การปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

OPTIMIZATION FOR ENHANCED HYDROGEN PRODUCTION BY *Bumileriopsis peterseniana*

นางสาวศิริพร ขำมะลังค์

นางสาวปัณชิกา ตีหล้า

นางสาวสุกัญญา สุขเกษม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

OPTIMIZATION FOR ENHANCED HYDROGEN PRODUCTION BY *Bumileriopsis peterseniana*

T149323

นางสาวศิริพร ขำมะลังค์
นางสาวปัณชิกา ตีหล้า
นางสาวสุกัญญา สุขเกษม

เลขหมู่
เลขทะเบียน 149323
วัน. เดือน. ปี 12 มิ.ย. 2561
b. 12882008
i.

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMIZATION FOR ENHANCED HYDROGEN PRODUCTION BY *Bumileriopsis peterseniana*

SIRIPORN KHAMMALANG
PUNCHIKA TEELA
SUKANYA SUKKASEM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACEDEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

OPTIMIZATION FOR ENHANCED HYDROGEN PRODUCTION BY *Bumileriopsis peterseniana*

ชื่อนักศึกษา นางสาวศิริพร ขำมะลังค์ 56050761

นางสาวปัณชิกา ตีหล้า 56050762

นางสาวสุกัญญา สุขเกษม 56050770

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ปณัตดา ยอดแสง

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.เอกรัฐ เดชศรี ประธานกรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร.ปณัตดา ยอดแสง กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

ชื่อนักศึกษา นางสาวศิริพร ขำมะลังค์ 56050761
นางสาวปัณชิกา ตีหล้า 56050762
นางสาวสุกัญญา สุขเกษม 56050770

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ปณัตดา ยอดแสง

บทคัดย่อ

Bumileriopsis peterseniana เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก คัดแยกได้จากน้ำเสียกากส่าน้ำตาลจากโรงงานผลิตเอทานอล จังหวัดราชบุรี เบื้องต้นพบว่าสาหร่ายสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนให้ได้ปริมาณสูง โดยเริ่มจากการศึกษาความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด (Tris-Acetate-Phosphate: TAP และ Tris-Phosphate-Hydrochloric: TP-HCl) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองพบว่า *Bumileriopsis peterseniana* สามารถเจริญได้ทั้งอาหาร TAP และ TP-HCl แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายดังกล่าวเป็น mixotroph สาหร่ายชนิดนี้จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่ออยู่ในอาหาร TAP เท่านั้นโดยจะผลิตได้สูงสุด 0.39 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งภายใน 26 ชั่วโมง ทำการแปรพารามิเตอร์ของอายุเซลล์ 23 ชั่วโมง ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ และความขุ่นเริ่มต้นเป็น 0.2 พบว่าจะให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนเป็น 0.034, 0.24 และ 0.46 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ เมื่อทดสอบการผลิตแบบต่อเนื่องโดยใช้ทุกตัวแปรพบว่าสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดภายใน 29 ชม. ที่ 8.33 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 21.4 เท่าเมื่อเทียบกับการวัดครั้งแรก การศึกษาครั้งนี้จึงได้เปิดโอกาสสำหรับกับการผลิตไฮโดรเจนในระดับใหญ่ขึ้นต่อไป

คำสำคัญ : การปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *Bumileriopsis peterseniana*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimization for Enhanced Hydrogen Production by *Bumileriopsis peterseniana*		
Students	Miss. Siriporn	Khammalang	56050761
	Miss. Punchika	Teela	56050762
	Miss. Sukanya	Sukkasem	55050770
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Environmental Chemistry		
Academic Year	2016		
Advisor	Dr.Cherdsak	Maneeruttanarungroj	
Co-Advisor	Dr.Panutda	Yodsang	

ABSTRACT

Bumileriopsis peterseniana is a green microalga isolated from molasses waste water in Ratchaburi ethanol production industry. Our preliminary result suggested that this alga has the hydrogen production capacity. Thus, this study focuses on hydrogen production optimization starting with optimization in 2 media (Tris-Acetate-Phosphate: TAP and Tris-Phosphate-Hydrochloric: TP-HCl) on growth and hydrogen production. The results indicated that *Bumileriopsis peterseniana* could grow in both TAP and TP-HCl media suggesting belonging as mixotroph. This alga could only produce hydrogen when in TAP medium yielding 0.39 μmol/mg DW within 26 h. Parameter optimization with 23-h culture age, light intensity of 1,500 lux and starting optical density of 0.2 resulted in production of 0.034, 0.24 and 0.46 μmol/mg DW, respectively. We further extended the experiment to continuously produce the gas with those optimized parameters. the maximum production was obtained within 29 h yielding 8.33 μmol/mg DW which was 21.4 folds above our preliminary rate. This high production rate makes *Bumileriopsis peterseniana* as the interesting strain for large scale hydrogen production in the future.

Keywords: Hydrogen production optimization, green algae, *Bumileriopsis peterseniana*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้ความช่วยเหลือ เสนอแนะ แก้ไข ปรับปรุง ให้ความอนุเคราะห์ และเอาใจใส่ในรายละเอียดของการทำโครงงานพิเศษอย่างใกล้ชิด

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เอกรัฐ เดชศรี ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ข้อเสนอแนะ

ขอขอบพระคุณ ดร.ปณัตดา ยอดแสง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานพิเศษที่ให้ความช่วยเหลือ เสนอแนะ แก้ไขปรับปรุง ให้ความอนุเคราะห์ และเอาใจใส่ในรายละเอียดของการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี ที่ให้ความรู้และความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือในการศึกษา และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและเอื้ออำนวยในทุกๆด้าน

ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์การวิเคราะห์ทางชีววิทยา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำ ให้ความรู้ อีกทั้งช่วยสนับสนุนในการทำ โครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำสำนึกในพระคุณของทุกๆท่าน และขอถือโอกาสนี้กราบขอบพระคุณทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ ให้กำลังใจและคำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษนี้มาโดยตลอด

ศิริพร ขำมะลังค์
ปัณชิกา ตีหล้า
สุกัญญา สุขเกษม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
คำย่อและสัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไฮโดรเจน	3
2.1.1 คุณสมบัติของไฮโดรเจน	3
2.1.2 แหล่งที่มาของพลังงานไฮโดรเจน	4
2.2 การผลิตไฮโดรเจน	4
2.2.1 การสลายตัวด้วยความร้อน	4
2.2.2 กระบวนการเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง	5
2.2.3 การรีฟอร์มมีเทน	5
2.2.4 การรีฟอร์มด้วยพลาสมา	6
2.2.5 กระบวนการไอน้ำ-เหล็ก	6
2.2.6 การแยกสลายด้วยไฟฟ้า	6
2.2.7 การแยกกรองด้วยไฟฟ้า	7
2.2.8 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ	8
2.2.9 การผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก	8
2.2.10 การแยกด้วยเมมเบรน	9
2.2.11 การสังเคราะห์ด้วยแสง	9
2.2.11.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง	9
2.2.11.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 สาหร่ายสีเขียว 11
2.3.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว 11
2.3.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์ 12
2.3.3 ระยะของการเจริญเติบโตของสาหร่าย 13
2.4 การสังเคราะห์ด้วยแสง 14
2.4.1 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง 14
2.5 การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่าย 18
2.5.1 การวัดโดยตรง 18
2.5.2 การวัดประชากรสาหร่ายโดยอ้อม 18
2.6 เทคนิคของการทำเชื้อให้บริสุทธิ์ 18
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย 19
2.7.1 ชนิดของจุลสาหร่าย 19
2.7.2 ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมภายนอก 19
2.8 เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี 20
2.8.1 หลักการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี 20
2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 21
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 26
3.1 สารเคมี 26
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 27
3.3 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl 27
3.4 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร TP-HCl 28
3.5 การวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหาร TAP และ TP-HCl 29
3.6 การวัดอายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ต่อการผลิตไฮโดรเจน.. 30
3.7 การวัดความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* 31
3.8 การวัดความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* 32
3.9 การวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้จากการปรับสภาวะให้เหมาะสม 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 34
4.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl 34
4.2 ผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร TP-HCl 35
4.3 ผลการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหาร TAP และ TP-HCl 36
4.4 ผลการวัดอายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ต่อการผลิตไฮโดรเจน 37
4.5 ผลการวัดความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* 38
4.6 ผลการวัดความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* 40
4.7 ผลการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้จากการปรับสภาวะให้เหมาะสม. 41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 43
5.1 สรุปผลการวิจัย 43
5.2 ข้อเสนอแนะ 44
เอกสารอ้างอิง 45
ภาคผนวก 49
ภาคผนวก ก วิธีการเลี้ยงสาหร่าย 50
ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณ 53
ภาคผนวก ค เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์และการทดลอง 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย 19
ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ..... 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ไอโซโทป 3 ชนิด ของไฮโดรเจน 4
รูปที่ 2.2 การสลายตัวด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา 5
รูปที่ 2.3 การเคลื่อนที่ของไอออน และการเกิดปฏิกริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า 7
รูปที่ 2.4 การเคลื่อนที่ของไอออน และเซลล์เคมีไฟฟ้าในกระบวนการแยกกรองด้วยไฟฟ้า 7
รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ 8
รูปที่ 2.6 กระบวนการหมักสารอินทรีย์ 9
รูปที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง 11
รูปที่ 2.8 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. 11
รูปที่ 2.9 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์ *Spirogyra* sp. 12
รูปที่ 2.10 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย 13
รูปที่ 2.11 แสดงการดูดแสงสีต่าง ๆ ของคลอโรพลาสต์ 15
รูปที่ 2.12 การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ 17
รูปที่ 2.13 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช 17
รูปที่ 2.14 ส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ 21
รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* , *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl 35
รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TP-HCl 36
รูปที่ 4.3 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหาร TAP และ TP-HCl 37
รูปที่ 4.4 อายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ต่อการผลิตไฮโดรเจน 38
รูปที่ 4.5 ความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* 39
รูปที่ 4.6 ความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* 40
รูปที่ 4.7 ความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* 41
รูปที่ ข-1 ตัวอย่างการแสดงผลพีคไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน 54
รูปที่ ข-2 ตัวอย่างการแสดงผลพีคไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน 54
รูปที่ ค-1 เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ ค-2 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ..... 58
รูปที่ ค-3 ตู้ปลอดเชื้อ..... 59
รูปที่ ค-4 เครื่องชั่ง..... 60
รูปที่ ค-5 เครื่องปั่นเหวี่ยง..... 61
รูปที่ ค-6 ไมโครปิเปต..... 62
รูปที่ ค-7 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ..... 63
รูปที่ ค-8 ตู้บ่มเชื้อ..... 64
รูปที่ ค-9 ตู้ดูดควัน..... 65
รูปที่ ค-10 เครื่องวัดความเข้มแสง..... 66
รูปที่ ค-11 ตู้อบ..... 67
รูปที่ ค-12 ไมโครเวฟ..... 68
รูปที่ ค-13 ตู้เย็น..... 69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TAP	ทริสอะซิเตตฟอสเฟต
TP-HCl	ทริสฟอสเฟตไฮโดรคลอริก
mL	มิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
mL/g	มิลลิลิตรต่อกรัม
mL/h	มิลลิลิตรต่อชั่วโมง
g/L	กรัมต่อลิตร
PSI	ระบบแสง1
PSII	ระบบแสง2
V	โวลต์
µL	ไมโครลิตร
UV	อัลตร้าไวโอเลต
mg/mL	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
mV	มิลลิโวลต์
OD	ค่าการดูดกลืนแสง
OD_{730}	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร
g	กรัม
µmolH_2/mgcell/hr	ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมของเซลล์ต่อชั่วโมง
lux	ลักซ์
rpm	รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สถานการณ์ความต้องการใช้พลังงานของโลกรวมถึงประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ปัจจุบันมีการเติบโตของภาคอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง ผลกระทบที่ตามมาคือ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลต่างๆ เช่น ปิโตรเลียม ก๊าซธรรมชาติและถ่านหินที่ปล่อยออกมาจากภาคอุตสาหกรรมและระบบขนส่งที่เพิ่มขึ้นอันเป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน ดังนั้นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) อย่างพลังงานไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายสีเขียว จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำ อีกทั้งยังเป็นพลังงานสะอาดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ชนิดของแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามปริมาณของแร่ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก (macronutrients) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุล ซึ่งเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ได้แก่ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนซึ่งมีความสำคัญในการสังเคราะห์แสงและเป็นสารอาหารหลักซึ่งอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นด้วย เช่น ความเข้มของแสง และอุณหภูมิ เป็นต้น

สิ่งมีชีวิตที่เลือกใช้ในงานวิจัยคือสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่ถูกค้นพบจากน้ำเสียส่าน้ำตาลที่เก็บตัวอย่างมาจากโรงงานผลิตเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจเนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ดังนั้นการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะส่งผลให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* เพื่อใช้ในการปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาสภาวะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* เปรียบเทียบกับ *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหารเพาะเลี้ยง
2) เพื่อศึกษาการปรับสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่เหมาะสมกับสาหร่าย *Bumileriopsis petersenaina*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาคือ *Bumileriopsis peterseniana* จากน้ำเสียส่าน้ำตาลที่เก็บตัวอย่างมาจากโรงงานผลิตเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ถูกนำมาเตรียมและเก็บรักษาเป็นหัวเชื้อ (stock culture) ในอาหารสูตร TAP
2) วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl ที่ถูกเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการวัดความขุ่นของสารละลายเซลล์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer UV-Visible 730 nm (OD_{730}) ทุกๆ 6 ชั่วโมง
3) ศึกษาอายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* , *Tetraspora* sp.CU2551 และ *Chlamydomonas Reinhardtii* ต่อการผลิตไฮโดรเจน
4) ศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย
5) ศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย
6) วัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้จากการปรับสภาวะให้เหมาะสมดังข้อ 3 4 และ 5 ตามลำดับ โดยทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Gas-Chromatography คอลัมน์ Molecular sieve 13x ดีเทคเตอร์ Thermal Conductivity Detector (TCD)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* เปรียบเทียบกับ *Tetraspora* sp.CU2551 และ *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหารเพาะเลี้ยง
2) ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis petersenaina*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานสะอาดที่สามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุด เป็นสสารที่ให้พลังงานสูงและผลจากการเผาผลาญไฮโดรเจน ไม่ว่าจะด้วยการเผาไหม้โดยตรงหรือโดยปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมีในเซลล์เชื้อเพลิงต่างก็ให้ผลิตผลเป็นไอน้ำและก๊าซออกซิเจน คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจนคือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ

2.1.1 คุณสมบัติของไฮโดรเจน

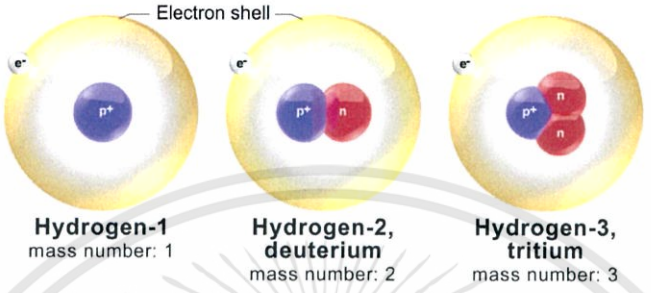
ไฮโดรเจนเป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอม 1 สัญลักษณ์ธาตุคือ H มีน้ำหนักอะตอมเฉลี่ย 1.00794 กรัมต่อโมล มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เป็นธาตุที่เบาที่สุดและพบมากที่สุดในเอกภพ โดยในบรรยากาศมีแก๊สไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน พลังงานพันธะสูงเท่ากับ 436 กิโลจูลต่อโมล ต้องใช้พลังงานสลายพันธะระหว่างอะตอมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา เช่น เพิ่มอุณหภูมิ หรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนมีจุดเดือด -252.87 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว -259.14 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ไฮโดรเจนมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงถึง 3,000 องศาเซลเซียส ให้พลังงานความร้อน 2,870 กิโลแคลอรีต่อกิโลกรัม ซึ่งค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอล ถึง 2.5 และ 5 เท่า ตามลำดับ

ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียสอยู่กลาง ภายในนิวเคลียส ประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และมีอิเล็กตรอนวิ่งรอบนอกเหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทป ขึ้นกับจำนวนโปรตอนและจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ดังนี้

1. โปรเตียม มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 1.0078
2. ดิวเทอเรียม (Deuterium) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวนนิวตรอน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 2.0141
3. ตริเที่ยม (Tritium) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวนนิวตรอน 2 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 3.0161

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทั่วไปของไฮโดรเจนทั้ง 3 สถานะ คือ ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็งจะไม่มีสี มีโครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม ปริมาตรต่อโมล (Molar Volume) เท่ากับ 2.56 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อโมล ส่วนไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวจะไม่มีสีมีค่าความหนืด (Viscosity) ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว ขณะที่ไฮโดรเจนที่เป็นก๊าซจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม



รูปที่ 2.1 ไอโซโทป 3 ชนิด ของไฮโดรเจน
ที่มา : https://simple.wikipedia.org/wiki/Isotope

2.1.2 แหล่งที่มาของพลังงานไฮโดรเจน

ปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนเมื่อพิจารณา จากวัตถุดิบเป็นหลักแบ่งออกเป็น 3 แหล่งหลัก คือ จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม จากแหล่งพลังงานหมุนเวียน เช่น ชีวมวล และน้ำ เป็นต้น และจากพลังงานนิวเคลียร์

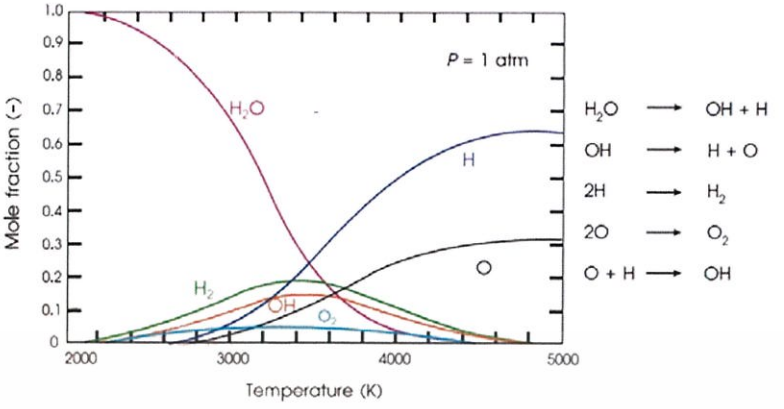
2.2 การผลิตไฮโดรเจน (Hydrogen Production)

