธิภาพการใช้สับสเตรท (COD) (H, heat-shock; P, acid; C, chemical (BESA) 16

ภาพที่ 2.3 วงรอบศักย์ไฟฟ้าเคมี (Cyclicvoltammograms, CV) ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต ไฮโดรเจนจากการหมักโดยใช้เชื้อผสม โดยรักษาสภาวะเป็นกรด (a) และสภาวะเป็นกลาง (b) 17

ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงการส่งอิเล็คตรอนระหว่างเอนไซม์ hydrogenase-nitrogenase ในเมแทบอลิซึมการสร้างไฮโดรเจนของ *Rhodospirillum rubrum* ระหว่าง การสังเคราะห์ด้วยแสง 24

ภาพที่ 3.1 แสดงการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม และจุลินทรีย์ ไม่ใช้อากาศ แบบแยกส่วน โดยมีเยื่อเมมเบรนกั้นระหว่างขวดทั้ง 2 และ ชุดดักก๊าซที่ขวดเลี้ยงเชื้อ 31

ภาพที่ 3.2 แสดงการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม และจุลินทรีย์ ไม่ใช้อากาศ แบบแยกส่วน ด้วยวิธีป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) 32

ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium เมื่อใช้กลูโคสความเข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน 37

ภาพที่ 4.2 การเจริญของเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน 38

ภาพที่ 4.3 การเจริญของเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium เมื่อใช้ข้าว 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน 39

ภาพที่ 4.4 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียแป้ง เป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน....41
ภาพที่ 4.5 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียแป้ง (บ่มเป็นเวลา 3 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน....43
ภาพที่ 4.6 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียแป้ง (บ่มเป็นเวลา 5 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน....44
ภาพที่ 4.7 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน....46
ภาพที่ 4.8 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียข้าว (บ่มเป็นเวลา 3 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน....47
ภาพที่ 4.9 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียข้าว (บ่มเป็นเวลา 5 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน....49
ภาพที่ 4.10 แสดงการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง แบบแยกส่วน....51
ภาพที่ 4.11 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าว อายุ 0 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน....53
ภาพที่ 4.12 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อายุ 3 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน 55
ภาพที่ 4.13 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าว อายุ 5 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน 57
ภาพที่ 4.14 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าว อายุ 3 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ในภาชนะขนาด 2 ลิตร 60
ภาพที่ 4.15 กิจกรรมของของเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase ของการเลี้ยงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) แบบครั้งเดียว (batch cultivation) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน 61
ภาพที่ 4.16 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศในน้ำเสียข้าว อายุ 3 วัน (ขวดที่ 2) ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร (ลูกศร หมายถึงเริ่มต้นการป้อนอาหารในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ในภาชนะขนาด 2 ลิตร 63
ภาพที่ 4.17 กิจกรรมของของเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase ของการเลี้ยงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) แบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน 65
ภาพที่ ค-1 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1 ปริมาตร 2000 มล.) และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงในน้ำเสียข้าวอายุ 3 วัน (ขวดที่ 2 ปริมาตร 2000 มล.) แบบแยกขวด ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อครั้งเดียวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 84
ภาพที่ ค-2 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1 ปริมาตร 2000 มล.) และจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์ด้วยแสงในน้ำเสียข้าวอายุ 3 วัน (ขวดที่ 2 ปริมาตร 2000 มล.)
แบบแยกขวด ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อป้อนอาหาร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
ภายใต้แสง 85
ภาพที่ ค-3 แสดงแผ่นเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้นระหว่างขวดเลี้ยงเชื้อ 1 และ 2 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของโครงการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ (สศช.) คาดการณ์แนวโน้มเศรษฐกิจไทยในปี 2553 ขยายตัว 7.9 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแรงสนับสนุนจากการฟื้นตัวของเศรษฐกิจโลกและความมั่นใจของนักลงทุน ส่งผลให้การส่งออก การลงทุน และการบริโภคของภาคเอกชนยังคงขยายตัว ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อการใช้พลังงานโดยรวมของประเทศ การใช้พลังงานมีมูลค่า 1,796,199 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปีก่อน 218,006 ล้านบาท หรือคิดเป็นเพิ่มขึ้น 13.8 เปอร์เซ็นต์ โดยมูลค่าการใช้พลังงานทุกชนิดเพิ่มขึ้น เนื่องจากราคาพลังงานเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปี 2552 (ศูนย์พยากรณ์และสารสนเทศพลังงาน, 2554) สถานะการณ์ความต้องการพลังงานในประเทศไทยมีความสอดคล้องกับการพัฒนาของโลกอุตสาหกรรมในช่วงหลายร้อยปีที่ผ่านมามีผลทำให้คุณภาพชีวิตมีการพัฒนามากขึ้น แต่ก็มีผลทำให้เกิดปัญหาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เช่น การขาดแคลนพลังงาน และมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม ความต้องการพลังงาน และปริมาณพลังงานสำรองจึงเป็นยุทธศาสตร์ที่มีความสำคัญเร่งด่วนทั้งในปัจจุบัน และอนาคต การมองหาพลังงานทดแทนรูปแบบต่างๆ ทั้งประเภทที่ใช้แล้วหมดไป หรือนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จึงได้รับความสนใจ และพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ เพื่อสอดรับกับความต้องการที่เพิ่มมากขึ้น พลังงานทดแทนที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้จัดเป็นการแก้ปัญหาพลังงานที่เหมาะสม และยั่งยืนที่สุด ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น ไฮโดรเจนได้รับความสนใจ และมีการศึกษาวิจัยเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเป็นพลังงานทดแทนที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างไม่มีวันหมดสิ้น งานวิจัยต่างๆ มุ่งไปที่กระบวนการผลิตที่ใช้ต้นทุนทางเศรษฐกิจต่ำ ความสะดวกต่อการนำไปใช้ และเก็บรักษา แนวโน้มการพัฒนากระบวนการผลิตไฮโดรเจนมุ่งไปยังเทคโนโลยีต่างๆ ได้แก่

1. Thermochemical processes ซึ่งใช้ความร้อนในการเปลี่ยน มวลชีวภาพให้กลายเป็นก๊าซผสม สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ แต่อาจก่อให้เกิดปัญหาปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกในสู่สิ่งแวดล้อม

2. Photoelectrochemical processes ใช้ เทคโนโลยีของ semiconductor เพื่อแยกน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนโดยใช้แสงแดด เช่น ใช้ไฟฟ้าจากเซลล์แสงอาทิตย์ (solar cell) แต่ใช้ต้นทุนสูง อาจมีความเสี่ยงในเชิงเศรษฐกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

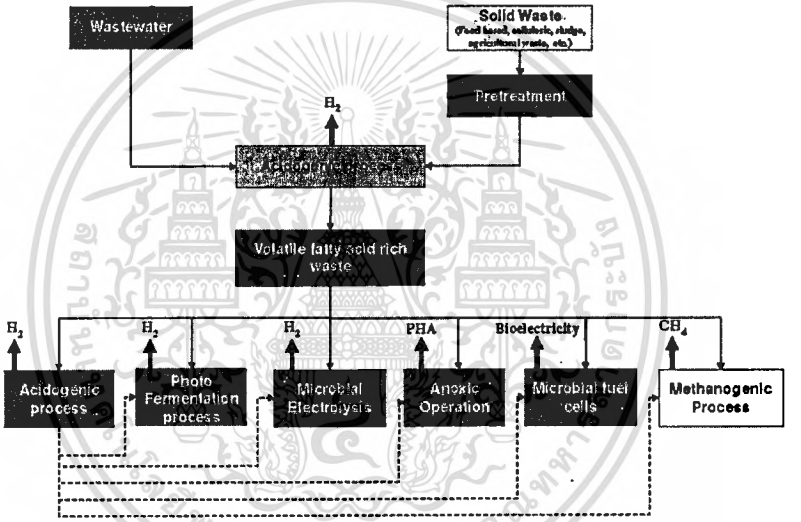
3. Photobiological processes โดยใช้แสงแดด และกระบวนการทางชีวภาพ ของสาหร่ายเซลล์เดียว และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อการแยกน้ำ หรือเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ให้กลายเป็นไฮโดรเจน แม้ว่าจะเป็นเทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อน ต้นทุนต่ำ แต่ปริมาณการผลิตยังไม่คุ้มค่าในเชิงพานิชย์

การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพมีการวิจัยพัฒนาอย่างมาก โดยมุ่งไปในด้านพัฒนาศักยภาพการผลิตที่รวดเร็วขึ้น และเพิ่มผลได้มากขึ้น และประยุกต์ใช้แหล่งวัตถุดิบราคาถูกเพื่อกระบวนการผลิต ซึ่งเน้นไปใช้ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร โรงงานผลิตอาหาร น้ำเสียจากครัวเรือน และการหมักทางชีวภาพ (biofermentation) น้ำเสียส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง ซึ่งมีค่า COD เฉลี่ย 2,000 มก.ต่อมล. นับว่าสูงมาก การแก้ปัญหาดังกล่าวต้องใช้เงินลงทุนสูง เพื่อบำบัดและกำจัดน้ำเสียเหล่านั้น ขณะเดียวกันก็สูญเสียมวลชีวะจำนวนมากที่มีอยู่ในน้ำเสียเหล่านั้นไปอย่างน่าเสียดาย จึงพัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อเพื่อบำบัดน้ำเสียในสภาพไม่ใช้อากาศและไร้แสง (dark anaerobic fermentation) เพื่อผลิตไฮโดรเจน ทำให้ได้ประโยชน์ทั้งในแง่การผลิตพลังงานสะอาด และบำบัดน้ำเสียไปพร้อมๆ กัน แต่อย่างไรก็ตามระหว่างการเจริญแบบไม่ใช้อากาศในที่มืดพบว่ามีการสร้างกรดอินทรีย์ควบคู่ไปด้วย ซึ่งจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศส่วนใหญ่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ จึงเกิดการสะสมกรดอินทรีย์ประมาณมาก ทำให้การบำบัดขั้นต่อมาต้องหาทางใช้ประโยชน์จากกรดอินทรีย์เหล่านี้เพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจน ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ (purple non-sulfur photosynthetic bacteria) สามารถใช้กรดอินทรีย์เพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะได้รับแสง ซึ่งให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศในสภาวะมืด เพื่อบำบัดน้ำเสีย จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อการเจริญ แต่มีเพียงแหล่งคาร์บอนบางชนิดเท่านั้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากน้ำเสีย (ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรทหลายชนิด ที่หลากหลายความเข้มข้น) ต้องอาศัยจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงที่สามารถใช้สับสเตรทเหล่านี้ได้ในช่วงกว้าง เพื่อนำไปผลิตไฮโดรเจน งานวิจัยนี้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงที่สามารถใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ เช่น แป้ง ข้าว กลูโคส และ acetic acid ซึ่งมีแนวโน้มสามารถนำไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ แต่จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เพื่อประโยชน์สูงสุดทั้งในด้านการผลิตไฮโดรเจน และการบำบัดน้ำเสีย

การสร้างเทคโนโลยีเพื่อผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพโดยคำนึงถึงสิ่งแวดล้อมนั้นมีความสำคัญอย่างมาก จึงต้องอาศัยการวิจัยหลากหลายแนวทาง วิศวะกรรมกระบวนการ และความเหมาะสมของปัจจัยดำเนินงานต่างก็นำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพระบบทางชีวภาพ และส่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิทธิพลถึงการผลิตไฮโดรเจนจากการหมัก การรักษาสภาวะเป็นกรด (เนื่องจากการสร้างกรดอินทรีย์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในวิถีเมแทบอลิซึม) ซึ่งส่งผลยับยั้งกระบวนการ ทำให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นไฮโดรเจนมีค่าลดลง อีกทั้งยังคงมีสับสเตรทเหลืออยู่ในน้ำหมักเป็นปริมาณมาก จึงมีการประยุกต์ใช้แนวทางต่างๆ เพื่อนำกรดอินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ การเลี้ยงเชื้อหลายขั้นตอน (Multi-stage process) เป็นแนวคิดที่มีความเป็นไปได้ เพื่อนำสารอาหารที่ยังคงเหลืออยู่ในน้ำหมักมาเปลี่ยนผลิตภัณฑ์พลังงานเพิ่มขึ้น (ได้แก่ ไฮโดรเจน ไฟฟ้าชีวภาพ หรือมีเทน เป็นต้น) ขณะเดียวการบำบัดน้ำเสียมีความสมบูรณ์มากขึ้นเพราะก็กำจัดคาร์บอนออกจากระบบได้อย่างดี (แสดงในภาพที่ 1.1) การนำพันธุวิศวกรรมมาปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และดัดแปลงเมแทบอลิซึม เป็นแนวทางที่มีศักยภาพสูงสำหรับเพิ่มผลผลิต



ภาพที่ 1.1 การใช้กระบวนการหลายแนวทางร่วมกันเพื่อผลิตพลังงานจากของเสียและน้ำเสีย

ที่มา : Mohan (2010)

อีกแนวทางหนึ่งที่สำคัญได้แก่การออกแบบและพัฒนาถังหมักให้เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน การขยายระบบไปสู่ถังหมักขนาดนำร่อง และขนาดใหญ่ (pilot และ large scale) เพื่อศึกษาข้อมูลเบื้องต้น ทำให้เทคโนโลยีนี้ยังยืน และสอดคล้องกับหลักเศรษฐศาสตร์ ดังนั้นนักวิจัยต้องศึกษาข้อมูลสอดคล้องความต้องการของภาคอุตสาหกรรมการผลิต และออกแบบให้เหมาะสมจึงจะเป็นกุญแจไปสู่ความสำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปรับปรุงและพัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงให้ผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อให้มีความสามารถใช้แป้ง ข้าว และความเข้มแสง สำหรับการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน ในสภาวะที่มีกรดอินทรีย์ความเข้มข้นสูง

3. ศึกษาการผลิตในถังหมักขนาด 2 – 5 ลิตร ด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบ batch และ fed-batch cultivation

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

นำน้ำเสียจากบ้านเรือนและโรงงานอาหาร (ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารอินทรีย์) มาเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่ใช้อากาศ และมีแสง เพื่อผลิตกรดอินทรีย์และเปลี่ยนกรดอินทรีย์เป็นไฮโดรเจน เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนเป็นเชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคาะห์แสง ซึ่งผ่านการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต จุลินทรีย์สังเคราะห์สายพันธุ์ OS33 และ S12 ที่คัดแยกได้นั้นมีความสามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง และข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตไฮโดรเจนได้ดี นำปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตไฮโดรเจน และการใช้กรดอินทรีย์ การทดลองศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการใช้เชื้อผสม ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ระดับพีเอช ปริมาณไนโตรเจน และอุณหภูมิ ที่เหมาะสม ในภาชนะปริมาตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร โดยการเลี้ยงเชื้อแบบ batch และ fed-batch cultivation

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

14.1 เชื้อจุลินทรีย์

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. OS33 และ S12 ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง และข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน มาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้สามารถใช้แป้งได้ดีขึ้น และผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น การปรับปรุงพันธุ์ใช้แสงอัลตร้าไวโอเลต และสารกระตุ้นการกลายพันธุ์ จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดีขึ้นและนำมาศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน และผลิตไฮโดรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 ศึกษาคุณสมบัติของจุลินทรีย์กลายพันธุ์

นำเชื้อที่คัดแยกได้มาศึกษาการเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน เทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

1.4.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน

นำเชื้อกลายพันธุ์มาศึกษาการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน ร่วมกับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ เพื่อเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน โดยแปรผันปริมาณสารอาหารแหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อแบบ batch และ fed-batch cultivation

1.4.4 การการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ของจุลินทรีย์สังเคราะห์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบ batch และ fed-batch cultivaiton

1.4.5 ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ศึกษาการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน โดยเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง และจุลินทรีนย์ไม่ใช้อากาศ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ batch และ fed-batch cultivation

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

โครงการวิจัยนี้มุ่งผลสำเร็จไปที่การนำความรู้เบื้องต้นจากการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (สายพันธุ์ OS33 และ S12 ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังและข้าว) และจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ เพื่อบำบัดน้ำเสียจากชุมชน แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไฮโดรเจน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียน วิธีการนี้นอกจากเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนแล้ว การใช้เชื้อผสมทั้ง 2 ประเภททำให้ประสิทธิภาพการกำจัดคาร์บอนออกจากน้ำทิ้ง มีค่าเพิ่มขึ้น ผลการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ด้วยวิธี batch และ fed-batch cultivation สามารถเพิ่มศักยภาพทั้งการผลิตไฮโดรเจน และการย่อยสลายสารอินทรีย์เพิ่มขึ้นไปอีก ซึ่งผู้วิจัยหวังว่าจะนำไปทดสอบขั้นต่อไป สรุปโดยรวมแล้วผลสำเร็จของโครงการวิจัยนี้อยู่ในระดับ P

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

ผลกระทบจากความต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้น ทำให้แหล่งพลังงานฟอสซิลสำรองมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว พร้อมทั้งก่อให้เกิดปัญหามลพิษจำนวนมหาศาลเข้าไปสะสมในสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้พลังงานในรูปของแหล่งฟอสซิล ทำให้เริ่มตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา การสร้างพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลสามารถทำได้ง่าย แต่ทว่าแหล่งพลังงานสำรองก็ลดลง และส่งผลทำให้อุณหภูมิโลกสูงขึ้นซึ่งนับเป็นปัญหาสำคัญ วิธีหนึ่งในการแก้ปัญหาอย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่การเปลี่ยนระบบเศรษฐกิจที่อยู่บนพื้นฐานเชื้อเพลิงฟอสซิลไปเป็นพลังงานไฮโดรเจน หรือพลังงานหมุนเวียน

ไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานสะอาด ให้พลังงานสูง (142.35 kJ/g) และได้น้ำหลังจากการเผาไหม้ ได้พลังงานสูงกว่าประมาณ 2.75 เท่าของพลังงานที่ได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล อีกทั้งไฮโดรเจนจัดเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตขึ้นมาใหม่ได้ แต่ทว่าการผลิตไฮโดรเจนเกือบ 90 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระบวนเคมีที่ความดันและอุณหภูมิสูง ได้แก่ stream reformation และ light oil fraction ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ได้แก่ การแยกตัวด้วยแสงทางชีวภาพ (bio-photolysis) การหมักด้วยแสง (photo-fermentation) และการหมักในสภาพไร้แสง (dark fermentation) หรืออาศัยการทำงานร่วมกันของระบบที่กล่าวมา การหมักในสภาพไร้แสงมีความได้เปรียบอย่างมาก เมื่อคำนึงถึงการนำของเสีย (wastewater) มาใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อผสม (mixed-culture) เพื่อผลิตไฮโดรเจน แต่ขณะเดียวกับการหมักด้วยแสงให้ผลได้สูงกว่า และมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสับสเตรทได้ดีกว่าของเสียประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ ที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งมีความได้เปรียบในด้านพลังงาน การนำของเสียมาเปลี่ยนเป็นแหล่งสับสเตรททำให้ลดค่าใช้จ่ายทั้งในด้านการบำบัดของเสีย และต้นทุนวัตถุดิบเพื่อการผลิตพลังงานไฮโดรเจนทางชีวภาพ เนื่องจากจุลินทรีย์อาศัยเมแทบอลิซึมย่อยสลายสารอินทรีย์ และผลิตไฮโดรเจนไปพร้อมกัน (Mohan และคณะ, 2005; Mohan, 2010)

การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพใช้ 2 แนวทางหลักซึ่งเกี่ยวข้องกับวิถี (pathway) การสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) และการหมักในสภาพไร้แสง (dark fermentation) การสังเคราะห์ด้วยแสงจัดเป็นกระบวนที่เกี่ยวข้องกับแสง (light-dependent) ประกอบด้วยการย่อยสารด้วยแสงโดยตรง (direct biophotolysis) การย่อยสารด้วยแสงโดยอ้อม (indirect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

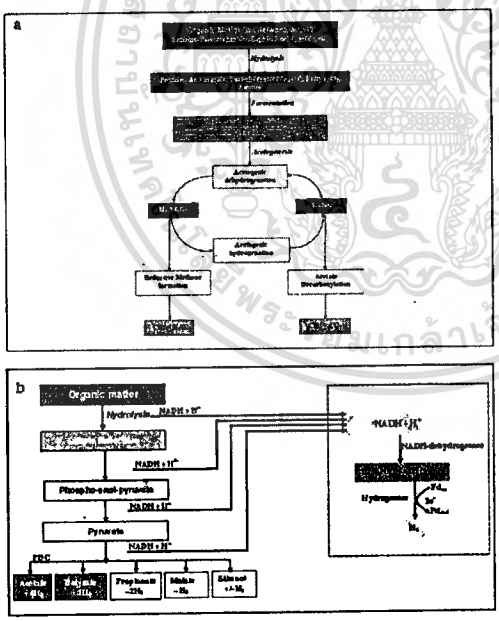
biophotolysis) และ การหมักในสภาพมีแสง (photo-fermentation) ขณะที่การหมักในสภาพไม่ใช้อากาศ (anaerobic fermentation) หรือการหมักในสภาพไร้แสง (dark fermentation) จัดเป็นกระบวนการย่อยสลายที่ไม่เกี่ยวข้องกับแสง (light-independent) (Benemann, 1996) จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ ได้แก่ สาหร่าย จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic bacteria) และไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ให้ผลผลิตไฮโดรเจนในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Mohan, 2008) ส่วนจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (fermentative microorganism) สามารถผลิตไฮโดรเจนในระหว่างการย่อยสลายในสภาพไม่ใช้อากาศในสภาวะสร้างกรด (acidogenic state) กระบวนการหมักให้ผลการผลิตไฮโดรเจนดีกว่ากระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากไม่ต้องพึ่งพาแสง และยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ได้แก่ สารประกอบอินทรีย์ ของเสีย น้ำเสีย หรือวัสดุประเภทเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ อีกทั้งกระบวนการหมักใช้พลังงานน้อยกว่า เป็นเทคนิคที่ปฏิบัติได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และมีความเสถียร (Schara และคณะ, 2008; Mohan, 2009) แต่อย่างไรก็ตามการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์พบว่าผลผลิตมีความจำเพาะมากกว่า เพราะได้ก๊าซไฮโดรเจนเพียงชนิดเดียว ขณะที่การหมักในสภาพไร้แสงอาจได้ก๊าซมากกว่า 1 ชนิด ทำให้ได้รับพลังงานน้อยลง หรือจำเป็นต้องนำไปผ่านขั้นตอนเพื่อให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการหมักในสภาพไม่ใช้อากาศไม่มีแสง พบว่ามีอัตราการเจริญเร็วกว่า ให้ปริมาณไฮโดรเจนค่อนข้างคงที่ ใช้กระบวนการย่อยสลายที่ก่อให้เกิดสารมลพิษค่อนข้างต่ำ และใช้พลังงานในกระบวนช้า ซึ่งจัดเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพ และสามารถทดแทนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการเคมี-ฟิสิกส์ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพทั้งหมดสามารถดำเนินการในสภาวะอุณหภูมิ และความดันปกติ จึงใช้พลังงานต่ำ แนวทางพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางแสงชีวภาพ (photo-biological route) เริ่มมีการวิจัยมากขึ้น โดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์จำเพาะ และอาหารที่ทราบองค์ประกอบแน่นอน (defined medium) แต่อย่างไรก็ตามการหมักในสภาพไร้แสงมีความสำคัญ เนื่องจากสามารถใช้ของเสียเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อต่างๆ ในระบบ

2.1 กระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน (Fermentative Process of H_2 Production)

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักในสภาพไร้แสง (กระบวนการสร้างกรด หรือกระบวนการสร้างกรดอะซิติก) มีความคล้ายคลึงกับกระบวนการย่อยสลายในสภาพไม่ใช้อากาศเพื่อผลิตมีเทน (methanogenic-anaerobic digestion) (Mohan, 2009; Angenent และคณะ, 2004; Mohan และคณะ, 2009) การย่อยสลายในสภาพไม่ใช้อากาศอาศัย 4 ขั้นตอนหลัก และเกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ 5 กลุ่ม ที่แตกต่างทางสรีระวิทยา ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเชิงซ้อนเปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลเดียวเพื่อผลิตไฮโดรเจน และสารตัวกลางที่เป็นกรด แล้วจึงเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และมีเทน ในขั้นตอนสุดท้าย (ภาพที่ 2.1) จุลินทรีย์สามารถหมักหรือย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์พอลิเมอร์ไปเป็นสารโมเลกุลเดียว แล้วจึงเปลี่ยนสารโมเลกุลเดียวไปเป็นกรดอินทรีย์โมเลกุลต่ำชนิดต่างๆ และแอลกอฮอล์ จากนั้นจึงเกิดการออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์ (Obligatory H_2 producing acetogenic bacteria (AB)) ได้สารกรดอินทรีนย์ และไฮโดรเจน จากนั้นจึงเปลี่ยนแปลงไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นอะซิเตทโดยจุลิทรีย์กลุ่ม acetogens และ homoacetogens แล้วอะซิเตทเปลี่ยนเป็นมีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม methanogens (Mohan, 2010; Angenent และคณะ, 2004; Dinopoulou และคณะ, 1988) จุลินทรีย์กลุ่มสร้างอะซิติกที่ผลิตไฮโดรเจนได้นั้นสามารถเจริญแยกตัวออกจากการที่เคยอยู่ร่วมร่วมกับจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทนที่สามารถใช้ไฮโดรเจน (hydrogenotrophic methanogen) ส่งผลให้ระดับไฮโดรเจนลดลง ทำให้กระบวนการสร้างอะซิติกส่งผลดีต่อการเปลี่ยนแปลงทางเทอร์โมไดนามิกส์ของการส่งผ่านไฮโดรเจนระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ (interspecies H_2 transfer)



(Angenent และคณะ, 2004).

