

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว  
*Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

OPTIMIZATION OF HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR  
GREEN ALGA *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

กิตติพัฒน์ วาริชนันท์  
KITTIIPHAT WARICHANAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-079

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว  
*Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

OPTIMIZATION OF HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR  
GREEN ALGA *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

กิตติพัฒน์ วาริชนันท์  
KITTIIPHAT WARICHANAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-079

OPTIMIZATION OF HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR  
GREEN ALGA *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

KITTIPHAT WARICHANAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2019

KMITL-2019-SC-M-020-079

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว <i>Scenedesmus obliquus</i> TISTR 8546
ชื่อนักศึกษา	นายกิตติพัฒน์ วาริชนันท์
รหัสประจำตัว	59605049
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

### บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากกระบวนการนี้ใช้เพียงน้ำและแสงที่มีอยู่ในปริมาณที่ไม่จำกัดเป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์และแหล่งพลังงานในการผลิตไฮโดรเจน *Scenedesmus obliquus* เป็นสาหร่ายสีเขียวชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงในที่มีแสงภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* 2 สายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ยังศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนในน้ำเสียอุตสาหกรรมอาหารของสาหร่ายที่คัดเลือก ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 คือ บ่มเซลล์ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ OD<sub>750</sub> เท่ากับ 0.8 ในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียม (TAP-K) การปรับตัวของเซลล์ในอาหารที่ขาดโพแทสเซียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนชักนำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนจะช่วยเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ ความเข้มแสง อุณหภูมิของการบ่ม และพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *S. obliquus* TISTR 8546 คือ ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิของการบ่ม 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหาร 7.2 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $14.455 \pm 0.855$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $336.859 \pm 21.416$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่มเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ ในงานวิจัยนี้ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ที่มีการเติมกรดอะซิติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ภายหลังจาก

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในน้ำเสียชนิดต่างๆ พบว่าค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ (DO) เพิ่มขึ้น แต่ค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ (BOD) ลดลงและค่าปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (COD) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตนมชั้นหวานก่อนบำบัดและมีการเติมกรดอะซิติก ความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $23.724 \pm 0.819$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $682.778 \pm 23.540$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ภายหลัง 96 ชั่วโมงของการบ่มในสภาวะที่ปราศจากอากาศ

**คำสำคัญ :** การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* น้ำเสีย

<b>Thesis Title</b>	Optimization of hydrogen production by unicellular green alga <i>Scenedesmus obliquus</i> TISTR 8546
<b>Student Name</b>	Kittiphat Warichanan
<b>Student ID</b>	59605049
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Year</b>	2019
<b>Thesis Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

### Abstract

Nowadays, H<sub>2</sub> production by green algae has become of great interest since this process uses only water and unlimited sunlight as electron and energy sources to produce H<sub>2</sub>. *Scenedesmus obliquus* is one of green algae that has ability to produce high photohydrogen production under anaerobic condition. This study aimed to compare H<sub>2</sub> production by two strains of *Scenedesmus* and the highest H<sub>2</sub>-producing strain was selected for H<sub>2</sub> production optimization. In addition, growth and H<sub>2</sub> production in food industrial wastewater of the selected strain were investigated. The result showed that *S. obliquus* TISTR 8546 gave higher H<sub>2</sub> production than *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1. The optimal conditions for H<sub>2</sub> production by *S. obliquus* TISTR 8546 were incubation the cell culture at 36 h of cell age with the cell density at OD<sub>750</sub> of 0.8 in potassium-deprived Tris acetate phosphate medium (TAP-K). Cell adaptation in potassium-deprived condition for 24 h before inducing H<sub>2</sub> production under anaerobic condition increased H<sub>2</sub> production by this algal strain. The optimal light intensity, incubation temperature and initial medium pH for H<sub>2</sub> production by *S. obliquus* TISTR 8546 were 30 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 30 °C and pH 7.2, respectively. The maximum H<sub>2</sub> production rate with 14.455 ± 0.855 μmolH<sub>2</sub> mgChl<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and the maximum H<sub>2</sub> accumulation with 336.859 ± 21.416 μmolH<sub>2</sub> mgChl<sup>-1</sup> at 48 h of anaerobic condition were obtained under optimized conditions. In this study, *S. obliquus* TISTR 8546 was able to grow in various kinds of food industrial wastewater supplemented with 17.4

mM acetic acid. After algal cultivation in these different kinds of wastewater, dissolved oxygen (DO) of wastewater was increased whereas biological oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) were obviously decreased. The green alga *S. obliquus* TISTR 8546 incubated in FN factory wastewater, obtained before wastewater treatment, supplemented with 17.4 mM acetic acid gave the maximum H<sub>2</sub> production rate with  $23.724 \pm 0.819 \mu\text{molH}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and the maximum H<sub>2</sub> accumulation with  $682.778 \pm 23.540 \mu\text{molH}_2 \text{ mgChl}^{-1}$  after 96 h of anaerobic incubation.

**Keywords:** H<sub>2</sub> production, Green alga, *Scenedesmus*, Wastewater

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือ ความกรุณาและการถ่ายทอดความรู้จากบุคคลผู้มีพระคุณต่างๆ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการทำวิจัยตลอดมา และเสนอแนวทางการแก้ไขปัญหา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวรัตน์ จันทะโร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี และรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์บัณฑิต ประจำภาคชีววิทยา ที่ได้เสียสละเวลามาเป็นประธานและกรรมการในการสอบในครั้งนี้ รวมทั้ง ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ นายเกียรติชาย วาริชนันท์ ผู้เป็นบิดา นางอัมพร วาริชนันท์ ผู้เป็นมารดา และ บุคคลในครอบครัวเป็นอย่างยิ่ง ที่อบรมสั่งสอน เลี้ยงดู และให้ทุนทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียน รวมทั้ง คอยเป็นกำลังใจในการศึกษาเล่าเรียนเสมอมา รวมทั้งคณาจารย์ประจำภาคชีววิทยา และที่สำคัญ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล 407 ทุกคนที่ให้คำปรึกษา และ ช่วยเหลือในยามมีปัญหา วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ หากไม่มีบุคคลที่เอ่ยนามมา นี้ และถ้าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีประโยชน์กับบุคคลหรือหน่วยงานใด ข้าพเจ้าขอมอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แต่ทุกท่านเพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

นายกิตติพัฒน์ วาริชนันท์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูป	ฐ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 ไฮโดรเจน	5
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน	6
2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming)	6
2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis)	7
2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการชีวภาพของสิ่งมีชีวิต (Biological process)	8
2.2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)	8
2.2.3.2 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)	10
2.2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)	10
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	11
2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว	14
2.4.1 การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามองค์ประกอบของโลหะ ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น	14
2.4.2 การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา	15
2.5 สาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	16

## สารบัญ

	หน้า
2.5.1 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	17
2.5.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	18
2.5.3 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	19
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	19
2.6.1 อายุเซลล์ (Cell age)	19
2.6.2 สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur deprivation)	19
2.6.3 สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen deprivation)	20
2.6.4 สภาวะการขาดแหล่งฟอสฟอรัส (Phosphorus deprivation)	20
2.6.5 สภาวะการขาดโพแทสเซียม (Potassium deprivation)	21
2.6.6 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)	21
2.6.7 แสง (Light)	21
2.6.8 อุณหภูมิ (Temperature)	22
2.6.9 พีเอช (pH)	22
2.7 แหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและการบำบัดน้ำเสีย	23
2.7.1 การบำบัดทางกายภาพ (Physical Treatment)	23
2.7.2 การบำบัดทางเคมี (Chemical Treatment)	24
2.7.3 การบำบัดทางชีวภาพ (Biological Treatment)	24
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
2.8.1 งานวิจัยผลความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	25
2.8.2 งานวิจัยผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	26
2.8.3 งานวิจัยสภาวะการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	27
2.8.3.1 การขาดแหล่งซัลเฟอร์ในอาหาร	27
2.8.3.2 การขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร	27
2.8.3.3 การขาดแหล่งฟอสฟอรัสในอาหาร	28
2.8.3.4 การขาดแหล่งโพแทสเซียมในอาหาร	28
2.8.4 งานวิจัยผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	28
2.8.5 งานวิจัยผลความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	29
2.8.6 งานวิจัยผลอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	29
2.8.7 งานวิจัยผลผลของพีเอชต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	29

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8.8 งานวิจัยผลการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยง ในน้ำเสีย	30
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	<b>31</b>
3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง	31
3.2 สารเคมี	31
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย	31
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	31
3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์	32
3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	32
3.2.5 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	32
3.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส	32
3.3 อุปกรณ์	33
3.4 วิธีการทดลอง	34
3.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	34
3.4.1.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> บนอาหารแข็ง	34
3.4.1.2 วิธีการเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> ในอาหารเหลว	34
3.4.1.3 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> ในอาหารเหลว	34
3.4.2 วิธีศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	35
3.4.3 วิธีศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	35
3.4.4 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์	35
3.4.5 วิธีศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	35
3.4.6 วิธีศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	36
3.4.7 การคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> ที่มีศักยภาพ ในการผลิตไฮโดรเจน	37
3.4.7.1 วิธีศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	37
3.4.7.2 วิธีศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการ ผลิตไฮโดรเจน	37

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.7.3 วิธีการศึกษาสภาวะการขาดธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	37
3.4.8 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> สายพันธุ์ที่คัดเลือก	38
3.4.8.1 วิธีการศึกษาสภาวะการขาดธาตุอาหารร่วมที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	38
3.4.8.2 วิธีการศึกษาชนิด ความเข้มข้น และการปรับตัวของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	38
3.4.8.3 วิธีการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	39
3.4.8.4 วิธีการศึกษาอุณหภูมิของการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	39
3.4.8.5 วิธีการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน	40
3.4.8.6 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไฮโดรเจน	40
3.4.9 วิธีการศึกษาความสามารถในการบำบัดน้ำเสียและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	41
3.4.9.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	41
3.4.9.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	41
3.4.9.3 วิธีการศึกษาคุณภาพน้ำเสียหลังจากผ่านการบำบัดด้วยสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	42
3.4.9.4 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน	42
3.4.9.5 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียดั้งเดิมและน้ำเสียที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน	42

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลวิจัยและการอภิปรายผล</b>	44
4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน	44
4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus sp.</i> KMITL OVG-1 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	44
4.1.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus sp.</i> KMITL OVG-1 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	45
4.1.3 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus sp.</i> KMITL OVG-1 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	48
4.1.4 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus sp.</i> KMITL OVG-1 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	51
4.1.5 ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus sp.</i> KMITL OVG-1 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	52
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	56
4.2.1 ผลของการขาดธาตุอาหารร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	56
4.2.2 ผลการศึกษาชนิดและ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	57
4.2.2.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน	57
4.2.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	60
4.2.2.3 ผลของกรดอะซีติกในอาหารในระยะการปรับตัวและระยะผลิตไฮโดรเจน	62
4.2.3 ผลการศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	63
4.2.4 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	65

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.5 ผลการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	69
4.2.6 ผลการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในสภาวะต่างๆ	71
4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการบำบัดน้ำเสียและการผลิตไฮโดรเจนของ สาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	73
4.3.1 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	73
4.3.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	75
4.3.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมกรดอะซีติก	80
4.3.4 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	81
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	<b>84</b>
5.1 สรุปผลวิจัย	84
5.1.1 สรุปผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน	84
5.1.2 สรุปสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย <i>S. obliquus</i> TISTR 8546	84
5.1.3 สรุปผลการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร	85
5.2 ข้อเสนอแนะ	85
เอกสารอ้างอิง	86
ภาคผนวก ก	95
ภาคผนวก ข	96
ภาคผนวก ค	97
ภาคผนวก ง	98
ประวัติผู้เขียน	101

