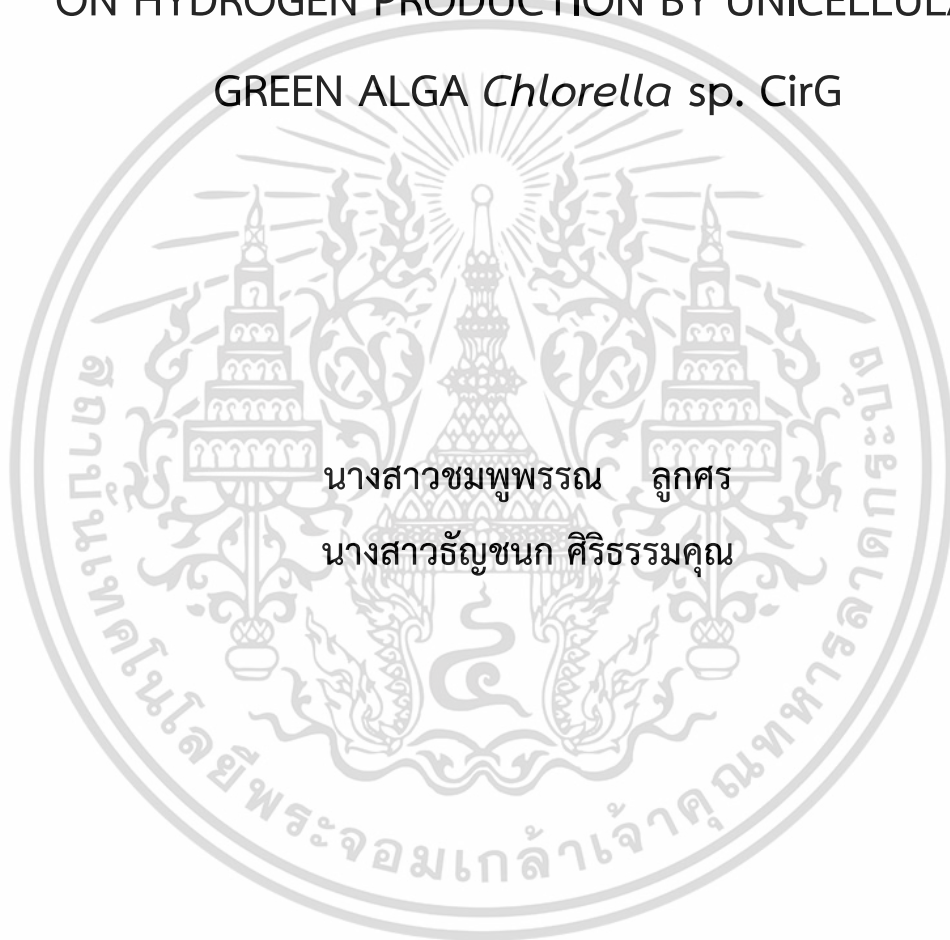


ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน
ของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp. CirG

EFFECTS OF CARBON SOURCE AND LIGHT INTENSITY
ON HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR
GREEN ALGA *Chlorella* sp. CirG



นางสาวชมพูนุพรรณ ลูกศร

นางสาวธัญชนก ศิริธรรมคุณ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2565 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF CARBON SOURCE AND LIGHT INTENSITY
ON HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR
GREEN ALGA *Chlorella* sp. CirG



CHOMPOOPAN LOOKSORN
THUNCHANOK SIRITHAMMAKHUN

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

ACADEMIC YEAR 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp. CirG

ชื่อนักศึกษา นางสาว ชมพูนุชพรณ ลูกศร รหัสนักศึกษา 62050583
 นางสาว ธัญชนก ศิริธรรมคุณ รหัสนักศึกษา 62050603

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2565

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว <i>Chlorella</i> sp. CirG		
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ชมพู่พรรณ ลูกศร	รหัสนักศึกษา	62050583
	นางสาว ธัญชนก ศิริธรรมคุณ	รหัสนักศึกษา	62050603
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2565		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์		

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจน (H_2) เป็นแหล่งพลังงานที่สะอาด เนื่องจากการเผาไหม้ไฮโดรเจนไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ ไฮโดรเจนที่ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิดอาจเรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน” ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวสามารถใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในการผลิตไฮโดรเจน งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* และสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. CirG, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus obliquus* 8546 จากผลการทดลองพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่ขาดไนโตรเจน ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 สูตรปกติ และในบรรดาสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ที่การศึกษา *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการขาดไนโตรเจนให้การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. CirG ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ ให้การผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุด เท่ากับ $3,617.65 \pm 23.19$ ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน, ไซยาโนแบคทีเรีย, สาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effects of Carbon Source and Light Intensity on Hydrogen Production by Unicellular Green Alga <i>Chlorella</i> sp. CirG
Students	Miss Chompoopan Looksorn Student ID 62050583 Miss Tunchanok Sirithammakhun Student ID 62050603
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Applied Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Asst.Prof.Dr. Saranya Phunpruch

Abstract

Hydrogen (H₂) is a clean energy source since its combustion does not produce air pollution. H₂ can be produced by both chemical and biological processes. Hydrogen produced by various kinds of microorganisms is also known as "Biohydrogen". Currently, H₂ production by cyanobacteria and green algae is interesting because they can use only light and water as substrate via photosynthetic process to generate H₂. This work focused on studying H₂ production by cyanobacterium *Aphanothece halophytica* and three strains of green algae, namely *Chlorella* sp. CirG, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 and *Scenedesmus obliquus* 8546. The result showed that *A. halophytica* cultivated in nitrogen deprived BG11 gave a higher H₂ production rate than that in normal BG11. Among three green algae investigated, *Chlorella* sp. CirG cultivated under nitrogen starvation showed highest H₂ production. To optimize H₂ production by *Chlorella* sp. CirG, effects of carbon source and light Intensity on H₂ production were investigated. It was found that *Chlorella* sp. CirG cultivated in TAP-N medium containing 87 mM acetic acid under light intensity of 8,000 lux, exhibited the highest H₂ production with 3,617.65 ± 23.19 molH₂/mgchl.

Keywords: Hydrogenproduction, Cyanobacteria, Green algae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้นั้นด้วยความกรุณาจาก รศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและเป็นผู้ที่คอยให้ความรู้ ความคิดเห็นและคำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในการให้ความรู้และอบรมสั่งสอนทั้งด้านทฤษฎีและปฏิบัติ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดเวลาของการศึกษาในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังแห่งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและพื้นที่วิทยาศาสตร์ ในการอำนวยความสะดวก ตลอดจนความตั้งใจในการช่วยเหลือและให้ความรู้ในด้านการใช้งานของเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่เกี่ยวข้องกับโครงการพิเศษนี้

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ในภาควิชาชีววิทยาและห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุลทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจกันและกัน อีกทั้งให้คำแนะนำปรึกษาในทุกเรื่อง ทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สำหรับประโยชน์และคุณค่าที่เกิดจากรายงานฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่ บิดา มารดา ครู อาจารย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ทุกท่านได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

ชมพู่พรรณ ลูกศร
ธัญชนก ศิริธรรมคุณ
18 พฤษภาคม 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน.....	3
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....	3
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการรีฟอร์มมีเทน.....	4
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแยกสลายด้วยไฟฟ้า.....	4
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการไอน้ำ-เหล็ก.....	5
2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการแยกกรองไฟฟ้า.....	5
2.2.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล.....	6
2.2.6 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต.....	6
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน.....	7
2.3.1 กลุ่มโฟโตโทรฟิคโพรคาริโอต.....	7
2.3.2 กลุ่มโฟโตโทรฟิคยูคาริโอต.....	7
2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	7
2.5.1 ไชยาโนแบคทีเรีย.....	7
2.5.2 สาหร่ายสีเขียว.....	9
2.5.2.1 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9
2.5.2.1.1 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i>	10
2.5.2.1.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i>	11
2.5.2.2 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirG.....	12
2.5.2.2.1 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella vulgaris</i>	13
2.5.2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>C. vulgaris</i>	14
2.5.2.3 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	14
2.5.2.3.1 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	15
2.5.2.3.2 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	16
2.5.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	16
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18
3.1 สาหร่ายที่ใช้ในโครงการพิเศษ	18
3.1.1 สาหร่าย 4 สายพันธุ์ได้จากห้องปฏิบัติการ.....	18
3.2 สารเคมี.....	18
3.2.1 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	18
3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการสกัดคลอโรฟิลล์	18
3.2.3 สารเคมีที่ใช้.....	18
3.3 ก๊าซที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน	18
3.4 อุปกรณ์.....	19
3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย	20
3.5.1 วิธีการต่างๆที่เกี่ยวข้อง.....	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ 3.5.1.1 การเตรียมหัวเชื้อไชยาโนแบคทีเรีย..... 21
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว	21
3.5.1.3 วิธีการสกัดคลอโรฟิลล์และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ไซยาโนแบคทีเรีย	21
3.5.1.4 วิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์สาหร่ายสีเขียว	22
3.5.1.5 นับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว	22
3.5.1.6 การหาน้ำหนักแห้งของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว.....	22
3.5.1.7 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน	22
3.5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	23
3.5.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตไซยาโนแบคทีเรีย	23
3.5.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว	24
3.5.3 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว.....	24
3.5.3.1 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย.....	24
3.5.3.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์.....	25
3.5.4 ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในหารเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่าย.....	25
3.5.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน	26
3.5.5.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน.....	26
3.5.5.2 การแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน.....	26
3.5.5.3 การแปรผันความเข้มของแสง	27
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	28
4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	28
4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i>	28
4.1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว	30
4.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	33
4.2.1 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	33
4.2.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์.....	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.3 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว	46
4.3.1 การเพาะเลี้ยงร่วมกันในสภาวะที่ไม่มีแสง	47
4.3.2 การเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ในสภาวะที่มีแสง.....	50
4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirG.....	53
4.4.1 การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirG ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน.....	53
4.4.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. CirG ที่มีความเข้มข้น ของกรดอะซิติกที่แตกต่างกัน	56
4.4.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. Cir-G ภายใต้ความเข้มข้น ที่ต่างกัน.....	59
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	62
5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	62
5.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว.....	62
5.3 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและ สาหร่ายสีเขียว.....	62
5.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว.....	63
5.5 ข้อเสนอแนะ.....	63
เอกสารอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก	68
ภาคผนวก ก	69
ภาคผนวก ข	70
ภาคผนวก ค	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ.....	23
4.1 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์	32
4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Aphanothece halophytica</i>	34
4.3 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 สุตาปกติและอาหาร BG11-N	34
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>Chlorella sp. CirG</i>	37
4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>Chlorella sp. CirG</i>	37
4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Scenedesmus obliquus</i> TISTR 8546.....	40
4.7 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546.....	40
4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC 124.....	43
4.9 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>C. reinhardtii</i> CC 124.....	43
4.10 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง.....	47
4.11 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>A. halophytica</i> และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง.....	48
4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง..	50
4.13 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>A. halophytica</i> และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง ...	51
4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจน <i>Chlorella sp. CirG</i> ที่บ่มใน TAP-N ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	54
4.15 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>Chlorella sp. CirG</i> ที่บ่มใน TAP-N ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	54
4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Chlorella sp. CirG</i> ที่บ่มเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่างๆ	57
4.17 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>Chlorella sp. CirG</i> ที่บ่มเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่างๆ	57
4.18 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Chlorella sp. CirG</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มี	

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน..... 60
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.19 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>Chlorella</i> sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มี ความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน.....	60



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การเคลื่อนที่ของไอออนและการเกิดปฏิกิริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า.....	4
2.2 การเคลื่อนที่ของไอออนและเซลล์เคมีไฟฟ้าในกระบวนการแยกกรองด้วยไฟฟ้า	6
2.3 ลักษณะของ <i>A. halophytica</i> ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10µm.....	8
2.4 องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i>	10
2.5 วัฏจักรชีวิตของ <i>Chlamydomonas</i>	11
2.6 องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella vulgaris</i>	13
2.7 การแบ่งเซลล์ระยะต่าง ๆ ของ <i>C. vulgaris</i>	13
2.8 สาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus obliquus</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	15
2.9 องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	15
4.1 การเจริญเติบโตของ <i>A. halophytica</i> ในอาหาร BG-11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (ก) และการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (ข).....	29
4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (รูปที่ 4.2ก) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.2ข) และความหนาแน่นของเซลล์ (รูปที่ 4.2ค).....	31
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่ 24 ของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 สูตรปกติและที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N (ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท)	34
4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 สูตรปกติและเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N (ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท)	35
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมง ของ <i>Chlorella</i> sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาด โพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน(TAP-N) และ ซัลเฟอร์ (TAP-S).....	37
4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนของ <i>Chlorella</i> sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารขาดโพแทสเซียม(TAP-K), ไนโตรเจน(TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S).....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมงของ <i>Scenedesmus obliquus</i> 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม(TAP-K), ไนโตรเจน(TAP-N)และซัลเฟอร์ (TAP-S)	40
4.8 ผลผลิตไฮโดรเจนของ <i>Scenedesmus obliquus</i> 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S)	41
4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S).....	43
4.10 ผลผลิตไฮโดรเจนของ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S)	44
4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง	47
4.12 การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ <i>A. halophytica</i> ที่บ่มในอาหาร BG11-N ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่บ่มในอาหารเหลว TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง	49
4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่บ่มเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีแสง	50
4.14 การผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ที่บ่มในอาหาร BG11-N ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหารเหลว TAP ที่ขาดอาหารบางชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์การโตในสภาวะที่มีแสง	52
4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขังในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp.</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	55
4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp.</i> CirG ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่างๆ.....	56
4.18 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp.</i> ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่แตกต่างกัน	58
4.19 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp.</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน	59
4.20 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp.</i> ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานหมุนเวียนที่สะอาดและไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ไฮโดรเจนสามารถสังเคราะห์ได้จากวัตถุดิบตามธรรมชาติหลากหลายประเภท เมื่อเกิดการเผาไหม้ไฮโดรเจนก็จะมีเพียงน้ำและออกซิเจนเท่านั้นที่เป็นผลพลอยได้ ซึ่งแตกต่างจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงอื่นที่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งส่งผลกระทบต่อตรงต่อทำให้โลกร้อนขึ้น (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน, 2552) การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในปัจจุบันเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการผลิตไฮโดรเจน เพราะว่ามีต้นทุนที่ต่ำโดยสามารถผลิตไฮโดรเจนจากพลังงานแสงและน้ำ

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีหลายลักษณะมีทั้งเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นเส้นสายและเป็นกลุ่ม สามารถสังเคราะห์แสงได้ เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรียสามารถพบได้ตามธรรมชาติในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำพุร้อน ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เนื่องจากมีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษา *Aphanothece halophytica* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดี่ยวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) สามารถสังเคราะห์แสงได้และสามารถเพาะเลี้ยงโดยไม่ยุ่งยาก (กระทรวงพลังงาน, 2550) มีศักยภาพในการเพิ่มจำนวนสูง (อาภารัตน์, 2551) ให้ผลผลิตในปริมาณมาก นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากในปัจจุบันได้มีความสนใจนำเอาสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน การทดลองนี้ได้นำเอาสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. CirG, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 มาทำการศึกษาการเจริญเติบโตและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยง เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งในอนาคตสามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนำไปพัฒนางานวิจัยในด้านพลังงานทดแทนต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย
- 1.2.2 ศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลวสูตรปกติและอาหารที่ขาดธาตุอาหารบางชนิด
- 1.2.3 ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงร่วมกัน
- 1.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เริ่มจากการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* และสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. CirG, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus obliquus* 8546 จากนั้นนำมาศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* และสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปกติและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดแหล่งธาตุอาหาร โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ใช้อาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution นำเซลล์มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยเปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร BG11-N (ที่ปราศจากไนโตรเจน) เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว TAP (Tris acetate phosphate) และอาหารเหลว TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารบางชนิด อาทิ เช่น ซัลเฟอร์ (TAP-S) ไนโตรเจน (TAP-N) และโพแทสเซียม (TAP-K) จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายที่มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ ชนิดของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงที่ทำการบ่มเซลล์เพื่อวัดไฮโดรเจนในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography : GC) โดยเปรียบเทียบกับก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในก๊าซอาร์กอนสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว
 - 1.4.2 ทราบปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในอาหารสูตรปกติและอาหารที่ขาดธาตุอาหารบางชนิด
 - 1.4.3 ทราบอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน
 - 1.4.4 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน พลังงานได้เข้ามามีบทบาทในการดำเนินชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก โดยพลังงานส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้เพื่อให้เกิดความสะดวกสบายในชีวิตประจำวัน นอกจากนี้ ยังถูกนำมาใช้ในงานทางด้านอุตสาหกรรม ไฟฟ้า การคมนาคม พลังงานถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ พลังงานที่ใช้แล้วหมดไปและพลังงานหมุนเวียน พลังงานที่ใช้แล้วหมดไปคือพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด เช่น น้ำมัน ถ่านหิน ในปัจจุบันโลกกำลังเผชิญปัญหาสภาวะโลกร้อนอันเนื่องมาจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่ไม่สมบูรณ์มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และฝุ่นละออง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีปริมาณพลังงานสำรองในประเทศ โดยแบ่งเป็นปริมาณน้ำมันซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี ปริมาณถ่านหินที่สามารถใช้ได้อีกแค่ประมาณ 60 ปี ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เนื่องจากพลังงานที่มีอยู่กำลังจะหมดไปและพลังงานทดแทนที่ผลิตได้นั้นจะต้องเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม พลังงานทดแทนในปัจจุบัน ได้แก่ พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานในมหาสมุทร (ชัยชาญ, 2547)

ไฮโดรเจนมีคุณสมบัติเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส มีคุณสมบัติเบากว่าอากาศ มีความสามารถในการติดไฟได้ง่าย ในบรรยากาศมีก๊าซไฮโดรเจนอยู่เพียงเล็กน้อย ประมาณร้อยละ 0.01 เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาผลาญในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งจะก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ ไฮโดรเจนให้พลังงานที่สูงมากๆ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ โดยไฮโดรเจนให้พลังงานสูงถึง 52,000 บีทียูต่อปอนด์

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายวิธี เช่น การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการกระบวนการทางเคมี การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล

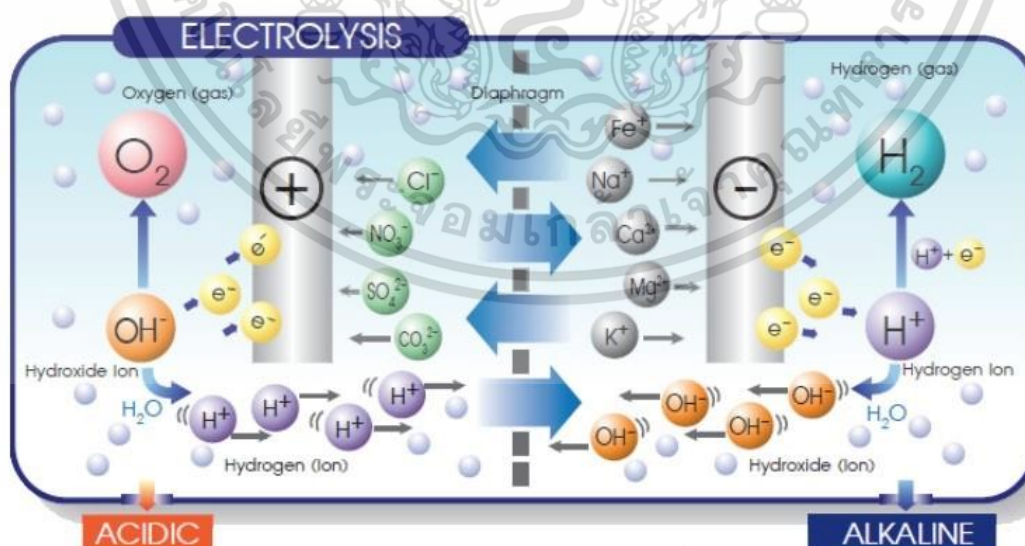
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการรีฟอร์มมีเทน (Methane reforming)

เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไฮโดรคาร์บอน โดยอาศัยหลักการการแตกตัวเป็นอนุโมลอิสระของก๊าซพาหะ (Carrier gas) ด้วยแรงดันไฟฟ้าที่ความดันบรรยากาศ แล้วทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น มีข้อดีคือทำให้เกิดปฏิกิริยารีฟอร์มมิง (Reforming reaction) ได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีกำมะถันได้ มีประสิทธิภาพดี ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยและให้อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นสูง แต่จำเป็นต้องอาศัยแหล่งจ่ายไฟฟ้าศักย์สูง และอาจเกิดเสื่อมสภาพของขั้วไฟฟ้าได้เมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้า

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแยกสลายด้วยไฟฟ้า (Electrolysis)

การให้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ขั้วไฟฟ้าของเซลล์เคมีไฟฟ้าเพื่อให้ไอออนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เคลื่อนที่ไปเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้า ปฏิกิริยาเคมีเกิดเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) หรือ รีดักชัน (Reduction) ในทิศทางที่ไม่สามารถเกิดเองได้ถ้าไม่ให้กระแสไฟฟ้า โดยกระแสไฟฟ้าที่ให้จะต้องให้มากกว่าค่าโวลต์มาตรฐานที่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น เช่น การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าจะต้องใช้ค่าโวลต์ที่สูงกว่า 1.229 โวลต์ ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าที่ขั้วแคโทดเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) ของโปรตอน (ไฮโดรเจนไอออน) ในภาวะกรด ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$) ส่วนในภาวะเบสจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำ ($2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$) (รูปที่ 2.1) ที่ขั้วแอโนดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ก๊าซออกซิเจน ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) ข้อดีของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพสูง ข้อเสียคือค่าใช้จ่ายด้านกระแสไฟฟ้าสูง



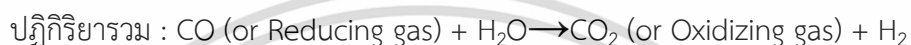
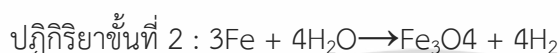
รูปที่ 2.1 การเคลื่อนที่ของไอออนและการเกิดปฏิกิริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า

ที่มา : <https://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการไอน้ำ – เหล็ก (Steam – iron process)