ภาพที่ 2.1 (a) แสดงการเจริญในสภาพไม่ใช้อากาศเพื่อผลิตกรดอินทรียน์ และสร้างมีเทนในระหว่างการย่อยสลายสารอินทรีย์ (b) วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนโปรตอนเป็นไฮโดรเจนในระหว่างการย่อยสลายสับสเตรท

ที่มา : Mohan, 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กระบวนการทางชีวเคมี (Biochemical process)

กระบวนการหมักได้รับพลังงานจากการออกซิเดชั่นสารประกอบอินทรีย์ โดยใช้ตัวรับอิเล็คตรอนภายในเซลล์ ได้แก่ สารประกอบของกรดอินทรีย์ (Klein และคณะ, 2005) ตรงข้ามกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่อิเล็คตรอนส่งไปยังตัวรับที่มาจากภายนอกเซลล์ ได้แก่ ออกซิเจน โดยอาศัยการส่งผ่านอิเล็คตรอน (Electron transport chain (ETC)) กรณีที่ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก ปฏิกิริยาเริ่มจากการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวทด้วยวิถีย่อยกลูโคส (glycolysis) โดยจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ กลุ่ม obligate และ facultative anaerobic bacteria พวกจุลินทรีย์กลุ่ม facultative anaerobes สามารถเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็น acetyl-CoA และฟอร์เมท โดยเอนไซม์ pyruvate formatelyase (PFL) (Schara และคณะ, 2008) จากนั้นฟอร์เมทเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนด้วยเอนไซม์ formatehydrogen lyase (FHL) complex ส่วนจุลินทรีย์กลุ่ม obligate anaerobes จะเปลี่ยนไพรูเวทเป็น acetyl-CoA และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) ซึ่งเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นร่วมกับ ferredoxin (Fd) (Schara และคณะ, 2008; Kraemer และ Bagley, 2007) บทบาทของไพรูเวทในกระบวนการไม่ใช้อากาศขึ้นกับระดับพีเอช ภายใต้สภาวะเป็นกรดพบว่าไพรูเวทเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ (volatile fatty acids) และไฮโดรเจน โดยจุลินทรีย์สร้างกรด (acidogenic bacteria) แต่ถ้าสภาวะเป็นกลางพบว่าไพรูเวทเปลี่ยนเป็นมีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์สร้างมีเทน (methanogenic bacteria) ส่วนสภาวะเป็นด่างพบการย่อยสลายแบบไม่ใช้อากาศ เกิดการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (solventogenesis) ระดับพีเอชต่างๆ ทำให้การส่งโปรตอนระหว่างสารตัวกลางในเมแทบอลิซึมโดยทำงานร่วมกับตัวส่งรีดอกซ์ (redox mediators) ต่างชนิดกันไปในสภาพไม่ใช้อากาศ โปรตอนหลุดออกมาจากตัวส่งรีดอกซ์ (redox mediatoris) ด้วยเอนไซม์ dehydrogenase จำเพาะ เช่น NADH-dehydrogenase และร่วมตัวกับอิเล็คตรอนที่มาจากการออกซิไดส์ ferredoxin ไปเป็นไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase (ภาพที่ 2.1b) กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase มีค่ามากในสภาวะเป็นกรด แต่ถ้าพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นทำให้วิถีเมแทบอลิกเปลี่ยนไปเป็นการย่อยสลายในสภาพไม่ใช้อากาศ ซึ่งโปรตอนถูกรีดิวซ์ไปเป็นมีเทน (การสร้างมีเทน) หรือเอธานอล ethanol (solventogenesis) (Mohan, 2010)

การย่อยสลายสับสเตรททางชีวภาพมักเกิดขึ้นไปพร้อมๆ กับการปล่อยโปรตอนและอิเล็คตรอน เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยเอนไซม์ต่างๆ Dehydrogenase เป็นหนึ่งในเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระหว่างสารเมแทโบไลท์ และการส่งโปรตอนระหว่างสารตัวกลางในเมแทโบลิซึมผ่านทางปฏิกิริยารีดอกซ์โดยอาศัยตัวส่ง (mediators ได้แก่ NAD^+,FAD^+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นต้น) ตัวส่งรีดอกซ์ (Redox mediators) สามารถนำพาโปรตอนหรืออิเล็คตรอน (เรียกว่าตัวส่งพลังงาน (energy carriers) คล้ายกับ ATP ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในสิ่งมีชีวิต) (Mohan และคณะ, 2009) โดยทั่วไปแล้วสภาพแวดล้อมไร้อากาศระดับจุลภาค พบการเปลี่ยนแปลงสารอาหารในระหว่างกระบวนการย่อยสลายทำให้เกิดโปรตอนภายในเซลล์ ซึ่งโปรตอนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับตัวส่งรีดอกซ์ ที่เป็นแหล่งสำคัญสำหรับการผลิตไฮโดรเจนในระหว่างการหมัก โดยโปรตอนหลุดออกจากตัวส่งรีดอกซ์ด้วยเอนไซม์ NADH-dehydrogenase แล้วจึงรีดิวซ์ไปเป็นไฮโดรเจนด้วยเอนไซม์ hydrogenase พร้อมกับออกซิไดซ์ ferredoxin (co-factor) ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็คตรอน (Schara และคณะ, 2008) เอนไซม์ hydrogenases เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ (complex metalloenzymes) แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยจำนวนและชนิดโลหะ ได้แก่ [NiFe]-hydrogenases [FeFe]- hydrogenases และ [Fe]-hydrogenases (13) เอนไซม์นี้ยังเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาย้อนกลับของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็น 2โปรตอนและ 2 อิเล็คตรอน ($H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$) (Schara และคณะ, 2008) การทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase และ hydrogenase มีความสำคัญมากต่อการรักษาระดับโปรตอนในเซลล์ให้สมดุลย์ โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และการเปลี่ยนแปลงสารตัวกลางในเมแทบอลิซึม nitrogenase เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจน สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาย้อนกับของการรีดักชันโมเลกุลไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียพร้อมกับใช้พลังงาน (สารพลังงานสูงในรูปของตัวส่งอิเล็คตรอน (e mediated) ได้แก่ ferredoxin, NAD^+ เป็นต้น) เช่น ATP nitrogenase กระตุ้นปฏิกิริยารีดักชันโปรตอนในสภาวะปราศจากก๊าซไนโตรเจน แม้ในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจนก็พบการสร้างไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ nitrogenase ซึ่งเป็นปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) ที่ระดับอัตราเร็ว 1/3 ถึง 1/4 ของการตรึงไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ก็จัดเป็นตัวเลือกที่มีศักยภาพสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากเอนไซม์ nitrogenase แต่เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานสูงมาก (ใช้หลาย ATP)

2.2.1 กรดอินทรีย์ในเมแทบอลิซึม (Metabolic acid intermediates)

กรดอินทรีย์ในเมแทบอลิซึม หรือกรดไขมันที่ระเหยได้ ถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการสร้างกรด (acidogenic process) โดยวิถีเมแทบอลิซึม (Orskav และคณะ, 1968) สมการต่อไปนี้แสดงเมแบโลไลท์กรดอินทรีย์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเพื่อสร้างกรด

$C_6H_{12}O6 + 2H_20 \rightarrow 2CH_3 \cdot COOH + 2CO_2 + 4H_2$ [Acetic acid]

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH + 2CO_2 + 2H_2$ [Butyric acid]

$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3 \cdot CH_2 \cdot COOH + 2H_2O$ [Propoinic acid]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow COOH{\cdot}CH_2{\cdot}CH_2O{\cdot}COOH + CO_2$ [Malic acid]

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3{\cdot}CH_2OH + CO_2$ [Ethanol]

ผลได้ไฮโดรเจนแตกต่างกันไปตามวิถีที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ และการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นผลิตผลิตภัณฑ์สุดท้าย ได้แก่ อะซิเตท บิวทิเรท บิวทานอล อะซิโตน แลคแตท หรือเอธานอล สามารถนำมาใช้คำนวณผลได้ของไฮโดรเจน (Schara และคณะ, 2008) จุลินทรีย์กลุ่ม obligate anaerobes ใช้เอนไซม์ hydrogenase เปลี่ยนไพรูเวทเป็นไฮโดรเจน โดยรีดิจซ์ Fd ให้ผลได้สูงสุด 2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส และได้เพิ่มอีก 2 โมลไฮโดรเจน จาก NADH ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายกลูโคส (glycolysis) โดย NADH ถูกออกซิไดซ์โดยปฏิกิริยารีดักชัน Fd ด้วยเอนไซม์ NADH : ferredoxin oxidoreductase (NFOR) (Schara และคณะ, 2008) นอกจากนี้ไฮโดรเจนยังผลิตได้จากการรีดิวซ์ Fd โดยเอนไซม์ hydrogenase โดยทฤษฎีแล้วผลได้สูงสุด 4 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส จากการหมักได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะซิเตท หรืออะซิโตน ฟอร์เมต 2 โมเลกุล ได้จากไพรูเวท 2 โมเลกุล ดังนั้นผลได้ (ทางทฤษฎี) 2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ถ้าผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นบิวทิเรท พบว่าผลได้สูงสุดทางทฤษฎีคือ 2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ยกเว้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอธานอล ซึ่งให้ผลได้ต่ำที่สุดเนื่องจากอะตอมไฮโดรเจนในโมเลกุลแอลกอฮอล์ไม่เปลี่ยนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน (Schara และคณะ, 2008) ในสภาวะที่มีกรดโพรพิโอนิคความเข้มข้นสูง หรือการสร้างตัวทำละลาย (solventogenesis) ไม่เหมาะสมต่อการสร้างไฮโดรเจน

2.2.2 ของเสียและน้ำเสียที่ใช้เป็นสับสเตรทสำหรับผลิตไฮโดรเจน

การลดค่าใช้จ่ายสำหรับการบำบัดของเสีย หรือน้ำเสีย (ในรูปของสารประกอบอินทรีย์) โดยนำมาใช้เพื่อการผลิตพลังงานทางชีวภาพ (bio-energy) (ได้แก่ ก๊าซไฮโดรเจน) จัดเป็นหนึ่งในแนวทางแก้ปัญหาที่ยังยืน ของเหลือทิ้งที่มีมวลชีวเป็นองค์ประกอบนั้นจัดว่ามีปริมาณพลังงานเพียงพอสำหรับความต้องการพลังงานของทั้งโลก ถ้าสามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบพลังงานที่ใช้งานได้สะดวกและเหมาะสม (Rittmann, 2008) ของเหลือทิ้งจากบ้านเรือน และชุมชน (domestic waste) อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ล้วนแต่มีของเสียซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์จำนวนมหาศาล สำหรับประเทศไทยซึ่งมีเศรษฐกิจหลักขึ้นกับผลผลิตทางการเกษตร ดังนั้นจึงมีของเหลือทิ้งปริมาณมาก เมื่อรวมของเสียจากชุมชนแล้วพบว่าในปี 2549 มีปริมาณขยะมูลฝอยชุมชนเกิดขึ้นทั่วประเทศประมาณ 14.63 ล้านตัน หรือวันละ 40.082 ตัน (ยังไม่รวมข้อมูลปริมาณขยะมูลฝอยก่อนนำมาทิ้งในถัง) เพิ่มจากปี 2548 ประมาณ 0.33 ล้านตัน (ธนากร, 2554) ในจำนวนนี้เป็นสารอินทรีย์ประมาณ 46 เปอร์เซ็นต์ นับเป็นปัญหาใหญ่ทั้งในด้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดการและการกำจัด ดังนั้นการนำมาใช้เป็นแหล่งสำหรับผลิตพลังงานทางชีวภาพ สามารถแก้ปัญหาด้านพลังงาน และการกำจัดของเสียได้อย่างดี จุดประสงค์สำคัญของการผลิตพลังงานจากของเสีย ได้แก่ ลดการปลดปล่อยคาร์บอน นำกลับมาใช้ใหม่ การเก็บเกี่ยวพลังงาน และบำบัดน้ำเสียไปพร้อมกัน โดยประเมินศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนโดยการหมักของเสียที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลต่ำหรือเชิงซ้อน ตารางที่ 2.1 แสดงผลการศึกษาการหมักในสภาพไร้แสง น้ำตาลโมเลกุลต่ำ (simple sugar) ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแลกโตส สามารถย่อยสลายและผลิตไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว แต่มีราคาสูง ส่วนของเสียที่ได้จากโรงงาน และแหล่งชุมชน-บ้านเรือน มีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีปริมาณมาก และประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้ ของเหลือทิ้งจากผลผลิตทางการเกษตร อุตสาหกรรมไม้ โรงงานอาหาร พืชน้ำ สาหร่าย และน้ำทิ้งจากบ้านเรือนสามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการหมักนี้ได้อย่างดี (Saratale และคณะ, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ของเสียและของเหลือทิ้งต่างๆ ที่สามารถใช้เป็นสับสเตรทสำหรับผลิตไฮโดรเจน

Nature of waste	Type of waste
Industrial Wastewater	Designed synthetic wastewater
	Chemical wastewater
	Paper mill waste
	Dairy processing wastewater
	Cheese processing wastewater
	Brewery wastewater
	Wine process wastewater
	Molasses based wastewater
	Palm oil mill effluent (POME)
	Citric acid wastewater
	Probiotic wastewater
	Slaughterhouse waste
	Starch based wastewater/starch effluent
	Olive mill wastewater
	Food processing wastewater
Urban waste	Municipal solid waste
	Domestic sewage/wastewater
	Activated sludge /sewage bio-solids
	Citrus peeling waste
Solid waste	Household solid waste
	Vegetable based market waste
	Corn stalk
	Wheat starch/Wheat straw
	Fodder maize
	Chitinous waste
Agricultural waste	Cattle wastewater
	Mixed fruit peel waste
	Potato waste/Potato starch residue
	Cellulose
	Hemicellulose-rich pine tree wood shavings

ที่มา : Mohan (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบเซลลูโลส (ต่างจากน้ำเสีย) หรือของเสียในรูปของแข็ง (solid wastes) จำเป็นต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเหลวก่อน (pretreatment) จากนั้นสารละลายอินทรีย์นี้จึงนำไปผลิตไฮโดรเจนโดยจุลินทรีย์ต่อไป เซลลูโลสมีคุณสมบัติยึดเกาะเป็นก้อนแข็ง ผลึกคงตัว และไม่ละลายน้ำ จึงคงทนต่อการย่อยสลายเป็นกลูโคสโมเลกุลเดี่ยว (Saratale และคณะ, 2008) การเปลี่ยนโครงสร้างเซลลูโลสอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างกระบวนการเคมี กายภาพ และเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิสูง ความดันสูง พีเอชต่ำหรือสูง เอนไซม์ย่อยสลาย คลื่นเสียงความถี่ต่ำ-สูง รังสี และสนามไฟฟ้า (Rittmann, 2008) จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายเซลลูโลสอย่างมีประสิทธิภาพโดยอาศัยเอนไซม์ cellulase ไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียว เพื่อใช้ผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมักในสภาพไร้แสงต่อไป (Saratale และคณะ, 2008)

2.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก

2.3.1 ตัวกระตุ้นทางชีวภาพ

การคัดเลือกและการเตรียมสับสเตรทมีความสำคัญอย่างมากต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่จะคัดเลือกมาใช้ผลิตไฮโดรเจนอย่างมีประสิทธิภาพ (Mohan, 2009; Kraemer และ Bagley, 2007; Mohan และคณะ, 2009; Zhu และ Beland, 2006) คุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อระยะเริ่มต้น และประสิทธิภาพทั้งหมดของการผลิตไฮโดรเจน เชื้อผสมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศพบว่าไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากไฮโดรเจนส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ต่างๆ หรือจุลินทรีย์สร้างมีเทน (MB) (Sparling และคณะ, 1997) วิธีที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทีย์ไม่ใช้อากาศ จำเป็นต้องกำจัดจุลินทรีย์สร้างมีเทน ทำให้การหมักได้ผลิตภัณฑ์ของเมแทบอลิซึมสุดท้ายเป็นไฮโดรเจน ความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพระหว่างจุลินทรีย์ผลิตไฮโดรเจน (AB) และจุลินทรีย์ใช้ไฮโดรเจน (MB) อยู่บนพื้นฐานการรักษาสภาวะความเป็นกรดเพื่อให้การเลี้ยงเชื้อเข้าสู่กระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Zhu และ Beland, 2006) โดยการเตรียมเชื้อ (จุลินทรีย์สร้างกรดสามารถสร้างสปอร์ ขณะที่จุลินทรีย์สร้างมีเทนไม่สร้างสปอร์) และระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ (จุลินทรีย์สร้างกรดเจริญเร็วกว่าจุลินทรีย์สร้างมีเทน) (ดังแสดงในตารางที่ 2.2) ดังนั้นเมื่อประยุกต์ใช้วิธีเตรียมการต่างๆ ส่งผลดีต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Mohan และคณะ, 2009) แต่ในสภาวะที่เป็นกรด ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสับสเตรทลดลง แต่ก็สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สร้างมีเทนได้ (Mohan และคณะ, 2009) เนื่องจากกระบวนการสร้างมีเทนต้องอาศัยสารตัวกลางที่สร้างจากกระบวนการสร้างกรด การประยุกต์ใช้วิธีเตรียมการเฉพาะอย่าง หรือใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย และการผลิตไฮโดรเจน (แสดงใน

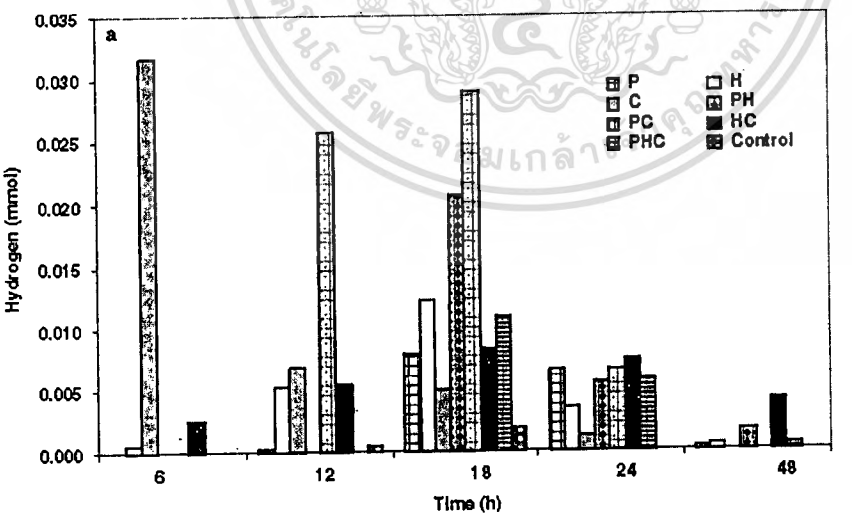
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.2)

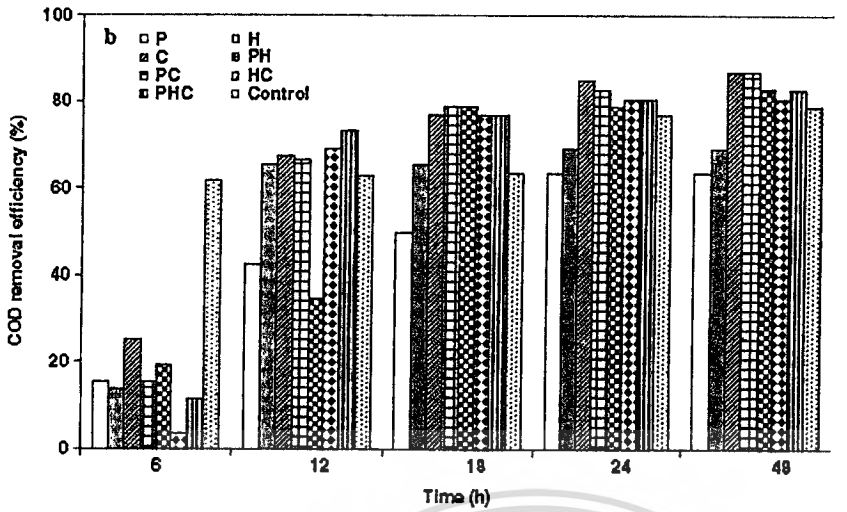
ตารางที่ 2.2 วิธีเตรียมสับสเตรทสำหรับผลิตไฮโดรเจน

Pretreatment method	Conditions	Function
Heat-shock	Enrichment under extreme temperature (>80oC)	Suppress non-spore forming bacteria
Acid	Enrichment in extreme acidic microenvironment (pH < 4)	Enrich spore-forming bacteria by specifically repressing the MB
Chemical	Enrichment in presence of specific chemicals such as	
	· 2-bromoethanesulfonic acid (BESA)	Selective inhibition of MB by suppressing the activity of co-enzyme, M reductase complex (chief component for methanogenesis)
	· Iodopropane	Prevents functioning of B12 co-enzyme (methyl group carrier)
	· Acetylene	Non-specific inhibition of MB
Alkaline	Enrichment in alkaline microenvironment (pH > 9) Non-specifically inhibits MB	
Load-shock	Direct enrichment in presence of higher substrate concentration	Leads to accumulation of high organic acids which prevents MB growth
Forced aeration (oxygen-shock)	Enrichment in presence of oxygen/air	Suppress the activity of MB

ที่มา : Mohan (2010)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากสับสเตรทที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ (a) การผลิตไฮโดรเจน และ (b) ประสิทธิภาพการใช้สับสเตรท (COD) (H, heat-shock; P, acid; C, chemical (BESA)

ที่มา : Mohan, 2010

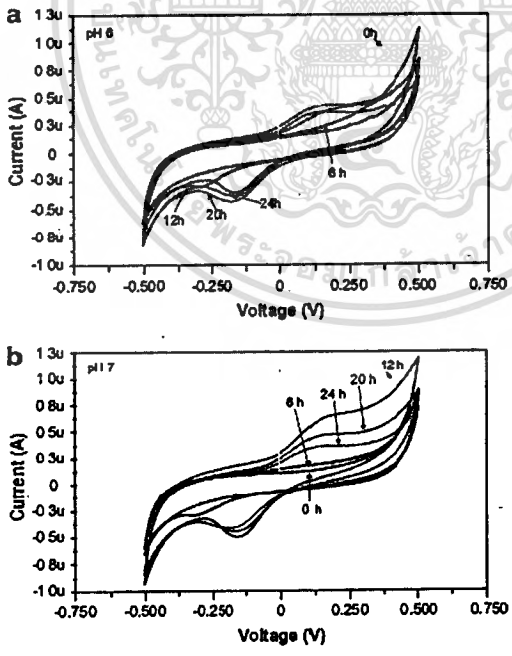
2.3.2 พีเอช

ชนิดและการเจริญของจุลินทรีย์ส่งผลต่อระดับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องต่อปัจจัยทางกายภาพหลักๆ รวมถึงค่าพีเอชภายในเซลล์ ระดับอิออน ศักย์ไฟฟ้าบนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential) และแรงเคลื่อนโปรตอน (proton-motive force) (Futai และ Tsuchiya, 1987) ระดับพีเอชมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของวิถีการย่อยสลายสับสเตรท การสังเคราะห์โปรตีน การสะสมสารภายในเซลล์ และการหลั่งสารออกนอกเซลล์ ซึ่งล้วนส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการหมัก เพราะกิจกรรมของจุลินทรีย์สร้างกรดจัดเป็นสิ่งสำคัญต่อการสร้างไฮโดรเจน (Mohan, 2010) กลุ่มจุลินทรีย์ที่จำเพาะต่อระดับพีเอชต่างๆ ส่งผลต่อการรักษาสภาวะเป็นกรดในแต่ละบริเวณของถังหมัก โดยพบว่าความเป็นกรดในช่วง 5.5–6.0 ให้ประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เนื่องจากยังยั้งจุลินทรีย์สร้างมีเทน (Zhu และ Beland, 2006) การรักษากระบวนการเลี้ยงเชื้อที่พีเอช ระดับต่ำ หรือสูง สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ได้ (Mohan, 2010) จุลินทรีย์สร้างมีเทนเจริญได้ในพีเอชช่วงแคบ (6.8–7.2) ขณะที่จุลินทรีย์สร้างกรด (สามารถผลิตไฮโดรเจน) เจริญที่พีเอชช่วงกว้างกว่า โดยเจริญดีที่พีเอชต่ำกว่า 6 (van Ginkel และ Logan, 2005) พีเอชในช่วง 5.5 – 6.0 จึงนำมาใช้เพื่อผลิตไฮโดรเจน และยับยั้งการสร้างมีเทนและการสร้างตัวทำละลาย (Liu และคณะ, 1985) แต่อย่างไรก็ตามการรักษาระดับพีเอชประมาณ 6 ให้ประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการรักษาระดับเป็นกลาง (van Ginkel และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ, 2001) การใช้พีเอชเริ่มต้น หรือเพิ่มพีเอชจากกรดไปเป็นกลางส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Mohan, 2010) พีเอชที่มีค่าต่ำกว่า 4.5 ให้ผลเสียต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากยับยั้งจุลินทรีย์สร้างไฮโดรเจน (Sparling และคณะ, 1997; Roychowdhury และคณะ, 1988)

การวัดค่าวงรอบศักย์ไฟฟ้าเคมี (Cyclic voltammograms, CV) ในสภาวะพีเอชเป็นกรดและเป็นกลาง แสดงการทำงานของคู่รีดอกซ์ (redox pairs) ที่เปลี่ยนแปลงไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งสัญญาณนี้สอดคล้องกับตัวส่งอิเล็คตรอนภายในเซลล์ (intracellular electron carriers) ได้แก่ $NADH/NAD^+$ (E0, –0.32 V) (24) (ภาพที่ 2.3) การขนส่งโปรตอนระหว่างสารตัวกลางในเมแทบอลิซึมสัมพันธ์กับการปล่อยประจุอิเล็คตรอนที่พบใน CV ในสภาวะเป็นกรด พบการปล่อยประจุอิเล็คตรอนในช่วง 12 20 และ 24 ชั่วโมง มีลักษณะคล้ายกัน แสดงให้เห็นประสิทธิภาพการส่งโปรตอนในเมแทบอลิซึม ดังนั้นการให้ระบบอยู่สภาวะพีเอชเป็นกรดนานขึ้นทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ในสภาวะเป็นกลางพบช่วงเวลาการปล่อยประจุอิเล็คตรอนต่างกันไป และให้ค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงลดลง เพราะความเป็นกลางและพฤติกรรมของโปรตอนลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์สร้างมีเทน (Mohan, 2010)



ภาพที่ 2.3 วงรอบศักย์ไฟฟ้าเคมี (Cyclicvoltammograms, CV) ของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไฮโดรเจนจากการหมักโดยใช้เชื้อผสม โดยรักษาสภาวะเป็นกรด (a) และสภาวะเป็นกลาง (b)
ที่มา : Mohan, 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชเป็นกรด (ต่ำกว่า 6) แสดงให้เห็นประสิทธิภาพการย่อยสลายสับสเตรทลดลง (ต่ำกว่าที่พีเอชเป็นกลาง) ทำให้กิจกรรมการสร้างมีเทนลดลง (Mohan, 2010) ดังนั้นการรักษาสภาวะเป็นกรดร่วมกับการเตรียมสับสเตรทส่งผลดีต่อการผลิตไฮโดรเจน เมื่อใช้น้ำเสียชนิดต่างๆ

กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ (VFA) ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักในสภาพเป็นกรด และระดับพีเอช นำมาใช้ร่วมกันเพื่อควบคุมสภาวะกรด-ด่าง ในสภาพไม่ใช้อากาศ สำหรับแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์สร้างกรด และสร้างมีเทน (AB และ MB) การสร้างกรดส่งผลให้ความเป็นบัฟเฟอร์ลดลงอย่างช้าๆ ส่งผลให้ค่าพีเอชของระบบลดลง เนื่องจากการสะสมกรดอินทรีย์นำไปสู่การยับยั้งกระบวนการ (Fang และคณะ, 2006) ถ้าหากไม่สามารถรักษาระดับพีเอชให้เหมาะสมก็ทำให้การผลิตไฮโดรเจนหยุดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ (van Ginkel และคณะ, 2001) เมื่อผลิตภัณฑ์จากเมแทบอไลท์เพิ่มขึ้นในสภาวะเป็นกรด สามารถใช้เป็นข้อมูลยืนยันผลดีของการผลิตไฮโดรเจน (Mohan, 2010; Ciudad และคณะ, 2007) อีกทั้งสามารถใช้ค่าพีเอชเป็นตัวแปรในการควบคุมกระบวนการ

