

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp. ChiW1  
โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย

HYDROGEN PRODUCTION OF UNICELLULAR GREEN ALGA  
*Chlorella* sp. CHIW1 BY CO-CULTIVATION WITH BACTERIA



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาดำเนินการตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2568

KMITL-2025-SC-M-020-023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYDROGEN PRODUCTION OF UNICELLULAR GREEN ALGA  
*Chlorella* sp. ChiW1 BY CO-CULTIVATION WITH BACTERIA



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2025

KMITL-2025-SC-M-020-023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF SCIENCE

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรีย
ชื่อนักศึกษา	นายธนิทร ศุภเกียรติกร
รหัสประจำตัว	64605050
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์

### บทคัดย่อ

ไฮโดรเจน ( $H_2$ ) เป็นพลังงานที่สะอาดและมีศักยภาพในการเผาไหม้ โดยสามารถผลิตจากสาหร่ายสีเขียว จากการคัดเลือกสายพันธุ์ *Chlorella* ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนพบว่า *Chlorella* sp. ChiW1 ซึ่งแยกได้จากนาข้าวในจังหวัดชัยนาท ประเทศไทย มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด *Chlorella* sp. ChiW1 ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตช่วงกลาง (Mid-logarithmic phase) และมีความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 2.0 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรียสามารถช่วยเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อเทียบกับสภาวะการเพาะเลี้ยงเดี่ยว โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด การเพาะเลี้ยงสาหร่ายร่วมกับแบคทีเรียทำให้งิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้น จากการลดปริมาณของออกซิเจนในระบบที่เป็นผลมาจากการใช้ออกซิเจนในการหายใจที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-acetate phosphate (TAP) ร่วมกับการเพิ่มความเข้มแสงช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงกับ *E. coli* TISTR074 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $47.06 \pm 1.95$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $1,320.63 \pm 52.33$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ หลังจากการบ่มภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 ในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย

**คำสำคัญ :** การเพาะเลี้ยงร่วมกัน, แบคทีเรีย, สาหร่ายสีเขียว, ไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Hydrogen production of unicellular green alga <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 by co-cultivation with bacteria
Student Name	Thaninthorn Supakriangkrai
Student ID	64605050
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2025
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

### Abstract

Hydrogen (H<sub>2</sub>) is a promising clean energy carrier that can be produced by green algae. In a screening for H<sub>2</sub>-producing *Chlorella* species, *Chlorella* sp. ChiW1, isolated from a rice paddy field in Chai Nat province, Thailand, exhibited the highest H<sub>2</sub> production rate and yield. *Chlorella* sp. ChiW1 in the mid-logarithmic phase, with a cell density at 750 nm of 2.0, demonstrated the highest level of H<sub>2</sub> production. Co-cultivation with bacteria further enhanced H<sub>2</sub> production compared to monocultures, particularly when co-cultivated with *E. coli* TISTR074. This enhancement was attributed to increased hydrogenase enzyme activity due to reduced oxygen levels, resulting from elevated bacterial respiration. Furthermore, the use of glycerol as a carbon source in Tris-acetate phosphate (TAP) medium, combined with increased light intensity, significantly promoted H<sub>2</sub> production. Under optimal conditions, *Chlorella* sp. ChiW1 co-cultivated with *E. coli* TISTR074 achieved a maximum H<sub>2</sub> production rate of  $47.06 \pm 1.95 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and a total H<sub>2</sub> yield of  $1320.63 \pm 52.33 \mu\text{mol H}_2 \text{ mg chl}^{-1}$  after 72 hours of anaerobic light incubation. These findings highlight the potential of *Chlorella* sp. ChiW1 as an efficient biohydrogen producer under bacterial co-cultivation conditions.

**Keywords:** Bacteria, Co-cultivation, Green algae, Hydrogen

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ที่จัดทำขึ้นนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดี จากการได้รับความอนุเคราะห์ การสนับสนุน และความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อ ในด้านการถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และกำลังใจ จากบุคคลผู้มีพระคุณต่างๆ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้และทักษะด้านต่างๆ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหา และข้อบกพร่อง และกำลังใจที่สำคัญ ในตลอดระยะเวลาทั้งหมดที่การดำเนินงานวิจัยและการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อมีความถูกต้องสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาเมตตา และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ดวงรัตน์ อินทร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภุช วรรณทกิจ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลามาทำการสอบวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนตรวจแก้ ให้คำแนะนำและแนวทางแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ นางสาวปรียานุช ศรีไพบุรณ์ นางสาวยุวดี คำแหง นางสาวจันทร์เทวา ราชเจริญ นักวิทยาศาสตร์ และนางสาวพัชรีรินทร์ ขาวสวย เจ้าหน้าที่ธุรการประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบคำแนะนำ เอื้อเฟื้ออุปกรณ์สารเคมี เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ตลอดการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณ นางสาววิญญา ครุฑพันธ์ นางสาวกชพร เสรีตระกูล นางสาวสุนิสา บันสุข นายณัฐนนท์ ชินชูศักดิ์ และนายสิทธิชัย ทองทา นักศึกษาประจำห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษาและการช่วยเหลือต่างๆ

ขอขอบพระคุณทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย หลักสูตรบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาอันมีค่านี้ ซึ่งมีส่วนสำคัญในการส่งเสริมโอกาสทางการศึกษา การพัฒนาทักษะด้านการสอนและการวิจัย ตลอดจนเป็นแรงสนับสนุนที่สำคัญยิ่งในการดำเนินงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัวของคณะผู้จัดทำที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนส่งเสริมด้านการศึกษาให้แก่คณะผู้จัดทำมาโดยตลอด

นายธนินทร ศุภเกียรติกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฅ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	6
2.2 การผลิตไฮโดรเจน	7
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลน้ำด้วยไฟฟ้า	8
2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำทางความร้อนเคมี	11
2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยพลังงานแสง	12
2.2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล	13
2.2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ	13
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน	14
2.3.1 แบคทีเรีย	14
2.3.2 ไชยาโนแบคทีเรีย	15
2.3.3 สาหร่ายสีเขียว	15
2.4 กระบวนการการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	19
2.5 เอมีไซม์ไฮโดรจีเนส	21
2.6 แบคทีเรีย	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7	ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	24
2.7.1	สภาวะการขาดแหล่งอาหารและแร่ธาตุ	24
2.7.2	แหล่งคาร์บอน (Carbon source)	26
2.7.3	อุณหภูมิ (Temperature)	26
2.7.4	แสง (Light)	27
2.7.5	ค่าพีเอช (pH)	27
2.7.6	ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	28
2.8	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	28

### บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	31
3.1.1	สาหร่ายสีเขียว	31
3.1.2	แบคทีเรีย	32
3.2	อุปกรณ์	32
3.3	อาหารเลี้ยงเชื้อ	33
3.4	สารเคมี	33
3.4.1	สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP)	33
3.4.2	สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-bertani medium (LB)	34
3.4.3	สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	34
3.4.4	สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	34
3.4.5	สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของกรดอะซิติก	34
3.5	ก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน	33
3.6	วิธีการทดลอง	33
3.6.1	การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	34
3.6.2	การวัดการเจริญเติบโต	34
3.6.3	การคัดเลือกของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	34
3.6.4	การศึกษาสภาวะของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือก	34
3.6.5	การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเพื่อการผลิตไฮโดรเจน	34
3.6.6	การศึกษาเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของไถรเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวร่วมกับแบคทีเรียเพื่อผลิตไฮโดรเจน	34
3.6.8 วิธีการวิเคราะห์ต่างๆ	41

**บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล**

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>Chlorella</i> ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน	44
4.2 ผลของอายุเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Chlorella</i> sp. ChiW1	47
4.3 การผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ต่างแตกต่างกัน	50
4.4 เมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย	50
4.5 การเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ <i>E. coli</i> ในการเพาะเลี้ยงร่วมเพื่อการผลิตไฮโดรเจน	58
4.5.1 ผลของอายุเซลล์ของแบคทีเรีย <i>E. coli</i> TISTR074 ต่อการผลิตไฮโดรเจน	58
4.5.2 ผลของอัตราส่วนโดยปริมาตรของ <i>E. coli</i> TISTR074 ต่อ <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ต่อการผลิตไฮโดรเจน	59
4.5.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>E. coli</i> TISTR074	61
4.5.4 ผลของพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>E. coli</i> TISTR07	64

**บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ**

5.1 สรุปผลการวิจัย	68
5.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>Chlorella</i> ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน	68
5.1.2 ผลของอายุเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1	68
5.1.3 การคัดเลือกชนิดและความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 เมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย	69
5.1.5 สภาพที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>E. coli</i> TISTR074	69
5.2 ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก ก	78
ภาคผนวก ข	80
ภาคผนวก ค	81
ภาคผนวก ง	83
ภาคผนวก จ	85
ภาคผนวก ฉ	85
ประวัติผู้เขียน	97



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ค่าพลังงานต่อมวลและการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของการเผาไหม้ไฮโดรเจนเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ	6
2.2 คุณสมบัติของไฮโดรเจน	7
2.3 ข้อมูลของกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	9
2.4 ข้อดีและข้อเสียของเทคโนโลยีการรีฟอร์มมิง	13
2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง แหล่งพลังงาน รวมถึงข้อดีและข้อเสียของแต่ละชนิด	17
2.6 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง แหล่งพลังงาน รวมถึงข้อดีและข้อเสียของแต่ละชนิด (ต่อ)	18
3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี	41
3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง	43
4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และปริมาณไฮโดรเจนสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ที่ผลิตได้โดย <i>Chlorella</i> sp. ที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทย โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	46
4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ของ <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ใน TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยปรับค่าความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) ตั้งแต่ 0.2 ถึง 3.0 แต่ละค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นมีจำนวนเซลล์ ( $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวม (มิลลิลิตรต่อลิตร) ที่แตกต่างกัน	48
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ของ <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 2.0 ที่การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับแบคทีเรียที่มีความหนาแน่น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของเซลล์ต่างๆ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบเดี่ยวของ <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 และแบคทีเรีย การเพาะเลี้ยงทั้งหมดถูกบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	51
4.4	อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ของ <i>Chlorella sp. ChiW1</i> ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย <i>E. coli</i> TISTR074 โดยแปรผันอัตราส่วนโดยปริมาตรของ <i>E. coli</i> TISTR074 ต่อ <i>Chlorella sp. ChiW1</i> ต่างๆ ในอาหาร TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 บ่มภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันในรูปแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) จากการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way Anova	59
ก 1	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ	79
ฉ 1	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp.</i> แต่ละชนิดที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 22 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1)	85
ฉ 2	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp.</i> แต่ละชนิดที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 22 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1)	86
ฉ 3	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp. ChiW1</i> ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)	86
ฉ 4	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp. ChiW1</i> ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)	87
ฉ 5	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp. ChiW1</i> ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)	87
ฉ 6	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella sp. ChiW1</i> ที่ความ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)	88
ฉ 7	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)	88
ฉ 8	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของการอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียความหนาแน่นเซลล์ต่างๆ (ตารางที่ 4.2)	89
ฉ 9	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียความหนาแน่นเซลล์ต่างๆ (ตารางที่ 4.2)	90
ฉ 10	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)	91
ฉ 11	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตออกซิเจนในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 กับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)	91
ฉ 12	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการสังเคราะห์แสงในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 กับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)	92
ฉ 13	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการหายใจในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 กับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)	92
ฉ 14	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอายุของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 (ตารางที่ 4.2)	93
ฉ 15	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียในอัตราส่วนต่างๆ (ตารางที่ 4.2)	93
ฉ 16	ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlorella</i> sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียในแหล่งคาร์บอนต่างๆ (ตารางที่ 4.2)	94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ฉ 17 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยง ร่วมกับแบคทีเรียที่ใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.2) 94
- ฉ 18 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยง ร่วมกับแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ค่าพีเอช ต่างๆ (ตารางที่ 4.2) 95
- ฉ 19 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยง ร่วมกับแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและบ่มที่ อุณหภูมิต่างๆ (องศาเซลเซียส) (ตารางที่ 4.2) 95
- ฉ 20 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยง ร่วมกับแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและบ่มที่ ความเข้มข้นแสงต่างๆ (ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) (ตารางที่ 4.2) 96

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไฮโดรเจน	8
2.2 หลักการทำงานของกระบวนการแยกโมเลกุลน้ำด้วยไฟฟ้าวิธีต่างๆ	11
2.3 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> ระหว่างการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic: A) และขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ (Anaerobic: B) (ATP Synthase (ATPase), Cytochrome b6f Complex (Cyt b6f), Ferredoxin (Fd), Ferredoxin-NADP Reductase (FNR), Light-Harvesting Complex (LHCII), Plastocyanin (PC), Plastoquinone (PQ), NAD(P)H-Dehydrogenase (NDH)	20
2.4 เอนไซม์ FeFe-ไฮโดรจีเนส	22
2.5 เอนไซม์ NiFe-ไฮโดรจีเนส	23
4.1 การเจริญเติบโตโดยการวัดจำนวนเซลล์และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Chlorella</i> sp. Chiw1 ที่เพาะเลี้ยงใน TAP เป็นระยะเวลาต่างๆ	48
4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงของ <i>Chlorella</i> sp. Chiw1 ภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>E. coli</i> และ <i>S. epidermidis</i> ที่ความเข้มข้น $2 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้น $2 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ <i>Chlorella</i> sp. Chiw1 ทุกกลุ่มตัวอย่างถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way Anova	54
4.3 อัตราการผลิตออกซิเจนหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงของ <i>Chlorella</i> sp. Chiw1 ภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>E. coli</i> และ <i>S. epidermidis</i> ที่ความเข้มข้น $2 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ <i>P. aeruginosa</i> ที่ความเข้มข้น $2 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ <i>Chlorella</i> sp. Chiw1 ทุกกลุ่มตัวอย่างถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way Anova	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.4 อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (A) และอัตราการหายใจในที่มืด (B) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. Chiw1 ภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* และ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้น  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *Chlorella* Sp. Chiw1 ทุกกลุ่มตัวอย่างถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way Anova 57
- 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่าง *Chlorella* sp. Chiw1 กับ *E. coli* TISTR074 ที่อายุเซลล์ต่างกัน การเพาะเลี้ยงถูกบ่มในอาหาร TAP ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way Anova) 58
- 4.5 ผลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปรับความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนให้อยู่ที่ 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (A) และผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอล (B) ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน ที่ 24 ชั่วโมงของการบ่มเพาะเชื้อร่วมระหว่าง *Chlorella* sp. Chiw1 และ *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่มีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way Anova) 62
- 4.7 การสะสม/การใช้กรดอะซิติกในระบบร่วมเพาะเชื้อระหว่าง *Chlorella* sp. Chiw1 และ *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (แบ่งสีดำ) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (แบ่งสีขาว) ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 64
- 4.8 ผลของค่าพีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) อุณหภูมิการบ่ม (B) และความเข้มแสง (C) ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดย *Chlorella* sp. Chiw1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงค่าที่มีความแตกต่างอย่าง

	มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way Anova)	66
ง 1	วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว	83
จ 1	กราฟมาตรฐานของกรดอะซีติก	84



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

พลังงานเชื้อเพลิงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ มนุษย์ใช้พลังงานในด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม การคมนาคมขนส่ง รวมถึงใช้ในชีวิตประจำวัน แหล่งพลังงานหลักที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่คือ เชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Fossil fuel) หรืออาจเรียกว่าเชื้อเพลิงจากซากดึกดำบรรพ์ (Ritchie และคณะ, 2021) เชื้อเพลิงฟอสซิลสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามสถานะ คือ 1) เชื้อเพลิงประเภทที่มีสถานะเป็นของแข็ง เช่น ถ่านหิน 2) เชื้อเพลิงประเภทที่มีสถานะเป็นของเหลว เช่น น้ำมันเชื้อเพลิงต่างๆ และ 3) เชื้อเพลิงประเภทที่มีสถานะเป็นก๊าซ เช่น ก๊าซธรรมชาติ ในปัจจุบัน เชื้อเพลิงฟอสซิลมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร รวมถึงการขยายตัวทางเศรษฐกิจ ทำให้ปริมาณและการผลิตเชื้อเพลิงไม่เพียงพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ การใช้พลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิลยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยการเผาไหม้เชื้อเพลิงเหล่านี้ก่อให้เกิดก๊าซพิษต่างๆ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO<sub>2</sub>) และก๊าซจำพวกไนโตรเจนออกไซด์ (NO<sub>x</sub>) เป็นต้น การสะสมของก๊าซเหล่านี้ในบรรยากาศโลกในปริมาณมากทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect) อันนำไปสู่การเกิดสภาวะโลกร้อน (Global warming) (Lelieveld และคณะ, 2019) ด้วยเหตุนี้ หน่วยงานต่างๆ จึงมีความพยายามค้นหาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ๆ ที่เป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แหล่งพลังงานทางเลือกในปัจจุบันนี้มีอยู่หลายประเภท เช่น พลังงานจากน้ำ พลังงานจากแสงอาทิตย์ พลังงานจากลม เป็นต้น แต่การใช้พลังงานทางเลือกเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดในด้านต่างๆ เช่น พลังงานน้ำมีปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการสร้างเขื่อน หรือ พลังงานแสงอาทิตย์และพลังงานลมมีปัญหาค่าใช้จ่ายจากการติดตั้งอุปกรณ์เซลล์และปัญหาการผลิตพลังงานที่ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ เป็นต้น ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาแหล่งพลังงานทางเลือกที่เหมาะสม มีกระบวนการผลิตพลังงานที่คุ้มค่าและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานเชื้อเพลิงชนิดอื่น การเผาไหม้พลังงานไฮโดรเจนจะให้ค่าพลังงานต่อมวลสูงสุด โดยให้พลังงาน 141.90 จูลต่อกิโลกรัม (Felseghi, 2019) การเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรเจนยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำและไม่ปลดปล่อยก๊าซพิษต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของปัญหาภาวะโลกร้อน นอกจากนี้ พลังงานไฮโดรเจน

ยังสามารถนำไปประยุกต์ในด้านต่างๆ เช่น นำไปผลิตกระแสไฟฟ้าและสามารถนำไปใช้กับงานที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลังงานกับดั้งเดิมได้ ดังนั้น พลังงานไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานที่น่าสนใจและคาดว่าจะจะเป็นพลังงานที่สำคัญในอนาคตแทนที่พลังงานดั้งเดิม ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการทางความร้อนเคมี กระบวนการทางเคมีไฟฟ้า กระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการหมักทางชีวภาพ เป็นต้น ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ได้จากการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นวัตถุดิบหลัก (Khzouz และ Gkanas, 2020) ซึ่งแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาและวิจัยการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการอื่นที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า กระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยวิธีความร้อนเคมี กระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสง และการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่ชั้นบรรยากาศ

การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยปฏิกิริยาชีวเคมีของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก สิ่งมีชีวิตที่ผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไชยาโนแบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียว เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความสนใจและมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนโดยใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงและใช้น้ำเป็นแหล่งอิเล็กตรอน นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว จากการใช้สารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทอโรโทรป สาหร่ายสีเขียวมีการกลายพันธุ์น้อยและไม่ก่อโรคร้ายแรงที่เป็นอันตรายกับร่างกายมนุษย์ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศ มาใช้ในการสร้างอินทรีย์สารจำพวกคาร์โบไฮเดรตและชีวมวลผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง อันเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศที่เป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อน

สาหร่ายสีเขียวจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ จัดอยู่ในกลุ่มคลอโรไฟตา (Chlorophyta) ซึ่งเป็นกลุ่มสาหร่ายที่พบมากที่สุด คือ มีประมาณ 9,000-12,000 สปีชีส์ (Britannica, 2022) สาหร่ายสีเขียวสามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำมีทั้งที่อยู่แบบเซลล์เดี่ยวและอยู่แบบเป็นกลุ่ม สาหร่ายสีเขียวมีคุณลักษณะทั่วไปคล้ายกับพืชชั้นสูงคือ มีผนังเซลล์สองชั้น ประกอบด้วยชั้นที่เป็นเซลลูโลสและชั้นที่เป็นเพกติน มีรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ บี ฯลฯ สาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนโดยการใช้อิเล็กตรอนที่ได้จากการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis) และการสลายคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์หรือการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวมีระบบถ่ายทอดอิเล็กตรอนคล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช กล่าวคือ เมื่อได้รับพลังงานแสง คลอโรฟิลล์ในศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (Reaction center) ที่ระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) จะกระตุ้นให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ( $O_2$ ) โปรตอน ( $H^+$ ) และอิเล็กตรอน ( $e^-$ ) อิเล็กตรอนที่ได้จะส่งไปที่ศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาที่ระบบแสงสองและจะถูกส่งต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวต่อไป โดยส่งอิเล็กตรอนผ่านพลาสโตควิโนน (Plastoquinone) ไซโทโครมคอมเพล็กซ์ (Cytochrome complex) ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ตามลำดับ เฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนให้กับโปรตอนเพื่อผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) สำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการสลายคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการย่อย คือ 1) กระบวนการสลายแป้งไปเป็นไพรูเวท โดยจะมีการสร้าง ATP และ NAD(P)H เกิดขึ้น อิเล็กตรอนจาก NAD(P)H จะส่งไปยังพลาสโตควิโนน โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์เอ็นเอดีพี/พลาสโตควิโนนออกซิโดรีดักเทส (NADPH plastoquinone oxidoreductase, NPQR) แล้วส่งอิเล็กตรอนต่อไปยังระบบแสงหนึ่ง เฟอร์รีดอกซินและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน ตามลำดับ 2) กระบวนการสลายไพรูเวทให้ได้อะซีติลโคเอ (Acetyl CoA) เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันของไพรูเวทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์ ไพรูเวทถูกเปลี่ยนเป็นอะซีติลโคเอ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวทเฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Pyruvate ferredoxin oxidoreductase, PFR) จากนั้น เฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอนและส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตเป็นไฮโดรเจนต่อไป

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว สภาพการเพาะเลี้ยง ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี และที่สำคัญที่สุด คือ ความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถสังเคราะห์แสงได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวยับยั้งที่สำคัญ (Strong inhibitor) ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น การรักษาความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบให้อยู่ในระดับต่ำและนานที่สุด จึงเป็นวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว การขาดธาตุอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว การขาดธาตุอาหารทำให้การทำงานและการซ่อมแซมของระบบแสงสองในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลงหรือถูกยับยั้งชั่วคราว ทำให้การแตกตัวของน้ำลดลง ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนในระบบลดลง เมื่อปริมาณออกซิเจนในระบบลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้ดีขึ้น ส่งผลให้ผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังมีวิธีการที่สามารถลดปริมาณออกซิเจนในระบบเพื่อกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนอื่นๆ เช่น การใช้สารรีดิวซ์ (Reducing agent) และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (Co-cultivation) เช่น แบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์อื่น งานวิจัยนี้สนใจเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียสามารถใช้ออกซิเจนที่สาหร่ายสีเขียวผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงในกระบวนการหายใจของแบคทีเรียเพื่อลดระดับความเข้มข้นของออกซิเจนให้อยู่ในระบบที่ลดลง ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) คัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวในห้องปฏิบัติการที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง
- 2) คัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกและสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจน
- 3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) คัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวในห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว Tris-Acetate-Phosphate (TAP) โดยปมในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ
- 2) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR074, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2141 และ *Staphylococcus aureus* TISTR2307 โดยแปรผันความหนาแน่นเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวที่ได้รับการคัดเลือก เพื่อให้สาหร่ายสีเขียวมีการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด จากนั้นแปรผันอายุของเซลล์แบคทีเรียและอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน วิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะและวิธีการเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว
- 3) ศึกษาความสัมพันธ์การเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายสีเขียวและแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยการวิเคราะห์กับการผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจน กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส การหายใจภายในระบบ และการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น
- 4) ศึกษาสภาวะของแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกันเพื่อส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกได้ให้สูงขึ้น เช่น ความหนาแน่นของเซลล์ อายุเซลล์ อัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียกับสาหร่ายสีเขียวในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยศึกษา 2 ปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และ ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มแสง และอุณหภูมิที่ใช้ป่ม

