

การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวโดยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

สำหรับการผลิตไฮโดรเจน

IMMOBILIZATION OF GREEN ALGAL CELLS BY
BACTERIAL CELLULOSE FOR HYDROGEN PRODUCTION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IMMOBILIZATION OF GREEN ALGAL CELLS BY BACTERIAL CELLULOSE FOR HYDROGEN PRODUCTION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวโดยเซลลูโลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

Immobilization of Green Algal Cells by Bacterial Cellulose for Hydrogen Production

ชื่อนักศึกษา นางสาวนันทมน อัครผล รหัสนักศึกษา 58050905
นางสาวพิมพ์พิมล ปักษา รหัสนักศึกษา 58050945
นางสาวลลิตา ชมพล รหัสนักศึกษา 58050964

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกข์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกข์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้รวมเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวโดยเซลล์โลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนัทธมน อัครผล รหัสนักศึกษา 58050905
	นางสาวพิมพ์พิมล ปักษา รหัสนักศึกษา 58050945
	นางสาวลลิตา ชมพล รหัสนักศึกษา 58050964
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกักษ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากการเผาไหม้ไฮโดรเจนให้ค่าความร้อนสูง นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังจัดเป็นพลังงานสะอาด ไม่มีสี ไม่เป็นพิษ ติดไฟได้ง่าย ไม่มีองค์ประกอบของคาร์บอน อันเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์เรือนกระจก ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียว โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองพบว่า ในบรรดาสาหร่ายสีเขียว 4 สายพันธุ์ เซลล์อิสระของ *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด สภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ *Chlorella* sp. LSD-W2 สำหรับการผลิตไฮโดรเจน คือ ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 และสภาวะการขาดไนโตรเจนในอาหาร Tris acetate phosphate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด *Chlorella* sp. LSD-W2 ถูกห่อหุ้มด้วยเส้นใยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย นอกจากนี้ จำนวนของขึ้นเซลล์โลส ปริมาตรก๊าซเหนือของเหลว และขนาดของขวดแก้ว มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 114.542 ± 1.245 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.498 ± 0.060 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตรที่มีขึ้นวุ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียจำนวน 8 ขึ้น และปริมาตรก๊าซเหนือของเหลว 11.7 มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเซลล์อิสระถึง 140 เท่า

คำสำคัญ : การตรึงเซลล์ การผลิตไฮโดรเจน เซลล์โลสจากแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานาน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Immobilization of Green Algal Cells by Bacterial Cellulose for Hydrogen Production		
Students	MissNattamon Akkarapon	Student ID 58050905	
	MissPimpimon Paksa	Student ID 58050945	
	MissLalida Chompol	Student ID 58050964	
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2018		
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch		

Abstract

Nowadays, Hydrogen (H_2) is an interesting alternative energy because H_2 combustion provides high heating value. In addition, H_2 is a clean, colorless, non-toxic, easily flammable, non-carbon compound that does not cause the greenhouse effect. H_2 can be produced by green algae. This study aimed to investigate the cell immobilization of green algae with bacterial cellulose for H_2 production. The result showed that among four strains of green algae, free cells of *Chlorella* sp. LSD-W2 showed the highest H_2 production. The optimization conditions of cell immobilization of *Chlorella* sp. LSD-W2 for H_2 production were the initial cell density with OD_{750} of approximately 0.1 and the nitrogen starvation in Tris acetate phosphate medium. Under scanning electron microscope, *Chlorella* sp. LSD-W2 was found to encompass with bacterial cellulose. In addition, number of immobilized cellulose cubes, volume of headspace and glass vial size influenced H_2 production by *Chlorella* sp. LSD-W2 immobilized with bacterial cellulose. *Chlorella* sp. LSD-W2 immobilized with bacterial cellulose gave the highest H_2 production rate with

$114.542 \pm 1.245 \mu\text{mol } H_2 \text{ gchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and the highest H_2 production yield with 5.498 ± 0.060

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกระใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$\mu\text{molH}_2 \text{ mgchl}^{-1}$ in 20 mL glass vial containing 8 immobilized bacterial cellulose cubes and 11.7 mL of headspace volume. This H_2 production was approximately 140 folds higher than that by free cells.

Keywords : Cell immobilization, H_2 production, Bacterial cellulose, Green algae



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่องการตรึงเซลล์สำหรับยีสี่เชื้อยโดยเซลล์จากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม โครงการพิเศษนี้จะสำเร็จลงไปได้ถ้าหากขาดความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ เป็นอย่างสูง ที่คอยช่วยเหลือ แนะนำวิธีการทำโครงการพิเศษ การค้นคว้าข้อมูล ตลอดจน ดูแล และใส่ใจในการทำเล่มโครงการพิเศษนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการการสอบโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการสอบโครงการพิเศษนี้ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า ให้คำแนะนำ และตรวจสอบเนื้อหาของโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ท่านอื่นๆ ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบวิชาความรู้ คำแนะนำ และทักษะการปฏิบัติงานต่างๆ ตลอดเวลาของการศึกษาในสถาบันนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และพนักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือการทดลอง หัวเชื้อ *Acetobacter xylinum* และสารเคมีต่างๆ จนโครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับโครงการพิเศษนี้ ตลอดจนมอบความรัก ความใส่ใจ ความห่วงใย แก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยหวังว่าโครงการพิเศษเล่มนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุดแก่ผู้ที่สนใจ และศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้

นัทธมน อัครผล

พิมพ์พิมล ปักษา

ลลิตา ชมพล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ก๊าซไฮโดรเจนและคุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน	4
2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพ	5
2.1.2 คุณสมบัติทางเคมีของไฮโดรเจน	5
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	6
2.3 สาหร่ายสีเขียว	6
2.3.1 คุณสมบัติของสาหร่ายสีเขียว	6
2.3.2 การจัดจำแนกของสาหร่ายสีเขียว	7
2.3.3 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในงานวิจัย	7
2.3.3.1 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp.	7
2.3.3.2 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas</i> sp.	9
2.3.3.3 สาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp.	10
2.4 การตรึงเซลล์	11
2.4.1 รูปแบบการตรึงเซลล์	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 ประสิทธิภาพการตรึงเซลล์	13
2.5 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย	13
2.5.1 โครงสร้างของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	14
2.5.2 การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	14
2.5.3 ประโยชน์ของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	15
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	19
3.1 สหรัยที่ใช้ในการทดลอง	19
3.2 เซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	20
3.3 สารเคมี	20
3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสหรัย	20
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Acetobacter xylinum</i>	20
3.3.3 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสหรัย	20
3.3.4 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Acetobacter xylinum</i>	21
3.3.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	21
3.3.6 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	21
3.4 อุปกรณ์	22
3.5 วิธีการทดลอง	23
3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสหรัยสีเขียว	23
3.5.2 วิธีการคัดเลือกชนิดของสหรัยสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระ	23
3.5.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลลูโลสจากแบคทีเรีย <i>Acetobacter xylinum</i>	24
3.5.4 วิธีการตรึงเซลล์สหรัยสีเขียวด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	24
3.5.5 วิธีการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สหรัยเริ่มต้นต่อการตรึงเซลล์	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจนให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.6 วิธีการศึกษาการขาดธาตุอาหารไนโตรเจน และซัลเฟอร์ต่อการตรึงเซลล์ สำหรับสาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน	25
3.5.7 วิธีการศึกษาผลของจำนวนชั้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการผลิต ไฮโดรเจน	25
3.5.8 วิธีการศึกษาผลของปริมาตร Headspace ที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	26
3.5.9 วิธีการศึกษาผลของขนาดภาชนะที่แตกต่างกันโดยส่งผลต่อการผลิต ไฮโดรเจน	26
3.5.10 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	26
3.5.11 วิธีการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	27
3.5.12 วิธีการศึกษาผลของข้อมูลทางสถิติ	28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	29
4.1 ผลการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจาก เซลล์อิสระ	29
4.2 ผลการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย	32
4.2.1 ผลการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการ เลี้ยงร่วม	32
4.2.2 ผลการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการ เลี้ยงแยก	33
4.3 ผลการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นต่อการตรึงเซลล์ด้วย เซลล์โลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน	34
4.4 ผลการศึกษาการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการตรึงเซลล์สาหร่าย สีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน	37
4.5 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียภายใต้กล้อง SEM	40
4.6 ผลการศึกษาจำนวนชั้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	42
4.7 ผลการศึกษาปริมาตร Headspace ภายในภาชนะบรรจุซึ่งส่งผลต่อการผลิต ไฮโดรเจน	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.8 ผลการศึกษาขนาดภาชนะที่แตกต่างกันโดยส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	49
5.1 สรุปผลการวิจัย	49
5.2 ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	52
ภาคผนวก ก	53
ภาคผนวก ข	56



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในโครงการพิเศษ	19
3.2 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]	28
4.1 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดจากเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. 2SinS4, <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2, <i>C. reinhardtii</i> CC-124 และ <i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8546 โดยบ่มสาหร่ายในอาหาร TAP ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น เท่ากับ 0.5	31
4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 จากการใช้วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	32
4.3 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย ในอาหาร TAP	36
4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-S, TAP-N และเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1	39
4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหารและไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย โดยมีจำนวนเซลลูโลสจากแบคทีเรีย จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ขึ้น ขนาด 1x1x0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-N	44
4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหารและไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 5, 7 และ 9 มิลลิลิตร โดยบ่มในอาหาร TAP-N	46
4.7 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหารและไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรียในภาชนะบรรจุที่มีขนาดเท่ากับ 12, 20 และ 120 มิลลิลิตร โดยบ่มในอาหาร TAP-N	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-1 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีค่า OD ₇₅₀ เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ในอาหาร TAP	56
ข-2 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีค่า OD ₇₅₀ เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ในอาหาร TAP-N	57
ข-3 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีค่า OD ₇₅₀ เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ในอาหาร TAP-S	58



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวโดยการใช้แสง	6
2.2 โครงสร้างโมเลกุลของหน่วยเซลล์โลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า (1,4) ในแต่ละหน่วยย่อยและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนในแต่ละสายของเซลล์โลส	14
3.1 เซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ทำการบ่ม 5 วัน	20
4.1 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ จากเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. 2SinS4, <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2, <i>C. reinhardtii</i> CC-124 และ <i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8546 โดยบ่มสาหร่ายในอาหาร TAP ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น เท่ากับ 0.5	30
4.2 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงร่วม	32
4.3 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงแยก	33
4.4 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย และเซลล์อิสระ ในอาหาร TAP	35
4.5 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย ที่มีค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และบ่มในอาหาร TAP, TAP-S, TAP-N และเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP	38
4.6 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ปราศจากเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (A) และกำลังขยาย 20,000 เท่า (B)	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ตรึงด้วยเซลล์สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 โดยบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (C) และกำลังขยาย 20,000 เท่า (D)	41
4.8 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ตรึงด้วยเซลล์สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 โดยบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-N ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (E) และกำลังขยาย 20,000 เท่า (F)	41
4.9 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย โดยมีจำนวนเซลล์โลสจากแบคทีเรีย จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ชั้น ขนาด 1x1x0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหาร TAP-N	43
4.10 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย โดยมีจำนวนเซลล์โลสจากแบคทีเรีย จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ชั้น ขนาด 1x1x0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหาร TAP-N	44
4.11 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 5, 7 และ 9 มิลลิลิตร	46
4.12 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียในภาชนะขนาด 12, 20 และ 120 มิลลิลิตร	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

ในปัจจุบันนี้ โลกกำลังประสบปัญหามลพิษจากใช้เชื้อเพลิงที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงจากน้ำมันทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทรัพยากรถูกทำลาย เกิดภาวะเรือนกระจก ซึ่งเป็นสาเหตุที่นำไปสู่ปัญหาโลกร้อน จากปัญหาดังกล่าว ทำให้มนุษย์หันมาสนใจ และให้ความสำคัญในการลดปริมาณการใช้เชื้อเพลิง โดยการแสวงหาพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งหนึ่งในพลังงานทดแทนที่มีความน่าสนใจในปัจจุบัน คือ พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นพลังงานสะอาด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งการเผาไหม้ของไฮโดรเจนยังให้พลังงานความร้อนสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพลังงานอื่น เช่น เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนรถยนต์หรือใช้ผลิตกระแสไฟฟ้า ฯลฯ นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย ฯลฯ

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างอย่างง่าย จัดอยู่ในไฟลัมคลอโรไฟตา สามารถสร้างอาหารเองได้โดยการสังเคราะห์แสง มีสารสีที่ประกอบไปด้วยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในโครงการพิเศษนี้เป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวเริ่มจากระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) เกิดการออกซิเดชันของน้ำ โมเลกุลของน้ำจะถูกแยกออกได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน ระบบจะดูดซับพลังงานแสงและเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมี โดยจะใช้พลังงานที่ได้รับขับเคลื่อนอิเล็กตรอนผ่านระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) จนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายหรือเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) จากนั้น ส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะทำการรวมอิเล็กตรอนกับโปรตอนที่ได้รับจากระบบแสงสอง จากนั้น จะมีการปลดปล่อยโมเลกุลไฮโดรเจนออกมา (Dubini *et al.*, 2011) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตไฮโดรเจน และเอนไซม์นี้มีความไวต่อออกซิเจน ด้วยเหตุนี้ ผลผลิตไฮโดรเจนจะมีปริมาณส่วนหนึ่งที่ถูกจำกัดเอาไว้ ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสามารถทำได้โดยวิธีการตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรึงเซลล์ (Cell immobilization) เป็นกระบวนการที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ หรือเป็นการกำหนดขอบเขตของเซลล์ให้อยู่ภายในวัสดุตรึง อีกทั้งยังทำให้เซลล์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน (Karel *et al.*, 1985) อย่างไรก็ตาม ในการผลิตไฮโดรเจนโดยการตรึงเซลล์ก็จะมีการใช้วัสดุตรึงหลายชนิด ได้แก่ อะการ์ แคลเซียมอัลจิเนต ฯลฯ แต่ยังไม่มียางานการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงเซลล์ด้วยเซลล์จากแบคทีเรีย ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงได้สนใจเซลล์จากแบคทีเรีย