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางการค้าเก่าแก่ที่สุดที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงโดยใช้ปฏิกิริยารีดักชัน-ออกซิเดชัน (Reduction-Oxidation) ของเหล็กออกไซด์ (Iron oxide) หรือแมกนีไทต์ (Magnetite, Fe_3O_4) ประกอบด้วยปฏิกิริยา 2 ขั้น ได้แก่ ขั้นของปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) ของเหล็กออกไซด์ด้วยก๊าซรีดิวซ์ (Reducing gas) เช่น ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์แก๊สไฮโดรคาร์บอน และก๊าซสังเคราะห์และขั้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็กด้วยไอน้ำ

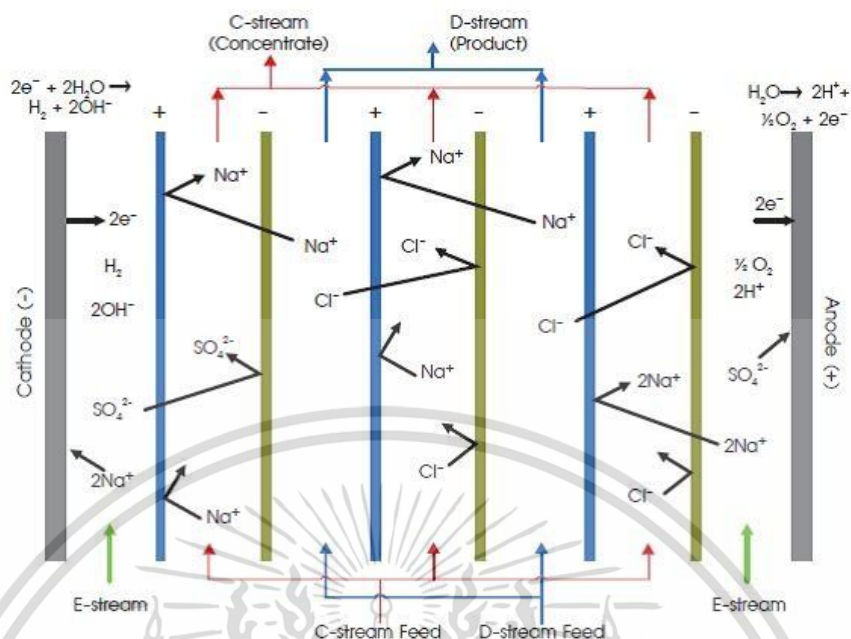


นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นๆ ที่ไม่ใช่ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 และ 2 ด้วย จึงส่งผลให้เกิดเหล็กออกไซด์ได้หลายรูปแบบในผลิตภัณฑ์ เช่น วูสไทต์ (Wustite, FeO) และเกิดปฏิกิริยาการแตกสลายออกซิเดชันขึ้นจำนวนมากพร้อมๆ กัน

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการแยกกรองด้วยไฟฟ้า (Electrodialysis)

เป็นการแยกไอออนโดยเฉพาะไอออนของสารละลายเกลือผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนได้ความเข้มข้นของไอออนบวกและลบที่สูงขึ้นในแต่ละช่องเซลล์เคมีไฟฟ้าโดยอาศัยความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้าให้กับระบบ (รูปที่ 2.2) สารละลายความเข้มข้นต่ำจะเข้าสู่เซลล์เคมีไฟฟ้าที่มีเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบและบวกคั่นอยู่ระหว่างขั้วไฟฟ้า ไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแอโนดผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบ จากนั้นจะถูกกั้นด้วยเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนบวก ส่วนไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนบวกและถูกกั้นด้วยเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบ ทำให้เกิดการกรองแยกเป็นส่วนที่มีความเข้มข้นสูงของไอออนลบและบวกคนละช่องของเซลล์ที่กั้นด้วยเมมเบรน การกรองแยกนี้นิยมใช้กันในรูปของเซลล์ที่ต่อเป็นแบบอนุกรมหลายเซลล์โดยคั่นด้วยเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบและบวกสลับกันไป ผลพลอยได้ของกระบวนการนี้ คือ เกิดก๊าซไฮโดรเจนที่ขั้วแคโทด และก๊าซออกซิเจนที่ขั้วแอโนดโดยมีกลไกเดียวกับการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การเคลื่อนที่ของไอออน และเซลล์เคมีไฟฟ้าในกระบวนการแยกกรองด้วยไฟฟ้า
ที่มา : <https://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/>

2.2.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (Steam reforming) เป็นปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและไอน้ำ อาศัยความร้อนจนทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน โดยในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่อุตสาหกรรมนิยมใช้เรียกว่า Coal gasification โดยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการนี้ก่อให้เกิดมลพิษอันเนื่องมาจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ คาร์บอนไดออกไซด์ จึงทำให้ในปัจจุบันมีการสนใจการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตมากขึ้น

2.2.6 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (Biohydrogen)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ (Microorganism) ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) แบคทีเรีย (Bacteria) ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) โดยใช้เอนไซม์ หรือสารประกอบจำพวกโปรตีนช่วยเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพสามารถจำแนกได้เป็น 2 แบบ ได้แก่ การจำแนกตามการใช้แสงภายในกระบวนการ คือ กลุ่มที่ใช้และไม่ใช้แสงภายในกระบวนการ และการจำแนกตามลักษณะของกระบวนการ การผลิตไฮโดรเจนทางตรงและทางอ้อม การผลิตไฮโดรเจนโดย สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก และ ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับว่าผูกพันไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไฮโดรเจนที่มีต้นทุนต่ำเพราะใช้ทรัพยากรสิ่งแวดล้อมที่มีอยู่ไม่จำกัดเช่น แสงและน้ำ นอกจากนี้ ยังง่ายต่อการ

เพาะเลี้ยงและสามารถเพาะเลี้ยงและเจริญโตในระบบปิดทำให้สามารถดักจับก๊าซได้ โดยเอนไซม์พื้นฐานสามชนิดสามารถพบได้ในจุลินทรีย์เหล่านี้ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนและเมแทบอลิซึม ได้แก่ ไฮโดรจีเนสแบบสองทิศทาง ไฮโดรเจนเนสที่จับกับเมมเบรนและไนโตรจีเนส เอนไซม์เหล่านี้สามารถทำงานพร้อมกันได้และมีการเปลี่ยนแปลงในกิจกรรมโดยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในสภาวะการเจริญเติบโต

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 จำพวกใหญ่ๆ ดังนี้

2.3.1 กลุ่มโฟโตโทรฟิกโพรคาริโอต (Phototrophic prokaryote)

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน คือ ไชยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยไชยาโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงและได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ระบบสังเคราะห์แสงของไชยาโนแบคทีเรียมี 2 ระบบมีคลอโรฟิลล์เหมือนพืชและสาหร่ายสีเขียว

2.3.2 กลุ่มโฟโตโทรฟิกยูคาริโอต (Phototrophic eukaryote)

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ใช้แสง ได้แก่ สาหร่าย สาหร่ายบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยจะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์สาหร่ายจะเกิดการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการผลิตไฮโดรเจน

2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogen : acceptor oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิต โดยจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจนหรือเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตและยูคาริโอต

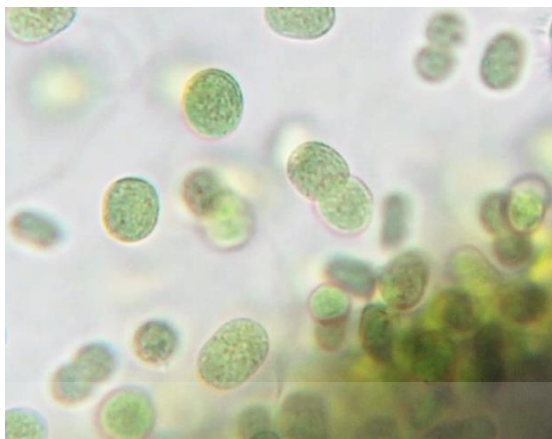
2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1. ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรีย จัดเป็นโพรคาริโอตเช่นเดียวกับแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญของไชยาโนแบคทีเรียคือ มีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียทั่วไป ในโครงการงานพิเศษนี้ทำการศึกษาในไชยาโนแบคทีเรีย

Aphanothece halophytica (รูปที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ลักษณะของ *A. halophytica*

ที่มา : <https://colombia.inaturalist.org/taxa/1143297-Aphanothece-halophytica>

A. halophytica มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีรงควัตถุคลอโรฟิลล์เอสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีความเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 - 3.0 โมลาร์ สืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์และไม่มีการสร้างเอกไซสปอร์ มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ การขาดสารอาหาร ความเข้มข้นของ NaCl และแหล่งคาร์บอน ค่า pH ความเข้มของแสง และอุณหภูมิ

ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านโฟโตไลซิสโดยตรง ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานแสงอาทิตย์ในการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ภายใต้สภาวะไร้อากาศและในที่ที่มีแสง *A. halophytica* สามารถเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมของสังเคราะห์ด้วยแสงไปเป็นการผลิตไฮโดรเจน การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นจากการยับยั้งเอนไซม์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตออกซิเจน ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จะถูกรวบรวมและใช้เป็นแหล่งพลังงานสะอาด

A. halophytica ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านการหมักด้วยแสง ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์เป็นก๊าซไฮโดรเจนเมื่อมีแสง วิธีนี้ใช้พลังงานแสงเพื่อสลายสารตั้งต้นอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรตหรือกรดอินทรีย์ ให้เป็นไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และผลพลอยได้อื่นๆ เส้นทางเมแทบอลิซึมนี้ต้องการสภาวะไร้อากาศและเอนไซม์เฉพาะสำหรับกระบวนการหมัก

การผลิตไฮโดรเจนโดย *A. halophytica* มีข้อดีหลายประการ เช่น การผลิตในอาหารที่มีความเค็มสูง เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการผลิตไฮโดรเจนในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำเค็มหรือน้ำกร่อยเพราะมีคุณสมบัติในการทนเค็มทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2. สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

โครงการพิเศษนี้ใช้สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตไฮโดรเจน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. CirG และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

2.5.2.1 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii จัดอยู่ใน

Domain Eukaryota

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlamydomonadales

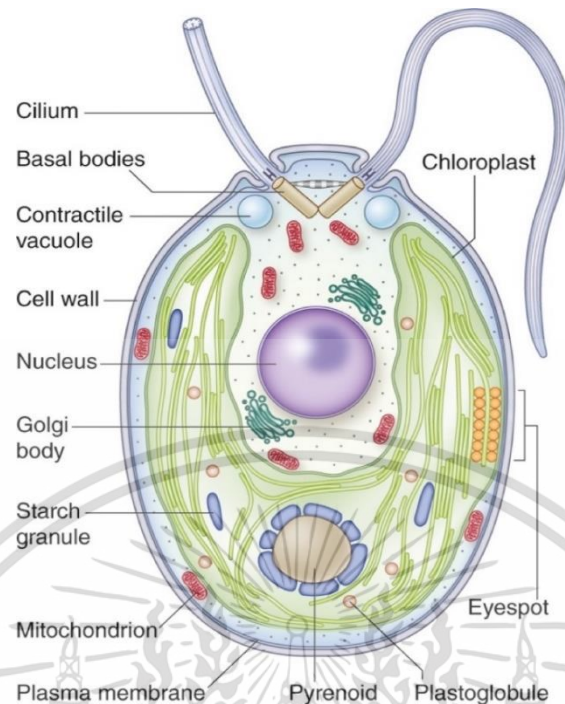
Family Chlamydomonadaceae

Genus *Chlamydomonas*

Species *C. reinhardtii*

สาหร่าย *C. reinhardtii* เป็นสาหร่ายสีเขียวที่พบได้ในน้ำและพบในดิน โดยทั่วไปเซลล์จะมีรูปร่างคล้ายลูกแพร์และมีเซลล์เดียว มีความยาวตั้งแต่ 10 ถึง 20 ไมโครเมตร มีผนังเซลล์ประกอบไปด้วย Hydroxyproline glycoprotein เป็นส่วนมาก และมี flagella 2 เส้น ที่ใช้สำหรับการเคลื่อนที่ มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย มีไพรีนอยด์ขนาดใหญ่ มีอายสพอตทำหน้าที่ในการรับแสง มีคลอโรฟิลล์เอและบี รวมถึงสารสีอื่นๆ (รูปที่ 2.9) ซึ่งทำให้สามารถจับพลังงานแสงและแปลงเป็นพลังงานเคมีได้ *C. reinhardtii* สามารถเจริญเติบโตได้เองโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์และแสงเพื่อผลิตสารประกอบอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



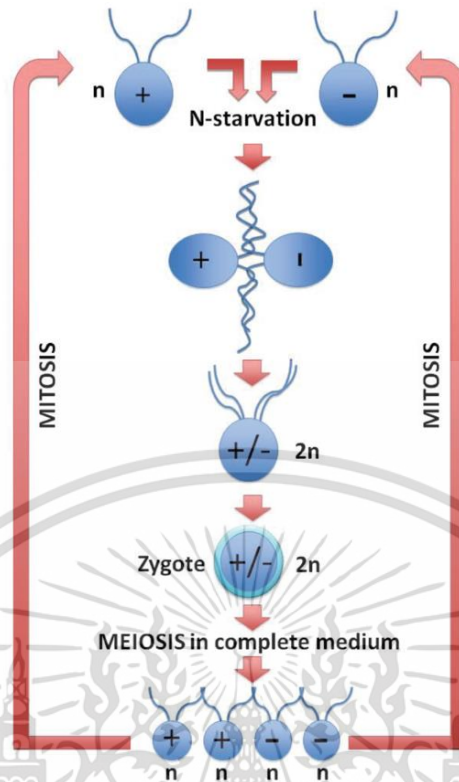
รูปที่ 2.4 องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

ที่มา : <https://iif.elifesciences.org/lax/39233%2Felifesciences-39233-fig1-v1.tif/full/full/0/default.jpg>

2.5.2.1.1 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ภายใต้สภาวะบางประการ *C. reinhardtii* สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศผ่านการหลอมรวมกันของ gamete สองตัวที่เข้ากันได้ กระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับการก่อตัวของโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า gametangia และการก่อตัวของไซโกตที่ตามมา โดยแต่ละเซลล์จะมีการสร้าง Mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (Actin) อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นเซลล์จะหลั่ง Agglutinin ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีน เพื่อกระตุ้นการจับกันของแฟลกเจลลาระหว่างเซลล์ที่มี Mating type ตรงข้ามกัน จากนั้นเซลล์ทั้งสองจะรวมตัวกันกลายเป็นเซลล์เดี่ยวที่ประกอบไปด้วยแฟลกเจลลา 4 สาย เมื่อแฟลกเจลลาสลายไป เซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่มีความหนาเป็นพิเศษเพื่อปกป้องไซโกตที่อยู่ในรูปของดิพลอยด์ เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม ไซโกตจะแบ่งเซลล์ไมโอซิส เกิดเป็นแฮพลอยด์ 4 เซลล์และจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสต่อไป (รูปที่ 2.6) (Harris, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas*

ที่มา : อัญชลี ศิริขจรกิจ, 2011

2.5.2.1.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโปรตอนและอิเล็กตรอนเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน การจำกัดซัลเฟอร์ เป็นวิธีการที่ใช้บ่อยที่สุดในการกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนใน *C. reinhardtii* ในการจำกัดปริมาณซัลเฟอร์ เซลล์จะเปลี่ยนกระบวนการ เมแทบอลิซึมของเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.2 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG

ในปี ค.ศ. 1890 นักวิทยาศาสตร์ชาว Dutch ชื่อ Martinus Beijerinck ได้ค้นพบสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่มีนิวเคลียสที่ชัดเจน *Chlorella* (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014)

Kingdom Protista

Division Chlorophyta

Class Trebouxiophyceae

Order Chlorellales

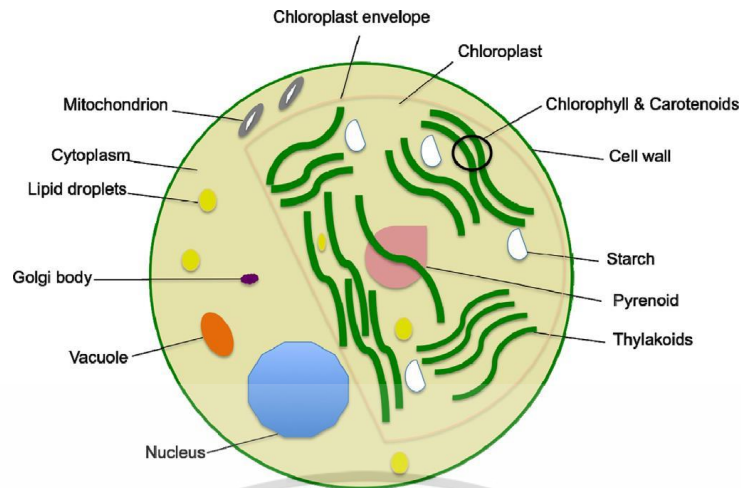
Family Chlorellales

Genus *Chlorella*

Species *Chlorella vulgaris*

C. vulgaris เป็นสาหร่ายขนาดเล็ก ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงเป็นสาหร่ายเซลล์เดียว มีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาด 5-10 μm (Scragg, Morrison, & Shales, 2003) มีองค์ประกอบหลายอย่าง คล้ายกับพืช หลังสาหร่าย *C. vulgaris* แบ่งตัวเสร็จสมบูรณ์มีขนาด 17-21 μm (M. Yamamoto, Fujishita, Hirata, & Kawano, 2004) และที่ผนังเซลล์ชั้น Microfibrillar มีลักษณะเหมือน Chitosan ซึ่งประกอบไปด้วย Glucosamine *C. vulgaris* มี Mitochondria ที่มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น โดยเยื่อหุ้มชั้นนอกหุ้มล้อมรอบ Organelle ซึ่งจะประกอบด้วย โปรตีน และ Phospholipid ส่วนเยื่อหุ้มชั้นในจะประกอบด้วยโปรตีน ซึ่งล้อมรอบพื้นที่ภายในที่เรียกว่า Matrix โดย Matrix จะประกอบด้วย Mitochondrial protein สาหร่าย *C. vulgaris* มี Chloroplast 1 อันที่มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้นที่ประกอบด้วย Phospholipid โดยเยื่อหุ้มชั้นนอกทำหน้าที่ดูดซึมสารและไอออน เยื่อหุ้มชั้นในทำหน้าที่เฉพาะในการขนส่งโปรตีน *C. vulgaris* มีเม็ดแป้งที่สะสม Amylose และ Amylopectin ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโต ใน Pyrenoid จะมี Ribulose-1,5-bisphosphatecarbox-ylaseoxygenase (RuBisCO) ปริมาณมาก ซึ่งจะทำหน้าที่ตรึงก๊าซ CO₂ Chloroplast เป็นที่เก็บ Thylakoids ที่มี Chlorophyll เป็นรงควัตถุหลัก และมีการสังเคราะห์สีอื่น ๆ ด้วย เช่น Lutein (รูปที่ 2.6) (Safi et al., 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

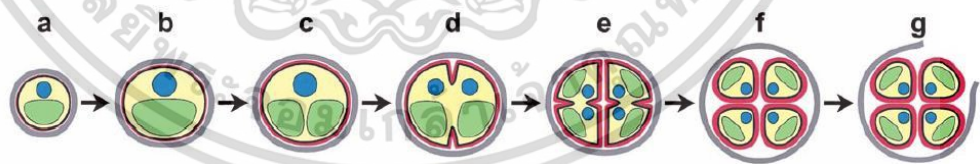


รูปที่ 2.6 องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris*

ที่มา : Safi et al. (2014)

2.5.2.2.1 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris*

สาหร่าย *C. vulgaris* สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้าง Autospore ภายในเซลล์แม่ (Mother cell) ใน Autospore จะมีเซลล์ลูก (Daughter cell) 2 หรือ 4 เซลล์ต่อหนึ่ง Autospore แต่สามารถมีเซลล์ลูกได้ถึง 3, 4, 8, 16 หรือ 32 เซลล์ในหนึ่ง autospore (M. Yamamoto, Nozaki, Miyazawa, Koide, & Kawano, 2003) การแบ่งเซลล์แบ่งได้ 7 ระยะ ได้แก่ Early cell growth phase, Late cell growth phase, Chloroplast dividing phase, First protoplast dividing phase, Second protoplast dividing phase, Autospore maturing phase และ Hatching phase (M. Yamamoto et al., 2004) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 การแบ่งเซลล์ระยะต่างๆ ของ *C. vulgaris*

ที่มา: M. Yamamoto et al. (2004)

(a) Early cell growth phase (b) Late cell growth phase

(c) Chloroplast dividing phase (d) First protoplast dividing phase

(e) Second protoplast dividing phase (f) Autospore maturing phase

(g) Hatching phase เส้นสีอ่อนเป็นผนังเซลล์ของเซลล์แม่และเส้นสีเข้มเป็น

ผนังเซลล์ของเซลล์ลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris*

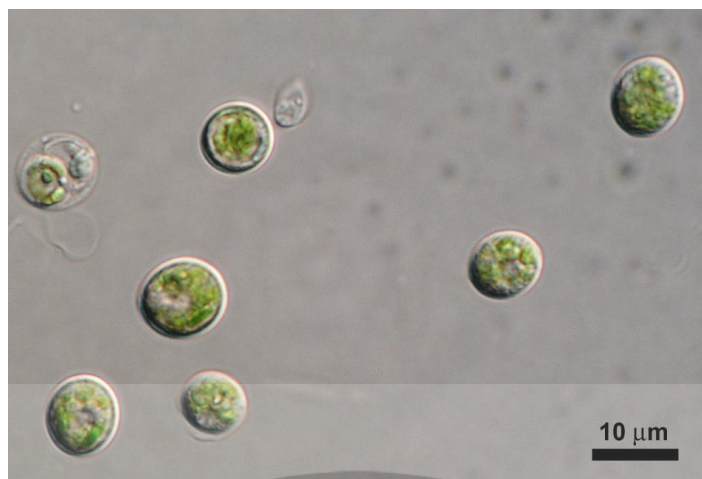
สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* สามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เมื่อสาหร่ายสัมผัสกับแสงและอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด สาหร่ายจะกระตุ้นเอนไซม์ที่เรียกว่าไฮโดรจีเนส ช่วยให้โมเลกุลของน้ำ (H_2O) แตกตัวเพื่อปล่อยก๊าซไฮโดรเจน (H_2) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของกระบวนการนี้มักจะถูกจำกัดโดยความไวของไฮโดรจีเนสต่อออกซิเจนและการแข่งขันสำหรับอิเล็กตรอนกับวิถีเมแทบอลิซึมอื่นๆ ในสาหร่าย