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวร่วมกับแบคทีเรีย
- 2) ทราบถึงสภาวะและปัจจัยที่ส่งเสริมการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวร่วมกับแบคทีเรีย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน (Hydrogen, H<sub>2</sub>) เป็นก๊าซที่ประกอบด้วยธาตุไฮโดรเจน (H) 2 อะตอม ที่เชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยโปรตอนและอิเล็กตรอนอย่างละ 1 ตัว ที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 และมีน้ำหนักอะตอมเฉลี่ย 1.0080 กรัมต่อโมล (Wieser และ Coplen, 2009) ไฮโดรเจนจัดเป็นธาตุที่เบาที่สุด พบอยู่ในสสารเกือบทุกชนิดที่อยู่ในเอกภพ แต่ในชั้นบรรยากาศของโลก พบก๊าซไฮโดรเจนเพียง 1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ก๊าซไฮโดรเจนที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐานจะมีคุณสมบัติดังนี้ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษ เป็นก๊าซที่มีความไวไฟสูง มีจุดเดือด -252.77 องศาเซลเซียส มีจุดหลอมเหลว -259.20 องศาเซลเซียส (Felseghi และคณะ, 2019) ไฮโดรเจนให้ค่าพลังงานความร้อนจากการเผาไหม้สูงถึง 141.90 จูลต่อกิโลกรัม และไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ตารางที่ 2.1) จึงถือว่าไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่สะอาดและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 2.1 ค่าพลังงานต่อมวลและการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของการเผาไหม้ไฮโดรเจนเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ (Felseghi และคณะ, 2019)

ชนิดของพลังงาน	ค่าพลังงานต่อมวล (J/kg)	ค่าพลังงานต่อปริมาตร (J/m <sup>3</sup> )	Energy Reserve Factor	การปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (kg C/kg Fuel)
ไฮโดรเจนเหลว	141.90	10.10	1.00	0.00
ก๊าซไฮโดรเจน	141.90	0.013	1.00	0.00
น้ำมันเตา	45.50	38.65	0.78	0.84
น้ำมันเบนซิน	47.40	34.85	0.76	0.86
น้ำมันเครื่องบิน	46.50	35.30	0.75	-
เมทานอล	22.30	18.10	0.23	0.50
เอทานอล	29.90	23.60	0.37	0.50
เชื้อเพลิงชีวภาพ	37.00	33.00	-	0.50
ก๊าซธรรมชาติ	50.00	0.04	0.75	0.46
ถ่านหิน	30.00	-	-	0.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

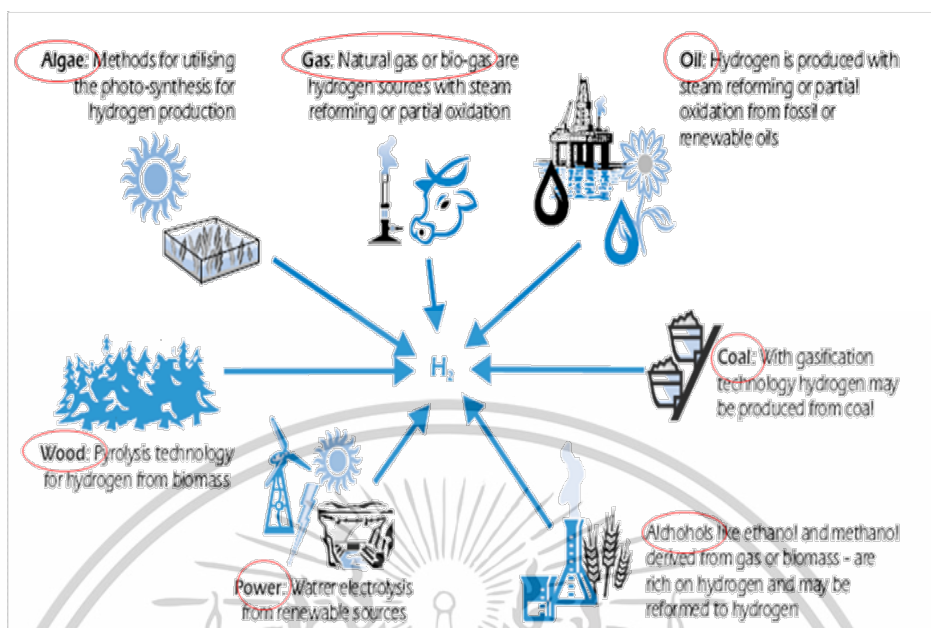
ไฮโดรเจนเป็นก๊าซไวไฟ ใช้พลังงานเพียงเล็กน้อยในการจุดไฟและการเผาไหม้ นอกจากนี้ ยังมีช่วงความสามารถในการติดไฟที่กว้าง คือ สามารถเผาไหม้ได้เมื่อในอากาศประกอบด้วยไฮโดรเจน 4 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คุณสมบัติของไฮโดรเจนแสดงดังตารางที่ 2.2 จากคุณสมบัติของไฮโดรเจน จึงสามารถนำไฮโดรเจนไปประยุกต์ใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงในการทำกิจกรรมต่างๆ ทั้งในชีวิตประจำวันและใช้ในงานด้านต่างๆ เช่น ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม เกษตรกรรม อากาศยานและยานยนต์ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์เพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานรูปแบบอื่นๆ เช่น ผลิตไฟฟ้า เป็นต้น

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของไฮโดรเจน (Felseghi และคณะ, 2019)

คุณสมบัติของไฮโดรเจน		
ความหนาแน่น	0.0838	kg/m <sup>3</sup>
ค่าพลังงานความร้อนของไฮโดรเจนในรูปของเหลว	119.90-141.90	MJ/kg
ค่าพลังงานความร้อนของไฮโดรเจนในระบบเย็นยิ่งยวด	11.89-10.05	MJ/m <sup>3</sup>
จุดเดือด	20.41	K
จุดหลอมเหลว	13.97	K
ความหนาแน่น (สถานะของเหลว)	70.8	kg/m <sup>3</sup>
การถ่ายโอนมวลในอากาศ	0.61	cm <sup>3</sup> /s
ความร้อนจำเพาะ	14.89	kJ/kg K
ขอบเขตการติดไฟในอากาศ	4-75	% (ปริมาตร)
พลังงานในการจุดติดไฟในอากาศ	0.02	Millijoule
อุณหภูมิที่ทำให้จุดติดไฟ	585	K
อุณหภูมิเปลวไฟ	2318	K
พลังงานในการระเบิด	58.823	kJ/g TNT
การแผ่รังสีของเปลวไฟ	17-25	%
ความเร็วในการเผาไหม้	2.75	cm/s

## 2.2 การผลิตไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมัน ปิโตรเลียม เป็นหลัก และสามารถผลิตได้จากแหล่งพลังงานหมุนเวียนอื่นๆ เช่น ชีวมวลและน้ำ และจากพลังงานนิวเคลียร์อีกด้วย (รูปที่ 2.1) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังสามารถผลิตได้จากกระบวนการต่างๆ ได้แก่ กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้า กระบวนการทางความร้อนเคมี และกระบวนการทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิต เป็นต้น ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากหลายกระบวนการดังนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไฮโดรเจน (IEA, 2006)

### 2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าจะใช้อิเล็กโทรดสองขั้วและผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปในน้ำเพื่อเปลี่ยนน้ำให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน วิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้ามี 3 กระบวนการ คือ (1) กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าในสารละลายต่าง (Alkaline electrolyser) (2) กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้าโดยใช้เมมเบรนแลกเปลี่ยนโปรตอน (Proton exchange membrane electrolyser, PEM) และ (3) กระบวนการแยกโมเลกุลน้ำด้วยไฟฟ้าโดยใช้สารประกอบออกไซด์ในรูปของแข็ง (Solid oxide electrolyser, SOE) ข้อมูลและสถานะของกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าในแต่ละวิธีแสดงดังตารางที่ 2.3 และหลักการของกระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้าในแต่ละวิธีแสดงในรูปที่ 2.2

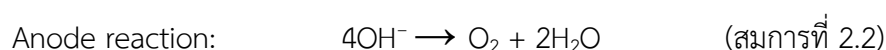
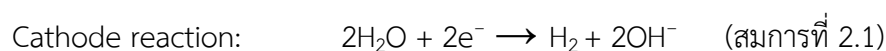
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.3** ข้อมูลของกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (El-Shafie และคณะ, 2019)

ข้อมูล	สารละลายต่าง	PEM	SOE
อุณหภูมิของเซลล์, °C	60-80	50-80	900-1000
ความดันของเซลล์, บาร์	<30	<30	<30
ความหนาแน่นกระแส, A/cm <sup>2</sup>	0.2-0.4	0.6-2.0	0.3-1.0
แรงดันไฟฟ้าของเซลล์, V	1.8-2.4	1.8-2.2	0.95-1.3
ความหนาแน่นของกำลังไฟฟ้า, W/cm <sup>2</sup>	Up to 1.0	Up to 4.4	-
ประสิทธิภาพของศักย์ไฟฟ้า, %	62-82	67-82	81-86
การใช้พลังงานจำเพาะของระบบ, kWh/Nm <sup>2</sup>	4.5-7.0	4.5-7.5	2.5-3.5
ช่วงของโพลดบางส่วน, %	20-40	0-10	-
พื้นที่ของเซลล์, m <sup>2</sup>	<4	<300	-
ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน, Nm <sup>2</sup> /hr	<760	<30	-
อายุการใช้งานของเซลล์, ชั่วโมง	<90,000	<20,000	<40,000
อายุการใช้งานของระบบ, ปี	20-30	10-20	-
ความบริสุทธิ์ของไฮโดรเจน, %	>99.8	99.999	-
ระยะเวลาเริ่มทำความเย็น, นาที	15	<15	>60

1) กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าในสารละลายต่าง

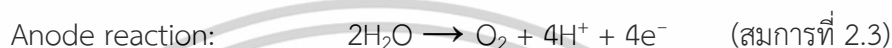
กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าในสารละลายต่าง เป็นวิธีการที่ใช้สารละลายต่างเป็นตัวกลางหรือเป็นอิเล็กโทรไลต์ สารละลายต่างแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 20-40 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก อิเล็กโทรดทั้งสองทำจากวัสดุไทเทเนียมที่มีความหนา 3 มิลลิเมตร อุณหภูมิการทำงานจึงจำกัดอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยที่ส่วนแคโทดจะแยกน้ำออกเป็นไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ (สมการที่ 2.1) จากนั้น ไฮดรอกไซด์จะถูกย้ายไปยังส่วนแอโนดเพื่อสร้างออกซิเจน (สมการที่ 2.2) กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าในสารละลายต่างมีต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำที่สุดเทียบกับกระบวนการอื่น แต่ก็มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดเช่นกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

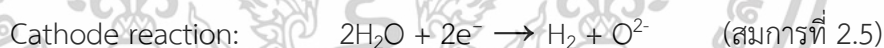
## 2) กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำโดยใช้เยื่อเลือกผ่านแลกเปลี่ยนโปรตอน

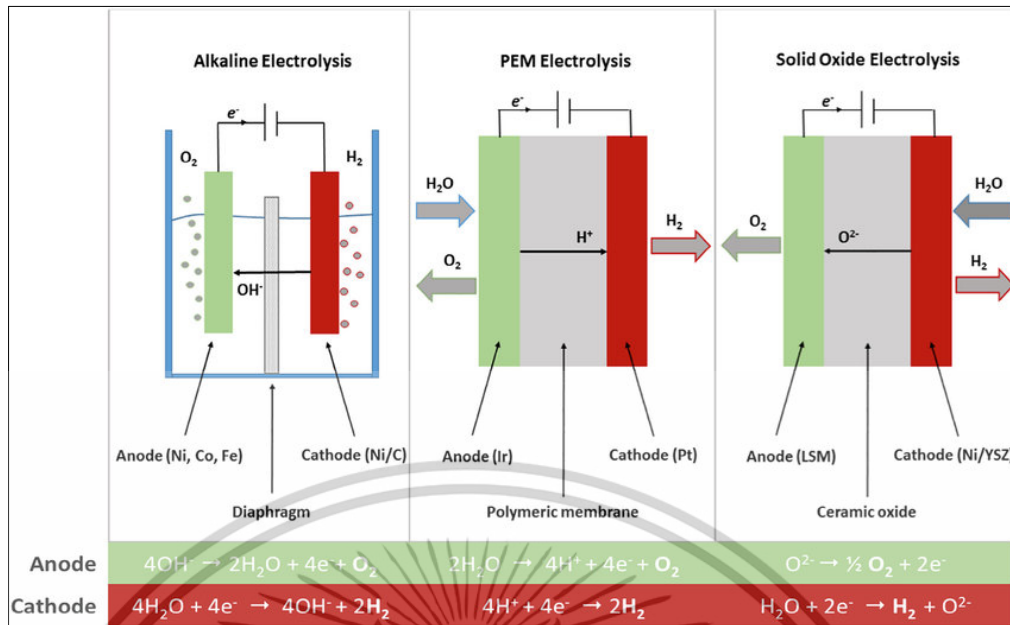
กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำโดยใช้เยื่อเลือกผ่านแลกเปลี่ยนโปรตอน เยื่อเลือกผ่านมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์รูปของแข็งที่สามารถแยกน้ำออกเป็นโปรตอน ( $H^+$ ) และอิเล็กตรอน ( $e^-$ ) ได้ วิธีการนี้จะช่วยลดปัญหาการกัดกร่อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแยกโมเลกุลน้ำด้วยไฟฟ้าในสารละลายต่าง ทำให้มีประสิทธิภาพสูงกว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำเกิดขึ้นที่ส่วนแอโนด ทำให้เกิดออกซิเจน อิเล็กตรอน และโปรตอน (สมการที่ 2.3) อิเล็กตรอนและโปรตอนจะเคลื่อนไปยังด้านแคโทดผ่าน PEM เกิดเป็นไฮโดรเจนที่ส่วนแคโทด (สมการที่ 2.4) อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ยังมีค่าใช้จ่ายที่สูงและยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาเพื่อลดปัญหาค่าใช้จ่าย



## 3) กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยสารประกอบออกไซด์แข็ง

กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยสารประกอบออกไซด์แข็งเป็นวิธีการที่ใช้โลหะออกไซด์ที่ทนความร้อนได้สูงถึง 1,000 องศาเซลเซียส เป็นตัวอิเล็กโทรไลต์และใช้พลังงานจากความร้อนแทนการใช้พลังงานไฟฟ้าในบางส่วน การเพิ่มอุณหภูมิของตัวอิเล็กโทรไลต์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการได้ กระบวนการนี้สร้างไฮโดรเจนจากน้ำที่ส่วนแคโทด (สมการที่ 2.5) และแอนไอออนของออกซิเจนจะถูกส่งไปที่ส่วนแอโนดซึ่งออกซิเจนจะก่อตัวขึ้นผ่านอิเล็กโทรไลต์ที่เป็นของแข็ง (สมการที่ 2.6) วิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธีอื่น





รูปที่ 2.2 หลักการทำงานของกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าต่างๆ (Sapountzi, 2016)

### 2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำทางความร้อนเคมี

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำทางความร้อนเคมี แบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ ดังนี้

#### 1) การแยกสลายน้ำด้วยความร้อน

การแยกสลายน้ำด้วยความร้อนใช้พลังงานความร้อนที่มีอุณหภูมิสูงในการแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง (สมการที่ 2.7) โดยต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 2,000 องศาเซลเซียส ซึ่งหมายความว่าวัสดุที่ใช้ในกระบวนการต้องทนต่ออุณหภูมิสูง ดังนั้น การศึกษาและพัฒนาในส่วนวัสดุและเทคนิคของวิธีการนี้จึงเป็นสิ่งสำคัญ



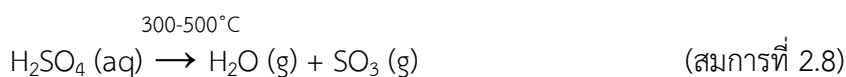
#### 2) การแยกสลายน้ำด้วยความร้อนเคมี

การแยกสลายน้ำด้วยความร้อนเคมีเป็นกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำโดยอาศัยความร้อนร่วมกับปฏิกิริยาเคมีเพื่อลดอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการให้เหลือประมาณ 900 องศาเซลเซียส การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้การแยกน้ำด้วยความร้อนและปฏิกิริยาเคมีจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีหลาย

ปฏิกิริยาที่ต่างกัน มีการศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการแยกน้ำด้วยความร้อนเคมีโดยใช้ปฏิกิริยาต่างๆ เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามแต่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนมาก เช่น กระบวนการที่ใช้คอปเปอร์-คลอรีน กระบวนการที่ใช้ซิงค์-ซิงค์ออกไซด์ กระบวนการที่ใช้นิกเกิล-แมงกานีสเฟอร์ไรต์ และกระบวนการที่ใช้ซัลเฟอร์-ไอโอดีน ตัวอย่างเช่น กระบวนการซัลเฟอร์-ไอโอดีน (สมการที่ 2.8-2.11)

ปฏิกิริยาสลายโมเลกุลกรดซัลฟิวริกเพื่อแยกน้ำ



ปฏิกิริยาสลายโมเลกุลของก๊าซซัลเฟอร์ไตรออกไซด์เพื่อแยกออกซิเจน



ปฏิกิริยาสังเคราะห์กรดซัลฟิวริกโดยการเติมก๊าซไอโอดีน



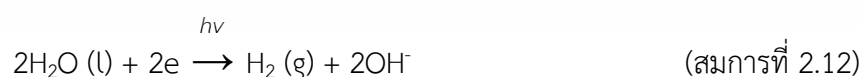
ปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน



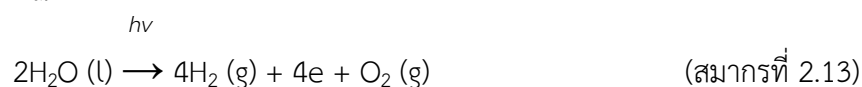
### 2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยพลังงานแสง

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยแสง เป็นกระบวนการที่ผลิตไฮโดรเจนจากพลังงานโฟตอน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ กระบวนการโฟโตคะตะลิสต์หรือกระบวนการเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง (Photocatalyst) ซึ่งเป็นการใช้สารกึ่งตัวนำเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้โมเลกุลน้ำแตกตัวออกเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน (สมการที่ 2.12-2.13) ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ เช่น ไททาเนียมออกไซด์ ( $\text{TiO}_2$ ) และการแยกน้ำด้วยกระบวนการโฟโตอิเล็กโทรไลซิส (Photoelectrolysis) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้แสงอาทิตย์ในการสร้างกระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโมเลกุลของน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน (สมการที่ 2.14)

ปฏิกิริยารีดักชัน



ปฏิกิริยาออกซิเดชัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการโฟโตอิเล็กโทรไลซิส



## 2.2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแหล่งพลังงานประเภทไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและปิโตรเลียมโดยการใช้เทคโนโลยีการรีฟอร์มมิง กระบวนการรีฟอร์มมิงสามารถแบ่งออกเป็น การรีฟอร์มด้วยไอน้ำ (Steam reforming) การออกซิเดชันบางส่วน (Partial oxidation, POX) และออโตเทอร์มัลรีฟอร์มมิง (Autothermal reforming) วิธีการนี้อาศัยความร้อนในการแยกโมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนให้ได้เป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการรีฟอร์มมิงแต่ละแบบแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ข้อดีและข้อเสียของเทคโนโลยีการรีฟอร์มมิง (El-Shafie และคณะ, 2019)

วิธีการ	ข้อดี	ข้อเสีย
การรีฟอร์มด้วยไอน้ำ (Steam reforming)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีการใช้งานทางด้านอุตสาหกรรมที่หลากหลาย</li> <li>- กระบวนการใช้อุณหภูมิต่ำที่สุด</li> <li>- อัตราส่วนผลผลิตระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์สูงสุด</li> <li>- ไม่ใช้ออกซิเจน</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ</li> </ul>
ออกซิเดชันบางส่วน (Partial oxidation : POX)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ลดกระบวนการกำจัดซัลเฟอร์</li> <li>- ไม่ใช่ตัวเร่งปฏิกิริยา</li> <li>- สูญเสียก๊าซมีเทนปริมาณน้อย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- อัตราส่วนผลผลิตระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ต่ำ</li> <li>- เพิ่มกระบวนการจัดการเขม่า</li> </ul>
ออโตเทอร์มัลรีฟอร์มมิง (Autothermal reforming)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ใช้อุณหภูมิต่ำกว่าวิธีการ POX</li> <li>- สูญเสียก๊าซมีเทนปริมาณน้อย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีข้อมูลในสถานการณ์ใช้งานทางการค้าต่ำ</li> <li>- ต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการ</li> </ul>

## 2.2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ (Biological process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมีจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับเมแทบอลิซึมของเซลล์และการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก (Fermentation) ไชยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน สำหรับสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียทั่วไปผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบ สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถใช้แหล่งวัตถุดิบได้หลากหลาย เช่น น้ำ แสงอาทิตย์ อินทรีย์และอนินทรีย์คาร์บอน อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้กับวัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้งอีกด้วย

## 2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

### 2.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง และ แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก

#### 1) แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) สามารถสังเคราะห์แสงโดยใช้สารประกอบซัลเฟอร์ ซัลไฟต์ ไทโอซัลเฟต กรดอินทรีย์หรือแหล่งคาร์บอนอื่นๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่มีการผลิตออกซิเจนเกิดขึ้นและสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยเอนไซม์ไนโตรจีเนส แบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีรงควัตถุที่สำคัญ คือ แบคทีเรียโอคโลโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) ซึ่งแตกต่างจากรงควัตถุของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) แบคทีเรียสีม่วงไม่สะสมซัลเฟอร์ (Non-sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Athiorhodeceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. (2) แบคทีเรียสีม่วงที่สะสมซัลเฟอร์ (Purple sulfur bacteria) ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. และ (3) แบคทีเรียสีเขียวที่สะสมซัลเฟอร์ (Green sulfur bacteria) ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp.

