สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียว

OPTIMIZATION OF HYDROGEN PRODUCTION FROM GREEN ALGAL CO-CULTIVATION

นางสาวโชษิตา บุญนาค
นางสาวภานุมาศ ชัยปลื้ม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMIZATION OF HYDROGEN PRODUCTION FROM GREEN ALGAL CO-CULTIVATION

CHOSITA BOONNAK
PANUMAS CHAIPLUEM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแ
งเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียว Optimization of Hydrogen Production from Green Algal Co-cultivation
ชื่อนักศึกษา	นางสาวโชษิตา บุญนาค รหัสนักศึกษา 62050587 นางสาวภานุมาศ ชัยปลื้ม รหัสนักศึกษา 62050636
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียว

ชื่อนักศึกษา นางสาวโชษิตา บุญนาค รหัสนักศึกษา 62050587
นางสาวภานุมาศ ชัยปลื้ม รหัสนักศึกษา 62050636

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

พลังงานไฮโดรเจน เป็นพลังงานชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากสำหรับการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต ไฮโดรเจนสามารถผลิตโดยจุลินทรีย์หลายชนิดผ่านกระบวนการทางชีวภาพที่แตกต่างกัน การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายและใช้เพียงน้ำและแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดเป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียวที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน จากผลการทดลองพบว่าในบรรดาสาหร่ายสีเขียวที่ทำการทดสอบทั้งหมด *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด และเมื่อนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *C. reinhardtii* CC-124 พบว่ามีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 8.7297 ± 0.5887 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 419.0330 ± 28.2570 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ที่ 48 ชั่วโมงของการบ่มในที่มีแสงภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ในขณะที่สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ChiW1 และ *C. reinhardtii* CC-124 คือ การบ่ม *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และบ่ม *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S โดยมีกรดอะซีติกที่ความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และ *C. reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

167.231 ± 2.727 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะปกติถึง 20 เท่า

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน, สาหร่ายสีเขียว, การเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Optimization of Hydrogen Production from Green Algal Co-cultivation

Students Miss Chosita Boonnak Student ID 62050587

Miss Panumas Chaipluem Student ID 62050653

Degree Bachelor of Science (Industrial Microbiology)

Department Biology

School Science

University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2022

Advisor Assoc.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

Abstract

Hydrogen (H_2) has received a much attention as one of important renewable energy sources in the future. H_2 can be produced by many microorganisms via different kinds of biological processes. H_2 production by green algae has an advantage due to an easy cultivation and unlimited substrate (water and light) availability. This research aimed to optimize H_2 production from the co-cultivation of potential green algae. The result showed that among green algae investigated, *Chlorella* sp. ChiW1 and *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 showed the highest H_2 production. *Chlorella* sp. ChiW1 co-cultivated with *C. reinhardtii* CC-124 gave the highest H_2 production rate at 8.7297 ± 0.5887 μmolH_2/mgchl/h and highest H_2 production yield at 419.0330 ± 28.2570 μmolH_2/mgchl at 48 hours of light anaerobic incubation. For optimization of H_2 production by co-cultivation of these two strains, it was found that *Chlorella* sp. ChiW1 incubated in nitrogen-deprived TAP showed the highest H_2 production rate whereas *C. reinhardtii* CC-124 incubated in sulfur-deprived TAP showed the highest H_2 production rate. The optimization conditions for H_2 production by *Chlorella* sp. ChiW1 and *C. reinhardtii* CC-124 were incubation in TAP-N for *Chlorella* sp. ChiW1 and TAP-S for *C. reinhardtii* CC-124 with 17.4 mM acetic acid as carbon source under a light intensity of 8,000 lux. Under optimized conditions, they showed the highest H_2 production rate with 167.231 ± 2.727 μmolH_2/mgchl/h which was 20 times higher rate than those under normal condition.

Keywords : H_2 production, Green algae, Co-cultivated

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี ต้องขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการอบรมให้ความรู้ ตลอดจนให้คำแนะนำด้านต่างๆ ตลอดเวลาของการศึกษาในสถาบันฯ

ขอขอบคุณพี่นักวิทยาสาสตร์ ที่มีความตั้งใจในการช่วยให้เบิกสารที่ใช้ในการทดลอง ทำให้เกิดผลสำเร็จในงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาในทุกเรื่อง

ประโยชน์และคุณค่าของงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้สั่งสอนอบรมจากอดีตจนปัจจุบันตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุดท้ายนี้ พวกเราหวังว่า โครงงานพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวต่อไป

โชษิตา บุญนาค
ภานุมาศ ชัยปลื้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ไฮโดรเจน 3
2.1.1 พลังงานไฮโดรเจน 3
2.1.2 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน 3
2.2 การผลิตไฮโดรเจน 4
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล 4
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า 4
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี 4
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต 4
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน 5
2.3.1 ไซยาโนแบคทีเรีย 5
2.3.2 แบคทีเรีย 5
2.3.2.1 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก 5
2.3.2.2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง 5
2.2.3 สาหร่ายสีเขียว 6
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว 6
2.5 เอนไซม์ไฮโดรจิเนส 7
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 10
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 14
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง 14
3.2 อุปกรณ์ 14
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 15
3.4 สารเคมี 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 15
3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ 15
3.4.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน 15
3.5 วิธีการทดลอง 16
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อของสาหร่ายสีเขียว 16
3.5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว 16
3.5.2.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง 16
3.5.2.2 วิธีการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ 16
3.5.2.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ 16
3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน 17
3.5.4 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ 17
3.5.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 17
3.5.5.1 การศึกษาการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 17
3.5.5.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 18
3.5.5.3 การศึกษาความเข้มข้นอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 18
3.5.5.4 การศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 18
บทที่ 4 ผลการทดลอง 20
4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ 20
4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ 22
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก 30
4.3.1 ผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 30
4.3.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนและแหล่งซัลเฟอร์ 36
4.3.3 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน 40
4.3.3.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน 40
4.3.3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน 44
4.3.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน 47
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 สรุปผลการวิจัย 52
5.2 ข้อเสนอแนะ 53
เอกสารอ้างอิง 54
ภาคผนวก 57
ภาคผนวก ก 58
ภาคผนวก ข 59
ภาคผนวก ค 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณ..... 22
4.2 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด..... 25
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง..... 25
4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 28
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 29
4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ 33
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ 33
4.8 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ..... 36
4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ..... 36
4.10 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 39
4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 40
4.12 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ..... 43
4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ..... 44
4.14 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก..... 47
4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก..... 47
4.16 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ..... 50
4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ..... 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว..... 7
2.2 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase..... 8
2.3 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [NiFe]-hydrogenase..... 9
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร..... 21
4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์..... 21
4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์..... 22
4.4 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์..... 23
4.5 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์..... 23
4.6 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์..... 24
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟ..... 24
4.8 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 26
4.9 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 26
4.10 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 27
4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟ..... 27
4.12 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 31
4.13 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 32
4.14 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 33
4.16 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 34
4.17 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 34
4.18 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 35
4.19 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)..... 35
4.20 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 37
4.21 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 38
4.22 กราฟแสดงผลผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 38
4.23 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน..... 39
4.24 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.25 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ..... 42
4.26 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ..... 42
4.27 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ..... 43
4.28 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกันที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก..... 45
4.29 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก..... 45
4.30 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก..... 46
4.31 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก..... 46
4.32 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมง ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-N ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ..... 48
4.33 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-N ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ..... 49
4.34 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมง ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-N ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ..... 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.35 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 24 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-N ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ..... 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน ความต้องการทางด้านพลังงานสำหรับใช้ในด้านเศรษฐกิจสังคม รวมถึงการใช้พลังงานในชีวิตประจำวันเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว อันเนื่องมาจากจำนวนประชากรที่เพิ่มสูงขึ้นและการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม ทำให้ความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แหล่งพลังงานที่มนุษย์ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ และน้ำมันดิบ ซึ่งเชื้อเพลิงเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณที่จำกัดและประกอบกับราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกในปัจจุบันที่ค่อนข้างแปรปรวนในทิศทางที่สูงขึ้น จึงทำให้เกิดการแสวงหาพลังงานทางเลือกใหม่ที่เป็นพลังงานหมุนเวียนที่มีศักยภาพสูงและเป็นพลังงานที่สะอาดและสามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลได้

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) ได้รับการคาดหมายและยอมรับว่าจะเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอย่างมากในอนาคต เนื่องจากเป็นพลังงานสะอาดเมื่อใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) แล้วจะไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ดังนั้น จึงไม่ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) อีกทั้งการเผาไหม้ยังมีประสิทธิภาพสูง ไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ โดยจะมีเพียงไอน้ำเป็นผลิตผลพลอยได้เท่านั้น ด้วยเหตุนี้ จึงสามารถช่วยลดการเกิดสภาวะโลกร้อนหรือภาวะเรือนกระจก พลังงานไฮโดรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานดั้งเดิมได้ การผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันยังนิยมใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการไอน้ำ (Steam reforming) และวิธีการทางเคมี เช่น การแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Water electrolysis) แต่ต้นทุนในการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการเหล่านี้ค่อนข้างสูงและต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิตสูงมาก ก่อให้เกิดอุปสรรคในการพัฒนานำเอาไฮโดรเจนมาใช้เป็นพลังงานทางเลือกใหม่ ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์จึงหันมาพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพหรือไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen) ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบคทีเรีย สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น

สาหร่ายสีเขียวสามารถจัดจำแนกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ สาหร่ายสีเขียวที่พบในทะเลซึ่งมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายทะเลมักจะพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง แต่จะมีบางชนิดที่พบในระดับความลึกถึง 300 ฟุต ที่แสงสามารถส่องถึง อีกชนิดหนึ่ง คือ สาหร่ายน้ำจืด ซึ่งมีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายสีเขียวที่อยู่ในน้ำจืดจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นหรือน้ำลึก บางชนิดขึ้นอยู่บนก้อนหิน ทราย โคลน เปลือกหอย บนพืช สัตว์ หรืออาจเจริญอยู่ในพืชก็ได้ สาหร่ายสีเขียวจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มแสง และความสมบูรณ์ของอาหาร สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ที่ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ที่ประกอบด้วย แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดเดียวกันกับที่พบในพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบ ทั้งเซลล์เดียว (Unicellular) อยู่รวมกลุ่มเป็นโคโลนี (Colony) และเป็นเส้นสาย (Filament) สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวเป็นอาหารสะสมประเภทแป้งและสะสมแป้งในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่า ไพรีนอยด์ (Pyrenoid) โดยแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียวมี 2 แบบ คือ แบบแฮพลอนติก (Haplontic type) เป็นการลดจำนวนโครโมโซม ซึ่งเกิดในระยะไซโกตเพื่อสร้างสปอร์ พบใน Order Volvocales และแบบดิพลอมาติก (Diplomatic type) เป็นการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ซึ่งเกิดในระยะสร้างแกมมีท พบในบางสกุลของ Order Chlorococcales การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการรวมกันของแกมมีท มีทั้งแบบไอโซแกมี (Isogamy) เฮเทอโรแกมี (Heterogamy) และโอโอแกมี (Oogamy) ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีทั้งแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์และการสร้างอะคินีต (Akinete)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจน ทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. เป็นต้น จากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน ออกซิเจนที่เกิดขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง จากสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการพัฒนาและนำมาผลิตก๊าซไฮโดรเจนเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวเพาะเลี้ยงได้ง่าย นอกจากนี้ ในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายจะใช้เพียงน้ำและแสงมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจากการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง จากนั้นนำสาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง 2 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงร่วมกัน

2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร TAP (Tris acetate phosphate medium) จากนั้นคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบอัตราการเจริญของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์

2) ทราบปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียว ในอาหาร TAP

3) ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

2.1.1 พลังงานไฮโดรเจน

พลังงาน เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาประเทศ โดยความต้องการใช้พลังงานมีแนวโน้มสูงขึ้น พลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เมื่อเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลนี้ จะก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสาเหตุหลักของสภาวะโลกร้อนหรือปรากฏการณ์เรือนกระจก เชื้อเพลิงส่วนใหญ่ที่ใช้ในปัจจุบันมาจากปิโตรเลียมและถ่านหิน ซึ่งมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องและกำลังจะหมดไปในไม่ช้า วิกฤตการณ์เช่นนี้ ทำให้ทุกประเทศมีความตื่นตัวเป็นอย่างมาก ในการเสาะแสวงหาพลังงานแหล่งใหม่ๆ เพื่อทดแทนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม พลังงานไฮโดรเจนจึงจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นพลังงานที่ให้ประสิทธิภาพในการเผาไหม้สูง สะอาด และสามารถนำมาใช้กับรถยนต์ หรือยานพาหนะอื่นๆ โดยไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน

ไฮโดรเจน (Hydrogen) ได้รับการคาดหมายและยอมรับว่าจะเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอย่างมากในอนาคต (ธรรมนูญ, 2550) เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นสสารที่ให้พลังงานสูง และผลผลิตจากการเผาผลาญไฮโดรเจน ไม่ว่าจะมาจากการเผาไหม้โดยตรง หรือมาจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในเซลล์เชื้อเพลิงจะได้ไอน้ำและก๊าซออกซิเจน ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงถือว่าเป็นการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สะอาดมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล ไฮโดรเจนเป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีสัญลักษณ์ธาตุ คือ H มีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นธาตุที่พบมากที่สุดในเอกภพ โดยในบรรยากาศโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน

2.1.2 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน

คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟเวลาเผาการเผาไหม้สะอาด ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลเท่ากับ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิหรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนมีจุดเดือด -252.87 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว -259.14 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ไฮโดรเจนมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงถึง 3,000 องศาเซลเซียส ให้พลังงานความร้อน 2,870 กิโลแคลอรีต่อกิโลกรัม ซึ่งค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอลและเอทานอล ถึง 2.5 และ 5 เท่า ตามลำดับ ไฮโดรเจนมีค่าความร้อนสูงถึง 122 กิโลจูลต่อกรัม (Madawar *et al.*, 2000) มีคุณสมบัติเป็นเชื้อเพลิงที่ดีและสามารถพัฒนาให้เป็นเชื้อเพลิงหลักได้

2.2 การผลิตไฮโดรเจน

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 4 กระบวนการ ดังนี้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (Steam reforming) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับไอน้ำ โดยอาศัยพลังงานความร้อน ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า เป็นกระบวนการให้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ขั้วไฟฟ้าของเซลล์เคมีไฟฟ้า เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน ทำให้โมเลกุลของน้ำถูกแยกออกเป็นก๊าซออกซิเจนและก๊าซไฮโดรเจน โดยอาศัยอิเล็กโทรด (Electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (Anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (Cathode) โดยจุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่เติมสารพวกอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วบวก วิธีนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ มีค่าใช้จ่ายสูงและมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในปริมาณมากในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิต

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (Thermochemistry) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยการใช้สารประกอบปรอท โบรไมด์ และแคลเซียม ในกระบวนการผลิตนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงอุณหภูมิประมาณ 200 ถึง 780 องศาเซลเซียส ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ เกิดปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนัก ได้แก่ ปรอท และโบรไมด์

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ

การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen) เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบคทีเรีย สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น โดยอาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องใช้เอนไซม์ หรือสารประกอบจำพวกโปรตีนช่วยเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสาหร่ายสีเขียวจะใช้แสงและน้ำเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Kosaric และ Lyng, 1988)

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถในการผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพ มีดังนี้

2.3.1 ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหรายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae) เปนสิ่งมีชีวิตที่อยูในอาณาจักรมอเนอรา (Monera Kingdom) ดิวิชันไซยาโนไฟตา (Division Cyanophyta) และเปนสิ่งมีชีวิตชนิดโพรคาริโอต (Prokaryote) ไมมีเยื่อหุมออรแกเนลล มีสารพันธุกรรม และรงควัตถุที่ใชในการสังเคราะหดวยแสงได้ ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่เร็วการพืชชั้นสูงและเปนแหลงชีวโมเลกุลที่ดี (คารโบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) ซึ่งสามารถนำไปใชเปนแหลงพลังงานทดแทนได จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต เชน การผลิตไบโอเอทานอล การผลิตไบโอดีเซล และการผลิตไบโอไฮโดรเจน เป็นต้น

2.3.2 แบคทีเรีย (Bacteria)

2.3.2.1 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (Dark fermentation bacteria)

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนได้ เพื่อผลิตตัวให้อิเลกตรอนสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Enterobacteria aerogenes, Clostridium butyricum* และ *Escherichia coli* เป็นต้น

2.3.2.2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Phototrophic bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สามารถสังเคราะห์แสงได้โดยไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Anoxygenic photosynthetic bacteria) สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม ตามคุณสมบัติและตำแหน่งของรงควัตถุ การสะสมสารซัลเฟอร์ การออกซิไดซ์ซัลไฟด์ และการเจริญในสภาวะที่มีอากาศ หรือไร้อากาศ คือ (1) Purple sulfur bacteria ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Amoebobacter, Chromatium, Lamprobacter และ Thiospirillum* เป็นต้น (2) Purple nonsulfur bacteria ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Rhodobacter, Rhodopseudomonas* และ *Rhodospirillum* เป็นต้น (3) Bacteria ที่มีรงควัตถุ Bacteriochlorophyll ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Heliobacillus* และ *Heliobacterium* เป็นต้น (4) Green sulfur bacteria ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Ancalochloris, Chlorobium* และ *Prosthechloris* เป็นต้น (5) Multicellular filamentous green bacteria ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Chloroflexus, Choronema* และ *Oscillochloris* เป็นต้น (6) Aerobic chemotropic bacteria ที่มีรงควัตถุ bacteriochlorophyll ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Erythrobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่าย (Algae) เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตนเองจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไป มีขนาดเล็กตั้งแต่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าจนกระทั่งถึงขนาดใหญ่ที่มีความยาวหลายร้อยเมตร เช่น สาหร่ายทะเลหลายชนิด สาหร่ายมีรูปร่างหลายแบบอาจจะเป็นเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์มารวมกลุ่มกัน เรียกว่า กลุ่มเซลล์หรือโคโลนี มีทั้งที่เป็นเส้นสายแตกแขนง และไม่แตกแขนง เป็นทัลลัสที่คล้ายราก ลำต้น และใบคล้ายพืชชั้นสูง แต่ไม่มีระบบท่อลำเลียงเหมือนพืชชั้นสูงซึ่งทุกเซลล์ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงเพื่อการดำรงชีวิต (ยุวดี, 2558)

สาหร่ายในที่นี้ หมายถึง สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำซึ่งตรงกับภาษาอังกฤษว่า Algae และภาษากรีกว่า Phykos เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Microalgae) ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ จนถึงขนาดใหญ่ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (Macroalgae) ซึ่งดูเหมือนมีราก ลำต้น และใบ ซึ่งเรียกว่า ทัลลัส (Thallus) ส่วนใหญ่จะมีคลอโรฟิลล์ช่วยในการสังเคราะห์แสง (ยุวดี, 2549)

เนื่องจากสาหร่ายมีความพิเศษที่แตกต่างจากพืชทดแทนอื่นๆ คือ มีความรวดเร็วในระบบสังเคราะห์แสง สาหร่ายสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์มาใช้ในการสังเคราะห์แสงได้อย่างรวดเร็วกว่าพืชทดแทนอื่นๆ มีศักยภาพในการเพิ่มจำนวนสูง สามารถเพาะเลี้ยงได้เป็นจำนวนมากโดยไม่ยุ่งยาก ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงไม่เปลืองและไม่มีผลกระทบต่อการเพาะปลูกพืชการเกษตรอื่นๆ อีกทั้งยังให้ผลพลอยได้มูลค่าสูง เช่น ปุ๋ย อาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะ เครื่องสำอาง หรือใช้เป็นยารักษาโรค นอกจากนี้สาหร่ายยังผลิตก๊าซไบโอไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง

สาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่นำมาศึกษา ได้แก่ (1) *Chlorella* sp. ChiW1 ได้มาจากน้ำในนาข้าว จังหวัดชัยนาท (2) *Chlorella* sp. KMITL CirG ได้มาจากแหล่งน้ำในเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร (3) *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ได้มาจาก Chlamydomonas Resource center ประเทศสหรัฐอเมริกา (4) *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 ได้มาจาก Chlamydomonas Resource center ประเทศสหรัฐอเมริกา (5) *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ (6) *Scenedesmus* sp. L ได้มาจากแหล่งน้ำในเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร

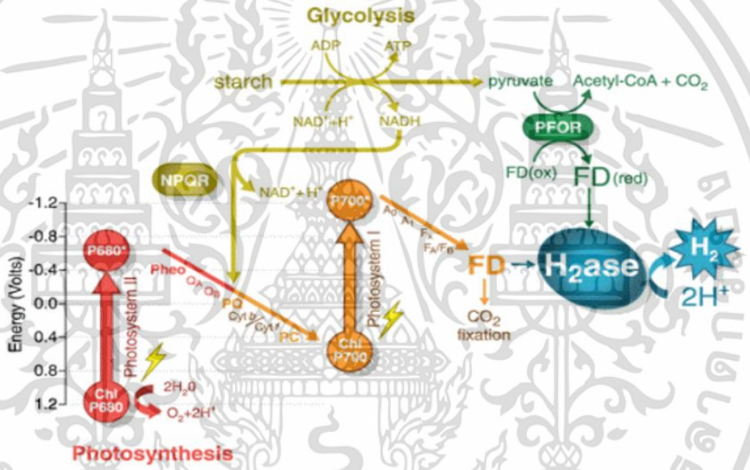
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้งในสภาวะที่ใช้แสงและไม่ใช้แสง โดยในสภาวะที่ใช้แสง จะใช้เพียงแสงและน้ำมาเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต โดยในการผลิตจะอยู่ในสภาวะไร้อากาศ การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ภายในคลอโรพลาสต์ของเซลล์จะมีหน่วยรับแสงที่ประกอบด้วย แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกัน เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป ต่อมาเมื่อมีพลังงานในรูปของแสงตกกระทบที่บริเวณระบบแสงสอง ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกไปที่ควิ

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

โนน อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวได้โมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะไปแทนที่อิเล็กตรอนในคลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ ต่อมาอิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนน จะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี, ไซโตโครม เอฟ, พลาสโตไซยานิน และเข้าสู่ระบบแสงหนึ่ง เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้น จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ในระบบแสงหนึ่ง เมื่อคลอโรฟิลล์ถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมตัวกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น

การผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่ใช้แสง จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไร้แสงและไร้อากาศ โดยแป้งจะสลายไปเป็นไพรูเวต โดยผ่านเอนไซม์ไพรูเวต-เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, PFOR) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อะซิติล-โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) และอิเล็กตรอน เฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอนที่ปลดปล่อยออกมาแล้วส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตไฮโดรเจนต่อไป



รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว
ที่มา : Posewitz, 2009

2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase : hydrogen acceptor oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจน หรือเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนส สามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอตและยูคาริโอต สิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอตจะพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซโตพลาสซึม ในขณะที่สิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ในคลอโรพลาสต์ โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสส่วนใหญ่จะมีความไวต่อก๊าซออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1. เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase)

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) หรือเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

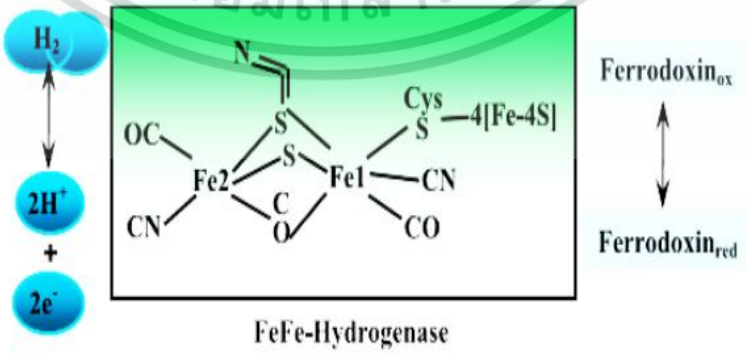
2. เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase)

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) หรือเอนไซม์ยูนิไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Unidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน เอนไซม์ชนิดนี้จะสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวบางชนิดที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน เช่น *Synechococcus* sp. PCC 6301

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1. เอนไซม์ที่มีเหล็กในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (FeFe-hydrogenase)

เอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอมอยู่ที่ศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น โดยเหล็กจะจับกับซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนซีสเทอีนของเอนไซม์ เอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase นี้ประกอบด้วย คลัสเตอร์ของ [2Fe-2S] และ [4Fe-4S] โดยซัลเฟอร์เปรียบเสมือนเป็นสะพานในการเชื่อมระหว่างโลหะ นอกจากอะตอมของเหล็กที่อยู่บริเวณศูนย์กลางของเอนไซม์จับกับกรดอะมิโนซิสเทอีนแล้ว เหล็กยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย (Maness et al., 2009)

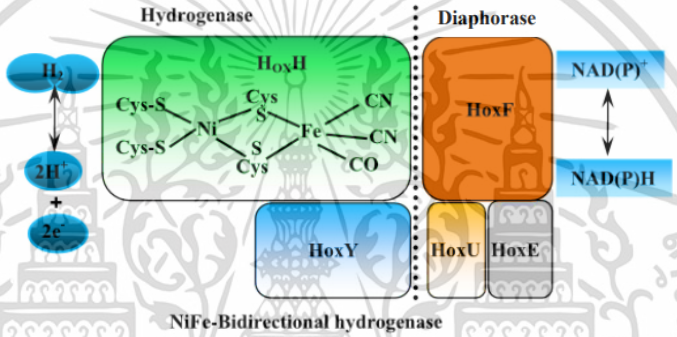


รูปที่ 2.2 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [FeFe]-hydrogenase
ที่มา : Maness et al., 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (NiFe-hydrogenase)

เอนไซม์ [NiFe]-hydrogenase เป็น Enzyme complex ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ (1) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxH ซึ่งประกอบด้วยอะตอมของเหล็ก (Fe) และนิกเกิล (Ni) โดยอะตอมของเหล็กเชื่อมอยู่กับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ ไซยาไนด์และซัลเฟอร์ เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เหมือนกับเอนไซม์ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส โปรตีน HoxY ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของ [4Fe-4S]
(2) เอนไซม์ไดอะโฟเรส (Diaphorase) ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxF, HoxU และ HoxE ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Maness et al., 2009)



รูปที่ 2.3 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ [NiFe]-hydrogenase
ที่มา : Maness et al., 2009

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่บริเวณกระตุ้น ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กเท่านั้น เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย มีรายงานการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron และ Rubin, 1942), *Chlamydomonas reinhardtii* (Healey, 1970), *Chlorella fusca* (Kessler, 1974) และ *Chlamydomonas moewusii* (Healey, 1970) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน โดยมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนในสาหร่ายสีเขียวประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสประกอบด้วย 1 หน่วยย่อย ที่มีบริเวณกระตุ้นหรือบริเวณ H-cluster ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอม และจะจับเข้ากับซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และทำหน้าที่เป็น Fe-S cluster นอกจากอะตอมของเหล็กที่อยู่ตรงกลางของบริเวณนี้จะจับกับซิสเทอีนแล้ว ยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ และไซยาไนด์อีกด้วย (Maness และคณะ, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ เช่น

1. แหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur)

สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนซีสเทอีนและเมทไธโอนีน ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนทุกชนิด และโปรตีน D1 ที่อยู่ในศูนย์กลางของระบบแสงสอง (Reaction center) เมื่อเซลล์สาหร่ายถูกบ่มภายใต้สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมในระบบแสงสอง (Wykoff et al., 1998) โดยยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองแบบชั่วคราว ส่งผลให้ระบบแสงสองหยุดการสังเคราะห์โปรตีนหรือซ่อมแซมโปรตีน D1 เมื่อระบบแสงสองถูกยับยั้ง อัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวจึงลดลง กระบวนการสร้างออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำจึงลดลง เมื่อออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงน้อยกว่าออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ เซลล์จึงเข้าสู่สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (Anaerobiosis condition) และเกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น

2. แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen)

ไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนทุกชนิดในสิ่งมีชีวิต รวมถึงไนโตรเจนยังเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์อีกด้วย ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์จะมีจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ และส่งผลต่อไซโตโครมบี 6 เอฟ (Cytochrome b_6f complex) เมื่อไซโตโครมบี 6 เอฟ สูญเสียสภาพไป ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นในระบบแสงสองน้อยลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลระหว่างปริมาณออกซิเจน การขาดไนโตรเจนยังทำให้ปริมาณโปรตีนที่ศูนย์กลางปฏิกิริยาการรับแสง (Light harvesting complex) และเอนไซม์ Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) ลดลง นอกจากนี้การขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงจะส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายเกิดการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการผลิตไนโตรเจนเนื่องจากเซลล์จะสลายแป้งเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

3. โพแทสเซียม (Potassium)

โพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช โพแทสเซียมเป็นไอออนบวก (K^+) ทำหน้าที่ช่วยควบคุมแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ (Haschke and Littge, 1975) และมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนของพืชและสาหร่าย (Leigh and Wyn Jones, 1984; Memon et al., 1985) เมื่อสาหร่ายขาดแหล่งโพแทสเซียม จะตอบสนองโดยการเพิ่มการเคลื่อนที่ของโพแทสเซียมไอออนระหว่างพลาสมาเมมเบรน (Plasma membrane) การสังเคราะห์แสงและอัตราการผลิตพลังงาน ATP ลดลง อัตราการหายใจของพืชเพิ่มขึ้น ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตลดลง (Munson, 1985) มีงานวิจัยพบว่า การขาดแหล่งโพแทสเซียมในอาหาร จะช่วยส่งเสริมการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว โดยสาหร่ายสีเขียวจะตอบสนองโดยการสังเคราะห์โปรตีน D1 ลดลง ในขณะที่โปรตีน PsaA ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในระบบแสงหนึ่งมีการสังเคราะห์มากขึ้น (Lyer et al., 2015) ดังนั้นการขาดโพแทสเซียมน่าจะมีผลช่วยในการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น

4. แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

สาหร่ายสีเขียวจะสะสมคาร์บอนในรูปของแป้งในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์แสง ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน สาหร่ายสีเขียวจะนำแป้งที่เก็บสะสมนี้ไปใช้เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน แหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายสีเขียวสามารถนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ สารอนินทรีย์คาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และกรดคาร์บอนิก และสารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กรดมาลิก กรดอะซีติก กลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส มอลโทส แมนนิทอล แลกโทส อะซีเตท และสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เป็นต้น นอกจากนี้ แหล่งคาร์บอน เช่น อะซีเตท สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ของสาหร่าย ทำให้เมื่อเซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศ จึงส่งผลให้เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น

5. อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์แสง รวมถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอยู่ในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส โดยเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความเสถียร ในสภาวะอุณหภูมิสูง เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะเสียสภาพ รวมถึงการทำงานของระบบแสงสองจะถูกยับยั้ง เนื่องจากระบบแสงสองมีความไวต่ออุณหภูมิสูง ทำให้อิเล็กตรอนจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองไม่ได้ถูกถ่ายทอดไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

6. แสง (Light)

สาหร่ายสีเขียวจำเป็นต้องใช้แสงในการเจริญเติบโต ซึ่งในระหว่างการเจริญเติบโต เซลล์จะนำแสงมาใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสะสมคาร์โบไฮเดรต รวมถึงแสงยังมีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนอีกด้วย ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ สาหร่ายจะสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการดูดซับพลังงานแสง ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม ความเข้มแสงมีผลต่อสารสีคลอโรฟิลล์ และการทำงานของระบบแสงสอง เนื่องจากความเข้มแสงสูงมีผลทำให้เซลล์เกิดการชักนำให้มีการสังเคราะห์สารสีในการสังเคราะห์แสง เช่น คลอโรฟิลล์ แซนโทฟิลล์ เพิ่มมากขึ้น เพื่อป้องกันระบบแสงสองจากปฏิกิริยาการออกซิเดชันโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจน นอกจากนี้ ถ้าความเข้มแสงมากเกินไป จะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองจากการสร้างออกซิเจน ทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กิตติพัฒน์ (2562) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 นอกจากนี้ยังศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนในน้ำเสียอุตสาหกรรมอาหารของสาหร่ายที่คัดเลือก ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 คือ บ่มเซลล์ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ OD 750 เท่ากับ 0.8 ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) การปรับตัวของเซลล์ในอาหารที่ขาดโพแทสเซียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนชักนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนจะช่วยเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ ความเข้มแสง อุณหภูมิของการบ่มและพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *S. obliquus* TISTR 8546 คือ ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิของการบ่ม 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 7.2 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 14.455 ± 0.855 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 336.859 ± 21.416 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่มเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ ในงานวิจัยนี้ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ที่มีการเติมกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ภายหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในน้ำเสียชนิดต่างๆ พบว่า ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ (DO) เพิ่มขึ้น แต่ค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ (BOD) ลดลงและค่าปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสารอินทรีย์ (COD) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตนมข้นหวานก่อนบำบัด และมีการเติมกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 23.724 ± 0.819 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 682.778 ± 23.540 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายหลัง 96 ชั่วโมงของการบ่มในสภาวะที่ปราศจากอากาศ

He *et al.* (2018) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยง *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 และแบคทีเรีย autotrophic sulfide-oxidizing facultative ภายใต้สภาวะที่มีกำมะถัน การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายขนาดเล็กถือเป็นแนวทางที่มีแนวโน้มในการพัฒนาพลังงานไฮโดรเจนที่ยั่งยืน สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-503 ได้รับการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Thuomonas intermedia* BCRC 17547 เพื่อปรับปรุงการผลิตไฮโดรเจน โดยมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของการเพาะเลี้ยงร่วมในสภาวะขาดกำมะถันคือ 122 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม และมีอัตราส่วนของสาหร่ายต่อแบคทีเรียเท่ากับ 60 : 1 ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบริสุทธิ์ 2.8 เท่า การบำบัดด้วย $Na_2S_2O_3$ สามารถให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 255 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบริสุทธิ์และการเพาะเลี้ยงร่วมที่ไม่มี $Na_2S_2O_3$ ถึง 5.9 และ 2.1 เท่า การเพาะเลี้ยงร่วมกันภายใต้สภาวะที่มีซัลเฟตยังสามารถเพิ่มมวลชีวภาพ อัตราการหายใจ ปริมาณแป้ง และกิจกรรมของไฮโดรเจนของ *C. reinhardtii* ได้อย่างมีนัยสำคัญ การเติม $Na_2S_2O_3$ อย่างต่อเนื่อง (52 วัน) สามารถผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมของแบคทีเรียต่อสาหร่ายได้ ผลการทดลอง แสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

ให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *C. reinhardtii* CC-503 และแบคทีเรีย *Thuomonas intermedia* BCRC 17547 เป็นกลยุทธ์ที่คุ้มค่าสำหรับการปรับปรุงการผลิตไฮโดรเจน

Kim et al. (2006) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยการแปรผันความเข้มแสงต่างๆ พบว่า สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนภายใต้ความเข้มแสง 60 ถึง 200 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ความเข้มแสง 200 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มแสงสูงทำให้เซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุด อย่างไรก็ตาม การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งที่ความเข้มแสง 300 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เนื่องจากระบบแสงสองถูกทำลายจากปริมาณแสงที่มากเกินไป (Photoinhibition) ดังนั้น สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtti* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์เมื่อทำการควบคุมความเข้มแสงให้ต่ำกว่าความเข้มแสงอิ่มตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. ChiW1, *Chlorella* sp. KMITL CirG, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Scenedesmus* sp. L

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 กระดาษกรอง (Filter paper)
3.2.2 กระบอกตวงสารขนาด 50, 100, 500 และ1000 มิลลิลิตร (Cylinder)
3.2.3 กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope)
3.2.4 ขวดแก้วดูแรนขนาด 1 ลิตร (Duran bottle)
3.2.5 ขวดแก้วใส่สารตัวอย่าง (Vial)
3.2.6 ขวดฉีดน้ำกลั่นขนาด 500 มิลลิลิตร (Wash bottle)
3.2.7 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 และ250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask)
3.2.8 เข็มฉีดตัวอย่าง (Gas-tight syringe)
3.2.9 คิวเวทท์ (Cuvette)
3.2.10 เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hotplate stirrer)
3.2.11 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas chromatograph)
3.2.12 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
3.2.13 เครื่องชั่งสาร (Balance)
3.2.14 เครื่องผสมสาร (Vortex)
3.2.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)
3.2.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
3.2.17 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
3.2.18 เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heat block)
3.2.19 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)
3.2.20 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
3.2.21 จานเพาะเชื้อแก้ว (Petridish)
3.2.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
3.2.23 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)
3.2.24 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
3.2.25 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
3.2.26 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic stirring bar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.27 ไมโครปิเปต (Micropipette)
3.2.28 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
3.2.29 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
3.2.30 หลอดไมโครเซนติฟิวจ์พลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)
3.2.31 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)
3.2.32 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1.1 กรดบอริก (H_3BO_3)
3.4.1.2 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
3.4.1.3 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรด ($CaCl_2.2H_2O$)
3.4.1.4 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)
3.4.1.5 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)
3.4.1.6 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)
3.4.1.7 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)
3.4.1.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
3.4.1.9 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
3.4.1.10 ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)
3.4.1.11 โพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3.4.1.12 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)
3.4.1.13 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)
3.4.1.14 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)
3.4.1.15 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

3.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

เมทานอล (CH_3OH)

3.4.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

3.4.3.1 ก๊าซอาร์กอน 99 เปอร์เซ็นต์
3.4.3.2 ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อของสาหร่ายสีเขียว

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อ (Starter) โดยเขี่ยเชื้อสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่มีในห้องปฏิบัติการแล้วลาก (Streak) ไปบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเชื้อเจริญแล้ว เขี่ยเชื้อสาหร่ายสีเขียวจากอาหารแข็ง TAP 2 ลูป มากระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสาหร่ายในแต่ละการทดลอง

3.5.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ ทำได้โดยเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยจากหัวเชื้อสาหร่ายดังหัวข้อที่ 3.5.1 ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยมาศึกษาการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร วิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณคลอโรฟิลล์

3.5.2.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำเซลล์แขวนลอยของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้อาหารเหลว TAP เป็นแบลงค์ (Blank) และนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate) และระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time)

3.5.2.2 วิธีการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์

นำเซลล์แขวนลอยของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์และนำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่างที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า นับจำนวนเซลล์ และคำนวณความหนาแน่นของเซลล์

3.5.2.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

นำเซลล์แขวนลอยของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสทิ้ง นำเซลล์สาหร่ายมาเติมเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ลงไป 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นำหลอดไปวางในอ่างน้ำควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามสมการดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ บี (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650})$