ไฮโดรเจนที่นำมาใช้งานสามารถผลิตได้จากแหล่งไฮโดรเจนด้วยกระบวนการต่าง ๆ ได้หลายวิธีการดังนี้

2.2.1 การสลายตัวด้วยความร้อน (Thermal Decomposition, Thermolysis)

การสลายตัวของสารตั้งต้นด้วยความร้อนที่ให้ผลผลิตอย่างน้อย 2 ชนิด สำหรับการสลายตัวของน้ำด้วยความร้อนเกิดได้น้อยแม้ที่อุณหภูมิสูงมาก เช่น ที่อุณหภูมิ 2,200 เคลวิน แตกตัวเพียงร้อยละ 3 และที่อุณหภูมิ 3,200 เคลวิน แตกตัวประมาณร้อยละ 50 ได้ไอออนอนุมูลอะตอมและโมเลกุลของไฮโดรเจน และออกซิเจนหลายชนิด เช่น ไฮโดรเจนไอออน (H^+) ออกซิเจนไอออน (O_2^-) ไฮโดรเจน (H_2) ออกซิเจน (O_2) ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และไฮโดรเพอรอกซิลหรืออนุมูลเพอรอกซิล (HO_2) ข้อจำกัดของปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยความร้อนในการประยุกต์ใช้งานจริงเชิงอุตสาหกรรมหรือเชิงพาณิชย์ คือ ความคงทนของอุปกรณ์หรือวัสดุในกระบวนการที่ต้องทำงานที่อุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การสลายตัวด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา
ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.2.2 กระบวนการเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง (Photocatalytic Process)

กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจน ด้วยวิธีการแตกตัวของน้ำ โดยใช้สารกึ่งตัวนำ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง ซึ่งรับโฟตอน (Photon) จากแสงอาทิตย์ไปกระตุ้นอิเล็กตรอน (Electron) จากแถบวาเลนซ์เคลื่อนที่ผ่านแถบพลังงาน (Energy Band) สู่แถบนำไฟฟ้า (Conduction Band) และเกิดเป็นหลุม (Hole) ทำให้น้ำแตกตัวเป็นแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สออกซิเจน จากนั้นผ่านเข้ากระบวนการทำไฮโดรเจนให้บริสุทธิ์ ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงที่นิยมใช้ ได้แก่ ไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) ทังเสตนออกไซด์ (WO_3) และแพลทินัม (Pt) เป็นต้น ประสิทธิภาพของกระบวนการขึ้นอยู่กับโครงสร้างผลึก สมบัติรวม และพื้นที่ผิวของตัวเร่งปฏิกิริยา ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อการกัดกร่อนในน้ำและมีประสิทธิภาพกระบวนการต่ำอยู่ที่ร้อยละ 8-14

2.2.3 การรีฟอร์มมีเทน (Methane Reforming)

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากแก๊สธรรมชาติด้วยวิธีอุณหเคมี (Thermochemistry) การรีฟอร์มด้วยไอน้ำ หรือการรีฟอร์มแบบออโตเทอร์มัล (Autothermal Reforming) ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ คือ นิกเกิล (Ni) อุณหภูมิที่ใช้ดำเนินการอยู่ในช่วง 500-1,000 องศาเซลเซียส ผลผลิตที่ได้เป็นแก๊สสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์เป็นหลัก ได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และแก๊สมีเทน เป็นผลิตภัณฑ์ร่วม จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำไฮโดรเจนให้บริสุทธิ์ (Hydrogen Purification) ตัวอย่างเช่น การดูดซับแบบสลับความดัน (Pressure Swing Adsorption) การแยกด้วยเมมเบรน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การรีฟอร์มด้วยพลาสมา (Plasma Reforming)

กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากไฮโดรคาร์บอน โดยอาศัยหลักการการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระของแก๊สพาหะด้วยแรงดันไฟฟ้าที่ความดันบรรยากาศ แล้วทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น มีข้อดี คือ ทำให้เกิดปฏิกิริยารีฟอร์มิงได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีกำมะถันได้ มีประสิทธิภาพดี ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยและให้อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นสูง แต่จำเป็นต้องอาศัยแหล่งจ่ายไฟฟ้าศักย์สูง และอาจเกิดเสื่อมสภาพของขั้วไฟฟ้าได้เมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้า

2.2.5 กระบวนการไอน้ำ-เหล็ก (Steam-iron Process)

กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนทางการค้าเก่าแก่ที่สุดที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงโดยใช้ปฏิกิริยารีดักชัน-ออกซิเดชันของเหล็กออกไซด์หรือแมกนีไทต์ (Fe_3O_4) ประกอบด้วยปฏิกิริยา 2 ขั้น ได้แก่ ขั้นของปฏิกิริยารีดักชันของเหล็กออกไซด์ด้วยแก๊สรีดิวซ์ เช่น แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ แก๊สไฮโดรคาร์บอน และแก๊สสังเคราะห์และขั้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็กด้วยไอน้ำ

ปฏิกิริยาขั้นที่ 1: $Fe_3O_4 + 4CO \text{ (or Reducing Gas)} \longrightarrow 3Fe + 4CO_2 \text{ (or Oxidizing Gas)}$ (2.1)

ปฏิกิริยาขั้นที่ 2: $3Fe + 4H_2O \longrightarrow Fe_3O_4 + 4H_2$ (2.2)

ปฏิกิริยารวม: $CO \text{ (or Reducing Gas)} + H_2O \longrightarrow CO_2 \text{ (or Oxidizing Gas)} + H_2$ (2.3)

และเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นๆ ที่ไม่ใช่ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 และ 2 ด้วย จึงส่งผลให้เกิดเหล็กออกไซด์ได้หลายรูปแบบในผลิตภัณฑ์ เช่น วูสไทต์ (Wustite, FeO) และเกิดปฏิกิริยาการแตกสลาย/ออกซิเดชันขึ้นจำนวนมากพร้อมๆ กัน

2.2.6 การแยกสลายด้วยไฟฟ้า (Electrolysis)

การให้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ขั้วไฟฟ้าของเซลล์เคมีไฟฟ้าเพื่อให้ไอออนในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เคลื่อนที่ไปเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วไฟฟ้า ปฏิกิริยาเคมีเกิดเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันในทิศทางที่ไม่สามารถเกิดเองได้ถ้าไม่ให้กระแสไฟฟ้า โดยกระแสไฟฟ้าที่ให้จะต้องให้มากกว่าค่าโวลต์มาตรฐานที่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น เช่น การแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าจะต้องใช้ค่าโวลต์ที่สูงกว่า 1.229 โวลต์ ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า

ขั้วแคโทดเกิดปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอน

ภาวะกรด : $2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ (2.4)

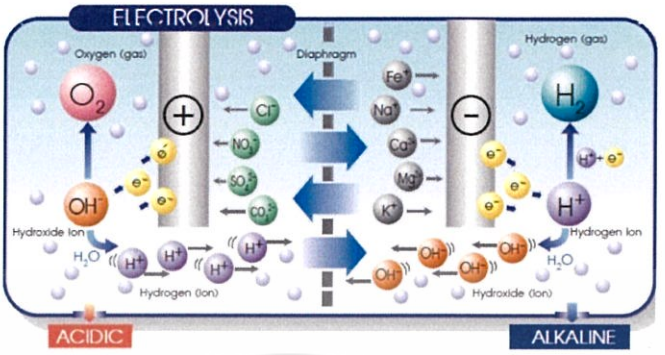
ภาวะเบส : $2H_2O + 2e^- \longrightarrow H_2 + 2OH^-$ (2.5)

ขั้วแอโนดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แก๊สออกซิเจน

$$H_2O \longrightarrow \tfrac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^- \quad (2.6)$$

ข้อดีของการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากวิธีนี้จะมีความบริสุทธิ์สูง ข้อเสีย คือค่าใช้จ่ายด้านกระแสไฟฟ้าสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

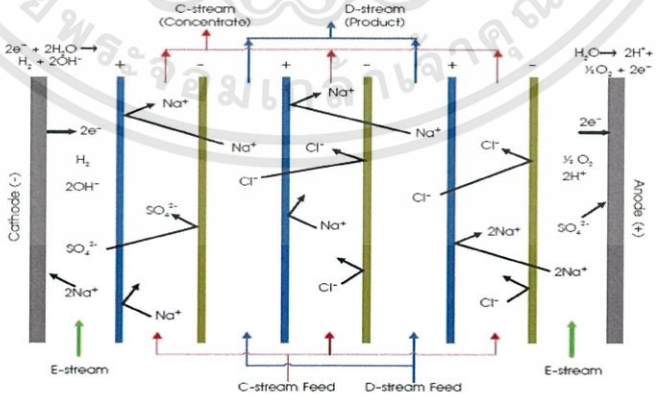


รูปที่ 2.3 การเคลื่อนที่ของไอออน และการเกิดปฏิกริยาในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า

ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.2.7 การแยกกรองด้วยไฟฟ้า (Electrodialysis)

การแยกไอออนโดยเฉพาะไอออนของสารละลายเกลือผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนได้ความเข้มข้นของไอออนบวกและลบที่สูงขึ้นในแต่ละช่องเซลล์เคมีไฟฟ้าโดยอาศัยความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้าที่ให้กับระบบ สารละลายความเข้มข้นต่ำจะเข้าสู่เซลล์เคมีไฟฟ้าที่มีเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบและบวกคั่นอยู่ระหว่างขั้วไฟฟ้า ไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแอโนดผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบ จากนั้นจะถูกกั้นด้วยเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนบวก ส่วนไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดผ่านเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนบวกและถูกกั้นด้วยเมมเบรนแลกเปลี่ยนไอออนลบ ทำให้เกิดการกรองแยกเป็นส่วนที่มีความเข้มข้นสูงของไอออนลบและบวกคนละช่องของเซลล์ที่กั้นด้วยเมมเบรน ผลพลอยได้ของกระบวนการนี้ คือ เกิดแก๊สไฮโดรเจนที่ขั้วแคโทด และแก๊สออกซิเจนที่ขั้วแอโนดโดยมีกลไกเดียวกับการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า



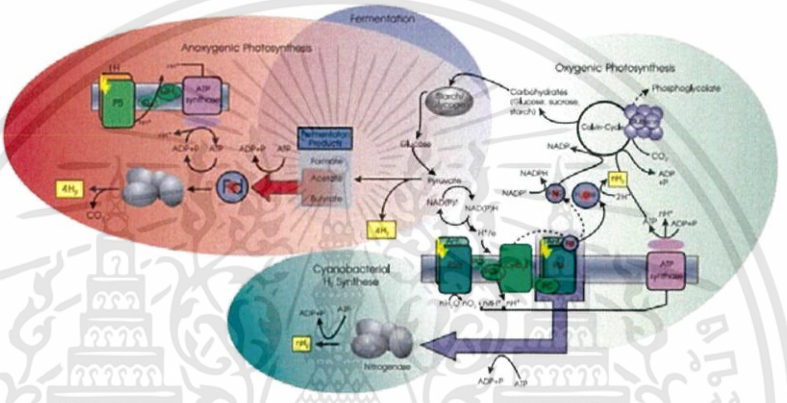
รูปที่ 2.4 การเคลื่อนที่ของไอออน และเซลล์เคมีไฟฟ้าในกระบวนการแยกกรองด้วยไฟฟ้า

ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ (Biohydrogen Production)

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยกระบวนการทางชีวภาพผ่านสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ สารตั้งต้นหลักของกระบวนการ ได้แก่ น้ำ ของเสียอินทรีย์หรือชีวมวล จุลินทรีย์ที่มีการใช้งานในกระบวนการ ได้แก่ สาหร่าย แบคทีเรีย หรืออาร์เคีย โดยอาจต้องใช้เอนไซม์หรือสารประกอบจำพวกโปรตีนช่วยเร่งปฏิกิริยาจำแนกการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ 2 แบบ ได้แก่ การจำแนกตามการใช้แสงภายในกระบวนการ คือ กลุ่มที่ใช้และไม่ใช้แสงภายในกระบวนการ และการจำแนกตามลักษณะของกระบวนการ การผลิตไฮโดรเจนทางตรงและทางอ้อม ปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีหลักที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเชิงพาณิชย์เนื่องจากข้อจำกัดด้านความรู้ความเข้าใจ และประสิทธิภาพของกระบวนการต่ำ



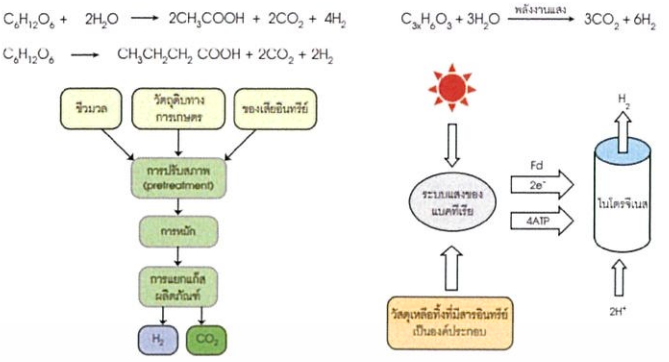
รูปที่ 2.5 การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.2.9 การผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมัก (Fermentation Hydrogen Production)

กระบวนการทางชีวเคมีที่สารอินทรีย์ย่อยสลายหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยอาศัยเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อผลิตไฮโดรเจน จำแนกเป็น 2 แบบ ได้แก่ การหมักแบบไม่ใช้แสงและการหมักแบบใช้แสง การหมักแบบไม่ใช้แสงพบในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศร่วมกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เปลี่ยนสารตั้งต้นจำพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น ของเสียอินทรีย์หรือ ชีวมวล ให้เป็นแก๊สไฮโดรเจน และผลผลิตสารอินทรีย์ข้างเคียงอื่น เช่น กรดแอซีติก ($C_2H_4O_2$) กรดบิวทีริก ($C_4H_8O_2$) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ส่วนการหมักแบบใช้แสงพบในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศแต่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากสารประกอบอินทรีย์จำพวกชีวมวล ได้แก๊สไฮโดรเจนและพลังงาน ข้อจำกัดหลักของการผลิตไฮโดรเจนโดยการหมักในการใช้งานเชิงอุตสาหกรรม ได้แก่ การขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 กระบวนการหมักสารอินทรีย์

ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.2.10 การแยกด้วยเมมเบรน (Membrane Separation)

กระบวนการแยกแก๊สผสมด้วยเมมเบรนสังเคราะห์ เช่น การแยกแก๊สไนโตรเจนหรือแก๊สออกซิเจนออกจากอากาศ การแยกแก๊สไฮโดรเจนออกจากแก๊สผสมที่มีแก๊สไนโตรเจน และแก๊สมีเทน การนำกลับ แก๊สไฮโดรเจนจากผลิตภัณฑ์แก๊สผสมของโรงงานผลิตแอมโมเนีย การนำกลับแก๊สไฮโดรเจนจากกระบวนการกลั่นน้ำมัน การแยกแก๊สมีเทนออกจากแก๊สชีวภาพ ปกติการแยกแก๊สด้วยเมมเบรนนิยมใช้เมมเบรนพอลิเมอร์ที่ไม่มีรูพรุน โดยอาศัยหลักการสภาพละลายได้และสภาพแพร่ที่ต่างกันของแก๊สแต่ละชนิด ส่วนเมมเบรนที่มีรูพรุน สามารถแยกแก๊สโดยอาศัยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่เล็กกว่าวิถีเสรีเฉลี่ย (Mean Free Path) ของโมเลกุลแก๊สภายใต้ภาวะความดัน 100 กิโลปาสกาล และอุณหภูมิ 300 เคลวิน เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนอยู่ที่ประมาณ 50 นาโนเมตร ในบางกรณีสามารถใช้วัสดุอื่นที่ไม่ใช่พอลิเมอร์ เช่น เมมเบรนแพลเลเดียม (Pd) ที่เลือกผ่านเฉพาะแก๊สไฮโดรเจน

2.2.11 การสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis)

กระบวนการทางชีวเคมีที่สิ่งมีชีวิตสีเขียวเปลี่ยนรูปพลังงานแสงไปเป็นพลังงานเคมี โดยแสงถูกดูดจับไว้ และทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ ได้คาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อผลิตไฮโดรเจนจำแนกได้เป็น 2 วิธีการ

2.2.11.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis)

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงด้วยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงเป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยอัตราส่วน 2:1 ดังสมการที่ (2.7) (Ni *et al.*, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 2H_2 + O_2 \qquad (2.7)$$

ระบบแสงที่สอง (photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน โปรตรอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซิน (Fd) โดยพลังงานแสงอาทิตย์ที่ถูกดูดซับโดยระบบแสงที่หนึ่ง (photosystem I, PSI) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน

เนื่องจากออกซิเจนมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงมีความจำเป็นต้องรักษาระดับออกซิเจนให้มีค่าต่ำกว่า 0.1% เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน (Hallenbeck and Benemann, 2002) สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงได้ เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis *et al.*, 2000) และ *Chlorella fusca* (Winkler *et al.*, 2002)

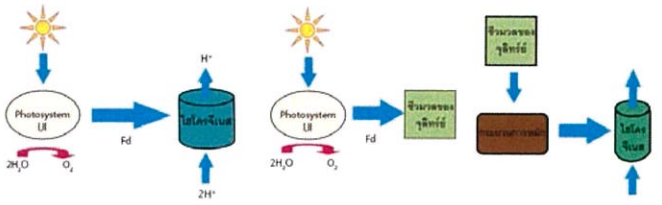
2.2.11.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (indirect biophotolysis)

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงด้วยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมจะพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ซึ่งมีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน การผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะสามารถแก้ปัญหาเนื่องจากออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจน เพราะกระบวนการสร้างออกซิเจนและไฮโดรเจนเกิดแยกกัน โดยในขั้นตอนแรกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ (2.8) และในขั้นตอนที่สองชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจนดังสมการที่ (2.9) (Levin *et al.*, 2004)

$$12H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad (2.8)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 12H_2 + 6CO_2 \qquad (2.9)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



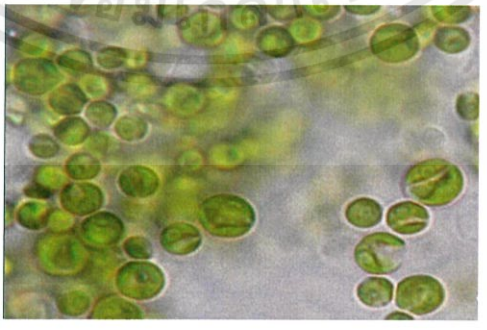
รูปที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง
ที่มา : http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production/