เซลล์เป็นสารชีวโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย เซลล์มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยสายพอลิเมอร์ขนาดเล็กที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ชนิดเบต้า (1,4) เซลล์จากแบคทีเรียมีสมบัติเฉพาะ คือ มีความบริสุทธิ์สูง มีความสามารถในการอุ้มน้ำ มีความแข็งแรง และทนต่อแรงดึงสูง (Klemm *et al.*, 2006) แบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตเซลล์ คือ *Acetobacter xylinum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างมีทั้งแบบกลมจนถึงแบบแท่ง ต้องการอากาศในการเจริญ โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 25-30 องศาเซลเซียส พืชอยู่ในช่วง 3-7 และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ (บุปผชาติ และคณะ, 2555)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาความสามารถของเซลล์จากแบคทีเรียในการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวสำหรับการผลิตไฮโดรเจน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่ตรึงในเซลล์จากแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว 4 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตไฮโดรเจน โดยคัดเลือกมา 1 ชนิด จากนั้น ทำการศึกษาวิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์จากแบคทีเรีย ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ 2 วิธี คือ วิธีแรกเป็นการเพาะเลี้ยงแบบแยกเป็นการนำเซลล์จากแบคทีเรียมาตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมมีความกว้าง×ยาว×หนา ขนาด 1×1×0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร หลังจากนั้น นำมาใส่ในเซลล์แขวนลอยของสาหร่าย ส่วนวิธีที่สองเป็นการเพาะเลี้ยงแบบรวมเป็นการนำเซลล์แขวนลอยของสาหร่ายมาใส่ในเซลล์จากแบคทีเรียที่กำลังสร้าง จากนั้น ทำการศึกษาวิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์จากแบคทีเรียที่ดีที่สุด แล้วทำการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของเซลล์สาหร่ายที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ศึกษาผลของการขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการ

ผลิตไฮโดรเจน ศึกษาผลของจำนวนชั้นเซลล์โอสจากแบคทีเรีย ปริมาตร Headspace และขนาดของภาชนะต่อการผลิตไฮโดรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่ตรึงด้วยเซลล์โอสจากแบคทีเรียได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ก๊าซไฮโดรเจนและคุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่มีสัญลักษณ์ H มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 ไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมี อะตอมของไฮโดรเจนมีนิวเคลียส ประกอบด้วยโปรตอนที่มีประจุไฟฟ้าบวกหนึ่งหน่วย อิเล็กตรอนที่มีประจุไฟฟ้าลบหนึ่งหน่วยสัมพันธ์กับนิวเคลียส น้ำหนักอะตอมมาตรฐานของไฮโดรเจนเท่ากับ 1.008 ไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบที่เบาที่สุดในตารางธาตุ และเป็นสารที่มีมากที่สุดในจักรวาลโดยคิดเป็นประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของเอกภพ แต่ก็คิดเป็นเพียงประมาณ 0.14 เปอร์เซ็นต์ของเปลือกโลกโดยน้ำหนัก อย่างไรก็ตาม ไฮโดรเจนเกิดขึ้นได้ในปริมาณมาก โดยเป็นส่วนหนึ่งของน้ำในมหาสมุทร แผ่นน้ำแข็ง แม่น้ำ ทะเลสาบ ในบรรยากาศ และเป็นส่วนหนึ่งขององค์ประกอบคาร์บอนจำนวนมาก ไฮโดรเจนยังอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ พืชผัก และ ปิโตรเลียมอีกด้วย แม้ว่าจะมีการกล่าวบ่อยครั้งว่า มีสารประกอบของคาร์บอนที่รู้จักกันดีกว่าธาตุอื่นๆ ความจริงก็คือไฮโดรเจนมีอยู่ในสารประกอบคาร์บอนเกือบทั้งหมด และยังก่อให้เกิดสารประกอบจำนวนมากที่มีองค์ประกอบอื่นๆ (ยกเว้นก๊าซเฉื่อยบางชนิด) เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไป ไฮโดรเจนอะตอมเกิดขึ้นครั้งแรกในช่วงการรวมตัวกันใหม่ (บิกแบง) ที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นสารประกอบโควาเลนต์ที่มีองค์ประกอบที่ไม่ใช่โลหะเป็นส่วนใหญ่ ไฮโดรเจนส่วนใหญ่บนโลกจึงอยู่ในรูปโมเลกุล เช่น น้ำหรือสารประกอบอินทรีย์

ภายใต้สภาวะปกติ ไฮโดรเจนมีการรวมตัวกันเป็นก๊าซโดยประกอบด้วยไฮโดรเจน 2 อะตอมเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส และติดไฟได้ง่าย ก๊าซไฮโดรเจนถูกผลิตขึ้นเป็นครั้งแรกในช่วงต้นศตวรรษที่ 16 โดยปฏิกิริยาระหว่างกรดกับโลหะ ในปี ค.ศ. 1671 โรเบิร์ต บอยล์ (Robert Boyle) ค้นพบและอธิบายปฏิกิริยาระหว่างตะไบเหล็กและกรดเจือจาง ซึ่งส่งผลให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในปี ค.ศ. 2309 เฮนรี คาเวนดิช (Henry Cavendish) เป็นคนแรกที่จำแนกก๊าซไฮโดรเจนโดยการตั้งชื่อก๊าซจากปฏิกิริยาของโลหะและกรดว่า "อากาศที่ติดไฟได้ง่าย" เขาสันนิษฐานว่า "อากาศที่ติดไฟได้ง่าย" ในความเป็นจริงเหมือนกับสารสมมุติเรียกว่า "Phlogiston" มีการค้นพบในปี ค.ศ. 1781 ว่าก๊าซผลิตน้ำได้เมื่อถูกเผาไหม้ ในปี ค.ศ. 1783 อองตวน ลาวัวซีเย (Antoine Lavoisier) ได้ให้ชื่อว่าไฮโดรเจน (จากภาษากรีกว่า "น้ำ" และ "ยีน" หมายถึง "ผู้สร้าง" ความหมายคือ "ผู้สร้างน้ำ") เมื่อเขาและปีแยร์-ซีมง ลาปลัสทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และใช้เฉพาะเพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การทดลองของคาเวนดิชซ้ำอีกครั้ง พบว่ามีการเกิดน้ำขึ้น เมื่อไฮโดรเจนถูกเผาไหม้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของไฮโดรเจนคือ ไฮโดรเจนไม่ได้เป็นเชื้อเพลิงหรือแหล่งพลังงาน แต่เมื่อไฮโดรเจนถูกเผาไหม้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศเพื่อสร้างความร้อน ความร้อนนี้จะถูกใช้เป็นพลังงาน และได้น้ำและไนโตรเจนออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ได้ ดังนั้น ไฮโดรเจนจึงถือเป็นผู้ให้พลังงาน การผลิตเชื้อเพลิงไฮโดรเจนมีหลายวิธี เช่น อิเล็กโทรไลซิส โดยใช้ไฟฟ้า พลังงานน้ำ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม และพลังงานนิวเคลียร์ ในฐานะเชื้อเพลิงนั้น ไฮโดรเจนถูกใช้อย่างปลอดภัยมานานหลายทศวรรษ โดยใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมโลหะ อุตสาหกรรมแก้ว และอุตสาหกรรมเคมี ในอุตสาหกรรมไฮโดรเจนได้รับการยอมรับทั่วโลกและมีการผลิตไฮโดรเจนมากกว่า 50 ล้านตันต่อปี

2.1.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจน

ที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐานไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีพิษ ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ไม่มีสี และติดไฟได้สูง ก๊าซไฮโดรเจนมีสูตรโมเลกุล คือ H_2 ไฮโดรเจนมีจุดหลอมเหลวที่ -259.14 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่ -252.87 องศาเซลเซียส ไฮโดรเจนมีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร ทำให้มีความหนาแน่นน้อยกว่าอากาศ ไฮโดรเจนมีสถานะออกซิเดชันที่แตกต่างกันสองสถานะ (+1, -1) ซึ่งทำให้สามารถทำหน้าที่เป็นทั้งตัวออกซิไดซ์และตัวรีดิวซ์ได้

โมเลกุลของไฮโดรเจนมีอยู่ 2 รูปแบบ แต่ละรูปแบบมีลักษณะการหมุนของนิวเคลียสอะตอมที่ต่างกัน รูปแบบออร์โธไฮโดรเจน (Ortho-hydrogen) นั้นมีการหมุนแบบขนาน ส่วนรูปแบบพาราไฮโดรเจน (Para-hydrogen) มีการหมุนแบบตรงกันข้าม ทำให้คุณสมบัติด้านเทอร์โมไดนามิกส์แตกต่างกัน แต่คุณสมบัติทางเคมีไม่ต่างกัน ที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน ก๊าซไฮโดรเจนประกอบด้วย Ortho-hydrogen 75 เปอร์เซ็นต์ และ Parahydrogen 25 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนอาจอยู่ในรูปแบบอื่นๆ เช่น ก๊าซอัดไฮโดรเจน ไฮโดรเจนเหลว รวมถึงรูปแบบของแข็งและโลหะ

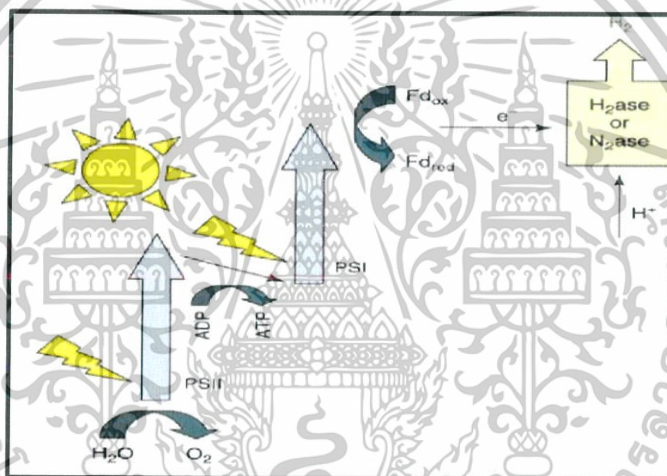
2.1.2 คุณสมบัติทางเคมีของไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจน ไวไฟสูงและจะเผาไหม้ในอากาศในช่วงความเข้มข้นที่กว้างมากระหว่าง 4 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เอนทัลปีของการเผาไหม้สำหรับไฮโดรเจนคือ -286 กิโลจูลต่อโมล ก๊าซไฮโดรเจนสามารถระเบิดได้ในส่วนผสมที่มีคลอรีน ตั้งแต่ 5 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ สารผสมเหล่านี้สามารถระเบิดได้เพื่อตอบสนองต่อประกายไฟ ความร้อน หรือแม้แต่แสงแดด อุณหภูมิไฮโดรเจนอัดในมิติ (อุณหภูมิที่เกิดการเผาไหม้เอง) คือ 500 องศาเซลเซียส การตรวจจับการรั่วไหลของไฮโดรเจนที่เผาไหม้เป็นอันตรายและต้องใช้เครื่องตรวจจับเปลวไฟ เนื่องจากไฮโดรเจนลอยอยู่ในอากาศ ไฮโดรเจนจึงติดไฟอย่างรวดเร็วและสร้างความเสียหายได้น้อยกว่าไฟของไฮโดรคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสามารถนำประโยชน์จากพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้ในการสังเคราะห์แสง สาหร่ายมีศักยภาพในการเพิ่มจำนวนสูงและเพาะเลี้ยงได้เป็นจำนวนมาก และสามารถผลิตก๊าซไบโอไฮโดรเจนที่มีประสิทธิภาพสูง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเริ่มจากระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ที่เกิดการออกซิเดชันของน้ำ โมเลกุลของน้ำจะถูกแยกออกได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน ระบบจะดูดซับพลังงานแสงและเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมี โดยจะใช้พลังงานที่ได้รับขับเคลื่อนอิเล็กตรอนผ่านระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) ไปจนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายหรือเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) จากนั้น เฟอร์รีดอกซินส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะทำการรวมอิเล็กตรอนกับโปรตอนที่ได้รับจากระบบแสงเพื่อผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนออกมา (รูปที่ 2.1) (Dubini *et al.*, 2011)



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวโดยการใช้แสง

(Hallenbeck *et al.*, 2009)

2.3 สาหร่ายสีเขียว

2.3.1 คุณสมบัติของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) มีสปีชีส์ทั้งหมดประมาณ 17,500 สปีชีส์ สาหร่ายสีเขียวส่วนมากมักอาศัยอยู่ในน้ำจืดมากกว่าน้ำเค็ม สาหร่ายสีเขียวทำหน้าที่เป็นผู้ผลิตอาหารและก๊าซออกซิเจนให้แก่ระบบนิเวศ นอกจากนี้ *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นสาหร่ายที่มีโปรตีนสูง จึงนิยมนำมาทำเป็นอาหาร สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะคล้ายพืชทั้งด้านโครงสร้าง ผนังเซลล์และส่วนประกอบของรงควัตถุ คือ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดอยู่

ร่วมกับรากเป็นไลเคนเกือบทุกชนิดมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สาหร่ายสีเขียวใช้แฟลกเจลลัม 2 เส้นในการเคลื่อนที่แบบโบว์ลิ่ง (biflagellate) ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเคลื่อนที่ สาหร่ายสีเขียวสามารถปรับตัวในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ และเชื่อกันว่าพืชมีวิวัฒนาการมาจากสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะสำคัญ ดังนี้

1. ผนังเซลล์เป็นพวกเซลลูโลส อาจมีแคลเซียมและซิลิกาปนอยู่
2. สะสมอาหารในรูปของแป้ง
3. มีคลอโรฟิลล์ทั้งชนิด เอ บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์
4. มีแฟลกเจลลาอยู่ด้านหน้าของเซลล์สาหร่าย
5. อยู่รวมกันหลายเซลล์เป็นโคโลนี
6. เซลล์อยู่รวมกันมีขนาดใหญ่ (Supercell)

2.3.2 การจัดจำแนกของสาหร่ายสีเขียว

เกณฑ์และลักษณะในการจัดจำแนกของสาหร่ายมีดังต่อไปนี้

1. ชนิดของรงควัตถุ โดยรงควัตถุหลักมี 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และ ไฟโคบิลิน (Phycobilin) สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะประกอบด้วย คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์
2. อาหารสะสม สารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต หรือเก็บไว้ในพลาสติดในรูปของแป้ง (Starch) ไขมัน (Fat) หรือน้ำมัน (Oil)
3. การเคลื่อนที่ ดูว่าเซลล์สาหร่ายมีการเคลื่อนที่ได้หรือไม่ ใช้โครงสร้างใดในการเคลื่อนที่สามารถใช้จำนวนตำแหน่งและลักษณะของแฟลกเจลลาในการจัดจำแนก
4. องค์ประกอบของผนังเซลล์ องค์ประกอบของผนังเซลล์ส่วนใหญ่เป็น Cellulose, Xylan, Mannan, Sulphated polysaccharide, Alginic acid, Protein, Silicon dioxide และหินปูน
5. รายละเอียดเฉพาะอย่าง เช่น รูปร่างลักษณะ การจัดเรียงของไทลาคอยด์ในพลาสติด การแบ่งเซลล์ และการแบ่งนิวเคลียส

2.3.3 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในงานวิจัย

2.3.3.1 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

ในปี ค.ศ. 1890 เอ็ม ดับพลิว ไบเจอร์นิค (Martinus Willem Beijerinck) นักจุลชีววิทยาชาวดัตช์ ได้ค้นพบ *Chlorella* เป็นคนแรกและได้ตั้งชื่อว่า *Chlorella* ที่มาจากภาษากรีก คำว่า คลอโรส (Chloros) แปลว่า สีเขียว กับภาษาละตินคำว่า เอลล่า (Ella) แปลว่า เล็ก *Chlorella* ที่พบครั้งแรก คือ *Chlorella* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Division : Chlorophyta