2.5.2.3 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

Scenedesmus จัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) พบว่า *Scenedesmus obliquus* จัดอยู่ใน Kingdom Plantae
Division Chlorophyta
Phylum Chlorophyta
Class Chlorophyceae
Order Chlorococcales
Family Scenedesmaceae
Genus *Scenedesmus*

เป็นสาหร่ายที่พบในน้ำจืด อาศัยอยู่ในน้ำนิ่ง หรืออาจพบในดิน ภายใต้การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* จะอยู่ในสภาพเซลล์เดี่ยว แต่ถ้าหากนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวโดยมีการเขย่า เซลล์จะไม่จับกันเป็นกลุ่มแต่ยังคงอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยมีขนาดเซลล์ประมาณ 10-20 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.8) ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ ประกอบด้วยออร์แกเนลล์ต่างๆ เช่น นิวเคลียส (Nucleus) คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งแต่ละออร์แกเนลล์ก็จะมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป

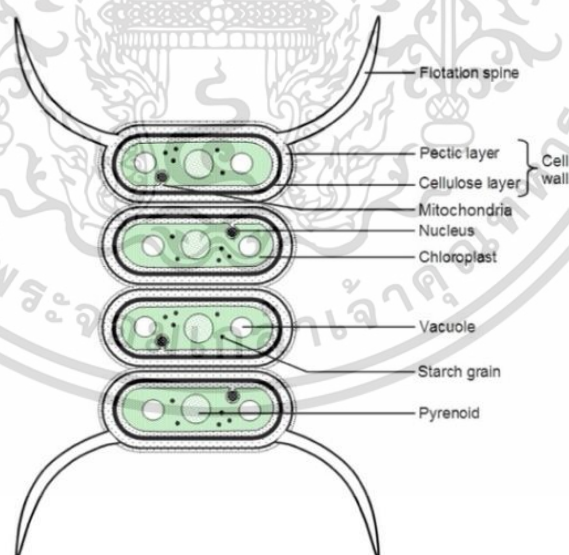
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา : <https://ccala.butbn.cas.cz/en/scenedesmus-obliquus-turpin-kuetzing-0>

2.5.2.3.1 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีรูปร่างและลักษณะแบ่งออกเป็น 2 แบบดังนี้ (1) เซลล์เดี่ยว (Unicellular form) มีรูปร่างได้หลายแบบคือ กลม กลมรี รูปร่างคล้ายรูปกระสวย พระจันทร์เสี้ยว เป็นต้น สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kuetzing เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีรูปร่างทรงกลม (2) เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (Colony form) เซลล์จะเกาะกันเป็นกลุ่มจำนวน 2, 4, 8, 16 หรือ 32 เซลล์ โดยด้านข้างของผนังเซลล์แต่ละเซลล์แตกต่างกัน (ดังรูปที่ 2.9) (Hindák and Hindáková, 2008)



รูปที่ 2.9 องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*
ที่มา : http://cronodon.com/BioTech/Algal_Bodies.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.3.2 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สาหร่ายสีเขียวจะสืบพันธุ์โดยใช้เซลล์สืบพันธุ์ แกมีต (Gamete) เมื่อเกิดการผสมพันธุ์ของแกมีต จะพัฒนากลายเป็นไซโกต (Zygote) หลังจากนั้นไซโกตจะพัฒนาไปเป็นสปอร์ที่มีโครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ไซโกสปอร์ (Zygospore) และเจริญกลายเป็นเซลล์ใหม่ต่อไป ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* จะอาศัยการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 หรือการสร้างออตสปอร์ ซึ่งในแต่ละเซลล์จะสร้างออตสปอร์เท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อเซลล์แก่ออตสปอร์จะหลุดจากผนังเซลล์แม่และจับกันเป็นโคโลนีใหม่

2.5.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

เซลล์ของสาหร่ายจะมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถกระตุ้นการแยกโมเลกุลของน้ำ (H_2O) เพื่อปลดปล่อยก๊าซโมเลกุลไฮโดรเจน (H_2) โดยภายใต้สภาวะไร้อากาศสาหร่ายขนาดเล็กเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ปราศจากออกซิเจน (O_2) ซึ่งเอื้อต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nattanon Chinchusak และคณะ (2022) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* โดยทำการศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์และสารรีดิวซ์ชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่ามียัตราการผลิตไฮโดรเจน สูงสุดที่ 55.80 ± 0.50 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมต่อน้ำหนักแห้ง บ่มเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่มีกลูโคส 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ภายใต้สภาวะไร้อากาศในที่มืด อัตรานี้สูงกว่าอัตราที่ไม่มีน้ำตาลถึง 1.5 เท่า ในบรรดาตัวรีดิวซ์ที่ทดสอบ เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล ไดไทโอทรีทอล แอล-ซิสเทอีน และโซเดียมซัลไฟด์มีศักยภาพสูงในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่มีประสิทธิผลในการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน โดย *A. halophytica* เซลล์ที่บ่มด้วยโซเดียมซัลไฟด์ 50 มิลลิโมลาร์ มีการสะสมไฮโดรเจนสูงสุดที่ 4815.59 ± 194.78 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อกรัมต่อน้ำหนักแห้ง หลังจากการบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจากกิจกรรมของไฮโดรจีเนสที่เพิ่มขึ้นและอัตราการผลิตออกซิเจนที่ลดลง ผลผลิตการผลิตไฮโดรเจนนี้สูงกว่าเมื่อไม่มีสารรีดิวซ์ประมาณ 20 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alejandro Ruiz-Marin และคณะ (2020) พบว่า *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียสามารถผลิตไบโอไฮโดรเจนในสภาวะการจำกัดกำมะถัน (S) ในสภาวะไร้อากาศที่ pH 7.5 และอุณหภูมิที่ 30 °C ที่ความเข้มแสง 140 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าแสงสีน้ำเงินกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายมากกว่าแสงสีม่วง ในขณะที่การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีม่วงคือ 128 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (ผลผลิต 204.8 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อวัน) และ 60.4 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (ผลผลิต 39.18 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อวัน) *S. obliquus* และ *C. vulgaris* ตามลำดับ

Jun Pyo Kim และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนใน *C. reinhardtii* โดยการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 60-200 ไมโครโมลไอน์สไต้นต่อตารางเมตรต่อวินาที ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ ภายใต้สภาวะไร้อากาศ พบว่า *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด คือ 225 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของการเพาะเลี้ยง หรือ 2.01 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ใน 24 ชั่วโมงแรก ที่ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลไอน์สไต้นต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่เมื่อความเข้มแสงที่ 300 ไมโครโมลไอน์สไต้นต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าการผลิตไฮโดรเจนหยุดลง เนื่องมาจากระบบแสงสองถูกยับยั้งโดยแสง (photodamage)

Neda Fakhimi และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli*, *P. stutzeri* และ *P. putida* ร่วมกับ *Chlamydomonas reinhardtii* พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มแสงน้อย การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับ *Chlamydomonas* สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้มากถึง 56 เปอร์เซ็นต์ การหายใจของแบคทีเรียช่วยให้ออกซิเจนในระบบลดลง ส่งผลให้ไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น

Samart Taikhao และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลธรรมชาติที่มีความเค็มและแร่ธาตุสูง โดยเติมสารอาหารที่จำเป็นบางชนิด และศึกษาผลกระทบของปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากแสง ซึ่งจากการทดลองพบว่า *A. halophytica* สามารถเติบโตได้ในน้ำทะเลธรรมชาติที่เติม NaNO_3 โดยเซลล์ที่เติบโตในน้ำทะเลที่เสริมด้วย NaNO_3 เพียง 1.76 มิลลิโมลาร์ มีการเติบโตที่คล้ายคลึงกันกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน BG11 ปกติที่เสริมด้วยสารละลายเกลือ Turk Island โดยมีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ในน้ำทะเลที่ไม่มีการเสริม NaNO_3 ภายใต้สภาวะนี้ *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 82.79 ± 3.47 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง พบได้ในเซลล์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ pH 6 ด้วยการเสริมกลูโคส 378 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร, 0.25 โมลาร์ NaCl และ 0.4 ไมโครโมล Fe^{3+} การสะสมไฮโดรเจนระยะยาวที่ $1,864 \pm 81$ นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัม โดยวัดน้ำหนักแห้งหลังจากการบ่มในที่มีมืดเป็นเวลา 8 วัน ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนและผลผลิตการผลิตไฮโดรเจนนั้นคงอยู่อย่างน้อยถึง 14 วัน ซึ่งบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากน้ำทะเลธรรมชาติในการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* เพื่อผลิตการผลิตไฮโดรเจนในระยะยาว

สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายที่ใช้ในโครงการพิเศษ

3.1.1 สาหร่าย 4 สายพันธุ์ ได้จากห้องปฏิบัติการ

- 3.1.1.1 ไชยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica*
- 3.1.1.2 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG
- 3.1.1.3 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124
- 3.1.1.4 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

- 3.2.1.1 อาหารเพาะเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรีย BG11 (ภาคผนวก ก)
- 3.2.1.2 อาหารเพาะเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรีย BG11 ที่ปราศจากธาตุไนโตรเจน
- 3.2.1.3 อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว TAP (ภาคผนวก ข)
- 3.2.1.4 อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว TAP ที่ปราศจากธาตุไนโตรเจน
- 3.2.1.5 อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว TAP ที่ปราศจากธาตุโพแทสเซียม
- 3.2.1.4 อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว TAP ที่ปราศจากธาตุซัลเฟอร์

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการสกัดคลอโรฟิลล์

- 3.2.2.1 เมทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (99% methanol)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้

- 3.2.3.1 แอมโมเนียมคลอไรด์
- 3.2.3.2 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต

เอกสารนี้ 3.2.3.3 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ศึกษานี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.3.4 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
- 3.2.3.5 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
- 3.2.3.6 กรดบอริก
- 3.2.3.7 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต
- 3.2.3.8 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต
- 3.2.3.9 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต
- 3.2.3.10 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต
- 3.2.3.11 โพแทสเซียมคลอไรด์
- 3.2.3.12 Tris-Base
- 3.2.3.13 Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate)
- 3.2.3.14 สารละลาย ไดโซเดียม EDTA
- 3.2.3.15 โซเดียมไฮดรอกไซด์
- 3.2.3.16 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
- 3.2.3.17 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.3 ก๊าซที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน

- 3.3.1 อาร์กอน 99 เปอร์เซ็นต์ (Argon 99%)
- 3.3.2 ไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (Hydrogen 4% in argon)

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 กรวยกรอง (Funnel)
- 3.4.2 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.4.3 กระจาดกรอง (Glass Microfiber Filter GF/C)
- 3.4.4 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- 3.4.5 ขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial)
- 3.4.6 ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.4.7 ขวดแก้วขนาด 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้ 3.4.8 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask) ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่าการ 3.4.9 เข็มฉีดยา (Syringe) หักดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.10 เข็มเย็บเย็บปลายมน (Loop)
- 3.4.11 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
- 3.4.12 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatograph : GC)
- 3.4.13 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
- 3.4.14 เครื่องชั่งละเอียด 3,4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 3.4.15 เครื่องบ่มเขย่า (Incubator shaker)
- 3.4.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.4.17 เครื่องปั๊มสุญญากาศ รุ่น VE-11 (Aspirator pump)
- 3.4.18 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.4.19 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.4.20 จานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petridish)
- 3.4.21 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
- 3.4.22 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
- 3.4.23 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.4.24 ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 7 และ -4 องศาเซลเซียส
- 3.4.25 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- 3.4.26 สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer)
- 3.4.27 หม้อนึ่งความดันไอฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 3.4.28 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.4.29 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 3.4.30 แท่งแก้วตัวแอล (L-shape glass rod)
- 3.4.31 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 วิธีการต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

3.5.1.1 การเตรียมหัวเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นบนจานอาหารแข็ง BG11 ที่มีค่า pH 7.5 เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นจึงนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี บนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบให้แสงสลับกับไม่มีแสง (แสง 16 ชั่วโมง : มีด 8 ชั่วโมง) เป็นเวลาระยะเวลา 14-21 วัน

3.5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. CirG และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกโคโลนีของสาหร่ายบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3-5 วัน

3.5.1.3 วิธีการสกัดคลอโรฟิลล์และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

นำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเมทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อนำมาทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ นำไปปั่นในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 665 นาโนเมตร คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ดังในสมการที่ 1.1

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์} = 12.7 \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร} \times 10 \text{ (สมการที่ 1.1)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.4 วิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์สำหรับสาหร่ายสีเขียว

นำสารแขวนลอยเซลล์มาใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเมทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อนำมาทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ จากนั้น นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 665 นาโนเมตร (สมการที่ 1.2) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี = Chlorophyll A + B = $(4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650})$ (สมการที่ 1.2)

3.5.1.5 นับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว

นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว ปริมาตรละ 10 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ทำการนับเซลล์โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (Hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

จำนวนเซลล์ ($10^6 \text{ cell mL}^{-1}$) = $(\bar{x} \times 25 \times 10^4)$ (สมการที่ 1.3)

3.5.1.6 การหาน้ำหนักแห้งของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

นำกระดาษกรอง Glass Microfiber Filters GF/C ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ นำเซลล์แขวนลอยที่เหลือไปกรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้เครื่องปั๊มสุญญากาศ จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปใส่ลงในโถดูดความชื้น (Desiccator) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแห้งคำนวณหาน้ำหนักแห้งดังสมการที่ 1.4

น้ำหนักแห้ง = นน. กระดาษกรองหลังการกรอง - นน. กระดาษกรองก่อนการกรอง (สมการที่ 1.4)

3.5.1.7 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายที่ต้องการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน มาทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อไล่อากาศออกและชักนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ เมื่อครบเวลา แล้วนำมาทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยการใช้เข็มฉีดยาดูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวภายในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial) ปริมาตรละ 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograph : GC) เพื่อเปรียบเทียบกับก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในก๊าซอาร์กอน สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า โครมาโทกราฟี แสดงในตารางที่ 1

เมื่อมีการแก้ไข ทั้งต้น ยกทั้งหมัด มิมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ
(Gas Chromatograph : GC)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Packed SS column 2 m × 4 mm OD × 3 mm I.D. p/w Molecular sieve 5°A 60/80 mesh
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Column temperature : 50 °C Detector temperature : 100 °C
Argon Carrier gas	Flow rate 20 ml/min (99.999% purity) (Praxair, Korea, co.,Ltd.)

3.5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

3.5.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เริ่มจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียบนจานอาหารแข็ง BG-11 ที่มีค่า pH 7.5 เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้น จึงนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบการให้แสงสลับกับไม่มีแสง (16 แสง : 8 มืด) เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นนำเซลล์มาเก็บเกี่ยวโดยนำเซลล์หัวเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วที่ 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยนำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว BG11 โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่นที่ 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 ศึกษาการเจริญเติบโต โดยเก็บตัวอย่างในแต่ละการทดลองใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 21 วัน โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์, ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. cirG และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 บนอาหารแข็ง TAP (Tris acetate phosphate) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อครบเวลาแล้วนำเซลล์ไปเก็บเกี่ยวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว TAP 3 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว TAP ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 3 พลาสติก โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงภายใต้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงที่ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโน, ปริมาณคลอโรฟิลล์และความหนาแน่นของเซลล์

3.5.3 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

3.5.3.1 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

นำหัวเชื้อไซยาโนแบคทีเรียตามหัวข้อที่ 3.5.1.1 มาเก็บเกี่ยวเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว BG11 โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่นที่ 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลา นำไซยาโนแบคทีเรียที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ไปกระจายในอาหารเหลว BG11 และ BG11-N (Blue-green Medium + Turk Island salt solution สูตรที่ปราศจากไนโตรเจน) ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 3 พลาสติก จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ภายใต้การให้แสงสลับกับไม่มีแสง (16 ชั่วโมง แสง : 8 ชั่วโมง มืด) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและปรับความเข้มข้นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียตามหัวข้อที่ 3.5.1.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อที่ 3.5.1.2 มาทำการเก็บเกี่ยว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อย่างละ 3 พลาสติก โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงภายใต้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงที่ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว TAP จากนั้นกระจายเซลล์ลงในอาหารเหลว TAP (สูตรปกติ) และอาหารเหลวที่ขาดแหล่งธาตุอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ซัลเฟอร์ (TAP-S), ไนโตรเจน (TAP-N) และโพแทสเซียม (TAP-K) ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 3 พลาสติก จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและปรับความเข้มข้นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวตามหัวข้อที่ 3.5.1.7

3.5.4 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่าย

นำหัวเชื้อไซยาโนแบคทีเรียตามหัวข้อที่ 3.5.1.1 มาเก็บเกี่ยวเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว BG11 โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่นที่ 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาแล้วนำไซยาโนแบคทีเรียที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 3 ครั้ง จากนั้นไปกระจายลงในอาหารเหลว BG11 และ BG11-N (สูตรที่ปราศจากไนโตรเจน) ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 3 พลาสติก จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ภายใต้การให้แสงสลັบกับไม่มีแสง (16 แสง : 8 มืด) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและปรับความเข้มข้นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ตามหัวข้อที่ 3.5.1.2 มาทำการเก็บเกี่ยว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว TAP ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อย่างละ 3 พลาสติก โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงภายใต้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงที่ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว TAP จากนั้นกระจายเซลล์ลงในอาหารเหลว TAP (สูตรปกติ) และอาหารเหลวที่ขาดแหล่งธาตุอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ซัลเฟอร์, ไนโตรเจน, โพแทสเซียม ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 3 พลาสติก ไม่่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละ 3 ฟลากล จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและปรับความเข้มข้นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 จากนั้น นำสารละลายเซลล์ที่ได้ใส่ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial) ขนาด 12.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นหลักในการทดลองและปริมาตรที่อัตราส่วน 1 : 1 หรือ ใส่ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวอย่างละ 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาอัตราการผลิตไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 3.5.1.7 ของการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

3.5.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

3.5.5.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

นำหัวเชื้อสาหร่ายที่มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดมาทำเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลากลขนาด 250 มิลลิลิตร อย่างละ 3 ฟลากล โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงที่ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและนำไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล กรดซิตริก โซเดียมอะซิเตต กรดแอสติก (สูตรปกติ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ เซลล์ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนข้างต้นมาเก็บเกี่ยวและปรับความเข้มข้นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 3.5.1.7

3.5.5.2 การแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

นำหัวเชื้อสาหร่ายที่คัดเลือกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจน มาทำเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ในฟลากล ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อย่างละ 3 ฟลากล โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงภายใต้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยว จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 8.7, 17.4 (สูตรปกติ), 34.8 และ 87 มิลลิโมลาร์ ในฟลากลขนาด 250 มิลลิเมตร ทุกชิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อย่างละ 3 ฟลasks เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยว และปรับความเข้มข้นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 3.5.1.7

3.5.5.3 การแปรผันความเข้มของแสง

นำหัวเชื้อมาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงภายใต้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงที่ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์มาเก็บเกี่ยวและปรับความเข้มข้นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 จากนั้นนำไปใส่ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial) ขนาด 12.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางและฝาลูมิเนียม นำไปใส่ในตู้แสงโดยพันก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที นำไปป้อนในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 (ทอพออล์), 800, 1,600, 4,000 และ 8,000 ลักซ์ (Lux) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนตามหัวข้อที่ 3.5.1.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

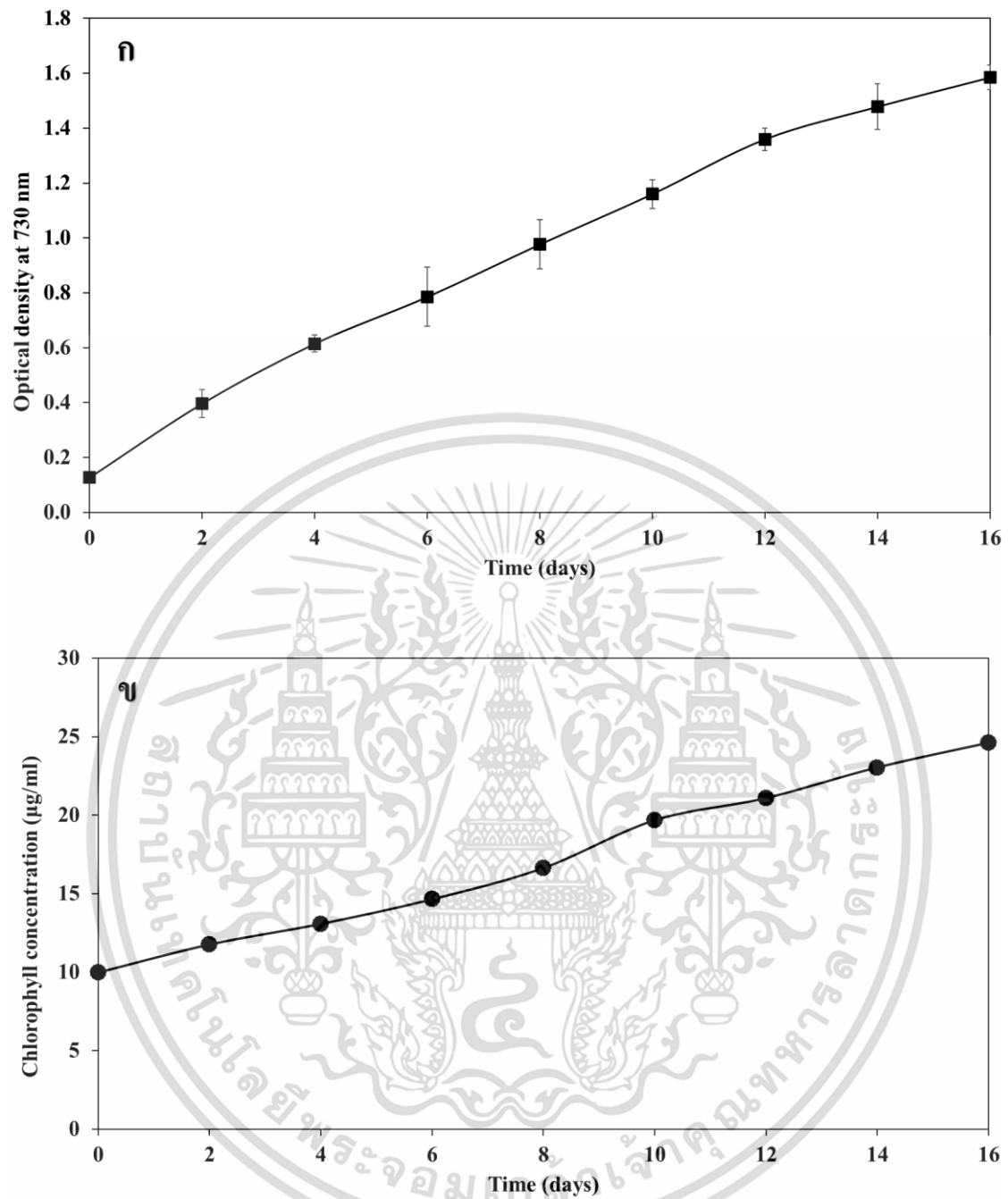
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