ในสภาพไม่มีอากาศพบว่าถ้ามีซัลเฟตในของเสีย จะเปลี่ยนเป็น hydrogen sulfide โดยจุลินทรีย์กลุ่ม sulfate-reducing bacteria (SRB) ซึ่งเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Bitton, 1994) จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้ไฮโดรเจนเป็นตัวให้อิเล็คตรอนด้วยเอนไซม์ hydrogenase (Mizuno และคณะ, 1998) พีเอชของระบบมีอิทธิพลโดยตรงต่อการลดลงของซัลเฟต และสัมพันธ์กับการผลิตไฮโดรเจน พีเอชเป็นกรดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่ม SRB แต่การผลิตไฮโดรเจนไม่ได้รับผลกระทบ การผลิตไฮโดรเจนยังดำเนินต่อไปแม้พีเอชลดเหลือ 5.5 และมีซัลเฟตความเข้มข้นสูงถึง 3 กรัมต่อลิตร (Lin และChen, 2006)

2.3.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจน ชนิดผลิตภัณฑ์ที่สร้าง การย่อยสลายสับสเตรท และการเจริญของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อได้แก่ อุณหภูมิปกติ (ambient 15–27 C), อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic 30–45 C) และอุณหภูมิสูงปานกลาง (moderate thermophilic 50–60 C) และมีรายงานใช้อุณหภูมิสูงมาก (extreme thermophilic 60 C) (Kotsopoulos และคณะ, 2006; Yokoyama และคณะ, 2009) อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมักในสภาพไม่มีแสงขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอน สำหรับการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์มักใช้อุณหภูมิเหมาะสมช่วง 37–45 C แต่ถ้าเป็นการเลี้ยงเชื้อผสมมักใช้อุณหภูมิต่ำกว่า (Mohan, 2010) กระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนได้อย่างเหมาะสมที่อุณหภูมิปานกลาง และสูง โดยอุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ผลดีเนื่องจากสมดุลย์ทางเทอร์โมไดนามิกส์ ซึ่งอัตราปฏิกิริยามีค่าสูง ประสิทธิภาพดี และลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ใช้ไฮโดรเจน แต่ที่อุณหภูมิสูงอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างรวดเร็วทำให้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ผลิตไฮโดรเจน (Khanal และคณะ, 2005) การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนสารเมแทบอไลท์เป็นผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ทำให้วิถีเมแทบอลิซึมเปลี่ยนซึ่งกระทบต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เจริญ ณ. อุณหภูมินั้นๆ (Wang และ Wan, 2008) ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิจึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมกระบวนการ

2.3.4 ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

ไนโตรเจนจัดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบในโปรตีน กรดนิวคลีอิค และเอนไซม์ และเป็นสารชนิดที่สอง (รองจากคาร์บอน) ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Lin และ Lay, 2004; Wang และคณะ, 2009) ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมให้ผลดีต่อการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก แต่ไนโตรเจนความเข้มข้นสูงยับยั้งประสิทธิภาพของระบบ โดยกระทบต่อพีเอชภายในเซลล์ หรือยับยั้งเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน (Bisaillon และคณะ, 2006) ไนโตรเจนความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน ประสิทธิภาพการย่อยสลายสับสเตรทดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจนจาก 0 เป็น 0.01 กรัมต่อลิตร (Wang และคณะ, 2009) สัดส่วน C/N ratio มีความสำคัญอย่างมาก โดยพบระดับเหมาะสมที่ 47 ฟอสเฟตช่วยรักษาความเป็นบัฟเฟอร์ในระหว่างการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก (Wang และ Wan, 2008) เมื่อใช้ฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์แทนคาร์บอเนต ทำให้ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเพิ่มปริมาณฟอสเฟตในระดับเหมาะสม ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น Na_2HPO_4 ให้ผลดีต่อการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากความเข้มข้นถึง 0.6 กรัมต่อลิตร ก็ยังไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจน และทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 1.9 เท่า เพราะลดเวลาในช่วงเริ่มต้นการหมัก (lag-phase) (Lin และ Lay, 2004a)

2.3.5 ประยุกต์ใช้หลายกระบวนการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

การใช้น้ำทิ้งเป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน ต้องคำนึงถึงการเพิ่มขีดความสามารถย่อยสลายสารอาหาร ควบคู่ไปกับประสิทธิภาพการผลิต ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตต้องแลกมาด้วยความสามารถย่อยสลายที่ลดลง (Mohan และคณะ, 2009) การบำบัดของเสียจำเป็นต้องใช้สภาวะพีเอชเป็นกลาง ขณะที่สภาวะเป็นกรดส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (Mohan, 2010) สภาพเลี้ยงเชื้ออย่างสมดุลย์เพื่อให้ประสบความสำเร็จอยู่ที่จุดร่วมระหว่างประสิทธิภาพและกระบวนการที่เหมาะสม ซึ่งสำคัญต่อความยั่งยืนของกระบวนการในเชิงความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ การประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ 1) การคำนวณทางคณิตศาสตร์ (data envelоping analysis, DEA) และ 2) การออกแบบในเชิงปฏิบัติ (design of experimental, DOE) (Mohan และคณะ, 2009) การประเมินบทบาทของตัวแปรสำคัญ ได้แก่ ชนิดและการเตรียมเชื้อ ขั้นตอนการเตรียมสับสเตรท พีเอชสารอาหาร สับสเตรทร่วม องค์ประกอบที่เพิ่มขึ้น ฯลฯ ต้องนำมาใช้ร่วมกับการคำนวณประสิทธิภาพด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ ได้แก่ การวิเคราะห์กระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ใช้เชื้อเริ่มต้นไม่ผ่านขั้นตอนเตรียมการ ในสับสเตรทน้ำทิ้งธรรมดาที่ไม่ผ่านขั้นตอน และเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรด เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพ ส่วนวิธีประเมินเชิงปฏิบัตินำมาแสดงรายละเอียดเกี่ยวกับบทบาทของปัจจัยที่ทดสอบการผลิตไฮโดรเจน และการย่อยสลายสับสเตรท โดยมุ่งไปยังสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการ วิธีการนี้ใช้บ่งบอกอิทธิพลของปัจจัยแต่ละชนิดที่เลือกมาทดสอบในระบบ และหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรและสภาวะดำเนินการ ทั้ง 2 แนวทางแสดงให้เห็นสภาวะที่เหมาะสมของประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนและการย่อยสลายสับสเตรท ซึ่งสามารถพัฒนาให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

2.3.6 ข้อจำกัดในการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก

การนำของเสียมาผลิตไฮโดรเจนนับเป็นแนวคิดที่ดี อาศัยจุดเด่นดังที่กล่าวมาข้างต้น แต่ความท้าทายสำคัญที่ต้องแก้ปัญหาของการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก ได้แก่ ประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์มีค่าต่ำ และสับสเตรทยังคงเหลืออยู่ในรูปของกรดอินทรีย์ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสร้างกรด จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศให้ผลได้ทางทฤษฎี 4 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส (Schara และคณะ, 2008) ซึ่งในทางปฏิบัติมีค่าต่ำกว่านี้ เช่น การออกซิเดชัน NADH โดย NFOR ถูกยับยั้งในสภาวะพื้นฐาน และเกิดปฏิกิริยาได้ก็ต่อเมื่อไฮโดรเจนมีปริมาณน้อย (Angenent และคณะ, 2004) อีกทั้งตัวเลขทางทฤษฎีคำนวณจากเมแทบอลิซึมที่รู้จักเท่านั้น (USDEH, 2007) นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดทางชีวภาพอื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจนเป็นตัวยับยั้งการผลิต (end-product inhibition) การสะสมกรดและตัวทำละลายทำให้มีผลได้เพียง 2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ในทางปฏิบัติแล้วผลได้ไฮโดรเจนมีค่าเพียง 1–2 โมลต่อโมลกลูโคส และพบปริมาณคาร์บอนยังคงอยู่ในน้ำทิ้ง 80-90 เปอร์เซ็นต์ (Mohan, 2009; USDEH, 2007; Srikanth และคณะ, 2008; Logan, 2004) และถึงแม้ในสภาวะเหมาะสมก็ยังคงมีคาร์บอนในน้ำทิ้ง 60-70 เปอร์เซ็นต์ (Schara และคณะ, 2008)

การสร้างและสะสมกรดอินทรีย์ ทำให้พีเอชในระบบลดลงอย่างรวดเร็ว จึงยับยั้งการสร้างไฮโดรเจน ผลได้ไฮโดรเจนมีค่าต่ำลงเมื่อการรีดิวซ์สารประกอบอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ได้แก่ กรดแลกติก กรดโปรพิโอนิก และแอลกอฮอร์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมัก ที่ไม่ผ่านไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจน (Angenent และคณะ, 2004) กรดอินทรีย์ที่ยืดอยู่รอบเซลล์สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้รบกวนสมดุลย์ทางสรีระวิทยา (Mohan, 2009) จึงต้องเพิ่มส่วนของพลังงานที่สงวนไว้เพื่อรักษา (maintainance energy) ความสมดุลย์ทางสรีระภายในเซลล์ ทำให้พลังงานที่ใช้สำหรับการเจริญมีค่าลดลง (มีผลยับยั้งการเจริญ) ถ้าหากกรดอินทรีย์รอบๆ เซลล์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีก ทำให้ความเข้มอิออนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์ย่อยสลายตัวเอง (cell lysis) (Wang และ Wan, 2008) แสดงว่ากรดอินทรีย์ที่ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการผลิต และการเจริญของเซลล์ (Wang และ Wan, 2008; Ciudad และคณะ, 2007; Zheng และ Yu, 2005) แม้จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันก็พบความแตกต่างของผลิตภัณฑ์สุดท้าย และผลได้ไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมเป็นสำคัญ (Schara และคณะ, 2008; Kotsopoulos และคณะ, 2006)

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ hydrogenase มีการเปลี่ยนแปลงแบบเทอร์โมไดนามิก ซึ่งส่งผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน เพราะเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการส่งอิเล็คตรอนจากตัวส่งไปยังโมเลกุลโปรตอน (Angenent และคณะ, 2004) ปริมาณไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน (Mohan, 2009) พบว่าปริมาณไฮโดรเจนที่ความดัน 60 Pa ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน (Angenent และคณะ, 2004)

การเลี้ยงเชื้อที่ความดันไฮโดรเจนต่ำ โดยแยกออกจากสารละลายทันที สามารถแก้ปัญหาที่กล่าวมาได้ (Mohan, 2010; Angenent และคณะ, 2004) กำจัดหรือยุดยั้งปฏิกิริยาการใช้ไฮโดรเจนโดยให้คงเหลือเฉพาะการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase เพื่อรีดิวซ์โปรตอน ทำให้การผลิตไฮโดรเจนมีค่าสูงสุด ศึกษาสรีระวิทยา และสภาวะทางเคมีฟิสิกส์ ไม่เพียงทำให้ค่าผลได้ไฮโดรเจนมีค่าเหมาะสมแล้ว ยังทำให้การใช้สับสเตรทมีประสิทธิภาพสูงขึ้นอีกด้วย

2.4 แนวทางการเพิ่มศักยภาพกระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก

2.4.1 ประยุกต์ใช้หลายวิธีการ

นำคาร์บอนที่ยังคงเหลืออยู่ในน้ำหมัก (หลังจากผลิตไฮโดรเจนในสภาพเป็นกรด) มาใช้ต่อโดยจุลินทรีย์สร้างมีเทน (ได้ผลิตภัณฑ์ทั้งไฮโดรเจนและมีเทน) หรือจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงในสภาพไม่ใช้อากาศมีแสง (photo-fermentative) (ได้ไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น) จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสามารถใช้กรดอินทรีย์ ซึ่งมีมากในน้ำหมักหลังจากผ่านระยะผลิตไฮโดรเจนในสภาพเป็นกรด (Mohan, 2008; Mohan, 2009; Srikanth และคณะ, 2008) โดยมีแนวทางเพิ่มผลได้ไฮโดรเจนเริ่มจากกลูโคสเปลี่ยนเป็นอะซิติก (ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการหมักในที่มืด) แล้วถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจน (Nath และคณะ, 2005) ซึ่งให้ไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น (Dinopoulou และคณะ, 1988) การผลิตไฮโดรเจนด้วย 2 กระบวนการหมัก ทำให้ผลได้มีค่าใกล้ 12 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ตามการคำนวณทางทฤษฎี (Nath และคณะ, 2005) แต่ต้องคำนึงถึงปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตไฮโดรเจนในสภาพเป็นกรด และชนิดองค์ประกอบสารอาหารในน้ำเสียที่ใช้เป็นสับสเตรท โดยเฉพาะปริมาณแอมโมเนียที่เหลือจากการผลิตไฮโดรเจนในสภาพเป็นกรด ซึ่งอาจส่งผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนโดยจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง แต่ก็สามารถแก้ไขได้โดยวิธีเจือจาง หรือทำให้เป็นกลาง (Mohan, 2010) การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการ dark fermentation ร่วมกับ photo-fermentation ให้ผลได้สูงกว่า การร่วมกับ methanogenic anaerobic digestion เนื่องจากความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ มีผลต่อจุลินทรีย์ผลิตมีเทนเช่นกัน วิธีการเลี้ยงเชื้อหลายแบบ (Multi-stage process) นิยมนำมาใช้เพิ่มการผลิตไฮโดรเจน เริ่มจากเลี้ยงเชื้อแบบ dark fermentation แล้วตามด้วย photo-fermentation และ direct photolysis (USDEH, 2007) จนกระทั่งมาสิ้นสุดที่ microbial electrolysis ซึ่งสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้ง 4 กระบวนการ

2.4.2 การสลายด้วยไฟฟ้าทางชีวภาพ (Microbial Electrolysis)

การนำจุลินทรีย์มาใช้ร่วมกับการสลายทางไฟฟ้า (Microbial aided electrolysis cells, MEC) โดยใช้ไฟฟ้าผลิตไฮโดรเจน (electro-hydrogenesis) ด้วยการส่งกระแสไฟฟ้าเข้าไปในระหว่างการหมักเพื่อเปลี่ยนสับสเตรทที่ย่อยสลายได้ไปเป็นไฮโดรเจนโดยตรง (Rozendal และคณะ , 2006) เพื่อย่อยสลายอะซิเตทอย่างต่อเนื่อง (Cheng และ Logan, 2007; Ditzig และคณะ, 2007) ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 0.11 โวท์ล (จุลินทรีย์ผลิตได้เพียง (–0.3V)) ทำให้เกิดฟองก๊าซไฮโดรเจนที่ขั้วคาโธด (cathode) (Cheng และ Logan, 2007) การสลายตัวด้วยไฟฟ้าทางชีวภาพสามารถสร้างไฮโดรเจนจากน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อในระยะสร้างกรด (acidogenic fermentation) (Tartakovsky และคณะ, 2009)

2.4.3 การปรับปรุงพันธุ์

วิศวกรรมเมแทบอลิซึมเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพสูง และสามารถนำมาใช้เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน โดยอาศัยการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อสร้างโครงข่ายวิถีเมแทบอลิซึมขึ้นมาใหม่สำหรับการผลิตไฮโดรเจน เช่น ทำให้ยีนแสดงออกมากขึ้น การกลายพันธุ์ และใช้เทคนิคยับยั้งการทำงานของยีน (gene knocking out techniques) เพื่อให้ผลได้ไฮโดรเจนมีค่าสูงใกล้เคียงทฤษฎี (USDEH, 2007)

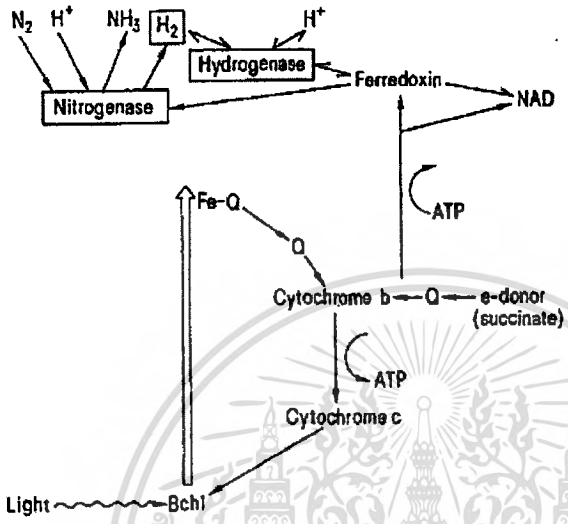
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic bacteria) ใช้ไฮโดรเจนเป็นตัวให้อิเล็คตรอนและใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในช่วงที่เจริญ (autotroph) โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังคงเกี่ยวข้องกับไฮโดรเจนในระหว่างการเจริญแบบไม่ใช้อากาศในสภาพไม่มีแสง (dark anaerobic condition) ซึ่งโดยส่วนมากเกี่ยวข้องกับการเจริญแบบไม่ใช้อากาศในสภาพมีแสง และปราศจากแอมโมเนียหรือโมเลกุลไนโตรเจน การผลิตไฮโดรเจนโดยปฏิกิริยาของแสง (photoproduction) ในจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วหรือเกือบทั้งหมดเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase (มีคุณสมบัติไม่ถูกยับยั้งโดย CO ขณะที่เอนไซม์ hydrogenase จะถูกยับยั้งด้วย CO) และขึ้นกับระดับ ATP เป็นสำคัญ โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ hydrogenase กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของการเปลี่ยน H_2 ไปเป็น $2H^+$ และ $2e^-$ (การสร้างไฮโดรเจน) คล้ายกับว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงใช้เอนไซม์นี้เพื่อกระตุ้นการใช้ไฮโดรเจน (hydrogen uptake) เป็นหลัก (ทดสอบในเซลล์) อาจเป็นไปได้ว่าหน้าที่ของเอนไซม์ hydrogenase เกี่ยวข้องกับการใช้ไฮโดรเจน ซึ่งจัดเป็นสารไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ (by-product) ที่ได้จากการปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitrogenase เพื่อให้ยังคงมีสภาพรีดิวซ์ที่เพียงพอสำหรับการรีดิวซ์ไนโตรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ (Dixon, 1972) จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงไม่สามารถเจริญได้ในสภาพใช้อากาศภายใต้แสง เพราะว่าปฏิกิริยา Knallgas reation ไม่สามารถสงวนพลังงาน (Siefert และ Pfennig, 1979) นอกจากโมเลกุลไฮโดรเจนแล้วจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงยังสามารถใช้สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็คตรอน ซึ่งมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาพมีแสง เอนไซม์กระตุ้นการผลิต และการใช้ไฮโดรเจน (ภายในเซลล์) พบว่าเป็นคนละชนิด โดยศึกษาทางพันธุกรรม หรือบังคับการทำงาน (regulatory linkage) ระหว่างเอนไซม์ nitrogenase และ hydrogenase ของยีน nif ในเชื้อกลายพันธุ์ *Rhodopseudomonas acidophila* (Siefert และ Pfennig, 1979) และยังพบว่าเอนไซม์ nitrogenase ในเชื้อ *Rhodopseudomonas capsulata* มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ hydrogenase ในสภาวะมีตัวกระตุ้น (inducers) ได้แก่ ไฮโดรเจน แสดงว่าไม่มีความสัมพันธุ์ที่แน่นอนระหว่างการสังเคราะห์เอนไซม์ hydrogenase และเอนไซม์ nitrogenase (Colbeau และคณะ, 1980) กลไกการส่งผ่านอิเล็คตรอนที่ถูกต้องในเมแทบอลิซึมไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีเพียงแบบแผนที่เป็นไปได้ของการส่งผ่านอิเล็คตรอน และเมแทบอลิซึมไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodospirillum rubrum* (ภาพที่ 2.4) แสงเป็นแรงผลักดันให้เกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็คตรอนเพื่อนำไปใช้สร้าง ATP จึงอาจเป็นไปได้ว่า NAD และสารประกอบต่างๆ ที่แสดงศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์เป็นลบ (negative redox potential) ถูกรีดิวซ์ เพื่อให้เกิดการไหลของอิเล็คตรอนในระหว่างใช้ ATP กรณีที่สารพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงหรือแหล่งพลังงานสำหรับกระบวนการตรึงไนโตรเจน พบว่ามีปริมาณมากเกินความต้องการ ทำให้เอนไซม์ nitrogenase ทำกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับไฮโดรเจน ซึ่งอาจนำกลับมาใช้ใหม่โดยเอนไซม์ ferredoxin-hydrogenase



ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงการส่งอิเล็คตรอนระหว่างเอนไซม์ hydrogenase-nitrogenase ในเมแทบอลิซึมการสร้างไฮโดรเจนของ *Rhodospirillum rubrum* ระหว่างการสังเคราะห์ด้วยแสง ที่มา : Ztirrer, 1982

2.5.1 เทอร์โมไดนามิกส์ของการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

ตารางที่ 2.3 แสดงทฤษฎีที่เป็นไปได้ของการสลายกลูโคสไปเป็นไฮโดรเจน หรือมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ การสร้างไฮโดรเจนในสภาพไร้แสงนั้นจัดเป็นการส่งผ่านพลังงานอย่างไม่มีประสิทธิภาพ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักยังคงมีพลังงานถึง 33 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานในสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้ได้ แต่ทว่าการสร้างมีเทนกลับมีประสิทธิภาพการส่งผ่านพลังงานมากกว่า พลังงานประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ได้รับการสงวนไว้ เทียบเท่ากับ 3 โมลของมีเทนสร้างจากกลูโคส 1 โมล จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสามารถใช้คาร์โบไฮเดรทด้วยวัฏจักร Krebs cycle ในสภาพไม่ใช้อากาศและมีแสง (light dependent anaerobic) (Gest และคณะ, 1962) โดยย่อยสลายกลูโคส 1 โมล ได้เป็นไฮโดรเจน 12 โมล แสดงว่าพลังงานการเผาผลาญกลูโคสถูกเก็บรักษาไว้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรายงานพบว่าการใช้แลคโตสเป็นสารอาหารให้การสงวนพลังงานได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Hillmer และ Gest, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้กลูโคส มีเทน และไฮโดรเจน

$Glucose + 2\ H_2O \rightarrow 2\ acetate^- + 2\ H^+ + 2\ CO_2 + 4\ H_2$ $4\ H_2 + 2\ O_2 \rightarrow 4\ H_2O$	$\Delta\ G^{o\prime} = -227$ kcal/mole
$Glucose + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$	$\Delta\ G^{o\prime} = -686$ kcal/mole
$Glucose \rightarrow 3\ CO_2 + 3\ CH_4$ $3\ CH_4 + 6\ O_2 \rightarrow 3\ CO_2 + 6\ H_2O$	$\Delta\ G^{o\prime} = -586$ kcal/mole
$Glucose + 6\ H_2O \rightarrow 6\ CO_2 + 12\ H_2$ $12\ H_2 + 6\ O_2 \rightarrow 12\ H_2O$	$\Delta\ G^{o\prime} = -680$ kcal/mole

ที่มา : Ztirrer (1982)

2.5.2 ตัวให้อิเล็คตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

การผลิตไฮโดรเจนจากพลังงานแสงสามารถพบได้ในเกือบทุกวงศ์ของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (*Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae* และ *Chlorobiaceae*) โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสามารถใช้สารอินทรีย์ได้หลากหลาย ได้แก่ คาร์โบไฮเดรท ไขมัน กรดไขมัน และสารประกอบอนินทรีย์ซัลเฟอร์ แต่ความจำเพาะของสารอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ตารางที่ 2.4 แสดงตัวให้อิเล็คตรอนบางชนิดที่มักนำมาใช้ผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (Kumazawa และ Mitsui, 1982) จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสามารถใช้ของเหลือทิ้งจากภาคเกษตรกรรม และของเสีย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากเชื้อเจริญดีแล้ว ยังสามารถลดมลพิษได้อีกด้วย (Kobayashi และคณะ, 1971) เช่น การใช้ whey หรือของเสียที่มีกรดแลคติกเป็นองค์ประกอบ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ยาวนานขึ้น แต่การผลิตไฮโดรเจนถูกจำกัดโดยความเหมาะสมของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิต

ตารางที่ 2.4 แสดงตัวให้อิเล็คตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

Rhodospirillaceae	Chromatiaceae	Chlorobiaceae
Acetate	Acetate	Citrate
Butyrate	Fumarate	Formate
Formate	Malate	Glucose
Fructose	Oxalacetate	α-Ketoglutarate
Fumarate	Pyruvate	Lactate
Glucose	Succinate	Mannitol
α-Ketoglutarate	Sulfide	Pyruvate
Lactate	Thiosulfate	Xylose
Malate		
Oxalacetate		
Propionate		
Pyruvate		
Succinate		
Sucrose		
Thiosulfate		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : Ztirrer (1982)

2.5.3 ศักยภาพการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

เมื่อพิจารณารายงานการวิจัยต่างๆ เกี่ยวกับอัตราการผลิตไฮโดรเจน พบว่ารายงานไม่สามารถแสดงอัตราการผลิตสูงสุดภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม อีกทั้งไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้เนื่องจากการทดลองที่แตกต่างกัน Hillmer และ Gest (1977) รายงานอัตราการผลิตไฮโดรเจน 130 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas capsulate* เมื่อใช้แลคแตท หรือไพรูเวท เป็นตัวให้อิเล็คตรอน ส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Rhodospirillum rubrum* แบบต่อเนื่อง พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.05 ต่อชั่วโมง (dilution rate) ให้มวลเซลล์ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (Ztirrer, 1982) เซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงประกอบด้วยโปรตีน 65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) และวิตามิน (Shipman และคณะ, 1977) มวลชีวของ *Rhodopseudomonas capsulata* และคุณค่าในลักษณะโปรตีนเซลล์เดียว เมื่อนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์สำหรับไก่ไข่ พบว่าให้ผลดีขึ้น (Kobayashi และ Kurata, 1978) การเจริญของจุลินทรีย์ในสภาพใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน (phototrophic) สามารถเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องโดยใช้โมเลกุลไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจน (Munson และ Burris, 1969) แล้วนำเชื้อไปเลี้ยงในสภาวะไม่มีไนโตรเจน

2.5.4 การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase ในจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

จากที่กล่าวมาแล้วว่าการผลิตไฮโดรเจนในสภาพมีแสงเกี่ยวข้องกับกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงที่ถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วแม้มีความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมในระดับต่ำเป็น ประสิทธิภาพการยับยั้งเป็นตัวกำหนดข้อจำกัดของการใช้แหล่งวัตถุดิบที่มีสารประกอบไนโตรเจนที่ปริมาณต่างๆ สำหรับใช้เป็นตัวให้ไฮโดรเจน (hydrogen donor) โดยพบว่าสารคล้ายกลูตาเมต (glutamate analog) (ได้แก่ L-methionine-DL-sulphoximine, MSO) ช่วยลดการไม่แสดงออก (repression) ของเอนไซม์ nitrogenase ที่มาจากแอมโมเนียภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่มี MSO ทำให้กระบวนการตรึงไนโตรเจน และการรีดักชั่นอะเซทิลลีน (acetylene reduction) เกิดขึ้นแม้มีแอมโมเนียในสารอาหาร (Weare และ Shanmugam, 1967) อีกทั้ง MSO ยังช่วยลดผลการยับยั้งของแอมโมเนียต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาพมีแสง (Ztirrer, 1982) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียเพื่อให้การผลิตไฮโดรเจนในสภาพมีแสงจึงได้รับความสนใจอย่างมาก ได้แก่ จุลินทรีย์กลายพันธุ์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rhodopseudomonas capsulata ที่มีคุณสมบัติ glutamine auxotroph สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ nitrogenase และผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีแอมโมเนียภายนอกเซลล์ (Wall และ Gest 1979)

2.5.5 การตรึงเซลล์ (Immobilized cells)

จุลินทรีย์ *Rhodospirillum rubrum* ที่อยู่ในสภาวะพักตัว (resting cells) การผลิตไฮโดรเจนในสภาพมีแสงมีอัตราลดลองอย่างช้าๆ แสดงว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์อื่นก็สามารถยืดระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อใช้กระบวนการตรึงเซลล์ในพอลิเมอร์หุ้มเซลล์ (polymer lattices) ซึ่งหลายงานวิจัยพบว่าการตรึงเอนไซม์ หรือตรึงเซลล์ ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (Durand และ Navarro, 1978) โดยพบรายงานการผลิตไฮโดรเจนด้วยการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Rhodospirillum, Clostridium, Anabaena) แต่ยังไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบได้อย่างเป็นระบบ เนื่องจากเทคนิค ผลได้ ความคงตัว ฯลฯ แตกต่างกันไป แต่อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงเป็นเทคนิคที่สามารถพัฒนาการเก็บรักษาพลังงานแสงในรูปของไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. OS33 และ S12 ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง และข้าว และกรดอินทรีย์ เป็นแหล่งคาร์บอน (ตามลำดับ) (สมชาย และนิสา, 2553) มาเจริญในอาหาร AM medium (Nathanan และคณะ, 2012) สำหรับการเลี้ยงเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ เตรียมได้จากการนำแหล่งคาร์บอน (ตามที่กำหนด) มาผสมกับน้ำประปา แล้วนำไปบ่มในสภาพไม่ใช้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 3 และ 5 วัน (ตามลำดับ) ใช้เพื่อเป็นแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (ภาคผนวก ก.)