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	36
4.1	54
4.2	69
4.3	70
4.4	77
4.5	80

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบค่าพลังงานความร้อนของการเผาไหม้เชื้อเพลิงชนิดต่างๆ ในหน่วย เมกะจูลต่อกิโลกรัม	6
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	8
2.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของ <i>Clostridium butyricum</i> จากกระบวนการหมัก ภายใต้สภาวะไร้อากาศ	9
2.4 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) (A) และการเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจาก อากาศ (Anaerobic condition) (B)	13
2.5 โครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและไดอะพอเรส	14
2.6 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ FeFe-hydrogenase	15
2.7 สาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus obliquus</i> TISTR 8546 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า	17
2.8 องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i>	18
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1 (A) และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 (B)	44
4.2 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) คลอโรฟิลล์ (B) และจำนวนเซลล์ (C) ของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1 และ สาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยง ในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร	46
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1 และ สาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ภายใต้อาหาร TAP โดยมีอายุเซลล์ 18, 24, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง ที่บ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	48
4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1 และ <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ภายใต้การบ่มในระยะเวลาช่วงการปรับตัวภายใต้สภาวะ ที่ปราศจากอากาศในที่มีแสงต่างกัน	50
4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1 และ สาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 มีการปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	51

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในอาหาร TAP, TAP-K, TAP-KS, TAP-KN, TAP-KP, TAP-KNS, TAP-KNP และ TAP-KNS ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	57
4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนคือ กรดอะซิติก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลซูโครส โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตและโซเดียมอะซิเตท ภายหลังจากการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	59
4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซิติก ที่ความเข้มข้น 0, 8.7, 17.4, 34.8, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	60
4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหารที่มีหรือไม่มีกรดอะซิติก	63
4.10 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 0, 30, 60, 120, 240 และ 480 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที บ่มและสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	64
4.11 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K ที่อุณหภูมิของการบ่มที่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	66
4.12 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ 4, 5, 6, 7, 7.2, 8, 9 และ 10 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิ 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	68
4.13 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในอาหาร TAP, TAP-K และ TAP-K ที่มีการปรับตัวในพลาสติก 24 ชั่วโมง (TAP-K + adaptation)	72
4.14 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-K และ TAP-K ที่มีการปรับตัวในพลาสติก 24 ชั่วโมง (TAP-K + adaptation)	73

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.15 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และจำนวนเซลล์ (C) ของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ	74
4.16 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และจำนวนเซลล์ (C) ของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่างๆที่มีการเติมกรดอะซีติกความเข้มข้นสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์	79
4.17 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทั้ง 6 ชนิด ที่มีการเติมและไม่เติมกรดอะซีติกภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	82
4.18 ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 จากการเปรียบเทียบอาหารที่ได้จากแหล่งน้ำเสียอุตสาหกรรมอาหาร FN (Be) ที่มีการเติมและไม่มีการเติมกรดอะซีติก บ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 96 ชั่วโมง	83

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

พลังงานเป็นสิ่งที่มีมนุษย์ใช้เพื่ออำนวยความสะดวกในชีวิตประจำวัน ในช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา ประชากรมนุษย์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ทำให้ความต้องการพลังงานในชีวิตประจำวันและในอุตสาหกรรมเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แหล่งพลังงานที่มนุษย์นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ พลังงานที่ได้จากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ เป็นต้น ซึ่งพลังงานเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณจำกัด และกำลังจะหมดไปในอนาคตอันใกล้ ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยและหน่วยงานต่างๆ จึงต้องพยายามแสวงหาพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ที่ให้ค่าพลังงานสูง และการเผาไหม้ของพลังงานทดแทนเหล่านี้ต้องไม่ส่งผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อม พลังงานทดแทนที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน ได้แก่ พลังงานน้ำ พลังงานลม พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานคลื่น พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ และ พลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen,  $H_2$ ) จัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเมื่อเกิดการเผาไหม้ไฮโดรเจนจะให้ค่าความร้อนสูง โดยให้ค่าความร้อนเท่ากับ 141.6 เมกะจูลต่อกิโลกรัม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและไม่มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide,  $CO_2$ ) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดสภาวะโลกร้อน (Global warming) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการหลัก คือ (1) กระบวนการทางความร้อนเคมี (Thermochemical process) โดยกระบวนการนี้สามารถผลิตไฮโดรเจนจากวิธีทางเคมีโดยใช้ความร้อน ซึ่งอาศัยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบหลัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ ไฮโดรเจน คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ มีเทน (2) กระบวนการทางไฟฟ้าเคมี (Electrochemical process) โดยกระบวนการนี้จะใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกโมเลกุลของไฮโดรเจนและออกซิเจนออกจากน้ำ และ (3) กระบวนการทางชีวเคมี (Biochemical process) โดยกระบวนการนี้เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือกระบวนการหมักของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น จุลินทรีย์ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ สาหร่ายสีเขียว เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบกว่าการผลิตในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ซึ่งเป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด มาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง อีกทั้งสาหร่ายสีเขียวยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้งสารอินทรีย์คาร์บอนและสารอนินทรีย์คาร์บอน ทำให้สาหร่ายสีเขียวสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในน้ำเสียเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวล จึงเป็นการลดต้นทุนของกระบวนการเพาะเลี้ยงอีกด้วย

สาหร่าย *Scenedesmus obliquus* เป็นสาหร่ายสีเขียวชนิดแรกที่ถูกค้นพบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีแสง (Gaffron, 1939) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* สามารถพบได้ในน้ำจืด ทั้งแหล่งน้ำนิ่งและแหล่งน้ำไหลเอื่อย เซลล์สาหร่ายอาจล่องลอยเป็นอิสระหรือดำรงชีวิตแบบยึดเกาะ มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปกระสวย รูปไข่ รูปวงเดือน รูปรี เป็นต้น กลุ่มเซลล์อาจพบลักษณะบิดเบี้ยวบ้าง เซลล์สาหร่ายชนิดนี้อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ซึ่งประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8, 16 และ 32 เซลล์ เรียงตัวกันโดยเอาด้านข้างสัมผัสกัน ผนังเซลล์อาจเรียบหรือมีลักษณะคล้ายเม็ดเล็กๆ ติดอยู่ ด้านข้างอาจพบหรือไม่พบลักษณะที่เป็นสัน เป็นพินหรือหนามเล็กๆ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* มีรงควัตถุหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และ แซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) โดยรงควัตถุจะอยู่รวมในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่รวมเรียกว่าคลอโรพลาสต์ คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายชนิดนี้มีขนาดใหญ่ และตั้งอยู่บริเวณขอบเซลล์ เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและมีคุณสมบัติในการป้องกันการสูญเสียน้ำ จึงทนต่อสภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ดี นอกจากนี้มีความสามารถในการฟื้นฟูสภาพของเซลล์ได้เป็นอย่างดี สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* มีคุณสมบัติมากมาย ได้แก่ นำมาใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมของมนุษย์ ผลิตเป็นอาหารสัตว์ (Becker, 2007) ใช้ทำปุ๋ย และช่วยในการบำบัดน้ำเสีย (Mata *et al.*, 2012) เป็นต้น

สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* สามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของ *S. obliquus* แบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ (1) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำแบบทางตรง (Direct photolysis) กระบวนการนี้ผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง แสงจะกระตุ้นการทำงานของศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงสอง (Photosystem II) ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็น ออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนจากการแตกตัวของน้ำจะเคลื่อนที่ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนชนิดต่างๆ เป็นลำดับ โดยผ่านพลาสโตควิโนน (Plastoquinone) ไซโตโครม (Cytochrome) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) ไปยังระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I) จนกระทั่งถึงเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะถูกส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนต่อไป (Melis *et al.*, 2000) (2) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำแบบทางอ้อม (Indirect photolysis) ผ่านกระบวนการหมักในที่มีอิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจะได้อาจมาจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมภายในเซลล์สาหร่าย และจะถูกส่งให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อไป (Prince and Kheshgi, 2005)

การบำบัดน้ำเสียโดยใช้สาหร่ายเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการบำบัดน้ำเสีย โดยสามารถลดปัญหามลพิษในน้ำได้ น้ำเสียที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากการเลี้ยงสัตว์หรือเกิดจากอุตสาหกรรมต่างๆ มีสารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย นอกจากนี้จะนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียเพื่อบำบัดน้ำเสียแล้ว สาหร่ายที่เจริญเติบโตยังให้ผลพลอยได้ที่เป็ประโยชน์ โดยสามารถ

นำมาผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า เช่น รงควัตถุ โปรตีน กรดไขมัน ฯลฯ หรือนำไปผลิตเอทานอลหรือไฮโดรเจน เพื่อใช้เป็นพลังงานต่อไป

งานวิจัยนี้ สนใจศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด สภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) โดยทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ (1) ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อายุเซลล์ ความเข้มข้นของเซลล์ พีเอช ความเข้มแสง อุณหภูมิ เป็นต้น (2) ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ การขาดแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ฯลฯ และชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ ยังศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 เพื่อการบำบัดน้ำเสียและการผลิตไฮโดรเจน

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) คัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน
- 2) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546
- 3) ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อการบำบัดน้ำเสียและการผลิตไฮโดรเจน

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) คัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ในอาหาร TAP ภายใต้สภาวะที่มีแสง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายและกระจายลงในอาหาร 5 ชนิด คือ อาหาร TAP สูตรปกติ อาหาร TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหาร TAP ที่ปราศจากไนโตรเจน (TAP-N) อาหาร TAP ที่ปราศจากฟอสฟอรัส (TAP-P) และอาหาร TAP ที่ปราศจากโพแทสเซียม (TAP-K) ทำการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ และวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี
- 2) ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP วิเคราะห์การเจริญของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี)

- 3) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือก โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลว TAP โดยทำการแปรผันอายุของเซลล์ การขาดแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น ซัลเฟอร์ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ฯลฯ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลแลคโทส โซเดียมอะซิเตท ฯลฯ ความเข้มข้น อุณหภูมิ และ พีเอช เป็นต้น จากนั้น วัดการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี
- 4) ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้แก่ น้ำเสีย จากนั้น วิเคราะห์การเจริญของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด
- 5) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดเลือกในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้แก่ น้ำเสีย จากนั้น วัดการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี
- 6) วิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของน้ำเสียก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ พีเอช ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ค่าปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรีย (Biochemical oxygen demand, BOD) ค่าปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้เพื่อออกซิไดซ์สารอินทรีย์ด้วยสารเคมี (Chemical oxygen demand, COD) และปริมาณธาตุอาหารต่างๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ คาร์บอน เป็นต้น

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทำให้ทราบสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูง
- 2) ทำให้ทราบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือก
- 3) สามารถเพาะเลี้ยงและผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกภายใต้แหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