4.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica*

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง BG-11 เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่นที่ 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 16 วัน ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของ *A. halophytica* โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ จากการทดลองพบว่า *A. halophytica* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร BG-11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 1.76 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.1A) และพบว่าในการเพาะเลี้ยงที่มีระยะเวลาเพิ่มขึ้นจะทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูงขึ้นอีกด้วย (รูปที่ 4.1B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



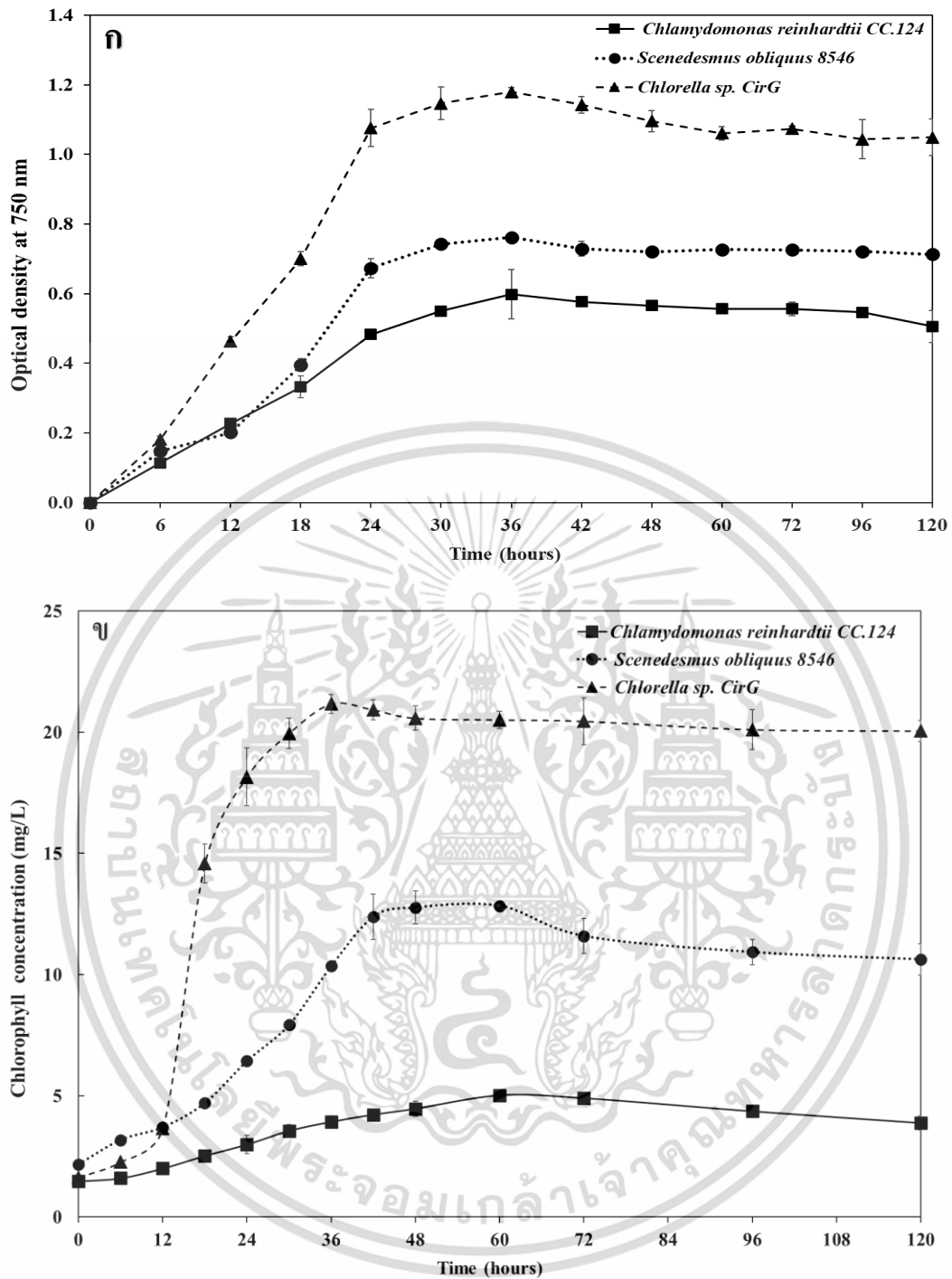
รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ในอาหาร BG-11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (ก) และการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

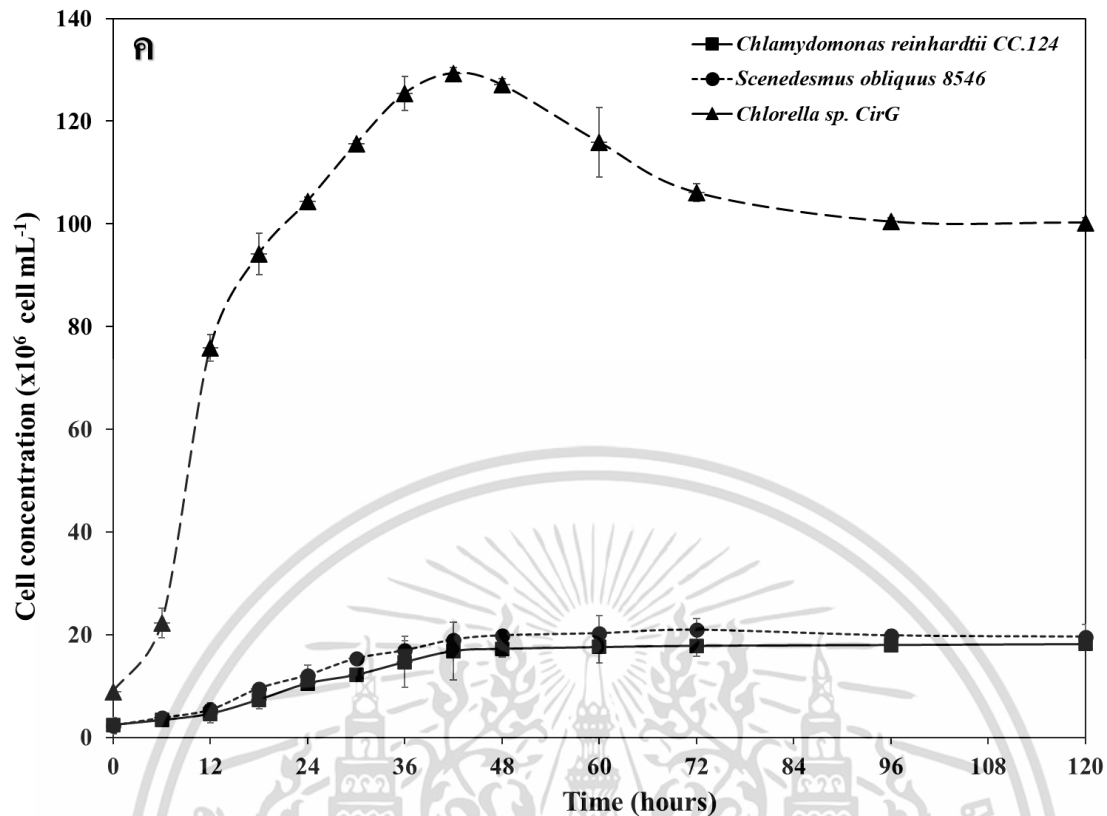
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 7 วัน โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง Tris acetate phosphate (TAP) เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี บนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีความการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร TAP ซึ่งมีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *Chlorella* sp. CirG มีการเจริญเติบโตสูงกว่า *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ซึ่ง *Chlorella* sp. cirG มีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร TAP ซึ่งเซลล์สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะ Log phase ตั้งแต่ 6-30 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง(รูปที่ 4.2) และมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.048 ± 0.002 ต่อชั่วโมง(ตารางที่ 4.1) หลังจากนั้นจะมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงเข้าสู่ช่วงระยะ Stationary phase ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโต *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 พบว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้งสองมีลักษณะค่อนข้างคล้ายกันตั้งแต่ 6-12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นระยะ Lag phase สาหร่ายปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งเซลล์สาหร่ายจะเข้าสู่ระยะ Log phase ตั้งแต่ 12-24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง(รูปที่ 4.2) และมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.028 ± 0.002 และ 0.020 ± 0.003 ต่อชั่วโมง(ตารางที่ 4.1) หลังจากนั้นจะมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงเข้าสู่ช่วงระยะ Stationary phase ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ มีความสอดคล้องกันกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์(รูปที่ 4.2ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ จาก การวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (รูปที่ 4.2ก) ปริมาณคลอโรฟิลล์โดยนำไปวัดค่าการ (รูปที่ 4.2ข) และความหนาแน่นของเซลล์(รูปที่ 4.2ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 (ต่อ) การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (รูปที่ 4.2ก) ปริมาณคลอโรฟิลล์โดยนำไปวัดค่าการ (รูปที่ 4.2ข) และความหนาแน่นของเซลล์(รูปที่ 4.2ค)

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ระยะการทวีคูณ (ชั่วโมง)
<i>Chlorella sp. CirG</i>	0.048 ± 0.002 ^a	14.489 ± 0.647 ^a
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC.124	0.020 ± 0.003 ^c	34.262 ± 0.492 ^c
<i>Scenedesmus obliquus</i> 8546	0.028 ± 0.002 ^b	24.845 ± 0.363 ^b

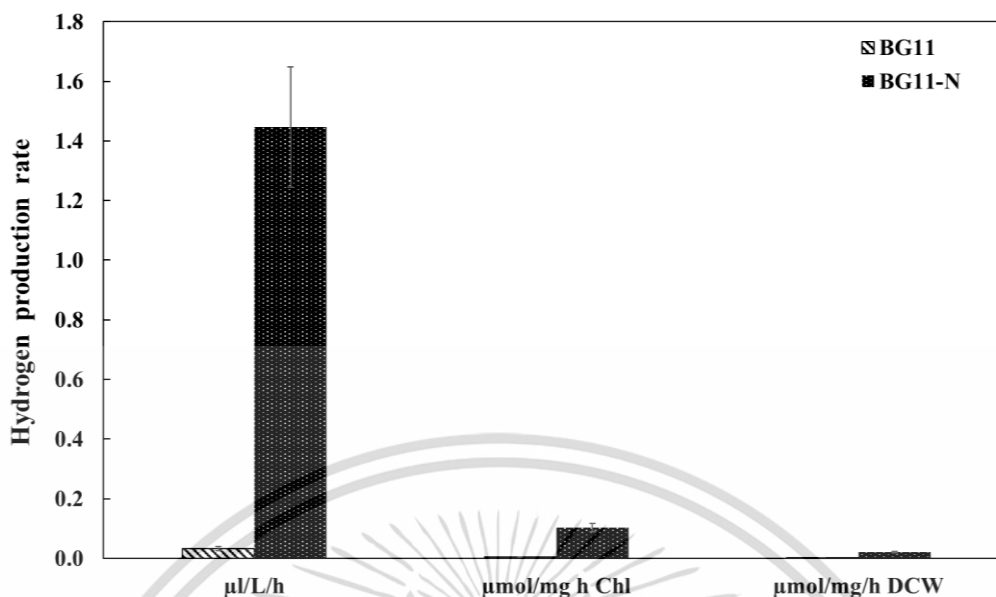
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

4.2.1 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

จากการนำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว BG11 สูตรปกติ ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน เก็บเกี่ยวไปกระจายลงในอาหารเหลว BG11 และ BG11-N (ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายใส่ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมห่อหุ้มขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นนำไปฟอนอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที ทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.03 ± 0.006 ไมโครลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.45 ± 0.201 ไมโครลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (ดังรูปที่ 4.3, ตารางที่ 4.2) จะเห็นได้ว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 44 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 สูตรปกติ (ดังรูปที่ 4.3) ซึ่งผลทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการศึกษการผลิตไฮโดรเจนแบบระยะยาวภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ Two-stage โดยพบว่าการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในระบบ Two-stage เพื่อผลิตไฮโดรเจนอย่างยั่งยืน มี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทเท่ากับ 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ขั้นที่สองนำสารละลายเซลล์มาเหนี่ยวนำในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทและสารอื่นๆ พบว่าการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* เพิ่มขึ้น เมื่อนำไปบ่มหรือเหนี่ยวนำในน้ำทะเลสภาวะที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท เป็นเวลา 2 วัน (สร้อยญา พันธุ์พุกฤษ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่ 24 ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 สูตรปกติ และอาหาร BG11-N (ปราศจากโซเดียมไนเตรท)

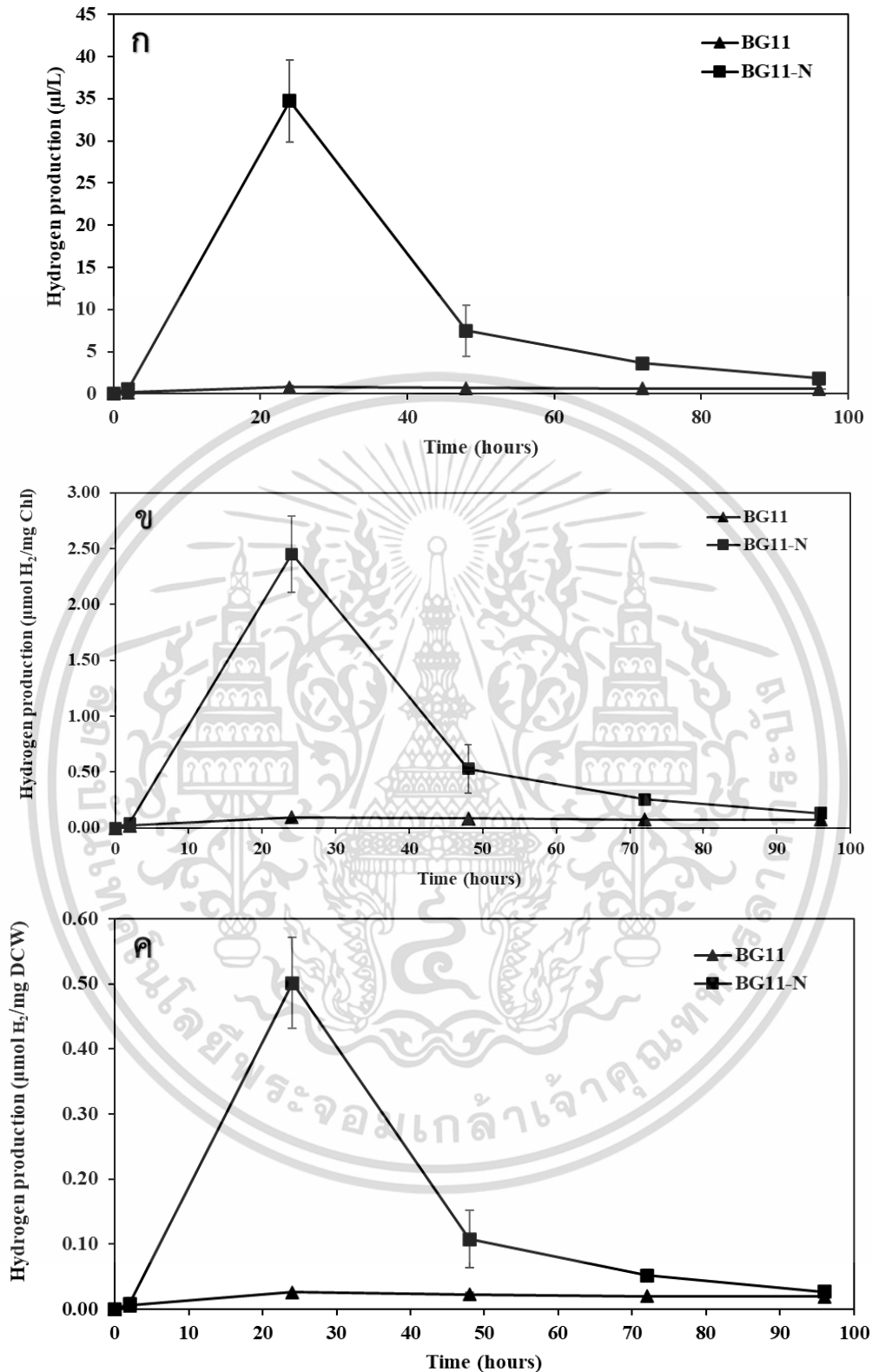
ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

ชนิดของอาหาร	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมง		
	μL/h	μmol H ₂ /mg chl/h	μmol H ₂ /mg DCW/h
BG11	0.03 ± 0.01 ^b	3.99 ± 0.83 ^b	1.08 ± 0.23 ^b
BG11-N	1.45 ± 0.20 ^a	102.16 ± 14.26 ^a	20.88 ± 2.91 ^a

ตารางที่ 4.3 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 สูตรปกติและอาหาร BG11-N

ชนิดของอาหาร	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	μL	μmol H ₂ /mg chl	μmol H ₂ /mg DCW
BG11	0.79 ± 0.17 ^b	95.86 ± 20.03 ^b	26.005 ± 5.433 ^b
BG11-N	34.71 ± 4.84 ^a	2451.77 ± 342.29 ^a	501.167 ± 69.969 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 สูตรปกติและเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N (ที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท)

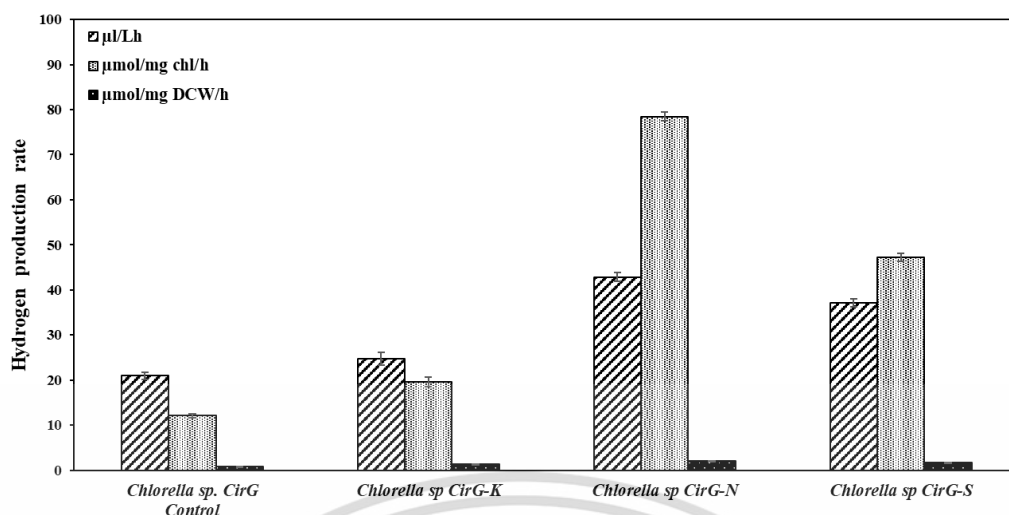
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ลงในอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ลงในอาหารเหลว TAP (สูตรปกติ) และอาหารเหลวที่ขาดแหล่งธาตุอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ซัลเฟอร์ ,ไนโตรเจนและโพแทสเซียม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปใส่ในขวดแก้วบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ขนาด 12.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียม นำไปใส่อากาศออกเป็นเวลา 15 นาที ทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและขาดแหล่งธาตุอาหารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S) มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน(TAP-N) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 47.26 ± 0.92 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.4) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ $1,500.52 \pm 24.37$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ (รูปที่ 4.5)

จากรายงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่า แหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของคลอโรฟิลล์และยังเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีน กรดนิวคลีอิกและไนโตรจีเนสเบส การจำกัดหรือการขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนทำให้การสังเคราะห์แสงและสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ลดลง ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบแสงสอง (PSII) โดยทำให้ออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองมีปริมาณลดลง ส่งผลให้ไม่มีออกซิเจนไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้กระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงมีผลในการช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* ให้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ (Meilin He *et al.*, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมง ของ *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาด โพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และ ซัลเฟอร์ (TAP-S)

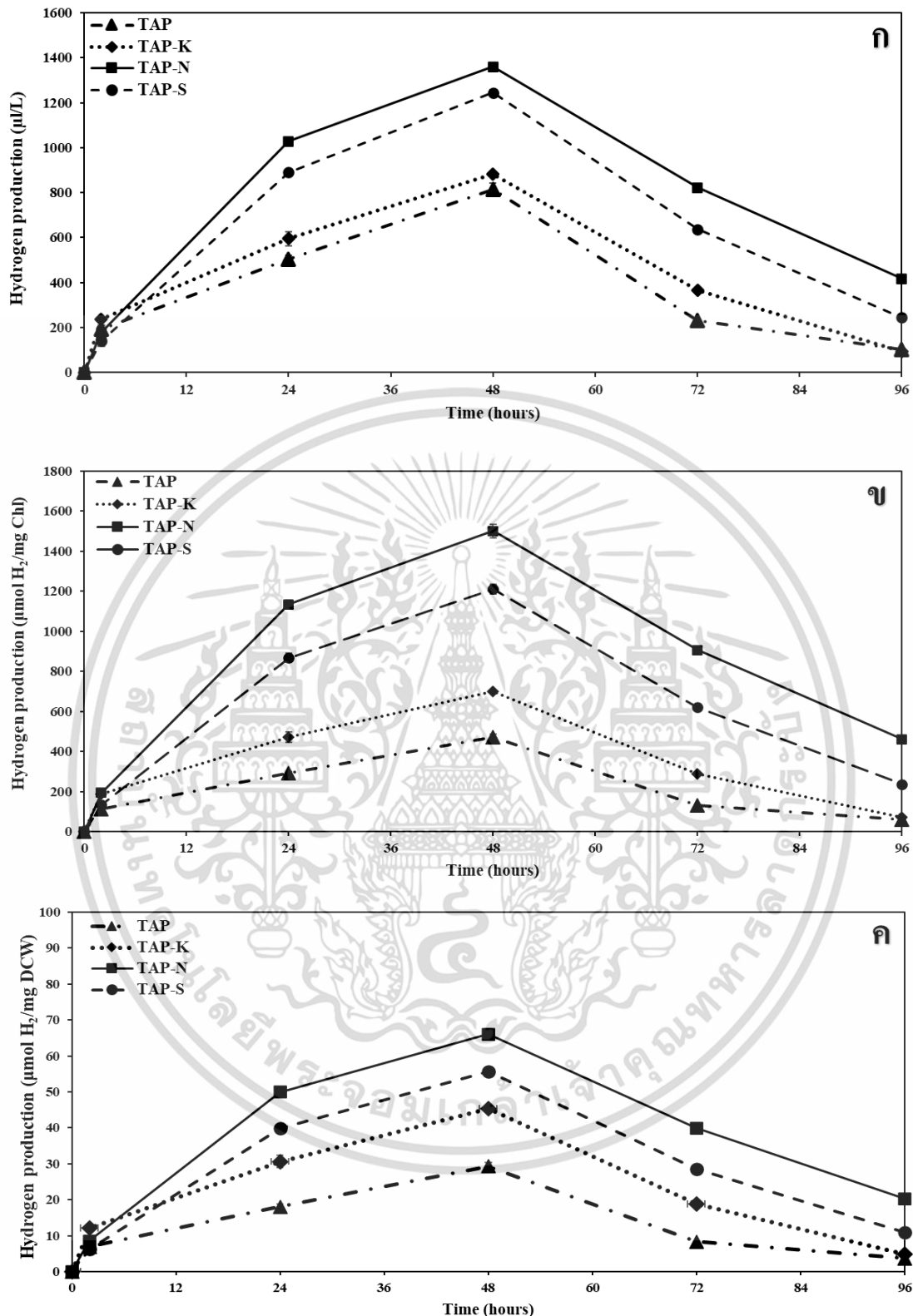
ตารางที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. CirG