3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เมื่อครบอายุเซลล์ที่ต้องการจะนำเซลล์ที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการนำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีและกระจายในอาหารใหม่ ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรเท่ากับ 2.0 แล้วนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาเพาะเลี้ยงร่วมกันในขวดแก้วบรรจุสาร (Vial) โดยใส่เซลล์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในอาหาร TAP นำขวดไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้อยู่ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยนำส่วนช่องว่างเหนือของเหลว (Headspace) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน จากนั้น นำผลพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณปริมาณไฮโดรเจน และทำการเก็บตัวอย่างหลังการวิเคราะห์ไฮโดรเจนมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.4 การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหาร TAP

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาทำเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นดังวิธีการในหัวข้อที่ 3.5.1 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น กระจายเซลล์ลงในอาหารใหม่ ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบอายุเซลล์จะทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน โดยนำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ตามวิธีการในหัวข้อ 3.5.3

3.5.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

3.5.5.1 การศึกษาการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน
ไม่ว่ากรณีใด

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาทำหัวเชื้อเริ่มต้นดังวิธีในหัวข้อที่ 3.5.1 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

กระจายเซลล์ลงในอาหารใหม่ จากนั้นปรับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 นำไปบ่มที่สภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบอายุเซลล์ จะนำเซลล์ที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้ง ทำการล้างเซลล์และนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร TAP (สูตรปกติ) และในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารบางชนิด ได้แก่ ขาดซัลเฟอร์(TAP-S), ขาดไนโตรเจน(TAP-N) และขาดโพแทสเซียม (TAP-K) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่สภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ตามวิธีการในหัวข้อ 3.5.3

3.5.5.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาทำหัวเชื้อเริ่มต้นดังวิธีในหัวข้อที่ 3.5.1 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการล้างเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ลงในอาหารใหม่ จากนั้นปรับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 นำไปบ่มที่สภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบอายุเซลล์จะนำเซลล์ที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้ง ล้างเซลล์และนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน มาบ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-NS) ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนได้แก่ กรดอะซีติก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส กรดซิตริก โซเดียมอะซีเตท กลีเซอรอลและอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน จากนั้น นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ตามวิธีการในหัวข้อ 3.5.3

3.5.5.3 การศึกษาความเข้มข้นของอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาทำหัวเชื้อเริ่มต้นดังวิธีในหัวข้อที่ 3.5.1 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ลงในอาหารใหม่ จากนั้นปรับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 นำไปบ่มที่สภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบอายุเซลล์ จะนำเซลล์ที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้ง ล้างเซลล์และนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน มาบ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-NS) ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 0, 0.87, 17.4, 34.8, 87 และ174 มิลลิโมลาร์ จากนั้น นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ตามวิธีการในหัวข้อ 3.5.3

3.5.5.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ไม่ว่ากรณีใดๆ

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวมาทำหัวเชื้อเริ่มต้นดังวิธีในหัวข้อที่ 3.5.1 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

กระจายเซลล์ลงในอาหารใหม่ จากนั้นปรับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 นำไปบ่มที่สภาวะเดิมต่อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบอายุเซลล์ จะนำเซลล์ที่ได้มาเก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้ง ล้างเซลล์และนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน มาบ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจนและซัลเฟอร์ (TAP-NS) ภายใต้ความเข้มข้นของแสงเท่ากับ 0, 800, 1,600, 4,000 และ 8,000 ลักซ์ จากนั้น นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) ตามวิธีการในหัวข้อ 3.5.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

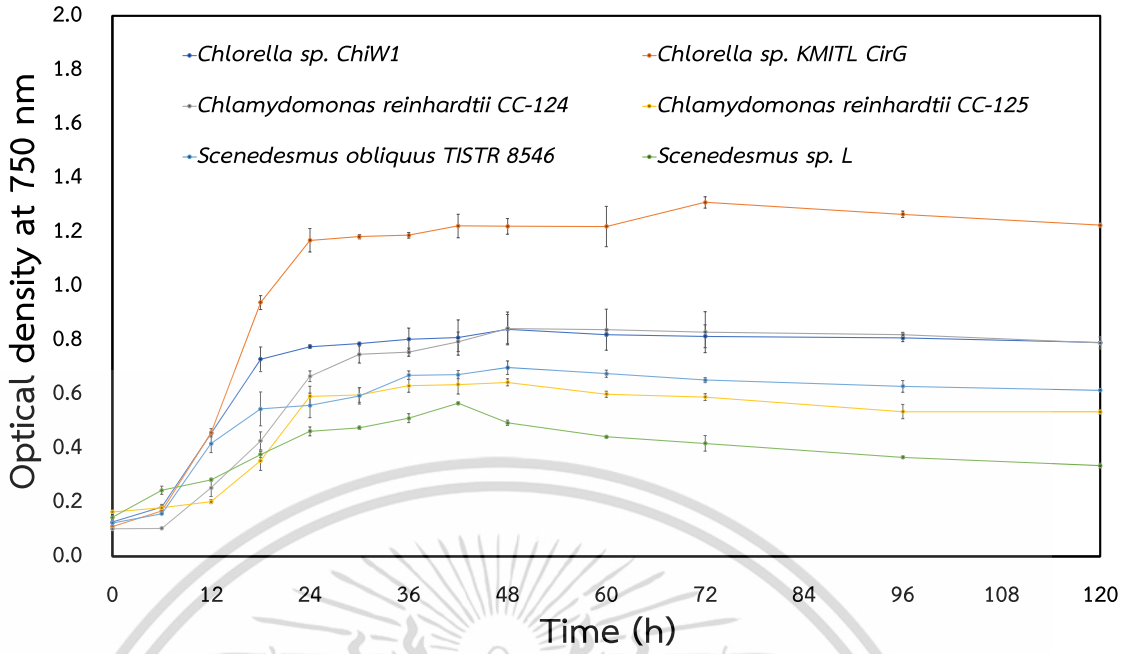
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์

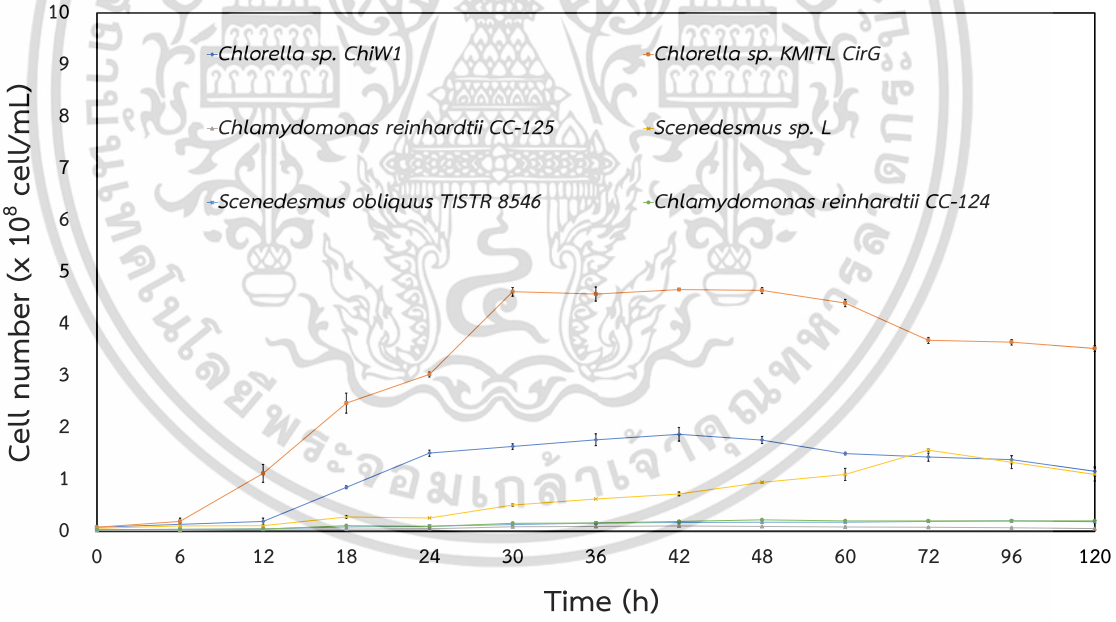
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์โดยการนำมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตรและเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่าย จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KMITL CirG มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัด และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *chlorella* sp. ChiW1, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 มีการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกัน โดยสาหร่ายสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. L มีการเจริญเติบโตช้าที่สุด (รูปที่ 4.1-4.3) เมื่อพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยแบ่งช่วงการเจริญเติบโตได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะพัก (Lag phase) ในช่วง 0-6 ชั่วโมง ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) ในช่วง 6-24 ชั่วโมง และระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) ในช่วง 24-72 ชั่วโมง

สาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิค (Photoautotrophic condition) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบใช้แสงและคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญซึ่งเซลล์จะสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศเปลี่ยนมาเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของเซลล์ (Yang et al., 2000) และสามารถเจริญได้ในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic condition) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารประกอบอินทรีย์ เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้ในสภาวะที่ไม่มีแสง (Bouarab et al., 2004) โดยในการทดลองนี้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP ซึ่งมีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน จากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์พบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KMITL CirG มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อพิจารณาจากทั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ และ ความหนาแน่นของเซลล์ โดยค่าทั้งหมดมีความสัมพันธ์สอดคล้องกัน โดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KMITL CirG มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0463 ± 0.0014 ต่อชั่วโมงและมีระยะการทวีคูณ เท่ากับ 14.9915 ± 0.4763 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆ (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

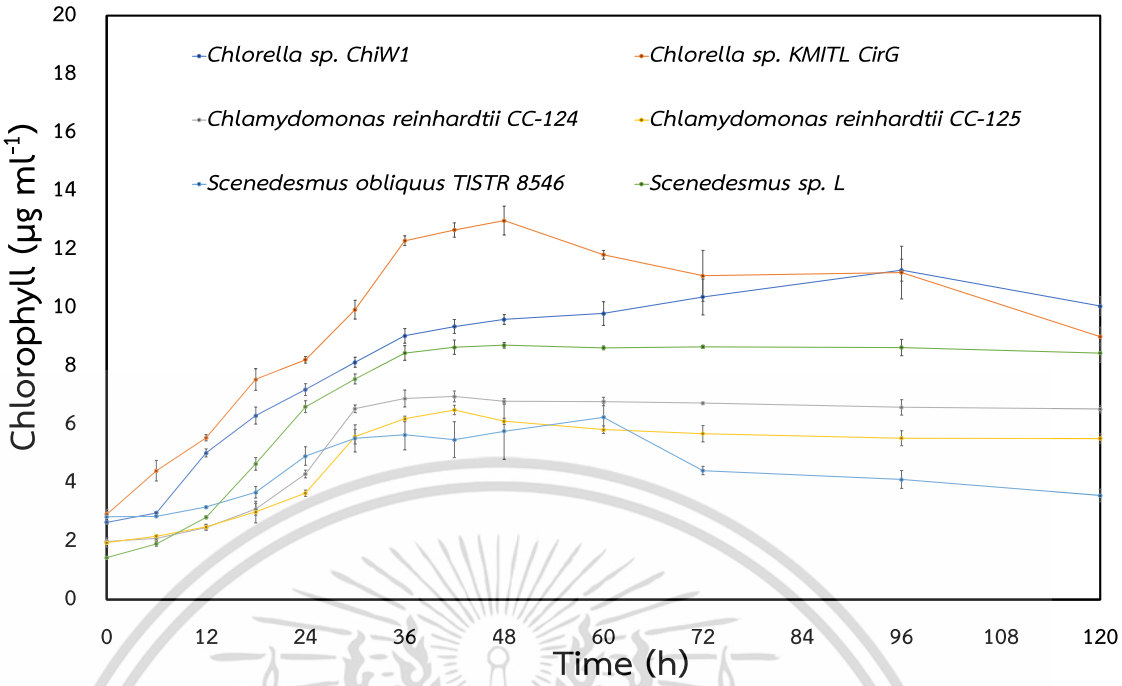


รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

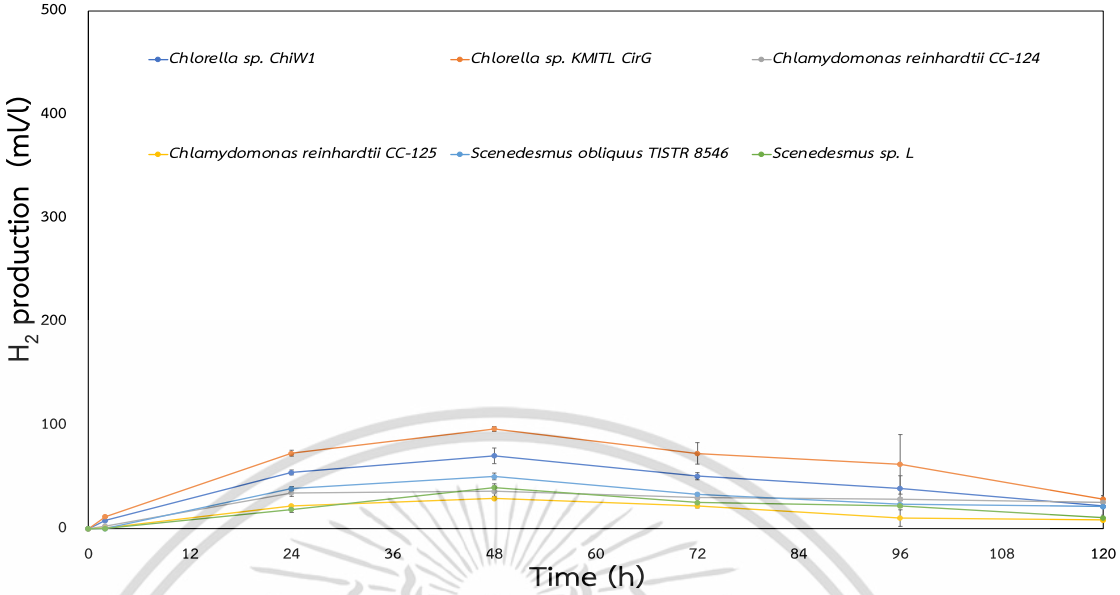
ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญจำเพาะและระยะการทวีคูณ

สายพันธุ์	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	ระยะการทวีคูณ (ชั่วโมง)
Chlorella sp. ChiW1	0.0347 ± 0.0024^{b}	20.0618 ± 1.4497^{b}
Chlorella sp. KMITL CirG	0.0463 ± 0.0014^{a}	14.9915 ± 0.4763^{a}
Chlamydomonas reinhardtii CC-124	0.0188 ± 0.0018^{d}	37.1626 ± 3.5346^{d}
Chlamydomonas reinhardtii CC-125	0.0099 ± 0.0019^{e}	72.0292 ± 15.6218^{e}
Scenedesmus obliquus TISTR 8546	0.0255 ± 0.0027^{c}	27.4133 ± 2.7517^{c}
Scenedesmus sp. L	0.0123 ± 0.0006^{e}	56.4430 ± 2.7566^{e}

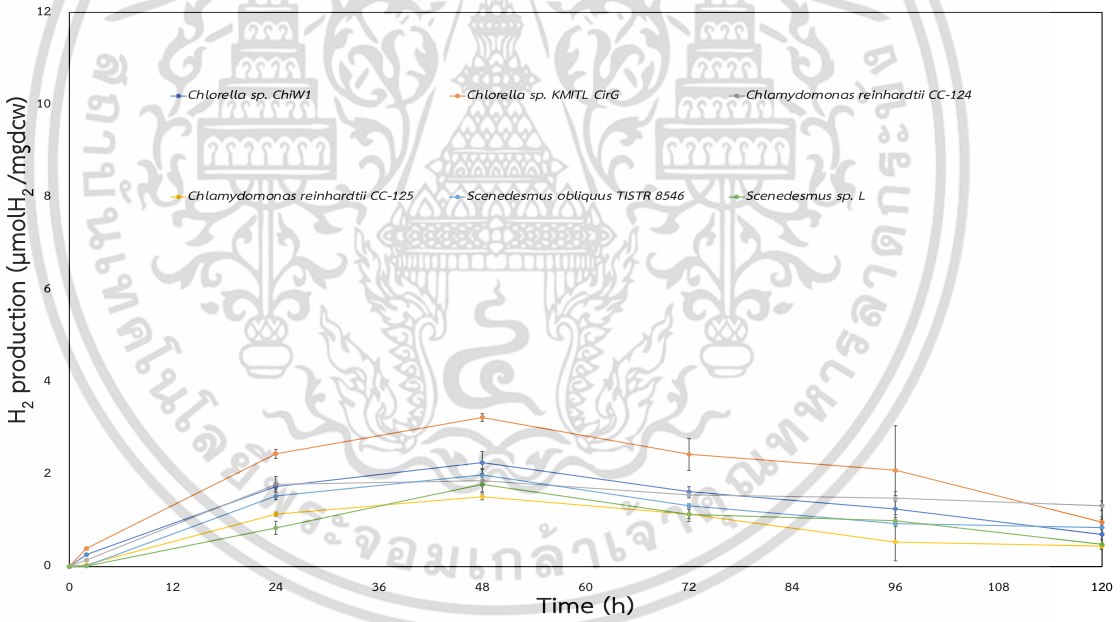
4.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหาร TAP

จากการนำสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP โดยการนำสาหร่ายทั้ง 6 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกันในขวดแก้วบรรจุสาร (Vial) จากนั้นนำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้อยู่ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟในชั่วโมงที่ 2 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน พบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. KMITL CirG มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุดเท่ากับ 3.0770 ± 0.0780 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 147.6847 ± 3.7441 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.7 และ ตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