Class : Trebouxiophyceae

Order : Chlorellales

Family : Chlorellaceae

Genus : *Chlorella*

Chlorella sp. มีลักษณะสำคัญ คือ เป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยวขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 1-10 ไมครอน อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ลักษณะของเซลล์มีหลายรูปร่าง เช่น ทรงกลม รูปไข่ และรูปรี เซลล์มีหลายขนาดในสภาพแวดล้อมเดียวกัน *Chlorella* sp. มีคลอโรพลาสต์รูปร่างคล้ายถ้วยหรือระฆัง หรือเป็นแบบแถบข้าง (Parietal) อาจมีหรือไม่มีเม็ดแป้ง ไม่มีรยางค์และคอนแทรคไทล์แวคิวโอล (Contractile vacuole) ผนังเซลล์หนาและแข็ง มี 3 ชั้น ผนังเซลล์ชั้นกลางหนาที่สุดประกอบด้วย เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ซึ่งจะทำให้จับกับโลหะหนักหรือสารพิษในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และชั้นในสุดเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์สาหร่าย *Chlorella* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้าง Autospore ภายในเซลล์ที่เจริญเต็มวัย เซลล์ของ *Chlorella* sp. เติบโตได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารในช่วงกว้าง ในธรรมชาติจึงพบ *Chlorella* sp. ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็มและน้ำเสีย โดยทั่วไป *Chlorella* sp. มีทั้งอยู่อย่างอิสระ และบางชนิดอาศัยอยู่ภายในตัวของสัตว์อื่น เช่น ฟองน้ำ ไฮดรา โปรโตซัว เป็นต้น บางครั้งอาจเรียก *Chlorella* sp. ชนิดนี้ว่า Zoochlorella

การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของ *Chlorella* sp. จะอาศัยคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี แต่มีข้อบกพร่องสำหรับบางสายพันธุ์ซึ่งไม่สามารถจัดหมวดหมู่โดยวิธีนี้ *Chlorella* sp. สามารถจัดจำแนกได้ 25 สายพันธุ์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี *Chlorella* sp. สามารถจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโครงสร้างของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ ลักษณะของคลอโรพลาสต์ การมีหรือไม่มีพรีนีอยด์ จำนวน Autospore ลักษณะการแบ่งเซลล์ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Chlorella*

1. แหล่งอาหาร

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้มีการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ต้องใช้อาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นในปริมาณเพียงพอ โดยทั่วไป ธาตุอาหารหลักของสาหร่าย ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไป แหล่งของคาร์บอนมาจากอากาศ และการใช้แหล่งสารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กลูโคส เป็นต้น จะสามารถเร่งผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายได้ดี ส่วน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ ได้จากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

2. แสง

แสงเป็นปัจจัยภายนอกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญในการเลี้ยงสาหร่าย โดยเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสง ความเข้มของแสงที่เพิ่มขึ้นทำให้การเจริญของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยสาหร่ายจะเพิ่มการสังเคราะห์ด้วยแสงและเร่งการทำงานของเซลล์

3. อุณหภูมิ

สาหร่ายแต่ละชนิดตอบสนองต่ออุณหภูมิได้แตกต่างกันและทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่างกัน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว สาหร่ายจะไม่สามารถปรับตัวได้จะชะงักการเติบโตและการแบ่งเซลล์

4. ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงสาหร่ายมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ทางชีววิทยาของเซลล์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นตัวบ่งบอกการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือ ปริมาณของไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์สาหร่าย

2.3.3.2 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp.

สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* sp. เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีความยาวประมาณ 10 ไมครอน และกว้างประมาณ 3 ไมครอน มีแฟลกเจลลา 2 เส้น ใช้ในการเคลื่อนที่ทางด้านหน้ามีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่ซึ่งกินเนื้อที่ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ และมี eye spot อยู่ที่ขอบด้านหนึ่งของคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ในการช่วยรับแสงและทำให้เซลล์มีการรับรู้ว่าจะต้องเคลื่อนที่ไปยังทิศทางใด โดย *Chlamydomonas* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Division : Chlorophyta

Class : Chlorophyceae

Order : Chlamydomonadales

Family : Chlamydomonadaceae

Genus : *Chlamydomonas*

สาหร่ายชนิดนี้สามารถเลี้ยงได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง สามารถเจริญเติบโตโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว (Photoautotrophic) หรือใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของอะซิเตทในอาหารเลี้ยง โดยมีแสงหรือไม่ต้องมีแสงก็ได้ โดยทั่วไป เซลล์อยู่ในสภาพแฮพลอยด์ ทำให้สามารถศึกษาฟีโนไทป์ได้ง่าย เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ แต่ละเซลล์จะมีรูปแบบการผสมพันธุ์เป็น Mating type + (mt+) หรือ Mating type - (mt-) อย่างใดอย่างหนึ่งตลอดชีวิต ซึ่งจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพื่อติดตามการถ่ายทอดลักษณะในรุ่นลูกได้ วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas* เริ่มจากเซลล์ในสภาพแฮพลอยด์ ซึ่งจะแบ่งเซลล์ไมโทซิสทุกๆ 8 ชั่วโมง ถ้ามีอะซิเตทในอาหารเลี้ยง หรือประมาณ 10-12 ชั่วโมงถ้าไม่มีคาร์บอนจากอาหาร แต่เมื่อสภาวะการเจริญไม่เหมาะสม เช่น เมื่อมีการขาดธาตุไนโตรเจน เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Gametogenesis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนให้เซลล์กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Gamete) โดยแต่ละเซลล์จะมีการสร้าง Mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (Actin) อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้น จะหลั่ง Agglutinin ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีน เพื่อกระตุ้นการจับกันของแฟลกเจลลาระหว่างเซลล์ที่มี Mating type ตรงข้ามกัน โดยเริ่มจากการใช้ปลายของแฟลกเจลลามาแตะกัน จนกระทั่งแฟลกเจลลาของทั้งสองเซลล์สานเข้าด้วยกันทั้งสาย ทำให้เซลล์ทั้งสองเข้ามาอยู่ชิดกันและหลั่งเอนไซม์ Autolysin เพื่อย่อยผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ทั้งสองสามารถรวมตัวกันกลายเป็นเซลล์เดียวที่มีแฟลกเจลลา 4 สาย เมื่อแฟลกเจลลาสลายไป เซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่มีความหนาเป็นพิเศษเพื่อปกป้องไซโกตซึ่งอยู่ในรูปดิพลอยด์ เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม ไซโกตจะแบ่งเซลล์ไมโอซิส เกิดเป็นเซลล์แฮพลอยด์ 4 เซลล์ ซึ่งจะแบ่งเซลล์ไมโทซิสต่อไป

2.3.3.3 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก เซลล์เดี่ยว ที่พบมากในประเทศไทย พบในแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหล เซลล์มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มประมาณ 2-32 เซลล์ มีลักษณะรูปร่างที่หลากหลาย เช่น รูปร่างโค้ง รูปไข่ หรือทรงกระบอก สาหร่าย *Scenedesmus* มีการจัดจำแนกเอกสารดังต่อไปนี้

เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Division : Chlorophyta

Class : Chlorophyceae

Order : Sphaeropleales

Family : Scenedesmaceae

Genus : *Scenedesmus*

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ในปัจจุบันมีทั้งหมด 74 สปีชีส์ นอกจากนี้ยังมีการระบุสกุลย่อยอีกหลายสกุลที่แตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาสาหร่าย *Acutodesmus*, *Desmodesmus* และ *Scenedesmus* มีความคล้ายคลึงกัน โดย *Acutodesmus* มีลักษณะของชีวเซลล์ที่แหลม ในขณะที่ *Desmodesmus* และ *Scenedesmus* มีชีวเซลล์ที่ป้าน *Scenedesmus* เป็นสาหร่ายน้ำจืดชนิดหนึ่งที่พบมากที่สุด อย่างไรก็ตาม ด้วยหลักฐานวิทยาที่หลากหลาย ทำให้สปีชีส์ที่พบมีการระบุยาก ในขณะที่สปีชีส์ส่วนใหญ่พบได้ทั่วโลก บางสปีชีส์มีอยู่เฉพาะในท้องถิ่น เช่น *S. intermedius* และ *S. serratus* ซึ่งพบเฉพาะในประเทศนิวซีแลนด์ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* สามารถอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ถ้าเป็นกลุ่มจะเป็นเซลล์สี่หรือเซลล์แปด

ในการสืบพันธุ์และการรวมกลุ่มเซลล์ เซลล์แม่จะขยาย และเพิ่มจำนวนเป็นหลายนิวเคลียส หลังจากการแบ่งส่วนไซโทพลาสซึมนั้น จะถูกแยกออกเป็นเซลล์ลูกที่มีนิวเคลียสโดยปกติ จะพัฒนาเป็นออโตพอร์ซที่ไม่เคลื่อนที่ เซลล์ลูกเหล่านี้จะเชื่อมโยงกับเซลล์ลูกอื่นเพื่อสร้างกลุ่มเซลล์ภายในผนังเซลล์ของพ่อแม่ที่จะถูกปล่อยออกมาในภายหลัง เซลล์มีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ซึ่งคล้ายกับของ Chlorophyceae อื่นๆ โดยไซโทพลาสซึมของเซลล์ลูกมีความหนาแน่นสูงมาก ในที่สุด ผนังเซลล์ของแม่ก็แตกและปล่อยสปอร์ซึ่งมีรูปร่างลักษณะปกติ เซลล์ที่ปลายทั้งสองของกลุ่มเซลล์นั้นมีความแตกต่างในด้านสัณฐานวิทยาจากตรงกลาง วิธีที่เซลล์ยึดติดกันระหว่างการพัฒนายังไม่ชัดเจน แต่เป็นที่รู้กันว่าปลอก Trilaminar (TLS) ประกอบด้วย Algaenan เป็นหนึ่งในโครงสร้างภายนอกแรกในรูปแบบการพัฒนาก่อนที่จะเชื่อมต่อเป็นชั้นต่อเนื่อง

2.4 การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ คือ การจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งหรือทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้โดยที่เซลล์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน (Karel et al., 1985) เทคนิคการตรึงเซลล์ เป็นเทคนิคที่ถูกคิดค้นขึ้นมาในปี ค.ศ. 1989 โดย Curturan ซึ่งได้ทำการตรึงกับเซลล์ของยีสต์เป็นครั้งแรก (Curturan et al., 1989) และต่อมาได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางชีวภาพมากมาย เช่น

เอกสารใช้ตรึงแอนติบอดี ตรึงเซลล์ของแบคทีเรีย สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 รูปแบบการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีหลายรูปแบบ ดังนี้

1.) การตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ (Adsorption)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมีราคาถูกเนื่องจากจุลินทรีย์อยู่ในสภาพธรรมชาติ ส่วนใหญ่ไม่ได้อยู่ในสภาพอิสระมักจะเจริญอยู่บนผิวของของแข็ง วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยการดูดซับนี้เป็นการนำจุลินทรีย์หรือสปอร์มาตรึงบนผิวของวัสดุตรึงโดยการบรรจุวัสดุตรึงเข้าไปในคอลัมน์แล้วปล่อยให้สารแขวนลอยของเซลล์ไหลผ่าน จนกระทั่งจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารที่ไหลออกมามีค่าคงที่หรืออาจทำได้โดยการผสมสารตรึงเซลล์เข้ากับเซลล์แล้วแยกจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรในของเหลวมีค่าคงที่

2.) การยึดจับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการทำให้เซลล์จับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยจะเกิดพันธะขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีของวัสดุที่ใช้ตรึงกับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งพันธะที่เกิดขึ้นจะเป็นพันธะที่เกิดขึ้นอย่างคงที่และเหมาะสม

3.) การตรึงเซลล์โดยการยึดจับ (Entrapment)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพและการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับด้วยพันธะโควาเลนต์ตรงที่เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความเป็นอิสระจากสารละลาย แต่จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โครงสร้างมีลักษณะเป็นตาข่าย เจล ซึ่งช่องว่างของร่างตาข่ายเจลที่เกิดขึ้นจะถูกควบคุมโดยโครงสร้างของเจลที่ยึดจับกับเซลล์อย่างแน่นหนาเพื่อป้องกันการรั่วหลุดของเซลล์ที่ถูกตรึงและรูที่เกิดขึ้นจะช่วยให้อาหารเคลื่อนที่เข้าออกจากเซลล์ได้อย่างอิสระ ส่วนตัววัสดุที่ใช้ตรึงนั้นสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับสารที่เคลื่อนที่ไปมาระหว่างเซลล์ซึ่งบางทีอาจจะมีผลกระทบอย่างมากต่อค่ากลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ แต่บางทีสภาวะเช่นนี้ก็อาจจะเป็นผลดีต่อเซลล์ที่ถูกตรึง เนื่องจากวัสดุที่ตรึงสามารถที่จะป้องกันสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ สำหรับวิธีการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะมีขั้นตอนและทฤษฎีการตรึงเซลล์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.) การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน (Crosslinking)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้วัสดุตรึงจะเป็นอิสระและจะมีการเชื่อมต่อของเซลล์แต่ละเซลล์กับวัสดุตรึงที่ยึดจับกับเซลล์อีกเซลล์หนึ่งซึ่งจะยึดจับกันเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ในลักษณะที่เป็น การเชื่อมพันธะไขว้กันโดยจะมีโครงสร้างเป็นลักษณะสามมิติเชิงซ้อนและสามารถเชื่อมกันได้ทั้งแบบกายภาพและเคมี โดยทฤษฎี ทางเคมีนั้นจะเป็นการเชื่อมไขว้กันโดยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเซลล์ ซึ่งจะเชื่อมกับสารที่มีหมู่ฟังก์ชันสองตำแหน่งหรือมากกว่า

5.) การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึง (Encapsulation)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้เป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยอาศัยการล้อมรอบเซลล์ จุลินทรีย์ไว้ภายในโครงสร้างตาข่ายของเจล สามารถทำได้โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึงที่มีลักษณะเป็น เยื่อเลือกผ่านคล้ายๆ กับการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับเซลล์กับวัสดุตรึงเซลล์ที่ถูกตรึงจะเป็นอิสระจาก สารละลาย (Entrapment) แต่จะแตกต่างกันตรงที่เซลล์ที่ตรึงโดยวิธีนี้จะไม่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ การที่ เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในลักษณะที่เป็นเมตนั้น จะทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านแผ่น เยื่อเลือกผ่านของวัสดุตรึงได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กนั้น สามารถเคลื่อนที่เข้าออกจากเมตเจลได้ อย่างอิสระ ซึ่งมีการนำวัสดุจำนวนมากมาใช้เพื่อให้เกิดการก่อตัวขึ้นเป็นเมตเจล โดยมีขนาดของเส้นผ่าน ศูนย์กลางตั้งแต่ 10 ถึง 100 ไมโครเมตร สารที่ใช้ ได้แก่ ไนลอน เซลลูโลส ไนเตรท เป็นต้น