3.2 การกลายพันธุ์ และการคัดแยกเชื้อ

นำเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas sp.* S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว AM medium (ภาคผนวก ก) ที่มีโซเดียมอะซิเตต 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียม กลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน นำไปเลี้ยงเชื้อภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 10 มล. มาผ่านแสง UV ที่ระยะห่าง 30 เซนติเมตร เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เก็บตัวอย่างสารละลายเชื้อตามเวลาที่ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ตามลำดับ มากระจาย (spread plate) ลงบนอาหารแข็ง AM medium ที่มีโซเดียมอะซิเตต (0.3 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อคว่ำลงในเดซิเคเตอร์ที่ไม่ใช้อากาศด้วยการเติมก๊าซไนโตรเจนเข้าไปแทนที่ เป็นจำนวน 3 ซ้ำ แล้วจึงนำไปบ่มในที่มืด 1 คืน จากนั้นจึงนำมาบ่มต่อภายใต้แสง (1500 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจดูลักษณะโคโลนีสีแดง ดูการเจริญของเชื้อ วิธีการกลายพันธุ์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas sp.* OS33 ก็ใช้วิธีเดียวกัน แต่ใช้แป้ง (2.0 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน

3.3 ศึกษาคุณสมบัติการเจริญและการสร้างก๊าซของจุลินทรีย์กลายพันธุ์

นำเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas sp.* S12 OS33 และจุลินทรีย์กลายพันธุ์ที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว AM medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มล. ที่มีโซเดียมอะซิเตต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และแป้งมันสำปะหลัง 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ตามลำดับ) บรรจุในหลอดทดสอบที่มีหลอดดักก๊าซ จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบการเจริญของเชื้อ และปริมาตรก๊าซในหลอดดักก๊าซ เปรียบเทียบกับการเจริญและการสร้างก๊าซของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์พ่อแม่

3.3 การเตรียมหัวเชื้อ

3.3.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม โดยนำเชื้อ *Rhodopseudomonas sp.* S12 และ OS33 มาเลี้ยงในอาหารเหลว AM medium ที่มีโซเดียมอะซิเตต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน (ตามลำดับ) นำไปเลี้ยงเชื้อภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งปรับให้มีความเข้มข้นเซลล์เป็น 1.0 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร (OD600 nm) นำสารละลายเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อผสมต่อไป

3.3.2 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ โดยนำแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง และข้าว ปริมาณ 30 กรัม มาผสมกับน้ำประปาจนได้ปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปใส่ให้เต็มภาชนะเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตามเวลาที่กำหนด เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป (ภาคผนวก ก.)

3.4 ศึกษาการเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

เตรียมอาหารเหลว AM medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส แป้งมันสำปะหลัง และข้าว ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (ตามลำดับ) ในขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 มล. บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 200 มล. แล้วจึงฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำมาประกอบส่วนดักเก็บก๊าซด้วยวิธีแทนที่น้ำ และมีสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นำเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ (ในรูปของ bacteriochlorophyll) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกลูโคส (ด้วยการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ) และปริมาตรไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

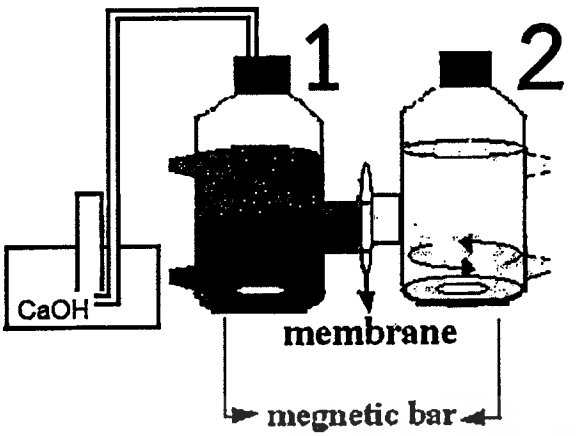
3.5 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม

เตรียมอาหารเหลว AM medium ที่ไม่มีมีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 100 มล. ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เตรียมน้ำเสียแป้งมันสำปะหลัง และน้ำเสียข้าว โดยนำแป้งมันสำปะหลัง หรือข้าว 30 กรัม ใส่น้ำประปา 100 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 3 และ 5 วัน (ตามที่กำหนด) แล้วนำไปเทผสมกับขวดที่บรรจุอาหารเหลว AM medium แล้วนำมาประกอบส่วนดักเก็บก๊าซด้วยวิธีแทนที่น้ำ จากนั้นจึงนำมาใช้สำหรับการทดลองทันที นำเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ (ในรูปของ bacteriochlorophyll) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกลูโคส (ด้วยการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ) และปริมาตรไฮโดรเจน

3.6 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม แบบแยกส่วน

เตรียมอาหารเหลว AM medium ที่ไม่มีมีแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 200 มล. ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เตรียมน้ำเสียแป้งมันสำปะหลัง และน้ำเสียข้าว โดยนำแป้งมันสำปะหลัง หรือข้าว 30 กรัม ใส่น้ำประปา 100 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 3 และ 5 วัน (ตามที่กำหนด) เตรียมชุดเลี้ยงเชื้อแบบแยกส่วน ตามภาพที่ 3.1 จากนั้นนำอาหารเหลว AM medium เทใสในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 และเทน้ำเสียแป้ง หรือน้ำเสียข้าว (ตามเวลาที่กำหนด) ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ติดตั้งชุดดักก๊าซที่ขวดที่ 1 นำเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 แล้วนำไปบ่มที่ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ (ในรูปของ bacteriochlorophyll) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกลูโคส (ด้วยการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ) และปริมาตรไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 แสดงการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม และจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ แบบแยกส่วน โดยมีเยื่อเมมเบรนกั้นระหว่างขวดทั้ง 2 และชุดดักก๊าซที่ขวดเลี้ยงเชื้อ

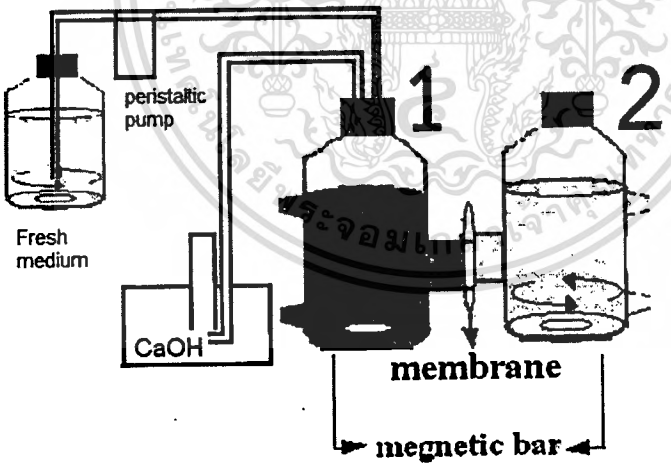
3.7 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม แบบแยกส่วนในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2000 มล. ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อครั้งเดียว (batch cultivation)

เตรียมอาหารเหลว AM medium ที่ไม่มีมีแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 1800 มล. ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2000 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เตรียมน้ำเสียแป้งมันสำปะหลัง และน้ำเสียข้าว (เตรียมน้ำเสียเป็นเวลา 3 วัน) เตรียมชุดเลี้ยงเชื้อแบบแยกส่วน ตามภาพที่ 3.1 (แต่ใช้ขวดปริมาตร 2000 มล.) จากนั้นนำอาหารเหลว AM medium เทใสในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 และเทน้ำเสียแป้ง หรือน้ำเสียข้าว (ตามเวลาที่กำหนด) ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ติดตั้งชุดดักก๊าซที่ขวดที่ 1 นำเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 แล้วนำไปบ่มที่ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ (ในรูปของ bacteriochlorophyll) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกลูโคส ปริมาตรไฮโดรเจน และกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase (ด้วยการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 ศึกษาการเจริญร่วมระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม แบบแยกส่วนในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2000 มล. ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อป้อนอาหาร (fed-batch cultivation)

เตรียมอาหารเหลว AM medium ที่ไม่มีมีแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 900 มล. ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1000 มล. จำนวน 2 ขวด แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เตรียมน้ำเสียแป้งมันสำปะหลัง และน้ำเสียข้าว (เตรียมน้ำเสียเป็นเวลา 3 วัน) เตรียมชุดเลี้ยงเชื้อแบบแยกส่วน ตามภาพที่ 3.2 (แต่ใช้ขวดปริมาตร 2000 มล.) จากนั้นนำอาหารเหลว AM medium ปริมาตร 900 มล. เทใสในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 และเทน้ำเสียแป้ง หรือน้ำเสียข้าว (ตามเวลาที่กำหนด) ปริมาตร 1900 มล. ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ติดตั้งชุดดักก๊าซที่ขวดที่ 1 นำเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 แล้วนำไปบ่มที่ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียล เมื่อเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (ขวดที่ 1) เป็นเวลา 2 วัน จึงป้อนอาหารเหลว AM medium ปริมาตร 900 มล. ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ด้วยอัตราการไหล 0.5 มล.ต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ bacteriochlorophyll ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกลูโคส ปริมาตรไฮโดรเจน และกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase (ด้วยการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)



ภาพที่ 3.2 แสดงการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม และจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ แบบแยกส่วน ด้วยวิธีป้อนอาหาร (fed-batch cultivation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวิเคราะห์

3.7.1 **ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง** ในลักษณะของปริมาณ bacteriochlorophyll โดยนำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ปริมาตร 3 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร

3.7.2 **ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด** นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มล. มาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำมาทำการเจือจางที่ระดับต่างๆ จากนั้นนำสารละลายเจือจางปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เพื่อตรวจวัดหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล - ซัลฟูริก (ภาคผนวก ข) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร บันทึกผลและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.7.3 **ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด** นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มล. มาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีนลงไป 3 หยด นำไปวัดปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรทกับสารละลาย NaOH มาตรฐาน 0.05 N บันทึกปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อคำนวณปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด (ภาคผนวก ข.)

3.7.4 **ปริมาณกลูโคส** นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่ระดับต่างๆ แล้วนำสารละลายเจือจางปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somagyi-Nelson (ภาคผนวก ข) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร บันทึกผลและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

3.7.5 **ปริมาตรไฮโดรเจน** วัดปริมาณก๊าซด้วยวิธีแทนที่น้ำ โดยใช้ก๊าซไหลผ่านสารละลาย CaOH เพื่อกำจัดก๊าซ CO_2 จากนั้นจึงนำก๊าซที่ได้มาวัดปริมาตร (ภาคผนวก ข)

3.7.6 **กิจกรรมเอนไซม์** hydrogenase กิจกรรมเอนไซม์ H_2-uptake hydrogenase วิเคราะห์โดยวิธี methylene blue (MB) reduction แล้ววัดด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu Model UV-1800) ตัวอย่างปริมาตร 1 มล. นำมาพ่นด้วยก๊าซอาร์กอน นำมาเจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 7.0 นำสารละลายที่ได้ 0.5 มล. ใส่ในขวดขนาด 9 มล. แล้วนำไปพ่นด้วยก๊าซ H_2 ประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงเติม 4 มล. ของสารละลายสี (0.2 mM methylene blue ใน 10 mM phosphate buffer, pH 7.0) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณภูมิ 40 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส ภายใต้แสงความเข้ม 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงจำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยเทียบกับตัวอย่างที่พ่นด้วยก๊าซอาร์กอน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ทันที (ภาคผนวก ข)

3.7.7 กิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase นำตัวอย่างปริมาตร 0.5 มล. และ สารละลาย 40 mM sodium acetate ปริมาตร 0.5 มล. ใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มล. ปิดปากขวดด้วยจุกยางซิลิโคน แล้วพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนจนสารละลายอิ่มตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงความเข้ม 1500 ลักซ์ เมื่อครบ 10 นาที จึงใส่ acetylene 0.9 มล. จากนั้นเขย่าขวดให้ผสมกันอย่างดี นำไปบ่มต่อ โดยเก็บตัวอย่างก๊าซ 0.9 มล. นาทีที่ 0 และนาทีที่ 30 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography (Shimadzu GC-17A) คอลัมชนิด porapak N (80-100 mesh) ความยาว 2.0 ม. ก๊าซพา (carrier gas) เป็น nitrogen อัตราการไหล 30 มล.ต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ injector และ FID เป็น 120 องศาเซลเซียส โดยใช้ acetylene และ ethylene เป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 จุลินทรีย์กลายพันธุ์

จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ไปศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV ที่เวลาต่างๆ (5 10 15 20 25 และ 30 นาที) ตามลำดับ จุลินทรีย์กลายพันธุ์จาก *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 นำมาคัดแยกบนอาหารแข็ง AM medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมอะซิเตต 0.3 เปอร์เซ็นต์ และแป้งมันสำปะหลัง 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ได้เชื้อกลายพันธุ์จาก *Rhodopseudomonas* sp. S12 จำนวน 25 ไอโซเลต และเชื้อกลายพันธุ์จาก *Rhodopseudomonas* sp. OS33 จำนวน 18 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อกลายพันธุ์ที่คัดแยกได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว AM medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมอะซิเตต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และแป้งมันสำปะหลัง 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเปรียบเทียบปริมาณ bacteriochlorophyll และการสร้างก๊าซ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่คัดแยกได้ มีความสามารถในการเจริญ และผลิตก๊าซ น้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นแบบสุ่ม และกระบวนการคัดแยกยังไม่จำเพาะต่อไอโซเลตที่มีคุณสมบัติดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ดังนั้นจึงใช้สายพันธุ์พ่อแม่ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการเจริญและการสร้างก๊าซของจุลินทรีย์กลายพันธุ์ และสายพันธุ์พ่อแม่

ไอโซเลต	การเจริญ	การสร้างก๊าซ	ไอโซเลต	การเจริญ	การสร้างก๊าซ
OS33	++++	++++	S12	++++	++++
OS33M5.1	++++	+++	S12M5.1	+++	-
OS33M5.2	++++	+++	S12M5.2	+++	+
OS33M5.3	+++	+	S12M5.3	++++	-
OS33M5.4	+++	-	S12M5.4	+++	++
OS33M5.5	+++	++	S12M5.5	+++	+++
OS33M5.6	+++	-	S12M5.6	++	-
OS33M10.1	++	+++	S12M5.7	+	++
OS33M10.2	++++	+	S12M5.8	++++	-
OS33M10.3	+	-	S12M10.1	+++	+
OS33M10.4	++	-	S12M10.2	+++	++
OS33M10.5	+++	+	S12M10.3	+	-
OS33M15.1	+	++	S12M10.4	+	-
OS33M15.2	+++	-	S12M10.5	+	+
OS33M15.3	+	+	S12M15.1	++	++
OS33M15.4	+++	+	S12M15.2	+	-
OS33M20.1	+	-	S12M15.3	++	-
OS33M20.2	+	++	S12M15.4	+++	-
OS33M25.1	+	-	S12M15.5	++	+
OS33M25.2	+	-	S12M20.1	+	+
			S12M20.2	+	-
			S12M20.3	++	+
			S12M25.1	+	-
			S12M25.2	+	-

หมายเหตุ
+ เจริญน้อย, สร้างก๊าซน้อย
++ เจริญปานกลาง, สร้างก๊าซปานกลาง
+++ เจริญดี, สร้างก๊าซดี
++++ เจริญดีมาก, สร้างก๊าซดีมาก
- ไม่เจริญ, ไม่สร้างก๊าซ

4.2 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

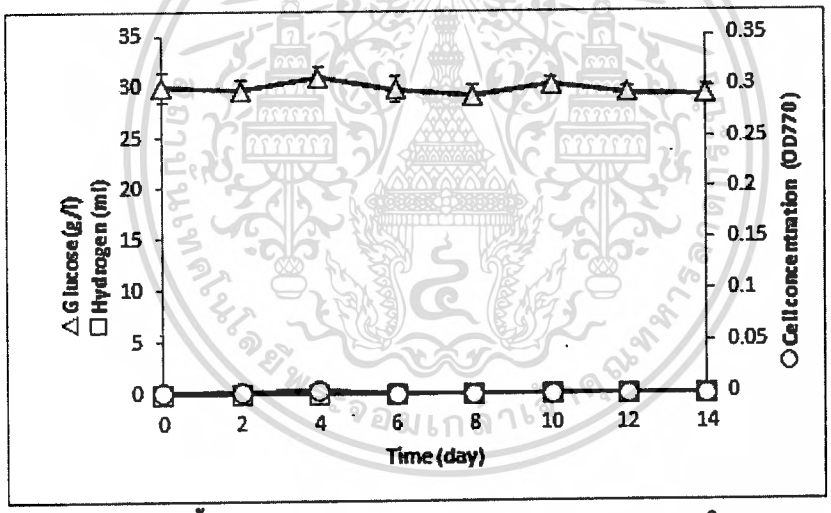
นำจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 มาเลี้ยงเชื้อร่วมกัน เพื่อใช้คุณสมบัติของเชื้อทั้ง 2 เกื้อกูลกัน โดย *Rhodopseudomonas* sp. S12 มีคุณสมบัติใช้กรดอินทรีย์ได้ดี ขณะที่ Rhodopseudomonas sp. OS33 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนพอลิเมอร์ (เช่น แป้ง มันสำปะหลัง และข้าว) ได้อย่างดี ดังนั้นการนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มาเลี้ยงร่วมกัน น่าจะทำให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายแหล่งคาร์บอนพอลิเมอร์ ร่วมกับการใช้กรดอินทรีย์ การทดลองเลี้ยงเชื้อผสม (co-culture) ในสัดส่วน 1 ต่อ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM medium ที่มีกลูโคส แป้งมันสำปะหลัง และข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

4.2.1 การเลี้ยงเชื้อผสมในแหล่งคาร์บอนกลูโคส

หลังจากลงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อเชื้อทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถเจริญอาจเป็นเพราะความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร อาจส่งผลให้เชื้อเจริญช้ามาก (ภาพที่ 4.1) สังเกตุสีของอาหารเลี้ยงเชื้อระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีแดง เนื่องจากสีของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 แต่เมื่อระยะเวลาเลี้ยงเชื้อนานขึ้นพบว่าสีเริ่มซีดจางลง เช่นเดียวกันการทดลองของ สมชาย และนิสา (2553) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ และไม่พบการสร้างไฮโดรเจนในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium เมื่อใช้กลูโคสความเข้ม 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

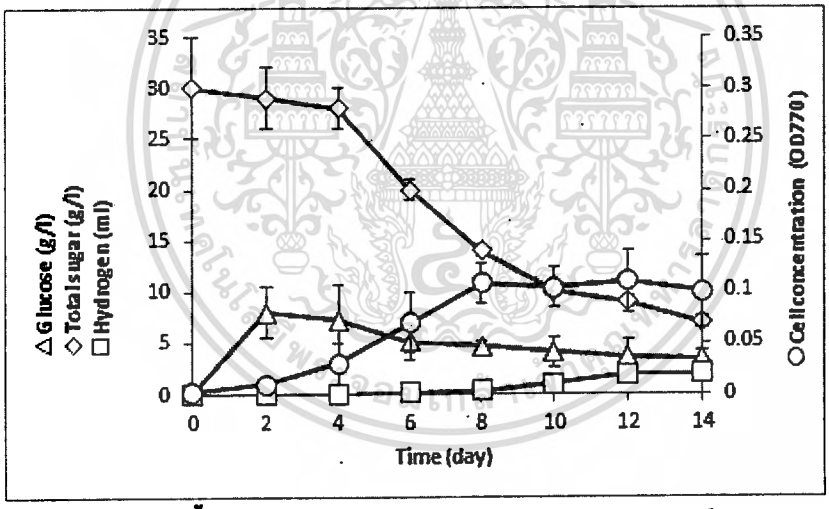
○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), และ □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร)

4.2.2 การเลี้ยงเชื้อผสมในแหล่งคาร์บอนแป้งมันสำปะหลัง

การทดลองที่ผ่านมา (สมชาย และนิสา, 2553) พบว่าการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ได้ดีในอาหาร AM medium ที่มีสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจน เป็นแป้งมันสำปะหลังต่อกลูตาเมต ที่ระดับ 5 ต่อ 1 ซึ่งการทดลองดังกล่าวใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังต่อกลูตาเมต 2.5 ต่อ 0.5 เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเรื่องความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัม ในอาหารเหลว AM medium ที่มีใช้ความเข้มข้นกลูตาเมต 10 กรัม (ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร) หลังจากลงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ให้มีความเข้มข้น 1 ต่อ 1 แล้วจึงลงเชื้อในอาหาร AM medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อเชื้อทั้ง 2 ชนิด เจริญเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ ตั้งแต่วันที่ 2 จนกระทั่งให้เซลล์สูงสุดในวันที่ 8 และคงที่ไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ขณะเดียวกันการใช้แป้งก็พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงช้าๆ ในระยะแรก โดยในช่วงวันที่ 4-8 ของการเลี้ยงเชื้อ มีการลดลงอย่างรวดเร็ว และมาคงที่ที่ระดับ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ส่วนปริมาณกลูโคสพบว่า ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อมีการสะสมกลูโคสสูงสุด แล้วจึงลดลงอย่างช้าๆ จนมาคงที่ที่ 4 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการสร้างไฮโดรเจน พบว่าวันที่ 8 เริ่มมีการสร้าง และให้ปริมาณสูงสุดประมาณ 3 มล. ในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 การเจริญของเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

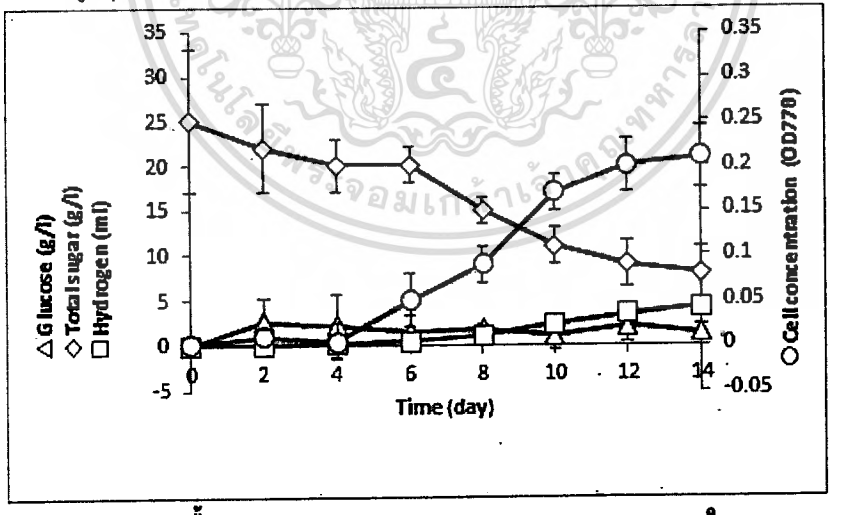
○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) และ □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร)

การเจริญร่วมกันระหว่าง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ส่งผลให้ใช้แป้งมันสำปะหลังได้อย่างดี แต่เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร อาจส่งผลต่อการผสมผสานในระยะแรกของการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การเลี้ยงเชื้อผสมในแหล่งคาร์บอนข้าว

การทดลองก่อนหน้า (สมชาย และนิสา, 2553) พบว่าการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ได้ดีในอาหาร AM medium ที่มีสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน เป็นข้าวต่อกลูตาเมต ที่ระดับ 5 ต่อ 1 แต่การทดลองครั้งนี้ใช้สัดส่วนที่ระดับ 3 ต่อ 1 เพื่อเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนอีก 2 ชนิด การใช้ข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างดี เมื่อเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลัง ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงใช้ความเข้มข้นข้าว 30 กรัม ในอาหารเหลว AM medium ที่มีใช้ความเข้มข้นกลูตาเมต 10 กรัม (ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร) หลังจากลงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ให้มีความเข้มข้น 1 ต่อ 1 แล้วจึงลงเชื้อในอาหาร AM medium ที่มีข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อเชื้อทั้ง 2 ชนิด เจริญเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ ในช่วง 2 วันแรก และเพิ่มอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 ถึงวันที่ 10 และคงที่ไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ขณะเดียวกันการใช้ข้าวพบการเปลี่ยนแปลงช้าๆ ในระยะแรกช่วงวันที่ 0-6 ของการเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น และมาคงที่ที่ระดับ 8 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ สำหรับปริมาณกลูโคสพบว่ามีการสะสมในระดับต่ำตั้งแต่วันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการสร้างไฮโดรเจน พบเริ่มต้นในวันที่ 6 และให้ปริมาณสูงสุดประมาณ 4-5 มล. ในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 การเจริญของเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium เมื่อใช้ข้าว 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) และ □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญร่วมกันระหว่าง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ส่งผลให้ใช้ข้าวได้อย่างดี อาจเป็นเพราะความหนืดที่ลดลง ส่งผลให้การผสมผสานดีขึ้น แต่โครงสร้างเมล็ดข้าวทำให้เชื้อแบคทีเรียจับเกาะได้อย่างดี และแทรกเข้าไปภายในเมล็ดข้าวได้ง่าย จึงยากต่อการวัดความเข้มข้นเซลล์ อย่างไรก็ตามการใช้ข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้สร้างไฮโดรเจนได้เร็วขึ้น