#### 2) แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก

แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Dark fermentative bacteria) สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร หรือพวกสารชีวมวลที่เป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนคาร์บอนให้เป็นไฮโดรเจนจะผ่านการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ (1) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic bacteria) เช่น *Escherichia* sp. และ *Enterobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sp. และ (2) เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่พบในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixing bacteria) เช่น *Azotobacter* sp. และ *Klebsiella* sp. (Basak และ Das, 2007)

### 2.3.2 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่จัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) ไซยาโนแบคทีเรียมีระบบแสง 2 ระบบ และมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดคลอโรฟิลล์เหมือนกับสาหร่ายสีเขียวและพืช ไซยาโนแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว (Unicellular cyanobacteria) ซึ่งไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ และ ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย (Filamentous cyanobacteria) ซึ่งพบทั้งชนิดที่ตรึงและไม่ตรึงไนโตรเจน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วย (1) เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (2) เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนที่ผลิตจากการตรึงไนโตรเจนไปเป็นโปรตอน และ (3) เอนไซม์ไบไดเรกชันนอลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน เอนไซม์นี้สามารถพบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป (Tamagnini และคณะ, 2002)

### 2.3.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Division Chlorophyta) เป็นกลุ่มสาหร่ายกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด คือ มีประมาณ 8,000 สปีชีส์ ภายในคลอโรพลาสต์ มีรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์ เอ และ บี จำนวนมาก ทำให้บดบังรงควัตถุอื่นๆ ไว้ นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุแคโรทีนอยด์และแซนโทฟิลล์อีกหลายชนิด สาหร่ายสีเขียวสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและสามารถเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มแสง และความสมบูรณ์ของอาหาร สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นสาหร่ายน้ำจืด ส่วนสาหร่ายอีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นสาหร่ายทะเล โดยมักจะพบบริเวณน้ำตื้นแนวชายฝั่ง

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างที่หลากหลาย ได้แก่ เซลล์เรียงตัวเป็นสาย (Filamentous body) เช่น *Ulothrix* sp. เซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ (Motile colony) เช่น *Chlamydomonas* sp. เซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (Non-motile colony) เช่น *Chlorella* sp. เซลล์เรียงตัวเป็นแผ่น (Membranous body) เซลล์มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อพาราไคนิม (Parenchymatous body) และเซลล์มีลักษณะเป็นท่อหรือเป็นถุง (Siphonous body) ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น ผนัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ชั้นในประกอบด้วยเซลลูโลส (Cellulose) และผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยเพคติน (Pectin) แต่บางชนิดจะมีผนังเซลล์ชั้นนอกที่ประกอบด้วยสารจำพวกไคติน (Chitin) หรือสปอโรโพลีนิน (Sporopollenin) ส่วนสาหร่ายสีเขียวที่ไม่มีผนังเซลล์จะมีเยื่อหุ้มเซลล์เพลลิเคิล (Pellicle) สาหร่ายสีเขียวสะสมอาหารในรูปของแป้งที่ประกอบไปด้วยอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ในไพเรินอยด์ (Pyrenoid) หากสาหร่ายสีเขียวไม่มีไพเรินอยด์ จะสะสมอาหารในรูปของน้ำมัน

สาหร่ายสีเขียวมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photohydrogen production) แต่ออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวมีการผลิตไฮโดรเจนลดลง กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนในระบบ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียวมีความไวต่อออกซิเจน ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวมักจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน ในปัจจุบัน มีความสนใจนำเอาสาหร่ายสีเขียวมาผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป สามารถเพาะเลี้ยงในน้ำเสียได้ จึงทำให้สามารถลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยง การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ ชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง แหล่งพลังงาน รวมถึงข้อดีและข้อเสียของการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง แหล่งพลังงาน รวมถึงข้อดีและข้อเสียของแต่ละชนิด (Das และ Veziroglu, 2001; Basak และ Das, 2007)

กลุ่มของจุลินทรีย์	จีโนมของจุลินทรีย์	เอนไซม์	แหล่งพลังงาน	ข้อดี	ข้อเสีย
สาหร่ายสีเขียว	<i>Chlamydomonas</i> <i>Chlorella</i>	ไฮโดรจีเนส	น้ำ แสง	- สามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำและพลังงานแสง	- ออกซิเจนที่เกิดการกระบวนการสังเคราะห์แสงสามารถยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน
ไซยาโนแบคทีเรีย	<i>Anabaena</i> <i>Oscillatoria</i>	ไฮโดรจีเนส และ ไนโตรจีเนส	น้ำ แสง	- สามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำและพลังงานแสง - สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้	- ออกซิเจนที่เกิดการกระบวนการสังเคราะห์แสงสามารถยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน

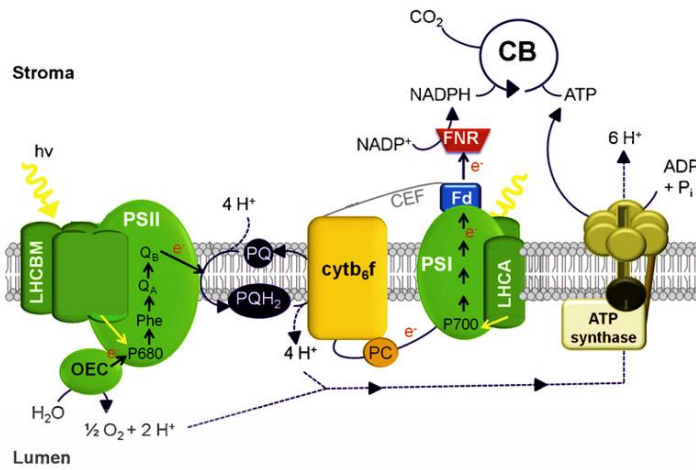
ตารางที่ 2.6 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง แหล่งพลังงาน รวมถึงข้อดีและข้อเสียของแต่ละชนิด (Das และ Veziroglu, 2001; Basak และ Das, 2007) (ต่อ)

กลุ่มของจุลินทรีย์	จีโนมของจุลินทรีย์	เอนไซม์	แหล่งพลังงาน	ข้อดี	ข้อเสีย
แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสง	<i>Rhodobacter</i> <i>Rhodospirillum</i> <i>Chromatium</i>	ไนโตรจีเนส	แสง	- สามารถใช้น้ำเสีย โปรตีน เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน	- ต้องการแสงในการผลิตไฮโดรเจน - กระบวนการหมักของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอาจทำให้เกิดปัญหาน้ำเสียได้
แบคทีเรียที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน	<i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Methanobacterium</i>	ไฮโดรจีเนส	อินทรีย์คาร์บอน	- สามารถผลิตไฮโดรเจนในที่ไม่มีแสง - สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เช่น แป้ง ซูโครส ไฮโลส ได้ผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเป็นกรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดแลคติก เป็นต้น	- การผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมักจะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

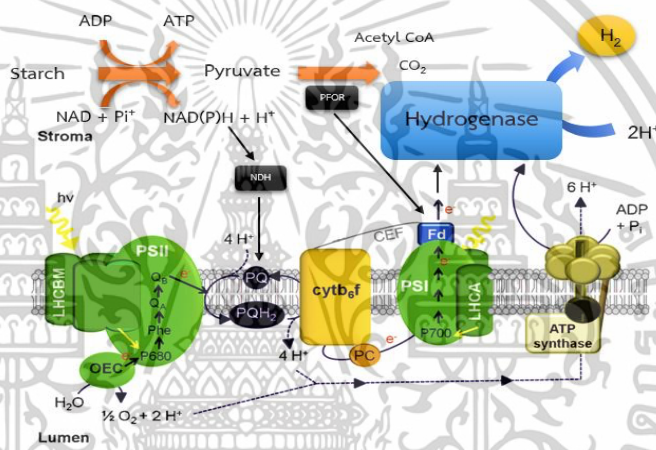
## 2.4 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวถูกพบครั้งแรกในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* โดยพบว่า *S. obliquus* สามารถผลิตไฮโดรเจนเป็นเวลาต่อเนื่องหลายชั่วโมง เมื่อชักนำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด แต่ปริมาณไฮโดรเจนยังค่อนข้างต่ำและสาหร่ายมีช่วงชีวิตที่สั้น (Gaffron, 1939) สารตั้งต้นของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว คือ แสง และน้ำ กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวจะใช้พลังงานแสงในช่วงคลื่นที่เรียกว่า Photosynthetically active radiation (PAR) ซึ่งมีความยาวคลื่นแสงระหว่าง 400-700 นาโนเมตร สาหร่ายสีเขียวมีระบบแสงในการสังเคราะห์แสง 2 ระบบ คือ ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) และระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของคลอโรฟิลล์ในระบบแสงหนึ่งจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เรียกระบบแสงนี้ว่า P700 และในระบบแสงสองดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เรียกระบบแสงนี้ว่า P680 ระบบแสงทั้งสองจะทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสง เปลี่ยนเป็นพลังงานเคมีเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายเกิดขึ้นเมื่อระบบแสงสองได้รับพลังงานแสง พลังงานแสงจะกระตุ้นให้อิเล็กตรอนในศูนย์กลางของระบบแสงสองในคลอโรฟิลล์หลุดออกไปต่อมา เมื่อน้ำเกิดการแตกตัว (Water splitting) ได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำจะเข้าไปแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดออกจากระบบแสงสอง ซึ่งอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองจะถูกส่งผ่านไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone, PQ) ในขณะเดียวกัน โปรตอนก็จะถูกขนส่งมายังพลาสโตควิโนนพร้อมกับอิเล็กตรอน โดยโปรตอนจะมาจากสโตรมาซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตอนต่ำ (Low  $H^+$ ) ไปยังลูเมนที่มีความเข้มข้นของโปรตอนสูงกว่า (High  $H^+$ ) และถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมบี 6 เอฟ (Cytochrome b6f, Cyt b6f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin, PC) และเข้าสู่ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) ตามลำดับ (รูปที่ 2.3 (A))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A)



(B)

รูปที่ 2.3 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ระหว่างการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic: A) และขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ (Anaerobic: B) (ATP Synthase (ATPase), Cytochrome B6F Complex (cytb<sub>6</sub>f), Ferredoxin (Fd), Ferredoxin-NADP Reductase (FNR), Light-Harvesting Complex (LHCII), Plastocyanin (PC), Plastoquinone (PQ), NAD(P)H-Dehydrogenase (NDH)) (Hemschemeier และคณะ, 2009)

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะพิเศษ (รูปที่ 2.3 (B)) เช่น สภาวะที่ปราศจากอากาศ หรือสภาวะที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ในอาหาร เป็นต้น สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้จาก 3 กระบวนการ ดังนี้ (1) การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis) (2) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis) และ (3) การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark fermentation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง เกิดขึ้นเมื่อ ศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาระบบแสงสองได้รับพลังงานแสง เกิดกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดๆ ไป จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin, Fd) เฟอร์รีดอกซินจะส่งอิเล็กตรอนให้กับโปรตอนเพื่อผลิตเป็นไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการแตกตัวของน้ำ โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง ส่วนการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม แหล่งอิเล็กตรอนส่วนใหญ่ได้มาจากการสลายตัวของแป้ง (Starch degradation) อิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ที่ได้จากการสลายตัวของแป้งถูกขนส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน ระบบแสงหนึ่ง เฟอร์รีดอกซินและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ตามลำดับ และกระบวนการสุดท้าย คือ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง กระบวนการนี้เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไพรูเวท ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของน้ำตาลกลูโคสหรือแป้ง ไพรูเวทถูกย่อยสลายได้อะซีติลโคเอและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยเอนไซม์ไพรูเวทเฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส จากนั้น เฟอร์รีดอกซินจะรับอิเล็กตรอนที่ได้จากการสลายไพรูเวท และส่งต่ออิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.3 (B))

## 2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันแบบย้อนกลับของโมเลกุลไฮโดรเจนหรือโปรตอน (สมการที่ 2.15) ปฏิกิริยาสามารถผันกลับได้เนื่องจากมีค่า  $\Delta G_0$  ต่ำ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ในแบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียว

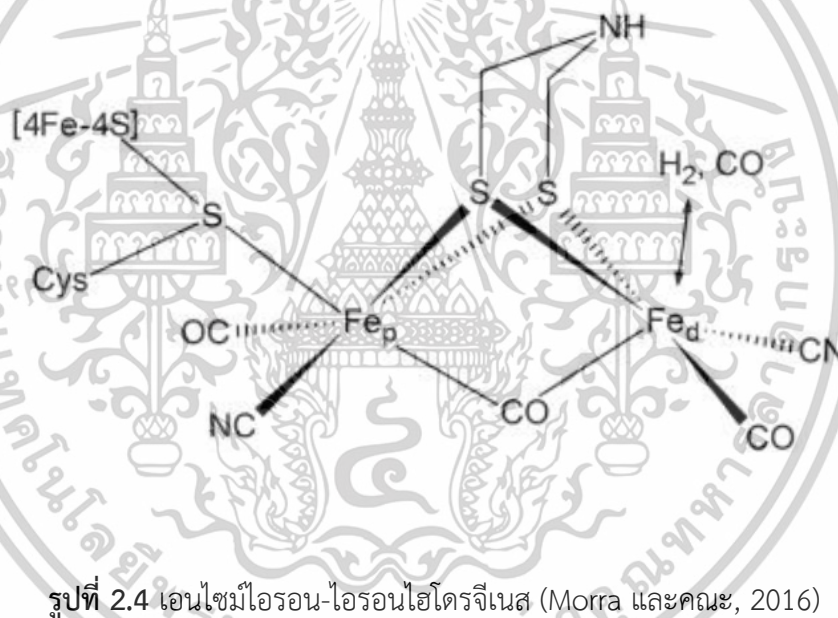


การค้นพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสครั้งแรกเกิดขึ้นในช่วงทศวรรษที่ 1930 และนับตั้งแต่นั้นมา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็ได้รับความสนใจในงานวิจัยด้านต่างๆ จำนวนมาก รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับพลังงาน ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกออกเป็น 3 ประเภท โดยพิจารณาจากโลหะที่บริเวณเร่ง (Active site) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. ไอรอน-ไอรอนไฮโดรจีเนส

ไอรอน-ไอรอนไฮโดรจีเนส (Iron-iron hydrogenase หรือ FeFe-ไฮโดรจีเนส) เป็นเอนไซม์ที่มีเหล็ก 2 โมเลกุลอยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบในจีโนมของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต เช่น สาหร่ายสีเขียว แบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Clostridium pasteurianum* และ *Megasphaera elsdenii* แต่ไม่พบในอาร์เคียแบคทีเรีย เอนไซม์ FeFe-ไฮโดรจีเนสประกอบด้วยเหล็ก-ซัลเฟอร์ 2 กลุ่ม คือ [2Fe-2S] และ [4Fe-4S] โดยมีซัลเฟอร์ที่จับกับกรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นตัวกลางเชื่อมระหว่าง 2 กลุ่มนี้ นอกจากนี้ อะตอมของเหล็กที่อยู่บริเวณศูนย์กลางของเอนไซม์ยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) (รูปที่ 2.4) เอนไซม์ FeFe-ไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไฮโดรเจน จึงได้รับความสนใจอย่างมาก อีกทั้งยังมีการสังเคราะห์ตัวเร่งปฏิกิริยาเทียมที่เลียนแบบคุณสมบัติตามธรรมชาติของ FeFe-ไฮโดรจีเนสอีกด้วย

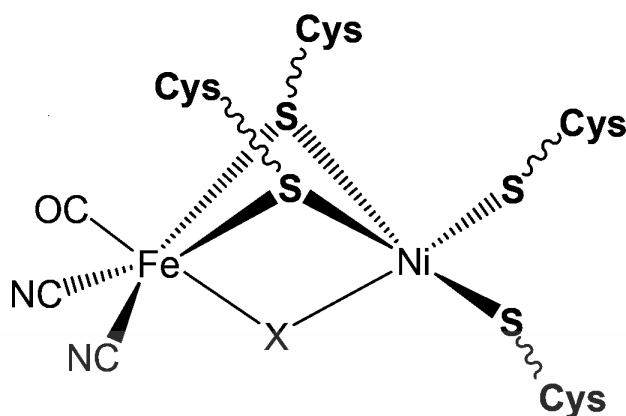


รูปที่ 2.4 เอนไซม์ไอรอน-ไอรอนไฮโดรจีเนส (Morra และคณะ, 2016)

## 2. นิกเกิล-ไอรอนไฮโดรจีเนส

นิกเกิล-ไอรอนไฮโดรจีเนส (Nickel-iron hydrogenase หรือ NiFe-ไฮโดรจีเนส) มีนิกเกิลและเหล็กอะตอมอยู่ในบริเวณเร่ง (รูปที่ 2.5) เอนไซม์นี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วยโปรตีน 5 หน่วยย่อย ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้เป็นเอนไซม์ 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกันคือ (1) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ประกอบด้วยโปรตีน HoxH ซึ่งเป็นที่อยู่ของอะตอมของเหล็กและนิกเกิล และโปรตีน HoxY ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของ [4Fe-4S] และ (2) เอนไซม์ไดอะพอเรส (Diaphorase) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxF, HoxU และ HoxE ที่ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 เอนไซม์นิกเกิล-ไอรอนไฮโดรจีเนส (Ghumaan และ Stein, 2019)

### 3. เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ปราศจากโลหะ

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ปราศจากโลหะ (Metal-free hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่ไม่พบองค์ประกอบของโมเลกุลของโลหะในบริเวณเร่ง สามารถพบในสิ่งมีชีวิตพวกแบคทีเรียอาร์เคียที่จัดอยู่ในกลุ่มเมทาโนเจน (Methanogenic archae) ซึ่งเอนไซม์นี้จะมีกลไกพื้นฐานและวิธีการส่งอิเล็กตรอนไปยังบริเวณที่แตกต่างไปจากเอนไซม์ 2 ชนิด ที่กล่าวไปข้างต้น

### 2.6 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่อาศัยอยู่ในเกือบทุกสภาพแวดล้อมบนโลก ตั้งแต่ช่องระบายอากาศ ใต้ท้องทะเลลึก ส่วนลึกใต้พื้นผิวโลก ไปจนถึงทางเดินอาหารของมนุษย์ แบคทีเรียไม่มีนิวเคลียสและโครงสร้างภายในอื่นๆ ดังนั้น จึงจัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า โปรคาริโอต แบคทีเรียประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด คือ แบคทีเรียและอาร์เคียแบคทีเรีย แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความยาวประมาณ 0.5–5.0 ไมโครเมตร มีรูปร่างที่หลากหลาย ตั้งแต่ทรงกลมไปจนถึงแท่งและเกลียว แบคทีเรียหลายสปีชีส์ดำรงชีวิตในรูปแบบเซลล์เดี่ยว บางสปีชีส์อาศัยอยู่รวมกันเป็นแบบแผนที่มีลักษณะเฉพาะ เช่น *Neisseria* ที่อยู่เป็นดิพลอยด์ (คู่) *Streptococcus* อยู่รวมกันเป็นสายยาว และ *Staphylococcus* เกาะกลุ่มกันเป็นกระจุกคล้ายพวงองุ่น แบคทีเรียยังสามารถรวมกันเพื่อสร้างโครงสร้างหลายเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ ดังการต่อสายพิลามেন্টของ Actinobacteria, การเกาะกลุ่มของ Myxobacteria และเส้นใยไฮฟาที่ซับซ้อนของ Streptomyces แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่ปรากฏขึ้นบนโลกอันดับต้นๆ เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีมานาน เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับแหล่งที่อยู่อาศัยของระบบนิเวศต่างๆ ได้ อีกทั้งยังมีความสามารถในการเกิดเมแทบอลิซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิซิมที่หลากหลาย สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์เกือบทุกชนิด และสารประกอบอนินทรีย์บางชนิด เป็นแหล่งอาหาร แบคทีเรียสามารถจัดจำแนกตามกลุ่มของแหล่งพลังงาน ตัวให้อิเล็กตรอน และ แหล่งของคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญเติบโต แบคทีเรียบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ สัตว์ หรือพืชได้ แต่ส่วนใหญ่ไม่มีอันตรายและเป็นประโยชน์ในทางนิเวศวิทยา แบคทีเรียบางชนิดมีรูปแบบ การอยู่ร่วมกับแบบซิมไบโอซิสกับสิ่งมีชีวิตอื่น (Rogers, 2020) โดยมีหน้าที่สำคัญต่างกันไปตามคู่ของ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยร่วมกัน เช่น การตรึงไนโตรเจนและการเสื่อมสภาพของเซลล์ูลอส เป็นต้น

ถ้าหากปราศจากแบคทีเรีย ดินจะไม่มี ความอุดมสมบูรณ์และสิ่ง ที่ตายแล้วจะเกิดการย่อย สลายตัวช้า ในปัจจุบัน มีการนำแบคทีเรียบางชนิดได้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านต่างๆ เช่น ด้านอาหาร สารเคมี และยาปฏิชีวนะ การศึกษาความสัมพันธ์และการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียใน ด้านต่างๆ รวมถึงการพัฒนาเทคโนโลยีด้านพลังงาน

## 2.7 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

### 2.7.1 สถานะการขาดแหล่งอาหารและแร่ธาตุ

การขาดแหล่งอาหารและแร่ธาตุชนิดต่างๆ มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว ดังนี้

#### 1) สถานะการขาดแหล่งซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์ถือได้ว่าเป็นมีความสำคัญต่อกระบวนการการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเป็น อย่างมาก เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนซิสเทอีนและเมไทโอนีน โดย กรดอะมิโนทั้งสองชนิดเป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนทุกชนิด และ หนึ่งในนั้นคือ โปรตีน D1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในศูนย์กลางของระบบแสงสอง (Reaction center) เมื่อ บ่มเซลล์สาหร่ายภายใต้สถานะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมในระบบแสงสอง (Wykoff และคณะ, 1998) โดยจะไปยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองแบบ ชั่วคราว เมื่อระบบแสงสองถูกยับยั้ง อัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวจะลดลง และ กระบวนการสร้างออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำก็จะลดลงตามไปด้วย ออกซิเจนที่ผลิตขึ้นจะถูก นำไปใช้ในกระบวนการหายใจไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial respiration) เมื่อออกซิเจนที่ เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงน้อยกว่าออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ เซลล์จะเข้าสู่สถานะที่ปราศจากออกซิเจน (Anaerobiosis) และเกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Melis และคณะ, 2000) นอกจากนี้ เซลล์ของ สาหร่ายยังสามารถสะสมแป้งภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 8 ถึง 10 เท่า ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการขาด แหล่งซัลเฟอร์ และในระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจน เซลล์ของสาหร่ายจะสลายแป้งเพื่อใช้เป็น แหล่งของอิเล็กตรอนสำหรับผลิตไฮโดรเจนต่อไป (Zhang และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2) สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนถือได้ว่าเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนทุกชนิดในสิ่งมีชีวิต รวมถึงไนโตรเจนยังเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์อีกด้วย การขาดแหล่งไนโตรเจนทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์หลายประการ คือ (1) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ (Gametes) (2) การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของระบบแสงสอง คือ มีการเสถียรภาพของไซโตโครมบี 6 เอฟ (Cytochrome b<sub>6</sub>f complex) เมื่อไซโตโครมบี 6 เอฟ เสถียรภาพไป จะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นในระบบแสงสองน้อยลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลระหว่างปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง และปริมาณออกซิเจนที่ใช้ไปในกิจกรรมการหายใจของเซลล์ (3) การทำงานของเอนไซม์ Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase (Rubisco) ลดลง และ (4) มีการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ NADH-PQ oxidoreductase (Peltier และ Schmidt, 1991) นอกจากนี้ การขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง จะส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายเกิดการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น (Herzing และ Falkowski, 1989) (Peltier และ Schmidt, 1991) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากเซลล์จะสลายแป้งเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

## 3) สภาวะการขาดแหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง การหายใจ และการแบ่งเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกและสารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ซึ่งมีบทบาทความสำคัญในการถ่ายทอดพลังงานภายในเซลล์ รวมถึงฟอสฟอรัสยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์สำหรับการสังเคราะห์แหล่งพลังงาน คือ อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate หรือ ATP) ให้แก่เซลล์ ดังนั้น เมื่อขาดฟอสฟอรัสจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Moseley และคณะ, 2009) นอกจากนี้ การขาดแหล่งฟอสฟอรัสทำให้การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่สำคัญในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) ลดลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการขนส่งของอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงสองเช่นเดียวกับการขาดแหล่งซัลเฟอร์ โดยอิเล็กตรอนจากตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก Q<sub>A</sub> (Primary quinone acceptor) จะไม่ส่งอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป Q<sub>B</sub> (Secondary quinone acceptor) (Chylla และ Whitmarsh, 1989) แต่ในระบบแสงหนึ่งยังคงมีการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อผลิตเป็นพลังงานให้แก่เซลล์

#### 4) สภาวะการขาดแหล่งโพแทสเซียม

โพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอนไซม์และโปรตีนในสิ่งมีชีวิต สามารถพบโพแทสเซียมได้โดยทั่วไปบนพื้นผิวโลก ในดิน และในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Khound และคณะ, 2012) โพแทสเซียมไอออน ( $K^+$ ) ทำหน้าที่ช่วยควบคุมแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ (Haschke และ Lüttge, 1975) และควบคุมการเปิดปิดของปากใบในพืช (Humble และ Hsiao, 1970) และมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนของพืชและสาหร่าย (Leigh และ Jones, 1984) (Memon และคณะ, 1985) การขาดโพแทสเซียมในอาหารมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลง เนื่องจากโปรตีน D1 ที่อยู่บริเวณศูนย์กลางเกิดปฏิกิริยาไม่ถูกสังเคราะห์ และระบบแสงสองช่องแชนแนลตัวเองไม่ได้ ทำให้ปริมาณของอิเล็กตรอน โปรตอน และออกซิเจนลดลง นอกจากนี้ การสังเคราะห์แสงและอัตราการผลิตพลังงาน ATP ลดลง ทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตลดลง (Munson, 1985) ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตขาดซีสเตรตในการดำเนินปฏิกิริยา ดังนั้น การสะสมแป้งจึงลดลง นอกจากนี้ การขาดโพแทสเซียมยังทำให้มีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงได้รับอิเล็กตรอนจากการสลายแป้งเป็นหลัก และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจน ทำให้มีการเหนี่ยวนำเอนไซม์ไฮโดรจีเนสให้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (Papazi และคณะ, 2014)