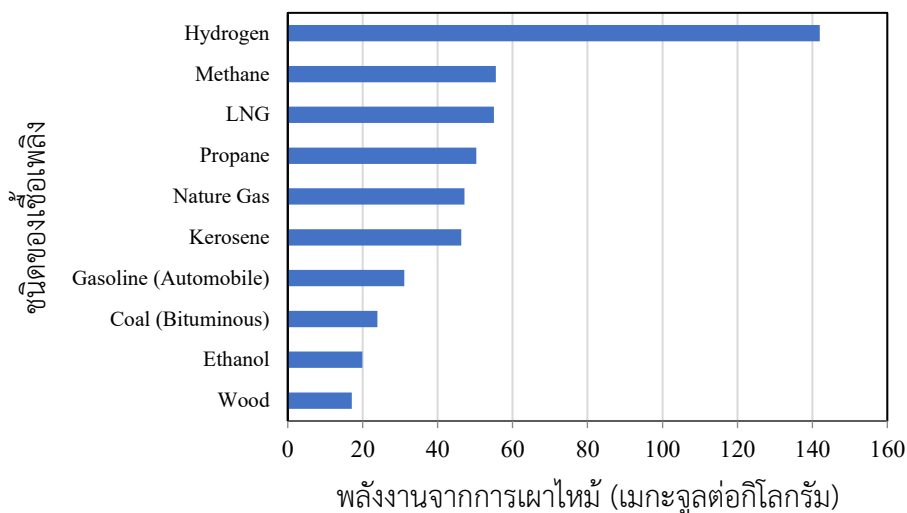
### 2.1 ไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน พลังงานจัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต ทั้งในครัวเรือน ภาคคมนาคมขนส่ง ภาคเกษตรกรรม และภาคอุตสาหกรรม ฯลฯ พลังงานที่มนุษย์ใช้ส่วนใหญ่ได้มาจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงดั้งเดิมและก่อให้เกิดผลกระทบที่ตามมาคือ การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลจะก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางอากาศจากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก นอกจากนี้ เชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้ยังมีปริมาณที่ลดลงและคาดว่าจะหมดไปในระยะเวลาอันใกล้ ในประเทศไทย กระทรวงพลังงานเปิดเผยว่า แหล่งพลังงานที่ใช้ในประเทศนั้นส่วนใหญ่ได้มาจากน้ำมันดิบและก๊าซธรรมชาติโดยคิดเป็นร้อยละ 80 ของปริมาณทั้งหมด และประเทศไทยยังคงต้องพึ่งพาการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2559) ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจึงจำเป็นต้องแสวงหาพลังงานหมุนเวียนรูปแบบอื่นมาใช้ทดแทนพลังงานฟอสซิลที่กำลังจะหมดไป โดยจะต้องให้ค่าพลังงานจากการเผาไหม้สูงและไม่ปลดปล่อยก๊าซพิษจากการเผาไหม้พลังงานทดแทนแหล่งใหม่ที่กำลังเป็นที่ได้รับความสนใจชนิดหนึ่ง คือ พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน (อังกฤษ: Hydrogen; ละติน: Hydrogenium) เป็นธาตุลำดับแรกในตารางธาตุ ไฮโดรเจนมีสัญลักษณ์ธาตุคือ H มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 และมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดหรือเวเลนซ์อิเล็กตรอนตัวเดียว เกือบทั้งหมดของสสารที่อยู่ในจักรวาลมีส่วนประกอบของธาตุไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้อง ไฮโดรเจนจะมีสถานะเป็นก๊าซที่ประกอบด้วยธาตุ 2 อะตอม ไฮโดรเจน ( $H_2$ ) เป็นก๊าซที่ไม่มีกลิ่น ไม่มีสี ไม่มีรส ติดไฟง่าย และเมื่อเกิดการเผาไหม้จะให้ค่าพลังงานที่สูงถึง 141.6 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (Perry, 1963) ซึ่งสูงกว่าพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้ก๊าซโซลีนและก๊าซธรรมชาติถึง 3-4 เท่า (รูปที่ 2.1) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนเป็นโมเลกุลที่เบาที่สุดในสภาวะปกติ ไฮโดรเจนจะกระจายและลอยหายไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเบากว่าอากาศมากถึง 16 เท่า ทำให้เมื่อเกิดการรั่วไหลของก๊าซไฮโดรเจนจะทำให้ก๊าซไฮโดรเจนกระจายหายไปสู่อากาศอย่างรวดเร็ว

ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานหมุนเวียนชนิดหนึ่ง โดยสามารถนำมาใช้ได้ไม่มีวันหมดและสร้างทดแทนขึ้นมาใหม่ได้ในระยะเวลาอันสั้น ก๊าซไฮโดรเจนสามารถประยุกต์ใช้ได้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้า ใช้กับเครื่องยนต์สันดาปภายใน ใช้กับเครื่องกังหัน และใช้กับเครื่องไอพ่น เป็นต้น ทั้งนี้ พลังงานที่ได้จากก๊าซไฮโดรเจนยังทำให้เครื่องยนต์มีแรงม้าที่สูงขึ้น เนื่องจากการเผาไหม้ของไฮโดรเจนให้ค่าพลังงานที่สูงกว่าพลังงานอื่นๆ และมีค่าออกเทน (ค่าความต้านทานการน็อคของเครื่องยนต์: Antiknock quality) สูงถึง 120 โดยทั่วไปแล้ว เชื้อเพลิงที่มีค่าออกเทน

สูงจะทำให้เกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ ในทางตรงกันข้าม เชื้อเพลิงที่มีค่าออกเทนต่ำจะส่งผลให้เครื่องยนต์เกิดการสะดุด ทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ และปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกมาในปริมาณมาก



**รูปที่ 2.1** การเปรียบเทียบค่าพลังงานความร้อนของการเผาไหม้เชื้อเพลิงชนิดต่างๆ ในหน่วยเมกะจูลต่อกิโลกรัม

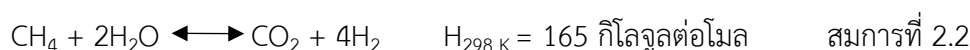
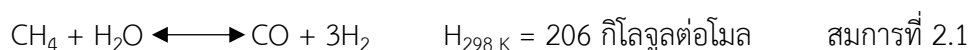
ที่มา: Ronneau, 2004

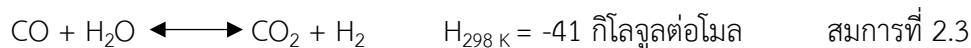
## 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อมจากการเผาไหม้ เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่มีอะตอมของคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ในปัจจุบัน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการหลักๆ ดังนี้

### 2.2.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming)

กระบวนการรีฟอร์มมิง เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาความร้อนเคมีระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในสถานะก๊าซ เช่น ก๊าซธรรมชาติ ก๊าซชีวภาพ และเอทานอล เป็นต้น กับไอน้ำ โมเลกุลของไฮโดรเจนจะถูกดึงออกจากไอน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ส่วนออกซิเจนที่เหลือน้ำและคาร์บอนที่เหลือน้ำจากไฮโดรคาร์บอนจะรวมตัวกันเกิดปฏิกิริยาและได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (สมการที่ 2.1 และ 2.2) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (สมการที่ 2.3) ตามลำดับ



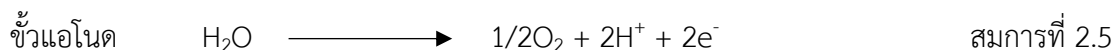
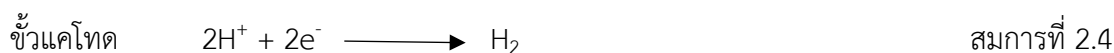


กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูง และเสียค่าใช้จ่ายน้อย จึงนิยมนำมาใช้ในทางการค้า แต่มีข้อเสียคือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากเกิดสารตกค้างจากการเผาไหม้ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่สมบูรณ์ คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และยังใช้วัตถุดิบที่มาจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีอยู่ในปริมาณจำกัด

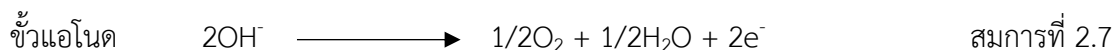
### 2.2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis)

การผลิตไฮโดรเจนจากการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า เป็นกระบวนการแยกองค์ประกอบของน้ำ ออกเป็นก๊าซออกซิเจนและก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการนี้อาศัยพลังงานไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้วของเซลล์อิเล็กโทรด ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ขั้ว คือ ขั้วแอโนดเป็นขั้วที่มีการให้อิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี โดยที่ขั้วแอโนดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเสมอ และขั้วแคโทดเป็นขั้วที่มีการรับอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาไฟฟ้าเคมี โดยขั้วแคโทดจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันเสมอ

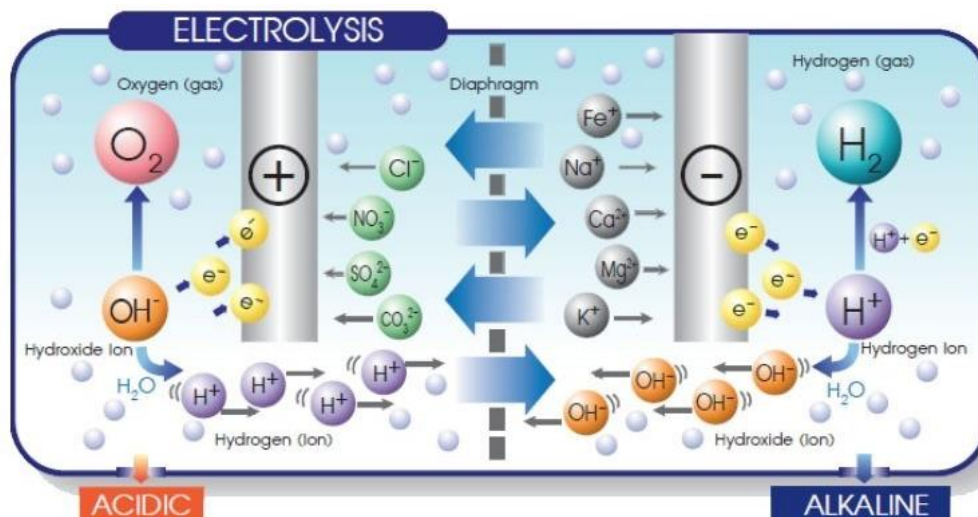
ในสภาวะกรด การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าจะเกิดที่ขั้วแคโทด โดยเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอน (สมการที่ 2.4) และที่ขั้วแอโนดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำ (สมการที่ 2.5)



ในสภาวะเบส การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าจะเกิดที่ขั้วแคโทด โดยเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของน้ำและอิเล็กตรอน (สมการที่ 2.6) และที่ขั้วแอโนดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮดรอกไซด์ไอออน (สมการที่ 2.7)



เมื่อน้ำถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าจะเกิดการแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตอนและไฮดรอกไซด์ไอออน โปรตอนจะวิ่งมาเกาะที่ขั้วแคโทดหรือขั้วลบ เกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเกิดขึ้น ส่วนไฮดรอกไซด์ไอออนจะวิ่งมาเกาะที่ขั้วแอโนดหรือขั้วบวก เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน (รูปที่ 2.2) ข้อดีของการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือไฮโดรเจนจะมีความบริสุทธิ์สูง ส่วนข้อเสียคือ กระบวนการนี้จำเป็นต้องอาศัยกระแสไฟฟ้าจำนวนมาก และมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายน้ำ



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า  
ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557

### 2.2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการชีวภาพของสิ่งมีชีวิต (Biological process)

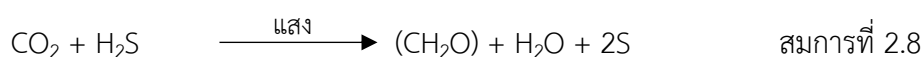
การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพหรือจากปฏิกิริยาในกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์สิ่งมีชีวิต ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตถูกเรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบคทีเรียไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว เป็นต้น แบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก (Yokoi *et al.*, 2001) สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงไนโตรเจน (Kosaric and Lyng, 1988) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีแบ่งเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ ดังนี้

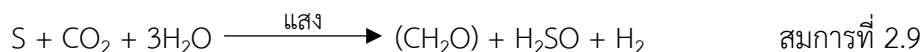
#### 2.2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