2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (green algae) จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (chlorophyta) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (eukaryote) พบทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดและน้ำทะเล สาหร่ายสามารถสังเคราะห์แสงได้เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์จึงช่วยเพิ่มออกซิเจนให้กับแหล่งน้ำ สาหร่ายส่วนใหญ่แบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้มีสารไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนสูง สาหร่ายสีเขียวบางชนิดเป็นอิสระลอยอยู่ตามผิวน้ำ มีรูปร่างลักษณะมากมาย มีทั้งเซลล์เดี่ยว โคโลนีและเส้นสาย มีทั้งเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 พวกที่มีหนวดจะมีออร์กาเนลล์ที่มีสีเรียกว่าตา ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด สาหร่ายสีเขียวสามารถจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.3.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว

สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลัมที่ใช้ในการโบกพัดจำนวน 2-4 เส้น ตัวอย่างเช่น *Chlamydomonas* sp. เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้โดยไม่มีแฟลกเจลลัม เช่น *Chlorella* sp., *Chlorococcoum* sp. เป็นต้น

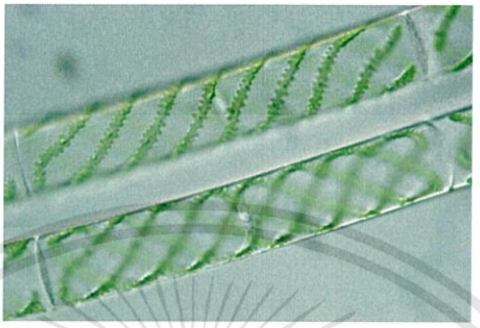


รูปที่ 2.8 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp.
ที่มา : https://www.pinterest.com/jessicaleemac/biology/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์

สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์มีทั้งชนิดที่ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Ulothrix* sp., *Spirogyra* sp. เป็นต้น และที่อยู่เป็นกลุ่ม ได้แก่ *Volvox* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น



รูปที่ 2.9 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์ *Spirogyra* sp.
ที่มา : http://mtv2day.info/znamesrez-spirogyra-sp.html

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่พบเช่นเดียวกับรงควัตถุที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ และบี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ โดยอาจจะมี 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ซึ่งทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการรวมกันของแกมีตซึ่งมีทั้งแบบ Isogamy, Anisogamy และ Oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์ และการสร้าง Akinete

2.3.3 ระยะของการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เมื่อนำเซลล์สาหร่าย (ธวัชชัย, 2547) จำนวนหนึ่ง ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวแล้วจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะพบว่าเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายจะเป็นไป ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆ ได้ 4 ระยะ ดังนี้

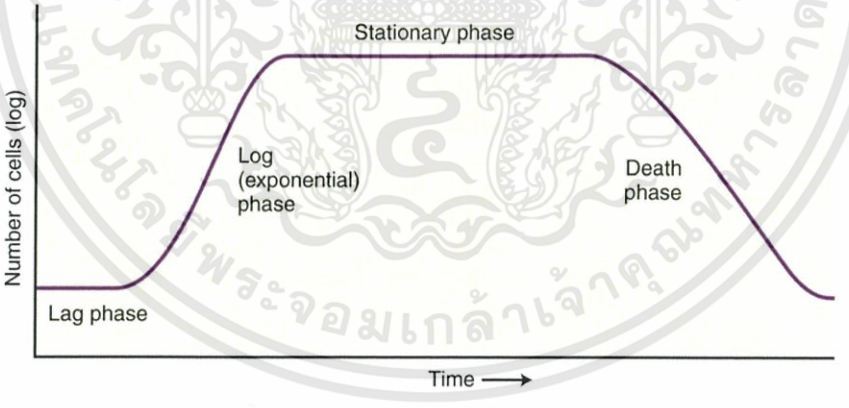
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เซลล์สาหร่าย เริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ จะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้นมีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้ เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยและพร้อมที่จะแบ่งตัวระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และขบวนการต่างๆ ตลอดจนคุณสมบัติทางสรีรวิทยา เป็นแบบเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เซลล์มีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าเซลล์สาหร่ายไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เซลล์สาหร่ายเจริญเติบโตแล้วเข้าสู่ระยะ Stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง จึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ ของเสียที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย

4. Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย เซลล์สาหร่ายที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้ เป็นเพราะอาหารอาจหมด มีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก



รูปที่ 2.10 การเจริญเติบโตของเซลล์จุลสาหร่าย

ที่มา : http://clinicalgate.com/bacteria-and-archaea/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การสังเคราะห์ด้วยแสง

การสังเคราะห์ด้วยแสง หมายถึง กระบวนการสร้างอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตของพืชสีเขียว จากน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาศัยคลอโรฟิลล์ แสงสว่างเป็นตัวช่วย และเอนไซม์ในเม็ดคลอโรพลาสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นกระบวนการเปลี่ยน พลังงานแสงเป็น เคมี สารอินทรีย์เป็นสารอนินทรีย์ กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมีประโยชน์ต่อมนุษย์สามารถให้สารอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาล ได้เชื้อเพลิงถ่านและไม้ต่างๆ และได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในการหายใจ

2.4.1 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงแบ่งเป็น 2 ชนิด

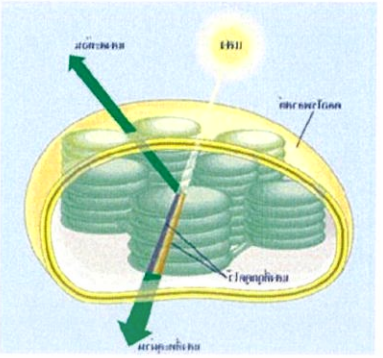
1. ปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง (Light Reaction)

ออร์แกเนลล์ที่สำคัญของพืช คือ คลอโรพลาสต์ เป็นแหล่งที่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและเทคนิคต่างๆทำให้ทราบลักษณะของคลอโรพลาสต์ โดยคลอโรพลาสต์ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างกลมรี มีขนาดยาวประมาณ 5 ไมโครเมตร กว้าง 2 ไมโครเมตร และหนาประมาณ 1 – 2 ไมโครเมตร จำนวนแต่ละเซลล์มีไม่แน่นอน มีตั้งแต่สิบขึ้นไปจนถึงร้อยซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และชนิดของเซลล์พืช

คลอโรพลาสต์มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น เรียกว่า ยูนิกเมมเบรน ภายในเป็นของเหลวเรียกว่า สโตรมา เยื่อหุ้มชั้นในของคลอโรพลาสต์จะแผ่เข้าไปข้างในกลายเป็นโครงสร้างย่อยๆ ที่เป็นเยื่อบางๆ เรียกว่าลาเมลลา (lamella) ลาเมลลาส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นแผ่นกลมแบนบางๆ และเรียงซ้อนกันเป็นตั้งเรียกว่า กรานา ส่วนนี้จะหนากว่าส่วนอื่น ๆ แต่ละชั้นของกรานา เรียกว่า ไทลาคอยด์ ในคลอโรพลาสต์เต็มไปด้วยกรานาที่กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป

คลอโรพลาสต์ที่เจริญเต็มที่แล้วประกอบด้วยกรานา 40 - 60 กรานา ต่อ 1 คลอโรพลาสต์ ส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างกรานา เรียกว่า อินเตอร์กรานา (intergrana)หรือสโตรมาลาเมลลา (stroma lamella)หรือสโตรมาไทลาคอยด์ (stroma thylakoid) ลาเมลลาประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ภายในบรรจุด้วยคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ทางผิวด้านหน้าของ ไทลาคอยด์จะมีรงควัตถุอยู่เป็นกลุ่มๆ ทำให้มองดูมีลักษณะเป็นเม็ด ๆ เรียกว่า แกรนูล (granule) แกรนูลมีทั้งขนาดเล็ก และใหญ่ สำหรับแกรนูลที่มีขนาดใหญ่ภายในมีกลุ่มของรงควัตถุระบบแสงที่ I (Photosystem I) รับพลังงานแสงในช่วงคลื่น 700 นาโนเมตรได้ดี และรงควัตถุระบบแสงที่ II (photosystem II) รับพลังงานแสงในช่วงคลื่น 680 นาโนเมตรได้ดี และระบบแสงทั้ง 2 ระบบนี้จะเรียกรวมกันว่า ควอนตาโซม (quantasome) ส่วนแกรนูลที่มีขนาดเล็กเข้าใจว่าเป็นที่อยู่ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง ส่วนในสโตรมาจะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่ 2 คือ ปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 แสดงการดูดแสงสีต่าง ๆ ของคลอโรพลาสต์
ที่มา : https://sites.google.com/site/sciencejarukorn/content01/content012

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง

1. สารสี (Pigment) แบ่งเป็น 2 ระบบ คือ สารสีระบบที่ 1 (Pigment system I) และสารสีระบบที่ 2 (Pigment system II)

1) สารสีระบบที่ 1 (Pigment system I) ทำหน้าที่รับพลังงานแสง ซึ่งประกอบด้วยสารชนิดสำคัญ คือ คลอโรฟิลล์ เอ ชนิดรับแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรได้ดี พบในพืช และสาหร่ายทุกกลุ่ม สารสีระบบที่ 1 และตัวรับถ่ายทอดอิเล็กตรอนต่าง ๆ จะประกอบกันเป็นระบบแสงที่ 1 (Photosystem I)

2) สารสีระบบที่ 2 (Pigment system II) ทำหน้าที่รับพลังงานแสง ซึ่งประกอบด้วยสารสี ดังนี้

- คลอโรฟิลล์ บี พบเฉพาะในพืช และสาหร่ายสีเขียว
- คลอโรฟิลล์ ซี พบเฉพาะในสาหร่ายสีน้ำตาล และสีน้ำตาลแกมเหลือง
- คลอโรฟิลล์ ดี พบเฉพาะในสาหร่ายสีแดง
- แคโรทีนอยด์ พบในพืช และสาหร่ายทุกกลุ่ม
- ไฟโคบิลิน พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. พลังงานแสง ทำหน้าที่ ดังนี้

1) กระตุ้นให้อิเล็กตรอนของคลอโรฟิลล์มีพลังงานสูงขึ้น

2) แยกสารละลายน้ำในปฏิกิริยาที่เรียกว่า โฟโตไลซิส ทำให้เกิดโปรตอน (H^+) อิเล็กตรอน (e^-) และ O_2

3) ใช้สร้างสารอินทรีย์พลังงานสูง 2 ชนิด คือ ATP , NADPH+ H^+

3. น้ำ จะถูกพืชนำไปสลายให้เป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนเพื่อนำไปใช้สร้างน้ำตาลในปฏิกิริยาไม่ใช้แสง และมีผลทำให้เกิด O_2 เป็นผลพลอยได้ปล่อยออกทางปากใบของพืช

4. ADP และ Pi ทำหน้าที่รับพลังงานที่ถ่ายทอดออกมาจากอิเล็กตรอนเกิดเป็น ATP

5. $NADP^+$ เป็นสารทำหน้าที่รับโปรตอน และอิเล็กตรอนจากน้ำกลายเป็นสารอินทรีย์พลังงานสูง คือ NADPH+ H^+

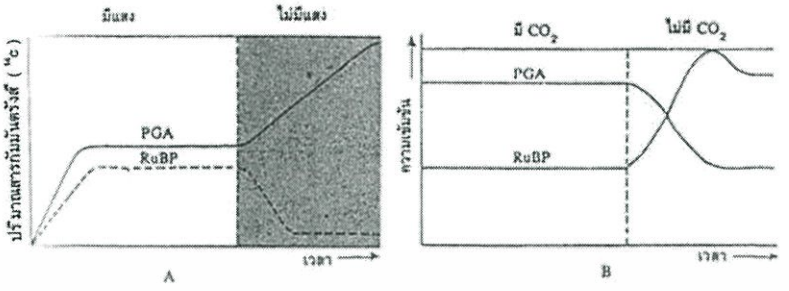
สำหรับปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงจะมีบทบาทสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากทำหน้าที่ในการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมี แล้วเก็บไว้ในสารประกอบ ATP และ NADPH2 เมื่อแสงส่องถูกคลอโรฟิลล์ พลังงานแสงบางส่วนจะถูกคลอโรฟิลล์ดูดซับเอาไว้ ทำให้อิเล็กตรอนภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์มีพลังงานสูงขึ้น เรียกว่า excited electron และถ้ามีพลังงานแสงมากพอจะทำให้อิเล็กตรอนนี้หลุดออกจากคลอโรฟิลล์ อิเล็กตรอนที่หลุดออกมาอาจมีจำนวนมาก และจะถูกสารบางอย่างมารับแล้วถ่ายทอดอิเล็กตรอนนี้ไปเป็นทอด ๆ พลังงานภายในอิเล็กตรอนจะลดลงเรื่อย ๆ พลังงานที่ปล่อยออกมาจะถูกนำไปสร้างเป็น ATP หรือ NADPH+H^+

2. ปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้แสง (Light Reaction)

ปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้แสงเป็นปฏิกิริยาที่เกิดภายในสโตรมาของคลอโรพลาสต์ โดยเป็นปฏิกิริยาเคมีล้วนๆ โดยปฏิกิริยานี้ไม่ต้องการแสงสว่าง แต่ต้องการ ATP และ $NADPH^+$ จากปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง โดยนำมาใช้การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีพลังงานศักดิ์ในโมเลกุลต่ำในบรรยากาศให้เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีพลังงานศักดิ์อยู่ในโมเลกุลสูง ดังนั้น ปฏิกิริยานี้จึงเรียกได้อีกอย่างว่า ปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide fixation) สำหรับบุคคลแรกที่ใช้คำว่า dark reaction คือ เอฟ.เอฟ.แบลคแมน (F.F. Flack Man) เมื่อปี พ.ศ. 2448 (ค.ศ. 1905)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

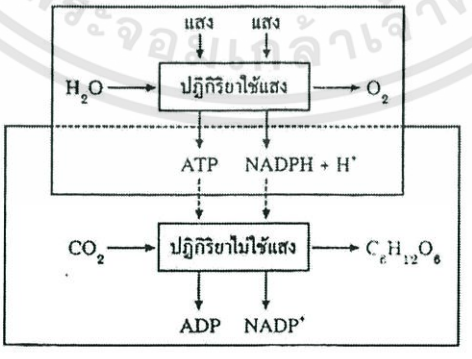
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.12 การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : https://sites.google.com/site/sciencejarukorn/content01/content012

เนื่องจากในขณะที่มีแสง PGA ถูกสร้างขึ้นจาก RuBP และ $14CO_2$ ได้ตลอดเวลาและ PGA บางส่วนก็สามารถเปลี่ยนไปเป็น RuBP ได้ แต่ในสภาพที่ไม่มีแสง RuBP สามารถรวมตัวกับ $14CO_2$ แล้วสลายตัวเป็น PGA จึงมีมาก ทำให้ RuBP ลดจำนวนลงและ RuBP สร้างขึ้นใหม่ไม่ได้ เนื่องจากปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสงไม่มีจึงไม่มี ATP และ $NADPH+ H^+$ มาใช้ในการเปลี่ยน PGA เป็น RuBP ในขณะที่มีแสงและมี $14CO_2$ การสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดได้ตามปกติ RuBP สามารถรวมตัวกับ $14CO_2$ ได้ แล้วแตกตัวเป็น PGA ได้ในในขณะเดียวกัน PGA ส่วนหนึ่งก็สามารถสร้างกลับไปเป็น RuBP ได้ ดังนั้นปริมานของ PGA และ RuBP จึงคงที่ แต่เมื่อมีแสงและไม่มี $14CO_2$ ปริมานของ PGA จะลดลงเนื่องจาก PGA สามารถเปลี่ยนเป็น RuBP ได้ เพราะยังคงมีปฏิกิริยาที่ใช้แสงอยู่ทำให้มี ATP และ$NADPH + H^+$ อยู่ตลอดเวลา PGA จึงรวมตัวกับ ATP และ$NADPH+ H^+$ เป็น RuBP เมื่อไม่มี $14CO_2$ ทำให้ RuBP ไม่ถูกใช้ไป RuBP จึงมีเพิ่มมากขึ้น PGA ไม่มีการสร้างเพิ่ม แต่ถูกใช้ไปเรื่อยๆปริมาณจึงลดลง



รูปที่ 2.13 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช

ที่มา : https://sites.google.com/site/sciencejarukorn/content01/content012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
149323

2.5 การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่าย

การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่

2.5.1 การวัดโดยตรง (Direct measurement or Total Count)

2.5.1.1 การนับโดยใช้สไลด์นับเซลล์ (counting chamber) และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)

2.5.1.2 การนับโดยใช้การตกตะกอนและกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope

2.5.1.3 การนับโดยใช้สไลด์ธรรมดาและจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)

2.5.1.4 การนับโดยใช้เครื่องนับจำนวน (counter count หรือ electronic counting)

2.5.2 การวัดประชากรสาหร่ายโดยอ้อม (Indirect measurement)

2.5.2.1 การหาน้ำหนักแห้ง (day weight)

2.5.2.2 การหาน้ำหนักของขี้เถ้า (ash content)

2.5.2.3 การหาปริมาตรเซลล์ที่อัดกันอยู่ (pack cell volume)

2.5.2.4 การหาความหนาแน่นโดยอาศัยแสง (optical density)

2.5.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน (analysis of carbon)

2.5.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่น (chlorophyll and other pigment analysis)

2.6 เทคนิคของการทำเชื้อให้บริสุทธิ์

เทคนิคของการทำเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นวิธีการเพื่อให้ได้ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่เป็นชนิดเดียวกันทั้งหมด ปัญหาที่พบในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ คือ การปะปนของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น ไดอะตอมปะปนอยู่กับไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้โดยการใช้เจอมิเนียมไดออกไซด์ (Germanium dioxide) 1-10 มิลลิลิตรต่อกรัม ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ด้วย หลังจากได้ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นแล้ว ต้องทดสอบความบริสุทธิ์ได้โดยการทดสอบบนอาหาร Nutrient agar ในบางครั้ง อาจมีสิ่งปนเปื้อนมาก ก็ต้องนำเอาไปปั่นแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด ถ้าสิ่งที่ปนเปื้อนมีขนาดใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย ก็ให้กรองผ่าน Filter ที่ฆ่าเชื้อแล้วที่มีขนาด 8 ไมโครเมตรของ Millipore filter และล้างอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อลดปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน เมื่อแยกได้ดีแล้ว ก็นำไปเขี่ยไปมาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และเก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิและแสงที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย

การผลิตไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ ดังนี้

2.7.1. ชนิดของจุลสาหร่าย ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจะแตกต่างและมีความเฉพาะตัวตามชนิดของสาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีเมตาบอลิซึมของการตรึงไนโตรเจนและการสังเคราะห์แสงแตกต่างกันไป (Hall *et al.*, 1995)

2.7.2. ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น องค์ประกอบของธาตุอาหารและแร่ธาตุ ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจน (Dutta *et al.*, 2000; Weissman and Benemann, 1977) แหล่งและปริมาณคาร์บอน (Shah *et al.*, 2001) ปริมาณซัลเฟอร์ (Antal and Lindblad, 2005) เป็นต้น ความเข้มแสง และ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ฯลฯ อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด	เอกสารอ้างอิง
1. *Anabaena* sp. PCC 7120	2.6 μmol/mg chl a/h	Masukawa *et al.*, 2001
2. *Anabaena cylindrica* IAMM-1	2.1 μmol/mg chl a/h	Masukawa *et al.*, 2001
3. *Anabaena cylindrica* IAMM-58	4.2 μmol/mg chl a/h	Masukawa *et al.*, 2001
4. *Anabaena cylindrica*UTEXB-629	0.91 μmol/mg chl a/h	Masukawa *et al.*, 2001
5. *Anabaena variabilis* AVM13	68 μmol/mg chl a/h	Happe *et al.*, 2000
6. *Anabaena variabilis* PK84	32.3 μmol/mg chl a/h	Sveshnikov *et al.*, 1997
7. *Anabaena variabilis*ATCC29413	39.4 μmol/mg chl a/h	Sveshnikov *et al.*, 1997
8. *Synechococcus* sp. PCC6830	0.26 μmol/mg chl a/h	Serebryakova *et al.*, 2000
9. *Synechococcus* sp. PCC602	0.66 μmol/mg chl a/h	Serebryakova *et al.*, 2000
10. *Synechocystis* sp. PCC6308	0.13 μmol/mg chl a/h	Serebryakova *et al.*, 2000
11. *Microcystis* sp. PCC7820	0.16 μmol/mg chl a/h	Howarth and Codd, 1985
12. *Gloeocapsa alpicola* CALU743	0.58 μmol/mg chl a/h	Antal and lindbald, 2005
13. *Chroococcidiopsis thermalis*	0.7 μmol/mg chl a/h	Moezelaar and Stal, 1994
14. *Calothrix membmacea* B-379	0.108 μmol/mg dry wt/h	Lambert and Smith, 1977
15. *Oscillatoria* sp. Miami BG7	0.250 μmol/mg dry wt/h	Phlips and Mitsui, 1983
16. *Oscillatoria limnosa*	0.83 μmol/mg chl a/h	Heyer *et al.*, 1989
17. *Cyanothece* sp. 7822	0.92 μmol/mg chl a/h	Van der Oost *et al.*, 1989

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 แก๊สโครมาโตกราฟี

แก๊สโครมาโทรากราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหยได้ โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง ไอที่เกิดขึ้นจะถูกนำเข้าสู่คอลัมน์โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas ตาม flow rate ที่ต้องการภายในคอลัมน์บรรจุด้วยสารที่ทำหน้าที่ในการแยก เรียกว่าเฟสคงที่ (stationary phase) สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆ ที่คอลัมน์นี้ด้วยความแตกต่างของสมบัติทางเคมี โครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล จุดเดือด สารที่แยกได้ผ่านออกไปสู่ส่วนตรวจวัด (detector) ทำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้าส่งไปยังระบบประมวลผล (Data system) ซึ่งสามารถคำนวณและรายงานผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม ให้ทราบถึงองค์ประกอบหรือเทียบปริมาณของสารตัวอย่างได้ กล่าวคือสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ

2.8.1 หลักการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

1. Carrier gases หรือแก๊สพามีหน้าที่นำแก๊สตัวอย่างจากจุดฉีด (injection port) ผ่านเข้าสู่คอลัมน์และไปยัง detector แก๊สที่ใช้งานกับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ เป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารตัวอย่าง เช่น แก๊สฮีเลียม ไฮโดรเจน หรือไนโตรเจน

2. Injector port เป็นส่วนที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยทั่วไปส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (inlet) มักจะมีตัวให้ ความร้อน (heater) ติดตั้งอยู่ด้วย เพื่อทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ การเลือกใช้งานว่าจะใช้ inlet แบบใดนั้นขึ้นอยู่กับสารตัวอย่าง หากสารตัวอย่างเป็นแก๊สมักจะฉีดตัวอย่างเข้าไปด้วย gas sampling valve หากสารตัวอย่างเป็นของเหลวโดยมากจะใช้ micro syringe ดูดสารตัวอย่างขึ้นมาตามปริมาตรที่ต้องการแล้วฉีดผ่าน silicone septum ที่ injection port ไปยังปลายของคอลัมน์

3. Column เป็นส่วนที่ใช้แยกสารตัวอย่าง คอลัมน์ที่ใช้กันทั่วไปในแก๊สโครมาโตกราฟี นั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ packed column และ capillary column การเลือกใช้คอลัมน์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารผสมไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน แต่สามารถพิจารณาเลือกจาก catalog ที่บริษัทผู้ผลิตคอลัมน์ออกมาจำหน่ายและค้นคว้าจากงานวิจัยในวารสารด้านโครมาโตกราฟี

4. Detector หรือส่วนตรวจวัด เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารเชิงเดี่ยวที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผลสามารถจำแนกประเภทของส่วนตรวจวัดได้เป็นหลายประเภทตามคุณสมบัติการตรวจวัดโดยรูปแบบตรวจวัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง และสามารถทำได้ในเครื่อง GC-2014 ได้แก่

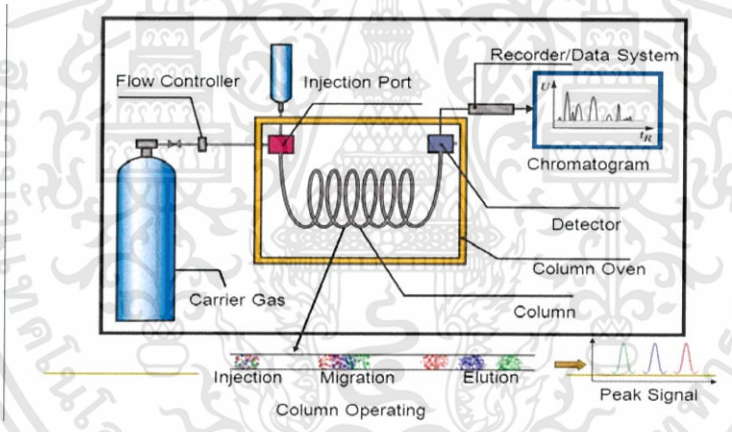
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 Flame Photometric Detector (FID) ใช้ใน การตรวจหาสารประกอบอินทรีย์ (สารประกอบที่มี C-C, C-H bonds)

4.2 Electron Capture Detector (ECD) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ดีในการตรวจหาสารประกอบที่มีแฮโลเจนอะตอมเป็นองค์ประกอบ เช่น ยาฆ่าแมลง และยาปราบวัชพืช เป็นต้น

4.3 Thermal conduct Detecter (TCD) เป็นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ด้วยการตรวจจับการเปลี่ยนของค่าการนำความร้อน

5. Data system หรือระบบประมวลผล เป็นส่วนที่ ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ซึ่งคำนวณและรายงานผลเป็น retention time คือเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของของพีคที่ได้จากโครมาโตแกรม retention time สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อระบุว่าเป็นสารชนิดใดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ลักษณะและขนาดของพีคที่ได้จากโครมาโตแกรมใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้



รูปที่ 2.14 ส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ
ที่มา: http://www.chromedia.org

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วย Duncan'S New Multiple Range Procedure ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Walid M. Alalayah. (2014) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulagaris* ในการศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่เหมาะสมโดยพารามิเตอร์เหล่านี้จะรวมถึงความเข้มข้นเริ่มต้น, pHเริ่มต้น, ไนโตรเจนและฟอสเฟตในสูตรอาหาร The Bold's Basal Culture (BBC), กลูโคสเริ่มต้น โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Bold's Basal Culture(BBC) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C และอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 0.04% ใช้หลอดฟูออเรสเซนต์ 8 หลอด ขนาด 20 วัตต์ แล้วใส่ขวด Duran ใช้แก๊สไนโตรเจนในการไล่ก๊าซและทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนโดย Gas Chromatography วัดความหนาแน่นของเซลล์ชีวมวลที่ความยาวคลื่น 450 nm ในเวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง วัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสโดยวิธีวิเคราะห์ Blood-Glucose ในเวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง ผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่แสดงให้เห็นถึงการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุด ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจะอยู่ที่ 10 g/L ผลของ pH เริ่มต้นในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะอยู่ที่ pH 8 ± 0.2 ผลของไนโตรเจนและฟอสเฟตในสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตไนโตรเจนที่ดีที่สุดเมื่อเพิ่มขึ้น 10%

Surattiporn Rattana. (2015) ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับไบโอไฮโดรเจนที่ถือเป็นพลังงานสะอาดอีกทางเลือกหนึ่ง สามารถผลิตได้โดย สิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งในสาหร่ายสีเขียวนั้นสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ผ่านทางกระบวนการ photobiological ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนแบบใช้แสง การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. นั้นได้นำเอาสาหร่ายที่มีการเลี้ยงแบบ photoheterotrophically ในอาหารเลี้ยงเชื่อที่มีการควบคุมปริมาณของอะซิเตท เพื่อหาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่จะผลิตสูงที่สุด โดยนำเอาเซลล์สาหร่ายนั้นมาเลี้ยงในอาหารTAP เป็นเวลา 18 ชม. ภายในตู้บ่มที่มีการควบคุมแสงที่เหมาะสมและบ่มต่อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนอีกเป็นเวลา 2 ชม.ซึ่งทำให้ได้พลังงานไฮโดรเจนออกมาได้สุงสุด

Fikret Mamedov. (2013) ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับไฮโดรเจนถือเป็นหนึ่งในเชื้อเพลิงที่มีแนวโน้มมากที่สุดที่จะถูกนำมาใช้แทนเชื้อเพลิงฟอสซิลในการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิง เพราะไฮโดรเจนสามารถผลิตได้โดยตรงจากพลังงานแสงวิธีการทางชีวภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากพลังงานแสงอาทิตย์จะใช้จุลินทรีย์ในการสังเคราะห์แสงโดยการสังเคราะห์แสงนั้นจะแยกโมเลกุลน้ำออกเป็นไฮโดรเจน (H^+)และอิเล็กตรอน (e^-) สามารถรวมกันเป็นก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ด้วยเอนไซม์ชนิดพิเศษ เรียกว่า "hydrogenases" ซึ่งเอนไซม์นี้เกิดขึ้นจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวซึ่งสามารถใช้พลังงานแสงอาทิตย์ผ่านการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนสาหร่ายสีเขียวที่ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะต่างๆ มีการศึกษาเป็นเวลา 15 ปี แต่มีประสิทธิภาพต่ำ ปัญหาคือ ปริมาณของพลังงานที่ดูดซึมโดยสาหร่ายที่จะเปลี่ยนเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนเอนไซม์ที่มีความสามารถในการแยกน้ำเป็นอิเล็กตรอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ใน Photosystem II กลุ่มนักวิจัยที่ Uppsala University นำโดย Fikret Mamedov พบว่าการเปลี่ยนมุมมองที่เกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว นักวิจัยได้ศึกษารายละเอียดวิธีการ Photosystem II ใช้สาหร่ายสองสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* โดยการวิธีการวัดปริมาณและกิจกรรมใน Photosystem II ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่า มีอิเล็กตรอนมากถึงร้อยละ 80 ในการผลิตไฮโดรเจนที่มาจากPhotosystem II ซึ่งมากกว่าที่เคยเชื่อกันมา ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนจะใช้พลังงานแสงอาทิตย์โดยตรง

วิทวัส แจ้งเอี่ยม (2557) ไฮโดรเจนถือว่าเป็นพลังงานที่สะอาดและเหมาะที่จะใช้ในอนาคต เนื่องจากมีการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูงและไม่ปลดปล่อยแก๊สที่เป็นมลพิษ กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่ายได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากจุลสาหร่ายมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่สามารถใช้พลังงานจากธรรมชาติที่มีอยู่เช่น แสงอาทิตย์ และน้ำ ในบทความนี้จะกล่าวถึงกระบวนการสังเคราะห์แสงของจุลสาหร่ายทั้งสองชนิด ได้แก่ สาหร่ายโฟโตออโตโทรฟิคและสาหร่ายโฟโตเฮเทอโรโทรฟิค โดยสาหร่ายทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันหลายประการในแง่ของการผลิตแก๊สไฮโดรเจน เช่น เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจน ความต้องการพลังงาน ปริมาณแก๊สออกซิเจนที่จะเป็นตัวยับยั้งสารตั้งต้นที่ใช้และผลิตภัณฑ์ที่ได

Laurinavichene. *et al.* (2013) สารตั้งต้นในก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงที่ประกอบด้วยคาร์บอน เป็นพลังงานที่มีประสิทธิภาพ ไม่มีมลพิษ และมีพลังงานสูง ปัจจุบันไฮโดรเจนถูกสังเคราะห์ด้วยวิธีการเปลี่ยนรูปร่างทางเคมีจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ในขณะที่กระบวนการทางชีวภาพมากมายถูกค้นพบอย่างกว้างขวางแต่ไม่มีวิธีใดที่มีความเหมาะสมเชิงเศรษฐกิจเลย ในบรรดากระบวนการทางชีวิภาพสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ใช้สารอินออร์แกนิกที่ไม่แพงทำให้สาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ โดยปกติแล้วระหว่างการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียจะมีการพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตไฮโดรเจนขนาดใหญ่ถูกจำกัดด้วยทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรม ระบบเมตาบอลิซึมและด้านสรีรวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสังเคราะห์แสงโดยใช้ออกซิเจน การพัฒนาใหม่ทางกลยุทธ์ของกระบวนการทางชีวภาพและพันธุวิศวกรรมในอนาคตทำโดยปรับปรุงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงโดยตัดบริเวณที่สัมผัสกับอากาศทิ้งและเพิ่มประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อแสง แต่ผลผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวิภาพยังคงให้ผลผลิตน้อยเมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้จากการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตามการพัฒนาเหล่านี้ยังคงต้องการเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรรษมน นาคขุนทด (2558) ความต้องการพลังงานที่เพิ่มสูงขึ้น ปัจจุบันทำให้ต้องหาแหล่งพลังงานใหม่เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นพลังงานที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยเพาะเลี้ยง *Carteria* sp. AARL045, *Scenedesmus* sp. AARLG022 และ *Chlorella* sp. AARLG049 ในอาหาร tris-acetatephosphate ที่ขาดซัลเฟอร์ (TAP-S) พบว่า *Carteria* sp. AARLG045 และ *Scenedesmus* sp. AARLG022 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ส่วน *Chlorella* sp. AARLG049 ไม่พบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น โดย *Scenedesmus* sp. AARLG022 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 38.06 mL.L-1 ส่วน *Carteria* sp. AARLG045 ให้ผลผลิต 33.73 mL.L-1 และพบการรายงานเป็นครั้งแรกว่ามีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่าย ชนิดนี้และเมื่อนำ *Carteria* sp. AARLG045 เพาะเลี้ยงในอาหาร Jaworski's medium (JM-S) ร่วมกับการตรึงเซลล์สาหร่ายมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนได้

เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ (2554) ได้ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งถูกพบในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย โดยพบว่าสาหร่ายชนิดนี้ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าสั้นที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) โดยสาหร่ายที่อายุ 24 ชั่วโมง เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่ 37 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส จะแสดงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เหมาะสม การผลิตก๊าซจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มจาก 5.75 ถึง 9.30 และลดลงเมื่อ pH ถึง 5.25 การเติม 0.5 mM ของ **β**-mercaptoethanol ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มเป็นสองเท่า การขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ทำให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 50% การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดสูงสุดเมื่อขาดแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 29 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ซึ่งเป็นค่าการผลิตที่สูงเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น ยีน sulfate permease (sulP) ทำหน้าที่ขนส่งซัลเฟตเข้าสู่คลอโรพลาสต์และยีน hydrogenase (*hydA*) ทำหน้าที่แปลรหัสให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสร้างก๊าซไฮโดรเจน ระดับการแสดงออกของยีน *sulP* และ *hydA* ของ *Tetraspora* sp. เพิ่มขึ้น 2.3 เท่า ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและกิจกรรมของระบบแสงที่สอง (PSII) ลดลงหลังจากอยู่ในภาวะขาดแหล่งซัลเฟอร์ จะถูกฟื้นฟูเมื่อเพิ่มแหล่งซัลเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ (2557) ได้ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ในการผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย โดยวิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและผลของแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปวางบนเครื่องเขย่า โดยเขย่าที่ความเร็ว 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำตะกอนเซลล์มากระจายในอาหาร BG110 (อาหาร BG11 ที่ปราศจากไนโตรเจน) และเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปไล่อากาศโดยการพ่นอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที บ่มขวดแก้วในที่มืดและที่สว่างโดยคว่ำขวดไว้เป็นเวลา 2, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ผลการทดลองพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 ที่บ่มในที่มืดภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่อชั่วโมงสูงสุด คือ 389.630 ± 72.084 นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงและยังพบว่าการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศในที่มืด เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดใน 2 ชั่วโมงแรกของการบ่ม หลังจากนั้น อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์จะลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี

1. ผงวุ้น (Agar) SDFCL SD Fine-Chem Limited AR Grade India
2. แอมพิซิลิน (Ampicillin) VWR Life Science AR Grade India
3. ทริซ (tris) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
4. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) Loba Chemie AR Grade India
5. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
6. แคลเซียมคลอร์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
7. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) Loba Chemie AR Grade India
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) Loba Chemie AR Grade India
9. ไดโซเดียมอีดีทีเอไดไฮเดรต ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
10. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
11. กรดบอริก (H_3BO_3) Loba Chemie AR Grade India
12. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
13. ไอรอนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
14. โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) Carlo Erba Reagent AR Grade Italy
15. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
16. แอมโมเนียมโมลิบเดรตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) Loba Chemie AR Grade India
17. กรดอะซิติกล้วน CH_3COOH (glacial) Reagents Duksan GR Grade South Korea
18. กรดไฮโดรคลอริก HCl (conc.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
2. เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) Thermo Scientific รุ่น Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer USA
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (Auto Crave) JSAC-60 Korea
4. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet) JSCB-1200SB Korea
5. เครื่องชั่ง (Weight Scale) Mettler Toledo รุ่น ML204 Switzerland
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Heraeus Megafuge 8R Thermo
7. ตู้แช่ (Fridge) Toshiba รุ่น GR-S26KPB Thailand
8. ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave Oven) Electrolux Thailand
9. ตู้ดูดควัน (Fume Hood) Flexlab รุ่น FH5-13/FB/ Thailand
10. ไมโครปิเปต (Micro Pipet) Rainin รุ่น Pipet-Lite XLS USA
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) Hewlett Packard รุ่น 5890 Series II USA
12. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Thailand
13. เครื่องวัดความเข้มแสง (Light meter) DT-8820

3.3 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl

เพื่อศึกษาถึงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* เปรียบเทียบกับ *Tetraspora* sp. CU2551และ *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหารสูตร TAP ซึ่งเป็นสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนและในอาหารสูตร TP-HCl ซึ่งเป็นสภาวะที่ขาดแหล่งคาร์บอนเพื่อหาชนิดของสาหร่ายและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาต่อโดยจะทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ปริมาตร 50 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml จากนั้นใช้ลูปเขี่ยสาหร่ายในเพลทเลี้ยงเชื้อใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร TAP จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชม. (*Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlamydomonas reinhardtii* ก็ทำเช่น เดียวกัน)
2. เมื่อครบ 24 ชม. จึงทำการเก็บเซลล์สาหร่ายโดยนำสาหร่ายที่ได้ในข้อ 1 ลงในหลอดเซนติฟิวส์ ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาตร 40 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วจึงนำมาเทส่วนใสออก 40 ml และเหลือไว้ 10 ml เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป

3. จากนั้นนำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 170 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml และปิเปต Ampicillin ปริมาตร 0.170 ml ลงไป (ในอาหารสูตร TP-HCl ทำในลักษณะเดียวกัน) ปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ที่ได้ในข้อ 2 ลงในบีกเกอร์ พร้อมกับคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 และ*Chlamydomonas reinhardtii* ทำในลักษณะเดียวกัน)
4. ปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 (OD_{730}=0.2) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer
5. แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ml ปริมาตร 50 ml ทั้งหมด 3 ขวด พร้อมกับปิดด้วยจุกด้านบนปากขวด
6. นำสาหร่ายที่เตรียมนี้เข้าตู้บ่มและทำการวัดค่าความขุ่น (OD_{730}) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ทุกๆ 6 ชม.