2.4.2 ประสิทธิภาพของการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ เป็นการเพิ่มการผลิตผลิตภัณฑ์ของเซลล์ การยืดอายุของเซลล์ให้มีอายุ นานขึ้นส่งผลดีต่อกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์และการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่และยังเป็นการ เพิ่มคุณสมบัติในการดูดซับสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น ค่า ความเป็นกรด - ด่าง ระยะเวลาที่ทำการบ่ม ความเข้มข้นของประจุ และวัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์ เป็นต้น

2.5 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย

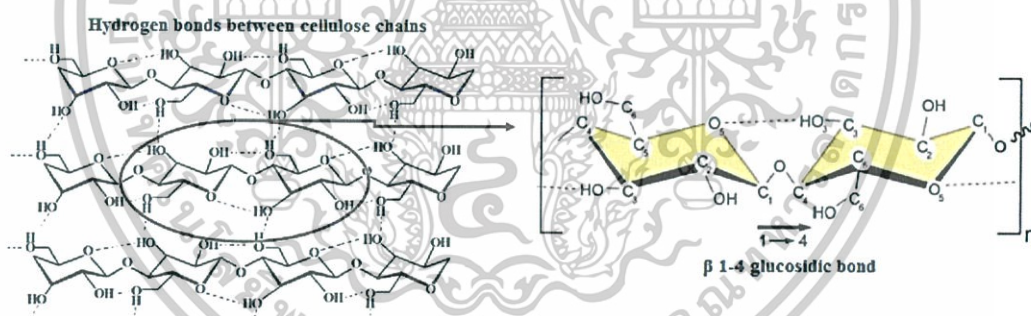
เซลลูโลสจากแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเส้นใยที่เชื่อมต่อกันจนเป็นแผ่นเซลลูโลส โดยเส้นใยที่ผลิต ได้มีความบริสุทธิ์สูง มีคุณสมบัติเฉพาะ คือเส้นใยมีลักษณะใส ทนต่อแรงดึง และมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง เซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักด้วย *Acetobacter* โดยสายพันธุ์ที่นิยมใช้ คือ *Acetobacter xylinum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะรูปร่างมีทั้งแบบแท่งและแบบกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสาย ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 25-30 องศาเซลเซียส และพีเอชอยู่ในช่วง 3-7 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโต และสังเคราะห์เซลลูโลสออกมาภายนอกเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากเซลลูโลสที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย *A. xylinum* ดังกล่าว ทำให้มีสมบัติเฉพาะ คือ มีความบริสุทธิ์สูง แข็งแรง ทนต่อแรงดึงได้สูง มีความสามารถอุ้มน้ำได้ในปริมาณมาก และที่สำคัญ มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับเซลลูโลสจากพืช จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมการผลิตยา เป็นต้น

2.5.1 โครงสร้างของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

เซลลูโลสเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย โครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยสายพอลิเมอร์ขนาดเล็กที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า (1,4) เซลลูโลสมีสูตรโมเลกุล คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ โดยเส้นใยที่ผลิตได้จากแบคทีเรียจะมีขนาดเล็กกว่าเซลลูโลสที่สกัดได้จากพืชถึง 100 เท่า โดยแบคทีเรีย *Acetobacter* จะผลิตเส้นใยเซลลูโลสสองชนิด ชนิดแรก คือ โครงสร้างพอลิเมอร์คล้ายริบบิ้น และชนิดที่สอง คือ โครงสร้างของพอลิเมอร์ที่มีความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ แบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Acetobacter xylinum* สามารถผลิตเส้นใยขนาดเล็กได้จำนวนมากซึ่งจะออกมาจากผนังเซลล์แบคทีเรียแล้วเชื่อมต่อกันเป็นร่างแหโดยรวมตัวกันคล้ายริบบิ้นที่บริเวณผิวหน้า (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของหน่วยเซลลูโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า (1,4) ในแต่ละหน่วยย่อยและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนในแต่ละสายของเซลลูโลส (Poletto *et al.*, 2010)

2.5.2 การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

เส้นใยของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักด้วย *A. xylinum* จะเกิดขึ้นบริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมที่มีเอนไซม์เซลลูโลสซินเทส (Cellulose synthase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยากระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียประกอบด้วยหลายขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับกลไกหลัก 2 ขั้นตอน คือ การสังเคราะห์สารยูริดีนไดฟอสเฟตกลูโคส (Uridinediphosphate-glucose, UDP-Glc) แล้วเข้าสู่ขั้นตอนการเชื่อมต่อสายยาวของกลูแคนชนิดเบต้า (1,4) ที่ไม่มีกิ่งก้านสาขา การสังเคราะห์ UDP-Glc เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มจากการใช้แหล่งคาร์บอนในวัฏจักรเครปส์ เช่น กลีเซอรอล (Glycerol) เฮกโซส (Hexose) ไพรูเวต (Pyruvate) ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (Dihydroxyacetone) และกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) จากนั้นจึงเข้าสู่ปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน (Phosphorylation) เพื่อสังเคราะห์ ATP (Adenosine triphosphate) จาก ADP (Adenosine diphosphate) และหมู่ฟอสเฟต จากนั้นเกิดกระบวนการไอโซเมอไรเซชัน (Isomerization) ผ่านสารตัวกลางทำให้ได้สารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์เซลลูโลส คือ UDP-Glc จุลินทรีย์สายพันธุ์ *A. xylinum* มีประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์เซลลูโลส โดยสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้เป็นสารผลิตภัณฑ์เซลลูโลสได้มากถึงร้อยละ 50 (De Lannino *et al.*, 1998) ในกระบวนการสร้างสายของกลูแคนชนิดเบต้า (1,4) ยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (Glucosyltransferase) ซึ่งอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมี Cyclic dimeric guanosine monophosphate ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์และทำให้เอนไซม์ดังกล่าวทำงานได้เป็นปกติ การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสทำได้โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (Phosphodiesterase, PDE) ชนิด เอ และ บี (PDE A, PDE B)

2.5.3 ประโยชน์ของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ในปัจจุบันเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างหลากหลาย เนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการแพทย์ และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ เซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นวัสดุที่ช่วยให้สามารถขึ้นรูปได้หลายวิธีจึงสามารถรองรับการใช้งานที่แตกต่างกันได้

ในอุตสาหกรรมอาหารการใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียที่เก่าแก่ที่สุดและเป็นที่รู้จักกันดีคือ วัตถุดิบของ nata de coco หรือวุ้นมะพร้าว ซึ่งเป็นขนมหวานแบบดั้งเดิมของฟิลิปปินส์ เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังถูกใช้เป็นตัวเพิ่มความข้นเพื่อรักษาความหนืดในอาหาร และเป็นสารที่ทำให้เกิดการขึ้นรูป เนื่องจากมีเนื้อสัมผัสและเส้นใย จึงถูกเพิ่มเข้าไปในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดว่าเป็นใยอาหาร ตัวอย่าง คือ Cellulon ซึ่งเป็นสารเพิ่มปริมาณที่ใช้เป็นส่วนผสมอาหารเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวทำให้ข้นขึ้นเพิ่มเนื้อ และลดแคลอรี เซลลูโลสจากจุลินทรีย์ยังถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในเครื่องดื่มลดน้ำหนักในญี่ปุ่นตั้งแต่ปีค.ศ. 1992 โดยเฉพาะ Kombucha หรือเครื่องดื่มชาหมัก

เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังมีการใช้งานที่กว้างขวางในอุตสาหกรรมการค้าในการผลิตกระดาษ เซลลูโลสถูกใช้เป็นกระดาษที่มีความแข็งแรงเป็นพิเศษและเป็นเครือข่ายใยแก้วนำแสงที่มีการเคลือบ การมัด การทำให้หนา และระบุลักษณะเฉพาะ เนื่องจากความเร็วเสียงสูงและการสูญเสีย

พลังงานต่ำ จึงใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นแผ่นอคูสติกหรือฟิลเตอร์ในลำโพงและหูฟัง เซลลูโลสจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียยังใช้เป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกจากนี้ ยังมีการทดสอบในอุตสาหกรรมสิ่งทอโดยมีความเป็นไปได้ในการผลิตเสื้อผ้าจากเส้นใยเซลลูโลส

เซลลูโลสจากแบคทีเรียสามารถนำมาใช้ในการทางการแพทย์ เซลลูโลสจากแบคทีเรียได้รับการทดสอบและประยุกต์ใช้อย่างประสบความสำเร็จในการใช้ตกแต่งแผล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกรณีที่แผลถูกเผาไหม้ มีรายงานว่าแผลไหม้ที่ได้รับการเคลือบด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย หายเร็วกว่าการรักษาแบบดั้งเดิมและมีแผลเป็นน้อยกว่า การใช้งานเฉพาะที่ของเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากเนื่องจากเซลลูโลสมีความสามารถในการอุ้มน้ำ และมีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำสูง ความสามารถในการอุ้มน้ำสูง ทำให้บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บมีความชื้นซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการรักษา นอกจากนี้เซลลูโลสจากแบคทีเรียก็ยังสามารถขึ้นรูปผิวได้ดี ซึ่งจะช่วยให้การปกปิดแผลเกิดขึ้นได้ แม้ในบริเวณที่ยากต่อการทำแผล เช่น บริเวณใบหน้า เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จอย่างมากในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย เช่น Biofill และ XCell ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ใช้รักษาบาดแผลจากแผลเกี่ยวกับเส้นเลือดดำ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่าการทำแผลด้วยผ้าโปร่งแบบดั้งเดิมที่มีไบโอพอลิเมอร์เซลลูโลสจากแบคทีเรียจะเพิ่มคุณสมบัติของผ้าโปร่ง นอกเหนือจากการเพิ่มเวลาในการแห้งของแผลและความสามารถในการอุ้มน้ำแล้ว ยาที่เป็นน้ำก็สามารถดูดซึมผ่านตาข่ายที่เคลือบด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรียได้อีกด้วย

เซลลูโลสจากแบคทีเรียยังถูกใช้สำหรับการรักษาภายใน เช่น การปลูกถ่ายอวัยวะ กระดูกและวิศวกรรมเนื้อเยื่ออื่นๆ และการฟื้นฟู ความสามารถหลักของเซลลูโลสจากแบคทีเรียสำหรับการใช้งานทางการแพทย์ คือ สามารถขึ้นรูปเป็นรูปร่างต่างๆ ได้อย่างง่ายดาย และยังคงคุณสมบัติที่มีประโยชน์ทั้งหมดไว้ การนำเซลลูโลสลงในท่อกลางยาวสามารถใช้เป็นโครงสร้างทดแทนในหลายบริเวณแตกต่างกันไป เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ หรือ หลอดลม การประยุกต์ใช้ล่าสุดของเซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นเหมือนเส้นเลือดและหลอดเลือดสังเคราะห์ เซลลูโลสสามารถถูกจำลองเป็นเนื้อเยื่อตาข่ายที่สามารถใช้สำหรับโครงสร้างการทดแทนภายใน เช่น เยื่อหุ้มสมองชั้นนอก นอกเหนือจากการทดแทนโครงสร้างเหล่านี้ยังถูกใช้เป็นกราฟต์เพื่อโต้ตอบกับวัสดุชีวภาพภายในที่มีอยู่ เซลลูโลสจากแบคทีเรียสามารถนำมาใช้ในการผ่าตัดและรักษารากฟันเทียม โดยช่วยการฟื้นตัวของเนื้อเยื่อปริทันต์ด้วยการแยกเซลล์เยื่อบุผิวในช่องปากและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือกออกจากพื้นผิวรากที่ได้รับการรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิจิตรา ใหม่จันทร์ และคณะ (2555) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* TISTR 086 โดยใช้ผลผลิตทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเซลลูโลสที่ได้จากการหมักด้วย *A. xylinum* เป็นพอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ ปราศจากเพคติน ลิกนิน และ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสประมาณ 2,000-18,000 หน่วย มีค่า Crystallinity และ Degree of polymerization สูง ค่า Water holding capacity อยู่ในช่วงระหว่าง 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง สมบัติของเซลลูโลสจากแบคทีเรียในด้านต่างๆ เหล่านี้ จึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเซลลูโลสที่ได้จากพืช และจากการทดลองหาปริมาณความชื้นของวุ้นที่ได้จากการหมักด้วย *A. xylinum* โดยนำวุ้นไปอบแห้งที่ระดับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้น นำไปชั่งน้ำหนักก่อนจะนำไปคำนวณหาปริมาณความชื้น ซึ่งพบว่าวุ้นมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก

Cherdsak Maneeruttanarungroj (2011) ศึกษาการคัดกรองสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนและการปรับภาวะให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะการขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่างกัน การขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลนี้ต่างจากการขาดแหล่งไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนในอัตราเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

Vejeysri Vello และคณะ (2018) ศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* และ *Parachlorella* พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* และ *Parachlorella* มีการสังเคราะห์แสง ผลิตผลาญธาตุอาหาร และการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ในระยะการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าสั้นที่สุดและผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อสาหร่ายมีอายุ 24 ชั่วโมง ระหว่างในช่วงเอ็กซ์โปเนนเชียลไปจนถึงช่วงต้นและช่วงปลายของ Stationary

Hans Gaffron และคณะ (1939) ศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* เพื่อตรวจหาก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน รวมไปถึงการสังเกตโมเลกุลของไฮโดรเจนร่วมกับการลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มีด พบว่าเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนจะมีการสร้างไฮโดรเจนขึ้นและพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ในที่มีแสงจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงไฮโดรเจนที่สูงในระยะเวลาสั้นไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากสาหร่ายขนาดเล็กได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic) โดยพวกโฟโตออโตโทรฟิกเป็นสาหร่ายที่สามารถสร้างอาหารเองได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ไสยาโนแบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายสีน้ำตาล สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดง เป็นต้น

Nadia Halib และคณะ (2012) ศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย พบว่าโครงสร้างเส้นใยของเซลลูโลสมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูง และเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 10-1,000 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ โดยมีความหนาประมาณ 3 - 4 นาโนเมตร กว้างประมาณ 60-80 นาโนเมตร และยาวประมาณ 180 - 960 นาโนเมตร สามารถทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ ได้ดี เส้นใยมีลักษณะใส ไม่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ เมทานอล และอะซิโตน แต่ละลายได้ในคิวปริเอทิลีนไดอะมีนซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสพองตัวโดยทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