##### 2.2.3.1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์แสงโดยไม่ได้ใช้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์เหมือนที่ได้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายและพืชชั้นสูง แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและโปรตอนแทนน้ำ เมื่อมีการสังเคราะห์แสงจึงให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของน้ำตาล น้ำ ซัลไฟด์ และไฮโดรเจน (สมการที่ 2.8 และ 2.9)

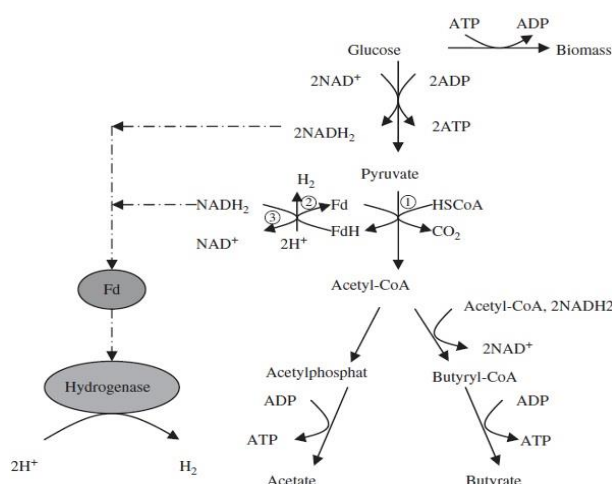




แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ (1) แบคทีเรียสีม่วงสะสมกำมะถัน (Sulfur purple bacteria) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Rhodospirillaceae เช่น *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodomicrobium vannielii* เป็นต้น (2) แบคทีเรียสีม่วงไม่สะสมกำมะถัน (Non-sulfur purple bacteria) อยู่ในวงศ์ Chromatiaceae เช่น *Chromatium Okenii*, *Thiocystis gelatinosa* และ *Thiospirillum sanguineum* เป็นต้น (3) แบคทีเรียสีเขียวสะสมกำมะถัน (Green sulfur bacteria) จัดอยู่ในวงศ์ Chlorobiaceae เช่น *Chlorobium vibrioforme*, *Prosthecochloris aestuarii* และ *Pelodictyon cathartiformes* เป็นต้น

### 2.2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (Dark fermentative bacteria)

กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงสามารถพบได้ในแบคทีเรียทั่วไป โดยแบคทีเรียจะใช้สารตั้งต้นจำพวก แป้ง กลูโคส เซลลูโลส ชีวมวล ของเสียทางการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนผ่านการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักนั้นมีตะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ (1) การเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวทโดยใช้เอนไซม์ในวิถีไกลโคลิซิส จากนั้น ไพรูเวทถูกเปลี่ยนเป็นอะซิลิลโคเอนไซม์ เอ ทำให้มีอิเล็กตรอนและโปรตอนเกิดขึ้นในรูปของ NADH (2) อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกส่งต่อไปยังเฟอร์รีดอกซินและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ตามลำดับ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะเร่งปฏิกิริยารีดักชันของอิเล็กตรอนและโปรตอนเกิดเป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.3) แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Desulfovibrio vulgaris* และ *Escherichia coli* เป็นต้น



รูปที่ 2.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของ *Clostridium butyricum* จากกระบวนการหมักภายใต้สภาวะไร้อากาศ

ที่มา: Chen *et al.*, 2006

### 2.2.3.2 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตเช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ต่างจากแบคทีเรียคือ ไชยาโนแบคทีเรียมี คลอโรฟิลล์ เอ ที่สามารถใช้ในการสังเคราะห์แสงและได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) ไชยาโนแบคทีเรียมีระบบแสง 2 ระบบและมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่คล้ายคลึงกับในสาหร่ายสีเขียวและพืช ภายใต้สภาวะที่มีแสงและออกซิเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไชยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในขณะที่ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน ไชยาโนแบคทีเรียจะนำไกลโคเจนที่สะสมมาสลายให้ได้แหล่งอิเล็กตรอนและนำมาผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการหมัก นอกจากนี้ ไชยาโนแบคทีเรียเส้นสายบางชนิดยังมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากการตรึงไนโตรเจนได้อีกด้วย ไชยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Aphanothece* sp., *Calothrix* sp. และ *Nostoc* sp. เป็นต้น

### 2.2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่สว่าง (Gaffron, 1942) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแสงจะเรียกว่า Photohydrogen production นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมเช่นเดียวกับไชยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp. (Tsygankov *et al.*, 2006), *Chlorella* sp. (Rashid *et al.*, 2011) และ *Scenedesmus* sp. (Rattana *et al.*, 2010) เป็นต้น อุปสรรคของการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวคือ ระหว่างกระบวนการสังเคราะห์แสงจะมีการแตกตัวของน้ำที่ระบบแสงสอง และได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ออกซิเจนที่เกิดขึ้นนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

ในปัจจุบัน มีรายงานการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวเป็นจำนวนมาก การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบกว่าการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตอื่นที่กล่าวมาข้างต้น คือ สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในพื้นที่ที่จำกัด โดยสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป นอกจากนี้ การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจะใช้เพียงน้ำและแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จึงช่วยลดต้นทุนในการผลิตไฮโดรเจนได้อีกด้วย

## 2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตชีวมวลจำนวนมาก ระยะนี้จัดเป็นระยะการเจริญของสาหร่ายที่เกิดภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) สาหร่ายสีเขียวสังเคราะห์แสงที่บริเวณคลอโรพลาสต์ และเปลี่ยนพลังงานจากแสงอาทิตย์ให้กลายเป็นพลังงานทางเคมีสำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์สาหร่าย และระยะที่ 2 เป็นระยะการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ (Anaerobic condition) สาหร่ายสีเขียวจะถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตไฮโดรเจนจากอิเล็กตรอนที่มาจากสารรีดิวซ์ที่เก็บสะสมไว้ในระยะที่ 1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ คือ

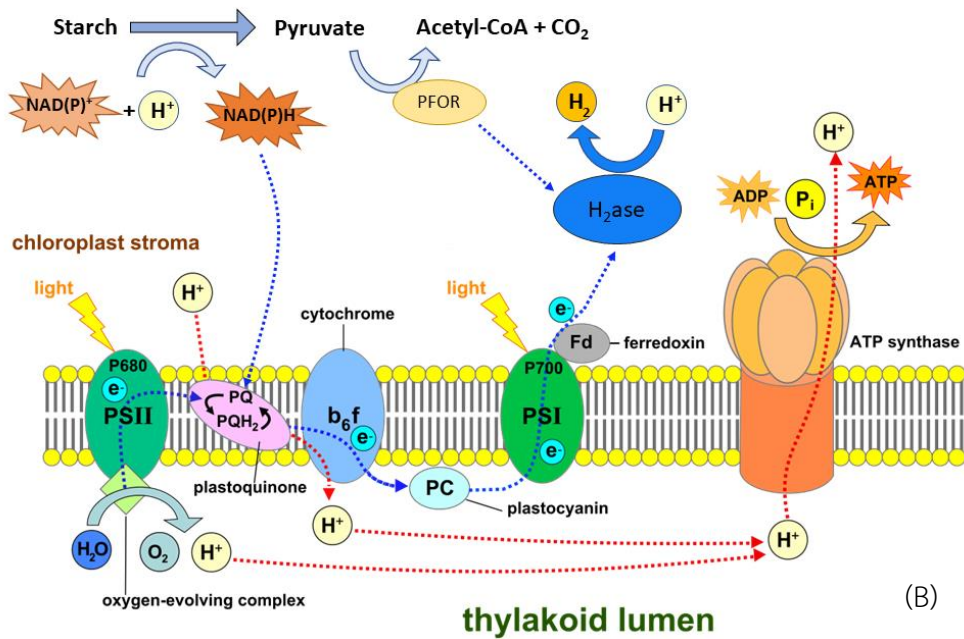
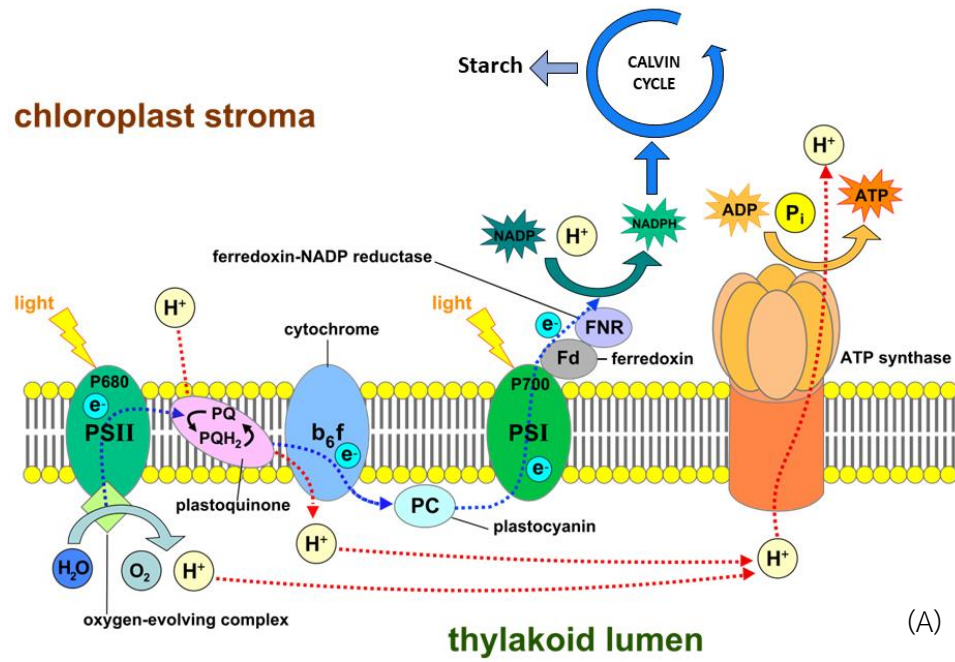
### (1) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำแบบทางตรง (Direct photolysis)

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำแบบทางตรง เป็นการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นบริเวณคลอโรพลาสต์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด คือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง สาหร่ายสีเขียวมีระบบแสงในการสังเคราะห์แสง 2 ระบบ คือ ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) และระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ระบบแสงหนึ่งจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยสามารถเรียกระบบแสงนี้ว่า P700 ส่วนระบบแสงสองจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร โดยเรียกระบบแสงนี้ว่า P680 กระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่ต่อเมื่อศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา (Reaction center) บนระบบแสงสองได้รับพลังงานแสง พลังงานแสงจะกระตุ้นให้ศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมา ต่อมา จะเกิดการแตกตัวของน้ำหรือที่เรียกว่า “Water splitting” ได้ผลิตก๊าซเป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำจะเข้าไปแทนที่อิเล็กตรอนที่หลุดออกไปในระบบแสงสอง อิเล็กตรอนจากระบบแสงสองจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (Plastoquinone: PQ) ไซโตโครม บี 6 (Cytochrome b<sub>6</sub>: Cyt b<sub>6</sub>) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f: Cyt f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin: PC) และไปยังระบบแสงหนึ่ง การทำงานของระบบแสงหนึ่งคล้ายคลึงกับระบบแสงสอง เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาและถูกส่งต่อไปจนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin: Fd) ในกระบวนการถัดไป อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะถูกส่งไปยัง 2 เส้นทาง เส้นทางแรกอิเล็กตรอนจะเข้าสู่กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> fixation) ได้ผลิตก๊าซเป็นคาร์โบไฮเดรต คาร์โบไฮเดรตที่ได้จะถูกนำไปใช้เป็นอาหารและเก็บสะสมต่อไป ซึ่งจะเกิดขึ้นในสภาวะปกติ (รูปที่ 2.4A) เส้นทางที่สองจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะพิเศษ เช่น สภาวะไม่มีออกซิเจนหรือสภาวะที่แหล่งอาหารขาดซัลเฟอร์ เป็นต้น อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่จากเฟอร์รีดอกซินไปรวมกับโปรตอนที่มา