#### 2.7.2 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว โดยเซลล์สาหร่ายสีเขียวจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศและนำเข้าวัฏจักรเคลวิน (Calvin cycle) เพื่อผลิตคาร์โบไฮเดรต เมื่อนำสาหร่ายสีเขียวมาเหนี่ยวนำให้ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ คาร์โบไฮเดรตที่สะสมจะถูกสลายเพื่อใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน แหล่งคาร์บอนที่สาหร่ายสีเขียวสามารถนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ สารอินทรีย์คาร์บอน เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และกรดคาร์บอนิก และสารอินทรีย์คาร์บอน เช่น กรดมาลิก กรดอะซีติก กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส มอลโทส แมนนิทอล แล็กโทส อะซีเตท และสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น อะซีเตท ที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหายใจของสาหร่าย ทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศ จึงส่งผลให้เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Melis และคณะ, 2000)

#### 2.7.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิถือเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว โดยทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายอยู่ระหว่าง 10 ถึง 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะทำให้ อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงอย่างรวดเร็ว เพราะเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase รวมถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะเสียสภาพ การทำงานของระบบแสงสองจะถูกยับยั้ง เนื่องจากระบบแสงสองมีความไวต่ออุณหภูมิสูงเช่นกัน ทำให้อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองไม่ถูกถ่ายทอดไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Salvucci และ Brandner, 2004) ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนยังขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายสีเขียวอีกด้วย

#### 2.7.4 แสง

สาหร่ายสีเขียวจำเป็นต้องใช้แสงในการเจริญเติบโต ซึ่งในระหว่างการเจริญเติบโต เซลล์จะนำแสงมาใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสะสมคาร์โบไฮเดรต รวมถึงแสงยังมีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนอีกด้วย ในกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียวจะดูดซับพลังงานแสงและเปลี่ยนเป็นพลังงานในรูป ATP เพื่อใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจะทำการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ไปเป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการผลิตชีวมวล เมื่อมีน้ำตาลในปริมาณที่มากพอ เซลล์สาหร่ายสีเขียวจะเก็บสะสมน้ำตาลในรูปของแป้ง ปริมาณแสงที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ถ้าความเข้มแสงมากเกินไป จะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของระบบแสงสองจากการสร้างออกซิเจนที่มากขึ้นและส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนลดลง (Laurinavichene และคณะ, 2004) การผลิตออกซิเจนและอัตราการสังเคราะห์แสงจะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายและความเข้มแสง

#### 2.7.5 พีเอช

ค่าพีเอช (pH) หรือค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเพาะเลี้ยง มีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชทำให้เมแทบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียวเปลี่ยนแปลงไปและมีผลต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ ในระยะเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง ค่าพีเอชของอาหารจะลดลง เนื่องจากสาหร่ายจะสร้างกรดคาร์บอนิกที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ภายหลังกการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-3 วัน ค่าพีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากระหว่างการเจริญเติบโต สาหร่ายจะใช้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เมื่ออะซิเตทถูกสลายจะได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นไฮดรอกไซด์ (OH<sup>-</sup>) จึงทำให้ค่าพีเอชของอาหารมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น พีเอชของอาหารจึงเพิ่มขึ้น (Kosourov และคณะ, 2003) โดยทั่วไป สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชในช่วง 5-9 (Song และคณะ, 2011) ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* จะอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง คือ 7.2-7.7 (Kosourov และคณะ, 2003) แต่ค่าพีเอชที่ต่ำกว่า 5.0 จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.7.6 ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ความไวต่อออกซิเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ FeFe-hydrogenase มีความไวต่อออกซิเจน เมื่อออกซิเจนมาจับอะตอมของเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมอย่างมีนัยสำคัญ (Cohen และคณะ, 2005) นอกจากนี้ การปรับเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศจะช่วยเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามวิธีการกำจัดออกซิเจนบางวิธีไม่คุ้มค่าต่อการผลิตไฮโดรเจน เช่น การใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซเฉื่อยเนื่องจากก๊าซฮีเลียมมีราคาสูง เป็นต้น ในปัจจุบัน ได้มีการคิดค้นวิธีการทำให้เกิดสภาวะปราศจากอากาศ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ (Melis และคณะ, 2000)

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Pongpadung และคณะ (2015) ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์สีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดธาตุซัลเฟอร์ (S) การจำกัดปริมาณไนโตรเจน (N) พร้อมกับการขาดธาตุซัลเฟอร์และการจำกัดปริมาณไนโตรเจนพร้อมกันกับการขาดธาตุฟอสฟอรัส (P) และการระบุชนิดของสายพันธุ์เขียวศึกษาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ 18S rDNA และ ITS จากการทดลองพบว่า *Chlorella lewinii*, *Micractinium* sp., *Coelastrella* sp., และ *Monoraphidium* sp. มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง จากการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนด้วยการจำกัดปริมาณของไนโตรเจนพบว่า *Chlorella* บางสายพันธุ์ และ *Chlamydomonas* ทุกสายพันธุ์สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น แต่ไม่สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์ *Coelastrella*, *Micractinium* หรือ *Scenedesmus* ได้

Alalayah และคณะ (2017) ศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเคมีระหว่างอัตราการย่อยสลายกลูโคสและอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสายพันธุ์สีเขียว *Chlorella vulgaris* โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bold's basal culture (BBC) พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยพบว่าสายพันธุ์เขียวผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.85 โมล อัตราการผลิตไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับอัตราการลดลงของกลูโคส โดยมีค่าคงที่ของอัตราการใช้กลูโคสเท่ากับ  $7.037 \times 10^2$  ต่อวินาที และมีค่าคงที่ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $3.890 \times 10^2$  ต่อวินาที

He และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสายพันธุ์เขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียออกโตโทรฟที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการออกซิไดส์ซัลเฟอร์ *Thiomonas intermedia* BCRC 17547 จากการทดลองพบการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันภายใต้สภาวะการขาดธาตุอาหารซัลเฟอร์ โดยผลิตไฮโดรเจนได้ 122 มิลลิโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อใช้อัตราส่วนปริมาตรของสาหร่ายต่อแบคทีเรียเป็น 60:1 โดยมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสาหร่ายอย่างเดียว 2.8 เท่า การเติมสารโซเดียมไทโอซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 255 มิลลิโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งสูงกว่าเมื่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพียงอย่างเดียวและเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันโดยไม่มีสารโซเดียมไทโอซัลเฟตถึง 5.9 และ 2.1 เท่า ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงร่วมกันภายใต้สภาวะการเพิ่มซัลเฟอร์ยังช่วยเพิ่มการผลิตชีวมวล อัตราการหายใจ ปริมาณการสะสมของแป้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอย่างมีนัยสำคัญ และการเติมสารโซเดียมไทโอซัลเฟตสามารถทำให้การผลิตไฮโดรเจนดำเนินได้อย่างต่อเนื่องเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *C. reinhardtii* CC-503 และแบคทีเรีย BCRC17547 เป็นวิธีการที่คุ้มค่าสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ

Fakhimi และคณะ (2019) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย พบว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ร่วมกับแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* โดยผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 40.8 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* จะผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 35.1 มิลลิลิตรต่อลิตร และเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Rhizobium etli* จะผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 16.1 มิลลิลิตรต่อลิตร การผลิตไฮโดรเจนโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันนี้ไม่เพียงจะเชื่อมโยงกับการชักนำให้เกิดภาวะการขาดออกซิเจนเท่านั้น แต่ยังเชื่อมโยงกับความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตกรดอะซิติกจากน้ำตาล การส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนทำได้โดยการผสมผสานระหว่างการสังเคราะห์แสงและการหมักในการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *C. reinhardtii* และ *E. coli* ที่มีสารตั้งต้นเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 60 เปอร์เซ็นต์

Javed และคณะ (2022) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ในระบบ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ทำให้แบคทีเรียใช้ออกซิเจนที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว แบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนนี้ทำให้การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น จากการนำแบคทีเรียที่บำบัดน้ำเสียมาเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าอัตราส่วนการเพาะเลี้ยงร่วมกันของปริมาตรสาหร่ายต่อแบคทีเรียที่ 1:1.5 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1,246 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยมีปริมาณออกซิเจนต่ำสุดเท่ากับ 57 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน การผลิตไฮโดรเจนหยุดลง เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของสารแขวนลอยเซลล์ลดลงเหลือประมาณ 4 เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของก๊าซในระหว่างการเพาะเลี้ยงในอัตราส่วนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำไปใช้โดยไม่ผ่านการแก้ไขใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ พบว่า ในระบบประกอบด้วยไฮโดรเจน ( $H_2$ ) 29–37 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) 34–35 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน ( $N_2$ ) 10–21 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน ( $O_2$ ) 2–4 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบมีเทน ( $CH_4$ ) ในการเผาเลี้ยงร่วมใดๆ ภายใต้สภาวะการทดลอง และความสัมพันธ์แบบแปรผกผันระหว่างการผลิตไฮโดรเจนและการใช้ออกซิเจน ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียกับสาหร่ายสีเขียวจะนำไปสู่การปรับปรุงการผลิตไฮโดรเจนอย่างเป็นรูปธรรม เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่ใช้การเผาเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

##### 3.1.1 สาหร่ายสีเขียว

1. *Chlorella* sp. 2TK แยกจากน้ำในนาข้าว จังหวัดนครสวรรค์
2. *Chlorella* sp. ChiS4 แยกจากน้ำในนาข้าว จังหวัดชัยนาท
3. *Chlorella* sp. ChiW1 แยกจากน้ำในนาข้าว จังหวัดชัยนาท
4. *Chlorella* sp. HNR141 แยกจากน้ำตกเหวนรก จังหวัดนครราชสีมา
5. *Chlorella* sp. HNR143 แยกจากน้ำตกเหวนรก จังหวัดนครนายก
6. *Chlorella* sp. HNR146 แยกจากน้ำตกเหวนรก จังหวัดนครนายก
7. *Chlorella* sp. HNR147 แยกจากน้ำตกเหวนรก จังหวัดนครนายก
8. *Chlorella* sp. KLM143 แยกจากน้ำตกผากล้วยไม้ จังหวัดนครราชสีมา
9. *Chlorella* sp. KMITL CirG แยกจากน้ำจืด จังหวัดกรุงเทพมหานคร
10. *Chlorella* sp. KLM142 แยกจากน้ำตกผากล้วยไม้ จังหวัดนครราชสีมา
11. *Chlorella* sp. KLM144 แยกจากน้ำตกผากล้วยไม้ จังหวัดนครราชสีมา
12. *Chlorella* sp. KLM145 แยกจากน้ำตกผากล้วยไม้ จังหวัดนครราชสีมา
13. *Chlorella* sp. LSD-W1 แยกจากน้ำทะเลหาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี
14. *Chlorella* sp. RSS141 แยกจากอ่างเก็บน้ำสายศร จังหวัดนครนายก
15. *Chlorella* sp. RSS147 แยกจากอ่างเก็บน้ำสายศร จังหวัดนครนายก
16. *Chlorella* sp. SRK141 แยกจากน้ำตกสาลิกา จังหวัดนครนายก
17. *Chlorella* sp. SRK149 แยกจากน้ำตกสาลิกา จังหวัดนครนายก
18. *Chlorella* sp. SWT141 แยกจากน้ำตกเหวสุวัต จังหวัดนครราชสีมา
19. *Chlorella* sp. SWT142 แยกจากน้ำตกเหวสุวัต จังหวัดนครราชสีมา
20. *Chlorella* sp. SWT144 แยกจากน้ำตกเหวสุวัต จังหวัดนครราชสีมา
21. *Chlorella* sp. SWT146 แยกจากน้ำตกเหวสุวัต จังหวัดนครราชสีมา
22. *Chlorella* sp. WTK แยกจากน้ำตกเหวสุวัต จังหวัดนครราชสีมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.2 แบคทีเรีย

1. *Escherichia coli* TISTR074 ซึ่งได้จากสถาบันวิจัยและวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดกรุงเทพมหานคร
2. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2141 ซึ่งได้จากสถาบันวิจัยและวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดกรุงเทพมหานคร
3. *Staphylococcus epidermidis* TISTR2307 ซึ่งได้จากสถาบันวิจัยและวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดกรุงเทพมหานคร

### 3.2 อุปกรณ์

1. กระจกบอทวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
2. กระดาษกรอง GF/C (Whatman plc, UK)
3. กล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายภาพได้ (Camera microscope) (Nikon Eclipse Ci-L, Japan)
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
5. ขวดแก้วขนาด 12.5 มิลลิลิตร (Vial) (National Scientific, USA)
6. เข็มฉีดยาก๊าซ (Gas syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)
7. คิวเวตควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific Ltd., UK)
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
9. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate with magnetic stirrer) (Vision VS130SH, Korea)
10. เครื่องแก้วต่างๆ (Glasswares)
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มาลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Hewlett-Packard, HP5890A GC, Japan)
12. เครื่องชั่งสาร (Balance) (Sartorius SI-234, Germany)
13. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter) (Lutron, LX-1108, Thailand)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labor-  
tech Z38K, Germany)
16. เครื่องผสมสาร (Vortex) (Genie-2, Scientific Industries, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
18. เครื่องวัดออกซิเจน (Oxygen electrode) (Hansatech, UK)
19. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-601, Japan)
20. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
21. เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heat block) (Labnet, USA)
22. เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (Shimadzu, japan)
23. จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)
24. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
25. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
26. โถดูดความชื้นเดซิเคเตอร์ (Desiccator)
27. ปีกเกอร์ (Beaker)
28. ทิปใส่ปิเปต (Pipette tip)
29. พาราฟิล์ม (Parafilm) (Bemis company, USA)
30. ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) (Pyrex, USA)
31. ไมโครปิเปต (Micropipette) (Labnet, USA)
32. ลูปเย็บเชื้อ (Loop)
33. หลอดเหวี่ยง (Centrifuge tube)
34. หลอดไมโครเหวี่ยง (Microcentrifuge tube) (Eppendorf, USA)
35. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) (Precicolor HBG, Germany)

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tris acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก)
2. Luria-Bertani medium (LB) (ภาคผนวก ข)

### 3.4 สารเคมี

#### 3.4.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP

1. กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) (Carlo Erba, Italy)
2. กรดอะซีติก ( $CH_3COOH$ ) (Ajax Finechem, Australia)
3. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (Mallinckrodt Baker, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้เผยแพร่เห็นใบปลิวหรือเอกสารอื่นที่อ้างถึง  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
5. ซิงค์คลอไรด์ ( $\text{ZnCl}_2$ ) (Fluka, Switzerland)
6. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Fluka, Switzerland)
7. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Fluka, Switzerland)
8. โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) (Merck, Germany)
9. โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (British Drug Houses, England)
10. โซเดียมอะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Merck, Germany)
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) (Kemaus, Australia)
12. ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) (Promega, USA)
13. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Carlo Erba, Italy)
14. ทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมีโนมีเทน ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) (Vivantis, Malaysia)
15. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Carlo Erba, Italy)
16. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
17. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
18. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba, Italy)
19. อะการ์ (Agar) (Difco, USA)
20. แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (Carlo Erba, Italy)
21. ไฮโดรคลอริก (HCl) (Merck, Germany)

#### 3.4.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

1. โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) (Univar, Australia)
2. ทริปโตน (Tryptone) (Sisco Research Laboratories, India)
3. สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) (Gibco, USA)

#### 3.4.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Analytical grade, RCI Labscan, Thailand)

#### 3.4.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

1. ไตรตันเอ็กซ์-100 (Triton X-100) (KemAus, Australia)
2. โซเดียมไดไธโอไนต์ ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (Sigma, Singapore)
3. เมทิลไวโอลเจนไดคลอไรด์ไฮเดรต ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma, Singapore)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติค

กรดซัลฟิวริก (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Ajax Finechem, Australia)

## 3.5 ก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Praxair, Thailand)
2. ก๊าซอาร์กอนบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Thonburiwattana, Thailand)

## 3.6 วิธีการทดลอง

### 3.6.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ที่มีในห้องปฏิบัติการจำนวน 22 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง โดยนำลูปมาเขี่ยหรือลาก (Streak) เชื้อบริสุทธิ์บนจานอาหารแข็ง Tris acetate phosphate (TAP) ที่มีค่าพีเอช 7.2 (Harris, 1989) นำจานอาหารแข็งที่มีเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้น นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อทำเป็นเซลล์เริ่มต้น หรือ Starter สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยเขี่ยสาหร่ายสีเขียวจากในจานอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำพลาสติกไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ในอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยมาปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วยอาหาร TAP ใหม่ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 เพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR074, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2141 และ *Staphylococcus epidermidis* TISTR2307 ทำได้โดยเขี่ยหรือลากเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่มีค่าพีเอช 7.0 แล้วนำไปจานไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อทำเซลล์เริ่มต้น หรือ Starter สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียในจานอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าพลาสติกที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว  $8,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยมาปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วยอาหาร TAP ใหม่ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 เพื่อใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงร่วมกันต่อไป

### 3.6.2 การศึกษาการเจริญเติบโต

#### 1) สาหร่ายสีเขียว

นำ Starter ของเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 มาเพาะเลี้ยงในฟลาस्कที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จากนั้น เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยจะเริ่มเก็บตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 ทำการเก็บตัวอย่างภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ครั้งละ 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดเก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างไปศึกษาการเจริญเติบโต โดยการวัดความหนาแน่นเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร หากมีความหนาแน่นของเซลล์ได้มากกว่า 0.8 ให้ทำการเจือจางตัวอย่างลงเพื่อให้อยู่ในช่วงที่เครื่องมือสามารถวัดได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการหยดตัวอย่างลงไปบนสไลด์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์แล้วนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วจึงทำการคำนวณเพื่อหาปริมาณเซลล์ทั้งหมดในช่วงเวลานั้นๆ (ภาคผนวก ง.)

#### 2) แบคทีเรีย

นำ Starter ของเซลล์แบคทีเรียโดยปรับให้มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 มาเพาะเลี้ยงในฟลาस्कที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้น เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยเก็บตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 30 ทำการเก็บตัวอย่างภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ครั้งละ 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดเก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างไปศึกษาการเจริญเติบโต โดยตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate โดยเริ่มจากการเจือจางเซลล์ในช่วง  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB จากนั้นนำเซลล์แต่ละการเจือจางมาทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง LB บ่มต่อ 24 ชั่วโมง จากนั้น นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยนับตัวอย่างที่มีโคโลนีเกิดขึ้นในช่วง 25-250 โคโลนี คำนวณให้อยู่ในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำ Starter ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ทั้ง 22 สายพันธุ์ ที่ปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เขย่าฟลาस्कที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วเก็บเกี่ยวเซลล์และล้างเซลล์อีกครั้งในอาหาร TAP ใหม่ นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปรับความเข้มข้นของเซลล์อีกครั้ง ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวด Vial จำนวน 3 ขวด ปิดฝาขวด และพ่นอาร์กอนในขวดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อไล่อากาศและทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะปราศจากอากาศ (Anaerobic condition) นำขวด Vial ไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจน ต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน คัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

### 3.6.4 การศึกษาสภาวะของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือก

#### 1) การศึกษาอายุเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและปรับความหนาแน่นเซลล์ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Vial ตัวอย่างละ 3 ขวด นำขวดไปพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจน ต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

#### 2) การศึกษาความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP จนได้ อายุเซลล์ที่ 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและปรับความหนาแน่นเซลล์ โดยแปรผันให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.1-3.0 จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Vial ตัวอย่างละ 3 ขวด นำขวดไปพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เขียว ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจน ต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

### 3.6.5 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกเพื่อการผลิตไฮโดรเจน

เตรียมเซลล์โดยนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP จนกระทั่งได้อายุเซลล์ที่ 36 ชั่วโมง และปรับความหนาแน่นเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรให้เท่ากับ 2.0 สำหรับการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* TISTR074, *P. aeruginosa* TISTR2141 และ *S. epidermidis* TISTR2307 เตรียมโดยการนำ starter ที่ปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าฟลาस्कที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียให้ได้เท่ากับ  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  และ  $1 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาผลของความหนาแน่นแบคทีเรียที่แตกต่างกันต่อการผลิตไฮโดรเจน หลังจากปรับค่าความหนาแน่นเรียบร้อยแล้ว ทำการปิเปตเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวลงในขวด Vial ขนาด 12.5 มิลลิลิตร โดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ที่อัตราส่วนแบคทีเรียต่อสาหร่ายสีเขียวเท่ากับ 1:49 (แบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร ต่อสาหร่ายสีเขียว 4.9 มิลลิลิตร) ทำซ้ำจำนวน 3 ขวด จากนั้นนำขวดไปปั่นก้ำซอร์บอนเป็นเวลา 15 นาที เพื่อสร้างสภาวะไร้ออกซิเจน ก่อนนำไปปั่นบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยทำการวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 5 วัน

### 3.6.6 การศึกษาเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย

ในการศึกษานี้ได้ดำเนินการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นของระบบการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่าง *Chlorella* sp. ChiW1 กับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074, *P. aeruginosa* TISTR2141 และ *S. epidermidis* TISTR2307 โดยเน้นการเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเดี่ยว ได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Xu และคณะ, 2016) การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน และการวัดอัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจ (Wu และคณะ, 2012) เพื่อประเมินผลกระทบของแบคทีเรียต่อกระบวนการชีวเคมีภายในระบบการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อ มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที ( $\mu\text{molH}_2 \text{ mg chl}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) วัดอัตราการผลิตออกซิเจนของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายในระบบเพาะเลี้ยงร่วมเปรียบเทียบกับแบบเดี่ยว โดยการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ จำนวนปริมาณออกซิเจนในหน่วยไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ( $\mu\text{molO}_2.\text{mg chl}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) และสุดท้ายดำเนินการวัดอัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจของระบบโดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับออกซิเจนในช่วงแสงและมีดด้วยเครื่องวัดออกซิเจน จำนวนปริมาณอัตราการสังเคราะห์แสงสุทธิและอัตราการหายใจในหน่วยไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที ( $\mu\text{molO}_2.\text{mg chl}^{-1} \text{min}^{-1}$ )

### 3.6.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวร่วมกับแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อการผลิตไฮโดรเจน

#### 1) การศึกษาอายุของเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP จนได้อายุเซลล์ที่ 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและปรับความหนาแน่นเซลล์ โดยปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่เท่ากับ 2.0 ในส่วนของแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP ใหม่ ปรับค่าความหนาแน่นเซลล์ โดยแปรผันให้มีความหนาแน่นเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวปริมาตรสุทธิทั้งหมดเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ลงไปในขวด Vial ขนาด 12.5 มิลลิลิตร โดยให้อัตราส่วนปริมาตรเซลล์แบคทีเรียต่อสาหร่ายสีเขียวเท่ากับ 1 ต่อ 49 (แบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตรต่อสาหร่ายสีเขียว 4.9 มิลลิลิตร) ทำ 3 ซ้ำ นำขวดไปพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจนต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

#### 2) การศึกษาอัตราส่วนของแบคทีเรียต่อสาหร่ายสีเขียวที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP จนได้อายุเซลล์ที่ 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและปรับความหนาแน่นเซลล์ โดยปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่เท่ากับ 2.0 ในส่วนของแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเหลว LB เป็นเวลาที่ 12 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP ใหม่ ปรับค่าความหนาแน่นเซลล์ โดยให้มีความหนาแน่นเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวปริมาตรสุทธิทั้งหมดเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ลงไปในขวด Vial ขนาด 12.5 มิลลิลิตร โดยแปรผันอัตราส่วนปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แบคทีเรียต่อสาหร่ายสีเขียวเท่ากับ 1 ต่อ 99 (แบคทีเรีย 0.05 มิลลิลิตรต่อสาหร่ายสีเขียว 4.95 มิลลิลิตร), 1 ต่อ 49 (แบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตรต่อสาหร่ายสีเขียว 4.9 มิลลิลิตร), 1 ต่อ 9 (แบคทีเรีย 0.5 มิลลิลิตรต่อสาหร่ายสีเขียว 4.5 มิลลิลิตร), 1 ต่อ 4 (แบคทีเรีย 1 มิลลิลิตรต่อสาหร่ายสีเขียว 4 มิลลิลิตร), 1 ต่อ 1.5 (แบคทีเรีย 2 มิลลิลิตรต่อสาหร่ายสีเขียว 3 มิลลิลิตร), 1.5 ต่อ 1 (แบคทีเรีย 3 มิลลิลิตรต่อสาหร่ายสีเขียว 2 มิลลิลิตร) ทำ 3 ซ้ำ นำขวดไปปั่นอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไป บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจนต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