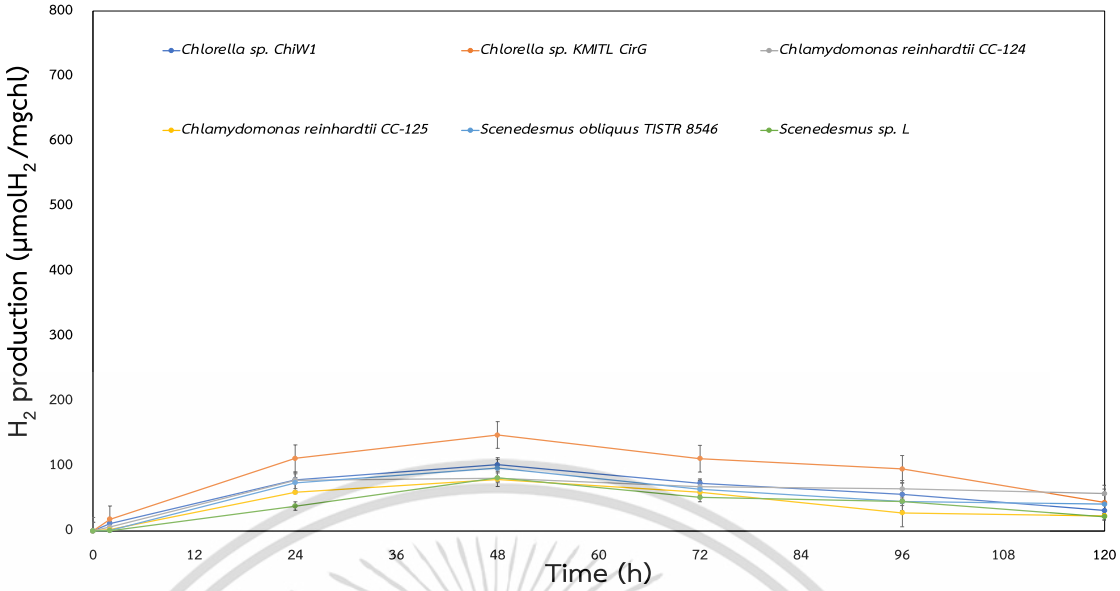


รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์

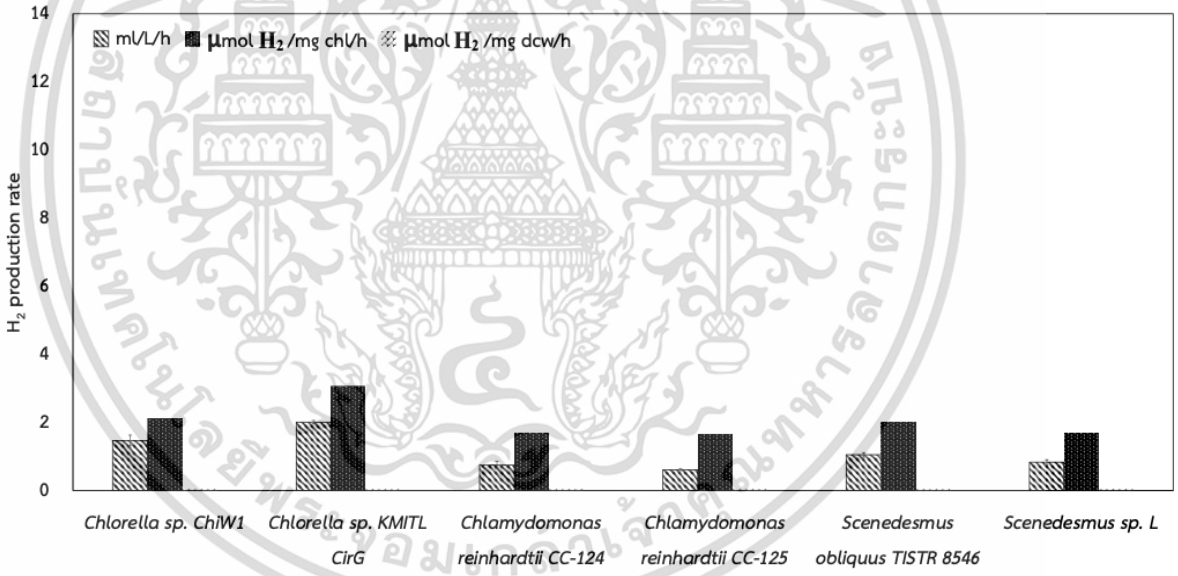


รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์



รูปที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว 6 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

สายพันธุ์	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	ml/L	$\mu molH_2/mgDCW$	$\mu molH_2/mgCHL$
Chlorella sp. ChiW1	70.5567 ± 7.5481[b]	2.2497 ± 0.2407[b]	101.8977 ± 10.9010[b]
Chlorella sp. KMITL CirG	96.3820 ± 2.4435[a]	3.2270 ± 0.0818[a]	147.6847 ± 3.7441[a]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124	36.0980 ± 5.0365[e]	1.8593 ± 0.2594[e]	81.4233 ± 11.3603[e]
Chlamydomonas reinhardtii CC-125	29.2753 ± 1.2109[f]	1.5080 ± 0.0624[f]	79.2377 ± 3.2775[f]
Scenedesmus obliquus TISTR 8546	50.2857 ± 3.2426[c]	1.9810 ± 0.1277[c]	96.5303 ± 6.2247[c]
Scenedesmus sp. L	39.8257 ± 3.5410[d]	1.7780 ± 0.1581[d]	81.7860 ± 7.2718[d]

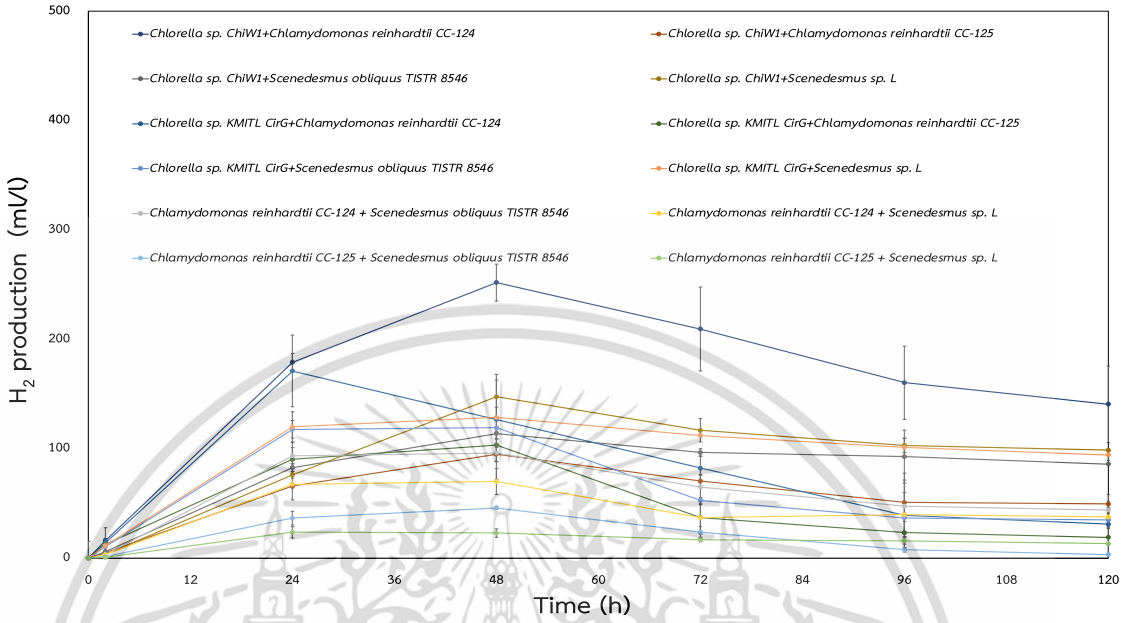
ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง		
	ml/L/h	$\mu molH_2/mgDCW/h$	$\mu molH_2/mgCHL/h$
Chlorella sp. ChiW1	1.4697 ± 0.1573[b]	0.0467 ± 0.0050[b]	2.1227 ± 0.2271[b]
Chlorella sp. KMITL CirG	2.0080 ± 0.0509[a]	0.0673 ± 0.0017[a]	3.0770 ± 0.0780[a]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124	0.7520 ± 0.1049[e]	0.0390 ± 0.0054[e]	1.6963 ± 0.2367[e]
Chlamydomonas reinhardtii CC-125	0.6100 ± 0.0252[f]	0.0313 ± 0.0013[f]	1.6507 ± 0.0683[f]
Scenedesmus obliquus TISTR 8546	1.0477 ± 0.0676[c]	0.0410 ± 0.0027[c]	2.0110 ± 0.1297[c]
Scenedesmus sp. L	0.8297 ± 0.0738[d]	0.0370 ± 0.0033[d]	1.7040 ± 0.1515[d]

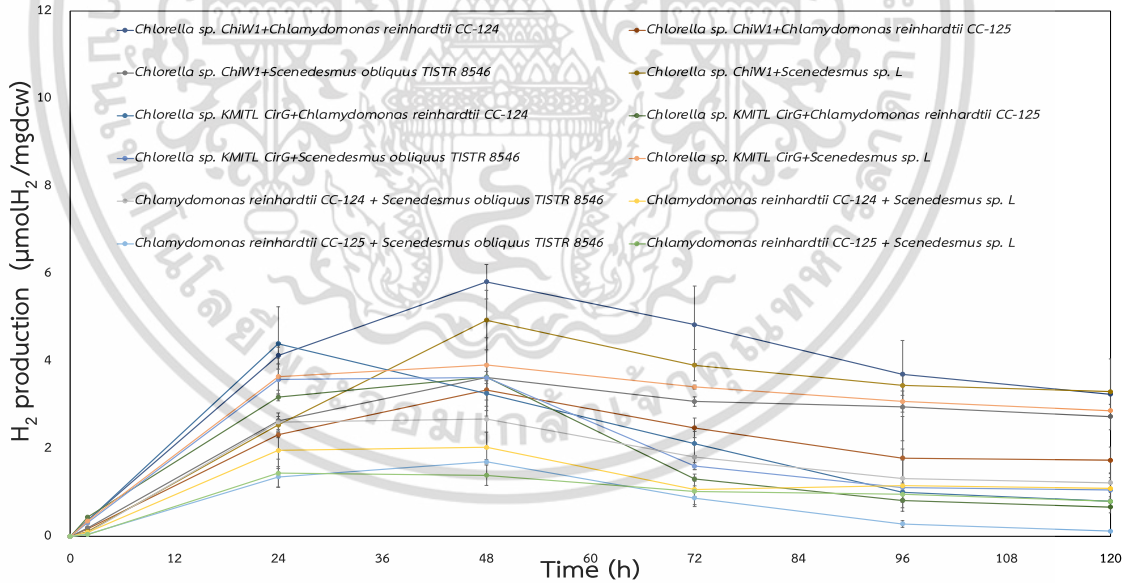
จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกันพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 8.7297 ± 0.5887 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 419.0330 ± 28.2570 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนของการเพาะเลี้ยงเดี่ยวและการเพาะเลี้ยงร่วมกันพบว่าสาหร่าย สีเขียวที่นำมาเพาะเลี้ยงร่วมกันมีการมีอัตราการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

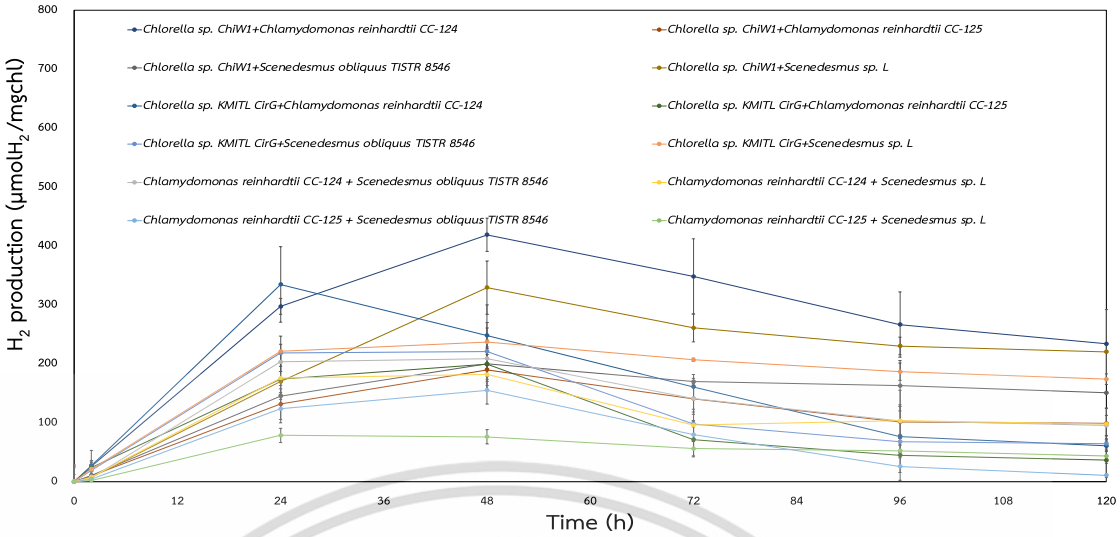


รูปที่ 4.8 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

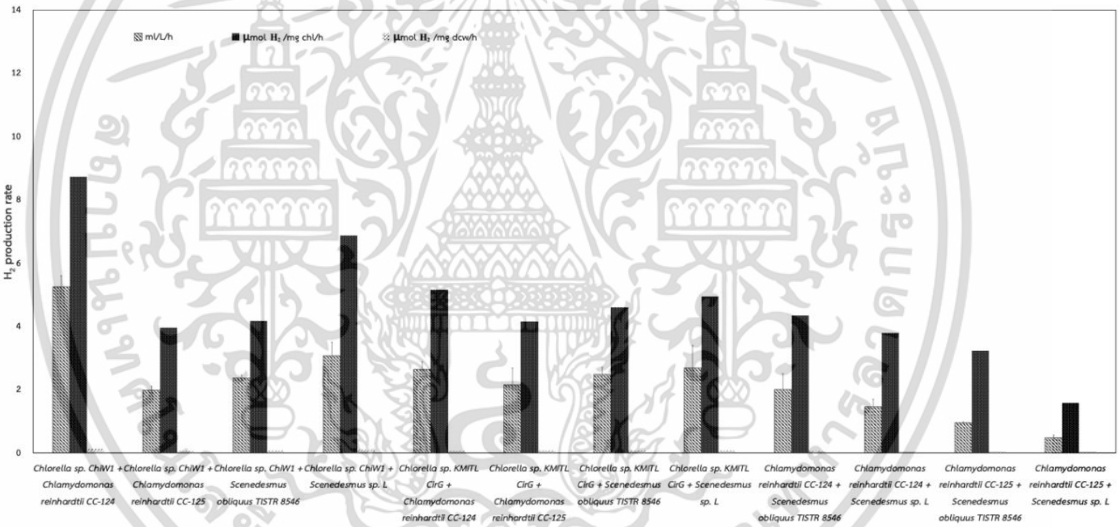


รูปที่ 4.9 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน



รูปที่ 4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

สายพันธุ์	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	mL/L	$\mu molH_2/mgDCW$	$\mu molH_2/mgCHL$
Chlorella sp. ChiW1 + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124	251.8983 ± 16.9865^{a}	5.8163 ± 0.3922^{a}	419.0330 ± 28.2570^{a}
Chlorella sp. ChiW1 + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125	94.9003 ± 6.5442^{d}	3.3447 ± 0.2306^{d}	189.8590 ± 13.0924^{def}
Chlorella sp. ChiW1 + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	113.7433 ± 4.3513^{cd}	3.6270 ± 0.1388^{c}	199.9943 ± 7.6509^{cdef}
Chlorella sp. ChiW1 + *Scenedesmus* sp. L	147.5030 ± 20.3215^{b}	4.9387 ± 0.6804^{b}	329.5553 ± 45.4028^{b}
Chlorella sp. KMITL CirG + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124	126.7453 ± 11.3082^{bc}	3.2647 ± 0.2912^{d}	248.1063 ± 22.1359^{c}
Chlorella sp. KMITL CirG +*Chlamydomonas reinhardtii* CC-125	103.3467 ± 25.4513^{cd}	3.6423 ± 0.8970^{c}	199.4743 ± 49.1250^{cdef}
Chlorella sp. KMITL CirG + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	119.1443 ± 10.3939^{cd}	3.6270 ± 0.3164^{c}	221.1143 ± 19.2896^{cde}
Chlorella sp. KMITL CirG + *Scenedesmus* sp. L	128.6340 ± 34.2619^{bc}	3.9153 ± 1.0429^{c}	237.3313 ± 63.2136^{cd}
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	96.0637 ± 24.0279^{d}	2.6803 ± 0.6704^{de}	208.8173 ± 52.2304^{cde}
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 + *Scenedesmus* sp. L	69.9763 ± 11.8115^{e}	2.0373 ± 0.3439^{efg}	182.2163 ± 30.7569^{ef}
Chlamydomonas reinhardtii CC-125 + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	45.8567 ± 1.2744^{efg}	1.7060 ± 0.0474^{fg}	155.3033 ± 4.3158^{f}
Chlamydomonas reinhardtii CC-125 + *Scenedesmus* sp. L	22.9553 ± 3.7902^{g}	1.3973 ± 0.2307^{g}	76.2223 ± 12.5851^{h}

ตารางที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจน		
	mL/L/h	$\mu molH_2/mgDCW/h$	$\mu molH_2/mgCHL/h$
Chlorella sp. ChiW1 + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124	5.2480 ± 0.3539^{a}	0.1213 ± 0.0082^{a}	8.7297 ± 0.5887^{a}
Chlorella sp. ChiW1 + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125	1.9770 ± 0.1363^{d}	0.0697 ± 0.0048^{cd}	3.9550 ± 0.2728^{def}
Chlorella sp. ChiW1 + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	2.3697 ± 0.0907^{cd}	0.0757 ± 0.0029^{c}	4.1667 ± 0.1594^{cdef}
Chlorella sp. ChiW1 + *Scenedesmus* sp. L	3.0730 ± 0.4234^{b}	0.1030 ± 0.0142^{b}	6.8660 ± 0.9459^{b}
Chlorella sp. KMITL CirG + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124	2.6407 ± 0.2356^{bc}	0.0683 ± 0.0061^{cd}	5.1690 ± 0.4612^{c}
Chlorella sp. KMITL CirG + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125	2.1533 ± 0.5302^{cd}	0.0757 ± 0.0187^{c}	4.1557 ± 1.0234^{cdef}
Chlorella sp. KMITL CirG + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	2.4823 ± 0.2165^{cd}	0.0757 ± 0.0066^{c}	4.6063 ± 0.4019^{cde}
Chlorella sp. KMITL CirG + *Scenedesmus* sp. L	2.6800 ± 0.7138^{bc}	0.0817 ± 0.0217^{c}	4.9447 ± 1.3170^{cd}
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	2.0010 ± 0.5006^{d}	0.0560 ± 0.0140^{de}	4.3503 ± 1.0881^{cde}
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 + *Scenedesmus* sp. L	1.4580 ± 0.2461^{e}	0.0423 ± 0.0072^{ef}	3.7960 ± 0.6408^{ef}
Chlamydomonas reinhardtii CC-125 + *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	0.9553 ± 0.0265^{efg}	0.0353 ± 0.0010^{f}	3.2353 ± 0.0899^{f}
Chlamydomonas reinhardtii CC-125 + *Scenedesmus* sp. L	0.4780 ± 0.0790^{g}	0.0290 ± 0.0048^{f}	1.5880 ± 0.2622^{h}

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก

4.3.1 ผลการศึกษาการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

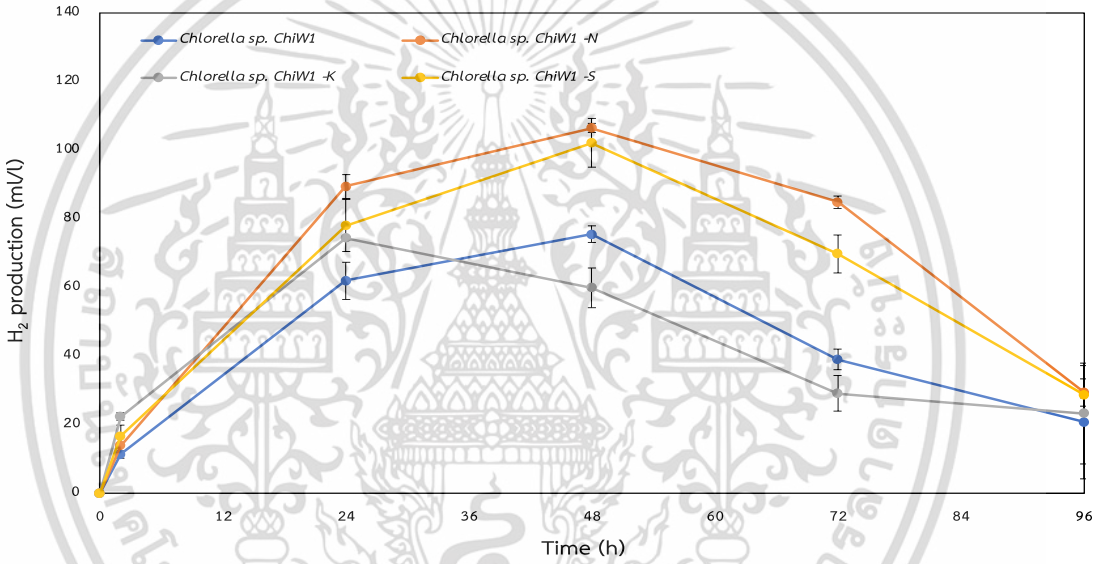
จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารบางชนิดได้แก่ ซัลเฟอร์ (TAP-S), ไนโตรเจน (TAP-N) และโพแทสเซียม (TAP-K) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) โดยใช้อาหาร TAP ปกติเป็นตัวแปรควบคุม พบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงแบบเดี่ยว มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (TAP-N) (รูปที่ 4.12 - 4.15, ตารางที่ 4.6 - 4.7) และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารซัลเฟอร์ (TAP-S) (รูปที่ 4.16 - 4.19, ตารางที่ 4.8 - 4.9) จากการทดลองพบว่าสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าการบ่มในอาหาร TAP ปกติที่เป็นตัวแปรควบคุม