ชนิดของอาหาร	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	$\mu\text{l/L/h}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg chl/h}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW/h}$
TAP	20.93 \pm 0.76 ^d	12.09 \pm 0.44 ^d	0.75 \pm 0.02 ^c
TAP-K	24.76 \pm 1.37 ^c	19.65 \pm 1.09 ^c	1.27 \pm 0.07 ^d
TAP-N	42.86 \pm 0.84 ^a	47.26 \pm 0.92 ^a	2.08 \pm 0.04 ^b
TAP-S	37.12 \pm 0.97 ^b	36.12 \pm 0.95 ^b	1.66 \pm 0.04 ^a

ตารางที่ 4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. CirG

สายพันธุ์	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	$\mu\text{l/L}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg chl}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW}$
TAP	814.56 \pm 18.05 ^d	470.47 \pm 16.20 ^b	29.33 \pm 1.01 ^d
TAP-K	881.84 \pm 7.00 ^c	699.93 \pm 5.55 ^c	45.42 \pm 0.36 ^c
TAP-N	1360.87 \pm 34.71 ^b	1500.52 \pm 24.37 ^b	55.57 \pm 1.55 ^b
TAP-S	1244.94 \pm 22.10 ^a	1211.28 \pm 33.77 ^a	66.04 \pm 1.07 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ข้อมูลลงในสื่อออนไลน์และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



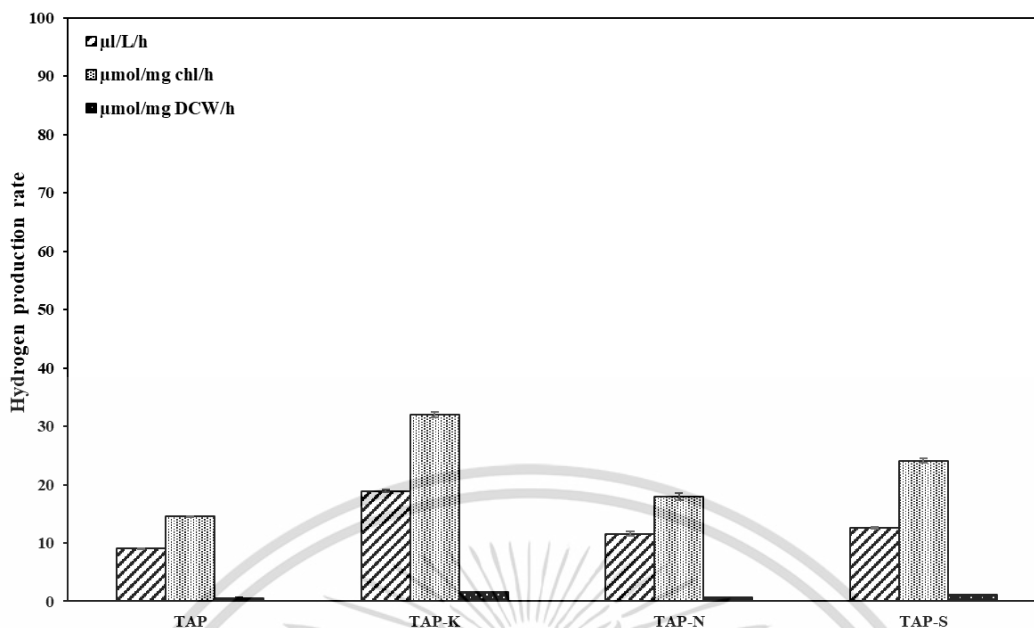
รูปที่ 4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella sp. CirG* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 พบว่า *S. obliquus* TISTR 8546 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-K ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารโพแทสเซียม โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 50.48 ± 0.24 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.6) และให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 907.67 ± 12.41 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.7) ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ (รูปที่ 4.7)

โพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบหลักของเอนไซม์ที่สำคัญภายในเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของระบบแสงสอง (PSII) ทำให้ปริมาณออกซิเจนภายในระบบลดลง เซลล์จะเก็บแหล่งคาร์บอนในรูปของแป้ง ซึ่งในการขาดแหล่งธาตุโพแทสเซียมเซลล์จะไปยับยั้งการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นแป้ง ดังนั้นภายในเซลล์จึงมีน้ำตาลกลูโคสจำนวนมากพอสำหรับใช้ในการผลิตไฮโดรเจน โดยเซลล์สามารถใช้แหล่งอิเล็กตรอนจากน้ำตาลกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากไม่ต้องสะสมพลังงานในรูปของแป้ง ทั้งหมดที่กล่าวจึงเป็นเหตุผลที่ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (Aikaterini Papazi *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมงของ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม(TAP-K), ไนโตรเจน(TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S)

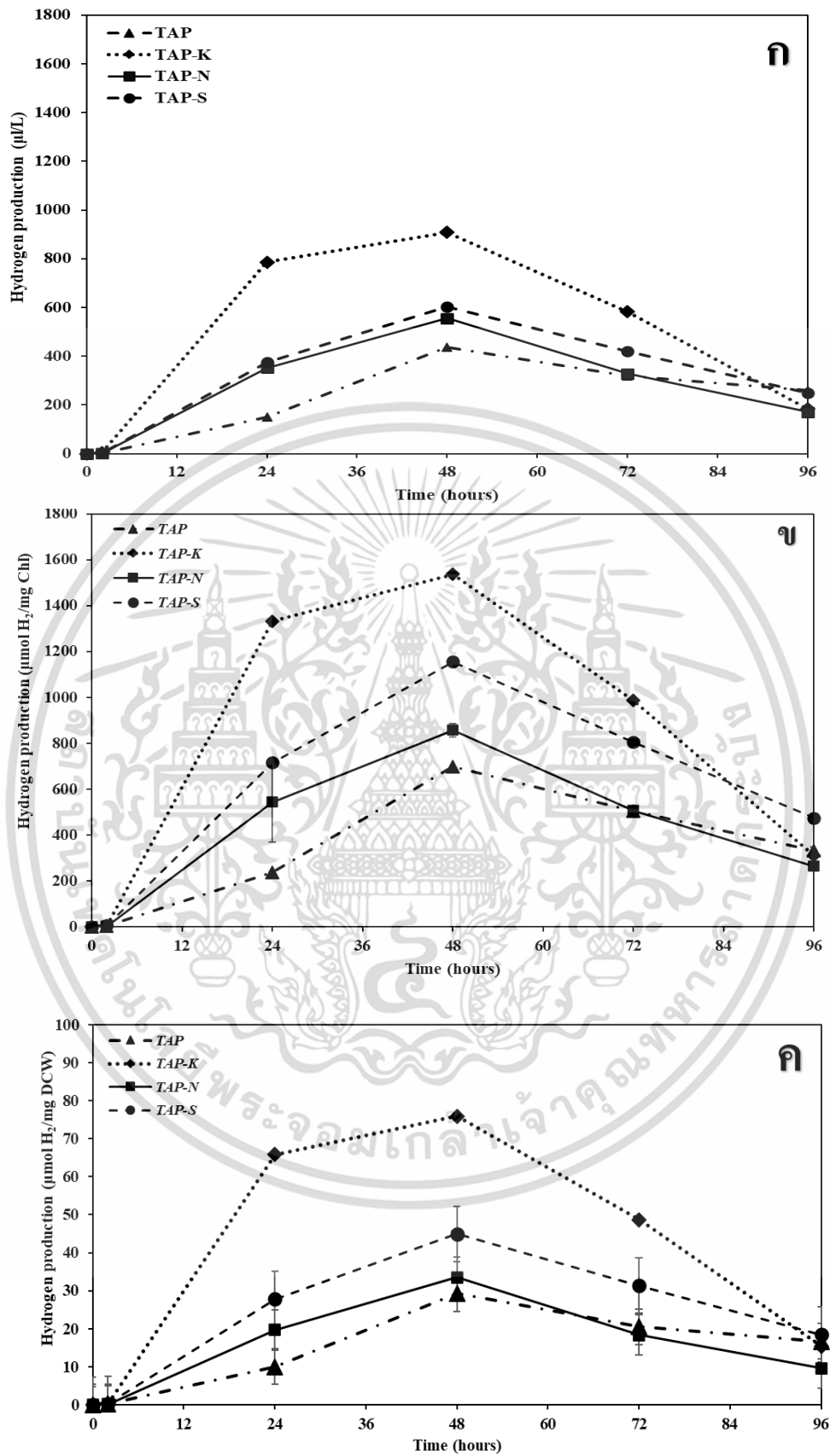
ตารางที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

ชนิดของอาหาร	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		
	µl /L/h	µmol H ₂ /mg chl/h	µmol H ₂ /mg DCW/h
TAP	6.22 ± 0.04 ^d	9.93 ± 0.06 ^d	0.42 ± 0.01 ^d
TAP-K	32.76 ± 0.15 ^a	50.48 ± 0.24 ^a	2.74 ± 0.01 ^a
TAP-N	14.65 ± 2.67 ^b	22.64 ± 0.72 ^b	0.82 ± 0.26 ^b
TAP -S	15.57 ± 0.42 ^c	19.83 ± 0.46 ^c	1.16 ± 0.01 ^c

ตารางที่ 4.7 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

ชนิดของอาหาร	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	µl /L	µmol H ₂ /mg chl	µmol H ₂ /mg DCW
TAP	436.55 ± 1.73 ^d	696.98 ± 2.76 ^d	29.23 ± 0.12 ^d
TAP-K	907.67 ± 12.41 ^a	1537.03 ± 21.00 ^a	75.97 ± 1.04 ^a
TAP-N	555.15 ± 18.96 ^c	857.71 ± 19.30 ^c	30.98 ± 1.06 ^c
TAP -S	603.95 ± 9.86 ^b	1155.66 ± 18.88 ^b	44.91 ± 0.73 ^b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่ข้อมูลใดๆ จากเอกสารชุดนี้โดยไม่ได้รับอนุญาต

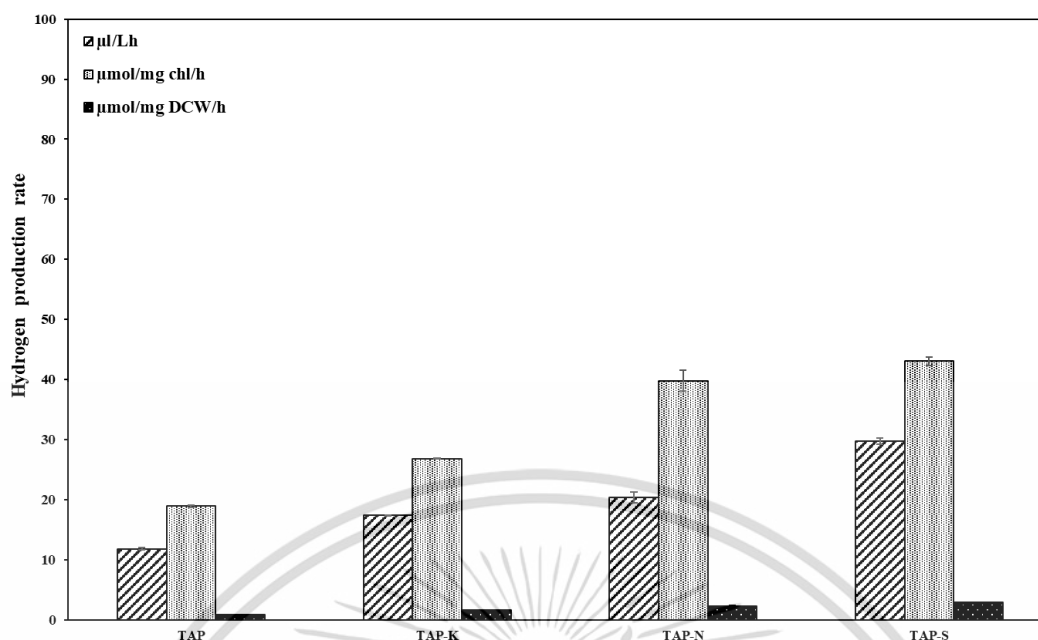


รูปที่ 4.8 ผลผลิตไฮโดรเจนของ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เอกสารนี้ เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบของสารอาหารต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S) ในการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 พบว่า *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด เมื่อป้อนในอาหารเหลว TAP-S (TAที่ขาดซัลเฟอร์) โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 43.04 ± 0.75 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.8) และมีผลผลิตไฮโดรเจนผลได้สูงสุดเท่ากับ $1,298.69 \pm 11.71$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.9) ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 2.3 เท่าเมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ (รูปที่ 4.9)

ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนภายในเซลล์การขาดซัลเฟอร์ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซีเทอีน (Cysteine) และเมไทโอนีน (Methionine) ได้ โดยกรดอะมิโน 2 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างโปรตีน D1 ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในการซ่อมแซมการทำงานของระบบแสงสอง เมื่อระบบแสงสองมีปัญหาจะทำให้เกิดการยับยั้งการแตกตัวของน้ำ ทำให้มีออกซิเจนในระบบลดลง ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงทำให้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (T.K Antal *et al.*, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S)

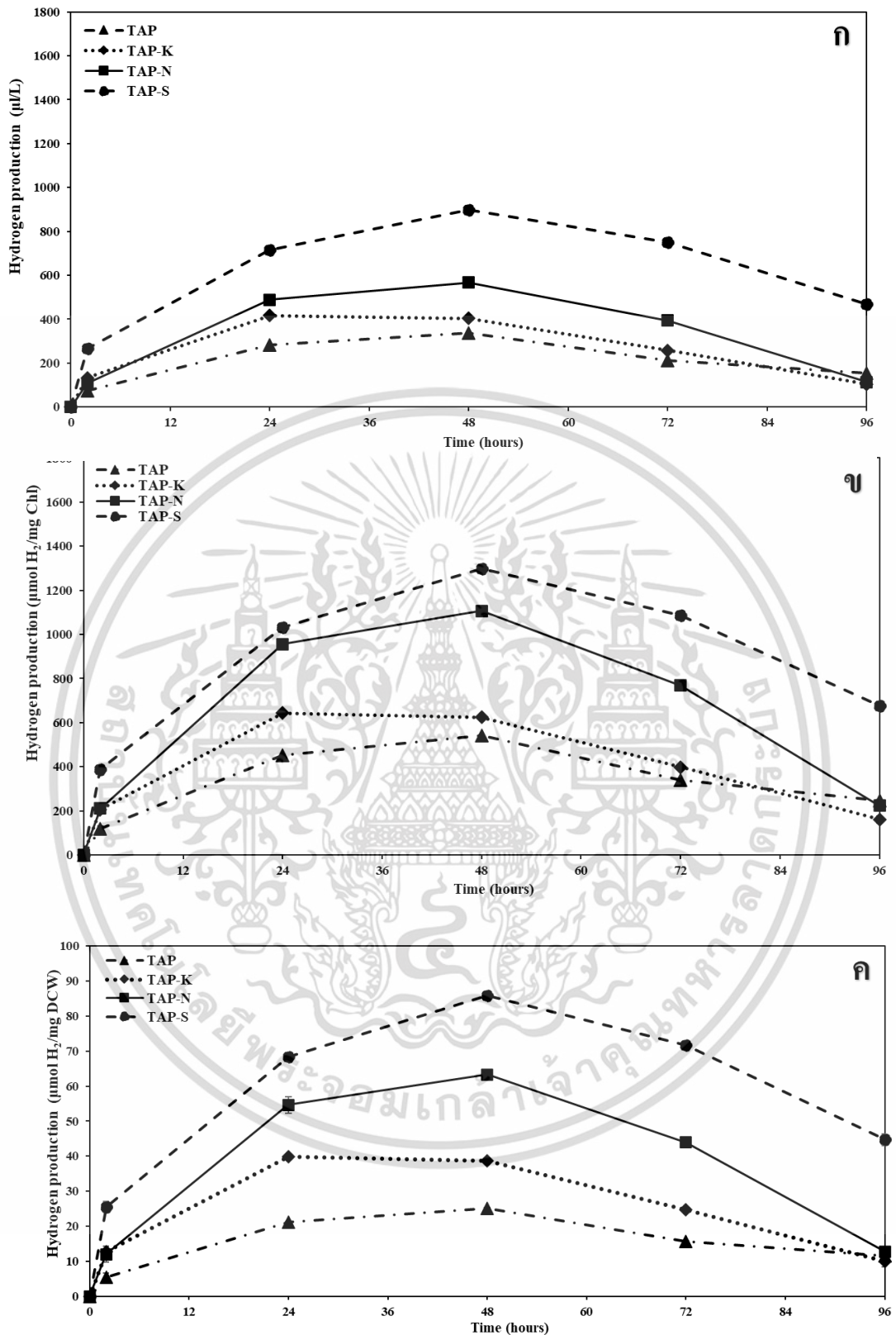
ตารางที่ 4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

ชนิดของอาหาร	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		
	µl /L/h	µmol H ₂ /mg chl /h	µmol H ₂ /mg DCW/h
TAP	11.81 ± 0.14 ^d	18.88 ± 0.23 ^d	0.87 ± 0.01 ^d
TAP-K	17.37 ± 0.03 ^c	26.82 ± 0.04 ^c	1.66 ± 0.02 ^c
TAP-N	20.39 ± 0.91 ^b	39.81 ± 1.77 ^b	2.27 ± 0.10 ^b
TAP -S	29.75 ± 0.52 ^a	43.04 ± 0.75 ^a	2.85 ± 0.04 ^a

ตารางที่ 4.9 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

ชนิดของอาหาร	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	µl /L	µmol H ₂ /mg chl	µmol H ₂ /mg DCW
TAP	338.13 ± 2.72 ^d	540.75 ± 4.35 ^d	25.16 ± 0.20 ^d
TAP-K	404.36 ± 0.77 ^c	624.45 ± 1.19 ^c	38.68 ± 0.07 ^c
TAP-N	567.31 ± 6.01 ^b	1107.16 ± 11.73 ^b	43.31 ± 0.67 ^b
TAP-S	897.79 ± 8.09 ^a	1298.69 ± 11.71 ^a	55.88 ± 0.77 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่มีการเผยแพร่ ทั้งสิ้น ยกเว้นให้ มิมีให้แต่แบบสงวนสิทธิ์ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีไว้ใช้



รูปที่ 4.10 ผลผลิตไฮโดรเจนของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติและอาหารที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K), ไนโตรเจน (TAP-N) และซัลเฟอร์ (TAP-S)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในหัวข้อที่ 4.2 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่นำมาบ่มในอาหารที่ขาดธาตุอาหารบางชนิด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ เมื่อเทียบกับอาหารสูตรปกติ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกอาหารที่ขาดธาตุอาหารที่ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่

- 1) *A. halophytica* : BG11-N (ปราศจากโซเดียมไนเตรต)
- 2) *Chlorella* sp. CirG : TAP-N (ปราศจากไนโตรเจน)
- 3) *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 : TAP-S (ปราศจากซัลเฟอร์)
- 4) *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 : TAP-K (ปราศจากโพแทสเซียม)

เมื่อทำการคัดเลือกเรียบร้อยแล้ว นำมาทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ในอัตราส่วน 1 : 1 ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง 2 แบบ คือ สภาวะที่ปราศจากแสงและสภาวะที่มีแสงในการทดลองต่อในหัวข้อที่ 4.3

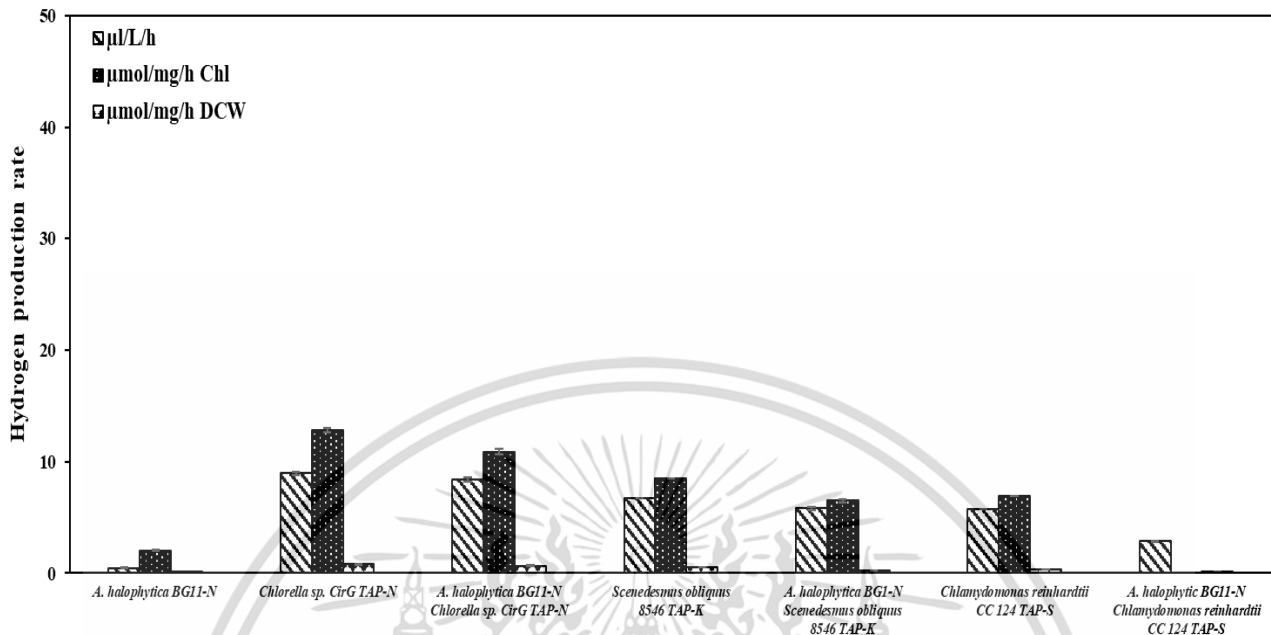
4.3 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

จากการนำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มาบ่มร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิด และนำมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสงและสภาวะที่มีแสง พบว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดพบใน *A. halophytica* ที่บ่มในอาหาร BG11-N ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนใน *A. halophytica* เมื่อนำไซยาโนแบคทีเรียที่บ่มร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ในสภาวะที่เหมาะสมมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่น้อยกว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายแบบเดี่ยว อีกทั้งการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากแสงเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายสีเขียว จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีแสงนั้นสามารถบ่งชี้ว่าสาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีแสงได้สูงมากกว่าสภาวะที่ปราศจากแสง สามารถสรุปได้ว่าการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว นั้น มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเลี้ยงเดี่ยวทั้งในสภาวะที่ปราศจากแสงและสภาวะที่มีแสง

ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกสาหร่าย 1 สายพันธุ์ ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดทั้งในสภาวะที่ปราศจากแสงและสภาวะที่มีแสง โดยพบว่าการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N ในสภาวะที่ปราศจากแสงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 12.79 ± 0.19 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.10) และภายใต้สภาวะที่มีแสง พบว่ามีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 39.47 ± 0.21 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.12) อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่เพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. CirG ในสภาวะที่มีแสงเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสภาวะปราศจากแสง

ดังนั้น จึงทำการคัดเลือก *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N ซึ่งมีกรดอะซิติก ความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีแสงไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. CirG ต่อไป

4.3.1 การเพาะเลี้ยงร่วมกันในสถานะที่ไม่มีแสง



รูปที่ 4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง

ตารางที่ 4.10 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง

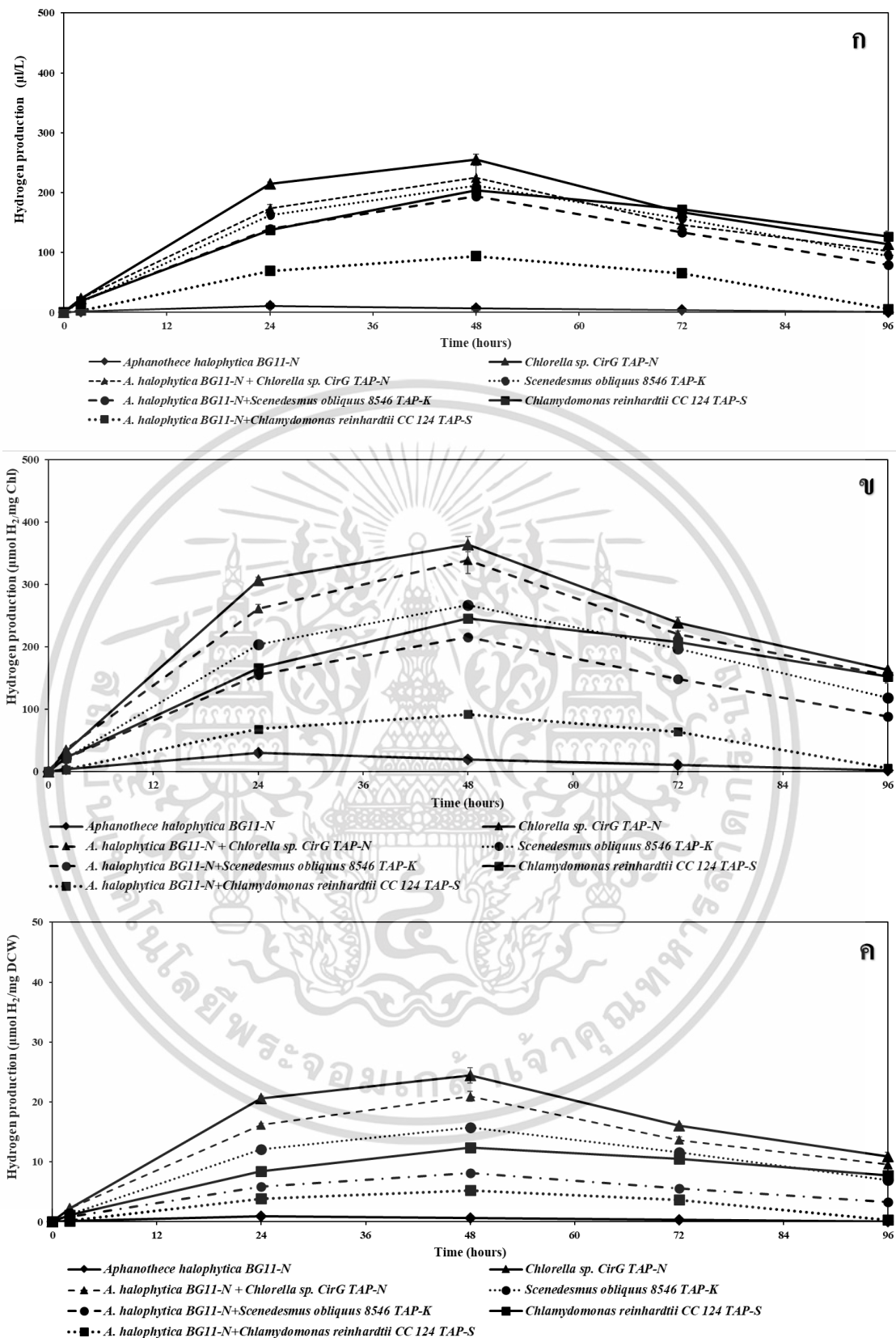
สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมง		
	$\mu\text{L/L/h}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl/h}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg/h DCW}$
<i>A. halophytica</i> (BG11-N)	0.47 ± 0.02 ^s	1.28 ± 0.04 ^s	0.04 ± 0.01 ^s
<i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	8.94 ± 0.13 ^a	12.79 ± 0.19 ^a	0.86 ± 0.01 ^a
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	7.23 ± 0.18 ^b	10.89 ± 0.26 ^b	0.67 ± 0.02 ^b
<i>Scenedesmus obliquus</i> 8546 (TAP-K)	6.75 ± 0.01 ^c	8.51 ± 0.01 ^c	0.50 ± 0.02 ^c
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>S.obliquus</i> 8546 (TAP-K)	5.82 ± 0.15 ^d	6.93 ± 0.16 ^d	0.35 ± 0.01 ^d
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	5.75 ± 25.06 ^{ed}	6.49 ± 0.01 ^e	0.24 ± 0.01 ^e
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>C.reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	2.89 ± 3.48 ^f	2.84 ± 0.03 ^f	0.16 ± 0.02 ^f

ไม่ผ่านการแก้ไข: ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้คัดแปลงเมื่อท่านจะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *A. halophytica* และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง

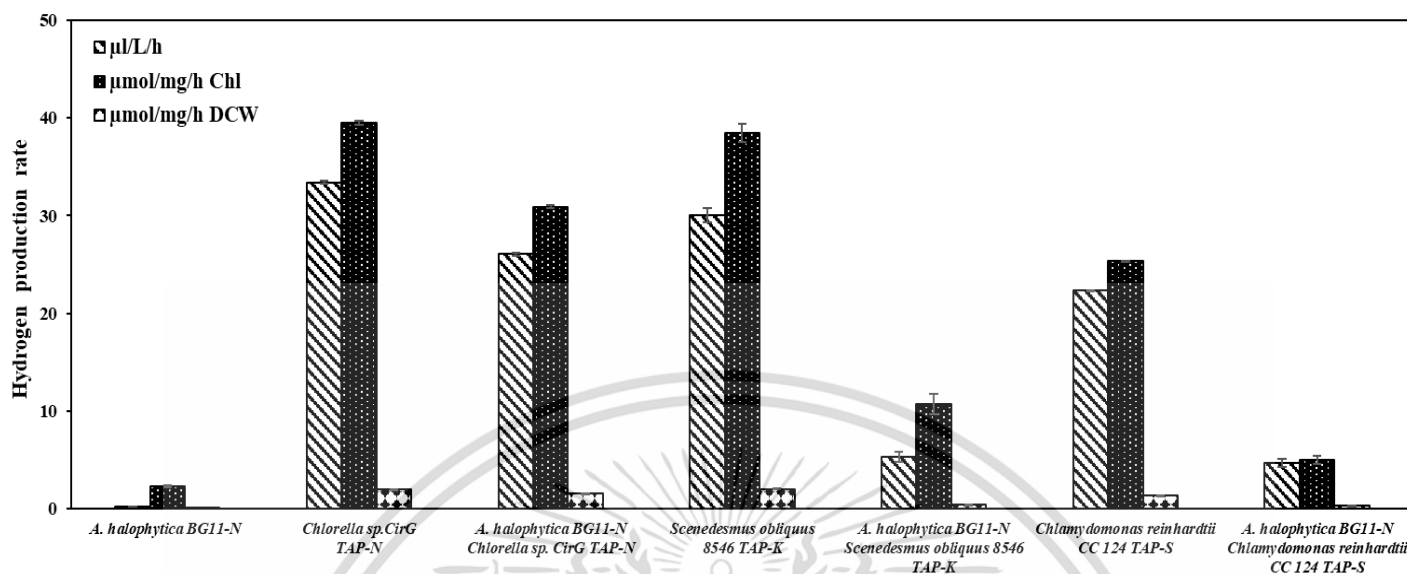
สายพันธุ์	ผลได้สูงสุด		
	$\mu\text{L} / \text{L}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW}$
<i>A. halophytica</i> (BG11-N)	7.03 \pm 0.47 ^f	19.14 \pm 1.29 ^c	0.59 \pm 0.04 ^f
<i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	255.03 \pm 8.66 ^a	364.47 \pm 12.38 ^a	24.39 \pm 0.83 ^a
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	224.79 \pm 13.80 ^d	338.65 \pm 20.94 ^c	20.90 \pm 1.29 ^f
<i>Scenedesmus obliquus</i> 8546 (TAP-K)	212.06 \pm 0.01 ^b	267.34 \pm 0.01 ^b	15.78 \pm 0.01 ^b
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>S.obliquus</i> 8546 (TAP-K)	193.66 \pm 3.28 ^e	216.12 \pm 3.66 ^c	8.11 \pm 0.13 ^{de}
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	203.86 \pm 0.01 ^c	245.61 \pm 0.01 ^c	12.41 \pm 0.01 ^c
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>C.reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	94.10 \pm 4.57 ^d	92.23 \pm 1.93 ^d	5.25 \pm 0.26 ^d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *A. halophytica* ที่ป้อนอาหาร BG11-N ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ป้อนอาหารเหลว TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง ทำให้มีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในสภาวะที่มีแสง



รูปที่ 4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่บ่มเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่มีแสง

ตารางที่ 4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจน *A. halophytica* และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง

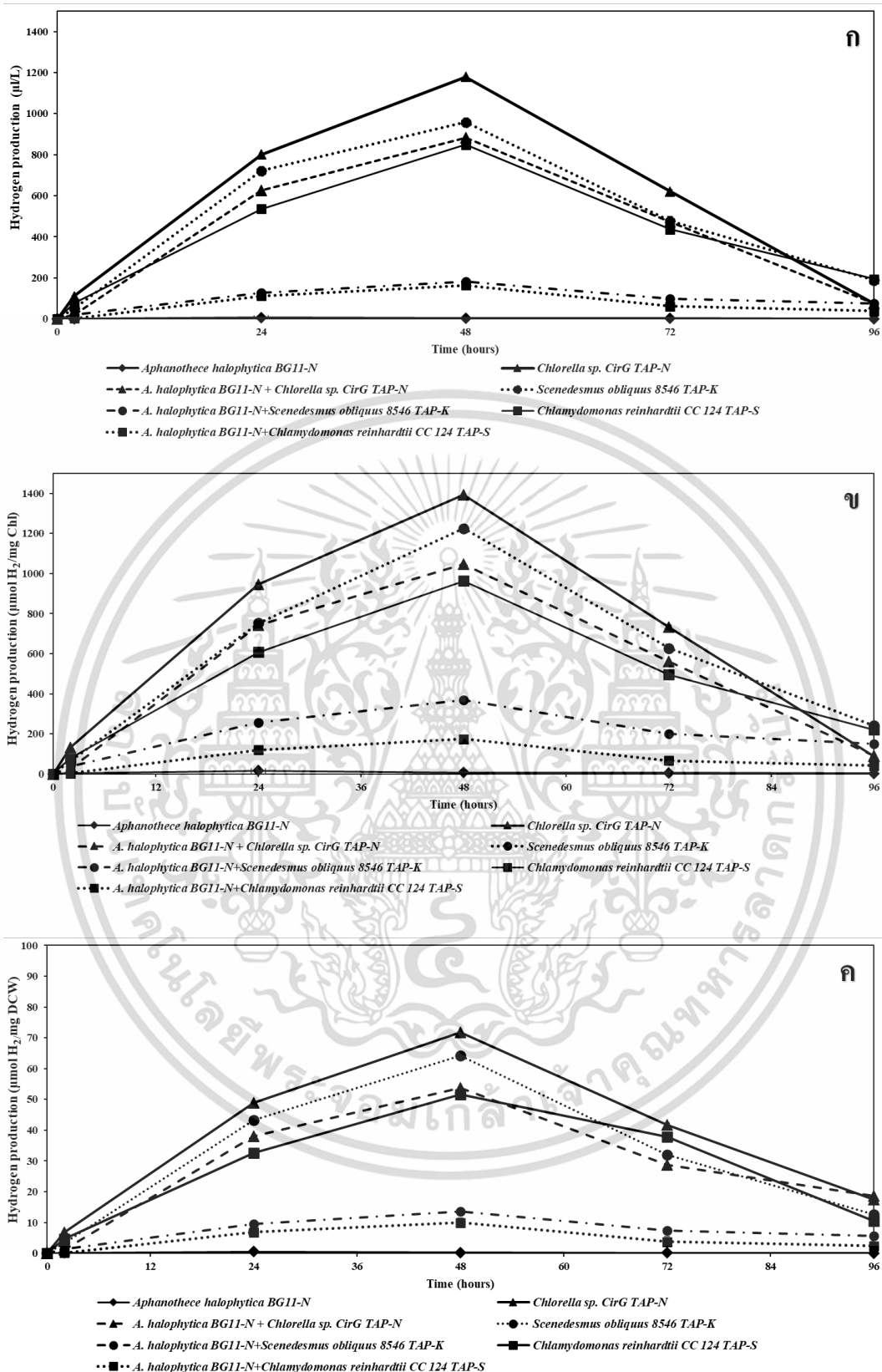
สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมง					
	µL/L/h		µmol H ₂ /mg Chl/h		µmol/mg DCW/h	
<i>A. halophytica</i> (BG11-N)	0.22	± 0.04 ^s	0.67	± 0.11 ^s	0.02	± 0.01 ^s
<i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	33.41	± 0.18 ^a	39.47	± 0.21 ^a	2.03	± 0.01 ^a
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	26.06	± 0.13 ^c	30.91	± 0.16 ^c	1.59	± 0.01 ^c
<i>Scenedesmus obliquus</i> 8546 (TAP-K)	30.07	± 0.73 ^b	38.44	± 0.94 ^b	2.01	± 0.01 ^b
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>S. obliquus</i> 8546 (TAP-K)	5.33	± 0.49 ^e	10.72	± 0.99 ^e	0.41	± 0.04 ^e
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	22.34	± 0.03 ^d	25.32	± 0.03 ^d	1.36	± 0.01 ^d
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>C. reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	4.69	± 0.39 ^f	5.02	± 0.41 ^f	0.29	± 0.02 ^f

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด *A. halophytica* และสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสง

สายพันธุ์	ผลได้สูงสุด		
	$\mu\text{L} / \text{L}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl}$	$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW}$
<i>A. halophytica</i> (BG11-N)	2.57 \pm 0.29 ^s	7.97 \pm 0.89 ^s	0.28 \pm 0.03 ^s
<i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	1179.31 \pm 4.00 ^a	1393.32 \pm 4.62 ^a	71.79 \pm 0.23 ^b
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>Chlorella</i> sp. CirG (TAP-N)	883.52 \pm 2.39 ^c	1047.82 \pm 2.84 ^c	53.78 \pm 0.14 ^c
<i>Scenedesmus obliquus</i> 8546 (TAP-K)	958.51 \pm 5.28 ^b	1225.40 \pm 6.76 ^b	64.18 \pm 0.35 ^b
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>S.obliquus</i> 8546 (TAP-K)	183.59 \pm 2.73 ^e	369.48 \pm 5.51 ^e	13.66 \pm 0.20 ^e
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	849.46 \pm 8.92 ^d	962.69 \pm 12.45 ^d	51.71 \pm 1.15 ^d
<i>A. halophytica</i> (BG11-N) + <i>C.reinhardtii</i> CC-124 (TAP-S)	163.77 \pm 2.69 ^f	175.16 \pm 2.88 ^f	9.97 \pm 0.16 ^f

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่บ่มในอาหาร BG11-N ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่บ่มในอาหารเหลว TAP ที่ขาดอาหารบางชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของแต่ละสายพันธุ์การโตในสภาวะที่มีแสง ห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

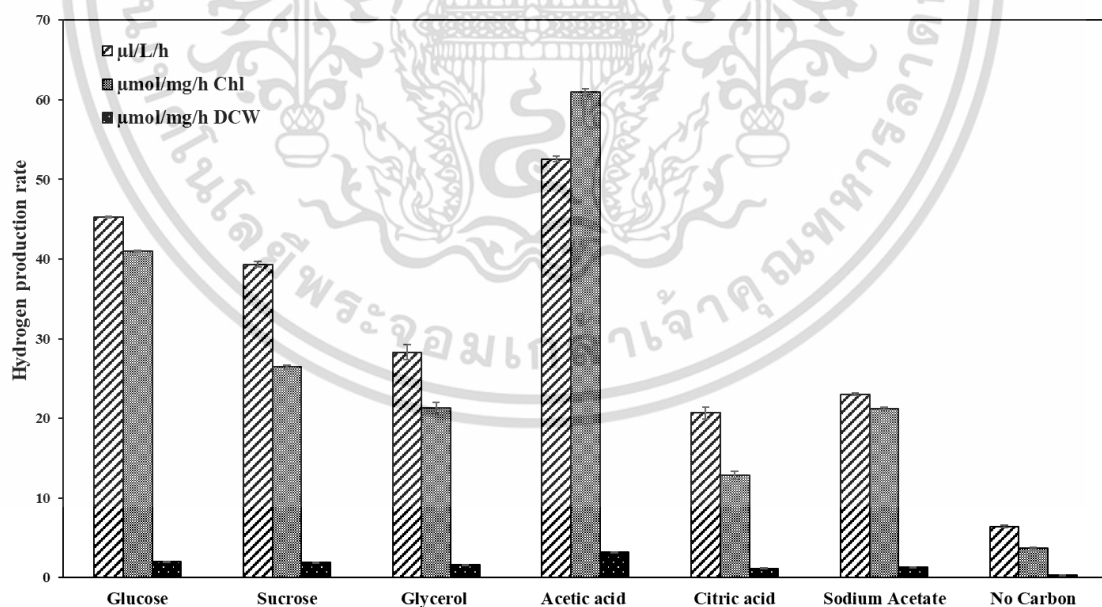
4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. Cir-G

4.4.1 การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Chlorella sp. Cir-G

ที่นำ *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยให้ความเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมเท่ากับอาหาร TAP สูตรปกติ ที่ความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล กรดอะซิติก กรดซิตริก โซเดียมอะซิเตต และ อาหารเหลว TAP-N (ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่า *Chlorella* sp. Cir-G ที่บ่มในอาหาร TAP-N ซึ่งมีกรดอะซิติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่อยู่ในอาหาร TAP-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 60.96 ± 0.86 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.14) และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เท่ากับ 1682.20 ± 2.98 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.15)

จึงนำ *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนไปศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ต่อไป