### 3) การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP จนได้ อายุเซลล์ที่ 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและปรับความหนาแน่นเซลล์ โดยปรับให้มีค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรที่เท่ากับ 2.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 และมีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ กลูโคส ซูโครส อะซีเตท กลีเซอรอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และกรดอะซิติก (เป็นชุดควบคุม) ความเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมที่เท่ากันคือ 35 มิลลิ โมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ในส่วนของแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเหลว LB เป็นเวลาที่ 12 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์และล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP ใหม่ ปรับค่าความ หนาแน่นเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 และมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่ กล่าวไปข้างต้น โดยให้ความหนาแน่นเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้น ปิเปิด เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวลงในขวด Vial ขนาด 12.5 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน แบคทีเรีย 1 ส่วน ต่อสาหร่ายสีเขียว 49 ส่วน ปริมาตรสุทธิทั้งหมดเท่ากับ 5 มิลลิลิตร (แบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร ต่อสาหร่ายสีเขียว 4.9 มิลลิลิตร) ทำ 3 ซ้ำ นำขวดไปปั่นอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจน ต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน หลังจากการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ทำ การทดลองข้างต้นกับแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกมาซ้ำอีกครั้ง โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่ง คาร์บอนให้มีความเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 0, 17.5, 35, 70, 175, 350 และ 1,750 มิลลิ โมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจน

### 4) การศึกษาผลของพีเอชของอาหาร อุณหภูมิของการบ่ม และความเข้มแสงต่อการ ผลิตไฮโดรเจน

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวและแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยเริ่มจากการ เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวและแบคทีเรียในอาหารจนได้อายุเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยว เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์และปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และแปรผันค่าพีเอชของอาหารให้อยู่ในช่วงพีเอช 5.0-9.0 โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงร่วมกันในขวด Vial ขนาด 12.5 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนที่เหมาะสม และมีปริมาตรสุทธิ 5 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ นำขวดไปฟั่นอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจนต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิของการบ่มโดยแปรผันอุณหภูมิในช่วง 25-50 องศาเซลเซียส และศึกษาผลของความเข้มแสงโดยแปรผันความเข้มแสงในช่วง 0-390 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดการผลิตไฮโดรเจนต่อเนื่องทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน

### 3.6.8 วิธีการวิเคราะห์ต่างๆ

#### 1) การวัดปริมาณไฮโดรเจนและออกซิเจนบริเวณ Headspace

วิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ โดยใช้ก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซตัวพา (Carrier gas) และใช้สถานะของระบบดังแสดงในตารางที่ 3.1 (Baebprasert และคณะ, 2010) เก็บตัวอย่างก๊าซภายในขวดแก้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยา ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในการวัดแต่ละครั้ง จะทำการเก็บตัวอย่างก๊าซเพื่อวัดปริมาณไฮโดรเจนเป็นจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้น คำนวณอัตราการผลิตและปริมาณผลผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจนตามวิธีดังแสดงในภาคผนวก ค ไมโครโมไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ( $\mu\text{molH}_2.\text{mg chl}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ( $\mu\text{molH}_2 \text{mg chl}^{-1}$ ) ไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ( $\mu\text{molO}_2.\text{mg chl}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) และไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ( $\mu\text{molO}_2.\text{mg chl}^{-1}$ )

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

พารามิเตอร์	สภาวะในระบบ
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	Packed column 2 m; Molecular sieve 5 °A 60/80 mesh
Temperature Program	Injector temperature: 100 °C Column temperature: 50 °C Detector temperature: 100 °C
Carrier gas	Argon Flow rate 20 mL /min (99.999% purity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2) การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว

เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยสาหร่ายสีเขียวในแต่ละชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว  $8,000 \times g$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนตะกอนเซลล์ จากนั้นสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Becker, 1994) โดยการเติมตัวทำละลายเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร ตามลำดับ แล้วนำไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 3) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

นำตัวอย่างสาหร่ายหรือสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียมา 500 ไมโครลิตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ซึ่งมีไตรตันเอ็กซ์-100 (Triton X-100) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โซเดียมไดไธโอนิต (Sodium dithionite) ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ และเมทิลไวโอโลเจนไดคลอไรด์ไฮเดรต (Methyl viologen dichlorohydrate) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ (Taikhao และคณะ, 2013) บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้น วัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากการวัดปริมาณไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้น

## 4) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ

วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ ด้วยเครื่อง Oxygen electrode โดยเติมสารโซเดียมไดไธโอนิต (Sodium dithionite) ปริมาณ 1 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นลงใน Chamber สำหรับปรับค่าเริ่มต้นของ เครื่อง Oxygen electrode เท่ากับศูนย์ จากนั้น แทนที่ด้วยการเติมสาหร่ายหรือสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย 2 มิลลิลิตร และบ่มภายใต้การให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสงเท่ากับ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการวิเคราะห์ออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง จากนั้น บ่มเซลล์ที่มืดเป็นเวลา 15 นาที สำหรับการวิเคราะห์ออกซิเจนจากกระบวนการหายใจ (Mattos และคณะ, 2015) อัตราการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ จากนั้น คำนวณในหน่วยไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ( $\mu\text{molO}_2 \text{ mg chl}^{-1}$ )

### 5) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก

ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) โดยปรับใช้สภาวะจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในระบบดังแสดงในตารางที่ 3.2 (Fakhimi และ Tavakoli, 2019) โดยเก็บตัวอย่างเซลล์จากการเพาะเลี้ยงทุก 24 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 120 ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก ในการวัดแต่ละครั้งเป็นจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์หาผลพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำกรวิเคราะห์ไว้หาความเข้มข้นของสารต่างๆ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งอยู่ในภาคผนวก จ

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

พารามิเตอร์	สภาวะในระบบ
Column	Inertsil®ODS-3 Packed column C18; 0.5 $\mu$ m, 7.8 x 150 mm
Mobile phase	5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flow rate	0.6 mL/min
Oven temperature	55 °C
UV Detection	Wavelength 210 nm
Injection volume	20 $\mu$ L

### 6) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS statistic version 28 (SPSS software, New York, USA) โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-way analysis of variance, One-way ANOVA) และวัดค่าความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการ Duncan ด้วยการตั้งสมมติฐาน  $H_0$  เมื่อ  $p$ -value  $>$  0.05 คือ มีอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และยอมรับสมมติฐาน  $H_1$  เมื่อ  $p$ -value  $<$  0.05 คือ มีอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำเพื่อจัดกลุ่มทางสถิติหาค่าเฉลี่ยที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P <$  0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ *Chlorella* ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* จำนวน 22 สายพันธุ์ ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และปราศจากออกซิเจน มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ทั้งหมด 22 สายพันธุ์ สามารถผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากออกซิเจนได้ โดยสายพันธุ์ *Chlorella* sp. ChiW1 ซึ่งแยกได้จากนาข้าวในจังหวัดชัยนาท มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $5.07 \pm 0.23$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ  $169.46 \pm 7.48$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายหลังจากบ่มในสภาวะที่มีแสงและปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน แต่คนละสายพันธุ์ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน โดยจากผลการทดลองพบว่า *Chlorella* sp. ChiW1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในขณะที่ *Chlorella* sp. ChiS4 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุด โดยต่ำกว่าถึง 11.3 เท่า ดังนั้น ศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว และยังขึ้นอยู่กับเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ รวมถึงความสามารถในการใช้สารตั้งต้นและการทนต่อสภาวะต่างๆ เป็นต้น

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* จำนวน 22 สายพันธุ์พบว่า *Chlorella* sp. ChiW1 ซึ่งแยกได้จากนาข้าวในจังหวัดชัยนาท มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ตารางที่ 4.1) ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* อาจมาจากความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำที่นำมาแยกสาหร่าย น้ำในนาข้าวมีองค์ประกอบของธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชและสาหร่าย (Phunpruch และคณะ, 2016) นอกจากนี้ น้ำในนาข้าว ยังมีธาตุแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง (Carvalho และคณะ, 2011) และธาตุเหล็ก (Fe) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Happe และคณะ, 1993) อาหารและแร่ธาตุเหล่านี้ส่งผลให้สาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 มีประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ อีกทั้งสภาพแวดล้อมของนาข้าวที่มีความเข้มแสงสูงและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น อาจส่งผลให้สายพันธุ์นี้มีการปรับตัวและมีอัตราการสังเคราะห์แสงที่สูงขึ้น นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสของ *Chlorella* sp. ChiW1 อาจมีความทนทานต่อออกซิเจนมากกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งน้ำประเภทอื่น ในทางกลับกัน *Chlorella* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sp. ChiS4 ที่คัดแยกได้จากน้ำในนาข้าวเหมือนกัน แต่ต่างบริเวณของจังหวัดชัยนาทกลับพบว่ามียัตราการผลิตต่ำ บ่งชี้ได้ว่าการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกันทั้งในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการทางชีววิทยาที่ควบคุมด้วยยีนต่างๆ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตไฮโดรเจน เช่น Hydrogenase และ Ferredoxin (Benemann และคณะ, 1973) (Das และคณะ, 2006) และยีนที่ควบคุมเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาร์บอนหรือการควบคุมภาวะไร้ออกซิเจน (Wu และคณะ, 2010) การดัดแปลงยีนหรือการเลือกใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มียีนเฉพาะทางสามารถเพิ่มหรือเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของระบบได้อย่างชัดเจน เช่น การตัดต่อของยีน *lba* เข้าสู่คลอโรพลาสต์ของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้ออกซิเจน พบว่าการบริโภคออกซิเจนเกิดขึ้นเร็วขึ้น เมื่อระดับออกซิเจนต่ำลง ทำให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นในสาหร่ายดัดแปลงพันธุกรรมเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wu และคณะ, 2010) ดังนั้น ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายและจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความหลากหลายของสายพันธุ์และเงื่อนไขการเพาะเลี้ยง ทั้งในแง่ของชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ร่วมเพาะเลี้ยง ความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อม และการแสดงออกของยีนเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์และใช้ออกซิเจน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการออกแบบระบบชีวภาพแบบวิศวกรรมจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถเพิ่มศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในประเทศไทย ได้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำจืด พบว่าสามารถจำแนกสาหร่ายสีเขียวได้ 43 สายพันธุ์ จาก 6 สกุล ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน แม้จะอยู่ในสกุลเดียวกันก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังพบว่า สภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนและการขาดซัลเฟอร์ช่วยเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella* และ *Chlamydomonas* (Pongpadung และคณะ, 2015) มีรายงานวิจัยการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากนาข้าวในประเทศไทยและนำสาหร่ายที่ได้มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 พบว่า สาหร่าย 9 สายพันธุ์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในระดับที่แตกต่างกัน (Phunpruch และคณะ, 2016) นอกจากนี้ จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากน้ำทะเลธรรมชาติของประเทศไทยพบว่า *Chlorella* sp. LSD-W2 มียัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.52 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากออกซิเจน นอกจากนี้ *Chlorella* sp. LSD-W2 สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 20 เท่า เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ (Tinpranee และคณะ, 2016) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในสาหร่ายแม้อยู่ในสกุลเดียวกัน แต่สภาวะการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของทั้งลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและ

โภชนาการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ที่ผลิตได้โดย *Chlorella* sp. ที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์	แหล่งที่มา	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
<i>Chlorella</i> sp. 2TK	นาข้าวในจังหวัดนครสวรรค์	1.42 ± 0.12 <sup>i</sup>	33.99 ± 2.81 <sup>lm</sup>
<i>Chlorella</i> sp. ChiS4	นาข้าวในจังหวัดชัยนาท	0.61 ± 0.07 <sup>k</sup>	21.24 ± 5.61 <sup>n</sup>
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	นาข้าวในจังหวัดชัยนาท	5.07 ± 0.23 <sup>a</sup>	169.46 ± 7.48 <sup>q</sup>
<i>Chlorella</i> sp. HNR141	น้ำตกในจังหวัดนครนายก	1.93 ± 0.02 <sup>h</sup>	47.48 ± 0.35 <sup>jk</sup>
<i>Chlorella</i> sp. HNR143	น้ำตกในจังหวัดนครนายก	4.19 ± 0.11 <sup>c</sup>	100.65 ± 2.53 <sup>de</sup>
<i>Chlorella</i> sp. HNR146	น้ำตกในจังหวัดนครนายก	2.38 ± 0.16 <sup>g</sup>	86.00 ± 10.48 <sup>fg</sup>
<i>Chlorella</i> sp. HNR147	น้ำตกในจังหวัดนครนายก	2.91 ± 0.44 <sup>ef</sup>	69.86 ± 10.55 <sup>hi</sup>
<i>Chlorella</i> sp. KLM143	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	3.49 ± 0.07 <sup>d</sup>	157.76 ± 3.17 <sup>b</sup>
<i>Chlorella</i> sp. KLM144	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	4.54 ± 0.29 <sup>b</sup>	108.99 ± 47.06 <sup>d</sup>
<i>Chlorella</i> sp. KLM145	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	1.80 ± 0.17 <sup>h</sup>	43.12 ± 4.06 <sup>kl</sup>
<i>Chlorella</i> sp. KLM146	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	0.45 ± 0.05 <sup>k</sup>	31.51 ± 2.79 <sup>m</sup>
<i>Chlorella</i> sp. KMITL CirG	น้ำจืดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร	1.98 ± 0.28 <sup>h</sup>	46.27 ± 6.78 <sup>jk</sup>
<i>Chlorella</i> sp. LSD-W1	น้ำทะเลในจังหวัดจันทบุรี	1.23 ± 0.14 <sup>ij</sup>	29.60 ± 3.28 <sup>mn</sup>
<i>Chlorella</i> sp. RSS141	อ่างเก็บน้ำในจังหวัดนครราชสีมา	1.14 ± 0.13 <sup>ij</sup>	38.73 ± 0.70 <sup>klm</sup>
<i>Chlorella</i> sp. RSS147	อ่างเก็บน้ำในจังหวัดนครราชสีมา	3.47 ± 0.09 <sup>d</sup>	83.32 ± 2.17 <sup>fg</sup>
<i>Chlorella</i> sp. SRK141	น้ำตกในจังหวัดนครนายก	3.01 ± 0.27 <sup>ef</sup>	120.82 ± 5.96 <sup>c</sup>
<i>Chlorella</i> sp. SRK149	น้ำตกในจังหวัดนครนายก	2.73 ± 0.25 <sup>f</sup>	65.71 ± 6.00 <sup>i</sup>
<i>Chlorella</i> sp. SWT141	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	1.75 ± 0.04 <sup>h</sup>	76.00 ± 6.40 <sup>gh</sup>
<i>Chlorella</i> sp. SWT142	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	2.30 ± 0.05 <sup>g</sup>	157.22 ± 11.58 <sup>b</sup>
<i>Chlorella</i> sp. SWT144	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	3.06 ± 0.06 <sup>e</sup>	156.93 ± 4.96 <sup>b</sup>
<i>Chlorella</i> sp. SWT146	น้ำตกในจังหวัดนครราชสีมา	2.30 ± 0.04 <sup>g</sup>	93.48 ± 3.17 <sup>ef</sup>
<i>Chlorella</i> sp. WTK	น้ำตกในจังหวัดนครนายก	1.09 ± 0.10 <sup>j</sup>	52.32 ± 4.8 <sup>j</sup>

\*ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA)

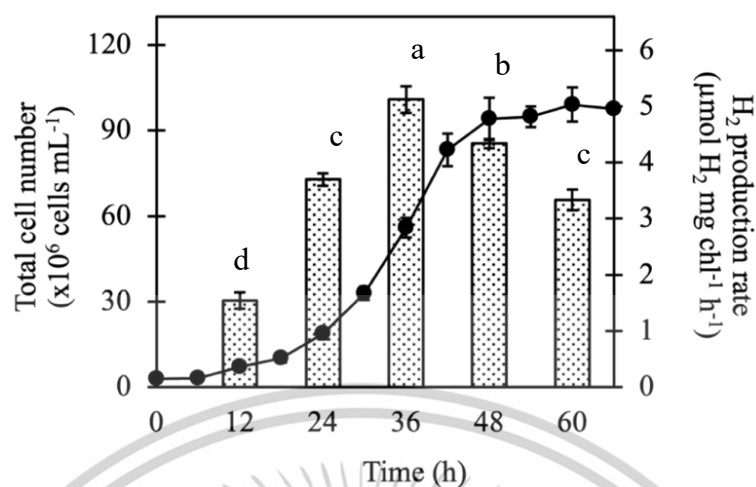
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่าย *Chlorella* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีความน่าสนใจ และได้รับคัดเลือกสำหรับการศึกษาลดไป โดยศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนให้สูงขึ้น โดยการแปรผันอายุของเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง สาหร่ายร่วมกับแบคทีเรีย ซึ่งจะเป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ChiW1 เพื่อการผลิตพลังงานชีวภาพที่ยั่งยืนต่อไป

#### 4.2 ผลของอายุเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1

จากการศึกษาผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 โดยนำเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง มาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตร ต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากออกซิเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกลางของระยะเจริญเติบโตแบบ ลอการิทึม (Mid-logarithmic phase) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $5.12 \pm 0.13$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ  $169.58 \pm 9.77$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.1) ในขณะที่เซลล์ที่อยู่ในช่วงระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโต (12 และ 24 ชั่วโมง) (ระยะ Lag และ Early-logarithmic) ระยะท้ายของการเจริญเติบโต (48 ชั่วโมง) (ระยะ Late-logarithmic) และระยะคงตัว (60 ชั่วโมง) (ระยะ Stationary) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอายุของเซลล์มีผลสำคัญต่อความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ChiW1 จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาปรับค่าความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 และนำไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *Chlorella* sp. ChiW1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นตามค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $5.07 \pm 0.18$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ  $169.60 \pm 6.80$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ หลังจากบ่มในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.2) อย่างไรก็ตาม เมื่อค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.0 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตโดยการวัดจำนวนเซลล์และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP เป็นระยะเวลาต่างๆ

ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง และปรับให้มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ 750 นาโนเมตร ( $\text{OD}_{750}$ ) ตั้งแต่ 0.2 ถึง 3.0 นำเซลล์เริ่มต้นมานับจำนวนเซลล์ ( $\times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$\text{OD}_{750}$	จำนวนเซลล์	ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
0.2	$3.11 \pm 0.45^i$	$2.85 \pm 0.20^h$	$1.75 \pm 0.37^e$	$57.02 \pm 7.45^f$
0.4	$6.21 \pm 0.74^h$	$5.83 \pm 0.72^g$	$2.26 \pm 0.24^d$	$71.74 \pm 4.34^e$
0.6	$9.29 \pm 0.65^g$	$8.61 \pm 0.54^f$	$3.06 \pm 0.29^c$	$116.02 \pm 3.32^c$
0.8	$11.96 \pm 0.99^f$	$10.35 \pm 0.96^f$	$3.23 \pm 0.03^c$	$127.35 \pm 7.52^c$
1.0	$14.57 \pm 0.95^e$	$13.99 \pm 0.22^e$	$4.32 \pm 0.42^b$	$142.73 \pm 10.99^b$
1.5	$20.14 \pm 0.86^d$	$19.28 \pm 0.63^d$	$4.37 \pm 0.43^b$	$152.39 \pm 9.00^b$
2.0	$27.96 \pm 1.10^c$	$24.96 \pm 1.54^c$	$5.07 \pm 0.18^a$	$169.60 \pm 6.80^a$
2.5	$34.14 \pm 1.26^b$	$30.83 \pm 0.93^b$	$3.99 \pm 0.25^b$	$126.10 \pm 6.06^c$
3.0	$42.68 \pm 1.24^a$	$36.84 \pm 2.70^a$	$3.12 \pm 0.12^c$	$96.25 \pm 8.36^d$

\*ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาอายุของเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์สำหรับที่ที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นที่สำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน ใน *Chlorella* sp. ChiW1 เซลล์ที่มีอายุ 36 ชั่วโมงและมีความหนาแน่นที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยในช่วงเวลา 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เซลล์อยู่ในระยะกลางของการเจริญเติบโตแบบลอการิทึม ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวสูงและมีปริมาณคลอโรฟิลล์มาก ปริมาณคลอโรฟิลล์เป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะแสง เนื่องจากคลอโรฟิลล์มีบทบาทหลักในการดูดซับพลังงานแสงเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ระบบแสงที่ 2 (PSII) เมื่อคลอโรฟิลล์ดูดซับพลังงานแสง กระบวนการแยกน้ำจะถูกกระตุ้นและปลดปล่อยโปรตอน อิเล็กตรอน และออกซิเจน อิเล็กตรอนและโปรตอนที่เกิดขึ้นสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Kosourov และคณะ, 2002) ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์จึงส่งผลให้มีสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น จากผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 พบว่า เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นเมื่อค่าความหนาแน่นเซลล์สูงขึ้น โดยมีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตร และค่าปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 36.29 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 159 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมเซลล์ ภายใต้สภาวะการขาดธาตุซัลเฟอร์และปราศจากออกซิเจน และให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่ลดลง เมื่อความหนาแน่นเซลล์สูงเกิน 0.96 กรัมต่อลิตร (Kim และคณะ, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่แสดงว่า ในการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ChiW1 อายุเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์แปรผันตรงกับปริมาณคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.2) และเป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากกระบวนการแยกน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสงส่งผลให้เกิดออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งออกซิเจนเป็นสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Das และคณะ, 2006) ดังนั้น หากมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากเกินไป อาจทำให้ออกซิเจนสะสมในระบบมากขึ้น ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้ง ดังนั้น ความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการป้องกันการสะสมของออกซิเจนที่มากเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 และในงานก่อนหน้านี้นี้ที่ระบุว่าเมื่อความหนาแน่นของเซลล์ *C. reinhardtii* UTEX 90 ที่สูงเกิน 0.96 กรัมต่อลิตร ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง แม้ว่าความหนาแน่นของเซลล์จะเพิ่มขึ้นก็ตาม (Kim และคณะ, 2005) นอกจากนี้ หากเซลล์มีความหนาแน่นมากเกินไป อาจทำให้ปริมาณอิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง เนื่องจากเกิดการบดบังกันระหว่างเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการดูดซับแสง (Kosourov และคณะ, 2002) มีรายงานการศึกษาผลของความหนาแน่นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Scenedesmus* sp. KMITL-OVG1 พบว่าการผลิตไฮโดรเจนลดลงจาก 0.79 เป็น 0.48 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นจาก 0.8 เป็น 1.0 (Warichanan และ Phunpruch, 2019) ดังนั้น ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันว่า *Chlorella* sp. ChiW1 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้โดยการควบคุมให้มีอายุเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสม

#### 4.3 การคัดเลือกชนิดและความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรียต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยนำ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 มาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย ทั้ง 3 ชนิด คือ *Escherichia coli* TISTR074, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2141 และ *Staphylococcus epidermidis* TISTR2307 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรีย  $1 \times 10^8$  ถึง  $1 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนและความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 และ *P. aeruginosa* TISTR2141 ทุกระดับความหนาแน่นของเซลล์ มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย โดยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $7.50 \pm 0.20$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ  $227.98 \pm 10.49$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ChiW1 แบบเดี่ยว ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ภายใต้สภาวะเดียวกัน (ตารางที่ 4.3) เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับ *P. aeruginosa* TISTR2141 ที่ความหนาแน่น  $5 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ *S. epidermidis* TISTR2307 ที่ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ถึง  $6.37 \pm 0.52$  และ  $5.75 \pm 0.60$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบเดี่ยว อย่างไรก็ตาม เมื่อความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียสูงเกินระดับที่เหมาะสม อัตราการผลิตไฮโดรเจนมีแนวโน้มลดลง ตัวอย่าง เช่น เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับ *E. coli* TISTR074 พบว่าอัตราการผลิตลดลงจาก  $7.50 \pm 0.20$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ที่ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรีย  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหลือ  $6.27 \pm 0.32$  และ  $5.08 \pm 0.37$  ไมโคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเพิ่มความหนาแน่นเป็น  $5 \times 10^8$  และ  $1 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