จากการแตกตัวของน้ำโดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.4B) แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการสังเคราะห์แสงทางตรงจะเกิดออกซิเจนที่เป็นผลพลอยได้ จากกระบวนการสังเคราะห์แสง ออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ (Melis and Happe, 2001)

## (2) กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำแบบทางอ้อม (Indirect photolysis)

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำแบบทางอ้อมเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยไม่ผ่านระบบแสงสอง ทำให้ไม่เกิดก๊าซออกซิเจนขึ้น สามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทางคือ (1) อิเล็กตรอนที่ใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้มาจากการย่อยสลายแบ่งไปเป็นไพรูเวท NADH และ ATP NADH จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่พลาสโตควิโนนโดยผ่านเอนไซม์ NAD(P)H plastoquinone oxidoreductase (NPQR) อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป คือ ไซโตโครม บี 6 ไซโตโครม เอฟ พลาสโตไซยานิน ระบบแสงหนึ่ง และตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่จากเฟอร์รีดอกซินไปรวมกับโปรตอน โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์คือไฮโดรเจน (2) ในสภาวะที่มีดและปราศจากออกซิเจน ไพรูเวทจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีติลโคเอและให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ Pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) จากนั้น เฟอร์รีดอกซินจะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ PFOR และจะถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน (รูปที่ 2.4B)



รูปที่ 2.4 กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) (A) และการเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ (Anaerobic condition) (B)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก [https://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent\\_reactions](https://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent_reactions)

## 2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

ในปี ค.ศ. 1939 Gaffron ได้ค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* เป็นครั้งแรกจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Gaffron, 1939) Stephenson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ “ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase)” ขึ้นเป็นครั้งแรกภายหลังการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (Methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต

### 2.4.1 การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามองค์ประกอบของโลหะในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น

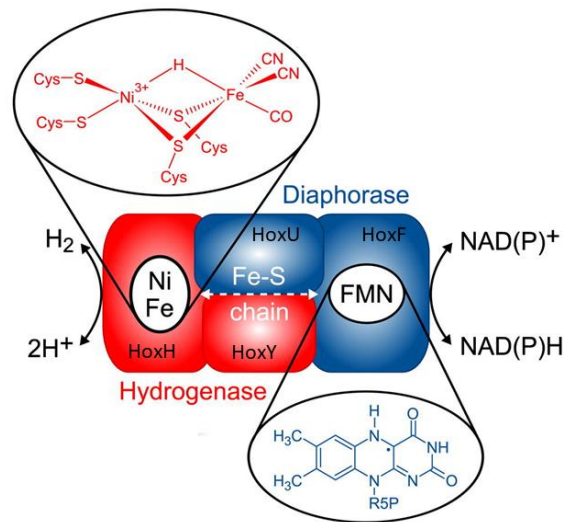
เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกออกเป็น 2 ชนิด ตามองค์ประกอบของโลหะในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น ดังนี้

1. เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (NiFe-hydrogenase)

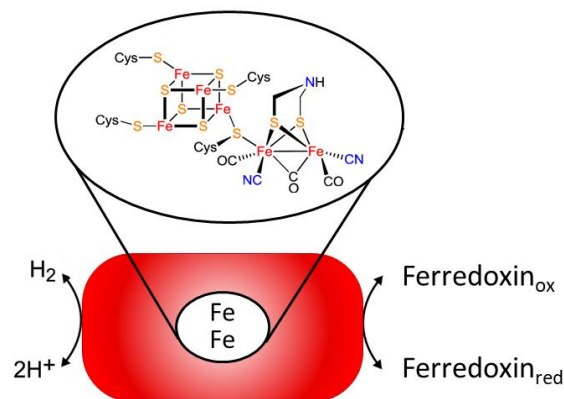
นิกเกิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยคือ หน่วยย่อยเล็กหรือ HoxY ที่มีขนาดประมาณ 28.8 กิโลดาลตัน และประกอบด้วยคลัสเตอร์ของซัลเฟอร์และเหล็ก (Fe-S cluster) จำนวน 3 ชุด และหน่วยย่อยขนาดใหญ่หรือ HoxH มีขนาดประมาณ 62.5 กิโลดาลตัน และประกอบด้วยอะตอมของเหล็ก (Fe) และนิกเกิล (Ni) ซึ่งเป็นบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Active site) (Vignais and Toussaint, 1994) นอกจากหน่วยย่อยเล็กและใหญ่แล้ว ยังมีโปรตีนอีกส่วนหนึ่งที่เรียกว่าไดอะพอเรส (NADH : Acceptor oxidoreductase, diaphorase) ซึ่งประกอบด้วย HoxF, HoxU และ HoxE ที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H (Horch *et al.*, 2011) (รูปที่ 2.5)

2. เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น (FeFe-hydrogenase)

ไดไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่อยู่ในโมเลกุลประกอบด้วยอะตอมของเหล็ก 2 อะตอม อยู่บริเวณศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ชนิดนี้ เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยคลัสเตอร์ของซัลเฟอร์และเหล็ก (Fe-S cluster) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยคือ (1) หน่วยย่อยใหญ่ที่มีคลัสเตอร์ของ 4Fe4S และมีหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินและส่งต่อไปยังหน่วยย่อยเล็ก (2) หน่วยย่อยเล็กที่มีคลัสเตอร์ของ 2Fe-2S และเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยายารีดักชันระหว่างโปรตอนและอิเล็กตรอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน (Smith *et al.*, 2012) เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการผลิตไฮโดรเจนเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในสาหร่ายสีเขียว (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและไดอะฟอเรส  
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Horch *et al.*, 2011



รูปที่ 2.6 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ FeFe-hydrogenase  
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Li *et al.*, 2017

#### 2.4.2 การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

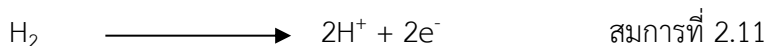
##### 1) ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase)

ไบไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน (สมการ 2.10) เอนไซม์นี้สามารถพบในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ เช่น แบคทีเรีย ไชยาโนแบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียว เป็นต้น



## 2) ยูนิไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนส (Unidirectional hydrogenase)

ยูนิไดเรกชันนาลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน (สมการที่ 2.11) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่มีเหล็กจำนวน 2 อะตอม อยู่ในบริเวณศูนย์กลางของการกระตุ้นของเอนไซม์ (FeFe-hydrogenase) และเป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron and Rubin, 1942), *Chlamydomonas reinhardtii* (Hartman and Krasna, 1963), *Chlorella fusca* (Kessler, 1974) และ *Chlamydomonas moewusii* (Healey, 1970) พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้จะทำงานได้ดีในสภาวะปราศจากออกซิเจนหรือในสภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณน้อยเท่านั้น (Florin *et al.*, 2001) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสประกอบด้วยโปรตีนเพียง 1 หน่วย มีบริเวณกระตุ้นหรือบริเวณ H-cluster ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอม โดยเหล็กตัวที่ 1 จับกับซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) ที่ทำหน้าที่เป็นคลัสเตอร์ของเหล็กและซัลเฟอร์ [4Fe-4S] นอกจากอะตอมของเหล็กที่อยู่ตรงกลางของบริเวณนี้จะจับกับซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซิสเทอีนแล้ว อะตอมของเหล็กยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย (Maness *et al.*, 2009) (รูปที่ 2.6)

## 2.5 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

จากการจัดจำแนกสาหร่าย *Scenedesmus* ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) พบว่า *Scenedesmus obliquus* จัดอยู่ใน

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Phylum Chlorophyta

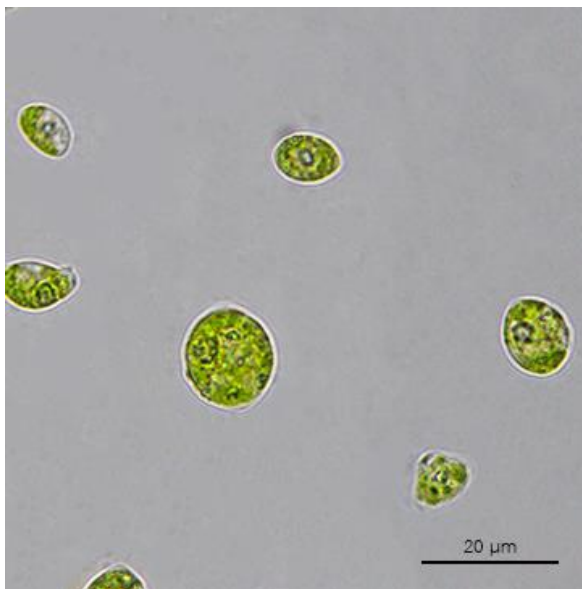
Class Chlorophyceae

Order Chlorococcales

Family Scenedesmaceae

Genus *Scenedesmus*

สาหร่ายในแฟมิลีนี้เป็นแพลงก์ตอนพืชที่พบในน้ำจืด อาศัยอยู่ในน้ำนิ่ง หรืออาจพบในดิน ภายใต้การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* จะอยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวหรือเป็นโคโลนีตามสายพันธุ์ แต่ถ้านำ *Scenedesmus* มาเลี้ยงด้วยอาหารเหลวโดยมีการเขย่า เซลล์จะไม่จับกันเป็นกลุ่ม แต่มักจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

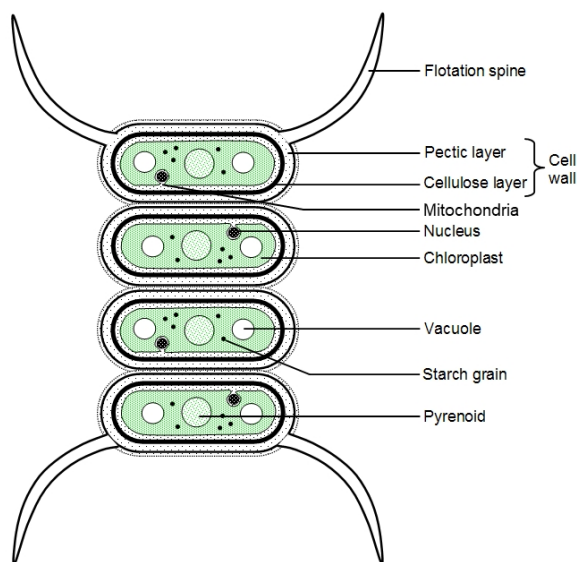
### 2.5.1 โครงสร้างของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

*Scenedesmus* เป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีขนาดประมาณ 10-20 ไมโครเมตร ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ ประกอบด้วยออร์แกเนลล์ต่างๆ ที่มีหน้าที่แตกต่างกัน ดังนี้

(1) นิวเคลียส (Nucleus) อยู่ในไซโทพลาสซึม เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของเซลล์ นิวเคลียสมีหน้าที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน และเอนไซม์ ภายในนิวเคลียสบรรจุสารพันธุกรรม ซึ่งจัดเรียงตัวเป็นดีเอ็นเอ (DNA) สายยาว เมื่อรวมกับโปรตีนฮิสโตน (Histone) เป็นโครโมโซมหรือยีน โครโมโซมเหล่านี้มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน

(2) คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ในเซลล์สาหร่ายสีเขียว คลอโรพลาสต์จะประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีและออร์แกเนลล์ต่างๆ เช่น พลาสติด (Plastid) เป็นแหล่งรวมของรงควัตถุต่างๆ ภายในเซลล์ ในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีรงควัตถุประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ มีไพเรโนอิด (Pyrenoid) ทำหน้าที่เก็บสะสมแป้งหรือพอลิแซคคาไรด์อื่นๆ มีแวคิวโอล (Vacuole) ทำหน้าที่ขับน้ำและของเสียออกภายนอกเซลล์ มีเม็ดแป้ง (Starch grain) ทำหน้าที่ในการสะสมแป้งหรือโปรตีน (รูปที่ 2.8)

(3) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) (รูปที่ 2.8) ประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ที่มีโปรตีนต่างๆ แทรกตัวอยู่ เยื่อหุ้มชั้นนอกมีลักษณะเรียบ และเยื่อหุ้มชั้นในมีลักษณะขดไปขดมาเรียกว่า คริสตี (Cristae) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน ไมโทคอนเดรียเป็น ออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตพลังงานสำหรับกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ของสาหร่าย



รูปที่ 2.8 องค์ประกอบภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

ที่มา : [http://cronodon.com/BioTech/Algal\\_Bodies.html](http://cronodon.com/BioTech/Algal_Bodies.html)

### 2.5.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีรูปร่างและลักษณะแบบออกเป็น 2 แบบดังนี้ (1) เซลล์เดี่ยว (Unicellular form) มีรูปร่างได้หลายแบบคือ กลม กลมรี รูปร่างคล้ายรูปกระสวย พระจันทร์เสี้ยว เป็นต้น สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kuetzing เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีรูปร่างทรงกลม (2) เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (Colony form) เซลล์จะเกาะกันเป็นกลุ่มจำนวน 2, 4, 8, 16 หรือ 32 เซลล์ โดยด้านข้างของผนังเซลล์แต่ละเซลล์แตะกัน (รูปที่ 2.8) เช่น สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus ginzbergeri* จะมีรูปร่างคล้ายกระสวยอยู่เป็นกลุ่ม 8 เซลล์ *Scenedesmus incrassatulus* มีรูปร่างคล้ายทรงกลมหรืออยู่เป็นกลุ่ม 4 หรือ 8 เซลล์ เป็นต้น (Hindák and Hindáková, 2008)

### 2.5.3 การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* จะอาศัยการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 หรือการสร้างออตสปอร์ ซึ่งในแต่ละเซลล์จะสร้างออตสปอร์เท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* ชนิดนั้น เมื่อเซลล์แก่ ออตสปอร์ก็จะหลุดออกมาจากผนังเซลล์แม่และจับกันเป็นโคลนินใหม่ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สาหร่ายสีเขียวจะสืบพันธุ์โดยใช้เซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่าแกมีต (Gamete) เมื่อเกิดการผสมพันธุ์กันของแกมีต จะพัฒนากลายเป็นไซโกต (Zygote) ถ้าแกมีตผสมกันระหว่างเพศเดียวกันและไซและสปอร์มีขนาดเท่ากันจะเรียกว่า ไอโซแกมีส (Isogamous) ถ้าแกมีตผสมในเพศที่แตกต่างกันและไซมีขนาดเท่าสปอร์จะเรียกว่า เฮเทอโรแกมีส (Heterogamous) และถ้าแกมีตผสมกันระหว่างเพศที่แตกต่างกันและไซและสปอร์มีขนาดที่แตกต่างกันจะเรียกว่า โอโอแกมี (Oogamy) หลังจากนั้น ไซโกตจะพัฒนาเป็นสปอร์ที่มีโครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ไซโกสปอร์ (Zygospore) และเจริญกลายเป็นเซลล์ใหม่ต่อไป

## 2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ (1) ระยะการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตชีวมวลจำนวนมากภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และ (2) ระยะการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ ในการทดลองนี้ จะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ต่ออาหาร Tris Acetate Phosphate (TAP) เพื่อผลิตชีวมวล หลังจากนั้น จึงนำเซลล์สาหร่ายมาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนในระยะการผลิตไฮโดรเจน ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่

### 2.6.1 อายุเซลล์ (Cell age)

สาหร่ายสีเขียวที่มีอายุเซลล์ต่างกันจะมีเมแทบอลิซึมและการผลิตสารตัวกลางที่แตกต่างกัน มีรายงานพบว่า ไฮโดรเจนเป็นสารปฐมภูมิ (Primary metabolite) ซึ่งผลิตมากในระยะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Logarithmic phase) จึงคาดว่าระยะการเจริญของเซลล์ที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดคือ ระยะ Log phase (Kim *et al.*, 2005) แต่ก็มีบางรายงานกล่าวถึงการผลิตไฮโดรเจนในระยะเฉื่อย (Late-logarithmic phase) ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ระยะอื่น (Chen *et al.*, 2008)

### 2.6.2 สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ (Sulfur deprivation)

ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนภายในเซลล์ การขาดซัลเฟอร์ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และเมไธโอนีน (Methionone) ที่มี

องค์ประกอบของซัลเฟอร์ได้ กรดอะมิโนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างโปรตีน D1 ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่ในการซ่อมแซมการทำงานของระบบแสงสอง (Wykoff *et al.*, 1998) เมื่อไม่มีโปรตีนชนิดนี้กระบวนการซ่อมแซมของระบบแสงสองเกิดความบกพร่อง ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำ อีกทั้งกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรียยังคงดำเนินต่อไป จึงทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนภายในระบบลดลง มีรายงานพบว่าโปรตีน D1 ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบแสงสองเท่านั้น แต่การทำงานของไซโตโครมบี 6 เอฟ และการทำงานของระบบแสงหนึ่งไม่ได้ลดลงตามไปด้วย (Happe *et al.*, 2002) อิเล็กตรอนที่เกิดจากการย่อยสลายแป้ง โปรตีน หรือไขมัน จะถูกส่งไปยังพลาสโตควิโนน ระบบแสงหนึ่ง เพอร์ริดอกซิน จนถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนต่อไป การผลิตไฮโดรเจนผ่านเส้นทางนี้ไม่มีออกซิเจนเกิดขึ้น ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น (Oncel *et al.*, 2014)

### 2.6.3 สถานะการขาดแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen deprivation)

การขาดไนโตรเจนจะส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนและไนโตรจีเนสในกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีนและองค์ประกอบสำคัญในหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ การขาดไนโตรเจนของเซลล์จะทำให้สาหร่ายมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงลดน้อยลง การสังเคราะห์โปรตีนของหน่วยรับพลังงานแสง (Light-harvesting complex, LHC) ในระบบแสงสองลดลง ทำให้ ออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสองลดลง นอกจากนี้ การขาดธาตุไนโตรเจนทำให้เซลล์สาหร่ายมีการสะสมแป้งมากขึ้น เมื่อแป้งถูกย่อยสลายเป็นไพรูเวท (Pyruvate) และอะซิติลโคเอ (Acetyl CoA) จะให้อิเล็กตรอนจำนวนมากและสามารถนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนการผลิตไฮโดรเจนได้ (Ji *et al.*, 2011)

### 2.6.4 สถานะการขาดแหล่งฟอสฟอรัส (Phosphorus deprivation)

ฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบหลักของการสังเคราะห์สารพลังงานสูง Adenosine triphosphate (ATP) ที่จำเป็นต่อวัฏจักรคัลวิน เมื่อเซลล์สาหร่ายขาดธาตุฟอสฟอรัสจึงส่งผลให้มีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศลดลง เนื่องจากสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์สารพลังงานสูง ATP และ ไรบูโลส-1,5-บิสฟอสเฟต (Ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในวัฏจักรคัลวิน (Brooks, 1985) จึงนำไปสู่การลดลงของกิจกรรมการถ่ายเทอิเล็กตรอนของระบบการสังเคราะห์แสง (Photosynthetic electron transport activity) นอกจากนี้ การขาดธาตุฟอสฟอรัสยังทำให้สาหร่ายมีอัตราการสังเคราะห์แสงลดลง เซลล์จึงเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจน ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

### 2.6.5 สถานะการขาดโพแทสเซียม (Potassium deprivation)

โพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ที่สำคัญภายในเซลล์ของสาหร่าย การขาดโพแทสเซียมจะส่งผลให้การทำงานของระบบแสงสองลดลง ทำให้ปริมาณออกซิเจนภายในระบบลดลงโดยปกติแล้ว เซลล์จะเก็บแหล่งคาร์บอนในรูปของแป้ง แต่การขาดโพแทสเซียมจะไปยับยั้งการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นแป้ง ทำให้เซลล์เหลือแหล่งพลังงานที่เป็นน้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก น้ำตาลกลูโคสจึงถูกใช้เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนที่มากพอสำหรับการผลิตไฮโดรเจน การขาดโพแทสเซียมจึงทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ การทำงานของระบบแสงสองลดลง และเซลล์สามารถใช้แหล่งอิเล็กตรอนจากน้ำตาลกลูโคสได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ เนื่องจากไม่ต้องไปเป็นสะสมในรูปของแป้ง (Papazi *et al.*, 2014)

### 2.6.6 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับกระบวนการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic condition) โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นอนินทรีย์คาร์บอนในการสร้างอาหาร หรือ ในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (Photoheterotrophic condition) โดยใช้อินทรีย์คาร์บอน เช่น อะซีเตท กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส มอลโทส แล็กโทส และสารอินทรีย์ในน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน (Harris, 1989) สาหร่ายสีเขียวจะเก็บสะสมคาร์บอนในรูปของแป้งหรือไกลโคเจน ภายใต้สภาวะการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียวจะนำแป้งหรือไกลโคเจนที่เก็บสะสมนี้ไปใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อการผลิตไฮโดรเจน (Márquez-Reyes *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม การเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนให้เหมาะสมมีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจน

### 2.6.7 แสง (Light)

แสงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากแสงเป็นแหล่งพลังงานของกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายจะนำพลังงานแสงไปกระตุ้นให้เกิดการแตกตัวของน้ำ ส่งผลให้มีการถ่ายเทอิเล็กตรอน จนในที่สุด เกิดการผลิตไฮโดรเจน ถ้ามีปริมาณแสงที่มากเกินไป จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่าการยับยั้งโดยแสง (Photoinhibition) โดยโปรตีนในระบบแสงจะถูกทำลายและเกิดสารอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของเซลล์สาหร่าย และอาจทำให้เซลล์เครียดและตายได้ (Das and Verziroglu, 2001) ในทางกลับกัน หากมีปริมาณแสงที่น้อยเกินไป สาหร่ายสีเขียวจะไม่มีพลังงานเพียงพอสำหรับกระตุ้นให้เกิดการแตกตัวของน้ำ หรือสำหรับกระตุ้นให้อิเล็กตรอนอยู่ในระดับพลังงานที่สูงขึ้น (Excited state) ทำให้อิเล็กตรอนไม่สามารถถูกถ่ายเทไปยังอิเล็กตรอนตัวถัดไปสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้น การ

เลือกความเข้มแสงที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนได้

### 2.6.8 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายสีเขียว โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายสีเขียวจะอยู่ในช่วง 15 ถึง 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นช่วงที่เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากเซลล์สาหร่ายอยู่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ลดลง มีการเพิ่มปริมาณการสร้างไรบูโลส 1,5 บิสฟอสเฟต และมีกิจกรรมของการสังเคราะห์แป้งมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการสังเคราะห์แสงจะสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเท่านั้น เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงอย่างรวดเร็วและมีอัตราการใช้ ATP และแป้งในไมโทคอนเดรียมากขึ้น (Staehr and Sand-Jensen, 2006)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิในช่วงนี้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่าย รวมถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เป็นเอนไซม์หลักในการผลิตไฮโดรเจน (Saeed and Ibrahim, 2012) ในอุณหภูมิต่ำกว่าหรือ 25 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะต่ำส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนจะใช้เวลานาน แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงเกินกว่า 40 องศาเซลเซียส จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงขึ้น อีกทั้ง ปริมาณก๊าซออกซิเจนลดลง จากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่มีประสิทธิภาพต่ำลง และกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรียที่เพิ่มขึ้น (Staehr and Sand-Jensen, 2006)