3.4 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร TP-HCl

เพื่อศึกษาระยะเวลาในการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตร TP-HCl ซึ่งเป็นสภาวะขาดแหล่งคาร์บอนโดยทำการเลือกสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ดีจากผลการทดลองในข้อ 3.3 โดยจะทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำอาหารสูตร TP-HCl ปริมาตร 170 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml จากนั้นปิเปต Ampicillin ปริมาตร 0.170 ml ลงไป
2. ปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ลงในบีกเกอร์ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 พร้อมกับคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ก็ทำในลักษณะเดียวกัน)
3. ปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 (OD_{730}=0.2) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer
4. แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ml ปริมาตร 50 ml ทั้งหมด 3 ขวด พร้อมกับปิดด้วยจุกผ้าด้านบนปากขวด
5. นำสาหร่ายที่เตรียมนี้เข้าตู้บ่มและทำการวัดค่าความขุ่น (OD_{730}) ทุกๆ 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหาร TAP และ TP-HCl

เพื่อศึกษาถึงปริมาณในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายแต่ละชนิดโดยเราจะเลือกสาหร่ายที่ให้ผลในการเจริญเติบโตได้ดีตามการทดลองที่ 3.3 และ 3.4 ซึ่งได้แก่สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 จึงนำมาทำศึกษาต่อ โดยจะทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำอาหารสูตร TAP ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml ปริมาตร 120 ml จากนั้นเติม Ampicillin ปริมาตร 0.120 ml ลงไป (ในอาหารสูตร TP-HCl ก็ทำในลักษณะเดียวกัน)
2. จากนั้นปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ลงไปและปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730}=0.1) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer (สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ก็ทำในลักษณะเดียวกัน) แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ml ปริมาตร 50 ml ทั้งหมด 2 ขวด พร้อมกับปิดด้วยจุกผ้าด้านบนปากขวดและนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชม.
3. เมื่อบ่มครบ 24 ชม. ก็นำออกมาใส่ในหลอดเซ็นติฟิวส์ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงไปปริมาตร 40 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
4. เมื่อล้างเซลล์ครบ 2 ครั้งแล้วจึงนำมาเทส่วนใสออก 40 ml และเหลือไว้ 10 ml เพื่อนำมาใช้เป็น Starter
5. นำอาหารสูตร TAP ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml ปริมาตร 100 ml จากนั้นเติม Ampicillin ปริมาตร 0.100 ml ลงไป (ในอาหารสูตร TP-HCl ก็ทำในลักษณะเดียวกัน)
6. ปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในข้อ 4 ลงไปและปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 (OD_{730}=0.2) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer (สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ก็ทำในลักษณะเดียวกัน)
7. แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 120 ml ปริมาตร 25 ml ทั้งหมด 3 ขวดปิดปากขวดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมให้แน่นแล้วจึงนำไปพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที
8. จากนั้นนำไปบ่มในตู้แล้วทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟทุกๆ 4 ชม.

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Pack column 2 m; Molecular sieve 13x
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	· Injector temperature : 100 °C · Column temperature : 50 °C · Detector temperature : 100 °C
Carrier gas	Argon 99.99% purity (flow rate 20 mL/min)
Standard	4% H_2 in Ar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การวัดอายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพื่อศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดตามช่วงของการเจริญเติบโตตั้งแต่ late log phase – late stationary phase ของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในอาหาร สูตร TAP ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากในการทดลองข้อ 3.5 นั้นสามารถให้ผลในการผลิตไฮโดรเจนได้ดีและมีความน่าสนใจเราจึงเลือกมาทำการทดลองต่อโดยจะทำการทำลองดังต่อไปนี้

1. นำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 60 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 ml และปิเปต Ampicillin ลงไปปริมาตร 0.060 ml จากนั้นจากนั้นปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ลงไปพร้อมกับปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730}=0.1) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer แล้วจึงเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ml ปริมาตร 50 ml นำไปบ่มในตู้เป็น เวลา 17 (ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันโดยจะบ่มเป็นเวลา 23, 29 และ 41 ชม. ตามลำดับ)
2. เมื่อบ่มสาหร่ายครบตามชั่วโมงที่กำหนดแล้วจึงทำการเก็บเซลล์สาหร่ายโดยจะต้องเก็บพร้อมกันทั้ง 4 ช่วงอายุเซลล์แล้วนำมาทำการล้างเซลล์โดยนำสาหร่ายที่ได้ในข้อ 1. ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาตร 40 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วจึงนำมาเทส่วนใสออก 40 ml และเหลือไว้ 10 ml เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป (1 หลอดเซนติฟิวส์ต่อ 1 ช่วงอายุเซลล์)
3. นำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 10 ml เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 40 ml จากนั้นปิเปต Ampicillin ลงไปปริมาตร 0.010 ml แล้วจึงปิเปตสาหร่ายที่ได้ในข้อ 2 ลงไป (ใช้สาหร่าย 1 ช่วงอายุเซลล์ต่ออาหาร 1 บีกเกอร์) ปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 (OD_{730}=0.2) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 12 ml ปริมาตร 2 ml ทั้งหมด 3 ขวด (1 ช่วงอายุเซลล์ต่อ 3 ขวด vial)
4. ปิดปากขวด vial ด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมให้แน่นจากนั้นนำไปพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 20 ชม.
5. เมื่อบ่มครบ 20 ชม.แล้วจึงนำไปทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวัดความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

เพื่อศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* โดยจากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 3.6 นั้นชั่วโมงที่ 23 ให้ผลการผลิตไฮโดรเจนได้เหมาะสมที่สุดเราจึงได้นำมาทำการทดลองหาความเข้มแสงมี่เหมาะสมต่อไปโดยทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 120 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml และปิเปต Ampicillin ลงไปปริมาตร 0.120 ml จากนั้นปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ลงไปพร้อมกับปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730}=0.1) ด้วยเครื่องUV-visible spectrophotometer แล้วจึงเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ml ปริมาตร 50 ml นำไปบ่มในตู้เป็นเวลา 23 ชม.
2. เมื่อบ่มสาหร่ายครบตามชั่วโมงที่กำหนดแล้วนำมาทำการล้างเซลล์โดยนำสาหร่ายที่ได้ในข้อ 1. ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาตร 40 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วจึงนำมาเทส่วนใสออก 40 ml และเหลือไว้ 10 ml เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป
3. นำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 50 ml เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 ml จากนั้นปิเปต Ampicilin ลงไปปริมาตร 0.050 ml จากนั้นปิเปตสาหร่ายที่ได้ในข้อ 2 ลงไป ปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 (OD_{730}=0.2) แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 12 ml ปริมาตร 2 ml ทั้งหมด 18 ขวด
4. ปิดปากขวด vial ด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมให้แน่นจากนั้นนำไปพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที
5. ทำการปรับระดับความเข้มแสงด้วยเครื่องLux meter ให้เท่ากับ 500, 1,000, 1,500 2,000, 2,500 และ 3000 lux แล้วจึงทำการห่อขวด vial ที่ได้ในข้อ 4 ให้มีความเข้มแสงตามที่เครื่องวัดได้ (1 ระดับความเข้มแสงต่อ vial 3 ขวด) จากนั้นบ่มต่อเป็นเวลา 20 ชม.
6. เมื่อบ่มจนครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงนำไปทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การวัดความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

เพื่อศึกษาความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ทำการทดลองซึ่งจะปรับความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายให้อยู่ในช่วง 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ตามลำดับแล้วจึงหาความหนาแน่นที่จะส่งผลให้มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนเหมาะสมที่สุดโดยเราจะทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. นำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 120 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml และปิเปต Ampicillin ลงไปปริมาตร 0.120 ml จากนั้นปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ลงไปปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730}=0.1) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer แล้วจึงเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ml ปริมาตร 50 ml ทั้งหมด 2 ขวด พร้อมกับนำไปบ่มในตู้เป็นเวลา 23 ชม.
2. เมื่อบ่มสาหร่ายครบตามชั่วโมงที่กำหนดแล้ว นำมาทำการล้างเซลล์โดยนำสาหร่ายที่ได้ในข้อ 1. ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาตร 40 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วจึงนำมาเทส่วนใสออก 40 ml และเหลือไว้ 10 ml เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป
3. นำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 40 ml เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 ml จากนั้นปิเปต Ampicillin ลงไปปริมาตร 0.040 ml แล้วจึงปิเปตสาหร่ายที่ได้ในข้อ 2 ลงไป ปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730}=0.1) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 13 ml ปริมาตร 5 ml ทั้งหมด 5 ขวด (ที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์ 0.2-0.5 ก็ทำในลักษณะเดียวกัน)
4. ปิดปากขวด vial ด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมให้แน่นจากนั้นนำไปพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 20 ชม.
5. เมื่อบ่มจนครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงนำไปทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.9 การวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้จากการปรับสภาวะให้เหมาะสม

เพื่อศึกษาหาสภาวะที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนจากการทำการทดลองในข้อ 3.3 - 3.8 ทำให้ทราบถึงสภาวะต่างที่เหมาะสมเราจึงนำเอาผลที่ได้นั้นมาทำการทดลองต่อโดยใช้สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*, อาหารสูตร TAP, อายุเซลล์สาหร่ายที่ 23 ชม., แสง 1,500 lux และความหนาแน่นของเซลล์ 0.2 ตามลำดับ ซึ่งจะทำการทดลองดังต่อไปนี้

1. แล้วจึงเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ml ปริมาตร 50 ml ทั้งหมด 2 ขวด พร้อมกับนำไปบ่มในตู้เป็นนำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 120 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml และปิเปต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ampicillin ลงไปปริมาตร 0.120 ml จากนั้นปิเปตสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ลงไปปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 (OD_{730}=0.1) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer เวลา 23 ชม.

2. เมื่อบ่มสาหร่ายครบตามชั่วโมงที่กำหนดแล้วจึงนำมาทำการล้างเซลล์โดยนำสาหร่ายที่ได้ในข้อ 1. ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวส์ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาตร 40 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วจึงนำมาเทส่วนใสออก 40 ml และเหลือไว้ 10 ml เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป
3. นำอาหารสูตร TAP ปริมาตร 140 ml เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 ml จากนั้นปิเปต Ampicilin ลง ไปปริมาตร 0.140 ml แล้วจึงปิเปตสาหร่ายที่ได้ในข้อ 2 ลงไป ปรับวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 (OD_{730}=0.2) ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer แล้วจึงแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 100 ml ปริมาตร 25 ml ทั้งหมด 5 ขวด
4. ปิดปากขวด vial ด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียมให้แน่นจากนั้นนำไปพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที
5. ทำการปรับระดับความเข้มแสงด้วยเครื่อง Lux meter ให้เท่ากับ 1,500 lux แล้วจึงทำการห่อขวด vial ที่ได้ในข้อ 4 ให้มีความเข้มแสงตามค่าวัดไว้ทั้ง 5 ขวด จากนั้นบ่มต่อเป็นเวลา 20 ชม.
6. เมื่อบ่มจนครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงนำไปทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

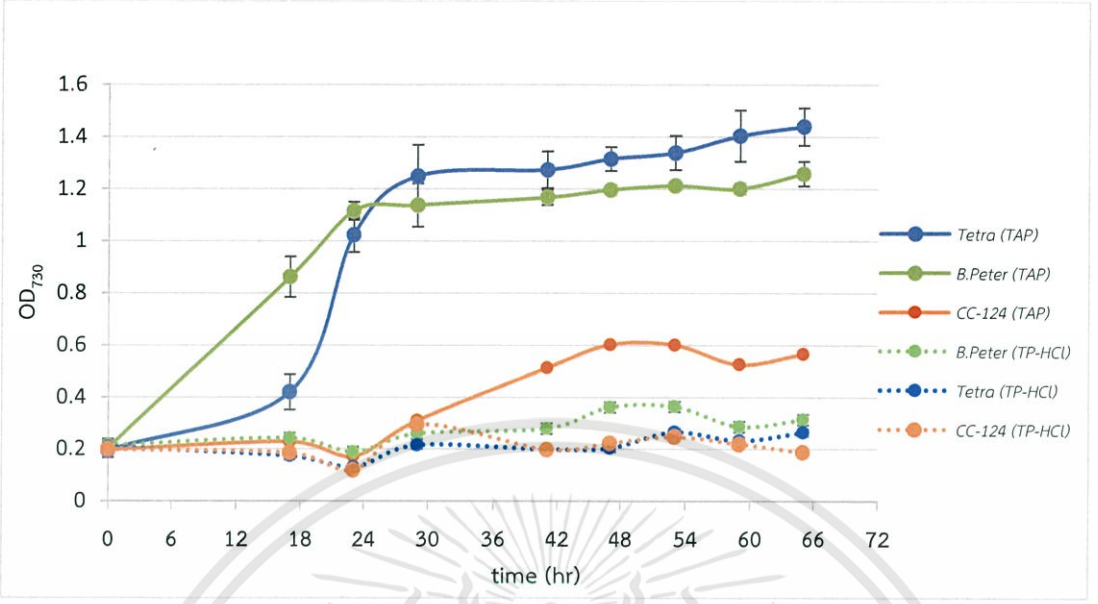
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl

การศึกษาครั้งนี้ต้องการดูผลการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* เปรียบเทียบกับ *Tetraspora* sp. CU2551และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และ Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) ซึ่งเป็นอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไม่มีแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) จะมี Acetate เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับสาหร่ายใช้ในการเจริญเติบโตซึ่งจะต่างกับอาหาร Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนสำหรับให้สาหร่ายใช้ในการเจริญเติบโต โดยให้มีความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น (OD_{730} = 0.2) จากนั้นนำไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 65 ชั่วโมง และทำการวัดความขุ่นทุกๆ 6 ชั่วโมง

ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.1 จะแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีการเจริญเติบโตได้ดีมากกว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ซึ่งสาหร่ายทั้งสามชนิดถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 36°C จึงเป็นข้อสังเกตว่าสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีการเจริญเติบโตได้ดีและรวดเร็วเพราะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากกว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่อุณหภูมิ 36°C อาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจึงเป็นผลทำให้มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างช้า ส่วนในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) พบว่าสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*, *Tetraspora* sp. CU2551และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และยังตรวจพบค่าความขุ่นของเซลล์สาหร่ายที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จึงเป็นไปได้ว่าเซลล์สาหร่ายอาจจะมีการตายหรือเซลล์สาหร่ายมีการเจริญเติบโตช้าจึงต้องทำการทดลองขยายเวลาเลี้ยงให้นานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



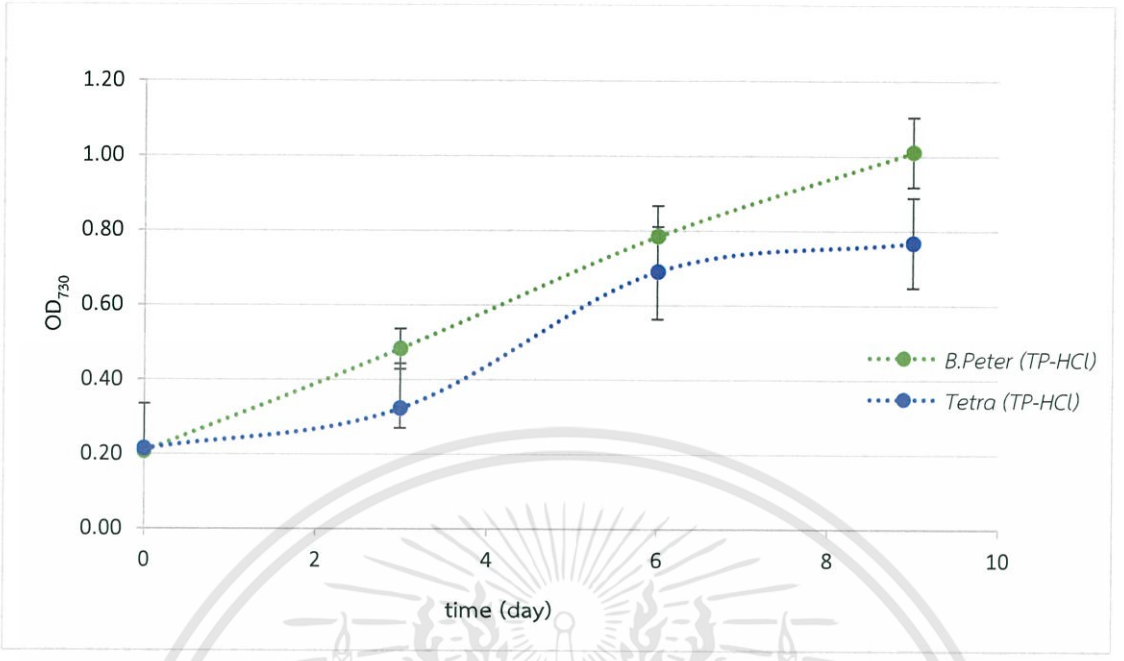
รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* , *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl

4.2 ผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร TP-HCl

จากหัวข้อก่อนหน้าจึงลองทดสอบว่าสาหร่ายเจริญเติบโตได้ช้าในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) จริงหรือไม่ โดยทำการเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตได้ดี คือ สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora sp.* CU2551 มาทำการเลี้ยงในอาหาร Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนให้สาหร่ายได้ใช้ในการเจริญเติบโต โดยให้มีความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น (OD_{730} = 0.2) จากนั้นนำไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 216 ชั่วโมง (9 วัน) และทำการวัดความขุ่นทุกๆ 3 วัน

ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.2 จะแสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง TP-HCl ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนได้แต่เติบโตได้ค่อนข้างช้า แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* และ *Tetraspora* sp. CU2551 สามารถสร้างอาหารเองได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้มีการเจริญเติบโตได้ทั้งในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งคาร์บอนและอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน แสดงว่า สาหร่าย 2 ชนิดนี้สามารถที่จะเจริญเติบโตได้แบบ mixotrophic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร TP-HCl

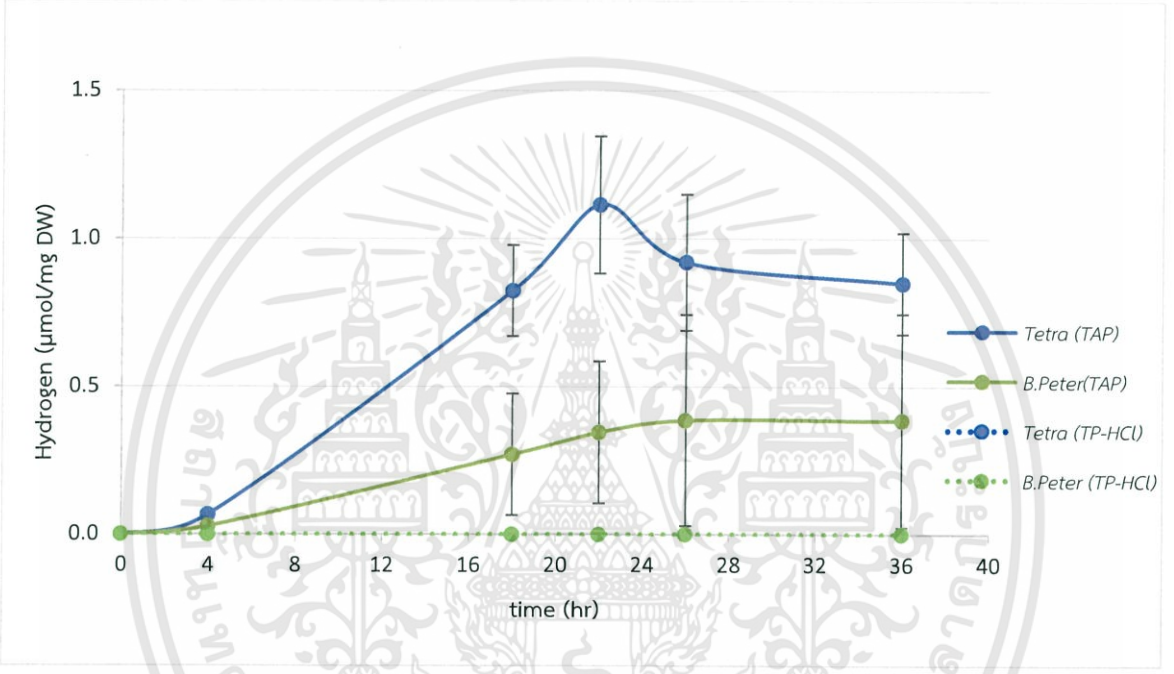
4.3 ผลการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหาร TAP และ TP-HCl

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 จึงได้ทำการเลือกสาหรายที่มีการเจริญเติบโตที่ดี คือ สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 มาทำการเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และ Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงไว้ใส่ขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใส่เซลล์สาหร่ายปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนในตู้บ่มเชื้อ ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า

- ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่า สาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* โดยที่สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดที่ 1.11 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งและจะเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 22 ส่วนสาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนประมาณครึ่งหนึ่งของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551
- ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) ไม่สามารถตรวจพบการผลิตไฮโดรเจนทั้งในสาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* และ *Tetraspora* sp. CU2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่า สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด ส่วนสาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้เพียงครึ่งหนึ่ง อย่างไรก็ตาม สาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* มาจากแหล่งน้ำเสียจึงต้องการทดสอบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายนี้ต่อไป โดยจะทำการแปรอายุเซลล์, ความเข้มแสง, ความขุ่นเริ่มต้นของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และสุดท้ายจะทำการทดลองอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในระยะยาวจากตัวแปรที่ได้ทำการศึกษามาแล้ว



รูปที่ 4.3 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหาร TAP และ TP-HCl

4.4 ผลการวัดอายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากผลการทดลองข้างต้นทำให้สามารถเลือกสาหร่ายที่จะนำมาทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ที่มีการเจริญเติบโตและมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ดี ทั้งยังเป็นสาหร่ายที่พบในน้ำเสียส่าน้ำตาล ในโรงงานผลิตเอทานอล อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ที่ช่วยในการบำบัดน้ำเสียส่าน้ำตาล (ปัญญาและคณะ 2559) ในการทดลองหาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ตามช่วงเวลาที่เหมาะสม จากการแบ่งช่วงอายุของเซลล์ในกราฟที่ 4.1 สามารถแบ่งอายุเซลล์ได้ตั้งแต่ช่วง late log phase - late stationary phase เป็น 4 ช่วง คือ 17, 23, 29 และ 41 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำสาหร่ายที่ถูกเพาะเลี้ยงตามช่วงเวลาดังกล่าวข้างต้น มาทำการบ่มเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 13 มิลลิลิตร โดยใส่เซลล์สาหร่ายปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนในตู้บ่มเชื้อ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าอายุเซลล์ของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วง 17, 23, 29 และ 41 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 0.0306, 0.0349, 0.0340และ 0.0145 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง ตามลำดับ และยังพบว่าอายุเซลล์ของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วง 17 และ 23 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ดังนั้น จึงเลือกใช้อายุเซลล์ของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วง 23 ชั่วโมง ที่มีปริมาณเซลล์ช่วงเวลาที่เหมาะสมแก่การทดลองและอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ดีมาใช้ในปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

รูปที่ 4.4 อายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ต่อการผลิตไฮโดรเจน

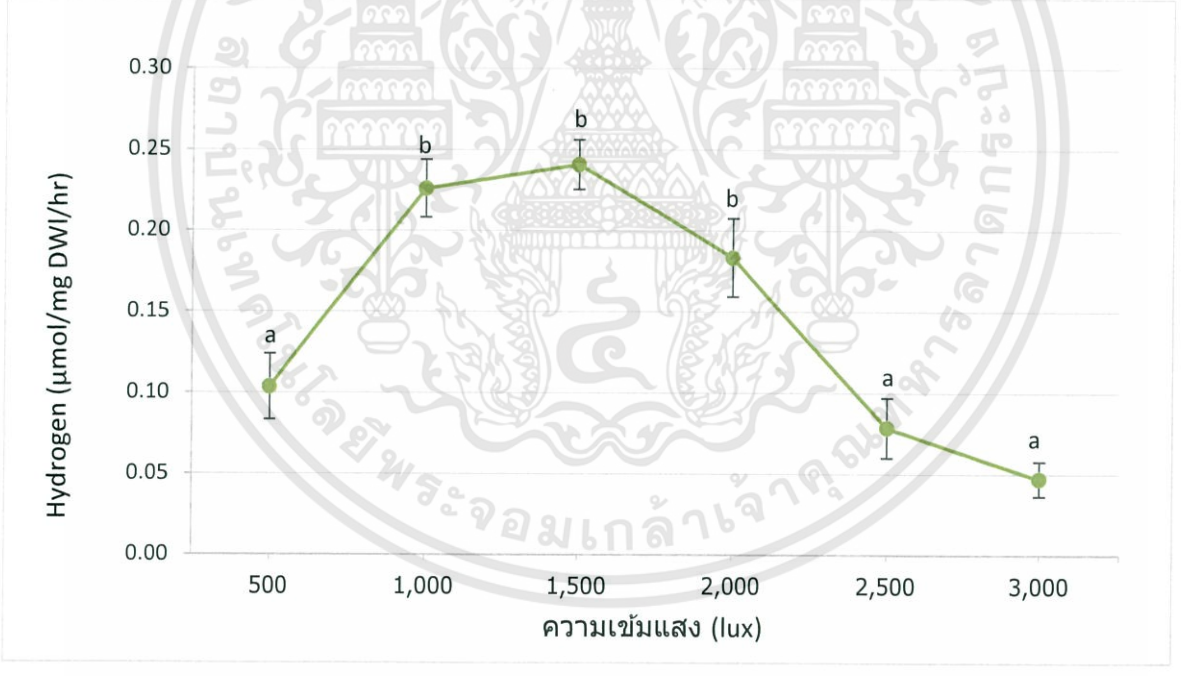
4.5 ผลการวัดความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

จากผลการทดลองข้างต้นที่มีผลการทดลองอายุเซลล์ของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วงเวลาเพาะเลี้ยง 23 ชั่วโมง เนื่องจาก แสงเป็นตัวแปรที่กระบวนการสังเคราะห์แสงที่ระบบแสง PSII จะผลิตอิเล็กตรอน (e^-) ซึ่งเป็น substrate ของ hydrogenase และก๊าซออกซิเจน (O_2) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ hydrogenase ปรับความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามช่วงเวลาที่ 23 ชั่วโมง จากนั้นนำสาหร่ายที่ถูกเพาะเลี้ยงตามช่วงเวลาดังกล่าวข้างต้น มาทำการบ่มเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 13 มิลลิลิตร โดยใส่เซลล์สาหร่ายปริมาตร 2 มิลลิลิตร และทำการปรับระดับความเข้มแสงที่ใช้ในการบ่มสาหร่ายตั้งแต่ช่วง 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 และ 3,000 ลักซ์ เป่าด้วยอาร์กอน (Ar) 5 นาที เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน (O_2) ที่อยู่ระบบ จากนั้นนำ gas-tight vial ไปบ่มเป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วงความเข้มแสง 1,000, 1,500 และ 2,000 ลักซ์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 0.2259, 0.2407 และ 0.1834 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ จะเห็นได้ว่าในช่วงความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ดังนั้น จึงเลือกใช้ในช่วงความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าช่วงความเข้มแสงอื่นๆ จากการทดลอง



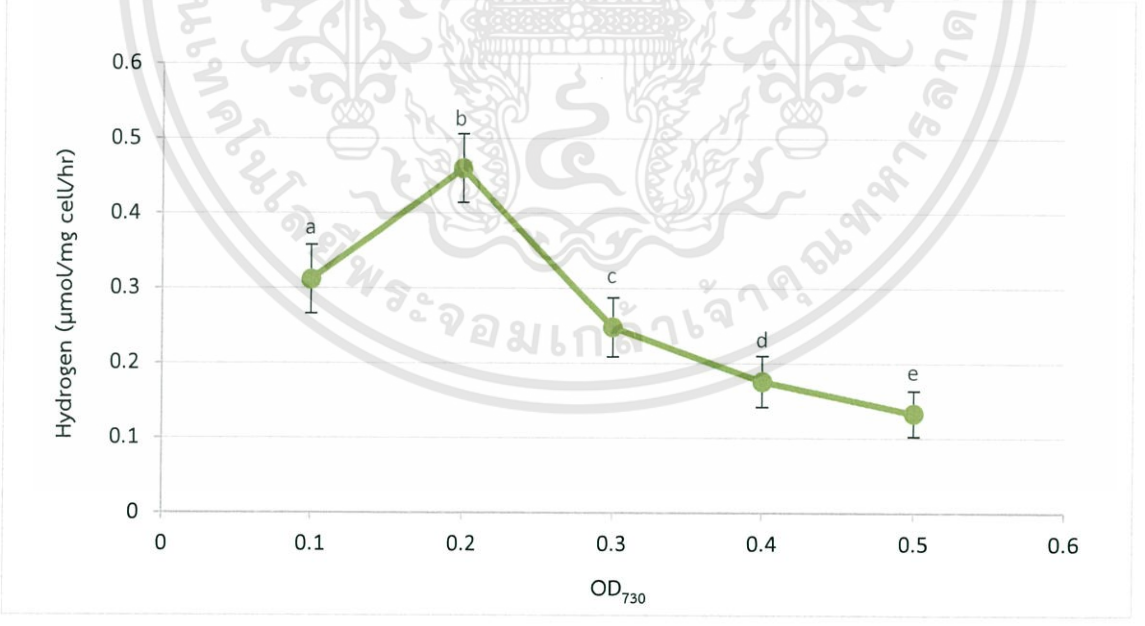
รูปที่ 4.5 ความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการวัดความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

จากผลการทดลองข้างต้นที่มีผลการทดลองอายุเซลล์ของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วงเวลาเพาะเลี้ยง 23 ชั่วโมง ทำการหาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายตามช่วงเวลาที่ 23 ชั่วโมง จากนั้นนำสาหร่ายที่ถูกเพาะเลี้ยงตามช่วงเวลาดังกล่าวข้างต้น มาทำการบ่มเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 13 มิลลิลิตร โดยใส่เซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตร และทำการปรับระดับความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ในการบ่มสาหร่ายตั้งแต่ช่วง 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 นำไปบ่มในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนในตู้บ่มเชื้อ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าความแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วงความความแน่น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 0.3116, 0.4601, 0.2479, 0.1757 และ 0.1330 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ จะเห็นได้ว่าในช่วงความหนาแน่นที่ 0.2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ดังนั้น จึงเลือกใช้ช่วงความหนาแน่นที่ 0.2 ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าช่วงความหนาแน่นอื่นๆ จากการทดลอง



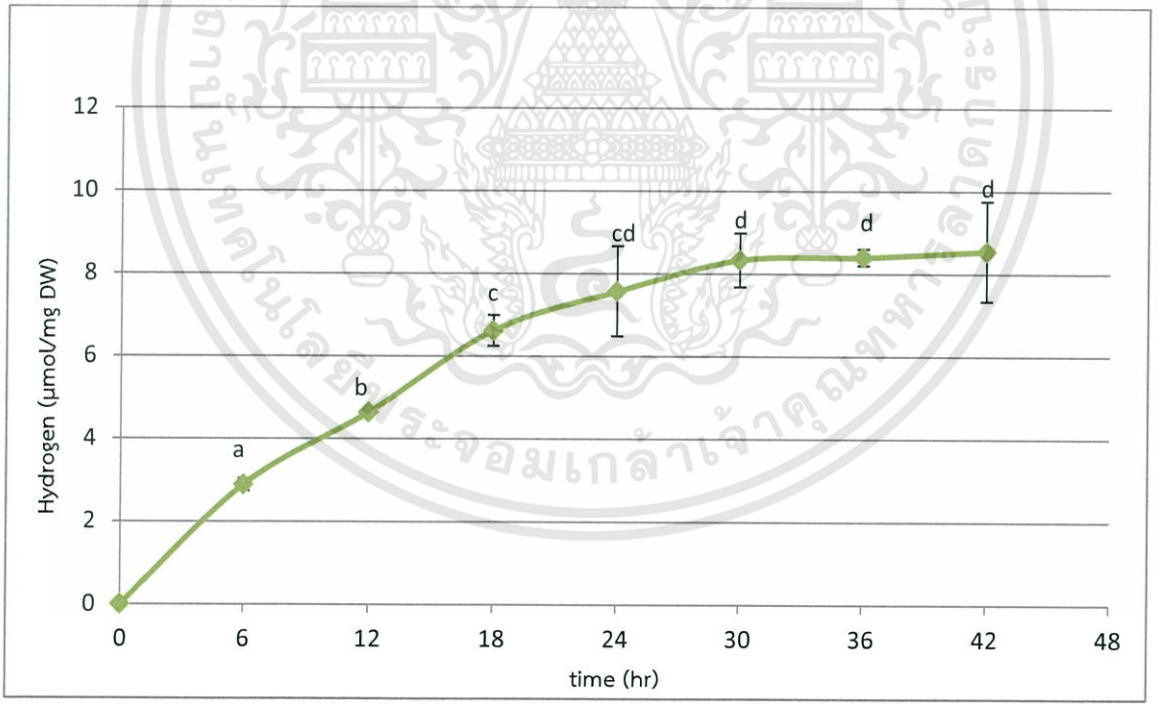
รูปที่ 4.6 ความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้จากการปรับสภาวะให้เหมาะสม

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3 - 4.6 ทำให้ได้ผลในการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในการทดลองส่วนนี้จะทำการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องโดยจะเลี้ยงสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) เป็นเวลา 23 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเซลล์เริ่มต้น (OD_{730} = 0.2) ใส่ขวด vial เป่าด้วยอาร์กอน (Ar) เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจน (O_2) ออก บ่มที่ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ทำการฉีดวัดปริมาณไฮโดรเจนในแต่ละช่วงเวลาให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมนิ่ง

ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ภายใต้ความเข้มแสงช่วง 1500 ลักซ์ สาหร่ายที่อายุ 23 ชั่วโมง จะแสดงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นโดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.33 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งภายเวลา 29 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการปรับสภาวะที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.39 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง คิดเป็น 21.36 เท่า



รูปที่ 4.7 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้จากการปรับสภาวะให้เหมาะสมของ *Bumileriopsis peterseniana*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตร TAP และ TP-HCl

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* กับสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 และ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และ Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) พบว่า สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีการเจริญเติบโตได้ดีมากกว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