**ตารางที่ 4.3** อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง และมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย 3 ชนิด ที่มีความหนาแน่นของเซลล์  $1 \times 10^8$  ถึง  $1 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *Chlorella* sp. ChiW1 การเพาะเลี้ยงทั้งหมดถูกบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1	-	$4.94 \pm 0.27^e$	$168.54 \pm 12.12^{fg}$
<i>E. coli</i> TISTR074	$1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$	N/A	N/A
<i>P. aeruginosa</i> TISTR2141	$1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$	N/A	N/A
<i>S. epidermidis</i> TISTR2307	$1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$	N/A	N/A
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1 + <i>E. coli</i> TISTR074	$1 \times 10^8$	$5.93 \pm 0.52^{bc}$	$190.40 \pm 9.79^{bcde}$
	$2 \times 10^8$	$7.50 \pm 0.20^a$	$227.98 \pm 10.49^a$
	$5 \times 10^8$	$6.27 \pm 0.32^b$	$201.01 \pm 8.14^{bc}$
	$1 \times 10^9$	$5.08 \pm 0.37^{de}$	$178.77 \pm 17.65^{defg}$
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1 + <i>P. aeruginosa</i> TISTR2141	$1 \times 10^8$	$5.06 \pm 0.17^{de}$	$181.46 \pm 10.63^{cdefg}$
	$2 \times 10^8$	$5.74 \pm 0.65^{bcd}$	$192.17 \pm 9.72^{bcd}$
	$5 \times 10^8$	$6.37 \pm 0.52^b$	$209.14 \pm 8.43^b$
	$1 \times 10^9$	$5.37 \pm 0.34^{cde}$	$187.39 \pm 12.88^{cdef}$
<i>Chlorella</i> sp. ChiW1 + <i>S. epidermidis</i> TISTR2307	$1 \times 10^8$	$5.10 \pm 0.31^{de}$	$169.81 \pm 10.43^{efg}$
	$2 \times 10^8$	$5.75 \pm 0.60^{bcd}$	$190.36 \pm 6.37^{bcde}$
	$5 \times 10^8$	$5.18 \pm 0.50^{cde}$	$186.21 \pm 13.61^{cdef}$
	$1 \times 10^9$	$4.59 \pm 0.25^e$	$162.68 \pm 6.89^g$

\*ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA)

\*\*N/A ไม่พบปริมาณไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

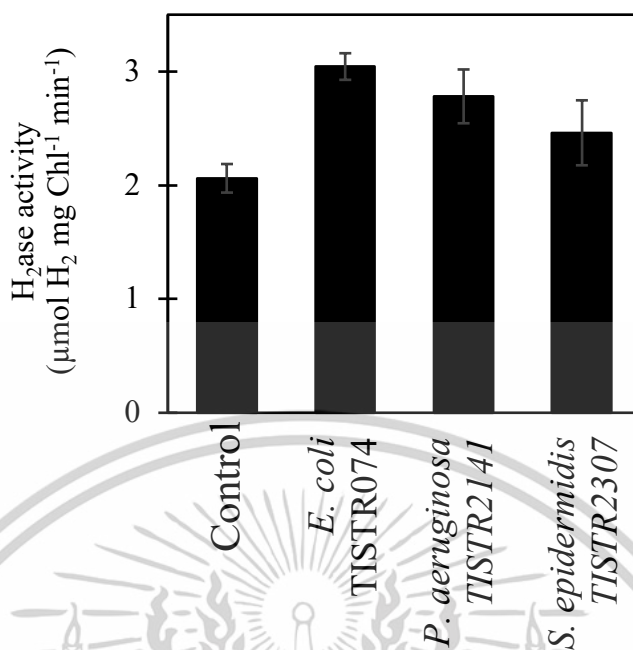
การเพาะเลี้ยงร่วมเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 อย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงร่วม (co-cultivation) ระหว่างสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 กับแบคทีเรียบางชนิด เช่น *E. coli* TISTR074 และ *P. aeruginosa* TISTR2141 ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายเพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะ *E. coli* ที่ความหนาแน่น  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลผลิตสูงสุดทั้งในแง่อัตราและปริมาณไฮโดรเจนสะสม ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่า จาก *Chlorella* sp. ChiW1 เลี้ยงเดี่ยว แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถส่งเสริมกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า การเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียวกับแบคทีเรียสามารถเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนได้ เช่น การเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Chlorella vulgaris* กับแบคทีเรียในภาคตะกอนจุลินทรีย์ในอัตราส่วน 1:1.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* แบบเดี่ยวถึง 45 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงร่วมกันในอัตราส่วน 1:1 และ 1.5:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน 39 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Javed และคณะ, 2022) การเพาะเลี้ยง *C. reinhardtii* ร่วมกับ *E. coli* ที่มีค่าความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) เท่ากับ 0.01 สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ 24 เปอร์เซ็นต์ (Fakhimi และ Tavakoli, 2019) และการเพาะเลี้ยง *C. reinhardtii* CC-849 ร่วมกับแบคทีเรีย *Pseudomonas* จำนวน 3 สายพันธุ์ (L2, L3 และ L4) สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ 4.0, 2.9 และ 4.1 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเดี่ยว (Li และคณะ, 2013)

หนึ่งในสมมติฐานที่อธิบายปรากฏการณ์นี้ได้คือ แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมอาจช่วยลดปริมาณออกซิเจน (He และคณะ, 2018) ภายในระบบ ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย และ/หรืออาจผลิตสารอินทรีย์บางชนิด (Fakhimi และคณะ, 2019) เช่น กรดอินทรีย์ ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานหรือแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ยังเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียและสาหร่ายมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพา (mutualism) ที่ช่วยปรับสภาวะโดยรวมของระบบให้เหมาะสมกับกระบวนการนี้มากขึ้น การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับสาหร่ายสีเขียวศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน ทำให้ระบบอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น ดังนั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนในระบบชีวภาพ ควรมีการศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ของการผลิตไฮโดรเจน ปริมาณออกซิเจน และการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Das และคณะ, 2006) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงหรือออกแบบระบบการผลิตที่เหมาะสมต่อการทำงานของไฮโดรจีเนสและการสร้างไฮโดรเจนสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 เมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย

จากการศึกษาเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074, *P. aeruginosa* TISTR2141 และ *S. epidermidis* TISTR2307 พบว่า การเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายและแบคทีเรียสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *Chlorella* sp. ChiW1 (รูปที่ 4.2) โดยพบว่า การเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเท่ากับ  $3.04 \pm 0.12$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาทีก ในขณะที่การเพาะเลี้ยงร่วมกับ *P. aeruginosa* TISTR2141 และ *S. epidermidis* TISTR2307 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส  $2.78 \pm 0.77$  และ  $2.46 \pm 0.71$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาทีก ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่าง *Chlorella* sp. ChiW1 กับแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีค่าที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และพบว่า การเพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก ferredoxins (FDXs) เพื่อผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองของเราพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวถึง 1.5 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เพิ่มขึ้นภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bradyrhizobium japonicum* โดยพบว่าการผลิตไฮโดรเจน ใน *C. reinhardtii* CC-124 เพิ่มขึ้น 2 เท่า และใน *C. reinhardtii* CC-503 เพิ่มขึ้น 3.4 เท่า (Xu และคณะ 2016) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาก่อนหน้านี้ที่สอดคล้องกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงร่วมของ *C. reinhardtii* CC-503 กับ *Thiomonas intermedia* BCRC 17547 สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้ประมาณ 2.9 เท่า (He และคณะ 2018) จากผลการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอาจมีสาเหตุจากการลดลงของปริมาณออกซิเจนภายในระบบ ซึ่งออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจนเลย ซึ่งเอื้อต่อการเกิดกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับที่สูงขึ้น

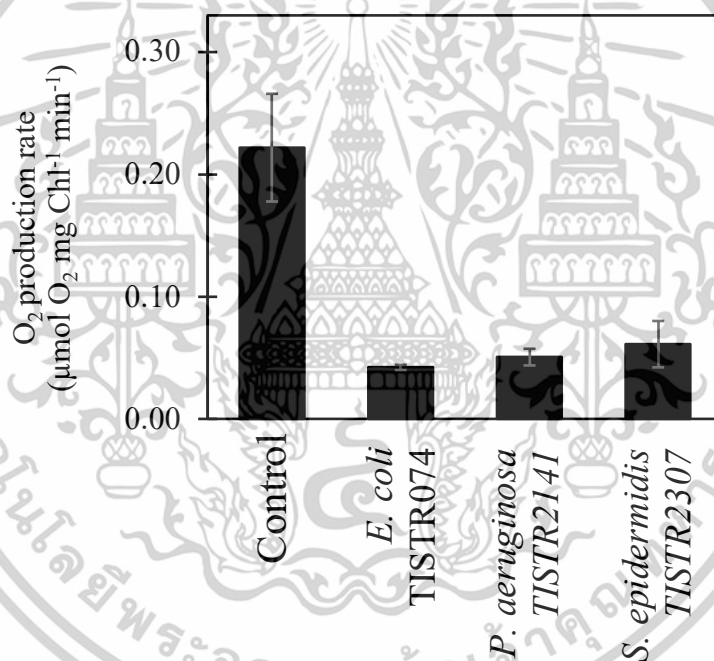


รูปที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหลังจากป่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 และ *S. epidermidis* TISTR2307 ที่ความเข้มข้นเซลล์  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ *P. aeruginosa* TISTR2141 ที่ความเข้มข้นเซลล์  $5 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *Chlorella* sp. ChiW1 (control) โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายและแบคทีเรียในอาหาร TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันในรูปแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) จากการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way Anova

จากผลของกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่สูงขึ้น ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่ปริมาณออกซิเจนในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันลดลง (Xu และคณะ, 2016) จึงได้ศึกษาปริมาณออกซิเจนในระบบของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ เทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเดี่ยว พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ทำให้ปริมาณออกซิเจนในระบบลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 แบบเดี่ยว โดยพบปริมาณออกซิเจนที่น้อยที่สุดในการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ที่มีค่าเท่ากับ  $0.04 \pm 0.00$  ไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และพบการผลิตออกซิเจนในสภาวะการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *P. aeruginosa* TISTR2141 และ *S. epidermidis* TISTR2307 ที่มีค่าการผลิตเท่ากับ  $0.05 \pm 0.01$  และ  $0.06 \pm 0.02$  ไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเหมือนเปรียบเทียบการผลิตออกซิเจน

ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกับการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ChiW1 เซลล์เดี่ยว เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

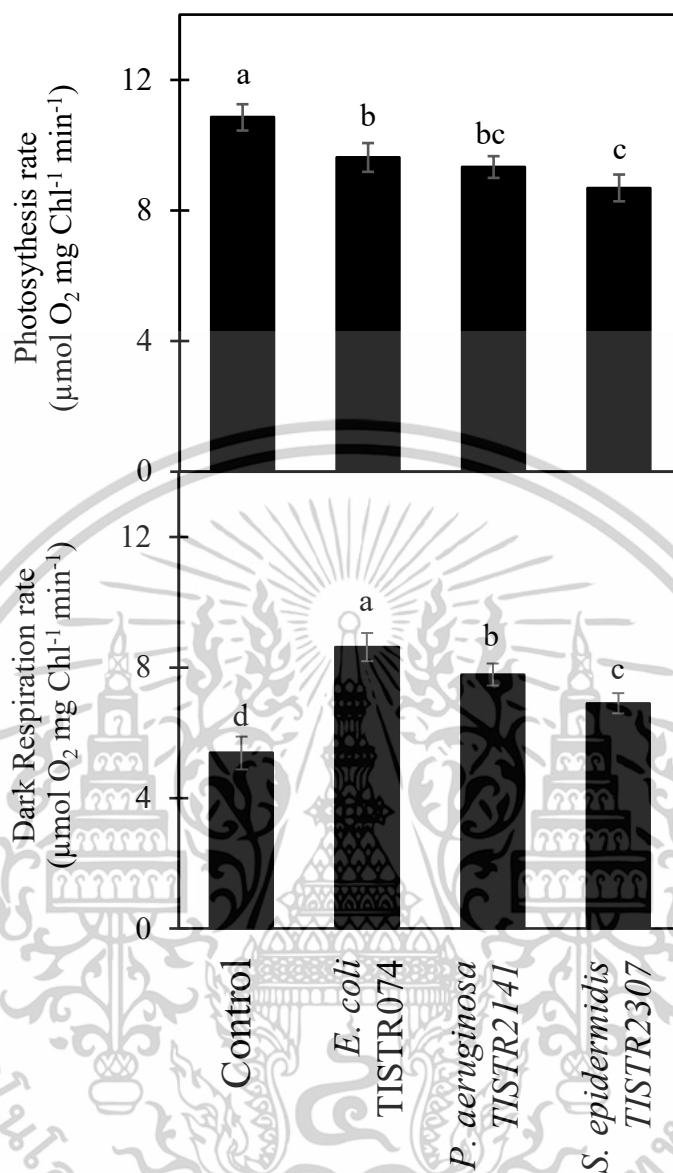
พบว่าปริมาณออกซิเจนลดลง 3-5 เท่า และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.3) ผลการทดลองนี้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า การลดระดับออกซิเจนในระบบส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน การเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างสาหร่ายและแบคทีเรียได้รับการเสนอให้เป็นกลยุทธ์หนึ่งที่สามารถรักษาสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงร่วมของ *C. reinhardtii* CC-124 และ CC-503 กับ *B. japonicum* สามารถลดระดับของออกซิเจนได้มากกว่าการเลี้ยงสาหร่ายแบบเดี่ยว ซึ่งลดจากปริมาณออกซิเจนในบรรยากาศที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ลงเหลือประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเลี้ยงสาหร่ายแบบเดี่ยวลดลงเหลือที่ 14 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืด (Xu และคณะ, 2016) นอกจากนี้ งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่หลายงานวิจัยที่รายงานการเพาะเลี้ยงร่วมแบคทีเรียเหล่านี้สามารถลดระดับออกซิเจน ได้อย่างมีประสิทธิภาพและส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น (Wu และคณะ, 2012)



รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตออกซิเจนหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 และ *S. epidermidis* TISTR2307 ที่ความเข้มข้นเซลล์  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ *P. aeruginosa* TISTR2141 ที่ความเข้มข้นเซลล์  $5 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *Chlorella* sp. ChiW1 (control) โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายและแบคทีเรียในอาหาร TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันในรูปแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) จากการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way Anova

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้ ระดับของออกซิเจนในระบบมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจ โดยการเพิ่มขึ้นของอัตราการหายใจหรือการลดลงของการสังเคราะห์แสงในระบบเพาะเลี้ยงร่วมอาจมีส่วนช่วยลดความเข้มข้นของออกซิเจน ในการศึกษาพบว่าภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกัน แสดงให้เห็นว่าอัตราการสังเคราะห์แสงที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเดี่ยว (รูปที่ 4.3) และอัตราการหายใจของเซลล์ในระบบเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นจากการหายใจของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก แสดงค่าอัตราการหายใจของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเดี่ยวที่เพิ่มขึ้นจาก  $5.38 \pm 0.50$  ไมโครโมล ออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ เป็น  $8.63 \pm 0.43$ ,  $7.79 \pm 0.34$  และ  $6.91 \pm 0.31$  ไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ ในการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074, *P. aeruginosa* TISTR2141 และ *S. epidermidis* TISTR2307 ตามลำดับ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยลดระดับออกซิเจนในระบบ การศึกษาในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการเพาะเลี้ยงร่วมของ *B. japonicum* กับ *C. reinhardtii* CC-124 และ *C. reinhardtii* CC-503 ทำให้อัตราการหายใจของเซลล์เพิ่มขึ้น 1.2 และ 2.6 เท่าตามลำดับ (Xu และคณะ, 2016) เช่นเดียวกับกับรายงานของ Li และ Wu ที่รายงานถึงการเพิ่มขึ้นของอัตราการหายใจของการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *C. reinhardtii* Cr849 กับ แบคทีเรีย L2, L3 และ L4 ที่เพิ่มขึ้น 25 เปอร์เซ็นต์, 23 เปอร์เซ็นต์ และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Li et al, 2013) และ *B. japonicum* ที่ 32 เปอร์เซ็นต์ (Wu และคณะ, 2012) ซึ่งผลการทดลองเพาะเลี้ยงร่วมทั้งหมดที่กล่าวถึงสามารถอธิบายได้ว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียช่วยลดระดับออกซิเจนในระบบผ่านการเพิ่มอัตราการหายใจของเซลล์ ส่งเสริมให้กิจกรรมของอนิไซมไฮโดรจีเนสมากขึ้นและส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนในระบบเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ



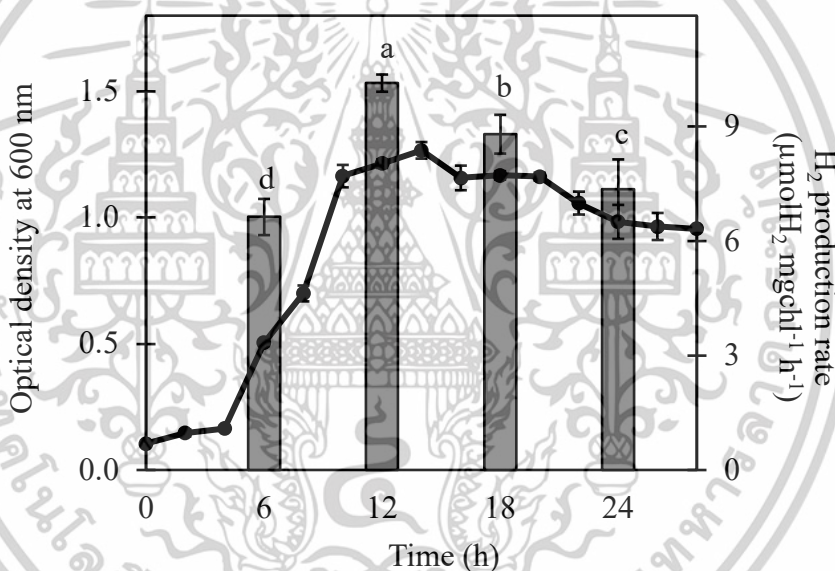
รูปที่ 4.4 อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (A) และอัตราการหายใจในที่มืด (B) หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงของ *Chlorella* sp. ChiW1 ภายใต้การเพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 และ *S. epidermidis* TISTR2307 ที่ความเข้มข้น  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ *P. aeruginosa* TISTR2141 ที่ความเข้มข้น  $5 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *Chlorella* Sp. ChiW1 ทุกกลุ่มตัวอย่างถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way Anova.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074

##### 4.5.1 ผลของอายุเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 โดยแปรผันอายุของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ดังนี้ 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ที่มีอายุ 12 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $10.13 \pm 0.48$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ  $280.77 \pm 33.95$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.5 ค่าความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Chlorella sp.* ChiW1 กับ *E. coli* TISTR074 ที่มีอายุเซลล์ต่างกัน ในอาหาร TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 บ่มภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันในรูปแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) จากการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way Anova

จากผลการทดลองพบว่า อายุของเซลล์แบคทีเรียมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sp.* ChiW1 และ *E. coli* TISTR074 โดยช่วงอายุของเซลล์แบคทีเรีย 12 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด และการผลิตลดลงเมื่อเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงร่วมมีอายุเซลล์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2 ผลของอัตราส่วนโดยปริมาตรของ *E. coli* TISTR074 ต่อ *Chlorella* sp. ChiW1 ต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 โดยแปรผันอัตราส่วนโดยปริมาตรของ *E. coli* TISTR074 ต่อ *Chlorella* sp. ChiW1 ต่างๆ พบว่า อัตราส่วนโดยปริมาตรของ *E. coli* TISTR074 ต่อ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ *E. coli* TISTR074 ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร และ *Chlorella* sp. ChiW1 ปริมาตร 4.90 มิลลิลิตร โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $10.36 \pm 0.65$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $275.08 \pm 9.16$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ตารางที่ 4.4) อัตราส่วนโดยปริมาตรของ *E. coli* TISTR074 ต่อ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ต่ำกว่าและสูงกว่านี้ ไม่สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน (ตารางที่ 4.4)

**ตารางที่ 4.4** อัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง) และผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์) ของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 โดยแปรผันอัตราส่วนโดยปริมาตรของ *E. coli* TISTR074 ต่อ *Chlorella* sp. ChiW1 ต่างๆ ในอาหาร TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 บ่มภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่ต่างกันในรูปแบบแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) จากการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way Anova

อัตราส่วนโดยปริมาตรของ <i>E. coli</i> TISTR074 ต่อ <i>Chlorella</i> sp. ChiW1	อัตราการผลิตไฮโดรเจน	ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
0.05 mL: 4.95 mL	$6.09 \pm 0.62^c$	$175.06 \pm 16.79^c$
0.10 mL: 4.90 mL	$10.36 \pm 0.65^a$	$275.08 \pm 9.16^a$
0.50 mL: 4.50 mL	$9.03 \pm 0.75^b$	$234.85 \pm 15.29^b$
1.00 mL: 4.00 mL	$6.62 \pm 0.49^c$	$184.17 \pm 6.74^c$
2.00 mL: 3.00 mL	$4.17 \pm 0.33^d$	$100.17 \pm 7.83^d$
3.00 mL: 2.00 mL	$3.29 \pm 0.22^d$	$78.96 \pm 5.32^d$

\*ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (ONE-WAY ANOVA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราส่วนโดยปริมาตรของ *E. coli* TISTR074 ต่อ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ 0.10 มิลลิลิตร ต่อ 4.90 มิลลิลิตร การเพิ่มปริมาตรของสาหร่ายสีเขียวและลดปริมาตรของแบคทีเรียอาจทำให้เซลล์สาหร่ายมีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น ได้ออกซิเจนสูงขึ้น แต่แบคทีเรียนำไปใช้ในกระบวนการหายใจได้น้อย จึงทำให้มีระดับของออกซิเจนที่สูง ออกซิเจนนี้จะเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ในขณะที่เมื่อลดปริมาตรของสาหร่ายสีเขียวแต่เพิ่มปริมาตรของแบคทีเรีย จะทำให้สาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงลดลง อิเล็กตรอนที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงลดลงเช่นกัน ดังนั้น การเพาะเลี้ยงร่วมกันจึงต้องมีอัตราส่วนโดยปริมาตรของแบคทีเรียต่อสาหร่ายที่เหมาะสม จึงสามารถช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อัตราส่วนโดยปริมาตรของแบคทีเรียต่อสาหร่ายนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและเมแทบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียวและแบคทีเรีย มีรายงานพบว่า การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *Chlorella vulgaris* กับแบคทีเรียในภาชนะกอนจูลินทรีที่อัตราส่วน 1:1.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 45 เปอร์เซ็นต์ (Javed และคณะ, 2022) การเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *C. reinhardtii* กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มีอัตราส่วนของแบคทีเรียต่อสาหร่ายที่เหมาะสมอยู่ที่ 1:80 ซึ่งช่วยเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 4 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยว และพบว่าการลดอัตราส่วนของแบคทีเรียทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Li และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตาม หากอัตราส่วนของแบคทีเรียสูงเกินไป อาจเกิดผลกระทบจากการบดบังแสง ทำให้การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายลดลง (Kim และคณะ, 2005)

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบเพาะเลี้ยงร่วมกันคือ อายุของเซลล์และอัตราส่วนโดยปริมาตรของแบคทีเรียต่อสาหร่าย การควบคุมความหนาแน่นของแบคทีเรียให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เป็นสิ่งจำเป็นในการสร้างสมดุลของระบบและป้องกันผลกระทบด้านลบที่อาจเกิดขึ้นกับประสิทธิภาพของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและความอยู่รอดของเซลล์สาหร่าย โดยพบว่าเมื่อความหนาแน่นของแบคทีเรียต่ำ อัตราการผลิตไฮโดรเจนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เมื่อใช้ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่สูงเกินไป แบคทีเรียจะปล่อยของเสียที่ส่งผลเสียต่อเซลล์สาหร่าย เช่น กรดอะซิติกและกรดแลคติก เป็นต้น (Fakhimi และคณะ, 2019) ที่สะสมในปริมาณมาก อาจทำให้ pH ลดลง จนเป็นกรด ส่งผลให้สาหร่ายเจริญเติบโตช้าหรือหยุดการสังเคราะห์แสง มีรายงานวิจัยที่สนับสนุนความสำคัญของการกำหนดอัตราส่วนที่เหมาะสมของแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในการเพาะเลี้ยงร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน (Wu และคณะ, 2012)