จากการศึกษาผลการขาดแหล่งธาตุอาหารซัลเฟอร์ ไนโตรเจนและโพแทสเซียมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีอาหาร TAP ปกติเป็นตัวแปรควบคุม พบว่าสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ที่บ่มในอาหาร TAP ปกติมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำ เป็นผลมาจากการที่ในอาหาร TAP ปกติมีสารอาหารอยู่ครบถ้วน กระบวนการเมแทบอลิซึมของสาหร่ายนั้นจะนำไปใช้ในกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ทำให้พลังงานถูกนำไปใช้ในกระบวนการอื่นมากกว่าการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้เซลล์สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำ

จากการทดลองพบว่า การขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าอาหาร TAP ปกติ โดยเฉพาะสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหารขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจนโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 10.5357 ± 0.1280 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.7) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 505.7116 ± 6.1442 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.6) เนื่องจากไนโตรเจนเป็นโครงสร้างหลักของกรดอะมิโนและเป็นองค์ประกอบในหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ การขาดไนโตรเจนจะทำให้สาหร่ายมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงลดลง เมื่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบแสงถูกยับยั้งให้สังเคราะห์แสงได้น้อยลง จึงส่งผลให้มีการสังเคราะห์แสงลดลง ทำให้ออกซิเจนในระบบลดลง การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้น นอกจากนี้ การขาดไนโตรเจนยังส่งผลให้เซลล์มีการสะสมแป้งมากขึ้น ทำให้เกิดอิเล็กตรอนจำนวนมากเนื่องจากแป้งถูกย่อยสลายเป็นไพรูเวท (Pyruvate) และอะซีติล-โคเอ (Acetyl CoA) โดยอิเล็กตรอนที่ได้จากการย่อยสลายสามารถนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ (Ji et al., 2011)

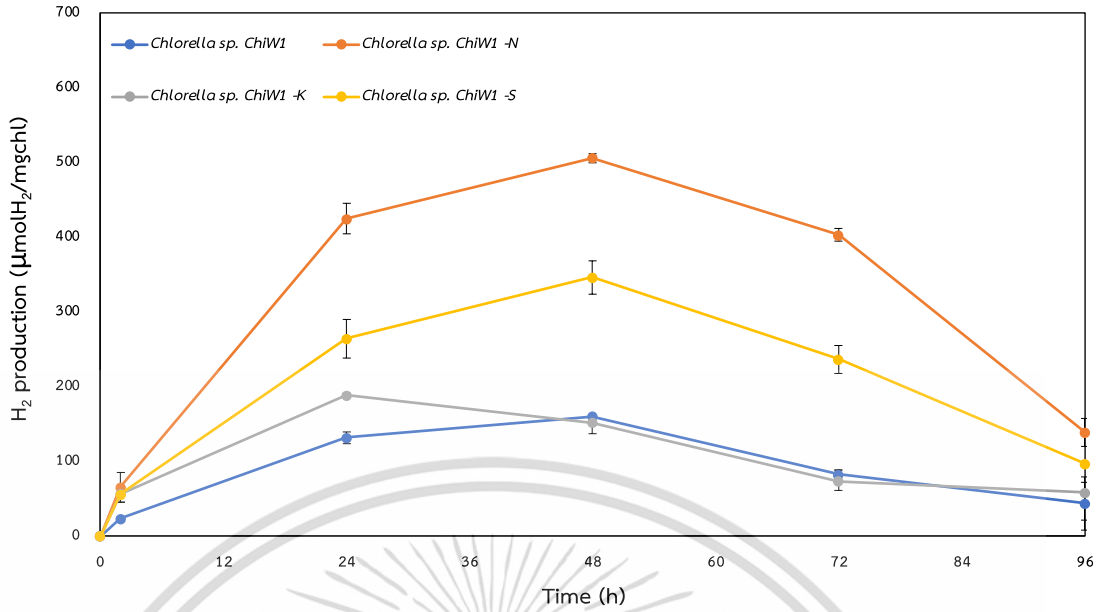
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารซัลเฟอร์ พบว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงสุดเมื่อบ่มในอาหารที่ขาดแหล่งธาตุอาหารซัลเฟอร์โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 10.4125 ± 0.6369 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.9) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 499.8004 ± 30.5690 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.8) เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เมไทโอนีน (Methionine) การขาดธาตุซัลเฟอร์ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ของเมไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมการทำงานของระบบแสง จึงทำให้การทำงานของระบบแสงลดลง เมื่อปริมาณออกซิเจนลดลง การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงมากขึ้น ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

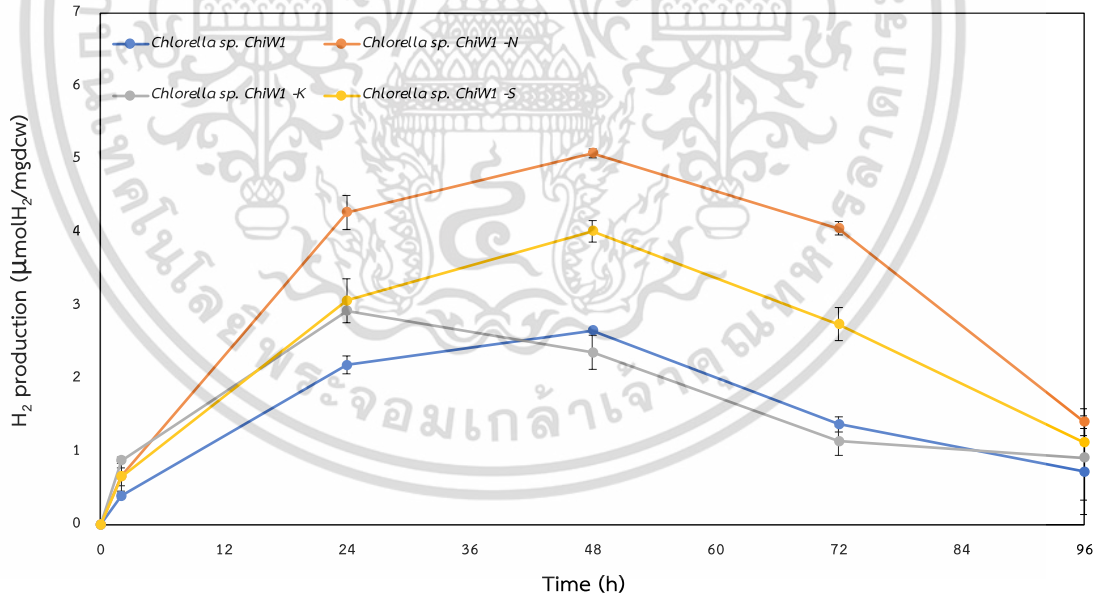


รูปที่ 4.12 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

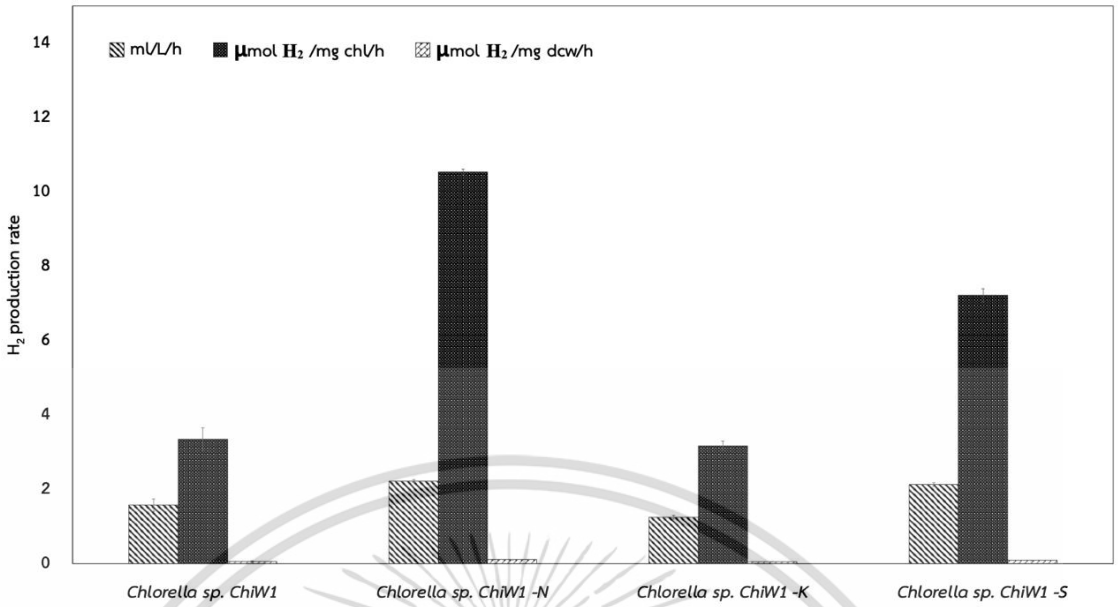


รูปที่ 4.13 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)



รูปที่ 4.14 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)

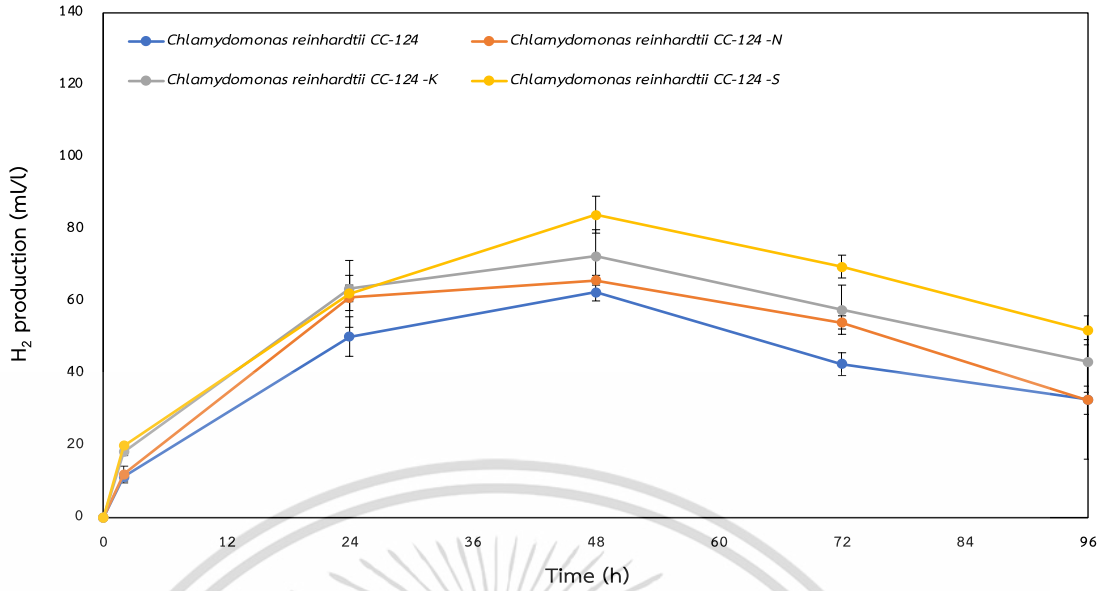
ตารางที่ 4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ

สายพันธุ์	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	ml/L	µmolH_2/mgDCW	µmolH_2/mgCHL
Chlorella sp. ChiW1	75.4147 ± 0.3776^{b}	2.6579 ± 0.0133^{c}	160.6596 ± 0.8044^{c}
Chlorella sp. ChiW1 -N	106.3392 ± 1.2920^{a}	5.0864 ± 0.0618^{a}	505.7116 ± 6.1442^{a}
Chlorella sp. ChiW1 -S	101.9826 ± 11.8902^{a}	4.0172 ± 0.4684^{b}	346.4439 ± 1.2458^{b}
Chlorella sp. ChiW1 -K	74.2784 ± 0.4907^{b}	2.9259 ± 0.0193^{c}	188.5965 ± 40.392^{c}

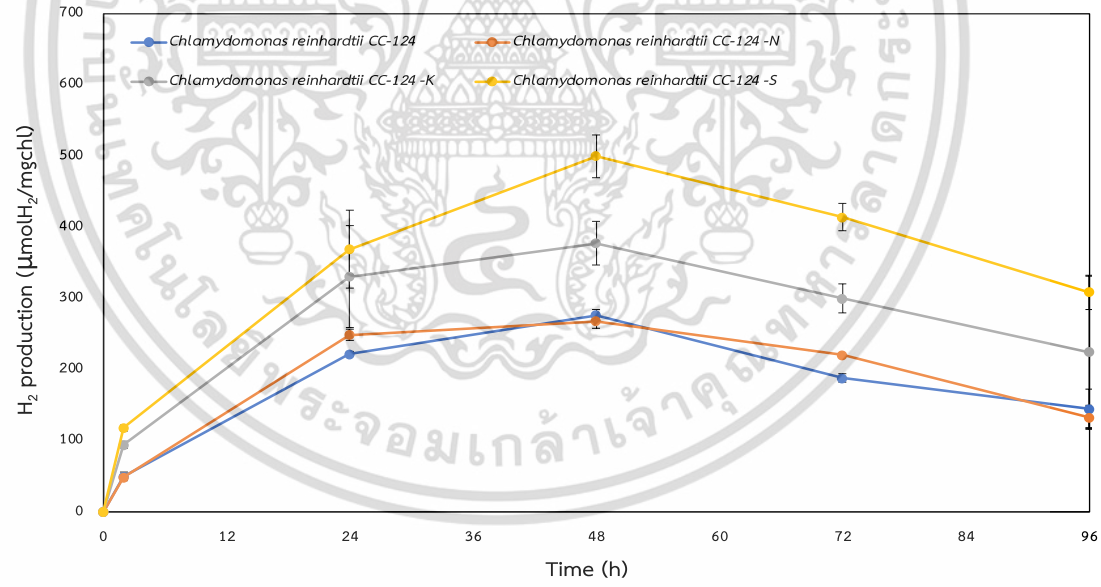
ตารางที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ

สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง		
	ml/L/h	µmolH_2/mgDCW/h	µmolH_2/mgCHL/h
Chlorella sp. ChiW1	1.5712 ± 0.0079^{b}	0.0554 ± 0.0003^{c}	3.3471 ± 0.0168^{c}
Chlorella sp. ChiW1 -N	2.2154 ± 0.0269^{a}	0.1060 ± 0.0013^{a}	10.5357 ± 0.1280^{a}
Chlorella sp. ChiW1 -S	2.1246 ± 0.2477^{a}	0.0837 ± 0.0098^{b}	7.2176 ± 0.5415^{b}
Chlorella sp. ChiW1 -K	1.2472 ± 0.1205^{c}	0.0491 ± 0.0047^{c}	3.1666 ± 0.3061^{c}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

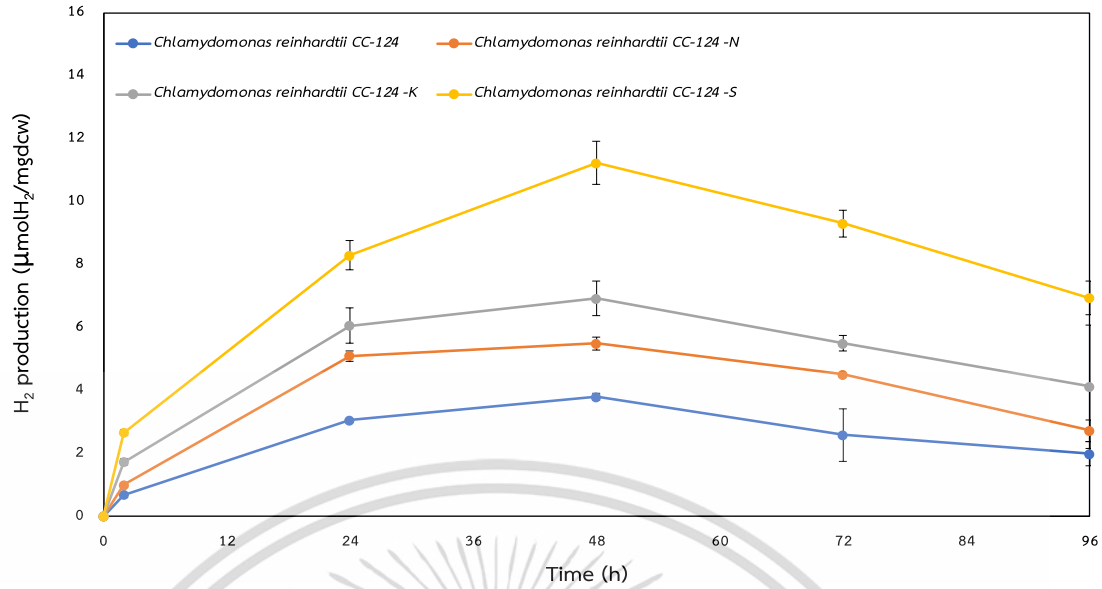


รูปที่ 4.16 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)

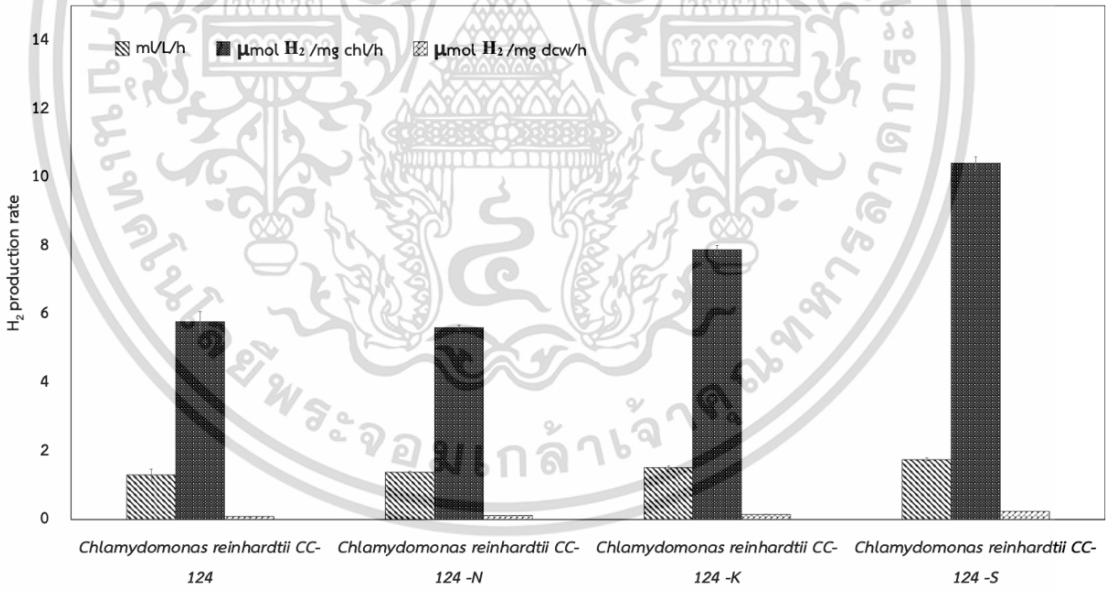


รูปที่ 4.17 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)



รูปที่ 4.19 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งโพแทสเซียม (TAP-K) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ

สายพันธุ์	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	ml/L	$\mu molH_2/mgDCW$	$\mu molH_2/mgCHL$
Chlamydomonas reinhardtii CC-124	62.4673 ± 1.8819[a]	3.8028 ± 0.1146[c]	276.4211 ± 8.3276[b]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 -N	65.7657 ± 2.4690[a]	5.5049 ± 0.2067[bc]	268.3456 ± 10.0742[b]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 -S	83.9347 ± 5.1336[a]	11.3416 ± 0.6875[a]	499.8004 ± 30.5690[a]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 -K	72.4486 ± 29.7136[a]	6.9307 ± 2.8425[b]	377.7007 ± 154.9075[ab]

ตารางที่ 4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารที่ขาดธาตุอาหารชนิดต่างๆ

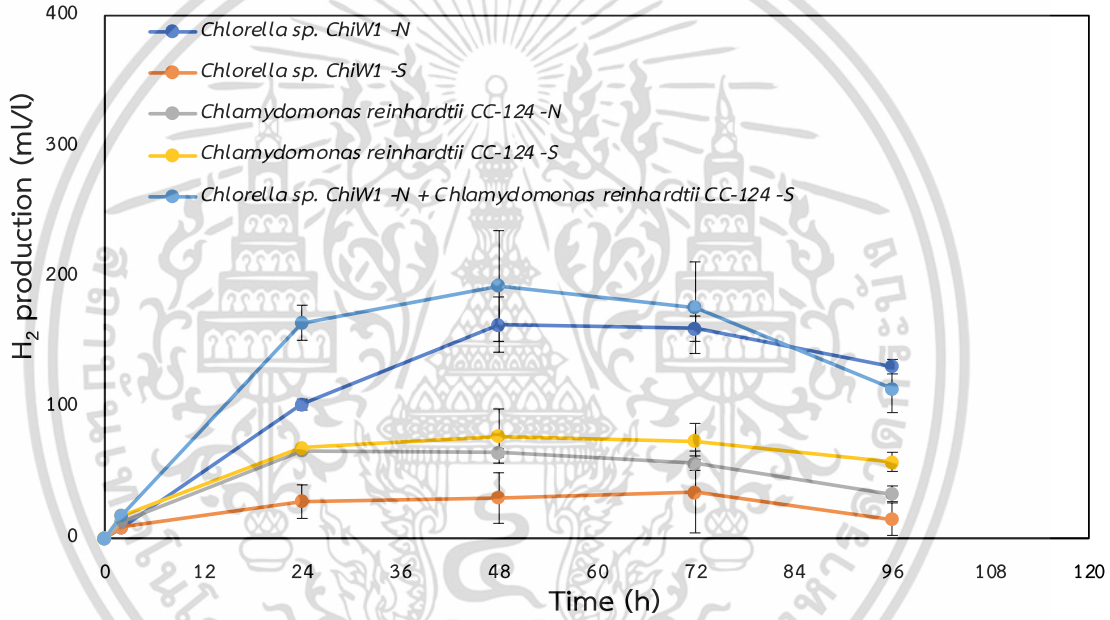
สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง		
	ml/L/h	$\mu molH_2/mgDCW/h$	$\mu molH_2/mgCHL/h$
Chlamydomonas reinhardtii CC-124	1.3014 ± 0.0392[a]	0.0792 ± 0.0024[c]	5.7588 ± 0.1735[b]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124-N	1.3701 ± 0.0514[a]	0.1147 ± 0.0043[bc]	5.5905 ± 0.2099[b]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124-S	1.7486 ± 0.1070[a]	0.2342 ± 0.0143[a]	10.4125 ± 0.6369[a]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124-K	1.5094 ± 0.6190[a]	0.1444 ± 0.0592[b]	7.8688 ± 0.4122[ab]

4.3.2 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ตามลำดับ

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (TAP-N) และ ซัลเฟอร์ (TAP-S) ตามลำดับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

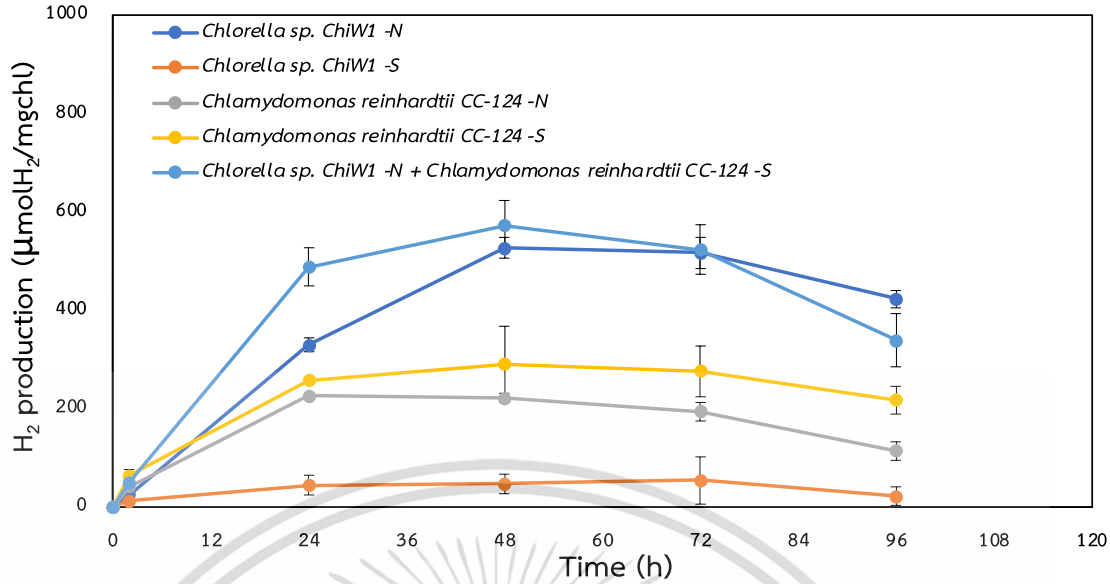
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlorella sp. ChiW1 ในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ร่วมกับสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 11.9222 ± 2.6439 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.11) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 572.2653 ± 126.9078 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่าการขาดธาตุอาหารไนโตรเจนร่วมกับซัลเฟอร์ส่งเสริมการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้ จึงเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่บ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดไนโตรเจนและสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ ไปทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกันในการทดลองต่อไป

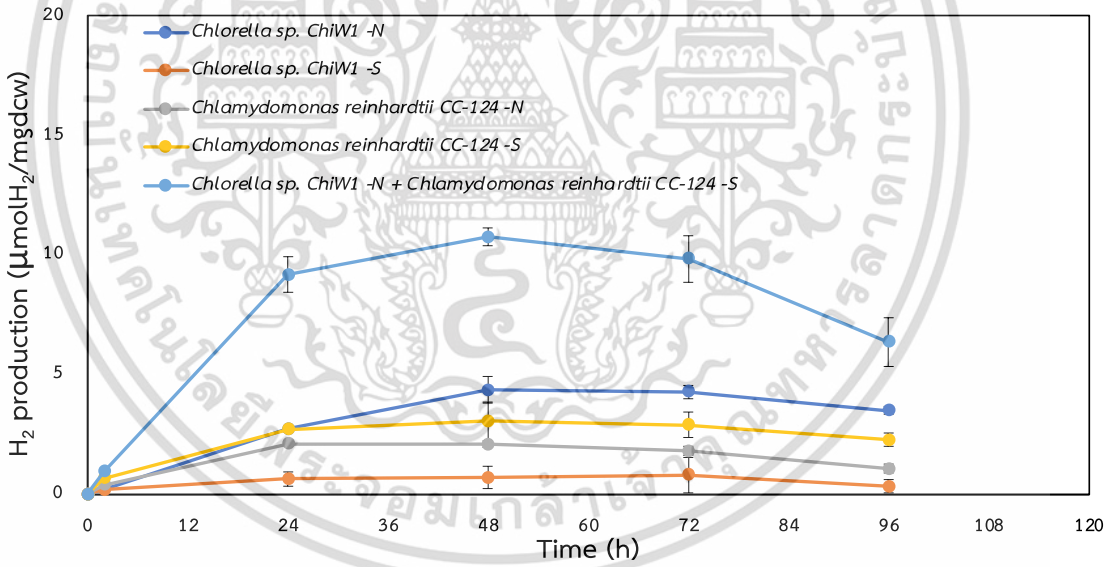


รูปที่ 4.20 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

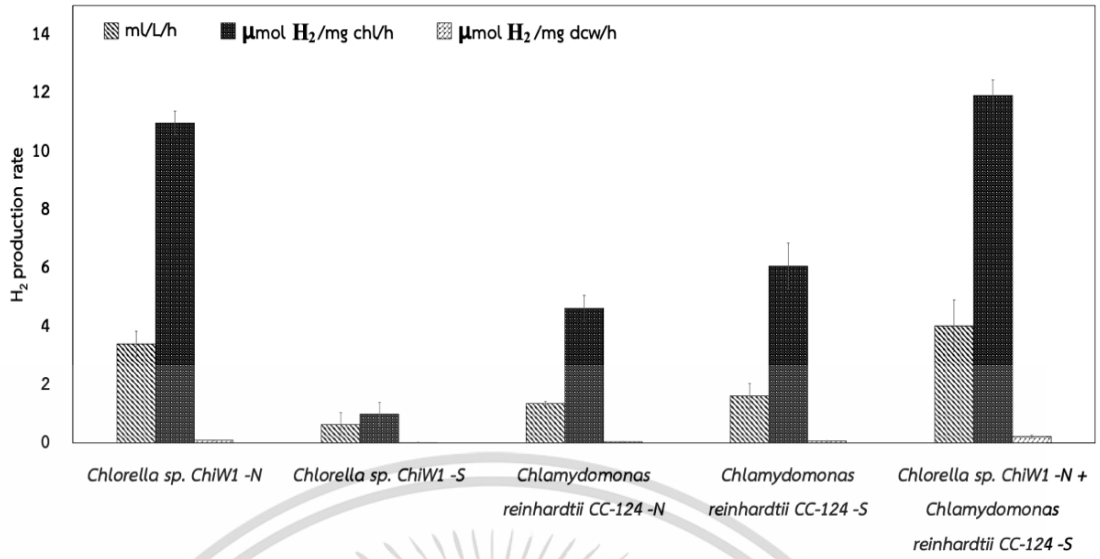


รูปที่ 4.21 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน



รูปที่ 4.22 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ตารางที่ 4.10 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของ *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน

สายพันธุ์	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	ml/L	$\mu molH_2/mgDCW$	$\mu molH_2/mgCHL$
Chlorella sp. ChiW1 (-N)	163.1159 ± 21.3730[a]	4.3692 ± 0.5725[b]	526.7871 ± 69.0248[a]
Chlorella sp. ChiW1 (-S)	34.5832 ± 31.2312[b]	0.8048 ± 0.7212[c]	54.0648 ± 48.4462[c]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 (-N)	66.4998 ± 1.22182[b]	2.1205 ± 0.0390[bc]	225.8363 ± 4.1493[b]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 (-S)	77.7224 ± 20.6337[b]	3.0616 ± 0.8128[bc]	291.0655 ± 77.2720[b]
Chlorella sp. ChiW1 (-N) + *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (-S)	192.8682 ± 42.7712[a]	10.7627 ± 2.3868[a]	572.2653 ± 126.9078[a]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงเดี่ยวและเพาะเลี้ยงร่วมกัน

สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง		
	ml/L/h	$\mu molH_2/mgDCW/h$	$\mu molH_2/mgCHL/h$
Chlorella sp. ChiW1 (-N)	3.3982 ± 0.4453[a]	0.0911 ± 0.0119[b]	10.9747 ± 1.4380[a]
Chlorella sp. ChiW1 (-S)	0.6382 ± 0.4036[b]	0.0147 ± 0.0093[d]	0.9900 ± 0.6260[c]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 (-N)	1.3584 ± 0.0621[b]	0.0433 ± 0.0020[cd]	4.6130 ± 0.2110[b]
Chlamydomonas reinhardtii CC-124 (-S)	1.6192 ± 0.4299[b]	0.0638 ± 0.0169[bc]	6.0639 ± 1.6098[b]
Chlorella sp. ChiW1 (-N) +*Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (-S)	4.0181 ± 0.8911[a]	0.2242 ± 0.0497[a]	11.9222 ± 2.6439[a]

4.3.3 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

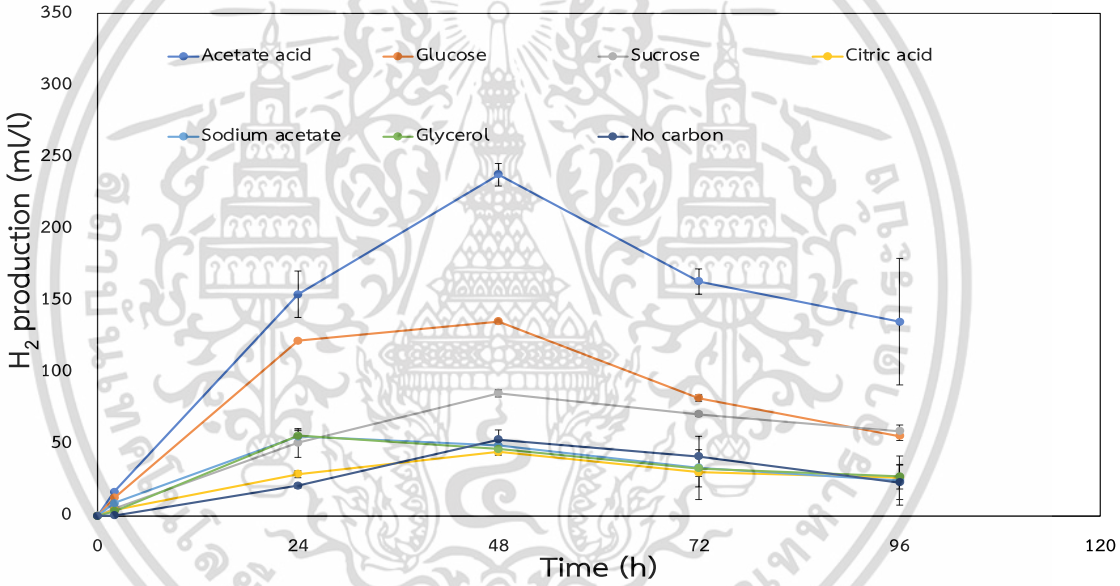
4.3.3.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งธาตุอาหารซัลเฟอร์และไนโตรเจน ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ กรดอะซีติก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส กรดซิติก โซเดียมอะซีเตท และกลีเซอรอล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซีติกในอาหาร TAP สูตรปกติ คือ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) โดยใช้อาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเป็นตัวแปรควบคุม จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 9.122 ± 0.303 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.13) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 437.8574 ± 14.5225 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.12) ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N และ TAP-S ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

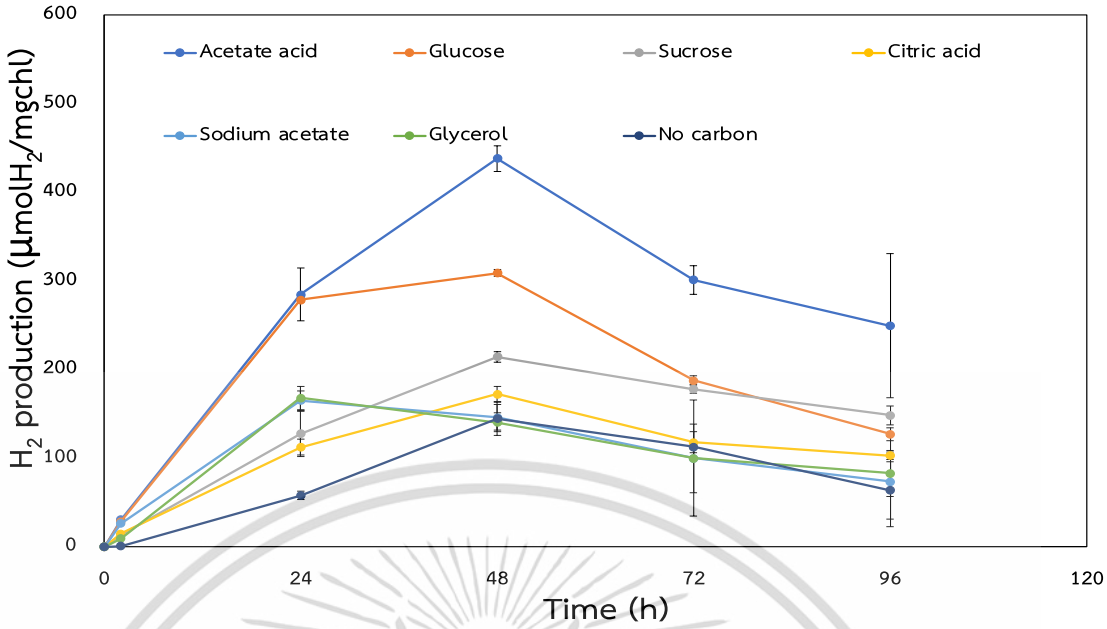
เท่ากับ 6.433 ± 0.079 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.13) ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-N และ TAP-S ที่มีน้ำตาลซูโครส กรดซิติก โซเดียมอะซีเตท และกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะเห็นได้ว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่า

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า เซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกรดอะซีติกมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เนื่องจากกรดอะซีติกมีอินทรีย์คาร์บอนที่สามารถดูดซึมได้ง่าย เมื่อกรดอะซีติกเข้าสู่เซลล์แล้วจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับโคเอนไซม์เอเปลี่ยนไปเป็น อะซีติลโคเอ (Acetyl CoA) จากนั้นเข้าสู่วัฏจักรเครบส์และมีการสร้าง NADH และ $FADH_2$ (Johnson และ Alric, 2012) ซึ่งทำให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เนื่องจากมีการให้โปรตอนและอิเล็กตรอน จึงส่งผลให้เซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูง

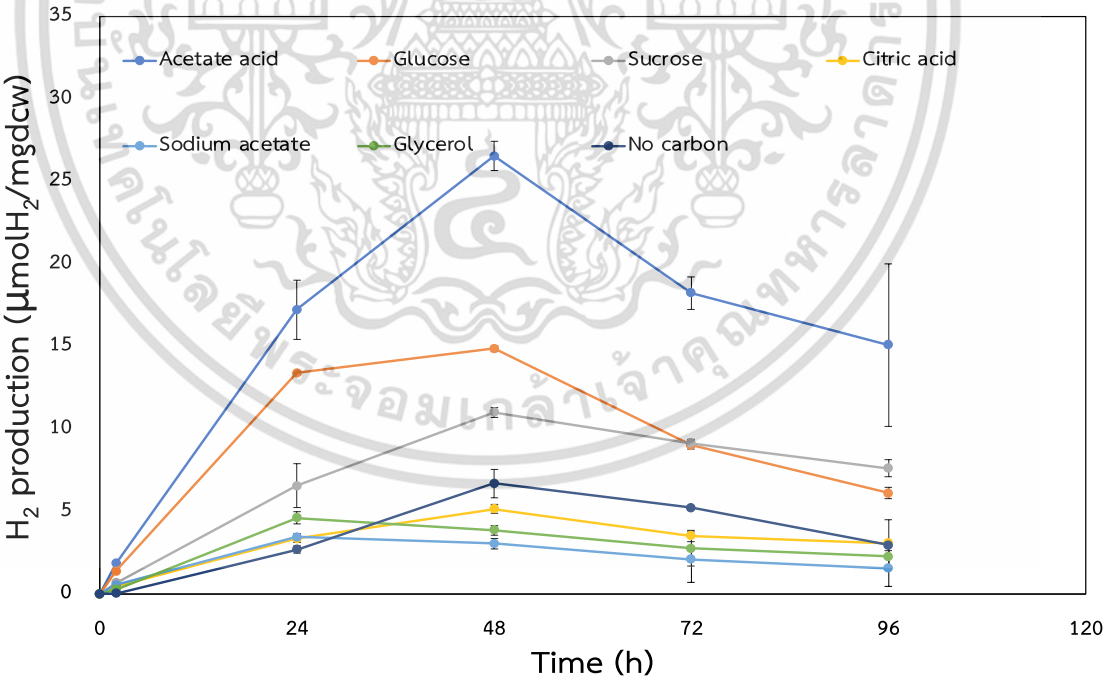


รูปที่ 4.24 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

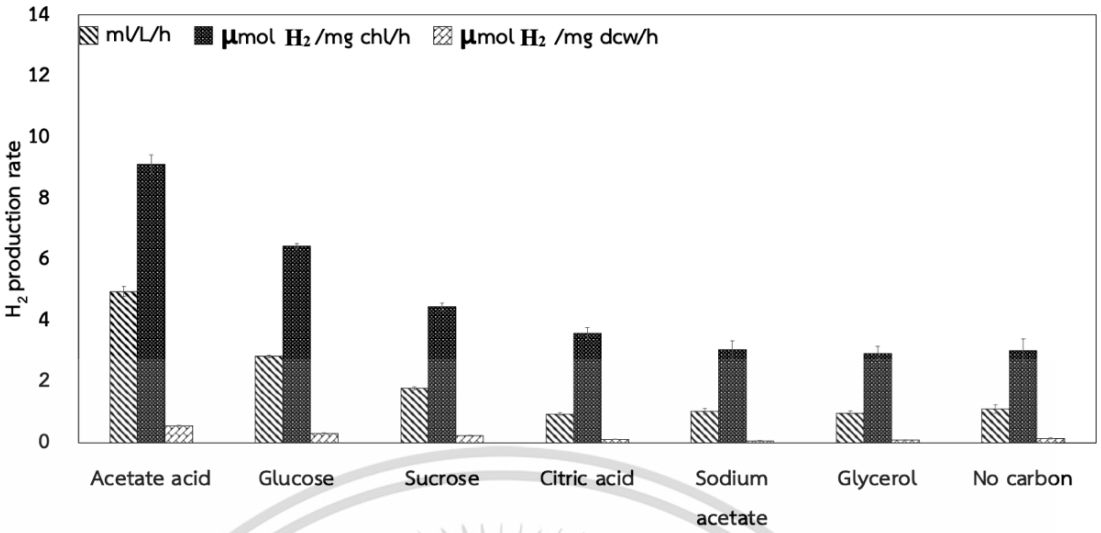


รูปที่ 4.25 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ



รูปที่ 4.26 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ตารางที่ 4.12 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	ml/L	$\mu molH_2/mgDCW$	$\mu molH_2/mgCHL$
Acetate acid	237.7274 ± 7.8848[a]	26.5321 ± 0.8800[a]	437.8574 ± 14.5225[a]
Glucose	135.3127 ± 1.6543[b]	14.8543 ± 0.1816[b]	308.8015 ± 3.7753[b]
Sucrose	70.8719 ± 1.9313[c]	7.1267 ± 0.2487[c]	177.6694 ± 4.8416[c]
Citric acid	44.5395 ± 2.2185[e]	5.1423 ± 0.2561[e]	172.0559 ± 8.5700[c]
Sodium acetate	55.4311 ± 3.7510[d]	3.4370 ± 0.2326[f]	164.7763 ± 11.1502[c]
Glycerol	55.7233 ± 4.3154[d]	4.6068 ± 0.3568[e]	167.7348 ± 12.9899[c]
No carbon	53.0312 ± 6.8166[d]	6.7004 ± 0.8613[d]	144.2750 ± 18.5450[d]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง		
	ml/L/h	$\mu molH_2/mgDCW/h$	$\mu molH_2/mgCHL/h$
Acetate acid	4.953 ± 0.164[a]	0.553 ± 0.018[a]	9.122 ± 0.303[a]
Glucose	2.819 ± 0.034[b]	0.309 ± 0.004[b]	6.433 ± 0.079[b]
Sucrose	1.779 ± 0.050[c]	0.229 ± 0.006[c]	4.461 ± 0.124[c]
Citric acid	0.928 ± 0.046[d]	0.107 ± 0.005[e]	3.584 ± 0.179[d]
Sodium acetate	1.022 ± 0.102[d]	0.063 ± 0.006[f]	3.037 ± 0.303[e]
Glycerol	0.971 ± 0.073[d]	0.080 ± 0.006[f]	2.922 ± 0.219[e]
No carbon	1.105 ± 0.142[d]	0.140 ± 0.018[d]	3.006 ± 0.386[e]

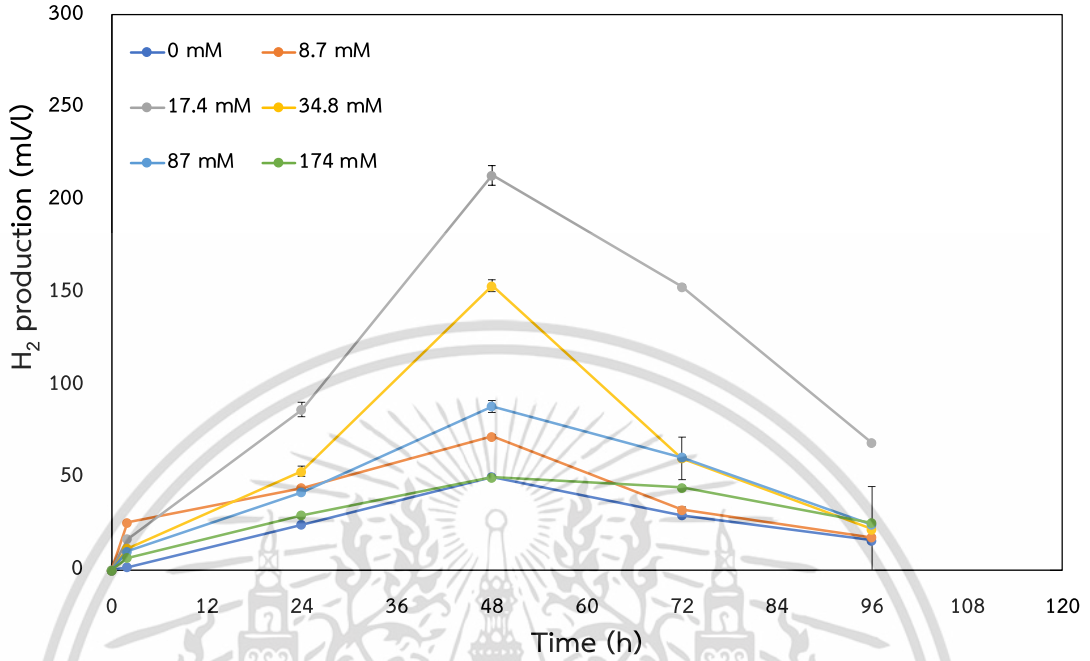
4.3.3.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-N และ TAP-S ที่มีการแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซีติกเท่ากับ 0, 8.7, 17.4, 34.8, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มต่อ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซีติก 17.4 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 14.506 ± 0.354 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.15) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 696.303 ± 3.074 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.14)

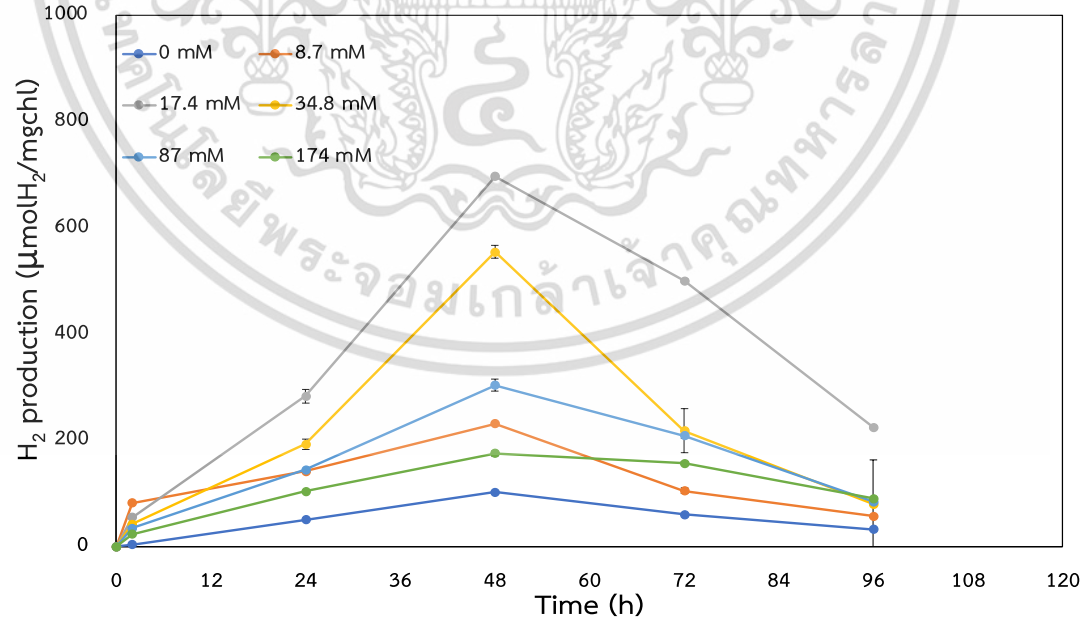
จากการศึกษาผลความเข้มข้นของอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซีติก 17.4 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เนื่องจากกรดอะซีติก เมื่อละลายน้ำแล้วจะแตกตัวให้อะซีเตทและโปรตอน โดยอะซีเตทเป็นอินทรีย์คาร์บอนที่สำคัญสาหร่ายใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ในการทดลองนี้จะแสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกน้อยจะส่งผลให้ภายในเซลล์ไม่มีพลังงานและสารตั้งต้นที่เพียงพอในการผลิตไฮโดรเจน ในขณะเดียวกันถ้าความเข้มข้นของอะซีติกมากเกินไป จะส่งผลให้มีการแตกตัวของโปรตอนมากขึ้นตามความเข้มข้น ทำ

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่ว่าการคัดลอกหรือการนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบใดๆ

ให้มีความเป็นกรดมาก โดยจะส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นได้ลดลง

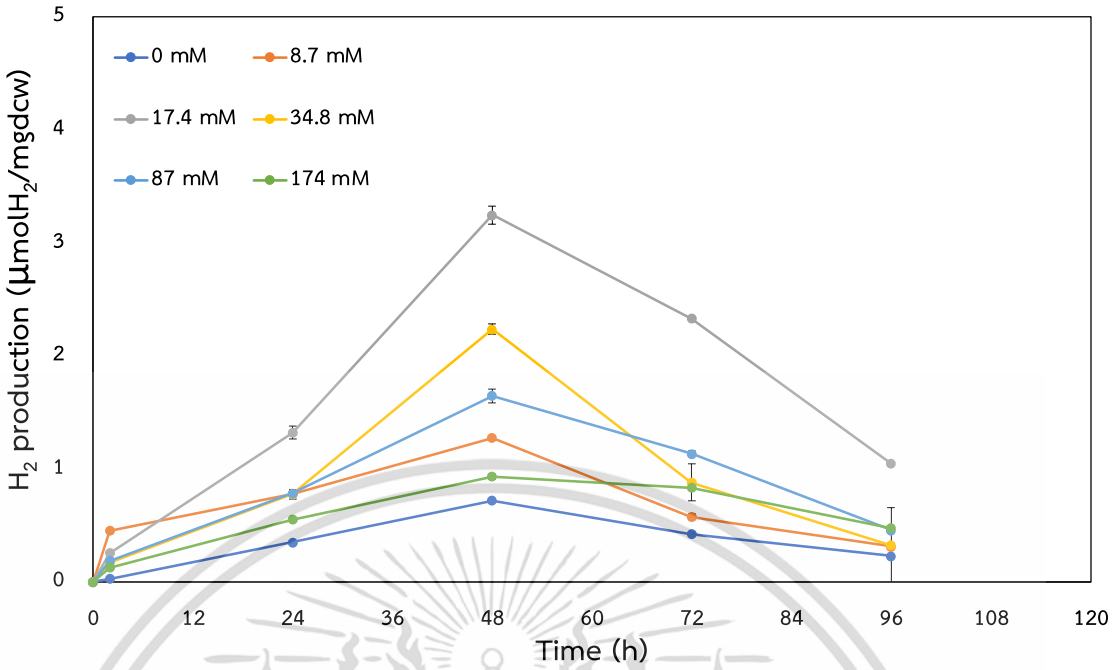


รูปที่ 4.28 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก

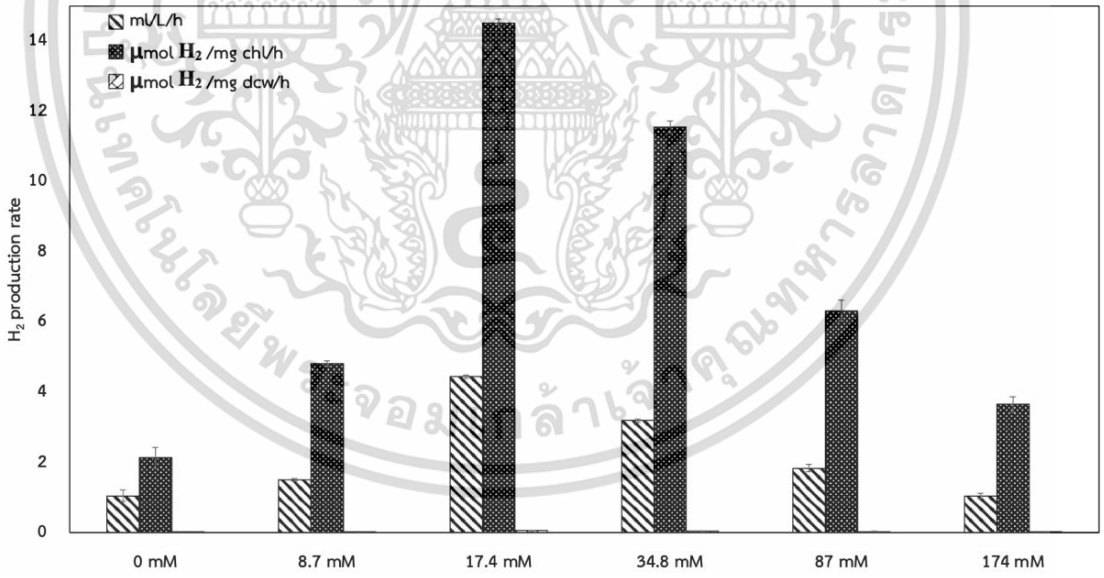


รูปที่ 4.29 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกันที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก



รูปที่ 4.31 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก

ความเข้มข้นของกรดอะซีติก	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	ml/L	$\mu molH_2/mgDCW$	$\mu mol\ H_2/mgCHL$
0 mM	50.373 ± 0.264[e]	0.718 ± 0.004[f]	102.497 ± 0.536[f]
8.7 mM	72.256 ± 0.960[d]	1.273 ± 0.017[d]	231.423 ± 3.074[d]
17.4 mM	213.255 ± 5.202[a]	3.246 ± 0.079[a]	696.303 ± 3.074[a]
34.8 mM	153.556 ± 3.288[b]	2.235 ± 0.048[b]	554.192 ± 11.867[b]
87 mM	88.520 ± 3.261[c]	1.647 ± 0.061[c]	303.595 ± 11.184[c]
174 mM	50.002 ± 1.278[e]	0.930 ± 0.024[e]	175.631 ± 4.489[e]

ตารางที่ 4.15 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก

ความเข้มข้นของกรดอะซีติก	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง		
	ml/L/h	$\mu molH_2/mgDCW/h$	$\mu molH_2/mgCHL/h$
0 mM	1.049 ± 0.005[e]	0.015 ± 0.000[f]	2.135 ± 0.011[f]
8.7 mM	1.505 ± 0.020[d]	0.027 ± 0.000[d]	4.821 ± 0.064[d]
17.4 mM	4.443 ± 0.108[a]	0.068 ± 0.002[a]	14.506 ± 0.354[a]
34.8 mM	3.199 ± 0.069[b]	0.047 ± 0.001[b]	11.546 ± 0.247[b]
87 mM	1.844 ± 0.068[c]	0.034 ± 0.001[c]	6.325 ± 0.233[c]
174 mM	1.042 ± 0.027[e]	0.019 ± 0.000[e]	3.659 ± 0.094[e]

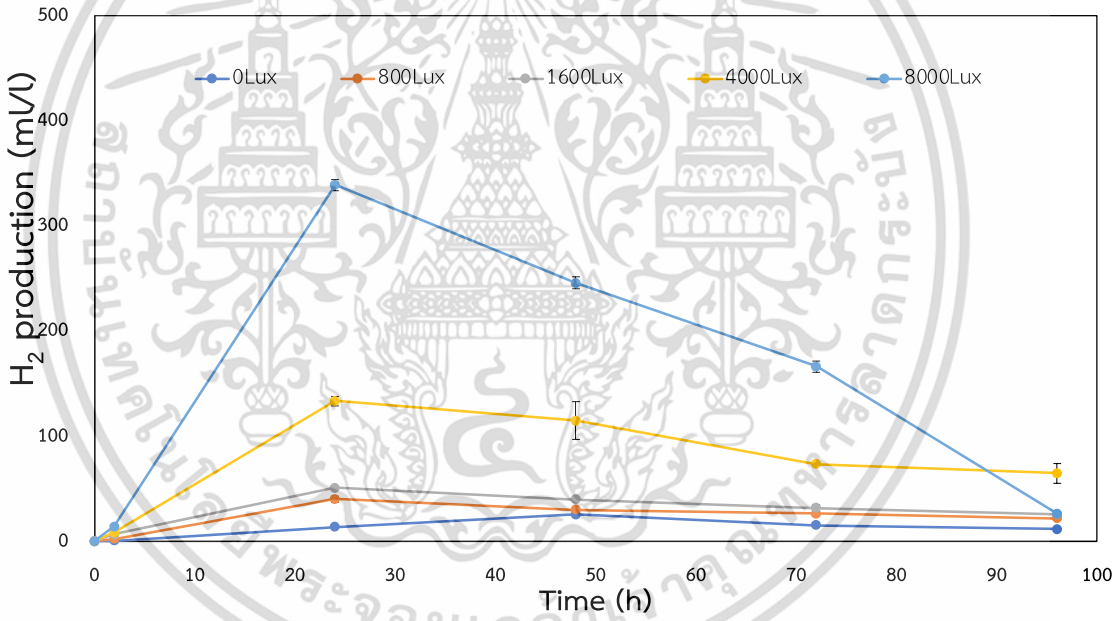
4.3.4 ผลการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-N และ TAP-S นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้อยู่ในสภาวะไร้อากาศ ทำการบ่มเซลล์ภายใต้การให้แสงต่อเนื่องที่ความเข้มแสงต่างๆ ดังนี้ 0, 800, 1,600, 4,000 และ 8,000 ลักซ์ จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า ที่ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 84.615 ± 1.364 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง(ตารางที่ 4.17) และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 4,061.543 ± 65.457 ไม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