5.1.2 ผลการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร TP-HCl

จากการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* กับ สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหาร Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) พบว่า สาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* และ *Tetraspora* sp. CU2551 มีการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนได้แต่ค่อนข้างช้า จึงแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายทั้งสองชนิดสามารถสร้างอาหารเองได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงว่าสาหร่าย 2 ชนิดนี้สามารถที่จะเจริญเติบโตได้แบบ mixotrophic

5.1.3 ผลการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายในอาหาร TAP และ TP-HCl

จากการวัดปริมาณไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* กับ สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และ Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) พบว่า สาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าสาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) และในอาหารเพาะเลี้ยง Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) สาหร่าย *Bumileriopsis petersenia* และ *Tetraspora* sp. CU2551 ไม่มีการผลิตไฮโดรเจน

5.1.4 ผลการวัดอายุเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการเลือกช่วงอายุเซลล์ของสาหร่าย *Bumileriopsis* peterseniana ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน พบว่า ช่วงอายุเซลล์ของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ในช่วง 23 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์และอัตราการผลิตไฮโดรเจนมากเท่ากับ 0.03 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.5 ผลการวัดความเข้มแสงที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Bumileriopsis peterseniana*

จากการเลือกช่วงความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* พบว่า ในช่วงความเข้มแสงที่ 1,500 ลักซ์ สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* มีอัตราการผลิตมากที่สุดเท่ากับ 0.24 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง

5.1.6 ผลการวัดความหนาแน่นของเซลล์ต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana*

จากการเลือกช่วงความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน พบว่า ที่ช่วงความหนาแน่นของเซลล์ OD_{730} เท่ากับ 0.2 สาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.46 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง

5.1.7 ผลการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สาหร่ายผลิตได้จากการปรับสภาวะให้เหมาะสม

จากการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Bumileriopsis peterseniana* ที่ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น OD_{730} เท่ากับ 0.2 สาหร่ายที่อายุ 23 ชั่วโมง ในช่วงความเข้มแสงที่ 1500 ลักซ์ จะแสดงความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 8.33 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง ซึ่งคิดเป็น 21 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทำโครงงานพิเศษซึ่งเป็นการศึกษาการปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Bumileriopsis peterseniana* สามารถสรุปของเสนอแนะเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปได้ดังนี้

1. การเลือกใช้หน่วยในการคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนสามารถเปลี่ยนเป็นหน่วย มิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ได้
2. ในงานวิจัยต่อไปอาจจะทำการทดลองในการหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนหรือทำการทดลองการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจน
3. ในงานวิจัยต่อไปอาจจะทำการทดลองใช้น้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้แหล่งคาร์บอนจาก acetate
4. ควรขีด plate และทำ starter ใหม่ทุก 1 อาทิตย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ปัญญารักษ์ รุ้งนุรักษ์, ผดา โล่ห์วชิรหัตถ์, พชรพล พุกพิบูลย์. 2559. **การคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากน้ำเสียโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อการบำบัดน้ำเสียส่าน้ำตาล.** โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วัชระ เวียงแก้ว. 2554. **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องการสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย.** [online]. Available : file:///C:/Users/Administrator/Downloads/Fulltext%233_55639%20(1).pdf เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2560

วิทวัส แจ้งเอี่ยม. 2553. **กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย.** วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 1, 13(2553):69-77.

วรรษมน นาคขุนทด, ปานชีวา ปัญจะเรือง, แพรวนภา แก้วบุญปัน, จีรพร เพกเกาะ และ ชยากร ภูมาศ. 2558. **การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สาหร่ายขนาดเล็ก.** [online]. Available : file:///C:/Users/Administrator/Downloads/68530-160627-1-SM.pdf เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2560

สรัญญา พันธุ์พฤกษ์, อรัญ อินเจริญศักดิ์. 2557. **การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย.** [online]. Available : file:///C:/Users/Administrator/Downloads/Abstract_185514%20(1).pdf เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2560

Antal TK, Lindblad P (2005). **Production of H2 by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH.** J Appl Microbiol 98:114–120.

Dutta M, Nikki G, Shah V. (2000). **Cyanobaeterial hydroger product.** World J Microbiol Biotechno 16:8-9.

Elizabeth H. Burrows, Frank W.R. Chaplen, Roger L. Ely. **Optimization of media Nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by Synechocystis sp. PCC 6803.** International journal of hydrogen energy ,33 (2008):6092-6099.

Fikret Mamedov (2013). **Hydrogen photoproduction in green algae Chamydomonas reinhardtii under magnesium deprivation.**

Hallenbeck and Benemann (2002). **Biological hydrogen production fundamentals and limiting processes.** Int Hydrogen Energy 27:1185-1193.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hall, D.O., S.A. Markov, Y. Watanabe and K.K. Rao. (1995) The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean tecnologise Photosynthesis Res., 46.159-167

Happe T, Schuetz K and Boehme H (2000). **Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC29413.** J Bacteriol 182:1624-1631.

Heyer H, Stal LJ and Krumbein WE (1989). **Simultameous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limnosa* incubated anaerobically in the dark.** Arch Microbiol 151:1558-1564.

Howarth DC and Codd GA (1985). **The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria.** J Gen Microbiol 131:1561-1569.

Ji Hye Jo a, Dae Sung Lee , Donghee Park , Woo-Seok Choe. **Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by Enterobacter aerogenes using statistical methods.** Bioresource Technology , 99(2008):2061-2066.

Lambert GR, Smith GD (1977). **Hydrogen formation by marine blue-green algae.** FEBS Lett 83:159-162.

Laurinavichene, T.V., S.N. Kosourov, M.L. Ghirardi, M. Seibert and A.A. Tsygankov (2008). **Prolongation of H_2 photoproduction by immobilized, sulfur-limited *Chlamydomonas reinhardtii* cultures.** J Biotechnol 2008;134:275-277

Levine C, Faden R, Grady C. (2004). **The limitations of "Vulnerability" as a Protection for Human Research Participants.** American Journal of Bioethics (4)3:44-49.

Maneeruttanarungroj C., Lindblad P., Incharoensakdi A. **A newly isolated green alga, Tetraspora sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production.** Int Hydrogen Energy 2010;35:13193-99.

Masukawa H, Nakamura K, Mochimaru M and Sakurai H (2001). **Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria.** In: Miyake J, Matsunaga T, San Pietro A, editors. Biohydrogen II. Elsevier pp63-66.

Melis, A., Zhang L, Forestier M, Ghirardi M.L., Seibert M. (2000). **Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*.** Plant Physiol 122:127-135.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moezelaar R and Stak LJ (1994). **Fermentation in the unicellular cyanobacterium *Microcystis* PCC 7806**. Arch Microbiol 162:63-69.

Ni M, Leung D, Leung M, Sumathy K. (2006). **An overview of hydrogen production from biomass fuel process**. Technol 87(5):461-472.

Phlips EJ, Mitsui A (1983). **Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7**. Appl Environ Microbiol 45:1212–1220.

Ripoll N. , Silvestre C. , Paredes E. , **Toledo M. Hydrogen production from algae biomass in rich natural gas-air filtration combustion.** Int Hydrogen Energy 2016. p.1-9.

Serebryakova LT, Sheremetieva M, Tsygankov AA (1998). **Reversible hydrogenase activity of *Gloeocapsa alpicola* in continuous culture**. FEMS Microbiol Lett 166:89–94.

Serebryakova LT, Sheremetieva M, Lindblad P (1999). **Hydrogenase activity of the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU743 under conditions of nitrogen limitation**. Microbiology 68:249–253.

Shah, D.V., Domke, D., & Wackman, D.B. (2001). **Exploitation of cyanobacteria for photrohydrogen production and wastewater treatment**. Ph. D. thesis, Sardar Patel University, Vallabvidyanogar, India.

Surattiporn Rattana. 2015. **Hydrogen Production By the Green Alge Scenedesmus sp. KMITL-01 under Heterotrophic Conditions**. ResearchGate 2015.114-120

Sveshnikov DA, Sveshnikova NV, Rao KK and Hall DO (1997). **Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress**. FEBS Microbiol Lett 147:297-301.

Van der Oost J, Bulthuis BA, Feitz S, Krab K and Kraayenhof R (1989). **Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC7822**. Arch Microbiol 152:415-419.

Walid M. Alalayah. 2014. **Experimental Investigation Parameters of Hydrogen Production by Algae Chlorella Vulgaris**. Environment & Biological Sciences 2014.41-43.

Weissman and Benemann (1977). **Hydrogen production by nitrogen starved cultures of *Anabaena cylindrical***. Appl Environ Microbiol 33:123-131.

Winkler, M., Hemschemeier, A., Gotor, C., Melis, A., Happer, T. (2002). **[Fe]-hydronases in green algae photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation**. Int Hydrogen Energy 27:1431- 1439.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xueqing Shi , Dong-Hoon Kim , Hang-Sik Shin , Kyung-Won Jung. **Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from Laminaria japonica by anaerobic mixed cultures.** Bioresource Technology ,144 (2013):225-231.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีการเลี้ยงสาหร่าย

1. การเตรียมอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) แบบเหลว (ที่มา : Culture Collection of Cryophilic Algae)

   1.1 ชั่งสาร Tris ปริมาณ 24.2 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 1

   1.2 ชั่งสาร NH_4Cl ปริมาณ 3.75 g $Mg.SO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณ 1.00 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ปริมาณ 0.05 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 2

   1.3 ชั่งสาร K_2HPO_4 ปริมาณ 2.88 g KH_2PO_4 ปริมาณ 1.44 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 3

   1.4 ชั่ง $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ปริมาณ 0.50 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณ 0.22 g H_3BO_3 ปริมาณ 0.114 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ปริมาณ 0.05 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณ 0.05 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ปริมาณ 0.016 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ปริมาณ 0.016 g $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ปริมาณ 0.007 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 4

   1.5 CH_3COOH con. 100% ให้เป็น ขวดที่ 5

   1.6 นำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL โดยปิเปตสารละลายขนาด ต่างๆ ดังนี้

   สารละลายขวดที่ 1 ปิเปตปริมาตร 10 mL
   สารละลายขวดที่ 2 ปิเปตปริมาตร 25 mL
   สารละลายขวดที่ 3 ปิเปตปริมาตร 1 mL
   สารละลายขวดที่ 4 ปิเปตปริมาตร 1 mL
   สารละลายขวดที่ 5 ปิเปตปริมาตร 1 mL

   จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 mL จะได้อาหาร TAP แบบเหลวขนาด 1,000 mL นำไปแช่ในตู้แช่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) แบบวุ้น (ที่มา : Culture Collection of Cryophilic Algae)

2.1 การเตรียม Ampicillin

นำผง Ampicillin ปริมาณ 200 mg ใส่ในหลอด Eppendorf เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2.2 การผสม TAP วุ้น

เติมอาหาร TAP ปริมาตร 500 mL ในโหลแก้ว 1,000 mL เติมผงวุ้นปริมาณ 7.5 g (1.5%) ลงในโหลแก้ว คนสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นแล้วนำอาหาร TAP มาเติมสาร Ampicillin ปริมาณ 20 mg/ml โดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำสารละลายที่ได้มาเทใส่จานเพาะเชื้อ

2.3 การเตรียมจุกปิด flask

นำผ้าก็อตหรือผ้าขาวบาง มาห่อสำลี แล้วลองนำมาปิด flask ให้มีขนาดพอดี ไม่หลวมและไม่แน่นจนเกินไป

2.4 Plate Streaking

ขูดสาหร่ายจากหัวเชื้อประมาณ 1 loop แล้วนำมาขีดในเพลทที่มี TAP วุ้น นำสาหร่ายไปบ่มในเครื่องบ่ม รอให้สาหร่ายเจริญเติบโตประมาณ 5 วัน (ขั้นตอนทุกอย่างทำในตู้ปลอดเชื้อ โดยเปิดแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อก่อนทำ 15 นาที)

2.5 การเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่าย

นำสาหร่ายจากข้อ 3.3.4 มาประมาณ 1 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 mL ที่มีอาหาร TAP แบบเหลวอยู่ปริมาตร 50 mL ใช้จุกสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิด แล้วนำเข้าเครื่องบ่มเป็นเวลา 2 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนสาหร่าย

2.6 การทำ Starter

นำสาหร่ายจากข้อ 1.5 ปริมาตร 50 mL ใส่ในหลอดเซ็นติฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้งปริมาตร 45 mL ที่เหลือ 5 mL นำมาใช้เป็น Starter ปิเปต Starter ปริมาตร10 µL (โดยใช้ไมโครปิเปต) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 990 µL นำไปวัดค่าความขุ่น OD_{730} เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณสาหร่ายที่ต้องปิเปตโดยต้องการให้มีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย

เลี้ยงสาหร่ายในตู้บ่มเชื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 36 °C ความเข้มแสง 1,500 lux และความเร็วรอบ 3,000 rpm

3. การเตรียมอาหาร Tris-Phosphate-Hydrochloric (TP-HCl) แบบเหลว (ที่มา : Culture Collection of Cryophilic Algae)

1.1 ชั่งสาร Tris ปริมาณ 24.2 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 1

1.2 ชั่งสาร NH_4Cl ปริมาณ 3.75 g $Mg.SO_4{\cdot}7H_2O$ ปริมาณ 1.00 g $CaCl_2{\cdot}\ 2H_2O$ ปริมาณ 0.05 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 2

1.3 ชั่งสาร K_2HPO_4 ปริมาณ 2.88 g KH_2PO_4 ปริมาณ 1.44 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 3

1.4 ชั่ง $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ ปริมาณ 0.50 g $ZnSO_4\ {\cdot}7H_2O$ ปริมาณ 0.22 g H_3BO_3 ปริมาณ 0.114 g $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ ปริมาณ 0.05 g $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ ปริมาณ 0.05 g $CoCl_2{\cdot}6H_2O$ ปริมาณ 0.016 g $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ ปริมาณ 0.016 g $(NH_4)_6MO_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ ปริมาณ 0.007 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL คนสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้เป็นสารละลาย ขวดที่ 4

1.5 HCl con. 100% ให้เป็น ขวดที่ 5

1.6 นำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL โดยปิเปตสารละลายขนาด ต่างๆ ดังนี้

สารละลายขวดที่ 1 ปิเปตปริมาตร 10 mL

สารละลายขวดที่ 2 ปิเปตปริมาตร 25 mL

สารละลายขวดที่ 3 ปิเปตปริมาตร 1 mL

สารละลายขวดที่ 4 ปิเปตปริมาตร 1 mL

สารละลายขวดที่ 5 ปิเปตปริมาตร 1 mL

จากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 mL จะได้อาหาร TAP แบบเหลวขนาด 1,000 mL นำไปแช่ในตู้แช่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณไฮโดรเจน

1. การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสาหร่ายที่ต้องการใช้

วัด OD ของสาหร่ายโดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 730 nm

สมมติ วัด UV_{730} = 0.100 nm

= 0.100 nm × 100

= 10nm

ใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

C_1 = ความเข้มแสงของสาหร่ายที่วัดได้

V_1 = ปริมาณของสาหร่ายที่ต้องการใช้

C_2 = ความเข้มแสงของสาหร่ายที่ต้องการใช้

V_2 = ปริมาตรอาหารTAP

ตัวอย่าง หาปริมาณของสาหร่ายที่ต้องใช้ในอาหาร TAP 500 mL

จะได้ $(15\ nm) \times V_1 = (0.01\ nm) \times (500\ mL)$

$$V_1 = \frac{(0.01\ \cancel{nm}) \times (500\ mL)}{(10\ \cancel{nm})}$$

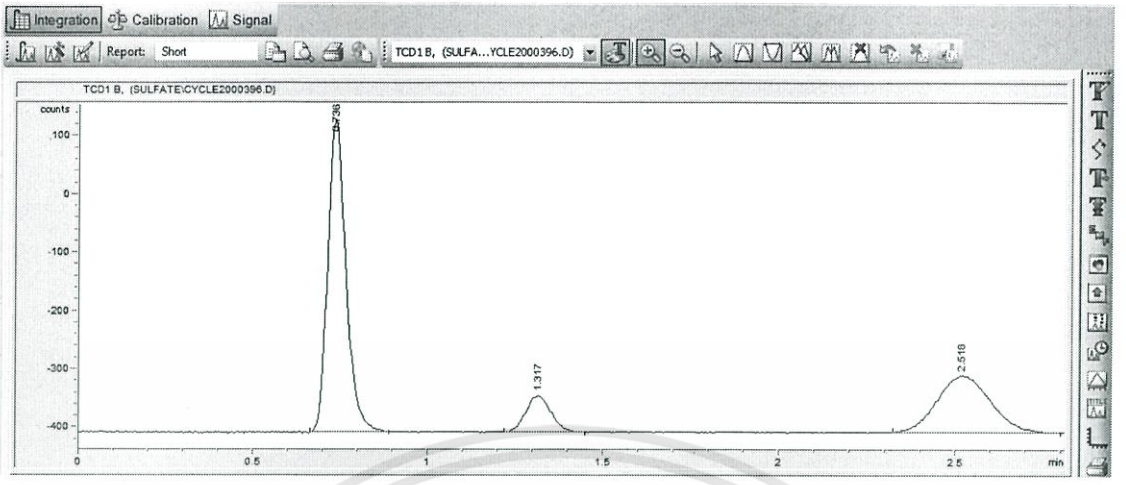
= 0.5 mL หรือ 500 µL

ดังนั้น ปริมาณของสาหร่ายที่ต้องใช้คือ 500 µL

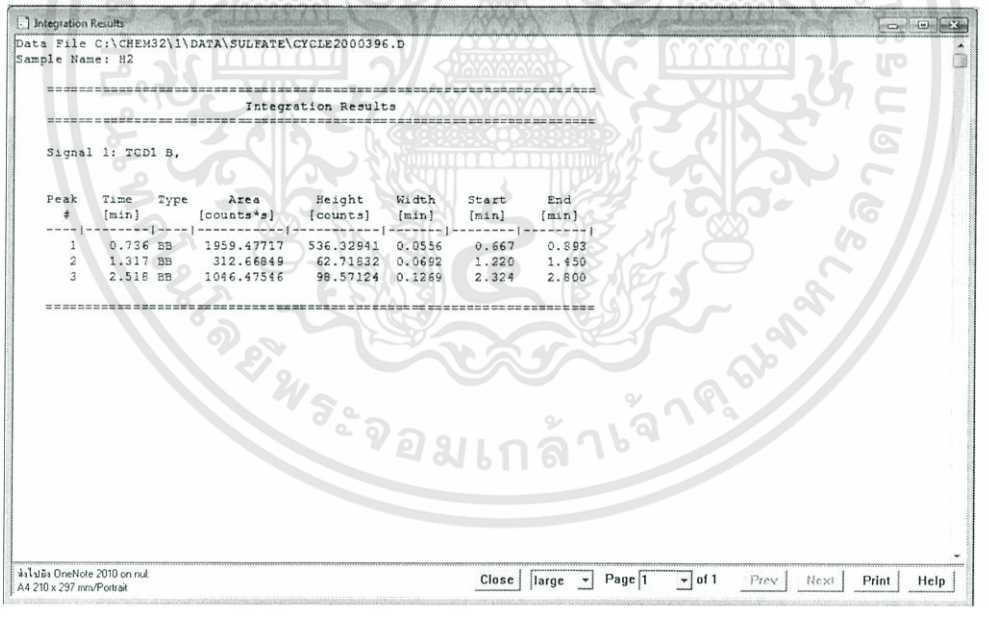
2. วิธีการคำนวณหาปริมาณไฮโดรเจนที่วัดได้