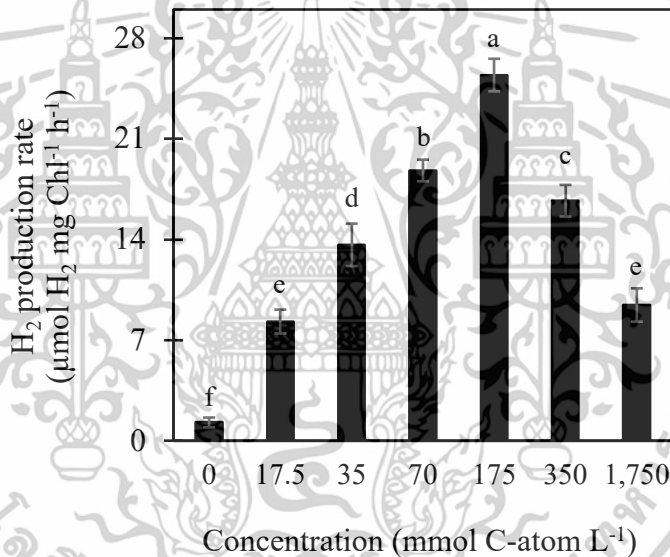
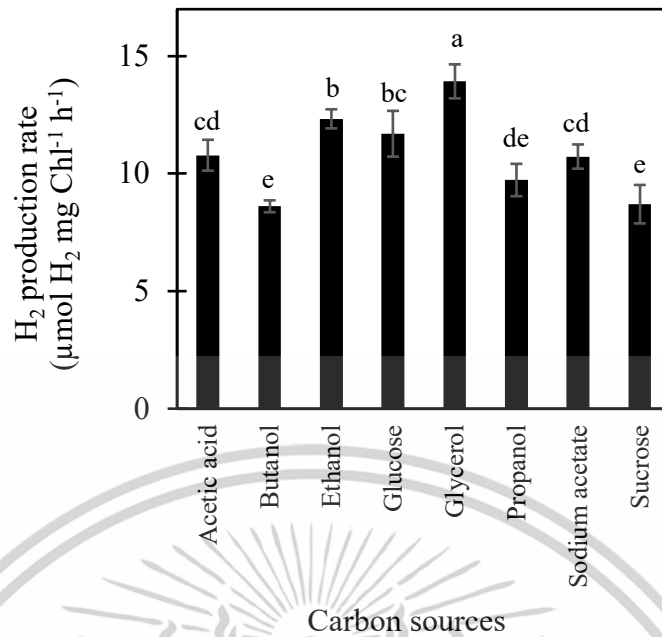
#### 4.5.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ในอาหารที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนอะตอมเท่ากันคือ 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตรพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหาร TAP ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ  $13.93 \pm 0.72$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.5A) รองลงมา ในอาหาร TAP ที่มีเอทานอล กลูโคส และกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.5A) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหาร TAP ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $1,353.27 \pm 12.11$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.5A) ผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนสูงกว่าเมื่อใช้กรดอะซิติกและกลูโคสประมาณ 1.3 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ จึงคัดเลือกกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074

จากการแปรผันความเข้มข้นของกลีเซอรอลจาก 0 ถึง 1,750 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตรพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ในอาหาร TAP ที่มีกลีเซอรอล 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $25.44 \pm 1.13$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับความเข้มข้นปกติ (รูปที่ 4.5B) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่น้อยกว่าหรือมากกว่า 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย

โดยปกติ กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายเขียว (González-Ballester และคณะ, 2017) กรดอะซิติกมีความสำคัญในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากการดูดซึมกรดอะซิติกของสาหร่ายช่วยรักษาระดับออกซิเจนในระบบให้อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการกระตุ้นและรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเจนเนส นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า กรดอะซิติกช่วยเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนโดยไม่อาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ผ่านทางระบบแสงสองของ *C. reinhardtii* strain 704 (Fakhimi และคณะ, 2019) (Jurado-Oller และคณะ, 2015) อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่พบเมื่อใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนคือ การดูดซึมกรดอะซิติกโดยสาหร่ายเขียวที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้กรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดไปอย่างรวดเร็ว ทำให้ระยะเวลาที่มีระดับออกซิเจนต่ำในระบบนั้นจำกัด และอาจส่งผลกระทบต่อระยะเวลาของการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

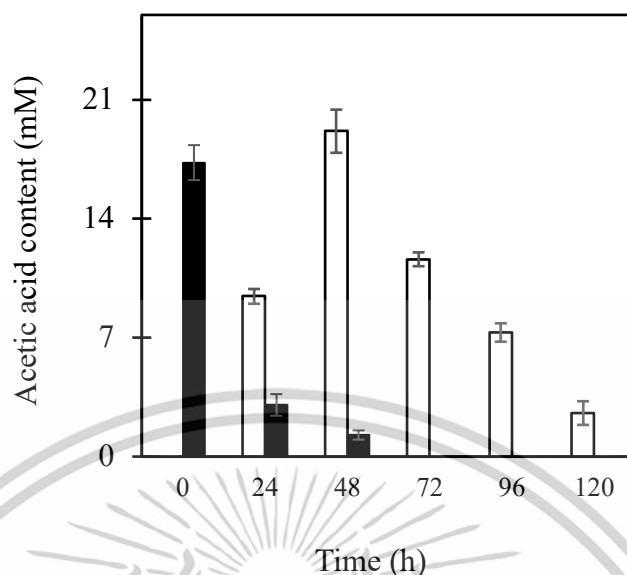


รูปที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* Sp. Chiw1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้ความเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมเท่ากัน คือ 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (A) และ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* Sp. Chiw1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของคาร์บอนอะตอมในกลีเซอรอล จาก 0 ถึง 1,750 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (B) บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่มีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยใช้การวิเคราะห์ ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way Anova)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้พบว่า กลีเซอรอลจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเมแทบอลิซึมกลีเซอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพและผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และได้กรดอินทรีย์อื่นเป็นผลผลิตพลอยได้ (Murarka และคณะ, 2007) ดังนั้น จึงช่วยขยายระยะเวลาให้มีกรดอะซิติกคงอยู่ในระบบให้นานขึ้น จากสมมุติฐานนี้ จึงได้ทำการศึกษาปริมาณกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้อาหาร TAP ที่มีกรดอะซิติกและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้อาหาร TAP ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 สามารถใช้กรดอะซิติกได้อย่างรวดเร็วและหมดไปภายใน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (รูปที่ 4.6) ตรงข้ามกับเมื่อใช้อาหาร TAP ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 และแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 สามารถใช้กลีเซอรอลและเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ โดยจะพบกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 24 และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 จากนั้น ปริมาณกรดอะซิติกจะลดลงเรื่อยๆ แต่ยังคงมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแม้จะบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (รูปที่ 4.6) ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า กรดอะซิติกจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* ร่วมกับ *E. coli* แต่หากใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ เช่น กลูโคส จะช่วยทำให้ปริมาณของกรดอะซิติกยังมีในระบบนานขึ้น ซึ่งจะช่วยรักษาปริมาณออกซิเจนในระบบและเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนถึงสามเท่า จาก 7.3 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อวัน เป็น 21.0 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อวัน (Fakhimi และคณะ, 2019) แคมทีเรีย *E. coli* มีบทบาทสำคัญในคาร์โบไฮเดรตเมแทบอลิซึม โดยการแปลงสารประกอบอินทรีย์ เช่น กลีเซอรอล ให้เป็นกรดอะซิติก อย่างต่อเนื่อง ซึ่งทำให้กรดอะซิติกคงอยู่ในระบบเป็นเวลานานขึ้น และผลิตไฮโดรเจนได้นานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ปริมาณกรดอะซิติกจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (แท่งสีดำ) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 35 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร (แท่งสีขาว) ที่ค่าพีเอช 7.2 ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

#### 4.5.4 ผลของพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074

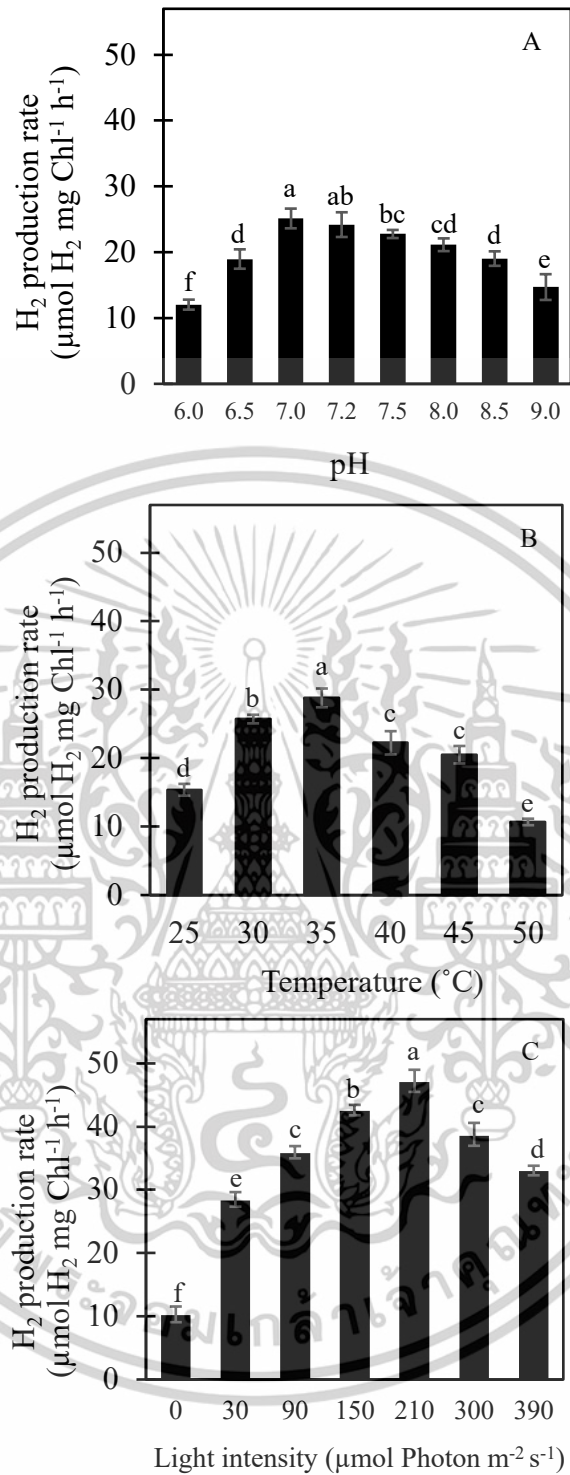
จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากพีเอช 6.0 ถึง 9.0 พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหารที่มีค่าพีเอช 7.0 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $25.15 \pm 0.97$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.7A) และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสถานะควบคุมที่พีเอช 7.2 ซึ่งให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $24.21 \pm 0.62$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง แต่การผลิตไฮโดรเจนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่พีเอชต่ำหรือสูงกว่าพีเอช 7.0 และ 7.2 ทั้งนี้เนื่องจากพีเอชที่สูงและต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสม ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสลดลง มีรายงานพบว่า ความเหมาะสมของค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายชนิดต่างๆ (Mandotra และคณะ, 2023) สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 เพื่อศึกษาผลของค่า pH ต่อการไหลของไอออนโปรตอนไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ผลการทดลองพบว่า การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (เพิ่มขึ้น 24% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) เกิดขึ้นที่ค่า pH 6.5 (Maneeruttanarungroj และคณะ, 2017) ในการศึกษาอีกฉบับที่ใช้สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ภายใต้ภาวะขาดซัลเฟอร์ พบว่า การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเกิดขึ้นที่ค่า pH 7.7 (Kosourov และคณะ, 2002) นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยพบว่าในอาหารที่มีค่าพีเอชต่ำ แบคทีเรียจะย่อยกลูโคสและเกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นอันตรายต่อสาหร่าย และทำให้ผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างรวดเร็ว ในการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Chlorella vulgaris* และแบคทีเรียจากตะกอนจุลินทรีย์ ค่าพีเอชที่ต่ำมากเกินไปจะส่งผลให้เซลล์สาหร่ายแตกตัวและคลอโรฟิลล์เสื่อมสภาพ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอัตราส่วนแบคทีเรียต่อสาหร่ายเท่ากับ 1:1.5 พบว่า คลอโรฟิลล์ลดลงจาก 12.874 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 1.603 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าพีเอชจะลดลง จนเข้าสู่ช่วงพีเอชที่เป็นกรดในวันที่ 4 ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนหยุดลง การปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนได้ (Skjånes และคณะ, 2008)

จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันอุณหภูมิของการบ่มตั้งแต่ 25 ถึง 50 องศาเซลเซียส พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $28.82 \pm 1.37$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.7B) อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพ (Denaturation) ในขณะที่อุณหภูมิต่ำทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมช้าลง (Song และคณะ, 2011) นอกจากนี้ เมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 40 องศาเซลเซียส ความมีผลกระทบต่อเซลล์อย่างมาก ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ในขณะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส ทำให้ระยะเวลาปรับตัวของเซลล์ยืดเยื้อและลดประสิทธิภาพการผลิตลงอย่างชัดเจน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเดี่ยวของ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ให้ผลใกล้เคียงกัน โดยแสดงอัตราการผลิตและผลผลิตสูงสุดภายใต้สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิลดลงหรือเพิ่มขึ้นจากนี้ จะส่งผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลงไป (Supakriangkrai และ Phunpruch, 2024) ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการรักษาประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนให้คงที่และมีประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.8** ผลของค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) อุณหภูมิของการบ่ม (B) และความเข้มแสง (C) ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way Anova)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มแสงเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 0 ถึง 390 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $47.06 \pm 1.95$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มภายใต้ความเข้มแสง 210 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (รูปที่ 4.7C) ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สภาวะควบคุมที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อความเข้มแสงสูงเกินไป (300 และ 390 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง 17 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.7C) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากความเข้มแสงที่สูงทำให้เกิดปรากฏการณ์ Photoinhibition คลอโรฟิลล์ลดลงและทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลให้อิเล็กตรอนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Ghirardi และคณะ, 2005) นอกจากนี้ การเพิ่มความเข้มแสงมีผลต่อกลไกภายในเซลล์ โดยไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน D1 ในระบบแสงสอง (Skjånes และคณะ, 2013) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยรักษาภาวะไร้ออกซิเจนที่จำเป็นต่อการผลิตไฮโดรเจน (Ghirardi และคณะ, 2005) มีรายงานพบว่าการเพิ่มความเข้มแสงจาก 30 เป็น 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนของ *Chlamydomonas reinhardtii* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Azotobacter chroococcum* เพิ่มขึ้นถึง 4.5 เท่า (Xu และคณะ, 2016) อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มแสงสูงเกิน 210 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าการเพิ่มความเข้มแสงในระบบเพาะเลี้ยงร่วมของ *Chlamydomonas* และแบคทีเรียไม่ได้เพิ่มการผลิตไฮโดรเจน แต่กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 12 PPFD แต่ลดลงอย่างมากที่ 100 PPFD โดยเฉพาะในระบบเพาะเลี้ยงเดี่ยวของสาหร่ายที่แทบไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เลย (Fakhimi และคณะ, 2019)

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

#### 5.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ *Chlorella* ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

ในบรรดาสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ทั้งหมด 22 สายพันธุ์ สาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 ซึ่งแยกได้จากนาข้าวในจังหวัดชัยนาท มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $5.07 \pm 0.23$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ  $169.46 \pm 7.48$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายหลังจากการบ่มในสภาวะที่มีแสงและปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 5.1.2 ผลของอายุเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1

อายุเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ 36 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลว TAP และอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นตามค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในเซลล์ที่มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 2.0 และมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $27.96 \pm 1.10 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

#### 5.1.3 การคัดเลือกชนิดและความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด คือ *E. coli* TISTR074, *P. aeruginosa* TISTR2141 และ *S. epidermidis* TISTR2307 และ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $7.50 \pm 0.20$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ  $227.98 \pm 10.49$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ChiW1 แบบเดี่ยว ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ภายใต้อุณหภูมิเดียวกัน ประมาณ 1.5 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 5.1.4 เมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนภายใต้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

##### ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่าย *Chlorella* sp. ChiW1 และแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงร่วมกันทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่เป็นเช่นนี้มาจากการลดลงของปริมาณออกซิเจนในระบบ ที่เกิดจากการลดการสังเคราะห์แสง และเพิ่มการใช้ออกซิเจนจากกระบวนการหายใจ

#### 5.1.5 สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

##### ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* TISTR074

- 1) อายุของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน คือ 12 ชั่วโมง
- 2) อัตราส่วนโดยปริมาตรของ *E. coli* TISTR074 ต่อ *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ *E. coli* TISTR074 ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร และ *Chlorella* sp. ChiW1 ปริมาตร 4.90 มิลลิลิตร
- 3) ชนิดและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน คือ กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับความเข้มข้นปกติ
- 4) พีเอชของอาหาร อุณหภูมิการบ่ม และความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli* TISTR074 เพื่อการผลิตไฮโดรเจน คือ พีเอชของอาหาร TAP 7.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 210 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที
- 5) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับ *E. coli* TISTR074 ให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเซลล์ TAP ที่ pH 7.0 ที่มีกลีเซอรอล ความเข้มข้น 175 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร บ่มภายใต้ความเข้มแสง 210 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยแสดงอัตราการผลิตและผลผลิตสูงสุดเท่ากับ  $47.06 \pm 1.95$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และ  $1320.63 \pm 52.33$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีความสามารถเฉพาะ เช่น แบคทีเรียออกซิไดซ์ซัลไฟด์ ซึ่งส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว
- 2) ศึกษาการขยายขนาดเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ChiW1 ร่วมกับแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม
- 3) ศึกษาการนำของเสียหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตมาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายและแบคทีเรีย เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน และเป็นการลดต้นทุนการผลิตไฮโดรเจนอีกด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- Alalayah, W.M., Alhamed, Y.A., Al-zahrani, A., and Edris, G. 2015 “Influence of Culture Parameters on Biological Hydrogen Production Using Green Algae *Chlorella vulgaris*.” *Revista De Chimie (Bucharest)*. 66(6): 788–791.
- Baebprasert, W., Lindblad, P., and Incharoensakdi, A. 2010. “Response of H<sub>2</sub> Production and Hox-Hydrogenase Activity to External Factors in the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 35(3): 6611–6616. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.047>
- Basak, N., and Das, D. 2007. “The Prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production: The Present State of the Art.” *World Journal Microbiol Biotechnol*. 23: 31–42. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9190-9>
- Becker EW. 1994. “Microalgae: Biotechnology and Microbiology.” Cambridge: Cambridge University Press.
- Benemann, J.R., Berenson, J.A., Kaplan, N.O., and Kamen M.D. 1973. “Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system”. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*. 70(8): 2317-2320. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2317>.
- Carvalho, A.P., Silva, S.O., Baptista, J.M., and Malcata, F.X. 2011. “Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89:1275–1288. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>
- Cohen, J., Kim, K., Posewitz, M., Ghirardi, M.L., Schulten, M. and King, P. 2005. “Molecular dynamics and experimental investigation of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> diffusion in [Fe]-hydrogenase”. *Biochemical Society Transactions*. 33(1): 80-82. Doi: <https://doi.org/10.1042/BST0330080>
- Chylla, R.A. and Whitmarsh, J. 1989. “Inactive photosystem II complexes in leaves. Turnover rate and quantitation.” *Plant Physiology*. 90(2): 765-772. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.90.2.765>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Das, D., Dutta, T., Nath, K., Kotay, S.M., Das, A.K., and Veziroglu, T.N. 2006. "Role of Fe-Hydrogenase in Biological Hydrogen Production." *Current Science*. 90(12): 1627–1637.
- Debabrata, D., and Veziroglu T.N. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 26(1): 13-28 Doi: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6)
- El-Shafie, M., Kambara, S., and Hayakawa, Y. 2019. "Hydrogen Production Technologies Overview." *Journal of Power and Energy Engineering*.
- Fakhimi, N., Dubini, A., Tavakol, O., and González-Ballester, D. 2019. "Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures" *Bioresource Technology*. 289: 121648-121656. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121648>
- Fakhimi, N., and Tavakol, O. 2019. "Improving hydrogen production using co-cultivation of bacteria with *Chlamydomonas reinhardtii* microalga" *Materials Science for Energy Technologies*. 2: 1–7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mset.2018.09.003>
- Fischer, M. 1986. "Safety Aspects of Hydrogen Combustion in Hydrogen Energy Systems." *International Journal of Hydrogen Energy*. 11(09): 593–601. Doi: [https://doi.org/10.1016/0360-3199\(86\)90126-6](https://doi.org/10.1016/0360-3199(86)90126-6)
- Felseghi, R.A., Carcadea, E., Raboaca, M.S., TRUFIN, C. N., and Filote, C. 2019. "Hydrogen Fuel Cell Technology for the Sustainable Future of Stationary Applications." *Energies*. 12(23): 4593. Doi: <https://doi.org/10.3390/en12234593>
- Gaffron, H. 1939. "Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae." *Nature*. 143(3614): 204-205. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/143204a0>
- Ghirardi, M.L., King, P.W., Posewitz, M.C., Maness, P.C., Fedorov, A., Kim, K., Cohen, K., Schulten, J., and Seibert, M. 2005. "Approaches to Developing Biological H<sub>2</sub>-photoproducing Organisms and Processes." *Biochemical Society Transactions*. 33(1): 70–72. Doi: <https://doi.org/10.1042/BST0330070>
- González-Ballester, D., Jurado-Oller, J.L., and Fernandez, E. 2015. "Relevance of nutrient media composition for hydrogen production in *Chlamydomonas*." *Photosynthesis Research*. 125: 395–406. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0152-7>
- Happe, T., and Naber, J.D. 1993. "Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*."