รูปที่ 4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

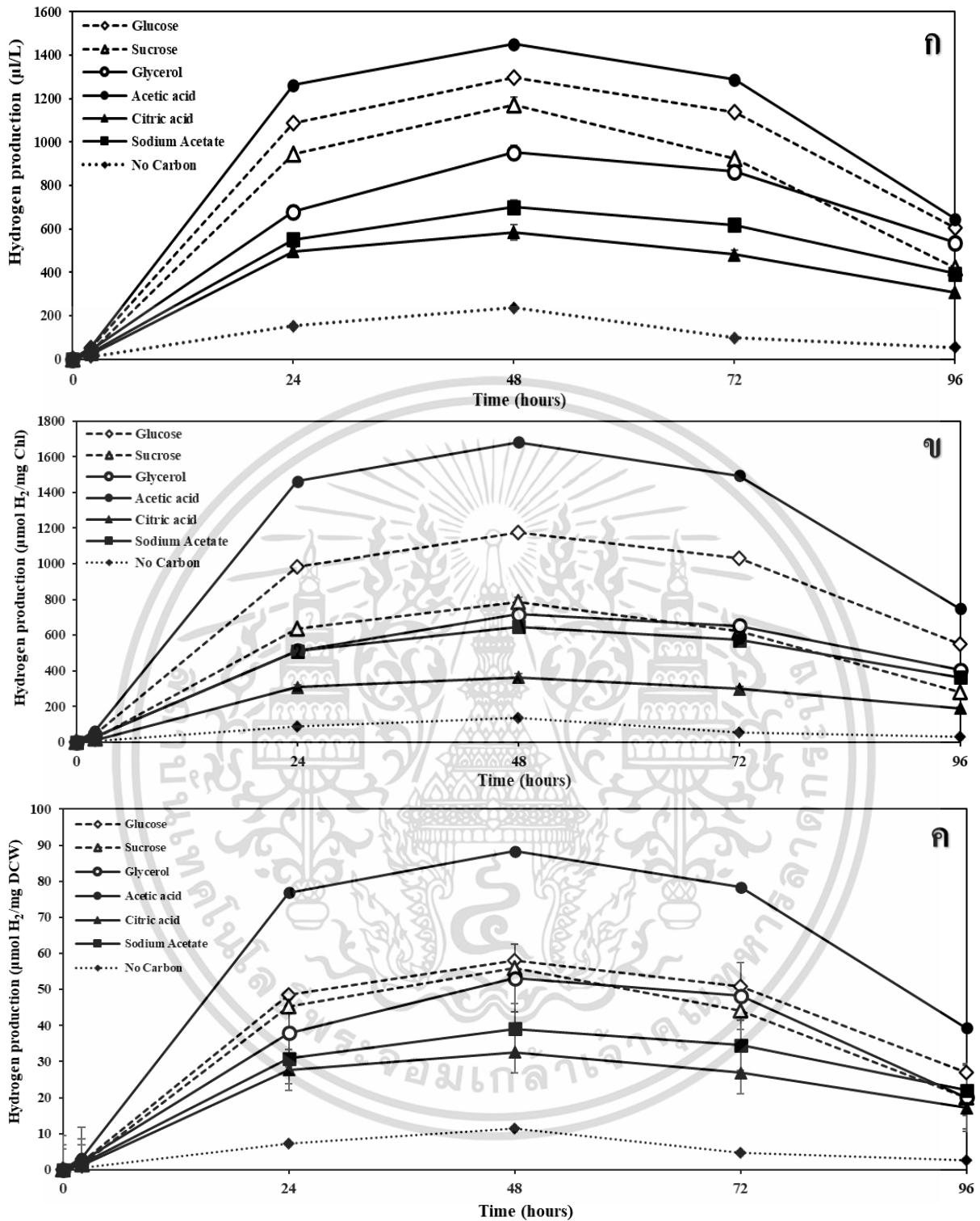
ตารางที่ 4.14 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ที่บ่มใน TAP-N มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ราคาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งคาร์บอน	อัตราการผลิตไฮโดรเจน					
	$\mu\text{l /L/h}$		$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Ch/h}$		$\mu\text{mo H}_2/\text{mg DCW/h}$	
Glucose	45.69	$\pm 1.00^b$	41.01	$\pm 0.90^b$	2.02	$\pm 0.04^b$
Sucrose	39.35	$\pm 0.37^c$	26.47	$\pm 0.25^c$	1.88	$\pm 0.01^c$
Glycerol	28.29	$\pm 0.96^d$	21.33	$\pm 0.72^d$	1.58	$\pm 0.05^d$
Acetic acid	52.56	$\pm 0.34^a$	60.96	$\pm 0.86^a$	3.20	$\pm 0.02^a$
Citric acid	20.67	$\pm 0.78^f$	12.82	$\pm 0.48^e$	1.15	$\pm 0.04^f$
Sodium acetate	23.00	$\pm 0.15^e$	21.25	$\pm 0.13^d$	1.28	$\pm 0.01^e$
No Carbon	6.41	$\pm 0.14^s$	3.69	$\pm 0.08^f$	0.31	$\pm 0.01^s$

ตารางที่ 4.15 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. ที่ป้อนใน TAP-N มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

แหล่งคาร์บอน	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด					
	μL		$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl}$		$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW}$	
Glucose	1297.52	$\pm 24.91^b$	1175.45	$\pm 11.91^b$	57.92	$\pm 0.58^b$
Sucrose	1170.89	$\pm 24.04^c$	787.68	$\pm 22.90^c$	56.01	$\pm 1.63^c$
Glycerol	951.51	$\pm 32.36^d$	717.39	$\pm 24.40^d$	53.10	$\pm 1.81^d$
Acetic acid	1450.55	$\pm 2.60^a$	1682.20	$\pm 2.98^a$	88.30	$\pm 0.15^a$
Citric acid	584.32	$\pm 5.78^f$	362.63	$\pm 22.20^f$	32.61	$\pm 1.99^f$
Sodium acetate	700.59	$\pm 3.81^e$	647.31	$\pm 28.47^e$	39.09	$\pm 1.72^e$
No Carbon	237.44	$\pm 4.78^s$	136.68	$\pm 2.75^s$	11.36	$\pm 0.22^s$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



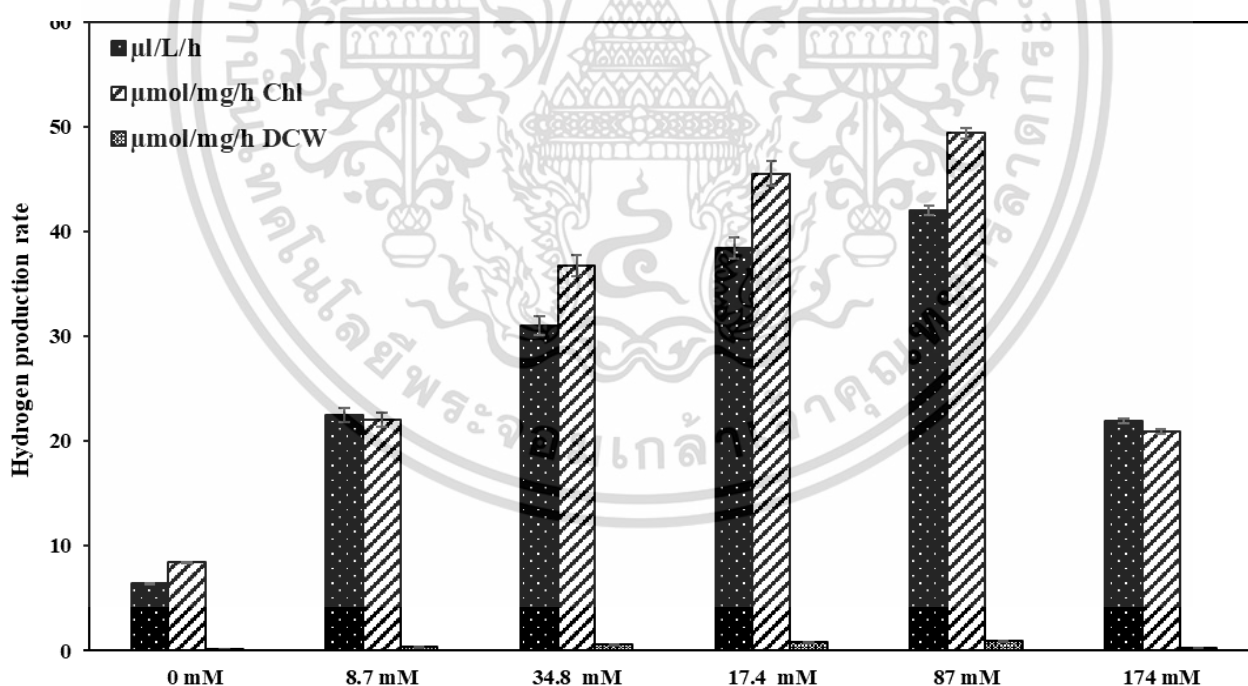
รูปที่ 4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2. การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp. Cir-G* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่แตกต่างกัน

นำหัวเชื้อ *Chlorella sp. Cir-G* ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่แตกต่างกัน คือ 0 , 8.7, 17.4 (สูตรปกติ) , 34.8 , 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าจากการทดลองการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน พบว่า *Chlorella sp. CirG* ที่บ่มในอาหาร TAP-N ซึ่งมีกรดอะซีติกความเข้มข้น 87 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 49.41 ± 0.51 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.16) และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1777.85 ± 14.25 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.17) ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.2 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP-N สูตรปกติ

ดังนั้น จึงนำ *Chlorella sp. CirG* ที่บ่มในอาหาร TAP-N ที่มีกรดอะซีติกความเข้มข้น 87 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella sp. CirG* ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆต่อไป



รูปที่ 4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp. CirG* ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

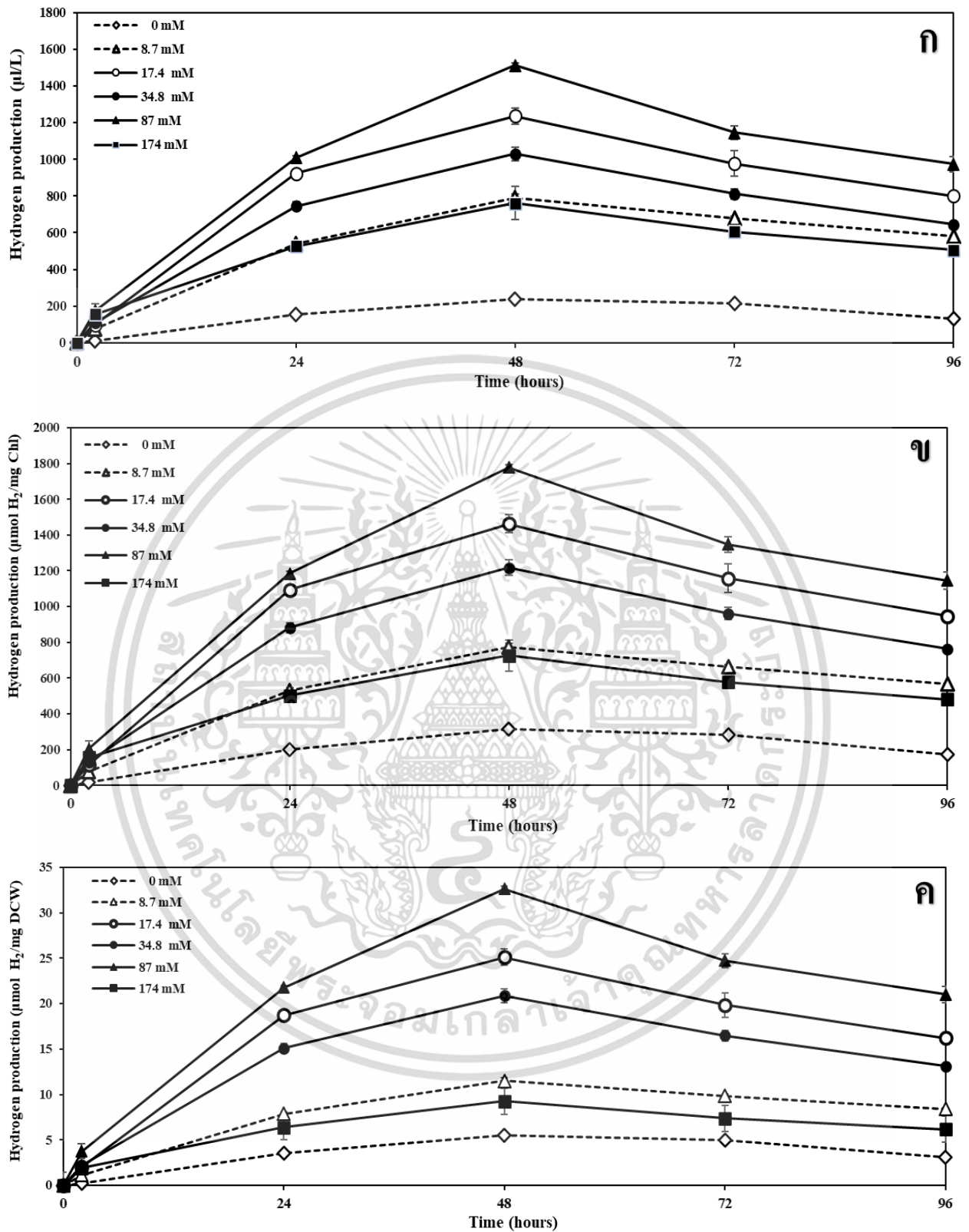
ตารางที่ 4.16 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. CirG ที่ป่มเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่างๆ

ความเข้มข้นของ กรดอะซีติก (มิลลิโมลาร์)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมง								
	$\mu\text{L}/\text{L}/\text{h}$			$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$			$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW}/\text{h}$		
0 mM	6.38	\pm	0.03 ^e	8.41	\pm	0.05 ^e	0.15	\pm	0.01 ^f
8.7 mM	22.49	\pm	0.70 ^d	22.03	\pm	0.69 ^d	0.33	\pm	0.01 ^d
34.8 mM	31.02	\pm	1.00 ^c	36.72	\pm	1.19 ^c	0.63	\pm	0.02 ^c
17.4 mM	38.40	\pm	0.88 ^b	45.52	\pm	1.04 ^b	0.78	\pm	0.01 ^b
87 mM	42.00	\pm	0.44 ^a	49.41	\pm	0.51 ^a	0.91	\pm	0.01 ^a
174 mM	21.96	\pm	0.22 ^d	20.92	\pm	0.21 ^d	0.27	\pm	0.01 ^e

ตารางที่ 4.17 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. CirG ที่ป่มเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่างๆ

ความเข้มข้นของ กรดอะซีติก (มิลลิโมลาร์)	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด								
	μL			$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl}$			$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW}$		
0 mM	238.71	\pm	2.35 ^f	314.35	\pm	6.54 ^f	5.51	\pm	0.05 ^f
8.7 mM	790.29	\pm	1.82 ^d	773.79	\pm	11.37 ^d	11.50	\pm	0.31 ^d
34.8 mM	1028.64	\pm	7.71 ^c	1217.59	\pm	14.64 ^c	20.87	\pm	0.76 ^c
17.4 mM	1236.35	\pm	4.01 ^b	1463.26	\pm	12.08 ^b	25.09	\pm	0.89 ^b
87 mM	1511.25	\pm	12.97 ^a	1777.85	\pm	15.26 ^a	32.64	\pm	0.28 ^a
174 mM	761.86	\pm	3.20 ^e	725.85	\pm	5.94 ^e	9.27	\pm	1.09 ^e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

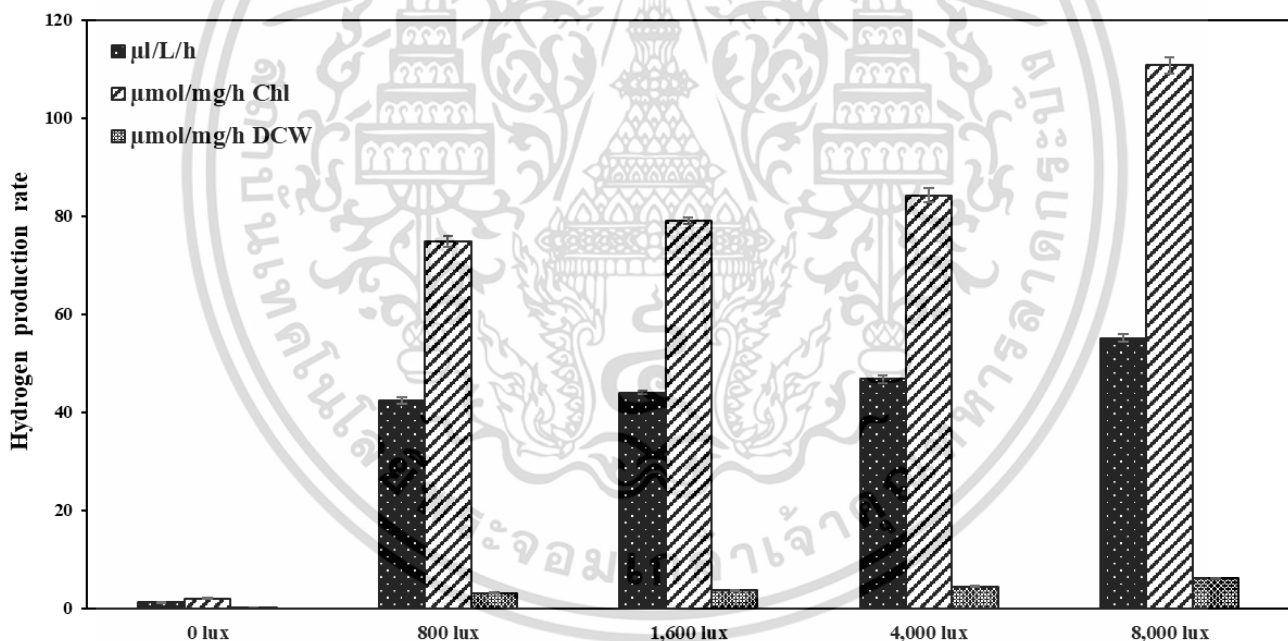


รูปที่ 4.18 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3. การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp. Cir-G* ภายใต้ความเข้มแสงที่ต่างกัน

จากการบ่ม *Chlorella sp. CirG* ในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยบ่มในขวดที่ปิดด้วยจุกยางและฟาลูมิเนียม นำไปฟั่นไล่อากาศออก โดยใช้ก๊าซอาร์กอนพ่น เป็นเวลา 15 นาที นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงแตกต่างกัน ได้แก่ 0, 800 (สูตรปกติ) 1,600, 4,000 และ 8,000 ลักซ์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่า *Chlorella sp. CirG* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N มีกรดอะซีติกความเข้มข้น 87 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มแสงที่ 8,000 ลักซ์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 110.73 ± 1.57 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.18) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ $3,617.65 \pm 23.19$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.19) ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.4 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP-N ภายใต้ความเข้มแสงปกติ (ดังรูปที่ 4.19)



รูปที่ 4.19 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp. CirG* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

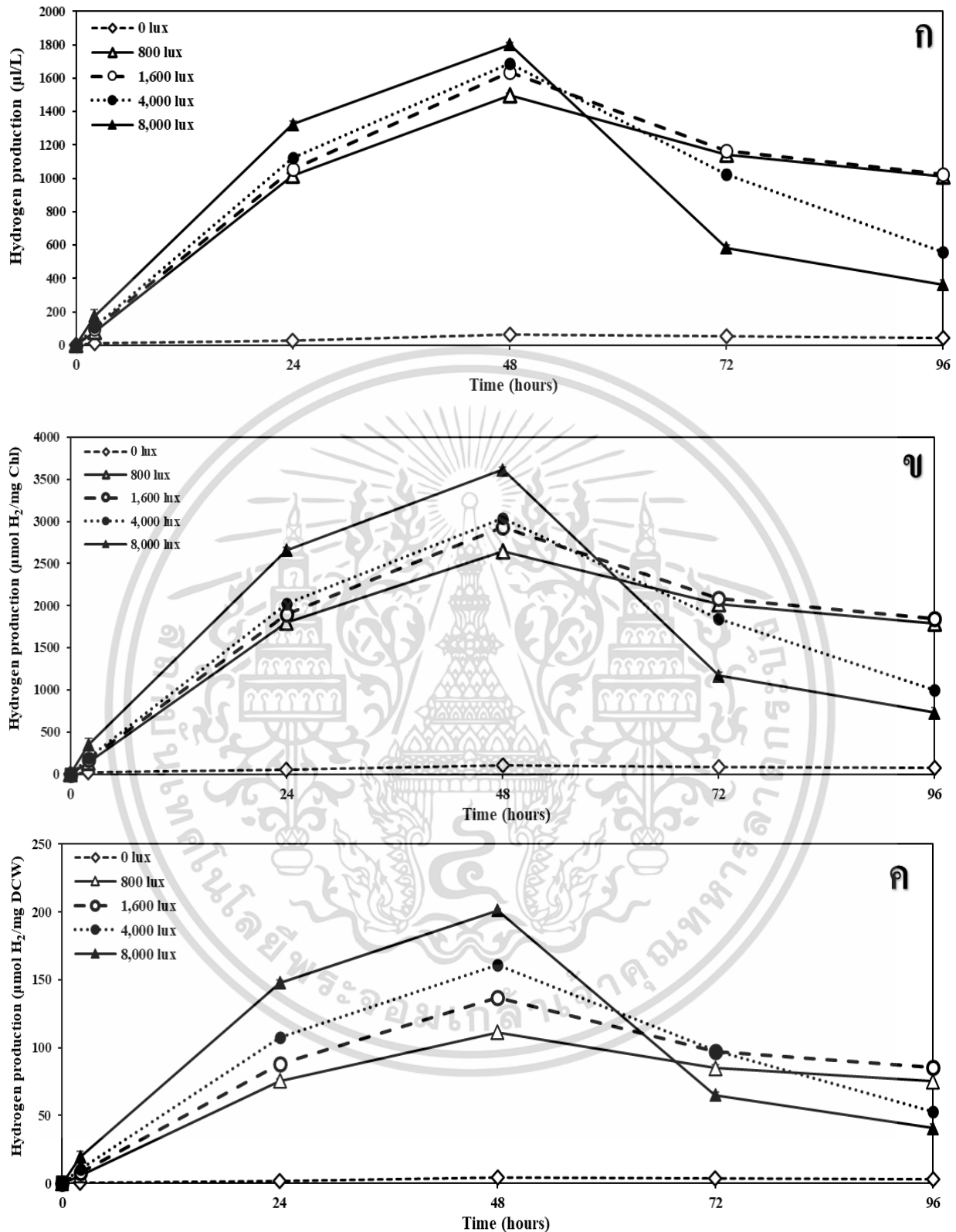
ตารางที่ 4.18 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของ กรดอะซีติก (มิลลิโมลาร์)	อัตราการผลิตไฮโดรเจน					
	$\mu\text{L/h}$		$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl/h}$		$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW/h}$	
0 lux	1.21	$\pm 0.06^e$	2.02	$\pm 0.11^e$	0.08	$\pm 0.01^e$
800 lux	42.37	$\pm 0.59^d$	74.86	$\pm 1.05^d$	3.15	$\pm 0.04^d$
1,600 lux	43.97	$\pm 0.35^c$	79.04	$\pm 1.04^c$	3.68	$\pm 0.03^c$
4,000 lux	46.76	$\pm 0.75^b$	84.26	$\pm 1.19^b$	4.47	$\pm 0.07^b$
8,000 lux	55.15	$\pm 0.78^a$	110.73	$\pm 1.57^a$	6.15	$\pm 0.08^a$

ตารางที่ 4.19 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของ กรดอะซีติก (มิลลิโมลาร์)	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด					
	μL		$\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl}$		$\mu\text{mol H}_2/\text{mg DCW}$	
0 lux	63.17	$\pm 1.05^e$	105.77	$\pm 1.77^e$	4.23	$\pm 0.07^e$
800 lux	1,498.29	$\pm 12.69^d$	2,646.93	$\pm 22.42^d$	111.48	$\pm 0.94^d$
1,600 lux	1,633.78	$\pm 16.45^c$	2,936.66	$\pm 29.56^c$	136.75	$\pm 1.37^c$
4,000 lux	1,685.22	$\pm 13.01^b$	30,36.25	$\pm 23.43^b$	161.21	$\pm 1.24^b$
8,000 lux	1,801.82	$\pm 11.55^a$	3,617.65	$\pm 23.19^a$	201.09	$\pm 1.29^a$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่บ่มในอาหารเหลว TAP-N ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ยิ่งระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นก็จะทำให้ปริมาณของคลอโรฟิลล์สูงขึ้น