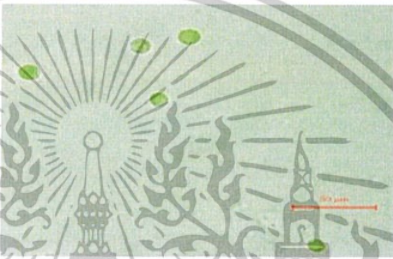
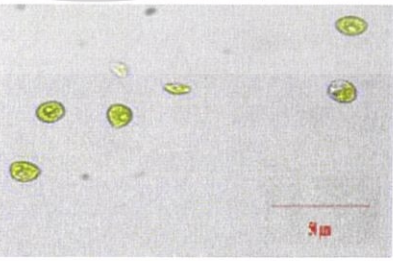
บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในโครงการพิเศษ แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชนิดและแหล่งที่มาของสาหร่ายสีเขียว

ชนิดสาหร่ายสีเขียว	รูปภาพ	แหล่งที่มา
สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. สายพันธุ์ 2SinS4 กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า		น้ำนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. สายพันธุ์ LSD-W2 กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า		น้ำนาข้าว หาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี
สาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> สายพันธุ์ CC-124 กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า		<i>Chlamydomonas</i> Resource
สาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp. สายพันธุ์ TISTR 8546 กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า		แหล่งน้ำธรรมชาติ ในเขตลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เซลลูโลสจากแบคทีเรีย ผลิตจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 เซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ทำการบ่ม 5 วัน

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสีเขียว

อาหารสูตร Tris Acetate Phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก.)
(Harris *et al.*, 2001)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum*

อาหารสูตร Hestrin & Schramm (HS) (ภาคผนวก ก.)
(Bae and Shoda, 2005)

3.3.3 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

- 1) กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 2) กลาสีลอะซีติกแอซิด ($C_2H_4O_2$) (EDM Millipore, Germany)
- 3) แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 4) คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 5) โคบอลต์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka Chemical Corp., USA)
- 6) ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka Chemical Corp., USA)
- 7) โซเดียมโมลิบเดตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 8) ไดโทเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และข้อมูลทั้งหมดเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 9) ทริสเบส (Tris-base) (Vivantis Ltd., UK)
- 10) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 11) เพอร์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 12) แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 13) แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 14) อะการ์ (Agar) (BD DifcoTM Agar, USA)
- 15) เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (BDH Prolabo Chemicals, UK)
- 16) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.3.4 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum*

- 1) กลูโคส ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 2) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3) แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 4) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) (BD DifcoTM Agar, USA)
- 5) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

3.3.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- 1) เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade) (Scharlau, Spain)
- 2) อะซีโตน (CH_3COCH_3) (Analytical grade) (Fisher Scientific, UK)

3.3.6 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

- 1) ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ไนอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Praxair, Thailand)
- 2) ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Thonburiwattana Ltd., Thailand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อุปกรณ์

- 1) กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
- 2) ขวดแก้วดูแรน (Duran) ขนาด 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตรและ 1000 มิลลิลิตร
- 3) ขวดแก้วเล็ก (Vial) ขนาด 12 มิลลิลิตรและ 20 มิลลิลิตร
- 4) เชื่อมติดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)
- 5) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))
- 6) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 7) เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 8) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV 50, Japan)
- 9) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 10) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)
- 11) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc, Genies2, USA)
- 12) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 13) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
- 14) คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)
- 15) ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) (Labnet, USA)
- 16) จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)
- 17) ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 18) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 19) ฟลาสก์แก้วขนาด 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตรและ 1000 มิลลิลิตร
- 20) หลอดเข็นทรีฟิวจ (Centrifuge Tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 21) หลอดไมโครเข็นทรีฟิวจ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2, *C. reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เริ่มจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวลงในอาหารแข็ง TAP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวของสาหร่ายจากอาหารแข็ง TAP ที่เลี้ยงไว้มากระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์เริ่มต้นโดยการนำเซลล์สาหร่ายแขวนลอยจากฟลาสก์ ใส่ลงในหลอดเซ็นทริฟิวจ์ นำมาปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ในอาหารเหลว TAP 2 ครั้งและกระจายเซลล์สาหร่ายลงในอาหารเหลว TAP นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Vortex) จากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้น นำฟลาสก์ไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.5.2 วิธีการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระ

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2, *C. reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 ที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 72 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแล้วปิดฝาให้แน่น จากนั้นนำไปพ่นด้วยก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง จากนั้น นำมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เข็มฉีดก๊าซชุดอากาศจากบริเวณเหนือของเหลว (Headspace) ในขวดฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)] บันทึกค่าที่ได้ และนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณหาปริมาณไฮโดรเจน ทำการคัดเลือกเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป

3.5.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์จากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเซลล์จากแบคทีเรีย ทำได้โดยเปิดหัวเชื้อ *A. xylinum* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารสูตร Hestrin & Schramm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ในระหว่างที่บ่มนั้นห้ามทำการเคลื่อนย้ายฟลาสก์)

3.5.4 วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์จากแบคทีเรีย

1) วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์จากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงร่วม

ดูดเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 72 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นเซลล์จากแบคทีเรียที่ทำการบ่มมาแล้ว 5 วัน จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงและนำขึ้นเซลล์จากแบคทีเรียไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

2) วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์จากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงแยก

นำเซลล์จากแบคทีเรียที่ทำการบ่มมาแล้ว 5 วัน มาตัดให้มีขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 1×1×0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำขึ้นเซลล์จากแบคทีเรียที่ได้จากการตัดมาใส่ลงในขวดแก้วดูแรนที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำขึ้นเซลล์จากแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียว นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่มีความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที แล้วนำขึ้นเซลล์จากแบคทีเรียไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ทำการคัดเลือกวิธีการตรึงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป

3.5.5 วิธีการศึกษาผลของค่าความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นต่อการตรึงเซลล์ด้วยเซลล์จากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้น เท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มาตรึงเซลล์สาหร่ายโดยวิธีการเลี้ยงแยก โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำเซลล์ตรึงมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอาหาร TAP 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ตรึงจำนวน 5 ขึ้น ใส่ในขวดที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

นำไปปั่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิโดยมีความเร็วในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากนั้น บันทึกค่าที่ได้ และนำไปคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจน ทำการคัดเลือกค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สำหรับเริ่มต้นที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป

3.5.6 วิธีการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการตรึงเซลล์

สำหรับสี่เหลี่ยมด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์แขวนลอยสำหรับสี่เหลี่ยมที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 72 ชั่วโมง ใช้มาตรึงเซลล์สำหรับโดยวิธีการเลี้ยงแยก นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำเซลล์ตรึงมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, อาหาร TAP, อาหาร TAP ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) อย่างละ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ตรึงจำนวน 5 ขึ้น ใส่ในขวดที่มีอาหารแต่ละชนิด ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาวะเดิม เป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากนั้น บันทึกค่าที่ได้ และนำไปคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจน ทำการคัดเลือกการขาดธาตุอาหารต่อเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป หลังจากนั้นนำขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียในอาหารเหลว TAP, TAP-N และเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ปราศจากเซลล์สำหรับ มาอย่างละ 1 ขึ้น นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5.7 วิธีการศึกษาผลของจำนวนขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์แขวนลอยสำหรับสี่เหลี่ยมที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 5 วัน มาทำการตรึงเซลล์สำหรับโดยวิธีการเลี้ยงแยก นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำเซลล์ตรึงมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอาหาร TAP ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ตรึงจำนวน 1, 3, 5 และ 7 ขึ้น ใส่ในขวดที่มีอาหาร TAP-N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาวะเดิม เป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้น บันทึกค่าที่ได้ และนำไปคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจน ทำการคัดเลือกจำนวนขึ้นของเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป

3.5.8 วิธีการศึกษาผลของปริมาตร Headspace ต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 5 วัน มาทำการตรึงเซลล์สาหร่ายโดยวิธีการเลี้ยงแยก นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำเซลล์ตรึงมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอาหาร TAP-N 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ตรึงจำนวน 5 ขึ้น ใส่ในขวดที่มีอาหาร TAP-N ปริมาตร 3, 5 และ 7 มิลลิลิตร นำไปปั่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ภายใต้สภาวะเดิม เป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากนั้น บันทึกค่าที่ได้ และนำไปคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจน ทำการคัดเลือกปริมาตร Headspace ที่เหมาะสมต่อเซลล์ตรึงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาการตรึงเซลล์ต่อไป

3.5.9 วิธีการศึกษาผลของขนาดภาชนะที่แตกต่างกันต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 5 วัน มาทำการตรึงเซลล์สาหร่ายโดยวิธีการเลี้ยงแยก นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำเซลล์ตรึงมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอาหาร TAP-N 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ตรึงจำนวน 5, 8 และ 50 ขึ้น ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 12, 20 และ 120 มิลลิลิตร โดยมีอาหาร TAP-N ปริมาตร 5, 8.3 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปปั่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากนั้น นำไปคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจน

3.5.10 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

1) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว

นำเซลล์แขวนลอยของสาหร่ายสีเขียวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมห่วงทำละลายเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสกัดคลอโรฟิลล์จากสาหร่าย *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 และอะซีโตน 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ผสมให้เข้ากัน จากนั้น บ่มที่ Heat block ในที่มืด ที่อุณหภูมิ

70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาบ่ม นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้น นำส่วนโสมมาตรวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร สำหรับสาหร่าย *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีการศึกษาของ Lee และ Shen (2004) ดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = (4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650})$$

ในขณะที่สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีการศึกษาของ Jeffrey และ Humphrey (1975) ดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = (11.93 \times A_{664}) - (1.93 \times A_{647})$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = (20.36 \times A_{647}) - (5.50 \times A_{664})$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ} + \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี}$$

2) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์ตรึงของสาหร่ายสีเขียว

นำชิ้นเซลล์จากแบคทีเรีย ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วบดชิ้นเซลล์จากแบคทีเรียให้ละเอียด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้น ทำวิธีการเดียวกับวิธีวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์อิสระ

3.5.11 วิธีการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เข็มฉีดยาฉีด Headspace เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยมีสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอน-
ดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

พารามิเตอร์	สภาวะ
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)
Column	Packed SS column 2m × 4mm OD × 3mm ID p/w Molecular sieve 5 °A 60/80 mesh
Temperature program	Injector temperature 100 °C Column temperature 50 °C Detector temperature 100 °C
Carrier gas	Argon gas with flow rate 20 mL min ⁻¹ (99.999%)

3.5.12 วิธีการศึกษาผลของข้อมูลทางสถิติ

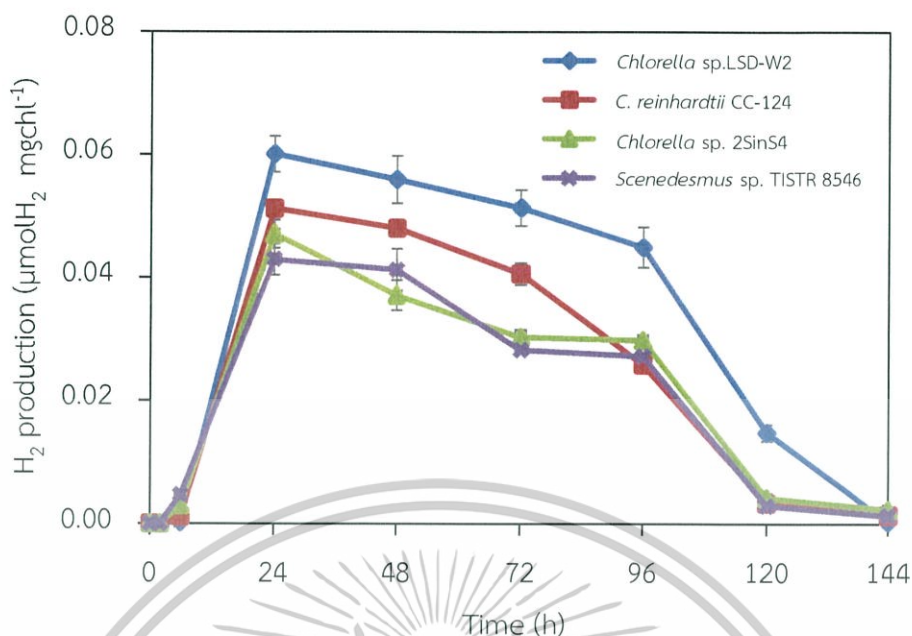
นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics Data Editor ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวหรือ One-Way ANOVA ด้วยวิธี Duncan และค่าที่ได้แสดงความเหมือนหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระ

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2, *C. reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 ในอาหารเหลว TAP นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 จากนั้น บ่มบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำเซลล์สาหร่ายแขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดแก้วเล็กและนำไปปั่นด้วยก้ำซาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน เซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงของการบ่มที่ 24 (รูปที่ 4.1) โดยสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.060 ± 0.003 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมา คือ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2SinS4 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.051 ± 0.001 , 0.047 ± 0.002 และ 0.043 ± 0.003 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) มีรายงานพบว่า เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีความทนทานต่อออกซิเจนมากกว่าสาหร่ายชนิดอื่น (Tinpranee et al., 2018) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้ *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด



รูปที่ 4.1 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ จากเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2, *C. reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 โดยบ่มสาหร่ายในอาหาร TAP และมีการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.5

เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดพบว่า เซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 ชนิด มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่ม โดยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.502 ± 0.121 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายอีก 3 ชนิด (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดจากเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2SinS4, *Chlorella* sp. LSD-W2, *C. reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus* sp. TISTR 8546 โดยบ่มสาหร่ายในอาหาร TAP ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.5

ชนิดสาหร่าย	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด $\mu\text{molH}_2 \text{ mgchl}^{-1}$	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด $\mu\text{molH}_2 \text{ gchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$
<i>Chlorella</i> sp. 2SinS4	0.047 ± 0.002^{bc} (24 h)	1.962 ± 0.096^{bc} (24 h)
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W2	0.060 ± 0.003^a (24 h)	2.502 ± 0.121^a (24 h)
<i>C. reinhardtii</i> CC-124	0.051 ± 0.001^b (24 h)	2.133 ± 0.018^b (24 h)
<i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8546	0.043 ± 0.003^c (24 h)	1.790 ± 0.108^c (24 h)

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกัน และค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) โดยตัวเลขในวงเล็บแสดงถึงชั่วโมงของการบ่มที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

จากผลการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระพบว่าเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ดังนั้น จึงคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.2 ผลการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย

4.2.1 ผลการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงร่วม

จากการนำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 72 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิเปตลงบนแผ่นเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียที่ทำการบ่มมาแล้ว 5 วัน ในอาหาร Hestrin & Schramm จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า เซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ไม่สามารถตรึงเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ได้ โดยไม่พบรังควัตถุของสาหร่ายบนผิวเซลล์ูโลสภายหลังการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2) เมื่อนำชิ้นวุ้นเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียที่ผ่านการตรึงเซลล์มาสกัดคลอโรฟิลล์ และคำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ทั้งหมด พบว่า เซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 0.129 ± 0.042 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2)

รูปที่ 4.2 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงร่วม

ตารางที่ 4.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จากการใช้วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย

วิธีการ	ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
เลี้ยงร่วม	0.129 ± 0.042^b
เลี้ยงแยก	6.426 ± 0.113^a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกัน และค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ

ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงแยก

จากการนำเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ทำการบ่มมาแล้ว 5 วัน มาตัดให้มีขนาด $1 \times 1 \times 0.3$ ลูกบาศก์เซนติเมตร นำขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียไปฆ่าเชื้อ จากนั้น นำขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในฟลาस्कที่มีเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิโดยมีความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์โลสจากแบคทีเรียสามารถตรึงสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ได้ จึงปรากฏสีเขียวของคลอโรฟิลล์เกาะติดกับขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรีย (รูปที่ 4.3) เมื่อนำขึ้นขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ผ่านการตรึงเซลล์มาสกัดคลอโรฟิลล์ และคำนวณหาความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว พบว่ามีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์สูงถึง 6.426 ± 0.113 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (ตารางที่ 4.2) ซึ่งมากกว่าขึ้นวันที่ตรึงโดยวิธีการเลี้ยงร่วมถึงประมาณ 50 เท่า

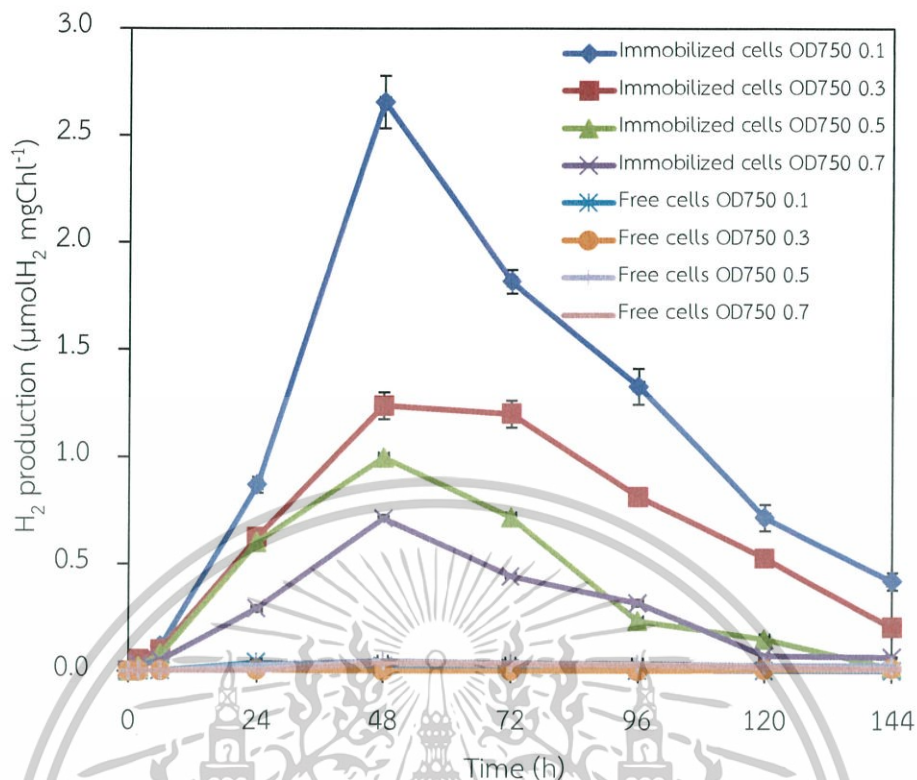
รูปที่ 4.3 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงแยก

จากผลการทดลองศึกษาวิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยใช้เซลล์โลสจากแบคทีเรีย พบว่าการตรึงเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงแยกมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการเลี้ยงร่วมถึง 50 เท่า เนื่องจากวิธีการเลี้ยงแยกนั้นได้นำขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์สาหร่ายอิสระ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียว ทำให้สาหร่ายสีเขียวสามารถเกิดการตรึงบริเวณผิวของเซลล์โลสจากแบคทีเรียได้ ซึ่งต่างจากวิธีการเลี้ยงร่วมที่นำสาหร่ายในปริมาณที่น้อยไปเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเซลล์โลส จึงทำให้สาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้น การตรึงเซลล์สาหร่ายโดยใช้เซลล์โลสจากแบคทีเรียด้วยวิธีการเลี้ยงแยกเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ จึงนำวิธีการนี้ไปทำการศึกษา

เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่ตรึงด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย

จากการนำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้น เท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 แล้วใช้วิธีการตรึงเซลล์สาหร่ายโดยวิธีการเลี้ยงแยก มาบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น นำเซลล์ตรึงจำนวน 5 ชิ้น ใส่ในขวดที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที บ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิโดยมีความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียโดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นของเซลล์สาหร่ายเท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงบ่มที่ 48 ทุกความเข้มข้น (รูปที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนระหว่างเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์อิสระ (รูปที่ 4.4) สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.655 ± 0.123 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ รองลงมา คือ สาหร่ายที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.3, 0.5 และ 0.7 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.239 ± 0.063 , 0.996 ± 0.006 และ 0.712 ± 0.017 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)



รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียและเซลล์อิสระ ในอาหาร TAP

จากการทดลองพบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 55.308 ± 2.553 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตของเซลล์ตรึงที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นอื่นๆ ประมาณ 2-4 เท่า (ตารางที่ 4.3) เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของเซลล์น้อยๆ ทำให้เซลล์ไม่มีการบดบังกันขึ้น ทำให้สารอาหารสามารถผ่านเข้าออกสู่เซลล์ได้อย่างทั่วถึง จึงทำให้เซลล์มีการทำงานอย่างมีประสิทธิภาพและนอกจากนั้นยังทำให้การปลดปล่อยก๊าซไฮโดรเจนเป็นไปได้สะดวก แต่ถ้าความเข้มข้นของเซลล์ที่มากขึ้นจะทำให้เซลล์เกิดการบดบังกัน ทำให้สารอาหารผ่านเข้าออกได้อย่างไม่ทั่วถึงและการปลดปล่อยก๊าซไฮโดรเจนก็เป็นไปได้ยากขึ้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้ การผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *Aphanothece halophytica* พบว่า การใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 0.2 มิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรของสารละลายเจล ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ทำให้เซลล์ตรึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด (Pansook *et al.*, 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย ในอาหาร TAP

OD ₇₅₀	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
	$\mu\text{molH}_2 \text{ mgchl}^{-1}$	$\mu\text{molH}_2 \text{ gchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$
0.1	2.655±0.123 ^a (48 h)	55.308±2.553 ^a (48 h)
0.3	1.239±0.063 ^b (48 h)	27.555±0.872 ^b (2 h)
0.5	0.996±0.006 ^c (48 h)	25.040±0.008 ^b (24 h)
0.7	0.712±0.017 ^d (48 h)	14.836±0.350 ^c (48 h)

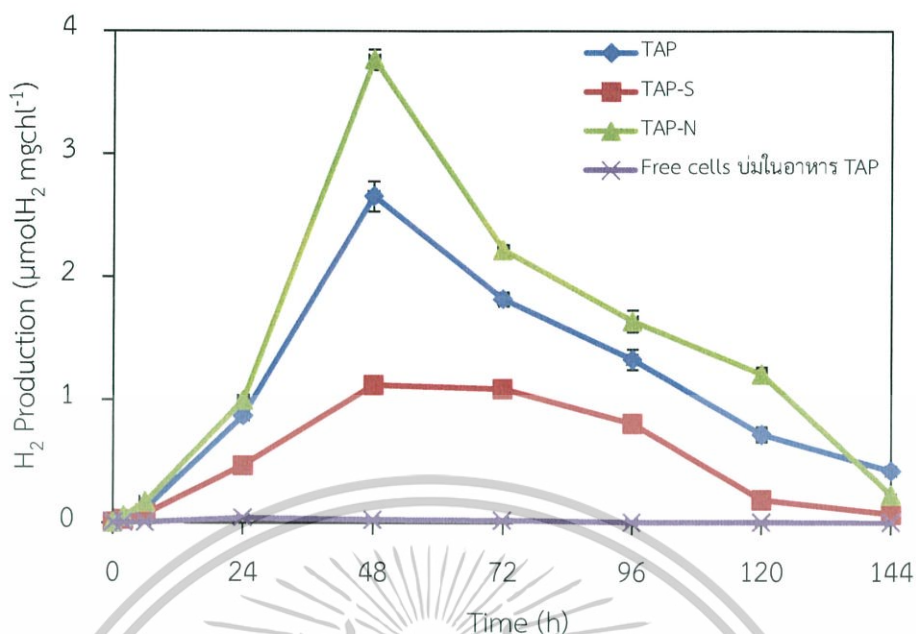
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกัน และค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) โดยตัวเลขในวงเล็บแสดงถึงชั่วโมงของการบ่มที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

จากการศึกษาผลของความหนาแน่นของเซลล์ตรึงสาหร่ายต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่าสาหร่ายที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและการสะสมไฮโดรเจนสูงสุด (ตารางที่ 4.3) โดยสาหร่ายจะสะสมไฮโดรเจนที่สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่มเซลล์ จากผลการศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือกค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้น 0.1 นี้ ไปทำการทดลองศึกษาผลของการขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของการขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย

จากการนำเซลล์แขวนลอยของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงมาแล้ว 72 ชั่วโมง มาตรึงเซลล์โดยวิธีการเลี้ยงแยก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม นำเซลล์ตรึงมาล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอาหาร TAP, อาหาร TAP ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) อย่างละ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ตรึงใส่ในขวดที่มีอาหารแต่ละชนิดนำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาวะเดิม เป็นเวลาทั้งหมด 144 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ที่บ่มในอาหาร TAP-N มีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S (รูปที่ 4.5) โดยมีการผลิตไฮโดรเจนที่สูงสุดเท่ากับ 3.765 ± 0.083 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม ซึ่งสูงกว่าเซลล์ตรึงที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.655 ± 0.123 และ 1.118 ± 0.025 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ในขณะที่เซลล์อิสระของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP มีการผลิตไฮโดรเจนน้อยมาก โดยผลิตเพียง 0.040 ± 0.001 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.4)



รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงด้วย เซลลูโลสจากแบคทีเรีย ที่มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และบ่มในอาหาร TAP, TAP-S และ TAP-N และเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP

เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงที่บ่มในอาหารชนิดต่างๆ พบว่า เซลล์ตรึงที่บ่มในอาหาร TAP-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 78.436 ± 1.725 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัม คลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ตรึงที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ถึง 1.4 และ 3.4 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่า ภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนสาหร่ายสีเขียวจะมี เมแทบอลิซึมที่แตกต่างจากสภาวะปกติ โดยการขาดไนโตรเจนจะทำให้โปรตีน D1 ในระบบแสงสอง ทำงานลดลง การแตกตัวของน้ำจึงลดลง ดังนั้น จึงผลิตก๊าซออกซิเจนลดลง เมื่อออกซิเจนในระบบลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้ดีขึ้น และกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการ ศึกษาในสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* ที่พบว่าเมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะสูงขึ้น (Ling et al., 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-S และ TAP-N และเซลล์อิสระที่บ่มในอาหาร TAP โดยให้มูลค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1

ชนิดของเซลล์	ชนิดอาหาร	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
		$\mu\text{molH}_2 \text{ mgchl}^{-1}$	$\mu\text{molH}_2 \text{ gchl}^{-1} \text{ h}^{-1}$
เซลล์ตรึง	TAP	2.655 ± 0.123^b (48 h)	55.308 ± 2.553^b (48 h)
เซลล์ตรึง	TAP-S	1.118 ± 0.025^c (48 h)	23.292 ± 0.518^c (48 h)
เซลล์ตรึง	TAP-N	3.765 ± 0.083^a (48 h)	78.436 ± 1.725^a (48 h)
เซลล์อิสระ	TAP	0.040 ± 0.001^d (24 h)	1.677 ± 0.019^d (24 h)

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกัน และค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) โดยตัวเลขในวงเล็บแสดงถึงชั่วโมงของการบ่มที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

จากการศึกษาการขาดธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียวด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย พบว่า เมื่อนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มาบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์เปรียบเทียบกับอาหารปกติ สาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและการสะสมไฮโดรเจนสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม (ตารางที่ 4.4)

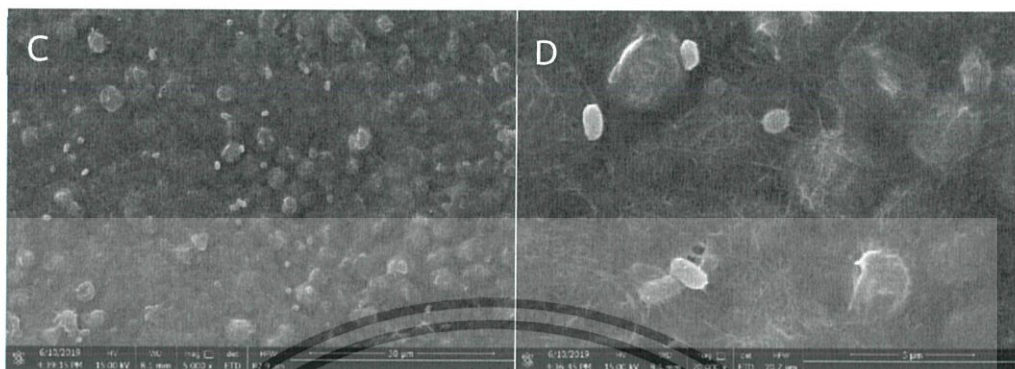
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ลักษณะของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่มีและไม่มีกรดไตรกลีเซอไรด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

จากการนำชิ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่มีขนาด $1 \times 1 \times 0.3$ ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่บ่มในอาหารเหลว TAP, TAP-N และเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ปราศจากเซลล์สาหร่าย ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่าสังเกตเห็นลักษณะทางกายภาพของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ปราศจากเซลล์สาหร่าย โดยมีแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ปรากฏรูปร่างเป็นแท่ง และเส้นใยเรียงต่อกันเป็นสายของเซลล์โลส (รูปที่ 4.6) ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ตรึงด้วยเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยบ่มในอาหาร TAP (รูปที่ 4.7) และบ่มในอาหาร TAP-N (รูปที่ 4.8) มีความคล้ายคลึงกัน โดยที่เส้นใยของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่เรียงต่อกันเป็นสายห่อหุ้มเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่มีรูปร่างกลม



รูปที่ 4.6 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ปราศจากเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (A) และกำลังขยาย 20,000 เท่า (B)



รูปที่ 4.7 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไลสจากแบคทีเรียที่ตรึงด้วยเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (C) และกำลังขยาย 20,000 เท่า (D)