4.3 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีความสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาพไม่ใช้อากาศจนได้เป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นสารให้อิเล็คตรอนสำหรับจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อร่วมกัน *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 จึงส่งผลดีต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยร่วม อีกทั้งการทดลองก่อนหน้า สมชาย และนิสา (2553) พบว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 สามารถเจริญแบบแข่งขันกับจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศที่เจริญในระหว่างการทำน้ำเสียสังเคราะห์ (นำข้าวใส่น้ำแล้วปล่อยให้เกิดการเน่าเสียที่อุณหภูมิห้อง) ซึ่งในเวลาต่อมาพบการเจริญของ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 เด่นชัด จนทำให้น้ำเสียข้าวสังเคราะห์เปลี่ยนเป็นสีแดง ซึ่งเต็มไปด้วยจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในการทดลองที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส อาจไม่ส่งผลดี เนื่องจากจุลินทรีย์ไร้อากาศสามารถเจริญได้อย่างดี จนทำให้มีปริมาณกรดอินทรีย์สูงมาก จนส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงได้ ขณะที่การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง และข้าว นำทำให้อยู่ในรูปของน้ำเสีย ด้วยการใส่ลงในน้ำประปา ซึ่งเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แล้วบ่มให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศเจริญในอาหารเป็นเวลา 0 วัน 3 วัน และ 5 วัน (ตามลำดับ) จากนั้นจึงใส่เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมระหว่าง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (สัดส่วน 1 ต่อ 1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM medium ต่อไป

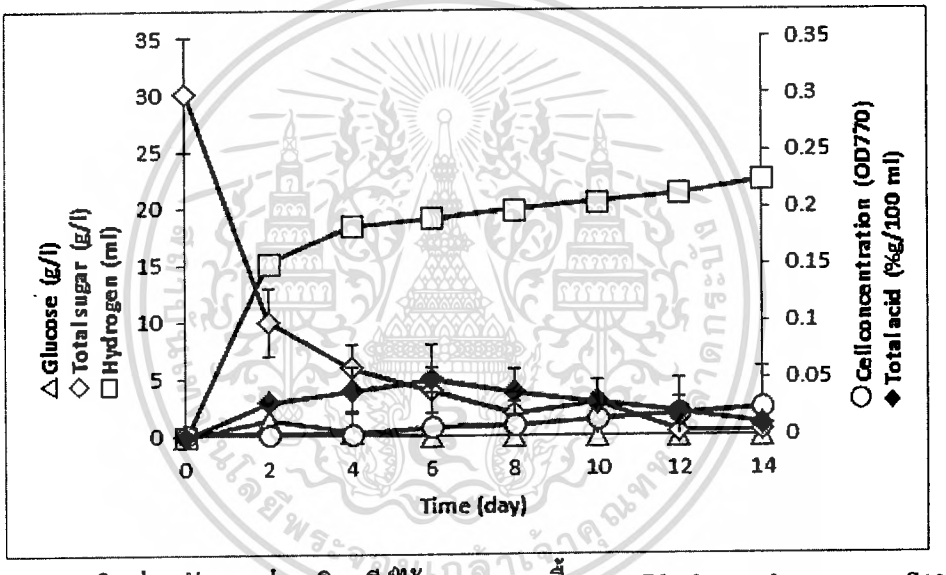
4.3.1 การเลี้ยงเชื้อผสมในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียแป้ง

4.3.1.1 เตรียมน้ำเสียแป้งเป็นเวลา 0 วัน

หลังจากลงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium และน้ำเสียแป้ง (ได้จากการผสมสารละลายแป้งมันสำปะหลังสุก และน้ำประปา) เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อจุลินทรียน์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมทั้ง 2 ชนิด เจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งถึงวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำกรดอินทรีย์ไปใช้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบการลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ซึ่งส่งผลให้ปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก ส่วนปริมาณกลูโคสไม่พบในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรียน์ไม่ใช้อากาศสามารถนำไปใช้อย่างรวดเร็ว สำหรับการสร้างก๊าซ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ทำให้มีการสร้างก๊าซแอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ (ถูกดักจับด้วยแคลเซียมคาร์บอนเนต) และก๊าซชนิดอื่น (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium และน้ำเสียแป้ง ซึ่งระยะแรกของการเจริญจะมีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศอย่างรวดเร็ว ขณะที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ซึ่ง

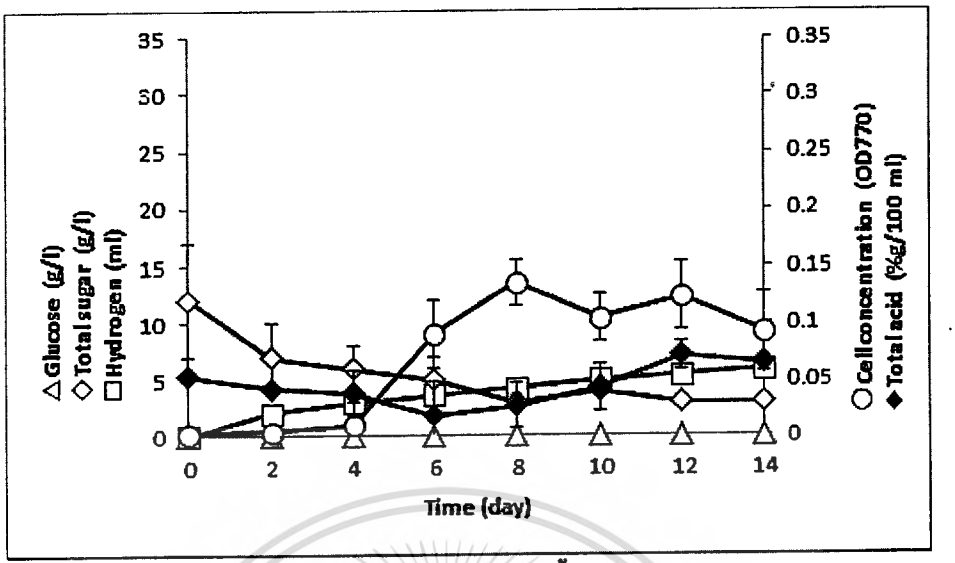
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นผลมาจากการใช้แป้งมันสำปะหลัง และการใช้กรดอินทรีย์ ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ในระบบอยู่ในปริมาณต่ำ จึงส่งเสริมให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถเจริญได้อย่างต่อเนื่อง และเพิ่มจำนวนอย่างมาก (predominant) โดยสังเกตุว่าในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น โดยไม่พบสีแดงจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ แสดงว่าจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศให้การเจริญอย่างมากจนจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงไม่สามารถเจริญแข่งขันได้ อีกทั้งก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ยังส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน

4.3.1.2 เตรียมน้ำเสียแป้งเป็นเวลา 3 วัน

เตรียมน้ำเสียแป้ง (ได้จากการผสมสารละลายแป้งมันสำปะหลังสุก และน้ำประปา) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงใช้น้ำเสียแป้งดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ นำมาใส่เชื้อผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมทั้ง 2 ชนิด เจริญเพิ่มขึ้นช้าในระยะแรก แล้วจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 4-8 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณเซลล์คงที่ไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ปริมาณกรดมีมากตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากใช้น้ำเสียแป้ง (ซึ่งใช้เวลาเตรียม 3 วัน) จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง นำไปใช้เพื่อการเจริญได้เลย จึงทำให้เชื้อเจริญตั้งแต่วันแรก ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งถึงวันที่ 6 ปริมาณกรดอินทรีย์จึงค่อยๆ เพิ่มขึ้น จนไปคงที่อยู่ที่ระดับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อ 100 มล) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าที่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำเนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศนำไปใช้ในช่วงการเตรียมน้ำเสีย (และเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์) ซึ่งค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับปริมาณกลูโคสไม่พบในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรียน์ไม่ใช้อากาศสามารถนำไปใช้อย่างรวดเร็ว การสร้างก๊าซ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากในช่วงเตรียมน้ำเสียแป้ง มีการนำอาหารไปใช้ และผลิตก๊าซไปแล้ว ดังนั้นการผลิตก๊าซในช่วงนี้จึงเป็นไฮโดรเจน และเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียแป้ง (บ่มเป็นเวลา 3 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

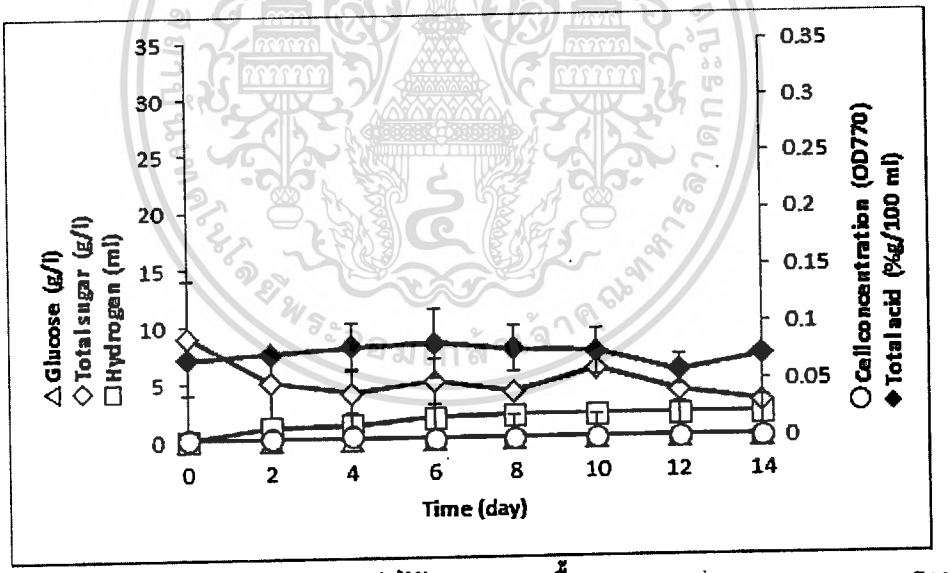
○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium และน้ำเสียแป้ง (บ่มเป็นมาแล้ว 3 วัน) ซึ่งระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ พบการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้น้ำเสียแป้ง (ผ่านการบ่มมาแล้ว 3 วัน) มีปริมาณกรดอินทรีย์ จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงวสามารถเจริญได้ทันที จึงทำให้กรดอินทรีย์ลดลง จนกระทั่งถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ จึงกลับมามีกิจกรรมย่อยแป้ง แล้วเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์สำหรับให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้ต่อไป ซึ่งกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศช่วงนี้อาจทำให้เกิดการสร้างก๊าซต่างๆ ที่ไม่ใช่ไฮโดรเจน เช่นก๊าซแอมโมเนีย ถ้ามีการละลายน้ำอาจส่งผลยับยั้งกิจกรรมการสร้างก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ได้เช่นกัน นอกจากนี้การใช้น้ำเสียแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดปัญหาเรื่องความหนืด แต่ทำให้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นลดลง ซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.3 เตรียมน้ำเสียแป้งเป็นเวลา 5 วัน

เตรียมน้ำเสียแป้ง (ได้จากการผสมสารละลายแป้งมันสำปะหลังสุก และน้ำประปา) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงใช้น้ำเสียแป้งดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ นำมาใส่เชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียแป้ง เนื่องจากมีกรดอินทรีย์ในปริมาณสูงมากตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำเนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศนำไปใช้ในช่วงการเตรียมน้ำเสีย (และเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์) และไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง โดยมีค่าคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับปริมาณกลูโคสไม่พบในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรียน์ไม่ใช้อากาศสามารถนำไปใช้อย่างรวดเร็ว การสร้างก๊าซพบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากกิจกรรมของกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ



ภาพที่ 4.6 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียแป้ง (บ่มเป็นเวลา 5 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium และน้ำเสียแป้ง (บ่มเป็นมาแล้ว 5 วัน) ซึ่งตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้เสียแป้ง (ผ่านการบ่มมาแล้ว 5 วัน) มีปริมาณกรดอินทรีย์เข้มข้นสูงมาก จนส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์อาจส่งผลยับยั้งการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ซึ่งทำให้กิจกรรมการสร้างก๊าซชนิดต่างๆ จากจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศลดลงไปด้วย

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำเสียแป้ง ที่ผ่านการเตรียมด้วยการผสมแป้งมันสำปะหลังและน้ำประปา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณกรดอินทรีย์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม เมื่อนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 จึงทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สามารถนำกรดอินทรีย์ไปใช้ได้ทันที และเมื่อปริมาณกรดอินทรีย์ลดลง ก็ทำให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถเจริญและย่อยน้ำตาลไปเป็นกรดอินทรีย์ได้อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระบบมีค่าลดลงเป็นลำดับ แต่อย่างไรก็ตามก๊าซที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง อาจเป็นก๊าซผสมระหว่างไฮโดรเจน (ที่ได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง) และก๊าซชนิดอื่น (ที่ได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ)

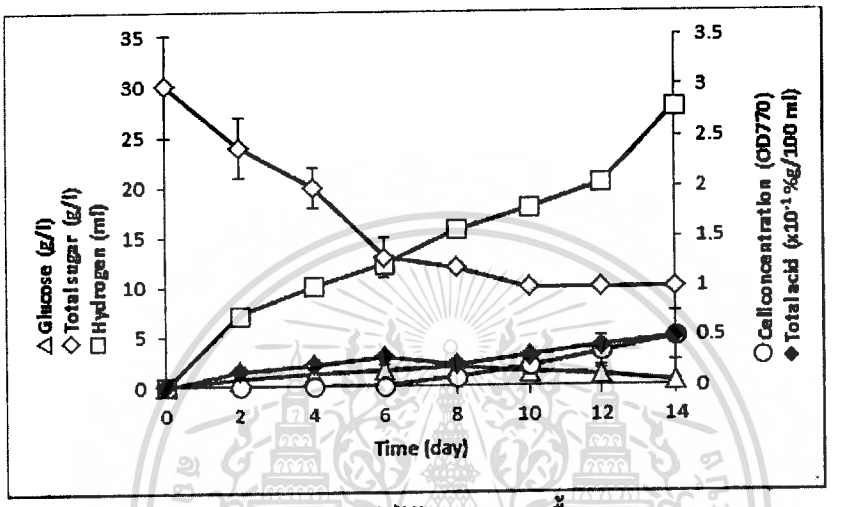
4.3.2 การเลี้ยงเชื้อผสมในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียข้าว

4.3.2.1 เตรียมน้ำเสียข้าวเป็นเวลา 0 วัน

เตรียมน้ำเสียข้าวโดยผสมข้าว 30 กรัม ลงในน้ำประปา แล้วบ่มในสภาวะไม่ใช้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 วัน แล้วจึงนำมาใช้เป็นแหล่งจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และแหล่งคาร์บอนสำหรับการทดลอง โดยลงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium แล้วจึงนำไปเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ภาพที่ 4.7 แสดงผลการทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมทั้ง 2 ชนิด เจริญช้ามากในช่วง 0-6 วันแรก หลังจากนั้นจึงพบการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งมีค่าสูงสุดในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำกรดอินทรีย์ไปใช้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-6 วันแรก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ซึ่งส่งผลให้ปริมาณกรดอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก ส่วนปริมาณกลูโคสพบเล็กน้อยในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากกิจกรรมการย่อยสลายข้าวไปเป็นกลูโคส มีมากกว่ากิจกรรมการใช้กลูโคส ของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สำหรับการสร้างก๊าซ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ทำให้มีการสร้างก๊าซชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ (ถูกดักจับด้วยแคลเซียมคาร์บอนเนต) และก๊าซชนิดอื่น



ภาพที่ 4.7 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

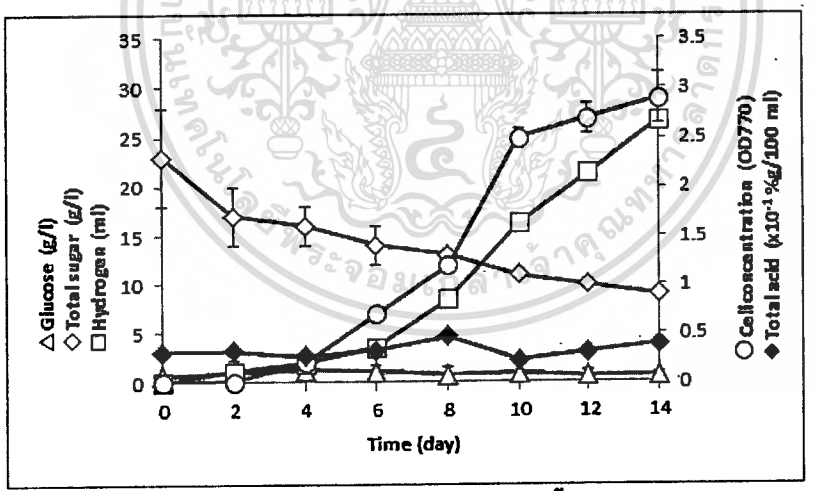
○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ ($x10^{-1}$ %กรัมต่อ 100 มล.)

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารที่มีน้ำเสียข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งระยะแรกของการเจริญจะมีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศอย่างรวดเร็ว ขณะที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงมีการเพิ่มขึ้นช้ามาก เนื่องจากการย่อยสลายข้าวโดยจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ *Rhodopseudomonas* sp. OS33 ดำเนินไปอย่างช้าๆ จนกระทั่งปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น จึงทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สามารถเจริญได้ ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ในระบบอยู่ในปริมาณต่ำ จึงส่งเสริมให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถเจริญได้อย่างต่อเนื่อง กิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ปริมาณก๊าซสร้างขึ้นประกอบด้วยก๊าซหลายชนิด ได้แก่ แอมโมเนียที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ซึ่งอาจส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.2 เตรียมน้ำเสียข้าวเป็นเวลา 3 วัน

เตรียมน้ำเสียข้าว (ได้จากการผสมข้าว 30 กรัม และน้ำประปา) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงใช้น้ำเสียข้าวดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ นำมาใส่เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมในอาหาร AM medium จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.8 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมทั้ง 2 ชนิด เจริญเพิ่มขึ้น (0-4 วัน) และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมาก (ในช่วงเวลา 4-10 วัน) หลังจากนั้นพบการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ไปจนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ปริมาณกรดมีความเข้มข้นสูงตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากใช้น้ำเสียข้าว (ซึ่งใช้เวลาเตรียม 3 วัน) จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง นำไปใช้เพื่อการเจริญได้เลย จึงทำให้เชื้อเจริญตั้งแต่วันแรก ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่ไปจนตลอดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าว่ามีการเปลี่ยนแปลงลดลงอย่างคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง สำหรับปริมาณกลูโคสพบว่ามีการสะสมในระดับต่ำมาก และคงที่ไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การสร้างก๊าซพบการสร้างตั้งแต่วันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 4.8 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไร้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียข้าว (บ่มเป็นเวลา 3 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (x10-^{1}%กรัมต่อ 100 มล.)

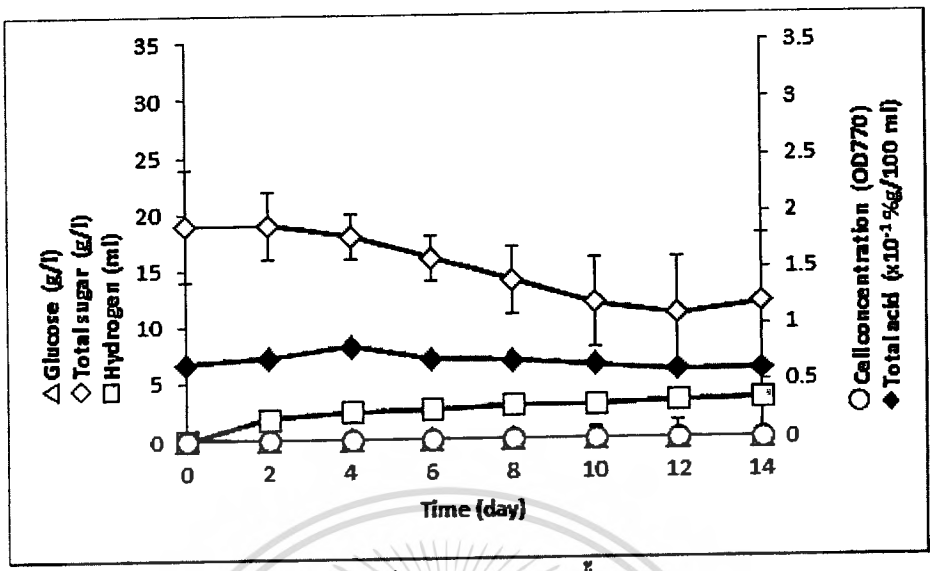
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium และน้ำเสียแป้ง (บ่มนาน 3 วัน) ซึ่งระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ พบการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้น้ำเสียข้าว มีปริมาณกรดอินทรีย์ จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสามารถเจริญได้ทันที จึงทำให้กรดอินทรีย์ลดลง จนกระทั่งถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ จึงกลับมามีกิจกรรมย่อยข้าว ไปเป็นสารโมเลกุลเล็ก แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ เพื่อให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้ต่อ กิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศจึงเกิดขึ้นได้ตลอดช่วงเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดการสร้างก๊าซต่างๆ ที่ไม่ใช่ไฮโดรเจน เช่นก๊าซแอมโมเนีย ถ้าหากละลายน้ำได้ ก็อาจส่งผลยับยั้งกิจกรรมการสร้างก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เช่นกัน การใช้น้ำเสียข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ถ้าสามารถควบคุมระดับความเข้มข้นของสารต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม ก็จะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายข้าวได้อย่างสมบูรณ์ จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งต่อการนำไปใช้เพื่อใช้บำบัดน้ำเสีย

4.3.2.3 เตรียมน้ำเสียข้าวเป็นเวลา 5 วัน

เตรียมน้ำเสียข้าว (ได้จากการผสมข้าว 30 กรัม และน้ำประปา) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงใช้น้ำเสียข้าวดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ นำมาใส่เชื้อผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงเชื้อในสภาพไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.9 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสมทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนน้ำเสียข้าว เนื่องจากมีกรดอินทรีย์ในปริมาณสูงมากตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ที่วันแรกของการเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำเนื่องจากจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศนำไปใช้ในช่วงการเตรียมน้ำเสีย (และเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์) และไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง โดยมีค่าคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับปริมาณกลูโคสไม่พบในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรียน์ไม่ใช้อากาศสามารถนำไปใช้อย่างรวดเร็ว การสร้างก๊าซ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากกิจกรรมของกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การเจริญร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium ซึ่งใช้น้ำเสียข้าว (บ่มเป็นเวลา 5 วัน) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ ($x10^{-1}$%กรัมต่อ 100 มล.)