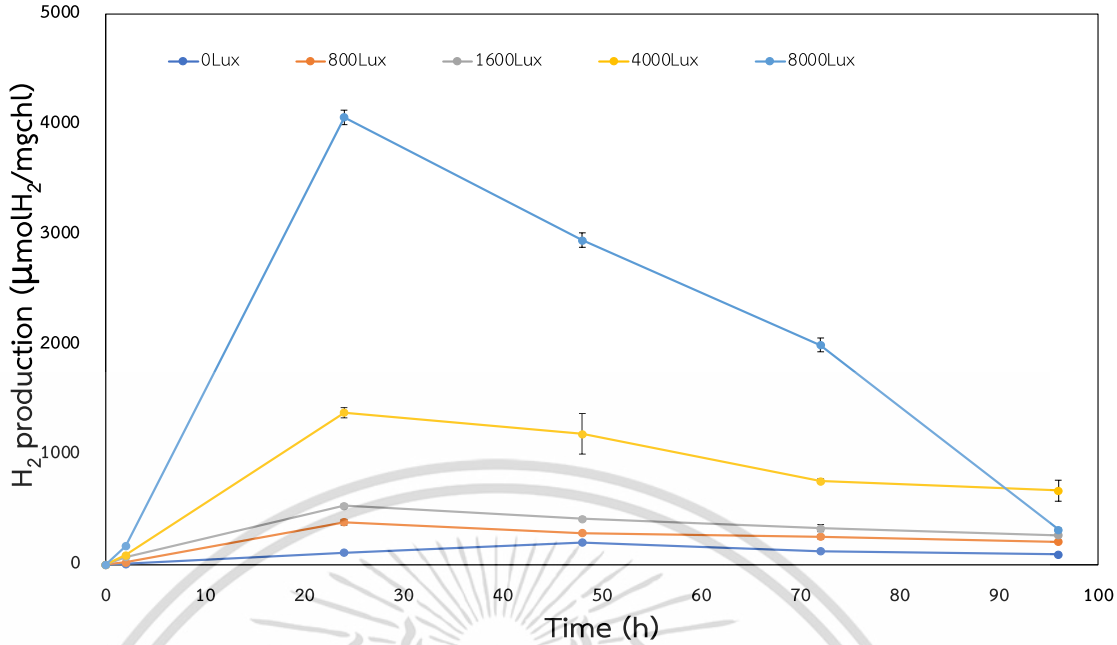
โครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์(ตารางที่ 4.16) โดยมีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 20 เท่า และเมื่อบ่มในที่มืด (0 ลักซ์) สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุดเท่ากับ 4.193 ± 0.270 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง(ตารางที่ 4.17)

จากการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ พบว่าสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำเมื่อนำไปบ่มในความเข้มแสงที่ต่ำ เนื่องจากพลังงานแสงจะกระตุ้นให้อิเล็กตรอนบริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสง อิเล็กตรอนมีพลังงานสูงขึ้นอิเล็กตรอนจึงหลุดออกมาและถูกถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังโมเลกุลต่างๆ จากนั้น อิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจะเคลื่อนที่ไปยังเฟอร์รีดอกซิน อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านเฟอร์รีดอกซินและเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตอนโดยมีเอนไซม์ไฮโดรจิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้ในสภาวะที่ความเข้มแสงต่ำ อิเล็กตรอนไม่ถูกกระตุ้นที่บริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสง จึงไม่มีอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจน

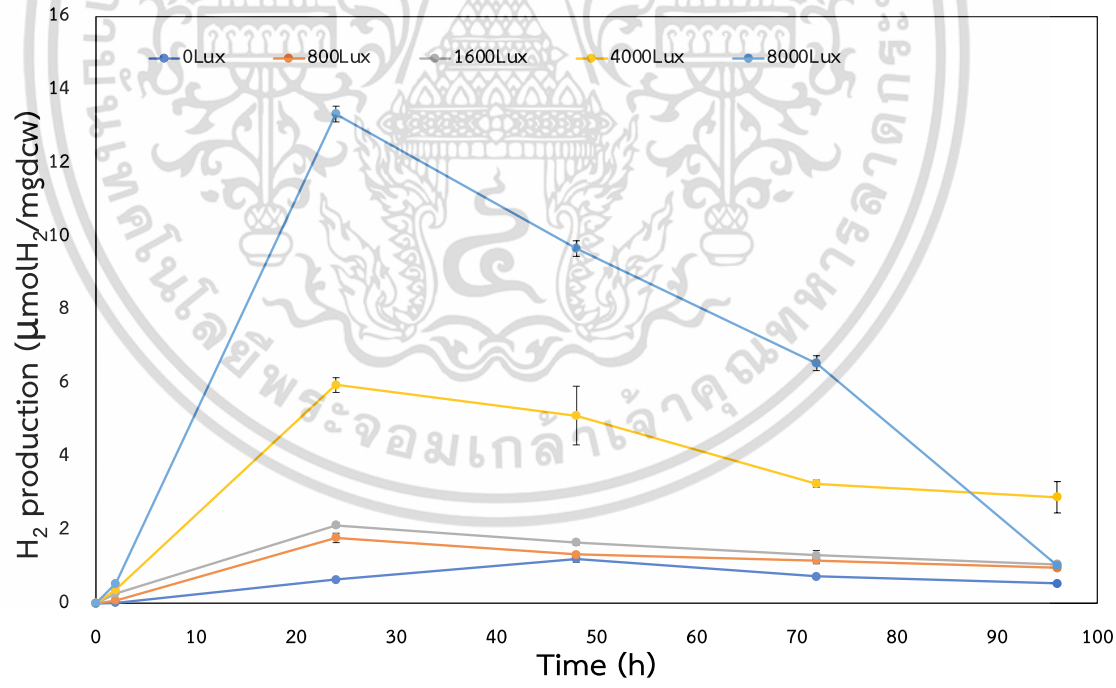


รูปที่ 4.32 การผลิตไฮโดรเจน (มิลลิลิตร/ลิตร) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

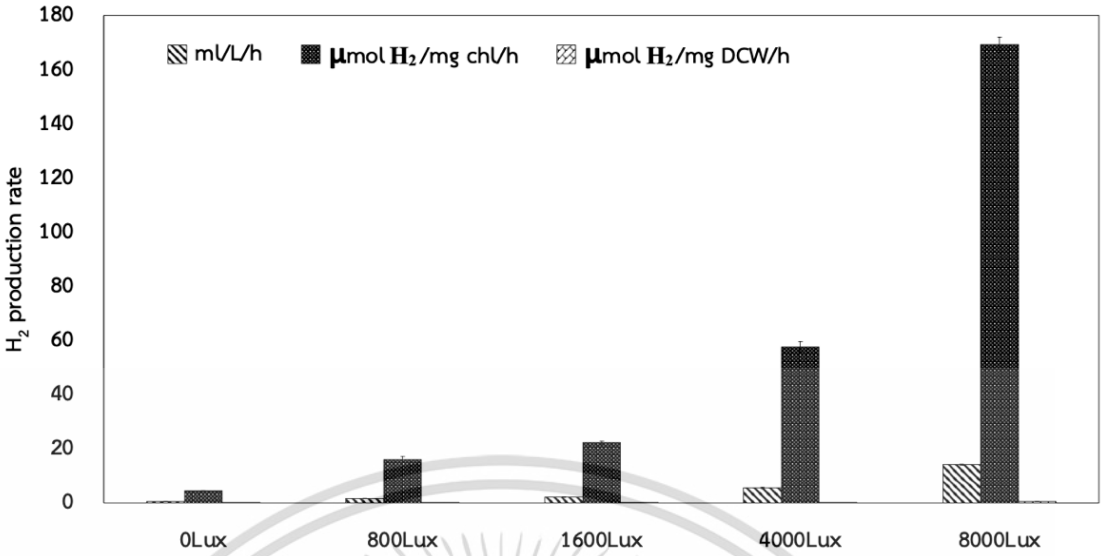


รูปที่ 4.33 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของคลอโรฟิลล์) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ



รูปที่ 4.34 การผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจน/มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ละชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.35 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 24 ของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

ตารางที่ 4.16 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

ความเข้มแสง	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	ml/L	µmoH_2/mgDCW	µmol H_2/mgCHL
0 Lux	25.294 ± 1.626^{e}	1.210 ± 0.078^{e}	201.263 ± 12.938^{e}
800 Lux	40.013 ± 2.772^{d}	1.786 ± 0.124^{d}	383.110 ± 26.542^{d}
1,600 Lux	50.910 ± 1.263^{c}	2.131 ± 0.053^{c}	532.933 ± 13.225^{c}
4,000 Lux	133.461 ± 4.579^{b}	5.958 ± 0.204^{b}	1380.086 ± 47.353^{b}
8,000 Lux	338.637 ± 5.458^{a}	13.339 ± 0.215^{a}	4061.543 ± 65.457^{a}

ตารางที่ 4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมงของสาหร่ายเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ในอาหาร TAP-N และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ

ความเข้มแสง	อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 48 ชั่วโมง		
	ml/L/h	µmolH_2/mgDCW/h	µmolH_2/mgCHL/h
0 Lux	0.568 ± 0.014^{e}	0.027 ± 0.001^{e}	4.519 ± 0.109^{e}
800 Lux	1.667 ± 0.116^{d}	0.074 ± 0.005^{d}	15.963 ± 1.106^{d}
1,600 Lux	2.121 ± 0.053^{c}	0.089 ± 0.002^{c}	22.206 ± 0.551^{c}
4,000 Lux	5.561 ± 0.191^{b}	0.248 ± 0.009^{b}	57.504 ± 1.973^{b}
8,000 Lux	14.110 ± 0.227^{a}	0.556 ± 0.009^{a}	167.231 ± 2.727^{a}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. ChiW1, *Chlorella* sp. KMITL CirG, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125, *Scenedesmus* sp. L และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. KMITL CirG มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) เท่ากับ 0.0463 ± 0.0014 ต่อชั่วโมง และมีเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time) เท่ากับ 14.9915 ± 0.4763 ชั่วโมง

2) จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 419.0330 ± 28.2570 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 8.7297 ± 0.5887 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

3) จากการศึกษาการขาดแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหาร 4 ชนิด คือ อาหาร TAP, อาหาร TAP-N, อาหาร TAP-K และอาหาร TAP-S พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร TAP-N และ สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 มีอัตราการการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร TAP-S

4) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน และสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่ใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 8,000 ลักซ์ มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 167.231 ± 2.727 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 4,061.543 ± 65.457 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งมากกว่าสภาวะปกติถึง 20 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเพิ่มเติม เช่น pH อุณหภูมิ เป็นต้น

2) ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเพิ่มเติม เช่น อายุเซลล์ จำนวนเซลล์ อัตราส่วนที่เหมาะสมของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติพัฒน์ วาริชนันท์. 2562. “สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546.” ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เจนจิรา แซ่คู และ ธรวรรณ พาณิชพัฒน์. 2560. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กในน้ำทิ้งฟาร์มสุกร และการผลิตน้ำมันจากสาหร่าย.” สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ธรรมนูญ ศรีทะวงศ์. 2550. “ผลิตพลังงานไฮโดรเจนโดยกระบวนการเร่งปฏิกิริยาเคมี.” วารสารส่งเสริมและเทคโนโลยี. 34(195) : 136-143.

บุหลัน พิทักษ์พล. 2517. “สาหร่ายสีเขียว.” รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 13 (236-241) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

มงคล งามเจริญวงษ์. 2547. “การใช้แป้งดิบเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง.” มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 122-125.

วิทวัส แจ้งเอี่ยม. 2553. “กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย.” *ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports.*

วิราวรรณ เหมันต์. 2557. “รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2557 โครงการความหลายหลายและการแพร่กระจายของสาหร่าย ในจังหวัดกาฬสินธุ์.” มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน นครราชสีมา.

สมนึก บุญพาไสว. 2549. เซลล์เชื้อเพลิง สืบค้นเมื่อ 9 เมษายน 2566. จาก http://www.ipst.ac.th/design/document/Fuel_cell.pdf.

สมรักษ์ รอดเจริญ, ชุตินุช สุจริต, และอเนกสาวะอินทร์. 2558. “การผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. TISTR 8236 โดยวิธี three-step microbial hydrogen-producing system จากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม.คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัญชลี จาละ. 2536. “การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและสีน้ำเงินแกมเขียว.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2(1), 70

อรศุภางค์ ดุรงคเสนีย์. “ผลของระยะเวลากักเก็บต่อการกำจัดไนโตรเจนจากน้ำทิ้งจากระบบผลิตก๊าซชีวภาพด้วยสาหร่าย *Chlorella* sp.ในถังปฏิกรณ์โฟโตไบโอรีแอคเตอร์แบบอากาศยกตัว.” คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อิศกฤตา โลหพรหม. 2557. “การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์.” คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี.

Appel, J. And Schulz, R. 1996. “Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)-dehydrogenase (complex I).” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1298 : 141-147.

Balat, M. 2008. “Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 33 : 4013-4029.

Bojan Tamburic. 2012. “A study of the Growth and Hydroden Production of *Chlamydomonas reinhardtii.*” Degree of Doctor of Philosophy. Imperial College London.

Chao-Fan Ji, Xing-Ju Yu, Zhao-An Chen, Song Xue, Jack Legrand and Wei Zhang. 2011. “Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo-hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*.” *International Journal of Hydrogen Energy* Volume 36, Issue 10, 5817-5821

Chen Yang, Qiang Hua and Kazuyuki Shimizu. 2000. “Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions.” *Biochemical Engineering* Journal 6. 2000. 87–102

C.J. Alexopoulos and H.C. Bold. 1967. “Algae and Fungi.” The Macmillan Company Collier-Macmillan Limited, London.

Dennis D. Wykoff, John P. Davies, Anastasios Melis, and Arthur R. Grossman. 2015. “The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Plant Physiology*, Vol. 117, 129-139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Eric M, Richard. 2000. “Photoelectrochemical hydrogen production: Proceeding the 2000.” *Hydrogen Program Review*. 1:1-14.

He Jiayi, Xi Lijun, Sun Xinzu, Ge Baosheng, Liu Dejian, Han Zhongxiang, Pu Xining and Fang Huang. 2018. “Enhanced hydrogen production through co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 and a facultative autotrophic sulfide-oxidizing bacterium under sulfurated conditions.” *Laboratory for Marine Biology and Biotechnology*. Central Universities. Shandong Province.

L. Bouaraba, A. Dautab and M. Loudiki. 2004. “Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose :effect of light and acetate gradient concentration.” *Water Research* 38. 2004. 2706–2712.

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

Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C., and Ghiradi, M. G. 2009. “Photobiological hydrogen production-prospects and challenges. *Microbe*. 4(6) : 275-280.

Posewitz MC, Dubini A, Mauser JE, Seibert M, Ghirardi ML. 2009. Hydrogenases, hydrogen production and anoxia. In Organellar and Metabolic Processes, 2ed. Edited by Stern DB. In The Chlamydomonas Sourcebook, Vol. 2. Edited by Harris EE. The Chlamydomonas Sourcebook. Vol. 2 Academic Press. 217-246.

Stanier R.Y, Kunisawa R, Mandel M. and Cohen-Bazire G. 1970. “Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales).” *Bacteriology Reviews* 35(2): 171-205

Wykoff, D.D, Davies, J.P., Melis, A. and Grossman, A.R. 1998. “The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii.*” *Plant Physiology.* 117 : 129-39.

Xenie Johnson and Jean Alric. 2012. “Interaction between Starch Breakdown, Acetate Assimilation, and Photosynthetic Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*.” *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* vol.287, 26445–26452

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP)

อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 15 กรัมต่อ 1 ลิตรของอาหาร

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

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4CL)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ 1 M Potassium phosphate

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock: 6.8 กรัม/50 มิลลิลิตร)
30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock: 8.7 กรัม/50 มิลลิลิตร)
(ปรับพีเอช 7.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

1) นับเซลล์สาหร่ายสีเขียวตำแหน่งกลางตาราง (จำนวน 25 ช่องใหญ่ ซึ่งภายช่องใหญ่จะประกอบด้วยตารางขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 400 เท่า

2) นับจำนวน 5 ช่อง ได้แก่ ช่อง 1, 2, 3, 4 และ 5 แสดงดังรูป ข แต่ละช่องมีความกว้างและความยาวเท่ากับ 0.2 มิลลิมตร และความลึกเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้น ปริมาตรสารละลายเซลล์ของแต่ละช่องเท่ากับ ความกว้าง x ความยาว x ความลึก

3) นำจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียวในช่อง 1-5 มาหาค่าเฉลี่ย และหารด้วยปริมาตรของสารละลายเซลล์แต่ละช่อง จะได้หน่วยเป็นเซลล์สาหร่ายสีเขียวต่อมิลลิลิตร

4) นับจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ตาราง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

<u>วิธีการคำนวณความหนาแน่นของเซลล์</u>

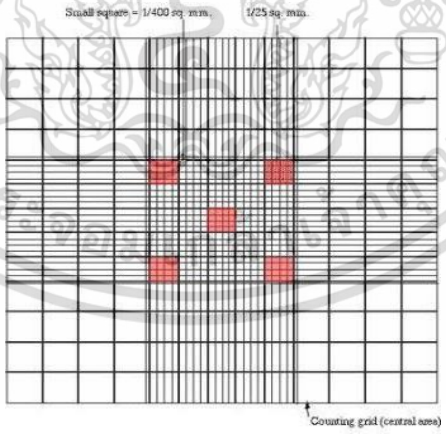
พื้นที่ 1 ช่องกลางในตารางใหญ่มีค่าเท่ากับ= 0.2 x 0.2 x 0.1 = 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ปริมาตร 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเซลล์อยู่ = A เซลล์

ปริมาตร 1,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีเซลล์อยู่ = $\frac{A \times 1000}{0.004}$

$= A \times 2.5 \times 10^{-5}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

<u>หมายเหตุ</u> : ถ้าเซลล์สาหร่ายสีเขียวทับเส้น ให้เลือกนับสาหร่ายบนเส้นแนวบนและเส้นแนวขวา ไม่นับเส้นแนวล่างและเส้นแนวซ้าย



รูป ข ตำแหน่งช่องสำหรับการนับเซลล์สาหร่ายสีเขียวบนฮีมาไซโตมิเตอร์

ที่มา : https://www.ทำเบียร์.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1) นำพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมที่ได้จากการทดลอง มาหาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนในหน่วยเปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจน (%H_2) คิดเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาร์กอนเป็นสารมาตรฐาน ตามวิธีด้านล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจน } (\%H_2) = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลอง} \times 4\%}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน}}$$

2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยเปอร์เซ็นต์ของไฮโดรเจน มาเปรียบเทียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร โดยคิดเทียบจากพื้นที่ของช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) ที่ใช้ในการทดลอง เช่น ปริมาตรของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ 100 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตรของไฮโดรเจน)} = \frac{\text{พื้นที่ของช่องว่างเหนือของเหลว} \times \text{เปอร์เซ็นต์ของ } H_2}{\text{100 มิลลิลิตร}}$$

3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาคิดเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยง 1 ลิตรหรือ 1,000 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตร ($mLH_2\ L^{-1}$)

4) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตรที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมง จะได้หน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง ($mLH_2\ L^{-1}\ h^{-1}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 19 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวโชษิตา บุญนาค รหัสนักศึกษา 62050587
นางสาวภานุมาศ ชัยปลื้ม รหัสนักศึกษา 62050636

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียว

ชื่อภาษาอังกฤษ Optimization of Hydrogen production from Green algal Co-cultivation

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 1.91 % หรือโปรแกรม Turnitin –

ลงชื่อ.....นางสาวโชษิตา บุญนาค..... ลงชื่อ.....ภานุมาศ ชัยปลื้ม.....
(นางสาวโชษิตา บุญนาค) (นางสาวภานุมาศ ชัยปลื้ม)
นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....
(รศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้