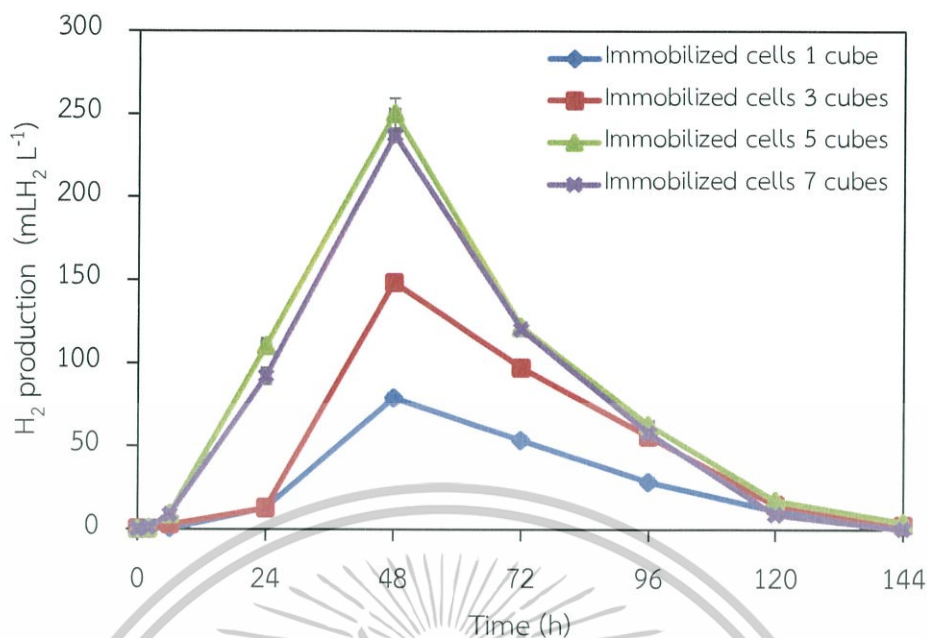


รูปที่ 4.8 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไลสจากแบคทีเรียที่ตรึงด้วยเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-N ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (E) และกำลังขยาย 20,000 เท่า (F)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาจำนวนขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย

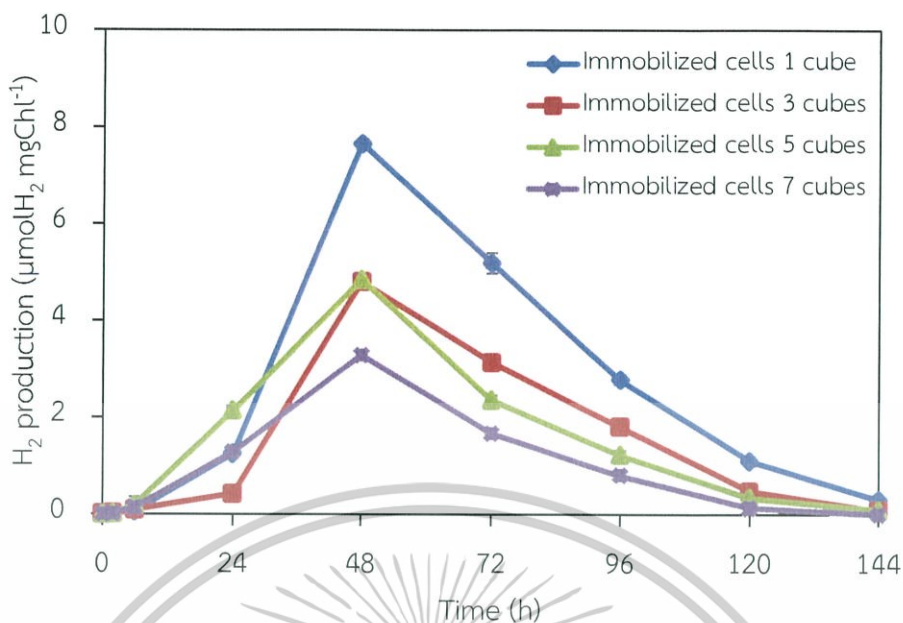
จากการนำขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ถูกตรึงด้วยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ขนาด 1x1x0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ขึ้น บ่มในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร บ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที บ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงเซลล์ด้วยขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงบ่มที่ 48 (รูปที่ 4.9) โดยเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียจำนวน 5 ขึ้น มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 250.082 ± 9.307 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหาร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียจำนวน 7 ขึ้น ที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 236.994 ± 4.155 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหาร ในขณะที่ เซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยขึ้นเซลล์โลสจากแบคทีเรียจำนวน 1 ขึ้นมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเพียง 78.887 ± 1.070 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหาร (ตารางที่ 4.5) เนื่องจากในการเปรียบเทียบต่อปริมาณอาหารที่เท่ากัน ปริมาณเซลล์ตรึงที่มีจำนวนมากกว่าจะมีการปลดปล่อยไฮโดรเจนได้สูงกว่า



รูปที่ 4.9 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียโดยมีจำนวนเซลล์จากแบคทีเรีย จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ชิ้น ขนาด 1x1x0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหาร TAP-N

สำหรับการผลิตไฮโดรเจนในหน่วยวิเคราะห์ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงเซลล์ด้วยชิ้นเซลล์จากแบคทีเรียมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่มเช่นกัน (รูปที่ 4.10) โดยเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยชิ้นเซลล์จากแบคทีเรียจำนวน 1 ชิ้น มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 7.648 ± 0.104 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ซึ่งสูงกว่าเซลล์สาหร่ายที่ถูกตรึงด้วยชิ้นเซลล์จากแบคทีเรียจำนวน 3, 5 และ 7 ชิ้น (ตารางที่ 4.5) เนื่องจากปริมาณคลอโรฟิลล์ของชิ้นเซลล์จากแบคทีเรีย 1 ชิ้น มีค่าน้อยที่สุด เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ จึงทำให้มีค่าการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *Aphanothece halophytica* พบว่าการใช้ปริมาตรของเซลล์ตรึงที่น้อยที่สุดสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด (Pansook et al., 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรีย โดยมีจำนวนเซลล์จากแบคทีเรีย จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ชิ้น ขนาด 1x1x0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหาร TAP-N

ตารางที่ 4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยมิลลิกรัมไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหารและไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วยเซลล์จากแบคทีเรีย โดยมีจำนวนเซลล์จากแบคทีเรีย จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ชิ้น ขนาด 1x1x0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-N

Volumetric size (mL)			Immobilized cells (cubes)	Maximum H ₂ production yield		Maximum H ₂ production rate	
Glass vial	Medium	Headspace		(mLH ₂ L ⁻¹)	(μmolH ₂ mgchl ⁻¹)	(mLH ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	(μmolH ₂ gchl ⁻¹ h ⁻¹)
12	5	7	1	78.887±1.070 ^c	7.648±0.104 ^a	1.643±0.022 ^c	159.326±2.162 ^a
12	5	7	3	148.408±4.946 ^b	4.796±0.160 ^b	3.092±0.103 ^b	99.912±3.330 ^b
12	5	7	5	250.082±9.307 ^a	4.849±0.180 ^b	5.210±0.194 ^a	101.017±3.759 ^b
12	5	7	7	236.994±4.155 ^a	3.282±0.058 ^c	4.937±0.087 ^a	68.379±1.119 ^c

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกัน และค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ

ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P < 0.05)

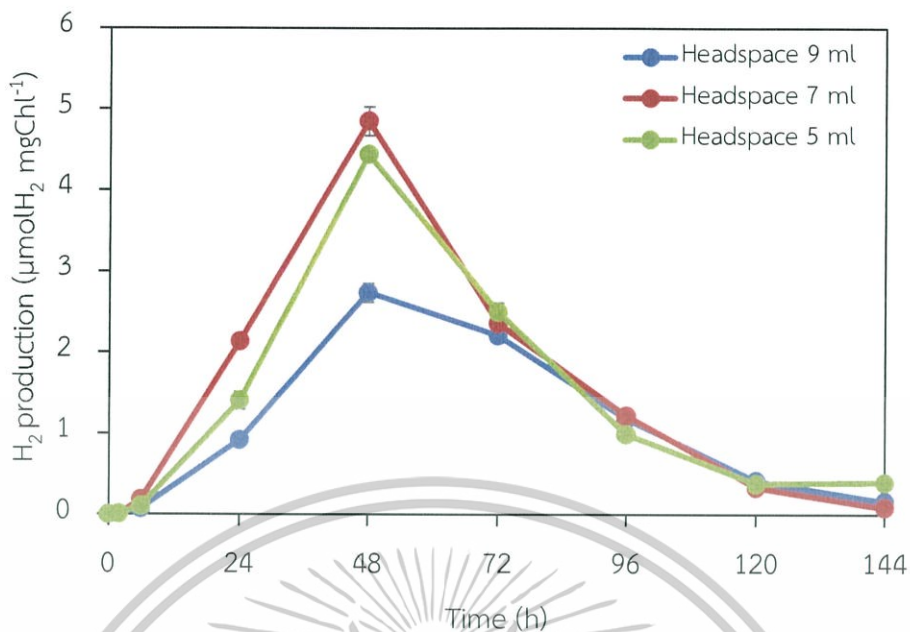
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการศึกษาปริมาตร Headspace ภายในภาชนะบรรจุต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย

จากการนำขึ้นเซลล์จากแบคทีเรียจำนวน 5 ขึ้น ที่ถูกเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 มาบ่มในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร โดยปริมาตร Headspace หรือ ปริมาตรอากาศที่เหลืออยู่เหนืออาหารภายในภาชนะบรรจุ เท่ากับ 9, 7 และ 5 มิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์ตรึงในอาหาร TAP-N ปริมาตร 3, 5 และ 7 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้น นำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที บ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียที่มีปริมาตร Headspace 9, 7 และ 5 มิลลิลิตรมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม (รูปที่ 4.11) โดยเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 7 มิลลิลิตร มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 4.849 ± 0.180 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 5 มิลลิลิตร ที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 4.440 ± 0.073 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในขณะที่เซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 9 มิลลิลิตร มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเพียง 2.733 ± 0.114 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.6) เนื่องจากในปริมาตร Headspace ที่มากจะมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนน้อย การอึดตัวของการผลิตไฮโดรเจนจะอึดตัวช้ากว่า จึงทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนออกมาได้อย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ปริมาตร Headspace ที่น้อยความอึดตัวในการผลิตไฮโดรเจนจะเร็วส่งผลให้ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอีก (Pansook *et al.*, 2019)

สำหรับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 7 มิลลิลิตร มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 101.017 ± 3.759 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 5 มิลลิลิตร ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 92.500 ± 1.511 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 9 มิลลิลิตร มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเพียง 56.932 ± 2.380 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าเซลล์ตรึงที่บ่มในปริมาตร Headspace 5 และ 7 มิลลิลิตร ประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วย เซลลูโลสจากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 5, 7 และ 9 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหารและไมโครโมล ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วย เซลลูโลสจากแบคทีเรียในปริมาตร Headspace 5, 7 และ 9 มิลลิลิตร โดยบ่มในอาหาร TAP-N

Glass vial	Medium	Volumetric size (mL)		Maximum H ₂ production		Maximum H ₂ production	
		Headspace	Immobilized cells (cubes)	yield (mLH ₂ L ⁻¹)	(µmolH ₂ mgchl ⁻¹)	rate (mLH ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	(µmolH ₂ gchl ⁻¹ h ⁻¹)
12	7	5	5	228.998±3.740 ^a	4.440±0.073 ^a	4.771±0.078 ^a	92.500±1.511 ^a
12	5	7	5	250.082±9.307 ^a	4.849±0.180 ^a	5.210±0.194 ^a	101.017±3.759 ^a
12	3	9	5	140.943±5.891 ^b	2.733±0.114 ^b	2.936±0.123 ^b	56.932±2.380 ^b

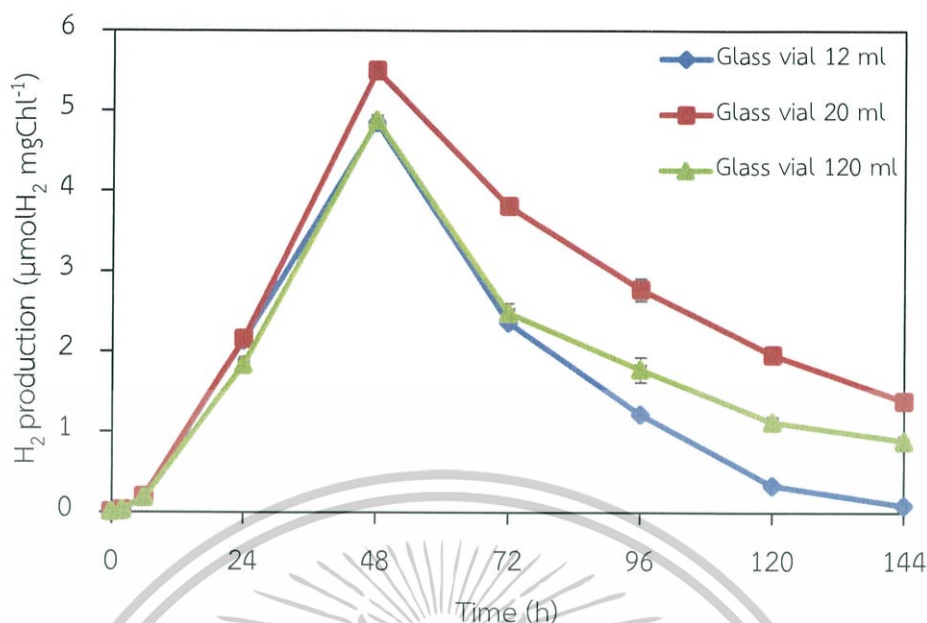
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกัน และ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P < 0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ผลการศึกษาขนาดภาชนะที่แตกต่างกันต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย

จากการนำขึ้นเซลล์จากแบคทีเรียที่มีเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ในอาหาร TAP-N มาบ่มในขวดแก้วขนาด 12, 20 และ 120 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที บ่มเป็นเวลา 144 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ตรึงเซลล์ด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในขนาดภาชนะ 12, 20 และ 120 มิลลิลิตร มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม (รูปที่ 4.12) โดยเซลล์สาหร่ายที่ตรึงด้วยเซลล์จากแบคทีเรียในขนาดภาชนะ 20 มิลลิลิตร มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 5.498 ± 0.060 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งสูงกว่าเซลล์สาหร่ายที่บ่มในขนาดภาชนะ 12 และ 120 มิลลิลิตร ที่มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 4.849 ± 0.180 และ 4.881 ± 0.041 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

สำหรับอัตราการผลิตไฮโดรเจนพบว่า เซลล์ตรึงที่บ่มในขนาดภาชนะ 20 มิลลิลิตร มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 114.542 ± 1.245 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.7) เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ตรึงที่บ่มในขนาดภาชนะ 12 และ 20 มิลลิลิตร พบว่าขนาดภาชนะ 20 มิลลิลิตร มีอัตราในการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า เนื่องจากขนาดภาชนะที่ใหญ่กว่าจะมีปริมาตร Headspace ที่มากกว่า ซึ่ง Headspace เป็นปัจจัยที่บ่งบอกความเข้มข้นของไฮโดรเจน เมื่อมีปริมาตรของ Headspace มาก ส่งผลให้มีการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน (Sang *et al.*, 2009) แต่เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ตรึงที่บ่มในขนาดภาชนะ 20 และ 120 มิลลิลิตร พบว่า เซลล์ตรึงที่อยู่ในขนาดภาชนะ 20 มิลลิลิตร มีอัตราในการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากการบ่มในสภาวะที่ต่างกันโดยขนาดภาชนะ 20 มิลลิลิตร ถูกบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ขณะเดียวกันเซลล์ตรึงที่บ่มในขนาดภาชนะ 120 มิลลิลิตร ถูกบ่มบนเครื่องเขย่าที่ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ จึงส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่า