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium และน้ำเสียแป้ง (บ่มเป็นมาแล้ว 5 วัน) ซึ่งตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้น้ำเสียข้าว (ผ่านการบ่มมาแล้ว 5 วัน) มีปริมาณกรดอินทรีย์เข้มข้นสูงมาก จนส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ OS33 และ S12 นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์อาจส่งผลยับยั้งการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ซึ่งทำให้กิจกรรมการสร้างก๊าซชนิดต่างๆ จากจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศลดลงไปด้วย

การใช้น้ำเสียข้าว ที่ผ่านการเตรียมด้วยการผสมข้าว (30 กรัม) และน้ำประปา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณกรดอินทรีย์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม เมื่อนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 จึงทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สามารถนำกรดอินทรีย์ไปใช้ได้ทันที และเมื่อปริมาณกรดอินทรีย์ลดลง ก็ทำให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถเจริญ และย่อยสลายข้าวไปเป็นสารโมเลกุลเล็ก แล้วได้เป็นกรดอินทรีย์อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระบบมีค่าลดลงเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับ แต่อย่างไรก็ตามก๊าซที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง อาจเป็นก๊าซผสมระหว่างไฮโดรเจน (ที่ได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง) และก๊าซชนิดอื่น (ที่ได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเตรียมน้ำเสียแป้ง และข้าว เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ส่งผลดีต่อการเลี้ยงเชื้อร่วมกับจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 เนื่องจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงสามารถนำกรดอินทรีย์ไปใช้ได้ทันที และทำให้ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ในระบบอยู่ในระดับสมดุล ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถย่อยสลายแป้ง และข้าวได้อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์ไร้อากาศต่อย่อยสลายแป้ง พบว่าเป็นไปอย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดการสะสมกรดอินทรีย์ปริมาณมาก เนื่องจากโครงสร้างของแป้งง่ายต่อการย่อยสลาย จึงส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสดงทั้งในด้านการเจริญและการสร้างก๊าซ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงใช้เพียงน้ำเสียข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าก๊าซที่ผลิตได้ อยู่ในรูปของก๊าซผสมที่ได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาการเจริญแบบ 2 ระบบ (two phase system) โดยควบคุมให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ แยกจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง แต่มีการส่งผ่านกรดอินทรีย์ จากขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ แพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่านขนาด 10 K da ไปยังขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งจะส่งผลดีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

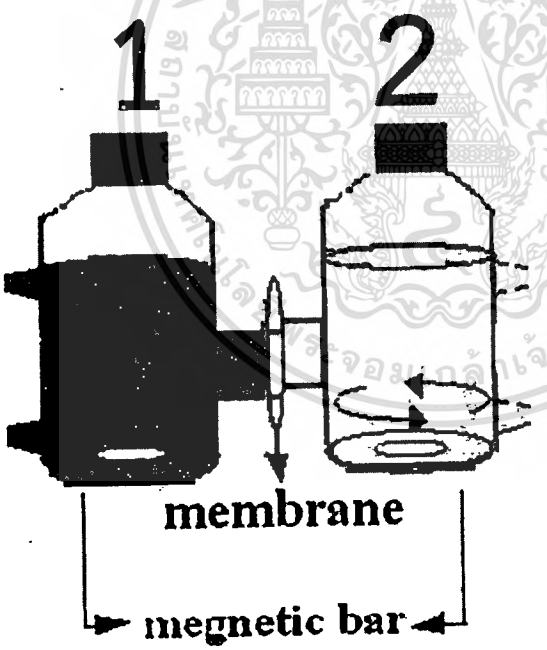
4.4 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง แบบแยกส่วน

การทดลองที่ผ่านมาพบว่าการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง มีผลส่งเสริมซึ่งกันและกัน การเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ทำให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นกรดอินทรีย์ จนกระทั่งกรดอินทรีย์มีความเข้มข้นสูง จึงส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ขณะที่การเจริญจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง พบการย่อยสลายสารอินทรีย์ดำเนินไปอย่างช้าๆ และสามารถใช้กรดอินทรีย์ได้อย่างดี ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อร่วมกันทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็นกรดอินทรีย์แล้วจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำกรดอินทรีย์ไปใช้เพื่อสร้างก๊าซไฮโดรเจน ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ในระบบลดลง เชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศก็สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ต่อไป แต่การเลี้ยงเชื้อร่วมกันทำให้เกิดสารบางอย่างที่ส่งผลยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิด อีกทั้งการสร้างก๊าซอาจอยู่ในรูปของก๊าซผสม ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาการเจริญ 2 ระบบ (two phase system) หรือการเลี้ยงเชื้อแบบแยกส่วน โดยให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เจริญในขวดที่ 1 และ จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศเจริญในขวดที่ 2 ซึ่งทั้ง 2 ขวด มีการเชื่อต่อกันเพื่อให้สารละลายสามารถแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรนขนาด 10 K da ไปยังขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้การสร้างก๊าซจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ทั้ง 2 แยกออกจากกันอย่างเด็ดขาด จะส่งผลดีต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 แบบแยกส่วน โดยขวดเลี้ยงเชื้อ 1 จะเป็นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน และขวดเลี้ยงเชื้อ 2 จะเป็นแหล่งน้ำเสียข้าวที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ขวดเลี้ยงเชื้อ 1 และ 2 จะมีบริเวณเชื่อมต่อกันโดยมีเยื่อเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้นแยกขวดทั้ง 2 ออกจากกัน มีเพียงสารอาหารเท่านั้นที่สามารถแพร่ผ่านไปได้ (ดังแสดงในภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 แสดงการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง แบบแยกส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณฝาขวดจะมีแผ่นซิลิโคนปิด สามารถให้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อแทงทะลุผ่านเพื่อเก็บตัวอย่าง และต่อท่อเพื่อให้ก๊าซ ซึ่งเคลื่อนที่ผ่านสารละลาย CaOH ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วไปแทนที่สารละลายในหลอดเก็บก๊าซ

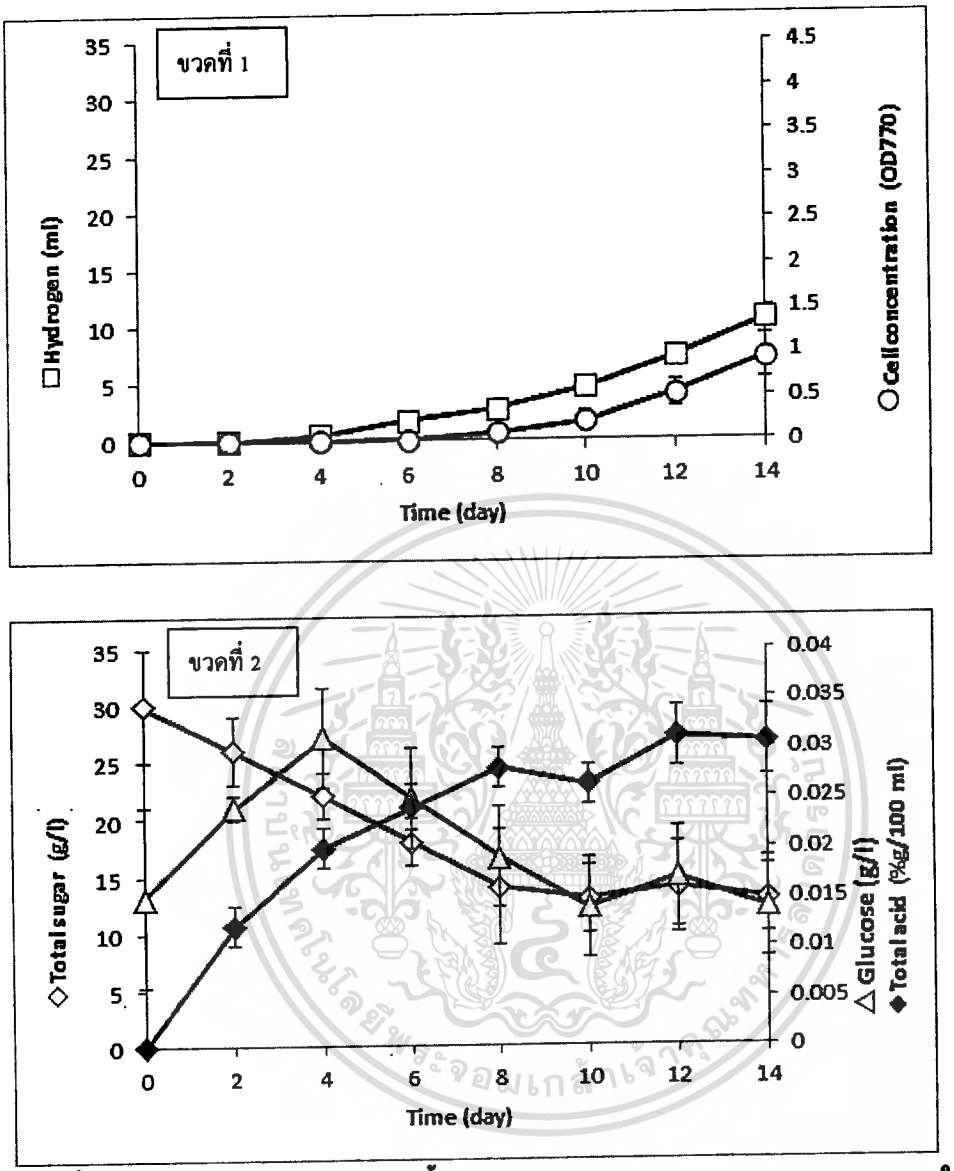
การทดลองเตรียมอาหารเหลว AM medium (ไม่มีแหล่งคาร์บอน) ปลอดเชื้อใส่ในขวดที่ 1 จากนั้นจึงใส่เชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (สัดส่วน 1 ต่อ 1) ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เชื่อมต่อกับขวดที่ 2 ซึ่งบรรจุน้ำเสียข้าว (ที่บ่มอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 วัน 3 วัน และ 5 วัน ตามลำดับ) โดยมีเยื่อเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้นระหว่างขวดทั้ง 2 แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์

4.4.1 การเลี้ยงเชื้อผสมแบบแยกส่วนในน้ำเสียข้าวที่ใช้เวลาเตรียม 0 วัน

ภาพที่ 4.11 แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในขวดที่ 1 พบว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ให้การเจริญอย่างช้าๆ และเริ่มดีขึ้นในวันที่ 8 ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง เช่นเดียวกับการสร้างไฮโดรเจนซึ่งพบการสร้างก๊าซตั้งแต่วันที่ 4 และเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างช้าๆ ไปจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงของอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ในวันที่ 8 ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง การสร้างกรดพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ และให้ค่าสูงสุดในวันที่ 8 และคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ปริมาณกลูโคสพบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 4 วันแรก จากนั้นจึงลดลง และมีค่าคงที่ในวันที่ 10 ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

การย่อยสลายข้าวโดยจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (ขวดที่ 2) ในระยะแรกมีการดำเนินไปอย่างช้าๆ ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ และกลูโคสที่แพร่ผ่านเมมเบรนไปยังจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (ขวดที่ 1) มีปริมาณน้อย ส่งผลให้การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงเป็นไปอย่างช้าๆ และเมื่อเวลาผ่านไปการย่อยสลายข้าวโดยจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ มีค่ามากขึ้น ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์แพร่ไปยังขวดที่ 1 มากขึ้น ทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เจริญได้ดีขึ้น การใช้น้ำเสียข้าวอายุ 0 วัน พบการสร้างกรดอินทรีย์อย่างช้าๆ จึงส่งผลให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 เจริญช้า และสร้างไฮโดรเจนช้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และอุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าวอายุ 0 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร), □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

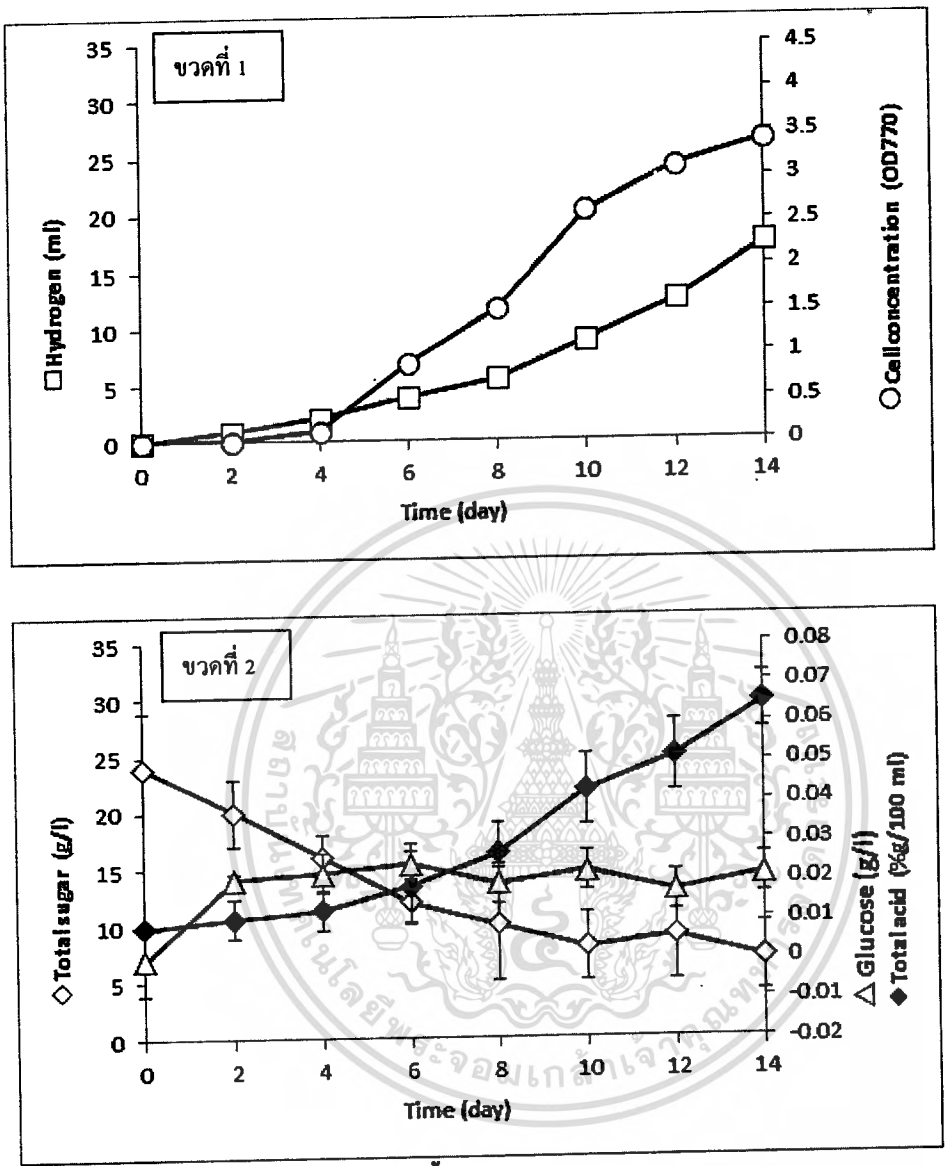
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การเลี้ยงเชื้อผสมแบบแยกส่วนในน้ำเสียข้าวที่ใช้เวลาเตรียม 3 วัน

ภาพที่ 4.12 แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในขวดที่ 1 พบว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 เริ่มต้นการเจริญตั้งแต่วันที่ 2 และเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 4-12 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่ค่อยๆ ช้าลงในเวลาต่อมา เช่นเดียวกับการสร้างไฮโดรเจน พบการสร้างเริ่มขึ้นในวันที่ 2 และดำเนินต่อไปจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับขวดที่ 2 ซึ่งบรรจุน้ำเสียข้าว (บ่มมาแล้ว 3 วัน) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงของอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ในวันที่ 10 ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณกรดอินทรีย์ พบว่าความเข้มข้นสูงตั้งแต่วันแรก และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องไปจนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ปริมาณกลูโคสพบว่ามีความเข้มข้นคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

น้ำเสียข้าว ที่ใช้ระยะเวลาการเตรียม 3 วัน พบว่ามีปริมาณกรดอินทรีย์สูง (ขวดที่ 2) จึงแพร่ผ่านเมมเบรนไปยังขวดที่ 1 ซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง จึงทำให้เจริญ และสร้างไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว ปริมาณกรดอินทรีย์ในขวดที่ 1 จึงลดลง ทำให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถย่อยสลายข้าวได้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลดีต่อระบบโดยรวม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในขวดที่ 1 ช่วงวันที่ 12-14 มีแนวโน้มช้าลง อาจเป็นผลเนื่องมาจากความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงมากจนส่งผลให้เกิดการบดบังแสง (light shading) จึงต้องคำนึงถึงพื้นที่ผิวการรับแสงเป็นสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าวอายุ 3 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร), □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

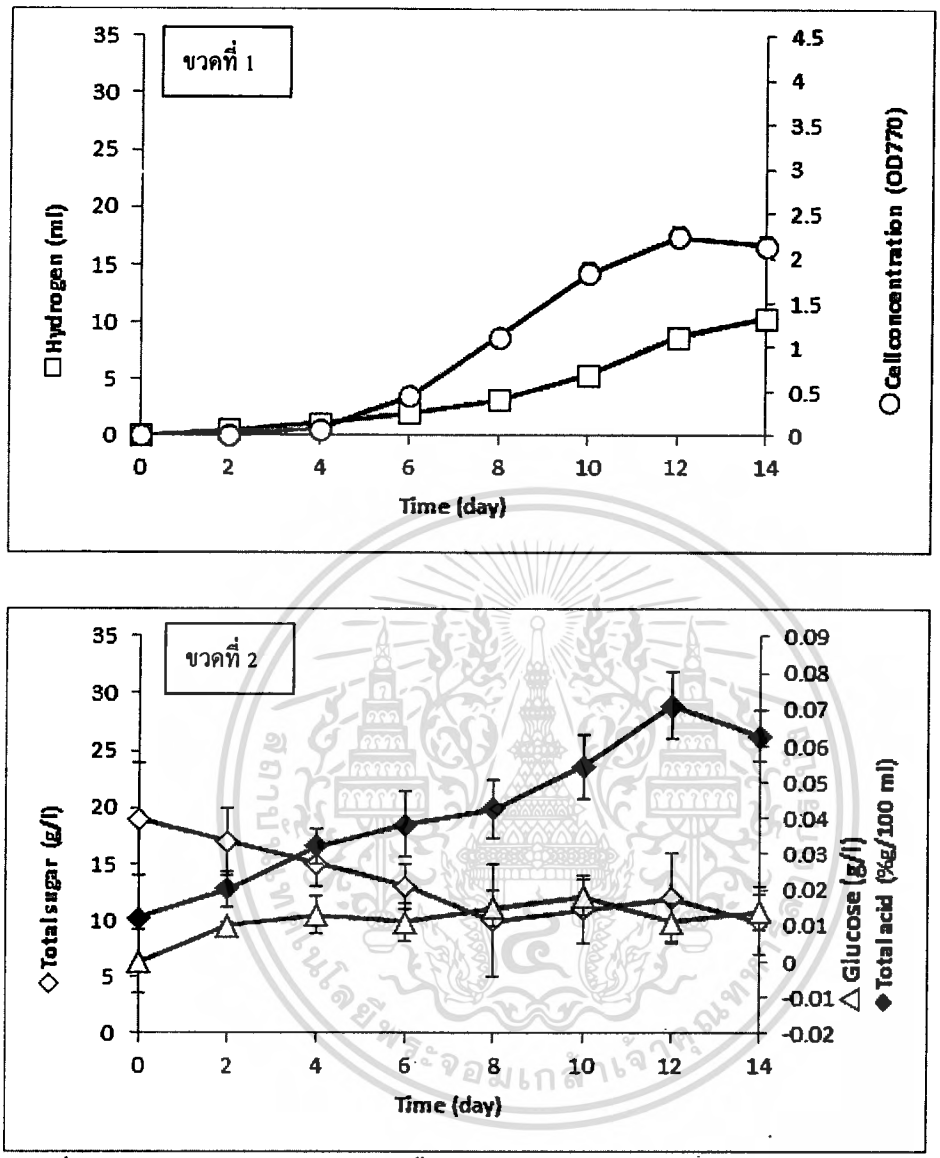
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 การเลี้ยงเชื้อผสมแบบแยกส่วนในน้ำเสียข้าวที่ใช้เวลาเตรียม 5 วัน

ภาพที่ 4.13 แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในขวดที่ 1 พบว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 เริ่มต้นการเจริญอย่างช้าๆ ตั้งแต่วันที่ 2-8 จากนั้นจึงเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 8-14 ของการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับการสร้างไฮโดรเจน พบการสร้างเริ่มขึ้นในวันที่ 4 และดำเนินต่อไปจนมีปริมาณสูงสุดในวัน 12 สำหรับขวดที่ 2 ซึ่งบรรจุน้ำเสียข้าว (บ่มมาแล้ว 5 วัน) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงของอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ในวันที่ 8 ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณกรดอินทรีย์ พบว่าความเข้มข้นสูงตั้งแต่วันแรก และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 12 และลดลงในตอนท้ายของการทดลอง ขณะที่ปริมาณกลูโคสพบว่ามีความเข้มข้นต่ำ และคงที่ไปจนตลอดการทดลอง

น้ำเสียข้าว ที่ใช้เวลาเตรียมนาน 5 วัน พบว่ามีปริมาณกรดอินทรีย์สูงมาก (ขวดที่ 2) จึงแพร่ผ่านเมมเบรนไปยังขวดที่ 1 ในปริมาณมากเช่นกัน ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงเจริญในสภาพที่มีกรดอินทรีย์ความเข้มข้นสูง ส่งผลให้เชื้อเจริญช้าในระยะแรก จึงทำให้สร้างไฮโดรเจนช้าและได้ปริมาณน้อยไปด้วย ขณะเดียวกันปริมาณกรดอินทรีย์ในขวดที่ 2 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อาจส่งผลให้ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในขวดที่ 1 มีค่าสูง จนส่งผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไฮโดรเจนจาก *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าวอายุ 5 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร), □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (ในน้ำเสียข้าว อายุ 3 วัน) และเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหาร AM medium แบบแยกส่วน พบว่ามีความเหมาะสม เนื่องจากมีปริมาณกรดอินทรีย์เริ่มต้น (ในขวดที่ 2) และแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรนไปยังขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้ได้ทันที ส่งผลให้ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 มีความเข้มข้นกรดอินทรีย์ลดลง อยู่ในระดับที่จุลินทรียน์ไม่ใช้อากาศสามารถย่อยสลายข้าวได้อย่างต่อเนื่อง ถ้าให้การเลี้ยงเชื้อดำเนินต่อไปก็จะทำให้เกิดการย่อยสลายข้าวในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะเดียวกันในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 จะพบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนเพียงชนิดเดียว เนื่องจากไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้ง่ายต่อการนำไฮโดรเจนไปใช้ประโยชน์ต่อไป สำหรับการใช้น้ำเสียข้าวอายุ 0 วัน และ 5 วัน ซึ่งไม่มีกรดอินทรีย์ และมีกรดอินทรีย์เข้มข้นสูง (ตามลำดับ) พบว่าไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์สังเคราะห์ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้น้ำเสียข้าวอายุ 5 วัน ซึ่งมีปริมาณกรดอินทรีย์เข้มข้นสูง อาจแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรนขนาด 10 Kda ได้อย่างดี จึงไปสะสมในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ในปริมาณมาก ถ้าใช้เมมเบรนที่มีพื้นที่ผิวลดลงหรือขนาดรูพรุนลดลง ก็อาจส่งผลดีต่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงในขวดที่ 2 แต่ทำให้เกิดผลเสียต่อการกิจกรรมและการเจริญของจุลินทรีย์ไร้อากาศ เนื่องจากปริมาณกรดอินทรีย์ ดังนั้นการทดลองต่อไปจะเป็นการศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนแบบครั้งเดียว (batch cultivation) และแบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2 ลิตร

4.5 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงในขวด 2 ลิตร แบบแยกส่วน

การทดลองที่ผ่านมาพบว่าการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง แบบแยกส่วน โดยใช้น้ำเสียข้าวที่เตรียมเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งมีปริมาณกรดอินทรีย์เริ่มต้นที่เหมาะสม จึงให้ผลดีทั้งในด้านการเจริญ และกิจกรรมของจุลินทรีย์ไร้แสง และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ย่อยสลายข้าวได้อย่างสมบูรณ์ (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2) และผลิตไฮโดรเจนได้อย่างดี (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) ดังนั้นการทดลองนี้จึงมุ่งความสนใจไปที่รูปแบบของการเลี้ยงเชื้อแบบครั้งเดียว (batch cultivation) และแบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) โดยใช้ขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2 ลิตร จำนวน 2 ขวด เพื่อเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ด้วยแสง (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) และเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2) มีการเชื่อต่อกันเพื่อให้กรดอินทรีย์สามารถแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรน ขนาด 10 K da

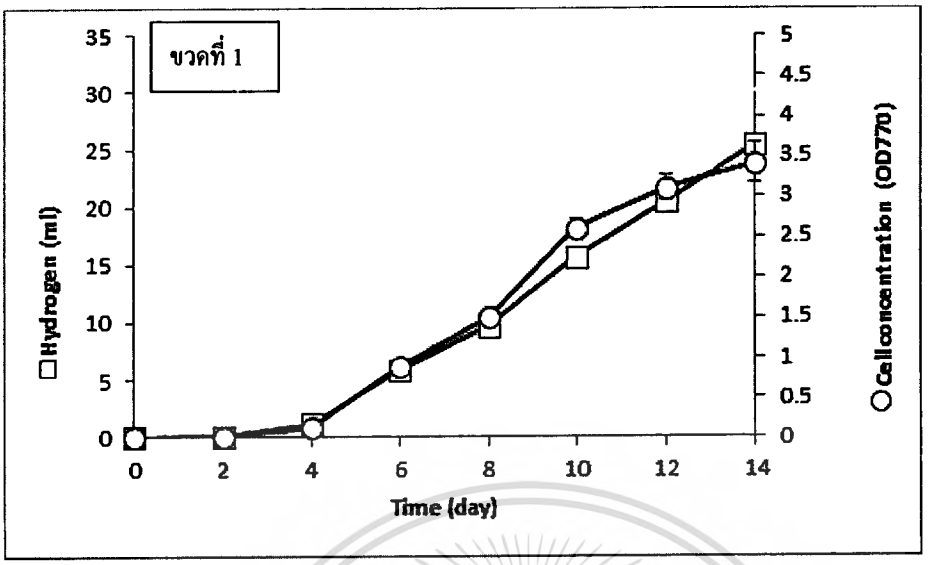
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

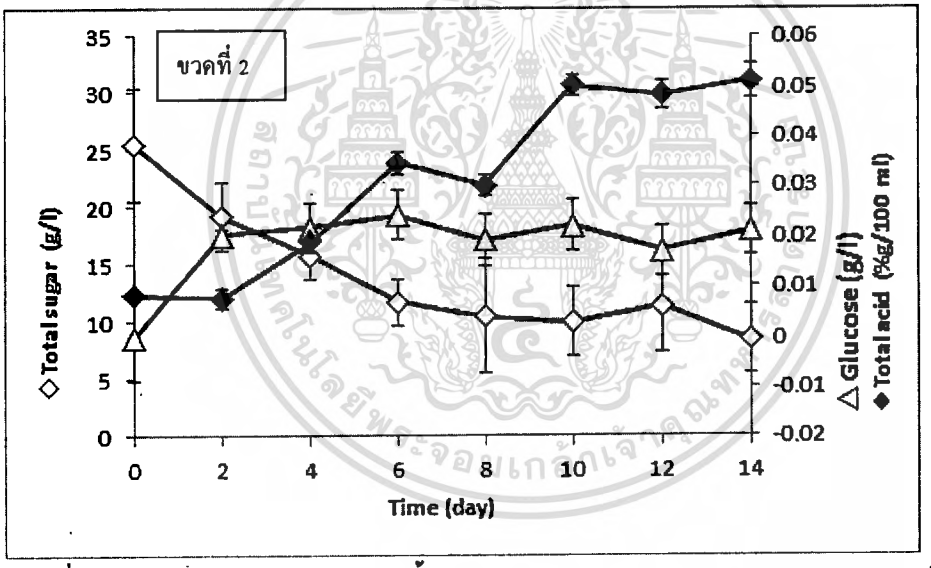
4.5.1 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันแบบแยกส่วนด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อครั้งเดียว (batch cultivation)

วิธีเลี้ยงเชื้อแบบครั้งเดียว (batch cultivation) ในขวดปริมาตร 2 ลิตร โดยขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 บรรจุอาหารเหลว AM medium (ไม่มีแหล่งคาร์บอน) ปริมาตร 1800 มล. หลังจากทำให้ปลอดเชื้อแล้ว จึงนำมาต่อ (มีเยื่อเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้น) กับขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ซึ่งบรรจุน้ำเสียข้าว (ที่เตรียมเป็นเวลา 3 วัน) ปริมาตร 1800 มล. จากนั้นลงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (สัดส่วน 1 ต่อ 1) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 แล้วจึงนำไปบ่มในสภาพไร้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.14 พบการเปลี่ยนแปลงในขวดที่ 1 จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 เริ่มต้นการเจริญตั้งแต่วันที่ 4 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วไปจนถึงวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับการสร้างไฮโดรเจน พบการสร้างเริ่มขึ้นในวันที่ 4 และดำเนินต่อไปจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับขวดที่ 2 บรรจุน้ำเสียข้าว (บ่มมาแล้ว 3 วัน) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงของอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ในวันที่ 8 ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณกรดอินทรีย์ มีความเข้มข้นสูงตั้งแต่วันแรก และเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 10 แล้วจึงคงที่ไปจนจนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ปริมาณกลูโคสพบว่ามีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 แล้วคงไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (ในขวดที่ 1) พบว่าเจริญช้าในช่วงแรก อาจเป็นผลเนื่องมาจากปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ทำให้กรดอินทรีย์ที่แพร่จากขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 มายังขวดที่ 1 มีความเข้มข้นลดลง แต่เมื่อเวลาผ่านไปก็พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ให้การเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว พร้อมกับการสร้างไฮโดรเจนไปด้วยกัน ขณะเดียวกันข้าวที่อยู่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 พบว่ามีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วในช่วงแรก แล้วเริ่มช้าลงในวันที่ 8 ซึ่งพบว่ามีปริมาณข้าวเหลือค่อนข้างมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาตรอาหาร ทำให้กรดอินทรีย์แพร่แผ่นเมมเบรนไปยังขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ดำเนินไปอย่างช้าๆ จึงทำให้มีกรดอินทรีย์สะสมในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายข้าวของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