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- European Journal of Biochemistry*. 11993; 214:475-481. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17944.x>
- Harris, EH. 1989. "The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use." San Diego: Academic Press.
- Haschke, H. P. and Lüttge, U. 1975. "Interactions between IAA, potassium, and malate accumulation, and growth in *Avena* coleoptile segments. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 76: 450-455. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(75\)80007-9](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(75)80007-9)
- Hemschemeier, A., Melis, A., and Happe, T. 2009. "Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae." *Photosynthesis Research*. 102(2): 523-540. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9415-5>
- Humble, G. D. and Hsiao, T. C. 1970. "Light-dependent influx and efflux of potassium of guard cells during stomatal opening and closing." *Plant Physiology*. 46: 483-487. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.46.3.483>
- Javed, M.A., Zafar, A.M., Hassan, A.A., Zaidi, A.A., Farooq, M., Badawy, A.E., Lundquist, T., Mohamed. M.M.A., and Al-Zuhair, S. 2022. "The role of oxygen regulation and algal growth parameters in hydrogen production via biophotolysis." *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 10(1): 107003–107018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107003>
- Jurado-Oller, J.L., Dubini, A., Galván, A., Fernández, E., and González-Ballester, D. 2015. "Low Oxygen Levels Contribute to Improve Photohydrogen Production in Mixotrophic Non-stressed *Chlamydomonas* Cultures." *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 8(149). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0341-9>
- Kim, J.P., Kang, C.D., Sim, S.J., Kim, M.S., Park, T.H., Lee, D., Kim, D., Kim, J.H., Lee, Y.K., and Pak, D. 2005. "Cell Age Optimization for Hydrogen Production Induced by Sulfur Deprivation Using a Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90." *JMB Journal of Microbiolog and Biotechnology*. 15(1): 131–135.
- Khound, N. J., Phukon, P. and Bhattacharyya, K. G. 2012. "Physico-chemical studies on surface water quality in the Jia-Bharali River basin, North Brahmaputra plain, India." *Archives of applied science research*. 4: 1169-1174.
- Kosourov, S., Seibert, M. and Ghirardi, M. L. 2003. "Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- reinhardtii* cultures.” *Plant and Cell Physiology*. 44(2): 146-155. Doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg020>
- Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M., and Ghirardi, M.L. 2002. “Sustained Hydrogen Photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of Culture Parameters.” *Biotechnology and Bioengineering*. 78(7): 731–740. Doi: <https://doi.org/10.1002/bit.10254>
- Laurinavichene, T. V., Tolstygina, I. V., Galiulina, R. R., Ghirardi, M. L., Seibert, M. and Tsygankov, A. A. 2002. “Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: 1245-1249. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00101-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00101-5)
- Leigh, R. A. and Wyn Jones, R. G. 1984. “A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell.” *New Phytologist*. 97: 1-13. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb04103.x>
- Li, X., Huang, S., Yu, J., Wang, Q., and Wu, S. 2013. “Improvement of hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by co-cultivation with isolated bacteria.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(25): 10779-10787. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.102>
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P., and Incharoensakdi, A. 2010. “A Newly Isolated Green Alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with Efficient Hydrogen Production.” *International Journal of Hydrogen Energy*. 35(4): 13193–13199. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.096>
- Mandotra, S.K., Sharma, C., Srivastava, N., Ahluwalia, A.S., and Ramteke, P.W. 2023. “Current Prospects and Future Developments in Algal Bio-hydrogen Production.” *Biomass Conversion and Biorefinery*. 13: 8575–8592. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01414-z>
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2000. “Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Plant Physiology*. 122(1): 127-136. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.127>
- Memon, A. R., Saccomani, M. and Glass, A. D. M. 1985. “Efficiency of potassium utilization by barley varieties: the role of subcellular compartmentation.”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Journal of Experimental Botany*. 6: 1860-1876. Doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/36.12.1860>

Morra, S., Maurelli, S., Chiesa, M., Mulder, D.W., Ratzloff, M.W., Giamello, E., King, P.W., Gilardi, G. and Valetti, F. 2016. "The effect of a C298D mutation in CaHydA [FeFe]-hydrogenase: Insights into the protein-metal cluster interaction by EPR and FTIR spectroscopic investigation." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1857(1): 98-106

Murarka, A., Dharmadi Y., Yazdani S.S., and Gonzalez R. 2008. "Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals." *Applied and Environmental Microbiology*. 74(4): 1124-1135. Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.02192-07>

Papazi, A., Gjindali, A. I., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K., and Kotzabasis, K. 2014. "Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 39(34): 19452-19464. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.096>

Peltier, G. and Schmidt, G.W. 1991. "Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(11): 4791-4795. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4791>

Phunpruch, S., Puangplub, A., and Incharoensakdi, A. 2016. "Biohydrogen Production by Microalgae Isolated from the Rice Paddle Field in Thailand." *KKU Research Journal*. 21(2): 236-247. Doi: <https://doi.org/10.14456/kkurj.2016.33>

Pongpadung, P., Liu, J., Yokthongwattana, K., Techapinyawat, S., and Juntawong, N. 2015. "Screening for Hydrogen-Producing Strains of Green Microalgae in Phosphorus or Sulphur Deprived Medium under Nitrogen Limitation." *Science Asia*. 41(2): 97-107. Doi: <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2015.41.097>

Ritchie, M.J., Engelbrecht, J.A.A., Booyen, M.J. 2021. "A probabilistic hot water usage model and simulator for use in residential energy management." *Energy & Buildings*. 235: 110727-110738. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.110727>

Salvucci, M. E. and Crafts-Brandner, S. J. 2004. "Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis."

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Physiologia *Plantarum*. 120: 179-186. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x>
- Sapountzi, F.M., Gracia, J.M., Weststrate, C.J., Fredriksson, Hans O.A., Niemantsverdriet, J.W. 2017. “Electrocatalysts for the generation of hydrogen, oxygen and synthesis gas.” *Progress in Energy and Combustion Science*. 58: 1-35. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2016.09.001>
- Skjånes, K., Rebours, C., and Lindblad, P. 2013. “Potential for Green Microalgae to Produce Hydrogen, Pharmaceuticals and Other High Value Products in a Combined Process.” *Critical Reviews in Biotechnology*. 33(2): 172–215. Doi: <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.681625>
- Song, W., Rashid, N., Choi, W., and Lee, K. 2011. “Biohydrogen Production by Immobilized *Chlorella* sp. Using Cycles of Oxygenic Photosynthesis and Anaerobiosis.” *Bioresour Technol*. 102(18):8676–8681. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.082>
- Supakriangkrai, S., and Phunpruch, S. 2025 “Screening and optimization of high-efficiency H<sub>2</sub>-producing *Chlorella* strains” *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 13(3): 71-81. Doi: <http://dx.doi.org/10.7324/JABB.2025.220894>
- Taikhao, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, S., and Phunpruch, S. 2013. “Factors Affecting Biohydrogen Production by Unicellular Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*.” *Journal of Applied Phycology*. 25: 575–585. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9892-3>
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., Lindblad, P. 2002. “Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(1): 1-20. Doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.1-20.2002>.
- Tinpranee, N., Incharoensakdi, A., and Phunpruch, S. 2016. “Hydrogen Production by Unicellular Green Alga *Chlorella* sp. LSD-W2 Isolated from Seawater in Thailand.” *KKU Research Journal*. 22(1): 256–266. Doi: <https://doi.org/10.14456/kkurj.2016.32>
- Warichanan, K., and Phunpruch, S. 2019. “Effect of Cell Density and Nutrient Deprivation on Hydrogen Production by Unicellular Green Alga *Scenedesmus* sp. KMITL-OVG1.” *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*. 24(2): APST–24. Doi: <https://doi.org/10.14456/apst.2019.12>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wu, S., Li, X., Yu, J., and Wang, Q. 2012. "Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*." *Bioresource Technology*. 123: 184-188. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.055>
- 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(1): 129–139. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.129>
- Xu, L., Li, D., Wang, W., Wu, S. 2016. "Improved hydrogen production and biomass through the co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 41(22): 9276-9283. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.009>
- Zhang, L, Happe, T., and Melis, A. 2002. "Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga)". *Plantā*. 241(4): 1005–1014. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2231>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP) (Harris, 1989)

#### อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 15 กรัมต่อ 1 ลิตรของอาหาร

#### ส่วนประกอบ 2x Filner's Beijernicks Solution (500 มิลลิลิตร)

แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

#### ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.14	กรัม
กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	2.2	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.073	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

#### ส่วนประกอบ 1M Potassium phosphate

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1M stock	20	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 1M stock	30	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น (Agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสุทธิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก 1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP ที่ขาดแหล่งอาหารต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตร TAP	องค์ประกอบของอาหาร		
	2x Filner's Beijernicks Solution	Trace Mineral Solution	Phosphate Solution
TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S)	ใช้ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ แทน $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	ใช้ $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ แทน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ใช้ $ZnCl_2$ แทน $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ใช้ $CuCl_2$ แทน $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-
TAP ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N)	ไม่มี $NH_4Cl$	ปกติ	-
TAP ขาดแหล่งฟอสฟอรัส (TAP-P)	ปกติ	ปกติ	ใช้ $KCl$ แทน $KH_2PO_4$ และ $K_2HPO_4$
TAP ขาดแหล่ง โพแทสเซียม (TAP-K)	ปกติ	ปกติ	ใช้ $Na_2HPO_4$ แทน $KH_2PO_4$ ใช้ $NaH_2PO_4$ แทน $K_2HPO_4$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

Luria-Bertani Medium (LB) (Sambrook และ Russell, 2001)

การเตรียม Luria-Bertani Medium ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม
ทริปโตเน (Tryptone)	5	กรัม
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม

ละลายแต่ละส่วนประกอบในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

(ปรับพีเอช 6.0) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น (Agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสุทธิ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์มาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%)
2. นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาคำนวณเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3. นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
4. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในหน่วยมิลลิลิตรมาหารปริมาตรของอาหารในการเพาะเลี้ยงจะได้หน่วยเป็น “มิลลิลิตรต่อลิตร”
5. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลมาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์”
6. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลมาหารปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง”
7. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตรมาหารจำนวนชั่วโมงจะได้หน่วยเป็น “มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง”
8. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง”
9. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งมาหารจำนวนชั่วโมงจะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

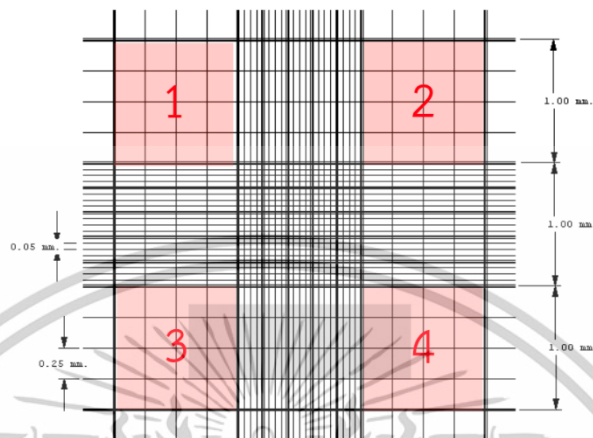
### วิธีการคำนวณปริมาณของออกซิเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์มาหาค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในหน่วยร้อยละ (%) เปรียบเทียบจากความเข้มข้นออกซิเจนในบรรยากาศปกติ
2. นำค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในหน่วยร้อยละมาคำนวณเป็นปริมาณออกซิเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3. นำปริมาณออกซิเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาคำนวณหาปริมาณออกซิเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซออกซิเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณออกซิเจน 1 มิลลิโมล
4. นำปริมาณออกซิเจนที่ได้ในหน่วยมิลลิลิตรมาหารปริมาตรของอาหารในการเพาะเลี้ยงจะได้หน่วยเป็น “มิลลิลิตรต่อลิตร”
5. นำปริมาณออกซิเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลมาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์”
6. นำปริมาณออกซิเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลมาหารปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง”
7. นำปริมาณออกซิเจนที่ได้ในหน่วยมิลลิลิตรต่อลิตรมาหารจำนวนชั่วโมงจะได้หน่วยเป็น “มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง”
8. นำปริมาณออกซิเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง”
9. นำปริมาณออกซิเจนที่ได้ในหน่วยไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งมาหารจำนวนชั่วโมงจะได้หน่วยเป็น “ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### วิธีการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์



รูปที่ ง 1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

- 1) ทำการปิเปตสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายลงในฮีโมไซโตมิเตอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
- 2) นำฮีโมไซโตมิเตอร์ที่มีสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 100 เท่า
- 3) นับจำนวนเซลล์สาหร่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ในช่องสี่แดงที่ 1, 2, 3 และ 4
- 4) หาค่าเฉลี่ยระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่อง 1, 2, 3 และ 4
- 5) ปริมาตรสารแขวนลอยในช่องสี่แดงแต่ละช่องมีค่าเท่ากับ กว้าง x ยาว x สูง (ความกว้างเท่ากับ 1 มิลลิเมตร, ความยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร และ ความลึกเท่ากับ 1 มิลลิเมตร)

ดังนั้น ปริมาตรสารแขวนลอยในช่องสี่แดงมีค่า

เท่ากับ  $1 \times 1 \times 1$  มิลลิเมตร

เท่ากับ  $0.1 \times 0.1 \times 0.1$  เซนติเมตร

เท่ากับ 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร

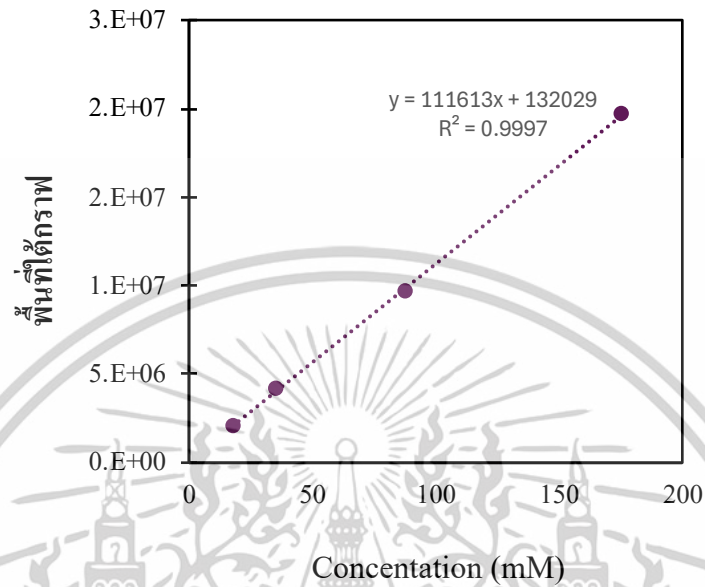
เท่ากับ  $10^{-4}$  ลูกบาศก์เซนติเมตร

ดังนั้น ปริมาณเซลล์เท่ากับจำนวนเซลล์จากการนับ  $\times 10^{-4}$  ลูกบาศก์เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ 1 กราฟมาตรฐานของกรดอะซิติก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฉ

### ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA

ชุดข้อมูลที่ตัวอักษรแตกต่างกัน คือชุดข้อมูลที่ระบุถึงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value > 0.05) และชุดข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มอักษรแตกต่างกัน คือชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05)

ตารางที่ ฉ 1 ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. แต่ละชนิดที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 22 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1)

Chlorella sp.	N	Subset for alpha = 0.05																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Chlorella sp. ChS4	3	21.2263																
Chlorella sp. LSD-W1	3	29.5965	29.5965															
Chlorella sp. KLM146	3		31.5079															
Chlorella sp. ZTK	3		33.9884	33.9884														
Chlorella sp. RSS141	3		38.7320	38.7320	38.7320													
Chlorella sp. KLM145	3			43.1220	43.1220	43.1220												
Chlorella sp. KM1L CIG	3				46.2726	46.2726												
Chlorella sp. HNR141	3				47.4775	47.4775												
Chlorella sp. WTK	3					52.3234												
Chlorella sp. SRK149	3						65.7104											
Chlorella sp. HNR147	3						69.8600	69.8600										
Chlorella sp. SWT141	3							75.9990	75.9990									
Chlorella sp. RSS147	3								83.3216	83.3216								
Chlorella sp. HNR146	3									86.0012	86.0012							
Chlorella sp. SWT146	3										93.4821	93.4821						
Chlorella sp. HNR143	3											100.6519	100.6519					
Chlorella sp. KLM144	3												108.9939					
Chlorella sp. SRK141	3													120.8188				
Chlorella sp. SWT144	3														156.9314			
Chlorella sp. SWT142	3															157.2151		
Chlorella sp. KLM143	3																157.7624	
Chlorella sp. ChW1	3																	169.4602
sig		.091	.091	.080	.105	.088	.396	.211	.056	.052	.146	.092	1.000	.873	1.000			

### Duncan<sup>a</sup>

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๒ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของผลการศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. แต่ละชนิดที่แยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 22 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1)

### Duncan<sup>a</sup>

Chlorella sp.	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Chlorella sp. KLM146	3	.4513										
Chlorella sp. Chi54	3	.6052										
Chlorella sp. WTK	3		1.0918									
Chlorella sp. RSS141	3		1.1398	1.1398								
Chlorella sp. LSD-W1	3		1.2332	1.2332								
Chlorella sp. 2TK	3			1.4162								
Chlorella sp. SWT141	3				1.7500							
Chlorella sp. KLM145	3				1.7967							
Chlorella sp. KMITL CirG	3				1.9280							
Chlorella sp. HNR141	3				1.9782							
Chlorella sp. SWT146	3					2.3010						
Chlorella sp. SWT142	3					2.3018						
Chlorella sp. HNR146	3					2.3811						
Chlorella sp. SRK149	3						2.7380					
Chlorella sp. HNR147	3						2.9108	2.9108				
Chlorella sp. SRK141	3						3.0083	3.0083				
Chlorella sp. SWT144	3							3.0636				
Chlorella sp. RSS147	3								3.4718			
Chlorella sp. KLM143	3								3.4874			
Chlorella sp. HNR143	3									4.1938		
Chlorella sp. KLM144	3										4.5414	
Chlorella sp. ChiW1	3											5.0660
sig		.091	.091	.080	.105	.088	.396	.211	.056	.052	.146	.092

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๓ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)

### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12	3	1.5379			
60	3		3.3333		
24	3		3.6964		
48	3			4.3355	
36	3				5.1205
Sig		1.000	.120	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๔ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของจำนวนเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.2	3	3.1071								
0.4	3		6.2143							
0.6	3			9.2857						
0.8	3				11.9643					
1.0	3					14.5714				
1.5	3						20.1429			
2.0	3							27.9643		
2.5	3								34.1429	
3.0	3									42.6786
<i>sig</i>		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๕ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
0.2	3	2.8507								
0.4	3		5.8727							
0.6	3			8.6093						
0.8	3				10.3523					
1.0	3					13.9907				
1.5	3						19.2833			
2.0	3							24.9600		
2.5	3								30.8280	
3.0	3									36.8440
<i>Sig</i>		1.000	1.000	.089	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๖ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)

Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.2	3	1.7500				
0.4	3		2.2749			
0.6	3			3.0600		
0.8	3			3.1232		
1.0	3			3.2302		
1.5	3				3.9962	
2.0	3				4.3219	
2.5	3				4.3658	
3.0	3					5.0709
Sig		1.000	1.000	.501	.152	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๗ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่ความหนาแน่นเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในช่วงระหว่าง 0.2-3.0 (ตารางที่ 4.2)

Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0.2	3	57.0217					
0.4	3		71.7378				
0.6	3			96.2469			
0.8	3				116.0218		
1.0	3				126.1633		
1.5	3				127.3478		
2.0	3					142.7251	
2.5	3					152.3931	
3.0	3						169.5970
Sig		1.000	1.000	1.000	.093	.128	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๘ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของการอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียความหนาแน่นเซลล์ต่างๆ (ตารางที่ 4.2)

Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (1x10 <sup>9</sup> )	3	4.5883				
ChiW1	3	4.9416				
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (1x10 <sup>8</sup> )	3	5.0640	5.0640			
Co-culture with <i>E. coli</i> (1x10 <sup>9</sup> )	3	5.0803	5.0803			
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (1x10 <sup>8</sup> )	3	5.0999	5.0999			
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (5x10 <sup>8</sup> )	3	5.1796	5.1796	5.1796		
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (1x10 <sup>9</sup> )	3	5.3681	5.3681	5.3681		
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (2x10 <sup>8</sup> )	3		5.7365	5.7365	5.7365	
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (2x10 <sup>8</sup> )	3		5.7487	5.7487	5.7487	
Co-culture with <i>E. coli</i> (1x10 <sup>8</sup> )	3			5.9325	5.9325	
Co-culture with <i>E. coli</i> (5x10 <sup>8</sup> )	3				6.2697	
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (5x10 <sup>8</sup> )	3				6.3692	
Co-culture <i>E. coli</i> (2x10 <sup>8</sup> )	3					7.4945
<i>Sig</i>		.052	.086	.053	.103	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๑ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียความหนาแน่นเซลล์ต่างๆ (ตารางที่ 4.2)

Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (1x10 <sup>9</sup> )	3	162.6812						
ChiW1	3	168.5433	168.5433					
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (1x10 <sup>8</sup> )	3	169.8131	169.8131	169.8131				
Co-culture with <i>E. coli</i> (1x10 <sup>9</sup> )	3	178.7682	178.7682	178.7682	178.7682			
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (1x10 <sup>8</sup> )	3	181.4608	181.4608	181.4608	181.4608	181.4608		
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (5x10 <sup>8</sup> )	3		186.2126	186.2126	186.2126	186.2126		
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (1x10 <sup>9</sup> )	3		187.3845	187.3845	187.3845	187.3845		
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (2x10 <sup>8</sup> )	3			190.3615	190.3615	190.3615	190.3615	
Co-culture with <i>S. epidermidis</i> (2x10 <sup>8</sup> )	3			190.3958	190.3958	190.3958	190.3958	
Co-culture with <i>E. coli</i> (1x10 <sup>8</sup> )	3				192.1699	192.1699	192.1699	
Co-culture with <i>E. coli</i> (5x10 <sup>8</sup> )	3					201.0071	201.0071	
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i> (5x10 <sup>8</sup> )	3						209.1412	
Co-culture <i>E. coli</i> (2x10 <sup>8</sup> )	3							227.9818
Sig		.069	.073	.053	.202	.066	.069	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๐ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ChiW1	3	1.5379		
Co-culture with <i>S. epidermidis</i>	3		3.3333	
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i>	3		3.6964	
Co-culture <i>E. coli</i>	3			4.3355
<i>Sig</i>		1.000	.120	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๑๑ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตออกซิเจนในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 กับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Co-culture <i>E. coli</i>	3	.0422	
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i>	3	.0507	
Co-culture with <i>S. epidermidis</i>	3	.0613	
ChiW1	3		.2219
<i>Sig</i>		.383	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๒ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการสังเคราะห์แสงในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 กับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ChiW1	3	8.6933		
Co-culture with <i>S. epidermidis</i>	3	9.3333	9.3333	
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i>	3		9.6267	
Co-culture <i>E. coli</i>	3			10.5867
<i>Sig</i>		.135	.469	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๑๓ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการหายใจในระบบการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 กับแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Co-culture <i>E. coli</i>	3	5.3813		
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i>	3		6.9067	
Co-culture with <i>S. epidermidis</i>	3			7.7867
ChiW1	3			8.6267
<i>Sig</i>		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๔ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอายุของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 (ตารางที่ 4.2)

Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Co-culture <i>E. coli</i>	3	6.6280		
Co-culture with <i>P. aeruginosa</i>	3	7.3507		
Co-culture with <i>S. epidermidis</i>	3		8.7957	
ChiW1	3			10.1339
<i>Sig</i>		.058	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๑๕ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียในอัตราส่วนต่างๆ (ตารางที่ 4.2)

Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
3.00 mL: 2.00 mL	3	3.7311			
2.00 mL: 3.00 mL	3	4.1737			
0.05 mL: 4.95 mL	3		6.0883		
1.00 mL: 4.00 mL	3		6.6197		
0.50 mL: 4.50 mL	3			9.0299	
0.10 mL: 4.90 mL	3				10.2448
<i>Sig</i>		.343	.258	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๖ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียในแหล่งคาร์บอนต่างๆ (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Butanol	3	8.6156				
Sucrose	3	8.7057				
Propanol	3	9.7332	9.7332			
Acetic acid	3		10.7313	10.7313		
Sodium acetate	3		10.7875	10.7875		
Glucose	3			11.7011	11.7011	
Ethanol					12.3361	
Glycerol						13.9312
<i>Sig</i>		.068	.083	.109	.260	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๑๗ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่ใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
0 mM	3	1.2797					
17.5 mM	3		8.2983				
1,750 mM	3		9.4491				
35 mM	3			13.6308			
350 mM	3				16.6998		
70 mM	3					18.8070	
175 mM	3					25.4428	
<i>Sig</i>		1.000	.192	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๘ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ค่าพีเอชต่างๆ (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
pH 6.0	3	12.0541					
pH 9.0	3		14.4633				
pH 6.5	3		14.7254				
pH 8.5	3			18.9855			
pH 8.0	3			19.0537			
pH 7.5	3			21.1542	21.1542		
pH 7.2	3				22.7880	22.7880	
pH 7.0	3					24.2111	24.2111
<i>Sig</i>							25.1486

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๑๙ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (องศาเซลเซียส) (ตารางที่ 4.2)

#### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
25	3	15.3999				
50	3		18.1962			
45	3			20.5237		
40	3			22.2605		
30	3				25.7318	
35	3					28.8243
<i>Sig</i>		1.000	1.000	.094	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑๒๐ ผลการทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA ของ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. ChiW1 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและบ่มที่ความเข้มแสงต่างๆ (ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) (ตารางที่ 4.2)

### Duncan<sup>a</sup>

OD <sub>750</sub>	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0		8.8363					
30	3		22.6996				
390	3			26.3880			
90	3				28.6858		
300	3				30.8719		
150	3					34.0243	
210	3						37.6450
<i>Sig</i>		1.000	1.000	1.000	.051	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายธนิทร ศุภกรียงไกร
วัน เดือน ปีเกิด	24 ตุลาคม 2541
ที่อยู่ปัจจุบัน	14/1 ซอยเพชรเกษม 79 ถนนเพชรเกษม แขวงหนองค้างพลู เขตหนองแขม กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	(2563) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.55 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย RA/TA ระดับบัณฑิตศึกษา
ผลงานทางวิชาการ	Supakriangkrai, S., and Phunpruch, S. 2025 “Screening and optimization of high-efficiency H <sub>2</sub> -producing <i>Chlorella</i> strains” <i>Journal of Applied Biology &amp; Biotechnology</i> . 13(3): 71-81.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้