การแสดงผลพีคจากการฉีดตัวอย่างด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้โปรแกรม Instrument Data Analysis พีคไฮโดรเจนจะขึ้นหลังจากฉีดเป็นเวลา 30 วินาที หลังจากพีคไฮโดรเจนขึ้น 20 วินาทีจะเป็นพีคออกซิเจน และหลังจากพีคออกซิเจนขึ้น 20 วินาที จะเป็นพีคไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-1 ตัวอย่างการแสดงผลพีคไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน



รูปที่ ข-2 ตัวอย่างการแสดงค่าพีคไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณ

Standard (4%H_2) มีพื้นที่ = 1,500 mV.S

ตัวอย่างพีคไฮโดรเจน มีพื้นที่ = 1959.47717 mV.S

2.1 หา Head Space ว่ามีไฮโดรเจนกี่โมล

ฉีดตัวอย่าง 0.4 mL ได้ area = 1959.47717 mV.S (4%H_2 Standard = 1,500 mV.S)

4.1.1 ถ้าพื้นที่ 1,500 จะเข้มข้น 4%

ถ้าพื้นที่ 1959.47717 จะเข้มข้น $\frac{1959.47717 \times 4\%}{1,500}$ = 0.052%

2.1.2 ถ้าปริมาตร 100 mL จะมีไฮโดรเจน 0.052 mL

ถ้าปริมาตร 75.4 mL จะมีไฮโดรเจน $\frac{75.4 \times 0.052}{100}$ = 0.039208 mL

75.4 เกิดจาก Vheadspace + $V_{กระบอกฉีด}$

(75 mL) + (0.4 mL) = 75.4 mL

2.1.3 ก๊าซ 22.4 L มีปริมาณ 1 mol

ก๊าซ **0.039208 mL** มีปริมาณ $\frac{0.039208\ mL \times 1\ mol}{22.4\ L}$

$= 1.75 \times 10^{-3}$

= 1.75 µmol

2.2 หาว่าเซลล์มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่าไหร่

จากสมการ y = 1.7915x

y = ค่า OD_{730} ที่วัดได้

x = น้ำหนักของเซลล์แห้ง

สมมติว่าวัด OD_{730} = 0.20273

จะได้ 0.20273 = 1.7915x

$x = \frac{0.20273}{1.7915} \times 25$ mL

= 2.82905 mg

2.3 เวลาในการบ่มเพื่อฉีด GC

สมมติว่าบ่ม 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 คำนวณหาอัตราการผลิตไฮโดรเจนในหน่วย $\mu molH_2/mgDW/hr$

จะคำนวณได้จาก 2.1.3/2.2/2.3

แทนค่าได้ 1.75 $\mu molH_2$/2.82905 mgDW/4 hr

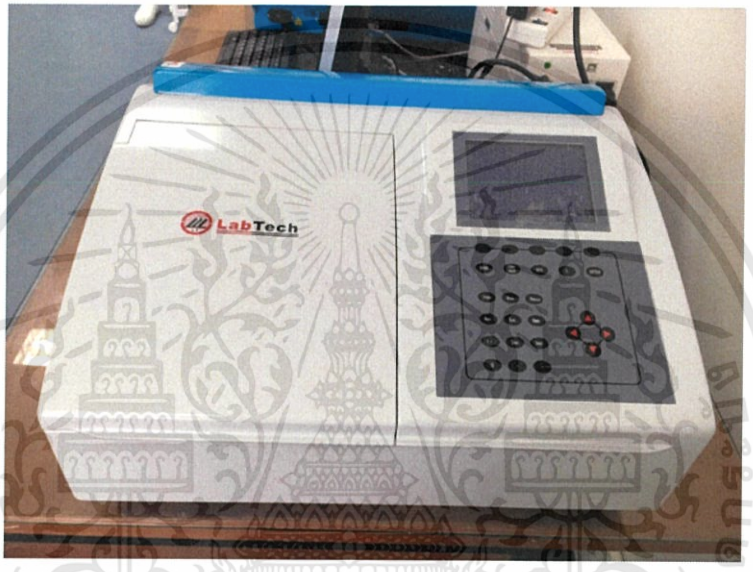
= 0.15465 $\mu molH_2/mgDW/hr$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์และการทดลอง

1. เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer)



ภาพประกอบที่ ค-1 แสดงภาพเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

LabTech รุ่น BlueStar B S/N:1604UV1503 UV/Vis Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (Auto Crave)

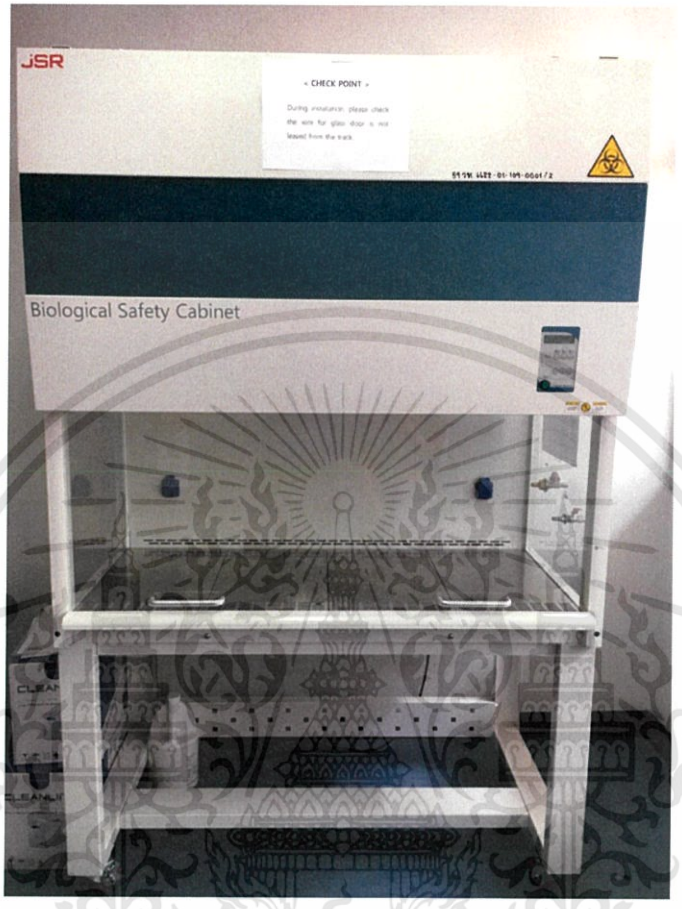
ภาพประกอบที่ ค-2 แสดงภาพเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (Auto Crave)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

JSAC-60 Korea

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet)



ภาพประกอบที่ ค-3 แสดงภาพตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

JSCB-1200SB Korea

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เครื่องชั่ง (Weight Scale)

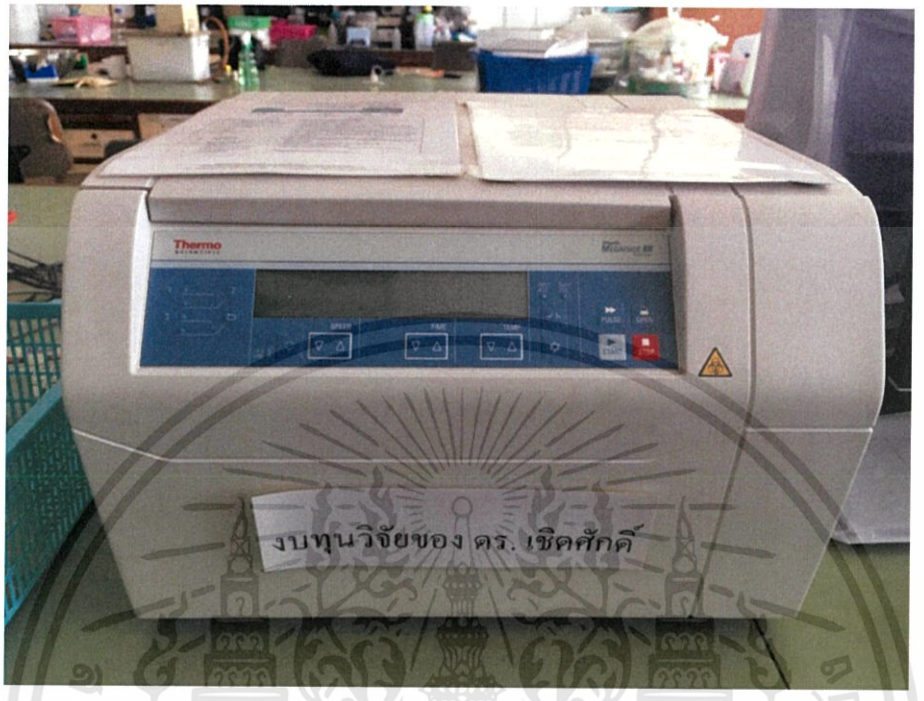
ภาพประกอบที่ ค-4 แสดงภาพเครื่องชั่ง (Weight Scale)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Mettler Toledo รุ่น MS204 Switzerland

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)



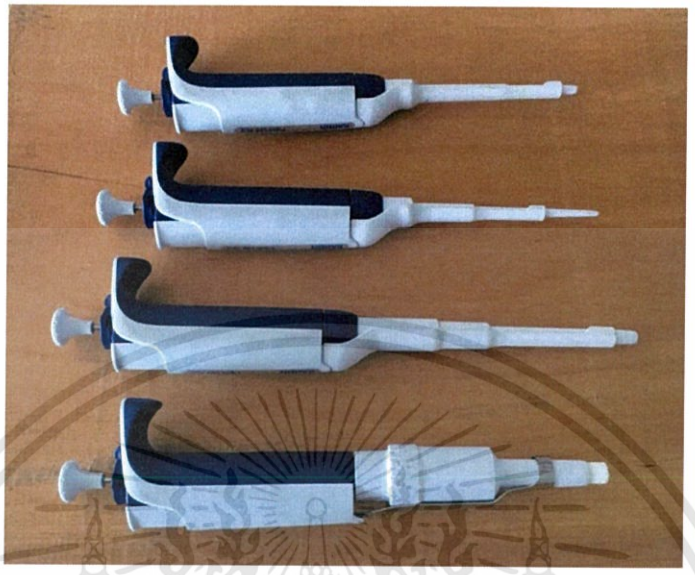
ภาพประกอบที่ ค-5 แสดงภาพเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Heraeus Megafuge 8R Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ไมโครปิเปต (Micro Pipet)



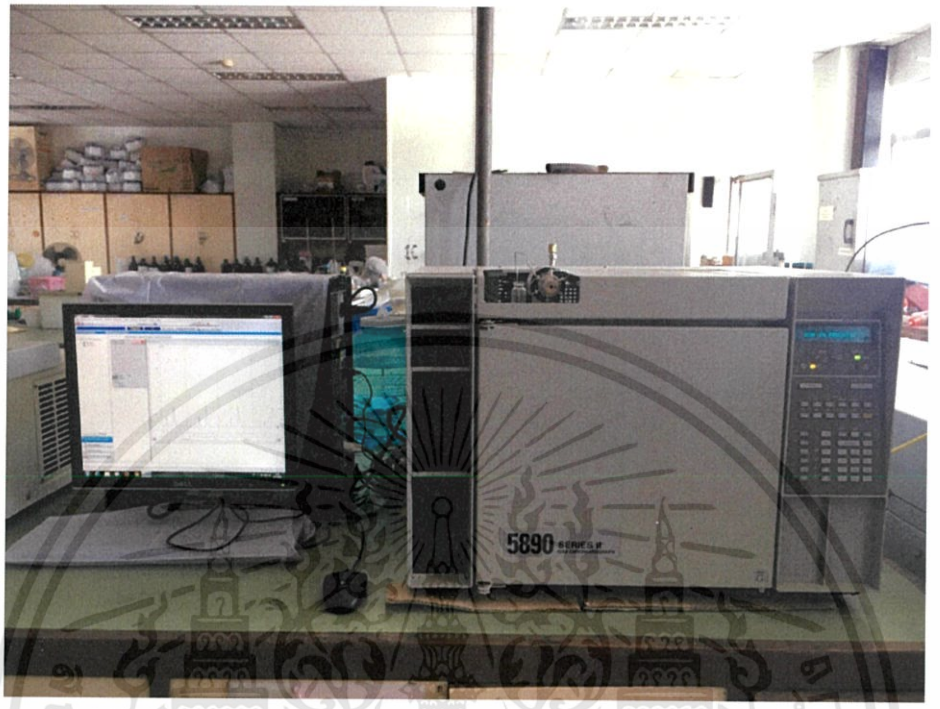
ภาพประกอบที่ ค-6 แสดงภาพไมโครปิเปต (Micro Pipet)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Rainin รุ่น Pipet-Lite XLS USA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph)



ภาพประกอบที่ ค-7 แสดงภาพเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Hewlett Packard รุ่น 5890 Series II USA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

ภาพประกอบที่ ค-8 แสดงภาพตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Thailand3.3qso

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ตู้ดูดควัน (Fume Hood)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Flexlab รุ่น FH5-13/FB/Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

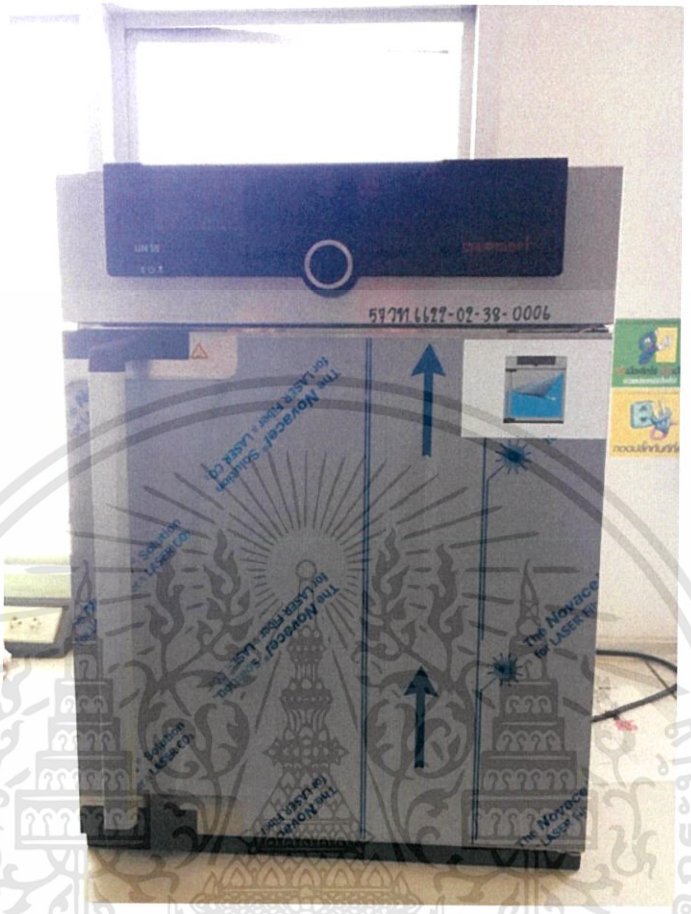
10. เครื่องวัดความเข้มแสง (Light meter)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

CEM รุ่น DT-8820

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. ตู้อบ (Oven temp)



ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Memmert รุ่น UN 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

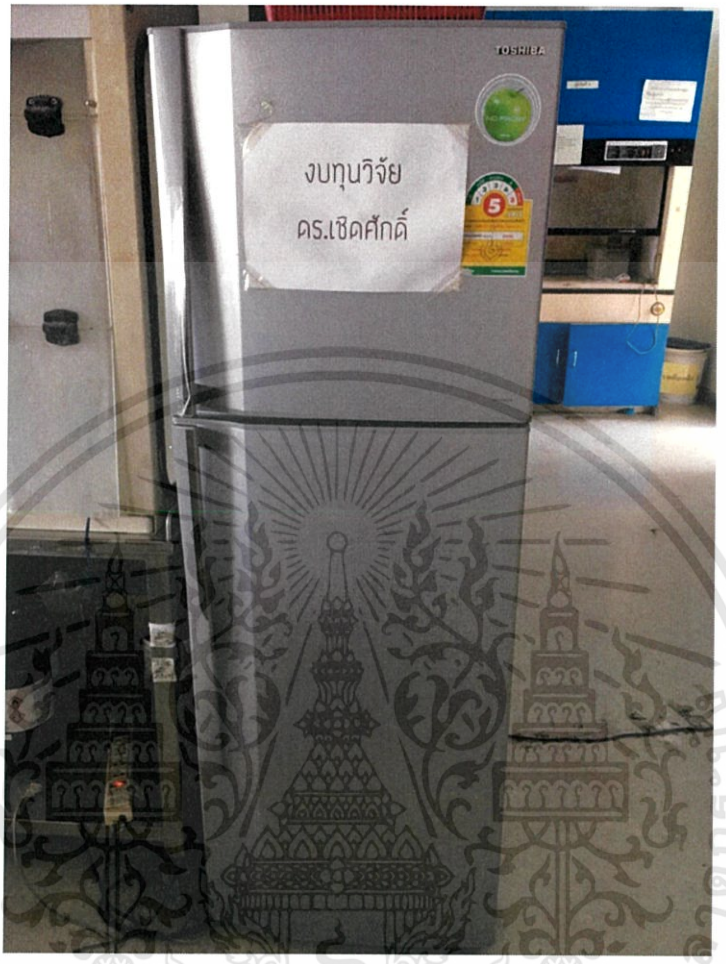
12. ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave Oven)

ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

Electrolux Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. **ตู้เย็น** (Refrigerator)



ยี่ห้อและรุ่นของเครื่องมือ

TOSHIBA รุ่น GR-S26KPB Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้