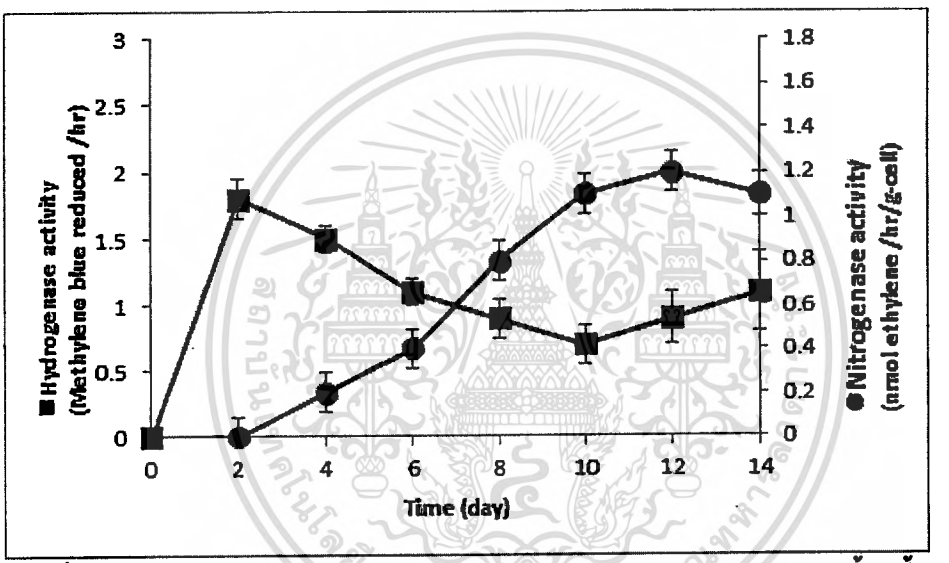


ภาพที่ 4.14 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไร้อากาศในน้ำเสียข้าวอายุ 3 วัน (ขวดที่ 2) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ในภาชนะขนาด 2 ลิตร

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร), □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม Rhodopseudomonas sp. S12 และ OS33 ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ซึ่งใช้วิธีเลี้ยงเชื้อแบบครั้งเดียว (batch cultivation) ไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase และ เอนไซม์ hydrogenase พบว่าในช่วง 0-2 วันแรก มีกิจกรรมของเอนไซม์ hydrogenase เพิ่มสูงขึ้น จากนั้นก็ค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 10 ของการเจริญ แล้วจึงเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase มีค่าน้อยมากในช่วง 0-2 วันแรก จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงลดลงในเวลาต่อมา



ภาพที่ 4.15 กิจกรรมของของเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase ของการเลี้ยงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) แบบครั้งเดียว (batch cultivation) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

■ กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase และ ● กิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะแรกพบกิจกรรมของเอนไซม์ hydrogenase มาก จึงไม่พบการสร้างก๊าซไฮโดรเจน อาจเป็นเพราะกิจกรรมของเซลล์ต้องการใช้พลังงานไปเพื่อการเจริญและการสร้างเซลล์ โดยเฉพาะการเจริญในสภาพที่มีความเข้มข้นของกรดอินทรีย์จำเป็นต้องใช้พลังงานอย่างมาก ในระยะต่อมาพบกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ค่อยๆ ลดลง อาจเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงความต้องการพลังงาน ทำให้เมแทบอลิซึมเปลี่ยนไปจากเดิม เช่นเดียวกับกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase พบว่าในระยะแรกมีค่าต่ำมาก แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ สอดคล้องกับการสร้างก๊าซไฮโดรเจน การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมภายในเซลล์ระหว่างการใช้พลังงานเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน อาจเป็นผลมาจากกิจกรรมโดยรวมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

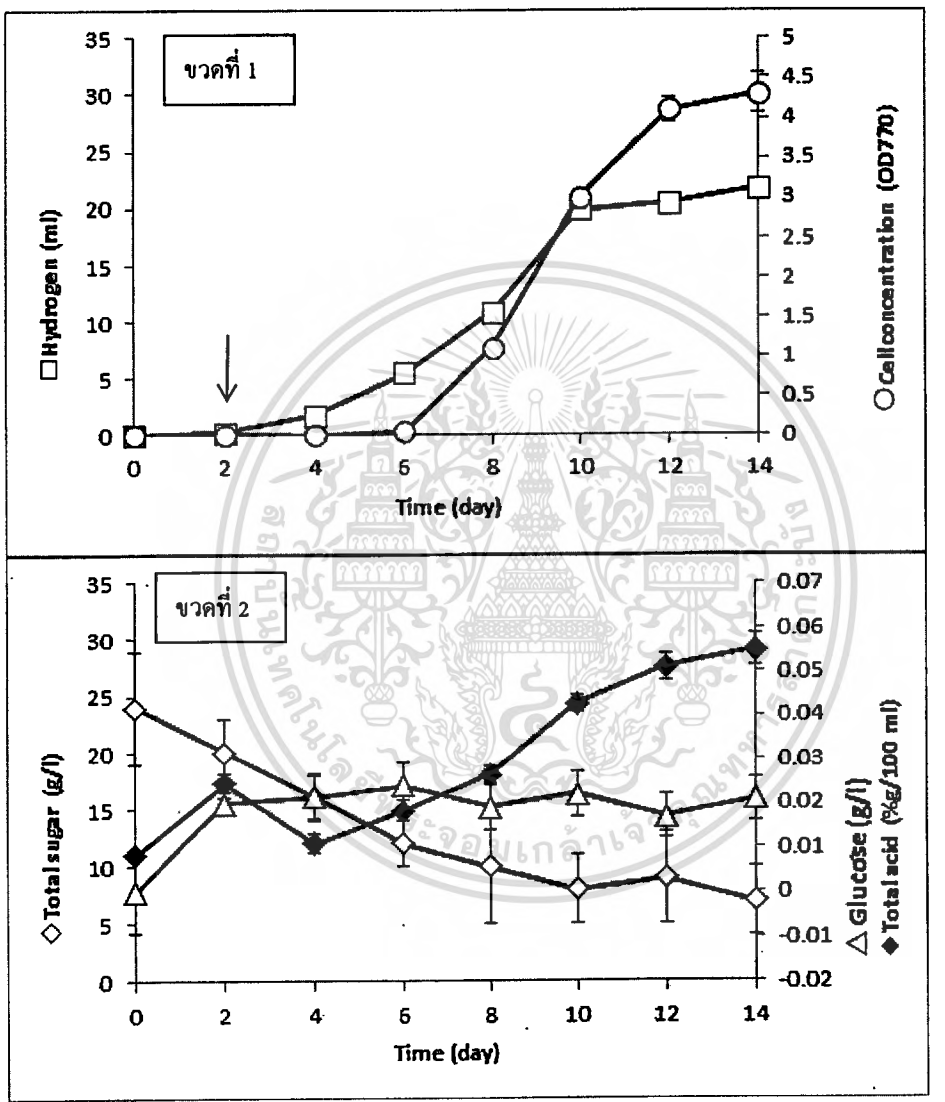
4.5.2 การเลี้ยงเชื้อร่วมกันแบบแยกส่วนด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อป้อนอาหาร (fed-batch cultivation)

วิธีเลี้ยงเชื้อป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ในขวดปริมาตร 2 ลิตร โดยขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 บรรจุอาหารเหลว AM medium (ไม่มีแหล่งคาร์บอน) ปริมาตร 900 มล. หลังจากทำให้ปรอดเชื้อแล้ว จึงนำมาต่อ (มีเยื่อเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้น) กับขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ซึ่งบรรจุน้ำเสียข้าว (ที่เตรียมเป็นเวลา 3 วัน) ปริมาตร 1800 มล. จากนั้นลงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (สัดส่วน 1 ต่อ 1) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 แล้วจึงนำไปบ่มในสภาพไม่ใช้อากาศ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน หลังจากเลี้ยงเชื้อในขวดที่ 1 เป็นเวลา 2 วัน จึงป้อนอาหารเหลว AM medium (ไม่มีแหล่งคาร์บอน) ปริมาตร 900 มล. ลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ด้วยอัตราการไหล 0.5 มล.ต่อนาที (ด้วยเครื่อง peristaltic pump) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.16 พบการเปลี่ยนแปลงในขวดที่ 1 จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 เริ่มต้นการเจริญอย่างช้าๆ ในช่วง 0-6 วันแรก เนื่องจากการป้อนอาหาร ทำให้ความเข้มข้นของเชื้อลดลง แต่เมื่อการป้อนอาหารสิ้นสุดลง ก็พบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 จนกระทั่งได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุดในวันที่ 12 แล้วลดการเจริญช้าลงในวันที่ 14 ขณะที่การสร้างไฮโดรเจนเริ่มต้นในวันที่ 4 และให้การสร้างสูงสุดในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ แล้วคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับขวดที่ 2 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงของอย่างรวดเร็ว และต่อเนื่องไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณกรดอินทรีย์ พบว่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในที่ 2 จากนั้นก็ลดลง แล้วค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ปริมาณกลูโคสพบว่ามีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 แล้วคงไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (ในขวดที่ 1) พบว่าเจริญช้าในช่วง 2 วันแรก เพราะกรดอินทรียน์ที่แพร่มาจากขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 มีปริมาณมาก และมีความเข้มข้นสะสมเพิ่มขึ้น และเมื่อมีการป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ในวันที่ 2 ทำให้เชื้อเจือจางลง เมื่อสิ้นสุดการป้อนอาหาร พบว่าเชื้อเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และให้ความเข้มข้นเซลล์สูงที่สุดในวันที่ 12 ส่วนการสร้างไฮโดรเจนเริ่มต้นในวันที่ 4 และดำเนินต่อไปจนถึงวันที่ 10 หลังจากนั้นการสร้างไฮโดรเจนมีอัตราน้อยลง อาจเป็นเพราะความเข้มข้นเซลล์ที่สูงมาก ส่งผลให้เกิดการบดบังแสง (light shading) ดังนั้นในช่วงวันที่ 10-14 ของการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ จึงไม่พบการสร้างไฮโดรเจน ขณะเดียวกันข้าวที่อยู่ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 พบว่ามีการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว และต่อเนื่องไปจนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ แสดงว่ากรดอินทรีย์ที่สะสมในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 อยู่ในระดับต่ำ จึงไม่ส่งผลยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายข้าวของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ



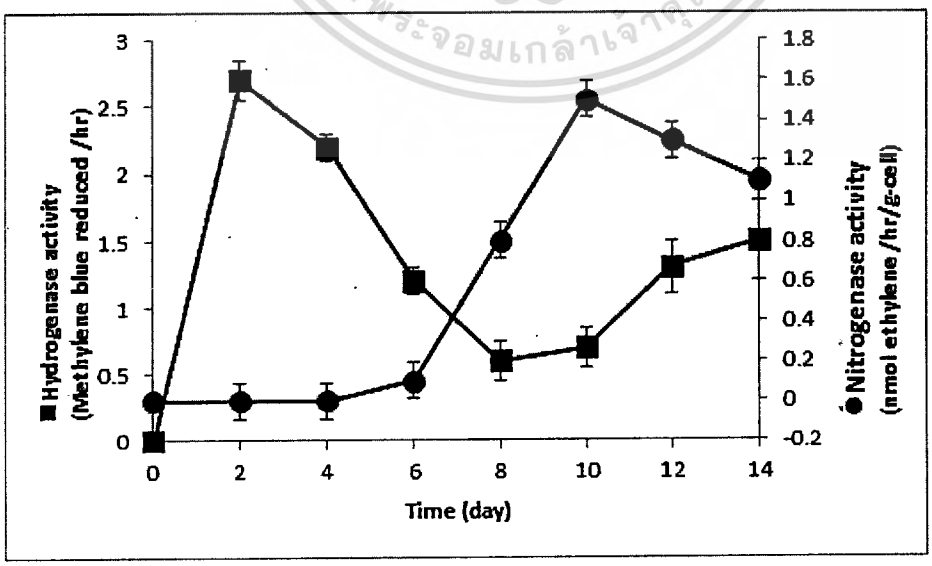
ภาพที่ 4.16 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1) และจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศในน้ำเสียข้าวอายุ 3 วัน (ขวดที่ 2) ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร (ลูกศร หมายถึงเริ่มต้นการป้อนอาหารในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน ในภาชนะขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

○ ความเข้มข้นเซลล์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33, △ กลูโคส (กรัมต่อลิตร), ◇ น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร), □ ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตร) และ ◆ กรดอินทรีย์ (%กรัมต่อ 100 มล.)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ส่งผลดีต่อการเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบครั้งเดียว (batch cultivation) เนื่องจากสามารถลดผลกระทบจากการยับยั้งโดยสับสเตรท (substrate inhibition) จากปริมาณกรดอินทรีย์ที่แพร่ผ่านมาจากขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 นอกจากนี้ยังส่งผลให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศดำเนินไปอย่างดี สามารถย่อยสลายข้าวได้อย่างต่อเนื่อง แต่การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงพบว่ามีความเข้มข้นสูง อาจทำให้เกิดการบดบังกันเอง เพราะขวดเลี้ยงเชื้อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมาก ทำให้แสงไม่สามารถส่องไปยังเซลล์ได้อย่างทั่วถึง จึงต้องคำนึงถึงพื้นที่ผิวการรับแสง และการควบคุมปริมาณเซลล์ให้อยู่ในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

เมื่อนำจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ซึ่งใช้วิธีเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase และ เอนไซม์ hydrogenase พบว่าในช่วง 0-2 วันแรก มีกิจกรรมของเอนไซม์ hydrogenase เพิ่มสูงมาก จากนั้นก็ค่อยๆ ลดลงอย่างรวดเร็ว จนมีค่าต่ำสุดในวันที่ 8 ของการเจริญ จากนั้นจึงค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase มีค่าน้อยมากในช่วง 0-6 วันแรก จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงลดลงอย่างมากในเวลาต่อมาจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.17 กิจกรรมของของเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase ของการเลี้ยงเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 (ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1) แบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน

■ กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase และ ● กิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะแรกพบกิจกรรมของเอนไซม์ hydrogenase สูงมาก เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่แพร่จากขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 เข้ามายังขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 มีปริมาณมาก อาจเป็นเพราะกิจกรรมของเซลล์ต้องการใช้พลังงานไปเพื่อรักษาสมดุลย์ในเซลล์ และเพื่อการเจริญ จึงไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase ทำให้ไม่พบการสร้างก๊าซไฮโดรเจน เมื่อเริ่มการเลี้ยงเชื้อแบบป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) โดยเติมอาหารเข้าสู่ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ทำให้ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ (โดยรวม) ค่อยๆ ลดลง ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ลดลง ซึ่งเพียงพอต่อการนำพลังงานไปใช้สร้างเซลล์ ขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ระยะแรกมีค่าน้อยมากในช่วง 0-6 วันแรก โดยพบว่าเมื่อสิ้นสุดการเติมอาหารลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 ทำให้ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ลดลง จึงพบการสร้างก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกับที่กิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 หลังวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase ลดลงอย่างมาก อาจเป็นผลมาจากการเจริญของเซลล์จนมีความเข้มข้นเซลล์สูง ทำให้ตัวเซลล์บดบังแสง อีกทั้งขวดเลี้ยงเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลางมาก จึงทำให้แสงไม่สามารถส่องผ่านไปยังเซลล์ด้านใน อาจส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase ลดลง ก็เป็นได้ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมภายในเซลล์ระหว่างการใช้พลังงานเพื่อการเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน อาจเป็นผลมาจากกิจกรรมโดยรวมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุป และวิจารณ์

5.1 สรุปผลการทดลอง

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 มาศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV พบว่าจุลินทรีย์กลายพันธุ์ที่คัดแยกได้ มีคุณสมบัติ (การเจริญ และการสร้างก๊าซ) ต่ำกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์พ่อแม่ อาจเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์แบบสุ่ม และกระบวนการคัดแยก ยังไม่จำเพาะเจาะจงต่อจุลินทรีย์กลายพันธุ์ชนิดที่ต้องการ อีกทั้งสภาวะการทดสอบจุลินทรีย์กลายพันธุ์อาศัยสภาวะที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์สายพันธุ์พ่อแม่ หากนำจุลินทรีย์กลายพันธุ์ที่ได้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน อาจผลการทดลองต่างไปจากเดิม จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบต่อไปทั้งในด้านพันธุกรรม และสภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้สายพันธุ์พ่อแม่ คือ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 มาศึกษาการเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน ในสภาวะเจริญร่วมกัน เนื่องจากการทดลองก่อนหน้า (สมชาย และนิสา, 2553) พบว่า *Rhodopseudomonas* sp. S12 เจริญได้ดีในอาหารที่มีกรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน *Rhodopseudomonas* sp. OS33 เจริญได้ดีในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง และข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 มาเจริญร่วมกัน ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่พบการเจริญ เนื่องความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ระดับ 30 กรัมต่อลิตร ส่งผลยับยั้งการเจริญ ซึ่งการทดลองที่ผ่านมาพบว่า *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 เจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อร่วมกันก็ไม่ส่งผลดีต่อการเลี้ยงเชื้อโดยรวม (สมชาย และนิสา, 2553) เมื่อนำมาศึกษาการเจริญร่วมกันในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง และข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน (ตามลำดับ) พบว่าเชื้อผสมสามารถเจริญได้อย่างดี แต่การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน (มีความหนืดสูง) ทำให้เกิดปัญหาเรื่องการผสมผสาน เชื้อกระจายตัวได้ไม่ดี จึงทำให้การเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน ไม่ค่อยดี ขณะที่การใช้ข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถแก้ปัญหาเรื่องความหนืด และทำให้เกิดการผสมผสานที่ดีกว่า ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สามารถเจริญ และสร้างไฮโดรเจน เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามเชื้อผสมทั้ง 2 สายพันธุ์ให้การเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน ค่อนข้างช้า เนื่องจากการย่อยสลายพอลิเมอร์น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ และกิจกรรมการสร้างกรดอินทรีย์ ซึ่งดำเนินไปอย่างช้าๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นมีแนวคิดที่จะนำจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศมาเจริญร่วมกับจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง เพื่อเพิ่มศักยภาพการย่อยสลายพอลิเมอร์น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ให้ดำเนินไปอย่างรวดเร็ว พร้อมทั้งมีการสร้างกรดอินทรีย์สำหรับให้จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงนำไปใช้ในกิจกรรมของเซลล์ต่อไป แต่การเจริญร่วมกันของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง จำเป็นต้องดำเนินไปอย่างเหมาะสม ทั้งในด้านสภาวะการเลี้ยงเชื้อ และประชากรจุลินทรีย์ในระบบ เพื่อให้จุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่ม เจริญอยู่ร่วมกันได้อย่างดี และอยู่บนพื้นฐานการย่อยสลายพอลิเมอร์น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียว แล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจะถูกจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้เพื่อการเจริญ และการสร้างไฮโดรเจน การนำกรดอินทรีย์ไปใช้ ทำให้ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในระบบมีค่าลดลง ส่งผลให้กิจกรรมการย่อยสลายพอลิเมอร์น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ (โดยจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ) ดำเนินต่อไปได้ ทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (Mohan, และคณะ, 2005; Mohan และคณะ, 2009; Mohan, 2010) จากแนวคิดดังกล่าวจึงนำไปสู่การเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์ผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ต้องคำนึงถึงการเจริญของประชากรในระบบทั้งหมด ที่สามารถเพิ่มจำนวนจนมีปริมาณมาก (predominant) ถ้าจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถเจริญเพิ่มจำนวนอย่างมาก (predominant) ก็จะส่งผลเสียต่อระบบ เนื่องจากมีการผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น จนอยู่ในระดับที่ส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่ถ้าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงเจริญเพิ่มจำนวนอย่างมาก (predominant) ก็อาจสร้างสารบางอย่างมายั้งยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (สมชาย และนิสา, 2553) การเจริญในสภาวะสมดุลย์จะพบว่าจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศสามารถเจริญ และย่อยสลายแหล่งคาร์บอน จนได้เป็นกรดอินทรีย์ จากนั้นจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ก็จะนำกรดอินทรีย์ไปใช้เพื่อเพื่อการเจริญ และเป็นแหล่งโปรตอนสำหรับผลิตไฮโดรเจน (Peng และคณะ, 1987; Mohan, 2010) ผลการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (ในน้ำเสียแป้ง และข้าวอายุ 3 วัน ตามลำดับ) และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง (*Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33) แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำเสียแป้ง และข้าว ที่ผ่านการเตรียมเป็นเวลา 3 วัน จะมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศเริ่มต้น และความเข้มข้นกรดอินทรีย์เริ่มต้น ที่ระดับเหมาะสมต่อการเจริญร่วมกันกับจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สามารถนำกรดอินทรีย์ไปใช้เพื่อการเจริญได้ทันที จึงทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ในระบบ มีค่าลดลง ส่งผลให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศย่อยสลายข้าวได้อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าก๊าซที่ผลิตได้จากระบบมีหลายชนิด ได้แก่ แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซม์ และไฮโดรเจน เป็นต้น ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำเสียแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จะเห็นได้ว่าการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง มีค่าต่ำ และสร้างก๊าซได้ลดลง

การเพิ่มศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากการเจริญร่วมกันของเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม จึงอาศัยการเลี้ยงเชื้อแบบ two phase system หรือแยกส่วน เพื่อกำหนดพื้นสำหรับการเจริญ โดยให้ขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 และขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ ซึ่งขวดเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 จะเชื่อมต่อกัน โดยมีเยื่อเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้นแยกระหว่างขวดทั้ง 2 ทำให้กรดอินทรีย์สามารถแพร่จากขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ไปยังขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 เพื่อให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงนำไปใช้เพื่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน จึงได้เพียงไฮโดรเจนเพียงชนิดเดียวในขวดเลี้ยวเชื้อที่ 1 ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อร่วมแบบแยกส่วนด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อครั้งเดียว (batch cultivation) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 250 มล. และ 2000 มล. พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเสียข้าว (เตรียมเป็นเวลา 3 วัน) ให้ผลการเจริญ และการสร้างไฮโดรเจนที่สอดคล้องกัน เนื่องจากการแพร่ของกรดอินทรีย์จากขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 ไปยังขวดเลี้ยงเชื้อที่ 1 เป็นไปอย่างเหมาะสม ทำให้จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง สามารถเจริญสอดรับกันได้อย่างดี และเห็นผลการสร้างไฮโดรเจรเพิ่มมากขึ้นเมื่อนำจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงมาเลี้ยงเชื้อร่วมแบบแยกส่วน ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อป้อนอาหาร (fed-batch cultivation) ในขวดขนาด 2 ลิตร พบว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงให้การเจริญดีขึ้น (เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบครั้งเดียว (batch cultivation)) จนได้ความเข้มข้นเซลล์สูงมาก ซึ่งส่งผลให้เซลล์บดบังแสงซึ่งกันและกัน (light shading) ทำให้การสร้างไฮโดรเจนเป็นไปอย่างจำกัด ขณะที่การเจริญของจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศในขวดเลี้ยงเชื้อที่ 2 สามารถเจริญและย่อยสลายข้าวได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการนำกรดอินทรีย์ไปใช้ (โดยจุลินทรีย์สังเคราะห์) อย่างสม่ำเสมอ การเจริญ และการสร้างไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง เป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ hydrogenase และ nitrogenase เป็นไปอย่างเหมาะสม สอดคล้องกับการทดลองของ Peng และคณะ (1987) โดยพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase มีค่าสูงเนื่องจากมีความต้องการพลังงานไปใช้เพื่อการเจริญ และรักษาสภาพของเซลล์ในสภาวะที่มีกรดอินทรีย์เข้มข้นสูง ซึ่งเอนไซม์ hydrogenase เกี่ยวข้องกับสมดุลย์ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณ H^+ เพื่อใช้ในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอน (electron transport system) สำหรับสร้างพลังงานเพื่อการเจริญ และกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ แต่เมื่อความต้องการพลังงานลดลงก็จะพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase เพิ่มขึ้น เพื่อรักษาสมดุลของ H^+ โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณ H^+ ส่วนเกินไปเป็น H_2 แต่อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจนทำให้เกิดการบดบังแสง ก็อาจส่งต่อสมดุลย์ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ทำให้การสร้างไฮโดรเจนลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จุลินทรีย์กลายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ควรทำไปศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไฮโดรเจน

2. การเลี้ยงเชื้อร่วมแบบแยกส่วน ควรคำนึงถึงการแพร่ของกรดอินทรีย์ไปยังขวดเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ให้เป็นไปอย่างเหมาะสม เช่น ขนาดพื้นที่ผิวของเมมเบรน และปริมาตรการเลี้ยงเชื้อ

3. การศึกษาในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 5 ลิตร พบปัญหาเรื่องการฆ่าเชื้อ ทำให้ปลายท่อบริเวณที่ใช้เชื่อมต่อกัน แตกหัก เนื่องจากขนาดของหม้อฆ่าเชื้อ และการจัดวางขวดขณะฆ่าเชื้อ ดังนั้น การศึกษาการเลี้ยงเชื้อในระดับใหญ่ขึ้นต้องคำนึงถึงอุปกรณ์รอบข้างที่อาจส่งผลกระทบต่อการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธนากร พิศอ่อน. 2554. ปริมาณขยะในประเทศไทย ปี 2549. วันที่ค้นข้อมูล 18 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.idis.ru.ac.th/report/index.php?topic=2.0)

ศูนย์พยากรณ์และสารสนเทศพลังงาน. 2554. สถานการณ์พลังงานปี 2553 และแนวโน้มปี 2554. วันที่ค้นข้อมูล 18 กันยายน 2554. เข้าถึงได้จาก http://www.eppo.go.th/index-T.html

สมชาย ไกรรักษ์ และ นิสา ไกรรักษ์. 2553. การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงด้วยสับสเตรทพอลิแซคคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในน้ำเสีย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A. and Domíguez-Espinosa, R. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. Trends Biotechnol., 22; 477–85.

Benemann, J. 1996. Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. Nat. Biotechnol., 14; 1101–03.

Bisaillon, A., Turcot, J. and Hallenbeck, P.C. 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. Int J Hydrogen Energy 31; 1504–08.

Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology. NewYork: Wiley-Liss Inc.

Cheng, S. and Logan, B.E. 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. Proc. Nat. Acad. Sci., 104; 18875–73.

Ciudad, R., González, C., Bornhardt, C. and Antileo, C. 2007. Modes of operation and pH control as enhancement factors for partial nitrification with oxygen transport limitation. Wat. Res., 41; 4621–29.

Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R. and Stanier, R. Y. 1957. Kinetic studies of pigment by non-purple sulfur bacteria. J. Cell. Comp. Physiol. 49; 25-68.

Colbeau, A., B.C. Kelley and P. Vignais. 1980. Hydrogenase activity in *Rhodopseudomonas capsulate*: relationship with nitrogenase activity. J. Bact. 144; 141-148.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dinopoulou, G., Sterritt, R.M., Lester, J.N. 1988. Anaerobic acidogenesis of a complex wastewater kinetics of growth, inhibition, and product formation. Biotechnol. Bioeng., 31; 969–78.

Ditzig, J., Liu, H. and Logan, B.E. 2007. Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectro-chemically assisted microbial reactor (BEAMR). Int J Hydrogen Energy, 32; 2296–304.