รูปที่ 4.12 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงด้วย เซลลูโลสจากแบคทีเรียในภาชนะขนาด 12, 20 และ 120 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.7 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของอาหารและไมโครโมล ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วย เซลลูโลสจากแบคทีเรียในภาชนะบรรจุที่มีขนาดเท่ากับ 12, 20 และ 120 มิลลิลิตร ในอาหาร TAP-N

Glass vial	Medium	Volumetric size (mL)		Maximum H ₂ production yield		Maximum H ₂ production rate	
		Headspace	Immobilized cells (cubes)	(mLH ₂ L ⁻¹)	(μmolH ₂ mgchl ⁻¹)	(mLH ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	(μmolH ₂ gchl ⁻¹ h ⁻¹)
12	5	7	5	250.082±9.307 ^b	4.849±0.180 ^b	5.210±0.194 ^b	101.017±3.759 ^b
20	8.3	11.7	8	283.567±3.082 ^a	5.498±0.060 ^a	5.908±0.064 ^a	114.542±1.245 ^a
120	50	70	50	251.754±2.091 ^b	4.881±0.041 ^b	5.245±0.044 ^b	101.689±0.845 ^b

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกัน และ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P < 0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์อิสระ พบว่าในบรรดาสาหร่ายสีเขียวนำมาคัดเลือก 4 ชนิด เซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เท่ากับ 0.060 ± 0.003 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม คลอโรฟิลล์ เมื่อป้อนในอาหาร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียโดยวิธีการเลี้ยงแยกมีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์มากกว่าวิธีการเลี้ยงร่วม เนื่องจากสีเขียวของคลอโรฟิลล์เกาะติดกับชั้นเซลล์โลสจากแบคทีเรีย และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในชั้นเซลล์โลส มีค่าสูงถึง 6.426 ± 0.113 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าวิธีการเลี้ยงร่วมถึง 50 เท่า

3) ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) จำนวนชั้นเซลล์โลสจากแบคทีเรีย 5 ชั้น ปริมาตร Headspace 7 มิลลิลิตร และใช้ภาชนะบรรจุที่มีขนาดเท่ากับ 20 มิลลิลิตร

4) เซลล์ตรึงสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรีย มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.498 ± 0.060 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งมีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจากเซลล์อิสระประมาณ 140 เท่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาการตรึงเซลล์ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนด้วยเซลล์โลสจากแบคทีเรียในสาหร่ายสีเขียว ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง และใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฆ่าเชื้อเซลล์โลสจากแบคทีเรีย

เอกสารอ้างอิง

- นุชนาถ แซ่มชัย. (2557). สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์. วารสาร มฉก. วิชาการ. ฉบับที่ 34 : 169-183.
- นริศรา สุวรรณโชติ. (2557). การศึกษาผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญเติบโตของ *Chlorella vulgaris*. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วิหวัศ แจ่มเยี่ยม. (2553). กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. ฉบับที่ 1 : 68-77.
- สร้อยญา พันธุ์พุก และ อรุณ อินเจริญศักดิ์. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยการตรึงเซลล์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2556.
- Bae, S.O. and Shoda, M., 2005. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(1), pp.45-51.
- Harris, E.H., 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual review of plant biology*, 52(1), pp.363-406.
- Jeffrey, S.T. and Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 167(2), pp.191-194.
- Lee, Y.K. and Shen, H., 2004. Basic culturing techniques. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, p.40.
- Li, L., Zhang, L. and Liu, J., 2015. The enhancement of hydrogen photoproduction in marine *Chlorella pyrenoidosa* under nitrogen deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(43), pp.14784-14789.
- Maneeruttanarungroj, C., 2011. *Screening of hydrogen-producing algae and optimization for enhanced hydrogen production* (Doctoral dissertation, Chulalongkorn University).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Maswanna, T., Phunpruch, S., Lindblad, P. and Maneeruttanarungroj, C., 2018. Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition. *Biomass and bioenergy*, 111, pp.88-95.
- Oh, S.E., Zuo, Y., Zhang, H., Guiltinan, M.J., Logan, B.E. and Regan, J.M., 2009. Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. *International journal of hydrogen energy*, 34(23), pp.9347-9353.
- Pansook, S., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S., 2019. Enhanced dark fermentative H₂ production by agar immobilized cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Journal of Applied Phycology*, pp.1-11.
- Phruksaphithak, N. and Kaewnun, C., 2019. Bacterial cellulose production and applications. *Science, Engineering and Health Studies*, 13(1), pp.1-7.
- Shastik, E., Li, L. and Liu, J., 2019. New methods for hydrogen production by marine microalga *Chlorella pyrenoidosa* in natural seawater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(29), pp.14707-14714.
- Tinpranee, N., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S., 2016. Hydrogen production by unicellular green alga *chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 21(2), pp.256-266.
- Vello, V., Umashankar, S., Phang, S.M., Chu, W.L., Lim, P.E., Nazia, A.M., Liew, K.E., Swarup, S. and Chew, F.T., 2018. Metabolomic profiles of tropical *Chlorella* and *Parachlorella* species in response to physiological changes during exponential and stationary growth phase. *Algal research*, 35, pp.61-75.
- Zor, E., 2018. Silver nanoparticles-embedded nanopaper as a colorimetric chiral sensing platform. *Talanta*, 184, pp.149-155.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงสาหร่าย Tris Acetate Phosphate (TAP) (1,000 มิลลิลิตร)

(Harris *et al.*, 2001)

● 2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร
● 1M Phosphate Buffer	1	มิลลิลิตร
● Trace Mineral Solution	5	มิลลิลิตร
● Tris-Base	1	มิลลิลิตร
● Glacial Acetic Acid	2.42	กรัม

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

● แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
● แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม
● แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2	กรัม
● เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส		

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน
ปรับพีเอช 6.5 ด้วย 5N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

● เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัม
● ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.2	กรัม
● กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
● แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.51	กรัม
● คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.016	กรัม
● โซเดียมโมลิเบตเตตระไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.073	กรัม
● โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.016	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบ 1M Phosphate Buffer

- 20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
(1M stock : 6.8 กรัม / 50 มิลลิลิตร)
- 30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
(1M stock : 8.7 กรัม / 50 มิลลิลิตร)
- (ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เต็มวัน 1.5 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร
- ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยง *Acetobacter xylinum* [Hestrin & Schramm (HS)] (1,000 มิลลิลิตร)
(Bae and Shoda., 2005)

- | | | |
|---|-----|------|
| ● กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) | 50 | กรัม |
| ● สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) | 5 | กรัม |
| ● แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) | 5 | กรัม |
| ● โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) | 4 | กรัม |
| ● แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.1 | กรัม |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

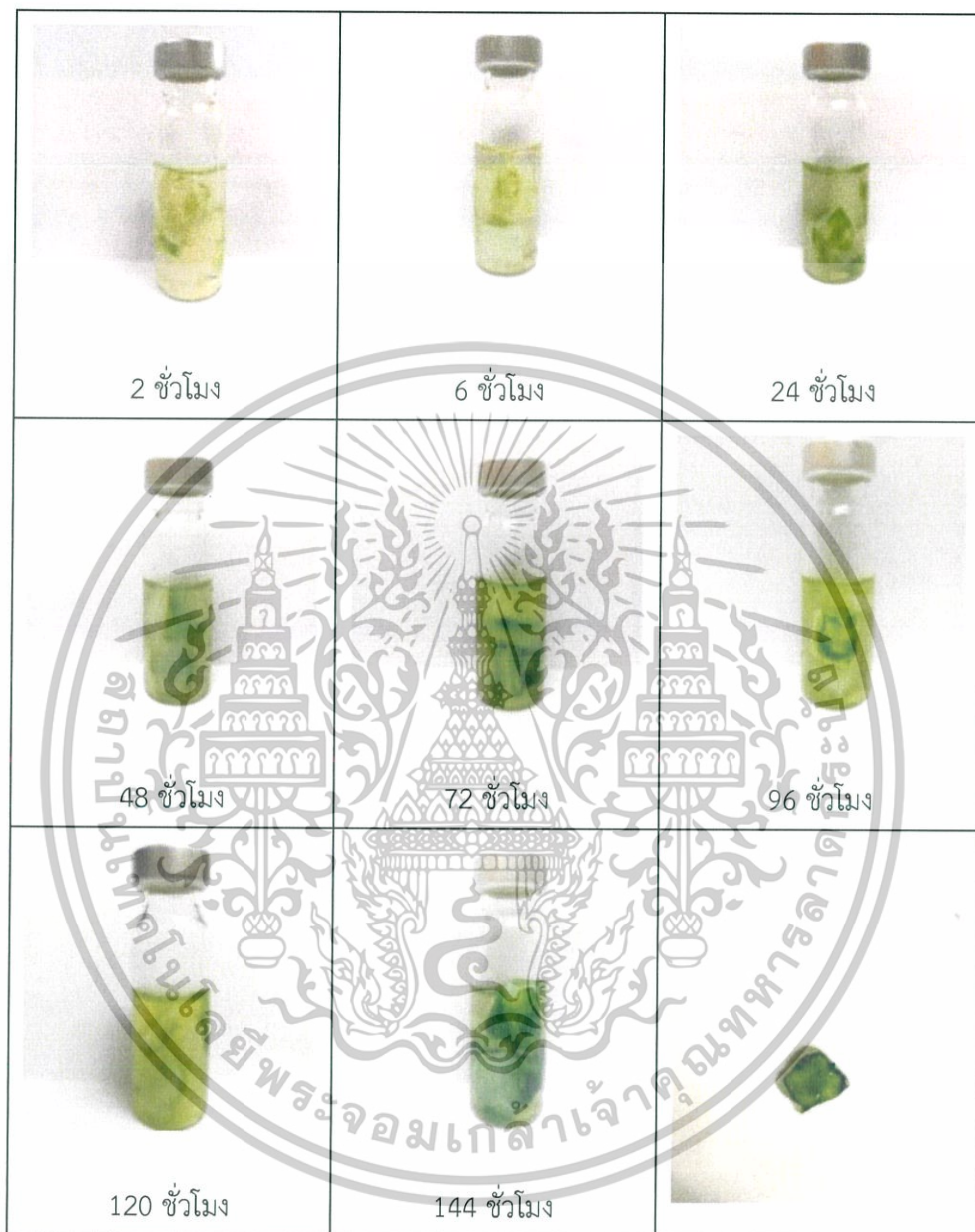
ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข-1 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียมีค่า OD₇₅₀ เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ในอาหาร TAP



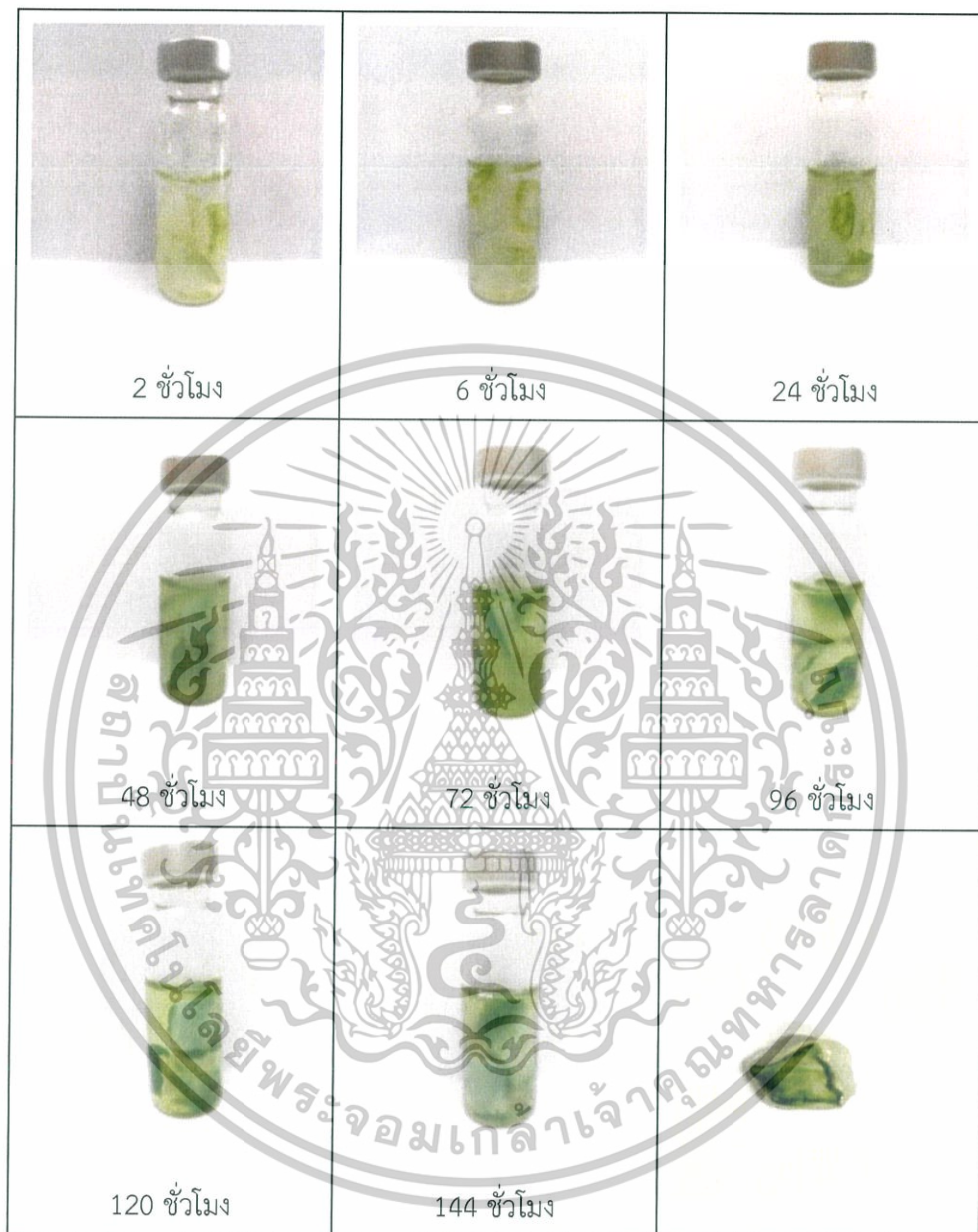
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่มีค่า OD_{750} เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ในอาหาร TAP-N



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3 การตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 ด้วยเซลล์จากแบคทีเรียที่มีค่า OD_{750} เริ่มต้น เท่ากับ 0.1 ที่ชั่วโมงบ่มต่างๆ ในอาหาร TAP-S



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้