### 2.6.9 พีเอช (pH)

พีเอชมีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์สาหร่ายเปลี่ยนแปลงไป โดยปกติ สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีพีเอชที่สูงกว่า 5.0 และต่ำกว่า 8.0 โดยมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่พีเอช 7.0 (Danilov and Ekelund, 2001) การควบคุมพีเอชให้คงที่นั้นเป็นปัญหาหนึ่งที่พบภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเป็นเวลา 1-3 วันเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียวให้ได้ผลผลิตชีวมวลปริมาณสูงในเวลาอันสั้น จะต้องเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก (Mixotrophic condition) โดยมีการดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว จึงส่งผลให้อาหารมีค่าพีเอชลดลงจากการที่กรดอะซีติกในอาหารแตกตัวได้อะซีเตท ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) และโปรตอน ( $\text{H}^+$ ) และมีรายงานว่าในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในอาหาร TAP ที่มีพีเอชเท่ากับ 7.7 (Kosourov et al., 2003)

## 2.7 แหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและการบำบัดน้ำเสีย

น้ำเป็นสิ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เพราะน้ำเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของร่างกายสิ่งมีชีวิต ทำให้กลไกต่างๆ ภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตดำเนินไปได้อย่างปกติ นอกจากนี้ น้ำยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิต เช่น สาหร่ายและสัตว์น้ำต่างๆ เป็นต้น มนุษย์เราใช้น้ำโดยปราศจากการวางแผนที่เหมาะสมและไม่มีการอนุรักษ์ฟื้นฟูแหล่งน้ำ ทำให้เกิดปัญหาความเน่าเสียของแหล่งน้ำ ภัยจากน้ำเสียจากอุตสาหกรรมไม่ได้มีแต่เพียงกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์เท่านั้น แต่ยังมีในรูปของก๊าซพิษที่ปล่อยออกสู่บรรยากาศ เคมีในรูปของสารละลายลงสู่แหล่งน้ำต่างๆ ทำให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย ไม่สามารถนำน้ำนั้นมาใช้ในการบริโภค อุปโภค รวมทั้งระบบนิเวศของสัตว์น้ำถูกทำลาย

น้ำเสีย หมายถึง น้ำที่มีสารใดๆ หรือสิ่งปนเปื้อนที่ไม่พึงปรารถนาปนอยู่ การปนเปื้อนของสิ่งสกปรกเหล่านี้ จะทำให้คุณสมบัติของน้ำเปลี่ยนแปลงไปจนอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ สิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในน้ำเสีย เช่น น้ำมัน ไขมัน ผงซักฟอก สบู่ ยาฆ่าแมลง สารอินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเหม็นและเชื้อโรคต่างๆ เป็นต้น สารเหล่านี้เมื่อไหลลงสู่แม่น้ำลำคลองจะไปเพิ่มมลพิษให้กับพืชและสัตว์น้ำ ทำให้มีประชากรของพืชและสัตว์น้ำตายลง เมื่อพืชและสัตว์น้ำตายจะส่งผลทำให้เกิดสารอินทรีย์ในน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมาก สารอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นนี้จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่อยู่ในแหล่งน้ำ ทำให้เกิดสภาวะการขาดออกซิเจนซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการย่อยสลายของสารอินทรีย์ในจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน ส่งผลให้แหล่งน้ำมีสีดำและส่งกลิ่นเหม็น (ชัยศรี ธาราสวัสดิ์พิพัฒน์, 2553) แหล่งน้ำเสียจากอุตสาหกรรมมีลักษณะแตกต่างกันตามประเภทของโรงงานอุตสาหกรรม น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมจะมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์จำนวนมาก ส่งผลให้ค่า Biochemical Oxygen Demand (BOD) ของน้ำทิ้งจากโรงงานเหล่านี้มีค่าสูงมาก และเป็นต้นเหตุให้เกิดการเน่าเสียและส่งกลิ่นเหม็นของน้ำเพิ่มมากขึ้น โรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้จึงต้องหาทางบำบัดน้ำเสียนี้ก่อนจะปลดปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ การคัดเลือกระบบบำบัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ลักษณะของน้ำเสีย ความยากง่ายของการดูแลรักษาระบบ และประสิทธิภาพของระบบบำบัดและราคาประหยัด โดยทั่วไป การบำบัดน้ำเสียแบ่งออกเป็น 3 กระบวนการหลักๆ ดังนี้

### 2.7.1 การบำบัดทางกายภาพ (Physical Treatment)

การบำบัดทางกายภาพเป็นการบำบัดน้ำเสียอย่างง่าย โดยปกติ การบำบัดน้ำเสียมักนิยมใช้การบำบัดทางกายภาพนี้เป็นอันดับแรก การบำบัดประเภทนี้มีหลักการคือ แยกเอาสิ่งเจือปนที่ไม่ละลายน้ำออกจากน้ำเสีย เช่น ของแข็งขนาดใหญ่ กระดาษ พลาสติก เศษอาหาร กรวด หวาย ไขมัน และน้ำมัน เป็นต้น โดยวิธีนี้จะแยกตะกอนของแข็งที่ไม่สามารถละลายน้ำออกได้ประมาณ 50-65 เปอร์เซ็นต์ และความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ วิธีการต่างๆ ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียทางกายภาพมีหลากหลายวิธี ได้แก่ การดักด้วยตะแกรง (Screening) เป็น

การแยกเศษขยะขนาดใหญ่ผ่านตะแกรงให้มีขนาดเล็กลง การทำให้ลอย (Floating) จะใช้สำหรับ ตะกอนที่มีความถ่วงจำเพาะน้อยกว่าน้ำ ตะกอนต่างๆ ในน้ำเสียจะลอยขึ้นสู่บริเวณชั้นบนของผิวน้ำ การตกตะกอน (Sedimentation) เป็นการคัดแยกตะกอนออกจากแหล่งน้ำเสีย โดยอาศัยหลักการ แรงโน้มถ่วง ซึ่งจะใช้กับตะกอนที่มีความถ่วงจำเพาะมากกว่าน้ำ การกำจัดน้ำมันและไขมัน (Oil and grease removal) น้ำมันและไขมันจะพบมากในน้ำทิ้งจากร้านอาหารทั่วไป สถานีจำหน่ายน้ำมัน อยู่ ช่อมรรถยนต์ โดยมีหลักการคือ ภายในถังดักจับน้ำมันหรือไขมันจะต้องมีพื้นที่ผิวกว้างพอกับปริมาตร ไขมันที่จะลอยขึ้นมากับความเร็วของน้ำ โดยจะมีแผ่นดักจับไขมันวางตามแนวขวาง เป็นต้น ซึ่งจะเป็น การลดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่มีในน้ำเสียเป็นหลัก

### 2.7.2 การบำบัดทางเคมี (Chemical Treatment)

การบำบัดทางเคมีเป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยการใช้สารเคมีในการกำจัดสารหรือสิ่งปนเปื้อน ต่างๆ ในน้ำเสีย วิธีการนี้จะใช้สำหรับน้ำเสียที่มีส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้ คือ ค่าพีเอช ของน้ำเสียสูงหรือต่ำจนเกินไป มีสารพิษ มีโลหะหนัก มีของแข็งแขวนลอยที่ตกตะกอนยาก มีน้ำมัน หรือไขมันที่ละลายน้ำ มีปริมาณไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสสูงเกินไป และมีเชื้อโรค กระบวนการทาง เคมีที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่หลากหลายกระบวนการ เช่น (1) กระบวนการโคแอกกูเลชัน (Coagulation) เป็นกระบวนการกำจัดสารที่มีอนุภาคขนาดเล็กมีหลักการโดยการเติมสารเคมีบาง ชนิดลงไป เช่น สารส้ม (Aluminum sulfate) ลงไปในน้ำเสียทำให้คอลลอยด์หลายๆ อนุภาคจับกัน เป็นกลุ่มจนมีอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นและตกลงเป็นตะกอน (2) กระบวนการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) เป็นกระบวนการเติมกรดหรือด่างลงในน้ำเสียเพื่อปรับสภาพพีเอชให้เป็นกลาง สารเคมีที่ใช้ เช่น กรดกำมะถัน กรดเกลือ หรืออาตใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก็ได้ เป็นต้น อุปกรณ์ที่ ใช้บำบัดน้ำเสียด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่ ถังกวนเร็ว ถังกวนช้า ถังตกตะกอน ถังกรอง และถังฆ่าเชื้อ ฯลฯ

### 2.7.3 การบำบัดทางชีวภาพ (Biological Treatment)

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นวิธีบำบัดน้ำเสียโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์ใน การกำจัดสิ่งเจือปนในน้ำเสีย เช่น สารอินทรีย์คาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ฯลฯ สารเจือปน เหล่านี้จะถูกใช้เป็นแหล่งอาหารและเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์เพื่อการเจริญเติบโต ทำให้น้ำเสีย มีค่าความสกปรกลดลง จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการบำบัดน้ำเสียเหล่านี้แบ่งได้ 2 ประเภทคือ (1) จุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic organisms) จุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนสามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ใน น้ำเสียให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (2) จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic organisms) จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และก๊าซไฮโดรเจน เป็นต้น ก๊าซเหล่านี้รวมเรียกว่า ก๊าซชีวภาพ (Biogas) อันมี ประโยชน์แก่การนำมาใช้เป็นพลังงานทางเลือกได้ นักวิจัยได้ให้ความสนใจและพัฒนาระบบการบำบัด

น้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เพื่อนำก๊าซชีวภาพดังกล่าวมาใช้เป็นพลังงานหมุนเวียนภายในโรงงานอุตสาหกรรม

สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ มีรายงานการบำบัดน้ำเสียจากสาหร่ายสีเขียวชนิดต่างๆ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำเสียและภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน เซลล์สามารถกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเสียได้มากถึง 83 และ 14.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Kong *et al.*, 2010) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* สามารถกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเสียได้สูงสุดถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 94 ชั่วโมง และกำจัดแอมโมเนียในแหล่งน้ำเสียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 188 ชั่วโมง (Martinez *et al.*, 2000) สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* สามารถกำจัดฟอสฟอรัสและไนโตรเจนได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 181 ชั่วโมง ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (Ruiz-Marin *et al.*, 2010) เป็นต้น นอกจากนี้ สาหร่ายยังสามารถใช้สารเจือปนจากน้ำเสียมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโต เมื่อมีการสังเคราะห์แสง สาหร่ายจะมีการผลิตออกซิเจนซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มอากาศให้แหล่งน้ำ อันจะเป็นประโยชน์แก่สัตว์น้ำ มีรายงานการนำน้ำเสียจากกระบวนการหมักข้าวฟ่างหวานมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ  $0.19 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง เปรียบเทียบกับในอาหาร TAP ที่สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ  $0.36 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง แต่การบ่มสาหร่ายในน้ำเสียจากกระบวนการหมักข้าวฟ่างหวานจะทำให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าการบ่มสาหร่ายในอาหาร TAP ประมาณ 8.57 เท่า (Chen *et al.*, 2014)

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.8.1 งานวิจัยผลของความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Gaffron (1939) ศึกษากระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* เป็นครั้งแรก โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้น ชักนำให้เซลล์อยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในที่มืด พบว่าเซลล์สาหร่าย *S. obliquus* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้