Dixon, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. Archs. Microbiol., 85; 193-201.

Durand, G. and J.M. Navarro. 1978. Immobilized microbial cells. Process Biochem., 13(9); 14.

Fang, H.H.P., Li, C., Zhang, T. 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. Int J Hydrogen Energy, 31; 683–92.

Futai, M. and Tsuchiya, T. 1987. *In* Ion Transport in Prokaryotes. Rosen, B., and Silver, S. (eds), SanDiego: Academic Press, Inc., 3–83.

Gest, H., J.G. Ormerod and K.S. Ormerod. 1962. Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum*: light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle. Archs. Biochem. Biophys., 97; 21-33

Hillmer, P. and H. Gest. 1977. H_2 metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: H_2 production by growing cultures. J. Bact. 129; 724-731.

Khanal, S.K., Chen, W.-H., Li, L. and Sung,S. 2005. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. Int J Hydrogen Energy, 29; 1123–31.

Klein, D.W., Prescott, L.M. and Harley, J. .2005. Microbiology. NewYork: McGraw-Hill.

Kobayashi, M., M. Kobayashi and H. Nakanishi. 1971. Construction of a purification plant for polluted water using photosynthetic bacteria. J. Ferment. Technol., 49; 817-825.

Kobayashi, M. and S. Kurata. 1978. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. Process Biochem. 13; 27 (1978).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kotsopoulos, T.A., Zeng, R.J. and Angelidaki, I. 2006. Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70°C). Biotech. Bioeng. 94; 296–302.

Kraemer, J.T. and Bagley, D.M. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. Biotechnol. Lett., 29; 685–95.

Kumazawa, S. and A. Mitsui. 1982. *In* Handbook of Biosolar Resources, vol. 1, Fundamental Principles. (ed.) A. Mitsui and C.C. Black, Jr. CRC Press, Palm Beach, in press. 672 p.

Lin, C.Y. and Chen, H.P. 2006. Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. Int J Hydrogen Energy, 31; 953–60.

Lin, C.Y. and Lay, C.H. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. Int J Hydrogen Energy, 29; 41–45.

Lin, C.Y. and Lay, C.H. 2004a. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. Int J Hydrogen Energy, 29; 275–81.

Liu, Y., Boone, D.R., Sleat, R. and Mah, R.A. 1985. Methanosarcina mazei LYC-a new methanogenic isolate which produces a disaggregating enzyme. Appl. Environ. Microbiol., 57; 2104–08.

Logan, B.E. 2004. Biologically extracting energy from wastewater: Biohydrogen production and microbial fuel cells. Environ. Sci. Technol., 38; 160A–67A.

Mohan, S.V. 2008. Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: Influence of pretreatment and system operating conditions. J Sci. Ind. Res., 67(11); 950–961.

Mohan, S.V. 2009. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: process evaluation towards optimization. Int J. Hydrogen Energy, 34; 7460–774.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mohan, S.V. 2010. Waste to renewable energy: A sustainable and green approach towards production of biohydrogen by acidogenic fermentation. Sustainable Biotechnology, 2010; 129-164.

Mohan, S.V., Chandrasekhara Rao, N., Prasad, K.K., Muralikrishna, P., Rama Rao, S. and Sarma, P.N. 2005. Anaerobic treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch bio-film reactor: Process optimization and evaluation of factors interaction using the Taguchi dynamic DOE methodology. Biotechnol. Bioeng. 90(6); 732–45.

Mohan, S.V., Lenin Babu, B., Mohanakrishna, G. and Sarma, P.N. 2009. Harnessing of biohydrogen by acidogenic fermentation of *Citrus limetta* peelings: Effect of extraction procedure and pretreatment of biocatalyst. Int J Hydrogen Energy, 34; 6149–56.

Mohan, S.V., Veer Raghuvulu, S., Mohanakrishna, G., Srikanth, S. and Sarma, P.N. 2009. Optimization and evaluation of fermentative hydrogen production and wastewater treatment processes using data enveloping analysis (DEA) and Taguchi design of experimental (DOE) methodology. Int J Hydrogen Energy, 34; 216–26.

Mizuno, O., Li, Y.Y. and Noike, T. 1998. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. Water Res., 32; 1626–34.

Munson, T.O. and R.H. Burris. 1969. Nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum* grown in nitrogen-limited continuous culture. J Bacteriol., 97(3); 1093–1098.

Nath, K., Kumar, A. and Das, D. 2005. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of Enterobacter cloacae strain DM11. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68; 533–41.

Nathanan M., S. Phunpruch and S. Krairak. 2012. Hydrogen production by photosynthetic bacterium strain OS33 using domestic waste as a carbon source. In Proceedings, The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, "Systems Biotechnology: Quality & Success", February 1-2, 2012, The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. 206-210.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Orskav, E.R., Flatt, W.P. and Moe, P.W. 1968. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. J Dairy Sci., 51; 1429–35.

Peng, Y., Stevens, P., de Vos, P. and J. de Ley. 1987. Relation between pH, hydrogenase and nitrogenase activity, NH_4^+ concentration and hydrogen production in cultures of *Rhodobacter sulfidophilus*. Journal of General Microbiology., 133; 1243-1 247.

Rittmann, B.E. 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. Biotechnol. Bioeng., 100(2); 203–12.

Roychowdhury, S., Cox, D., Levandowsky, M. 1988. Production of hydrogen by microbial fermentation. Int J Hydrogen Energy, 13; 407–10.

Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Euverink, G.J.W., Metz, S.J. and Buisman, C.J.N. 2006. Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. Int J Hydrogen Energy, 31; 1632–40.

Saratale, G.D., Chen, S., Lo,Y., Saratale,R.G. and Chang, J. 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feed stockusing dark fermentation-A review. J Sci. Indi. Res., 67; 962–79.

Schara, G.V., Maeda, T. and Wood, T.K. 2008. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. Microbial. Biotechnol., 1(2); 107–25.

Shipman, R.H., L.T. Fan and I.C. Kao. 1977. Single cell protein production by photosynthetic bacteria. Appl. Microbiol., 21; 161-181

Siefert, E. and N. Pfennig. 1979. Chemotrophic growth of *Rhodopseudomonas* species with H2 and chemotrophic utilization of methanol and formate. Arch. Microbiol. 122; 177–182

Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugar. J. Biol. Chem., 160; 61-69

Sparling, R., Risbey, D., Poggi-Varaldo, H.M. 1997. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. Int J Hydrogen Energy, 22; 563–66.

Srikanth, S., Venkata Mohan, S., Prathima Devi, M., Dinikar, P., Sarma, P.N. 2008. Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation usingmixed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

culture: Optimization of process parameters and combined process evaluation. Int J Hydrogen Energy, 34; 7513–22.

Tartakovsky, B., Manuel, M.-F., Wang, H. and Guiot, S.R. 2009. High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous H_2 production. Int J Hydrogen Energy, 34; 672–7.

USDEH. 2007. Fuel Cells and Infrastructure Technologies Program, Multi-Year Research, Development and Demonstration Plan, US Department of Energy.

van Ginkel, S. and Logan, B.E. 2005. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic andbutyric acids. Environ. Sci. Technol., 39; 9351–56.

van Ginkel, S., Sung, S.W. and Lay, J.J. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. Environ. Sci. Technol., 35; 4726–30.

Vignais, P.M., Magnin, J.P. and Willison, J.C. 2006. Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. Int J Hydrogen Energy, 31; 1478–83.

Wall, J.D. and H. Gest. 1979. Derepression of nitrogenase activity in glutamine auxotrophs of *Rhodopseudornonas capsiulata*. J. Bacteriol., 137; 1459-1463.

Wang, B., Wan, W. and Wang, J. 2009. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. Biores. Technol. 100; 1211–13.

Wang, J. and Wan, W. 2008. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. Int J Hydrogen Energy, 11; 15.

Weare, N.M. and K.T. Shanmugam. 1976. Photoproduction of Ammonium Ion from N_2 in *Rhodospirillum rubrum*. Archs. Microbiol., 110; 207-213. .

Yokoyama, H., Ohmori, H., Waki, M., Ogino, A. and Tanaka, Y. 2009. Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora. J Biosci. Bioeng. 107; 64–66.

Zheng, X.J. and Yu, H.Q. 2005. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. J Environ. Manag. 74; 65–70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhu, H., Beland, M. 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested waste watersludge. Int J Hydrogen Energy, 31; 1980–88.

Ztirrer, H. 1982. Hydrogen production by photosynthetic bacteria. Cellular and Molecular Life Sciences, 38(1); 64-66.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AM medium มีองค์ประกอบดังนี้ (สมชาย และ นิสา, 2553 และ Nathanan และคณะ, 2012)

แหล่งคาร์บอน	10	กรัมต่อลิตร
โมโนโซเดียมกลูตาเมต	10	กรัมต่อลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	1	กรัมต่อลิตร

แหล่งคาร์บอนเปลี่ยนแปลงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.8-7.2

2. การเตรียมน้ำเสีย และจุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ

นำแป้งมันสำปะหลังสุก หรือข้าวสุก 60 กรัม ลงในขวดดูแรนขนาด 250 มล. เติมน้ำประปา 200 มล. นำไปเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่ใช้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 3 และ 5 วัน ตามความวัตถุประสงค์การทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์เซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง ในรูปของปริมาณแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) (ดัดแปลงจาก Cohen-Bazire และคณะ, 1957)

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 2 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดไมโครทิวบ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง นำเฉพาะตะกอนเซลล์ไปสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง อะซีโตน และเมทานอล ในอัตราส่วน 7:2 (v/v) ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปสกัดในที่มืด เป็นเวลา 150 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric (Dubois และคณะ, 1956)

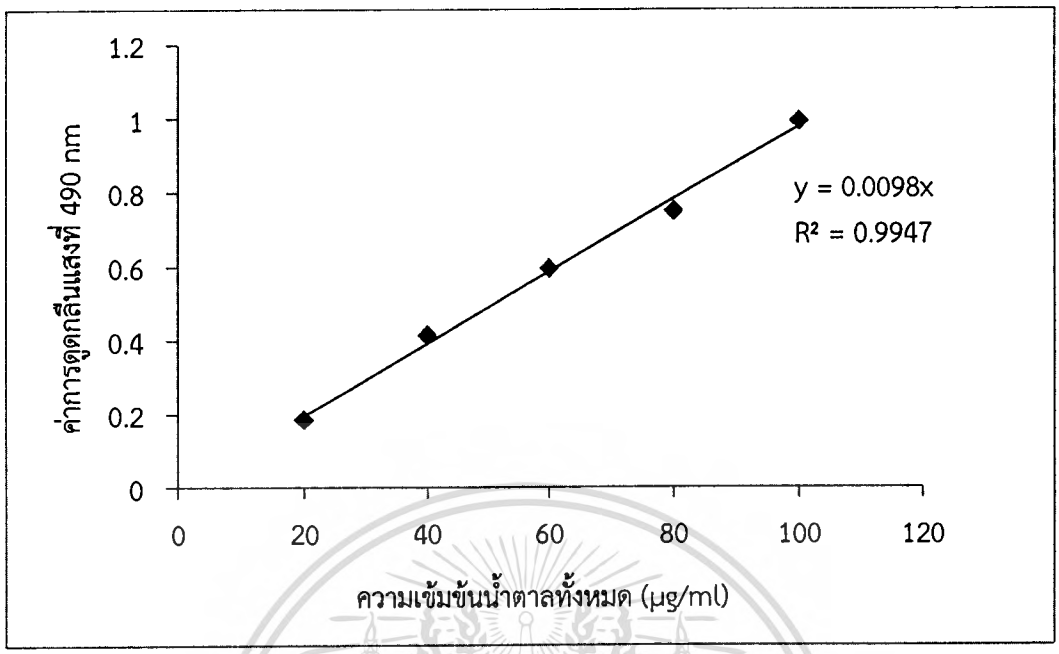
เตรียมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 98

เตรียมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5

ทำการทดลองโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มล. ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1.0 มล. เขย่าให้เข้ากัน และเติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 5.0 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานโดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-Sulfuric

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรท

- เตรียมสารละลาย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

- การหาสารละลายมาตรฐาน (Standardization) ด้วยการไตเตรทกับสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต

- การไตเตรท นำตัวอย่างตามปริมาตร 5 มล. มาเติมฟีนอล์ฟทาลีน (อินดิเคเตอร์) 3 หยด ลงในขวดทั้ง 3 และเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียว จากนั้นจึงค่อยๆ หยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ ผสมกับสารละลาย พร้อมเขย่าให้ผสมกันตลอดเวลา จนกระทั่งสารละลายกลายเป็นสีชมพูในช่วงแรก แต่เมื่อเขย่าเบาๆ สีก็จะหายไปอย่างรวดเร็ว เมื่อใกล้ถึงจุดสมมูล การหายไปของสีจะช้าขึ้นกว่าเดิมในตอนนี้ต้องทำการไตเตรตด้วยความระมัดระวังค่อย ๆ หยดสารละลายทีละหยดหรือเพียงครึ่งหยด จดบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อนำไปคำนวณปริมาณกรดทั้งหมด

$$n_{CH3COOH} = M_{NaOH} \times V_{NaOH}$$

$$M_{CH3COOH} = n_{CH3COOH} \times MW_{CH3COOH}$$

$$\%\ \text{ความเข้มข้นของเนื้อสาร} = \frac{m_{CH3COOH}}{\text{ปริมาณสารตัวอย่าง}} \times 20$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ตามวิธีการ Nelson-Somogyi (Somogyi, 1945)

4.1 สารเคมี

4.1.1 สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ชั่งน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 1.0 กรัม ใส่ในฟลาสก์ปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (สารละลายมาตรฐานกลูโคส) จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 ถึง 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.2 สารละลาย Somogyi แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ส่วน

4.1.2.1 ละลายโปแตสเซียม-โซเดียมทาร์เตรท 12 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม ในน้ำกลั่นต้ม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเติม $NaHCO_3$ 16 กรัม

4.1.2.2 ละลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายในข้อ 4.1.2.2 เติมลงในสารละลาย 4.1.2.1 ปรับปริมาตรให้ครบเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

4.1.3 สารละลาย Nelson แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ส่วน

4.1.3.1 ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

4.1.3.2 ละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 7.1.3.2 เติมลงในสารละลาย 7.1.2.1 ปรับปริมาตรให้ครบเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

4.2 การวิเคราะห์

4.2.1 สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 20 – 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2.2 ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

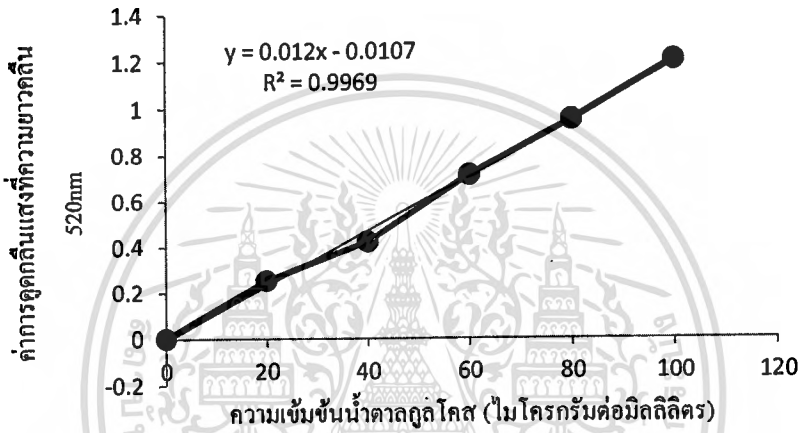
4.2.3 เติมสารละลาย Somogyi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 เติมสารละลาย Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

4.2.5 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นน้ำตาล

4.2.6 สำหรับตัวอย่างที่จะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 7.2.2 – 7.2.5 ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลสูง ก็ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง

5. การวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซที่ได้จากการทดลอง จะไปผ่านสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (CaOH) ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นก๊าซจะไปยังกระบอกตวง ภายในบรรจุของเหลว เพื่อวัดปริมาณก๊าซด้วยการแทนที่น้ำ

6. กิจกรรมเอนไซม์ Hydrogenase (H_2-uptake hydrogenase) วิเคราะห์โดยวิธี methylene blue reduction (ดัดแปลงจาก Peng และคณะ, 1987)

เตรียมสารละลาย Phosphate buffer ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 7.0 (Na_2HPO_3, NaH_2PO_3)

เตรียมสารละลาย methylene blue ความเข้มข้น 0.2 mM ละลายใน 10 mM phosphate buffer ที่ pH 7.0

เครื่อง spectrophotometer (รุ่น UV 1800, Shimadzu)

ก๊าซ argon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มล. นำมาพ่นด้วยก๊าซอาร์กอน แล้วจึงนำมาเจือจางด้วยสารละลาย Phosphate buffer ความเข้มข้น 10 mM (pH 7.0) นำสารละลายเจือจางปริมาตร 1.0 มล. ใส่ในขวดขนาด 9 มล. แล้วนำไปพ่นด้วยก๊าซ H_2 ประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงเติม 4 มล. ของสารละลายสี (0.2 mM methylene blue ใน 10 mM phosphate buffer, pH 7.0) แล้วนำไปบ่มที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงความเข้ม 1500 ลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงจำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (OD570 ที่ 30 นาที) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu รุ่น UV-1800) โดยเทียบกับสารเจือจางเดียวกัน ที่พ่นด้วยก๊าซอาร์กอน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ทันที (OD570 ที่ 0 นาที)

กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase หาได้จากผลต่าง ระหว่าง OD570 ที่ 0 นาที และ 30 นาที (ปริมาณ methylene blue reduction) มีหน่วยเป็น methylene blue reduced ต่อ 30 นาที

7. กิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase โดยวิธี Acetylene reduction assay (ดัดแปลงจาก Peng และคณะ, 1987)

เตรียมสารละลาย 40 mM sodium acetate

ก๊าซ argon

ก๊าซ acetylent

ก๊าซ ethylene

Gas chromatography (รุ่น GC-17A, Shimadzu)

Column porapak N (80-100 mesh) ยาว 2.0 ม.

Carrier gas เป็น nitrogen

Detecter เป็น FID

นำตัวอย่างปริมาตร 0.5 มล. และ 0.5 มล. 40 mM sodium acetate ใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มล. ปิดปากขวดด้วยจุกยางซิลิโคนให้สนิท แล้วพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนจนสารละลายอิ่มตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงความเข้ม 1500 ลักซ์ เมื่อครบ 10 นาที จึงใส่ acetylene 0.9 มล. จากนั้นเขย่าขวดให้ผสมกันอย่างดี นำไปบ่มต่อ โดยเก็บตัวอย่างก๊าซเหนือของเหลว ปริมาตร 1.0 มล. นาทีที่ 0 และนาทีที่ 30 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography (Shimadzu GC-17A) คอลัมชนิด porapak N (80-100 mesh) ยาว 2.0 ม. ก๊าซพา (carrier gas) เป็น nitrogen อัตราการไหล 30 มล.ต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ injector และ FID เป็น 120 องศาเซลเซียส โดยใช้ acetylene และ ethylene เป็นสารมาตรฐาน นำพื้นที่ใต้กราฟไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ethylene

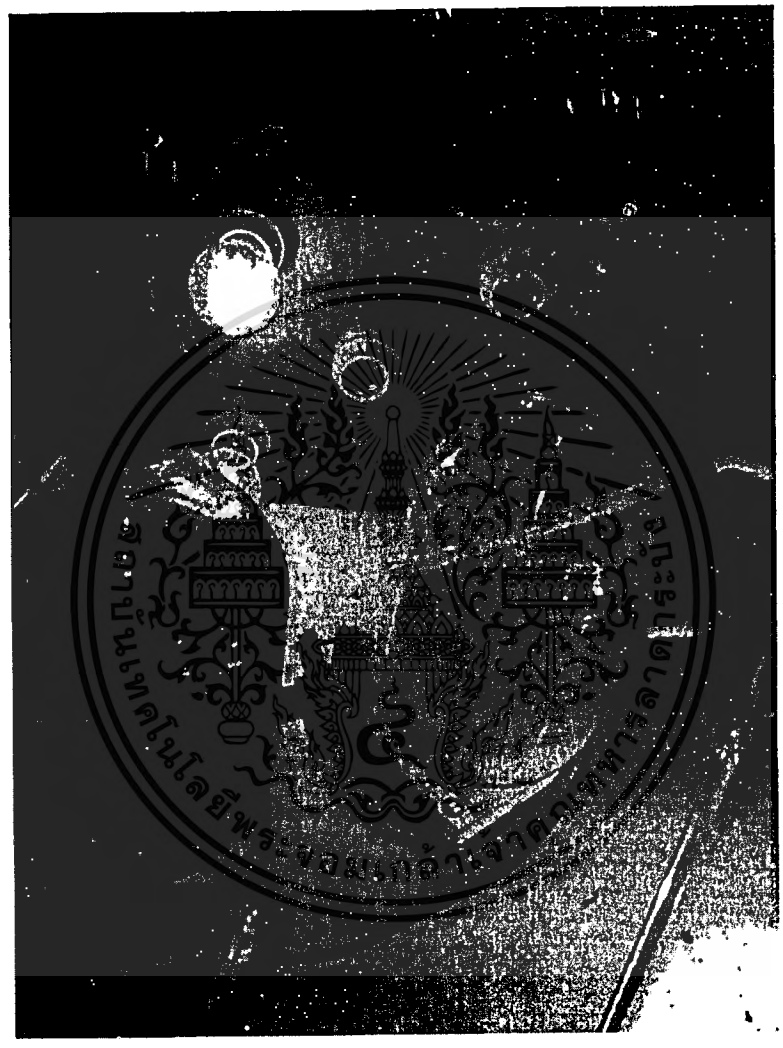
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ ethylene ที่ได้ เป็นผลมาจากการกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase ซึ่งมีหน่วยเป็น ปริมาณ ethylene ที่เกิดขึ้นในเวลา 30 นาที ต่อกรัมเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

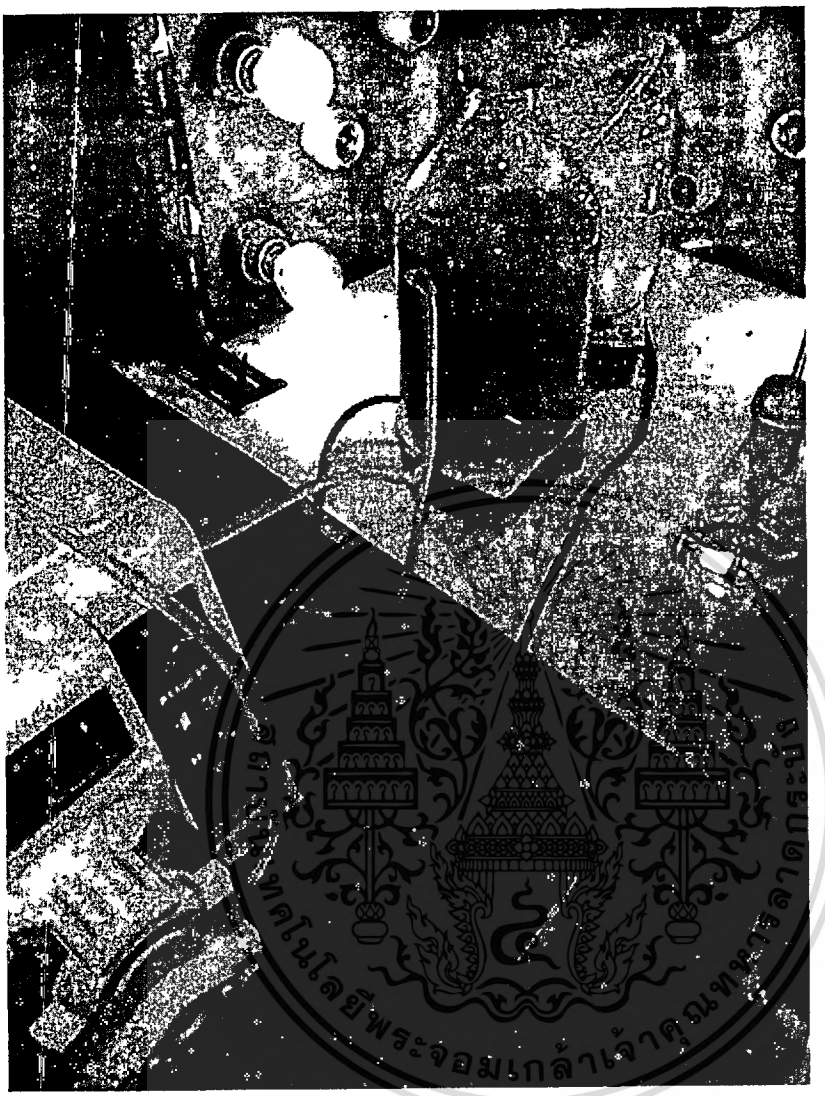
ภาคผนวก ค.

รูปภาพแสดงการทดลอง



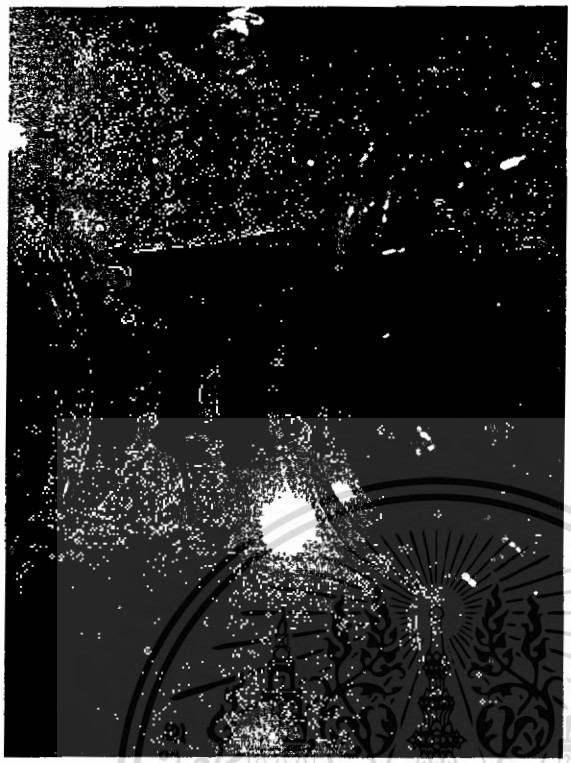
ภาพที่ ค-1 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1 ปริมาตร 2000 มล.) และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงในน้ำเสียข้าว อายุ 3 วัน (ขวดที่ 2 ปริมาตร 2000 มล.) แบบแยกขวด ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อครั้งเดียวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค-2 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อผสม *Rhodopseudomonas* sp. S12 และ OS33 ในอาหารเหลว AM medium (ขวดที่ 1 ปริมาตร 2000 มล.) และจุลินทรีย์สังเคราะห์ด้วยแสงในน้ำเสียข้าวอายุ 3 วัน (ขวดที่ 2 ปริมาตร 2000 มล.) แบบแยกขวด ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อป้อนอาหาร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค-3 แสดงแผ่นเมมเบรนขนาด 10 Kda กั้นระหว่างขวดเลี้ยงเชื้อ 1 และ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้