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว TAP พบว่า *Chlorella* sp. CirG มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.048 ± 0.002 ต่อชั่วโมง รองลงมาเป็น *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.028 ± 0.002 ต่อชั่วโมง และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.020 ± 0.002 ต่อชั่วโมง

5.2 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

จากการทดลองพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 44 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร BG11 สูตรปกติ และสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารขาดอาหารชนิดต่างๆสามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ ดังนี้

- 1) *Chlorella* sp. CirG ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ
- 2) *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-K มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ
- 3) *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP--S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ

5.3 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

จากการทดลองพบว่า *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนทั้งการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากแสงและมีแสงน้อยกว่าสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงแบบเดี่ยว (ไม่เพาะเลี้ยงร่วมกัน) มีอัตราในการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG

จากการทดลองพบว่า *Chlorella* sp. CirG ที่ป้อนในอาหาร TAP-N มีกรดอะซิติก (Acetic acid) ความเข้มข้น 87 mM เป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้ความเข้มข้นแสง 8,000 ลักซ์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 110.73 ± 1.57 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตไฮโดรเจนผลได้สูงสุดเท่ากับ $3,617.65 \pm 23.19$ ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งมีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.4 เท่า เมื่อเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติและเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวชนิดนี้สำหรับการผลิตไฮโดรเจนในอนาคต

5.5 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาอัตราส่วนของสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายร่วมกัน
2. ศึกษาอายุเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. CirG ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2557). ไฮโดรเจน. ในกรมพัฒนาพลังงาน
ทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, สารานุกรมพลังงานทดแทน (pp.47,49,54-56,61,66,68-
69, 74-75). กรุงเทพมหานคร,ประเทศไทย.
- กิตติพัฒน์วาริชนันท์.“สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว
Scenedesmus obliquus TISTR 8546”.(วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะ
วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2562)
- กิตติพัฒน์ วาริชนันท์ ฅณภัทร ต่วยศรีแก้ว และณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์. “การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว
Chlamydomonas reinhardtii CC-124” (ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะ
วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2558)
- คณะกรรมการกำกับกิจการพลังงาน. (2565). ไฮโดรเจน : อนาคตแห่งพลังงานโลก (ตอนที่ 1) สืบค้น 31
พฤษภาคม 2566 จาก <https://www.erc.or.th/th/energy-articles/2691>
- ชัยชาญ ฤทธิกริกโร. 2547. พลังงานชีวมวลกับศักยภาพในประเทศไทย. โลกพลังงาน. 7, 22-29.
- ยุวดี คำแหง. “การผลิตไฮโดรเจนจากสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว
Chlamydomonas reinhardtii”. (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2561)
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : ภาคชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาคชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 122-125.
- วิทวัส แจ็งเอี่ยม. 2553. “กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย.” *ASEAN Journal of Scientific
and Technological Reports*
- สร้อยญา พันธุ์พุกษ์ และ อรรณู อินเจริญศักดิ์. 2557. “การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยก
ได้จากนาข้าวของประเทศไทย.” คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง.
- สร้อยญา พันธุ์พุกษ์ และคณะ 2559. “รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2554 การประยุกต์ใช้น้ำ
ทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย
เค็ม *Aphanothece halophytica*”. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
ทหารลาดกระบัง
- เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถถ่ายทอด. 2557. “การผลิตไฮโดรเจนและลักษณะทางพันธุกรรมของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวทนเค็ม *Aphanothece halophytica*.” (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทระดับบัณฑิตศึกษา- ศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2557)

อัญชลี ศิริขจรกิจ. 2011. สาหร่ายสีเขียวแคลมิโดโมนาส (*Chlamydomonas reinhardtii*) กับงานวิจัยทางพันธุศาสตร์. Thai J. Genet. 4(1) 9:21.

Aikaterini Papazi, Armida-Irene Gjindali, Elizabeth Kastanaki, Konstantinos Assimakopoulos, Konstantinos Stamatakis, Kiriakos Kotzabasis. (2014). Potassium deficiency, a “smart” cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*. International Journal of Hydrogen Energy. Pages 19452-19464

Alejandro Ruiz-Marin, Yunuen Canedo-López and Paolah Chávez-Fuentes. (2020) “Biohydrogen production by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* immobilized cultivated in artificial wastewater under different light quality” Ruiz-Marin et al. *AMB Expr* (2020) 10:191 <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01129-w>

Carl Safi , Bachar Zebib ,Othmane Merah, Pierre-Yves Pontalier and Carlos Vaca-Garcia. “Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35 : 265-278

Eleftherios Touloupakis , Cecilia araloni , AnaMargarita SilvaBenavides , Jiří Masojid Giuseppe Torzillo 2021. “Sustained photobiological hydrogen production by *Chlorella vulgaris* without nutrient starvation.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 46 : 3684-3694

Giuliano Dragone 2022. “ Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 160 : 112284

Harris, E.H. 2001 *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 363-406

Hindák, F., and Hindáková, A. 2008 “Morphology and taxonomy of some rare chlorococcalean algae (Chlorophyta).” *Biologia*. 63(6): 781-90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jun Pyo Kim, Chang Duk Kang, Tai Hyun Park, Mi Sun Kim, Sang Jun Sim 2006.

“Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 31 : 1585-1590

Madawar D, Garg N, Shah V. 2000. “Cyanobacteria hydrogen production.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:757-767

Meilin He, Ling Li, Litao Zhang, Jianguo Liu. (2012). The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy* Pages 16903-16915

Nattanon Chinchusak, Aran Incharoensakdi, Saranya Phunpruch 2022. “Enhancement of dark fermentative hydrogen production in nitrogen-deprived halotolerant unicellular cyanobacterium *Aphanothece halophytica* by treatment with reducing agents.” *Bioresource Technolohy*. 167 : 106624

Neda Fakhimi and Omid Tavakoli 2019. “Improving hydrogen production using co-cultivation of bacteria with *Chlamydomonas reinhardtii* microalga.” *Materials Science for Energy Technologies* 2 : 1-7

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.

Samart Taikhao ,Aran Incharoensakdi, Saranya Phunpruch 2015. “Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in seawater.” *Journal of Applied Phycology* 27 : 187–196

T.K. Antal , T.E. Krendeleva, T.V. Laurinavichene , V.V. Makarova, M.L. Ghirardi, A.B Rubina, Tsygankovb, M. SeibertThe. 2003. dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1607 (2003) 153 – 160

V. Grechanik, I. Naidov, M. Bolshakov, A. Tsygankov 2021. “Photoautotrophic hydrogen production by nitrogen-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 46 : 3565-3575

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะเพื่อการเรียนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปเผยแพร่ในสื่อสังคมออนไลน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(chlorophyta, trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117, 257–264.

Zita Gruber , Andras,Jozsef Toth , Alfréd Menyhárd , Peter Mizsey , Mikołaj Owsianiak, Danil Fozer 2022. “Improving green hydrogen production from *Chlorella vulgaris* via formic acid-mediated hydrothermal carbonisation and neural network modelling.” *Bioresource Technolohy*. 365 : 128071

iEnergyGuru. (2023). การผลิตไฮโดรเจน (Hydrogen production). สืบค้นเมื่อ 3 พฤษภาคม 2566 จาก <https://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/>

Culture Collection of Autotrophic Organism. (2023). *Scenedesmus obliquus*. สืบค้นเมื่อ 3 พฤษภาคม 2566. จาก <https://ccala.butbn.cas.cz/en/scenedesmus-obliquus-turpin-kuetzing-0>

iNaturalist. (2023). *Aphanothece halophytica*. สืบค้นเมื่อ 3 พฤษภาคม 2566. จาก <https://colombia.inaturalist.org/taxa/1143297-Aphanothece-halophytica>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหาร BG11 + Turk Island Salt Solution + Modified BG11 Medium

Sodium chloride (NaCl)		28.16	มิลลิลิตร
BG11		10	มิลลิลิตร
BG11 Trace metal mix		1000	ไมโครลิตร
Stock A		100	มิลลิลิตร
Stock B		100	มิลลิลิตร
BG11 (100x)	NaNO ₃	119.55	กรัม/ลิตร
	MgSO ₄ 7H ₂ O	7.48	กรัม/ลิตร
	CaCl ₂ 2H ₂ O	3.60	กรัม/ลิตร
	Citric acid	0.60	กรัม/ลิตร
	Na ₂ EDTA	0.104	กรัม/ลิตร
Stock A	KCl	6.66	กรัม/ลิตร
	MgCl ₂ 6H ₂ O	55.00	กรัม/ลิตร
	CaCl ₂ 2H ₂ O	14.66	กรัม/ลิตร
Stock B	MgSO ₄ 7H ₂ O	74.80	กรัม/ลิตร
Trace metal Mix	H ₂ BO ₃	2.86	กรัม/ลิตร
	MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81	กรัม/ลิตร
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.220	กรัม/ลิตร
	NaMO ₄ 2H ₂ O	0.390	กรัม/ลิตร
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.790	กรัม/ลิตร
	Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.049	กรัม/ลิตร
สาร 3 ตัว	Na ₂ CO ₃	1000	ไมโครลิตร
	KH ₂ PO ₄	1000	ไมโครลิตร
	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	1000	ไมโครลิตร

อาหารเหลว ทำการเคลฟส่วนผสมทั้งหมดก่อนแล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อน จากนั้นเติมสาร 3 ตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว Tris acetate medium (TAP) (Harris, 1989)

2X Filner's Beijernicks Solution	25	มิลลิลิตร/ลิตร
1M Potassium Phosphate	1	มิลลิลิตร/ลิตร
Trace mineral Solution	5	มิลลิลิตร/ลิตร
Tris Base	2.42	กรัม/ลิตร
Glacial Acetic Acid (17.4 mM)	1	มิลลิลิตร/ลิตร

(อาหารแข็งให้เติมวัน 15 กรัม/ลิตร และทำการปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

(เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องอบไอน้ำฆ่าเชื้อและทำการเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส)

ส่วนประกอบ Trace mineral Solution

ประกอบไปด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ทำการคนและให้ความร้อนปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.50	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.14	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	2.20	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
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.073	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ 1M Potassium Phosphate

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1M stock	20	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1M stock	30	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์คำนวณทางสถิติ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ ในเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งใช้โปรแกรมในการคำนวณทางสถิติ SPSS โดยใช้วิธี ANOVA ในการวิเคราะห์

ตาราง ค.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ เช่น อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณของเซลล์ เป็นต้น

Uchl				DTchl					
Duncan ^a				Duncan ^a					
Subset for alpha = 0.05				Subset for alpha = 0.05					
stain	N	1	2	3	stain	N	1	2	3
124	3	.0202			CirG	3	14.2619		
8546	3		.0286		8546	3		24.2909	
CirG	3			.0487	124	3			34.2624
Sig.		1.000	1.000	1.000	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.2 ความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติและขาดแหล่งธาตุอาหารบางชนิด

อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 24 ชั่วโมง

Rvolume					Rchlorophyll					RDcw							
Duncan*					Duncan*					Duncan*							
GC	N	Subset for alpha = 0.05				GC	N	Subset for alpha = 0.05				GC	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4			1	2	3	4			1	2	3	4
CirG +Tap	3	20.9367				CirG +Tap	3	12.0933				CirG +Tap	3	.7533			
CirG +Tap-N	3		24.7567			CirG +Tap-N	3		19.6533			CirG +Tap-N	3		1.2767		
CirG +Tap-K	3			37.1267		CirG +Tap-K	3			36.1267		CirG +Tap-K	3			1.8567	
CirG +Tap-S	3				42.8600	CirG +Tap-S	3				47.2567	CirG +Tap-S	3				2.0767
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

Rvolume					Rchl					RDCw							
Duncan*					Duncan*					Duncan*							
TF	N	Subset for alpha = 0.05				TF	N	Subset for alpha = 0.05				TF	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4			1	2	3	4			1	2	3	4
Scenedesmus obliquus 8546 Control	3	7.1753				Scenedesmus obliquus 8546 Control	3	11.4559				Scenedesmus obliquus 8546 Control	3	.4805			
Scenedesmus obliquus 8546-S	3		8.9518			Scenedesmus obliquus 8546-N	3		14.2593			Scenedesmus obliquus 8546-N	3		.5154		
Scenedesmus obliquus 8546-N	3			9.2358		Scenedesmus obliquus 8546-S	3			17.1394		Scenedesmus obliquus 8546-S	3			.6661	
Scenedesmus obliquus 8546-K	3				13.6451	Scenedesmus obliquus 8546-K	3				23.1062	Scenedesmus obliquus 8546-K	3				1.1422
Sig.		1.000	.547	1.000		Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	Sig.		.288	1.000	1.000	
Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

Rvolume					Rchl					RDCw							
Duncan*					Duncan*					Duncan*							
TF	N	Subset for alpha = 0.05				TF	N	Subset for alpha = 0.05				TF	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4			1	2	3	4			1	2	3	4
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - K	3	9.1447				Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - K	3	14.1221				Chlamydomonas reinhardtii CC 124 Control	3	1.7608			
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - N	3		19.7601			Chlamydomonas reinhardtii CC 124 Control	3		37.9462			Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - K	3		2.0412		
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 Control	3			23.6651		Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - N	3			38.5639		Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - N	3			4.4107	
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - S	3				29.1145	Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - S	3				42.1155	Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - S	3				4.8741
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	Sig.		1.000	.459	1.000		Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลที่ได้ผลิตสูงสุดในการผลิตไฮโดรเจน

Yvolume

Duncan^a

GC	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
CirG +Tap	3	814.5600			
CirG +Tap-K	3		881.8367		
CirG +Tap-S	3			1244.9367	
CirG +Tap-N	3				1360.8800
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ychlorophyll

Duncan^a

GC	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
CirG +Tap	3	470.4700			
CirG +Tap-K	3		699.9333		
CirG +Tap-S	3			1211.2833	
CirG +Tap-N	3				1500.5167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

YdCw

Duncan^a

GC	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
CirG +Tap	3	29.3267			
CirG +Tap-K	3		45.4233		
CirG +Tap-S	3			55.5767	
CirG +Tap-N	3				66.0367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

yvolume

Duncan^a

TF	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Scenedesmus obliquus 8546 Control	3	471.2856		
Scenedesmus obliquus 8546 -N	3	547.2553	547.2553	
Scenedesmus obliquus 8546 -S	3		666.7482	
Scenedesmus obliquus 8546 -K	3			915.5675
Sig.		.284	.108	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ychl

Duncan^a

TF	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Scenedesmus obliquus 8546 Control	3	752.4421		
Scenedesmus obliquus 8546 -N	3	845.5109		
Scenedesmus obliquus 8546 -S	3		1276.5781	
Scenedesmus obliquus 8546 -K	3			1550.3937
Sig.		.427	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

yDcw

Duncan^a

TF	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Scenedesmus obliquus 8546 -N	3	30.5388		
Scenedesmus obliquus 8546 Control	3	31.5593		
Scenedesmus obliquus 8546 -S	3		49.6093	
Scenedesmus obliquus 8546 -K	3			76.6379
Sig.		.841	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

yvolume

Duncan^a

TF	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - K	3	219.4736			
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - N	3	474.2431			
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 Control	3		567.9626		
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - S	3			698.7472	
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ychl

Duncan^a

TF	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - K	3	338.9309		
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 Control	3		908.3100	
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - N	3			925.6331
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - S	3			1010.7708
Sig.		1.000	.459	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

yDcw

Duncan^a

TF	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 Control	3	42.2591			
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 -K	3		48.9896		
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - N	3			105.8579	
Chlamydomonas reinhardtii CC 124 - S	3				116.9777
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.3 ความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่ปราศแสง

Yvolume

Duncan^a

Subset for alpha = 0.05

GC	N	1	2	3	4	5	6	7
Ap-N	3	2.5733						
Ap-N+124-S	3		163.7700					
Ap-N+8546-K	3			183.5933				
124-S	3				849.4600			
Ap-N+ClrG-N	3					883.5233		
8546-K	3						958.5100	
ClrG-N	3							1179.3067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ychlorophyll

Duncan^a

Subset for alpha = 0.05

GC	N	1	2	3	4	5	6	7
Ap-N	3	7.9733						
Ap-N+124-S	3		175.1600					
Ap-N+8546-K	3			359.4867				
124-S	3				962.6867			
Ap-N+ClrG-N	3					1047.8233		
8546-K	3						1225.4033	
ClrG-N	3							1393.3167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

YdDCw

Duncan^a

Subset for alpha = 0.05

GC	N	1	2	3	4	5	6	7
Ap-N	3	.2833						
Ap-N+124-S	3		9.9700					
Ap-N+8546-K	3			13.8633				
124-S	3				51.7133			
Ap-N+ClrG-N	3					53.7867		
8546-K	3						64.1867	
ClrG-N	3							71.7900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.4 ความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของการเพาะเลี้ยงร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะที่มีแสง

Yvolume

Duncan^a

GC	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Ap-N	3	7.8600						
Ap-N+124-S	3		32.3333					
Ap-N+8546-K	3			48.7167				
124-S	3				70.0000			
8546-K	3					100.4600		
Ap-N+CirG-N	3						134.5100	
CirG-N	3							171.2233
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ychlorophyll

Duncan^a

GC	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Ap-N	3	19.1433						
Ap-N+124-S	3		92.2267					
Ap-N+8546-K	3			216.1167				
124-S	3				245.6100			
8546-K	3					267.3400		
Ap-N+CirG-N	3						338.6533	
CirG-N	3							364.4733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

YdDCw

Duncan^a

GC	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Ap-N	3	5.5867						
Ap-N+124-S	3		5.2500					
Ap-N+8546-K	3			8.1033				
124-S	3				12.4100			
8546-K	3					15.7800		
Ap-N+CirG-N	3						20.9100	
CirG-N	3							24.3967
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.5 ความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. CirG เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N (ปราศจากไนโตรเจน) ที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Yvolume

Duncan*

GC	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
No carbon	3	237.4433						
Citric acid	3		584.3200					
Sodium acetate	3			700.5833				
Glycerol	3				951.5133			
Sucrose	3					1170.8867		
Glucose	3						1297.5167	
Acitric acid	3							1450.5467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ychlorophyll

Duncan*

GC	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
No carbon	3	136.6833						
Citric acid	3		362.6233					
Sodium acetate	3			647.3133				
Glycerol	3				717.3900			
Sucrose	3					787.6800		
Glucose	3						1175.4467	
Acitric acid	3							1682.2000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

YdCw

Duncan*

GC	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
No carbon	3	11.3567					
Citric acid	3		32.6033				
Sodium acetate	3			39.0933			
Glycerol	3				53.0967		
Sucrose	3					56.0100	
Glucose	3						57.9233
Acitric acid	3						88.3033
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.111	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.6 ความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. CirG เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N (ปราศจากไนโตรเจน) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก (Acetic acid) ต่างๆ

Yvolume						
Duncan ^a						
Subset for alpha = 0.05						
GC	N	1	2	3	4	5
0 mM	3	238.7067				
174 mM	3		761.8567			
87 mM	3		790.2967			
34.8 mM	3			1028.6433		
17.4 mM	3				1236.3533	
87 mM	3					1511.2467
Sig.		1.000	.454	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Rvolume						
Duncan ^a						
Subset for alpha = 0.05						
GC	N	1	2	3	4	5
0 mM	3	6.3867				
174 mM	3		21.9533			
87 mM	3		22.4967			
34.8 mM	3			31.0233		
17.4 mM	3				38.4600	
87 mM	3					42.0033
Sig.		1.000	.325	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ychlorophyll						
Duncan ^a						
Subset for alpha = 0.05						
GC	N	1	2	3	4	5
0 mM	3	314.3533				
174 mM	3		725.8500			
87 mM	3		773.7933			
34.8 mM	3			1217.5933		
17.4 mM	3				1463.2667	
87 mM	3					1777.8500
Sig.		1.000	.228	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Rchlorophyll						
Duncan ^a						
Subset for alpha = 0.05						
GC	N	1	2	3	4	5
0 mM	3	8.4067				
174 mM	3		20.9200			
87 mM	3		22.0267			
34.8 mM	3			36.7233		
17.4 mM	3				45.5200	
87 mM	3					49.4133
Sig.		1.000	.093	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

YdCw							
Duncan ^a							
Subset for alpha = 0.05							
GC	N	1	2	3	4	5	6
0 mM	3	5.5100					
174 mM	3		9.2767				
87 mM	3			11.5033			
34.8 mM	3				20.8733		
17.4 mM	3					25.0867	
87 mM	3						32.6467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

RDcW							
Duncan ^a							
Subset for alpha = 0.05							
GC	N	1	2	3	4	5	6
0 mM	3	.1500					
174 mM	3		.2667				
87 mM	3			.3300			
34.8 mM	3				.6267		
17.4 mM	3					.7833	
87 mM	3						.9100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.7 ความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. CirG เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-N (ปราศจากไนโตรเจน) ที่มีกรดอะซิติก (Acetic acid) ความเข้มข้นของ 87 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

Rvolume						
Duncan*						
Subset for alpha = 0.05						
GC	N	1	2	3	4	5
0	3	1.2100				
800	3		42.3767			
1,600	3			43.9733		
4,000	3				46.7667	
8,000	3					55.1533
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Rchlorophyll						
Duncan*						
Subset for alpha = 0.05						
GC	N	1	2	3	4	5
0	3	2.0267				
800	3		74.8633			
1,600	3			79.0367		
4,000	3				84.2567	
8,000	3					110.7367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

RDcw						
Duncan*						
Subset for alpha = 0.05						
GC	N	1	2	3	4	5
0	3	.0800				
800	3		3.1533			
1,600	3			3.6800		
4,000	3				4.4733	
8,000	3					6.1567
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 20 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว ชมพูพรรณ ลูกศร รหัสนักศึกษา 62050583

นางสาว ธัญชนก ศิริธรรมคุณ รหัสนักศึกษา 62050603

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ขอรับรอง
ว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ผลของแหล่งคาร์บอนและความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว
เซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp. CirG

ชื่อภาษาอังกฤษ Effects of Carbon Source and Light Intensity on Hydrogen
Production by Unicellular Green Alga *Chlorella* sp.

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการ
พิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักษราวิสุทธิ 0.87% หรือโปรแกรม Turnitin -

ลงชื่อ ชมพูพรรณ ลูกศร.....

(ชมพูพรรณ ลูกศร)

นักศึกษา

ลงชื่อ ธัญชนก ศิริธรรมคุณ.....

(ธัญชนก ศิริธรรมคุณ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของ
นักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงขอลงชื่อไว้เป็น
หลักฐาน

ลงชื่อ.....สรัญญา พันธุ์ฤกษ์.....

(รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้