Gaffron and Rubin (1942) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* ในอาหารที่มีการเติมกลูโคส เซลล์สาหร่ายจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายจะผลิตและสลายไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นตามความเข้มแสง และเมื่อเติมสารไดไนโตรพีนอลไปยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนในที่มืด พบว่าเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงได้เช่นกัน

Peltier and Schmidt (1991) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 2137 โดยเฉพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่ขาดไนโตรเจนภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 2137 ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน เช่น LHC (Light harvesting complex) ในไทลาคอยด์ นอกจากนี้ การขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงจะส่งผลให้เซลล์ของสาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ และเกิดการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น

Schnackenberg *et al.* (1993) ศึกษาสารให้อิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* สายพันธุ์ D3 ซึ่งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟ โดยทดสอบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสกับเมทิลไวโอโลเจน (Methylviologen) ฟีนอสฟรานีน (Phenosafarine) เบนซิลไวโอโลเจน (Benzylviologen) เจนัส-กรีน (Janus-green) เมทิลีนบลู (Methylene blue) และโซเดียมไดไทโอไนท์ (Sodium dithionite) พบว่าเมทิลไวโอโลเจนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยทำหน้าที่คล้ายกับเฟอร์รีดอกซิน

Márquez-Reyes *et al.* (2015) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการเติมสารรีดิวซ์ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและสารยับยั้งออกซิเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas gloeopara* และ *S. obliquus* พบว่า การใส่กรดอะมิโนซิสเทอีนลงไปในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะมีส่วนช่วยลดปริมาณออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้ดี และผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้นในสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิด

### 2.8.2 งานวิจัยผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus*

Rattana *et al.* (2010) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากแหล่งน้ำในโรงเรียนพรตพิทยพยัต พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดที่อายุเซลล์ 18 ชั่วโมงหรือในระยะ Log phase และพบว่าภายใต้สภาวะที่มีแสง สาหร่ายมีค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าภายใต้สภาวะที่ปราศจากแสง

Kim *et al.* (2005) ศึกษาอายุเซลล์ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 ภายใต้สภาวะที่มีการขาดซัลเฟอร์ โดยอายุเซลล์ที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ 1. ระยะเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Early-logarithmic phase) 2. ระยะคงที่ของการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Mid-logarithmic phase) 3. ระยะเฉื่อย (Late-logarithmic phase) 4. ระยะคงที่ (Stationary phase) พบว่า เซลล์ในระยะ Late-logarithmic phase ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 159 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อ 1 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เนื่องจากปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 สูงสุดที่ ระยะ Late-logarithmic phase ส่งผลให้อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำมีปริมาณมาก การผลิตไฮโดรเจนจึงสูง อีกทั้งเมื่อเซลล์ปริมาณ

มากและอยู่ภายใต้สภาวะขาดซัลเฟอร์จะทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้เร็วขึ้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

### 2.8.3 งานวิจัยสภาวะการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

#### 2.8.3.1 การขาดแหล่งซัลเฟอร์ในอาหาร

Rashid *et al.* (2011) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ในการขาดแหล่งซัลเฟอร์ภายใต้สภาวะการให้แสงและไม่ให้แสง ในสภาวะการให้แสง นำสาหร่ายไปบ่มภายใต้ความเข้มแสง 120 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และในสภาวะไม่ให้แสง นำสาหร่ายไปบ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ภายใต้สภาวะการให้แสงสว่าง สาหร่าย *C. vulgaris* ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงถึง 530 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 34.8 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ ยังพบว่าภายใต้สภาวะที่มีแสงและมีการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารในชั่วโมงที่ 0 จะทำให้สาหร่าย *C. vulgaris* ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเดิม 18 เท่าในชั่วโมงที่ 24

Tsygankov *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิกที่มีการขาดธาตุซัลเฟอร์ และความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มแสงต่ำเท่ากับ 25 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีตลอดระยะเวลาการบ่ม พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $56.4 \pm 16.7$  มิลลิลิตรต่อลิตรการเพาะเลี้ยง

#### 2.8.3.2 การขาดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร

Ji *et al.* (2011) ศึกษาผลของการขาดธาตุไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Tetraselmis subcordiformis* พบว่าในสภาวะที่มีการขาดไนโตรเจน สาหร่ายจะไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ได้ ทำให้มีการสะสมแป้ง เมื่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบแสงสองหรือโปรตีน D1 ไม่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา จึงทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์แสงส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนลดลง เมื่อปริมาณออกซิเจนลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้มากขึ้น ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้น ในทางกลับกัน การขาดซัลเฟอร์และฟอสฟอรัสไม่ส่งผลต่อปริมาณการสะสมแป้งแต่มีการยับยั้งการทำงานของโปรตีน D1 เนื่องมาจากการขาดซัลเฟอร์

### 2.8.3.3 การขาดแหล่งฟอสฟอรัสในอาหาร

Brooks (1985) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์หรือฟอสฟอรัสภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด พบว่าการขาดฟอสฟอรัสจะทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพ และเมื่อไนโตรเจนหมดไปจะส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีน

Batyrova *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* 137c+ ภายใต้สภาวะขาดธาตุฟอสฟอรัส พบว่าสาหร่ายสีเขียวให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 68 มิลลิลิตรต่อลิตร และเมื่อบ่มเซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* 137c+ ถูกบ่มภายใต้สภาวะการขาดธาตุฟอสฟอรัสเป็นระยะเวลา 100 ชั่วโมง จะทำให้ระบบเข้าสู่สภาวะปราศจากก๊าซออกซิเจน ซึ่งจะใช้เวลาานานกว่าการขาดธาตุซัลเฟอร์

### 2.8.3.4 การขาดแหล่งโพแทสเซียมในอาหาร

Papazi *et al.* (2014) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ภายใต้สภาวะต่างๆ โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) ที่มีการขาดโพแทสเซียม จะส่งเสริมให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น เนื่องจากโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญของโคเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่าย เมื่อขาดโพแทสเซียมจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้มีปริมาณกลูโคสในเซลล์มากซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนได้

### 2.8.4 งานวิจัยผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Rashid *et al.* (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ในอาหาร TAP ที่มีการขาดซัลเฟอร์ ภายใต้สภาวะการแปรผันของพีเอช แหล่งคาร์บอน และแสง จากการทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ พีเอช 8 ใช้สารสกัดจากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการให้แสง

Benoit *et al.* (2010) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ในอาหาร TAP ที่มีอะซิเตทความเข้มข้น 17 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถใช้อะซิเตทในการเจริญและผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสาหร่ายที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน

### 2.8.5 งานวิจัยผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Kim *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 ในสภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ ภายใต้สภาวะการแปรผันความเข้มแสงตั้งแต่ 60-300 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าที่ระดับความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด โดยผลิตได้ 225 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ชั่วโมง และที่ความเข้มแสง 300 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จะเกิดการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะส่งผลต่อการทำงานของระบบแสงและปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการขาดแหล่งซัลเฟอร์ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดโดยการควบคุมความเข้มแสงในระดับที่เหมาะสม

### 2.8.6 งานวิจัยผลอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Saeed and Ibrahim (2012) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chaetomorpha* sp. GAF99 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนอยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิในช่วงนี้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่าย รวมถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เป็นเอนไซม์หลักในการผลิตไฮโดรเจน ในสภาวะไม่มีแสงสาหร่ายสีเขียว *Chaetomorpha* sp. GAF99 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 23.2 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวแต่ละสายพันธุ์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน

### 2.8.7 งานวิจัยผลของพีเอชต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

Saleem *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ATCC 824 ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ ที่มีพีเอชในช่วงกรดและเบส พบว่า ในอาหารที่มีพีเอชเป็นเบส สาหร่ายจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีในสภาวะที่ไม่มีการให้แสง ในขณะที่เดียวกัน ในอาหารที่มีพีเอชเป็นกลางสาหร่ายจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีในสภาวะที่มีการให้แสงสว่าง แต่ในอาหารที่มีพีเอชที่เป็นกลางและมีการให้แสง สาหร่ายยังคงมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงกว่าในอาหารที่มีพีเอชเป็นเบสและไม่มีการให้แสง

### 2.8.8 งานวิจัยผลการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสีย

Chen *et al.* (2014) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* โดยใช้ น้ำเสียจากกระบวนการหมักข้าวฟ่างหวานในโรงงานอุตสาหกรรม (ASSF) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *C.*

*reinhardtii* ที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำเสียเท่ากับ  $0.19 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิเมตรต่อชั่วโมง เปรียบเทียบอัตราการเจริญในอาหาร TAP ที่มีค่าเท่ากับ  $0.36 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิเมตรต่อชั่วโมง จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* เข้าสู่สภาวะการผลิตไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียวที่บ่มภายใต้แหล่งน้ำเสียผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเมื่อบ่มในอาหาร TAP ถึง 8.57 เท่า

Martinez *et al.* (2000) ศึกษาการเจริญเติบโตและการบำบัดน้ำเสียของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* และ *C. vulgaris* ในน้ำเสียจากชุมชน พบว่า สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และเมื่อนำสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่า *S. obliquus* มีความสามารถในการกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเสียได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลดีกว่า *C. vulgaris* จากนั้น นำสาหร่าย *S. obliquus* มาตรึงเซลล์ด้วยอัลจินตและทดสอบความสามารถในการบำบัดน้ำเสีย พบว่าเซลล์ตรึง *S. obliquus* สามารถกำจัดฟอสฟอรัสในน้ำเสีย โดยผ่านระบบการบำบัดได้ถึง 5 รอบ

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง คือ สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL-OVG1 แยกได้จากบ่อน้ำธรรมชาติในโรงเรียนพรตพิทยพยัต เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาวสุรัตน์ดิพร รัตน์ะ (2554) และสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research)

#### 3.2 สารเคมี

##### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

อาหารสูตร Tris acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก) (Harris, 1989)

##### 3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.2.1 กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.2 แกลเซียลอะซิติกแอซิด (Glacial acetic acid,  $C_2H_4O_2$ ) (EDM Millipore, Germany)
- 3.2.2.3 โคบอลท์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Fluka Chemical Corp., USA)
- 3.2.2.4 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.5 คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ) (J.T.Baker, USA)
- 3.2.2.6 คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.7 ซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.8 ซิงค์คลอไรด์ ( $ZnCl_2$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.9 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Fluka Chemical Corp., USA)
- 3.2.2.10 โซเดียมอะซิเตท ( $C_2H_3O_2Na$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.11 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.12 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $NaH_2PO_4$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.13 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.14 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 3.2.2.15 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.16 ทริสเบส (Tris-base) (Vivantis Ltd., UK)

- 3.2.2.17 น้ำตาลกลูโคส ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Merck, Germany)
- 3.2.2.18 น้ำตาลซูโครส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.19 น้ำตาลฟรักโทส ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.20 น้ำตาลมอลโทส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Merck, Germany)
- 3.2.2.21 น้ำตาลแลกโทส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Sigma, USA)
- 3.2.2.22 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.23 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.24 แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.25 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.26 แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.27 อะการ์ (Agar) (BD Medical Technology, France)
- 3.2.2.28 เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (BDH Prolabo Chemicals, UK)
- 3.2.2.29 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ( $NH_4OH$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.30 แอมโมเนียมคลอไรด์ ( $NH_4Cl$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.31 ไอออน (III) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) (BDH Prolabo Chemicals, UK)
- 3.2.2.32 ไอออน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.2.33 ไฮโดรคลอริก (HCl) (Ajax Finechem, New Zealand)

### 3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

เมทานอล ( $CH_3OH$ ) (Analytical grade) (RIC Labscan, Thailand)

### 3.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- 3.2.4.1 น้ำยารวม (Combined Reagent)
- 3.2.4.2 แบเรียมคลอไรด์ ( $BaCl_2$ ) (Sigma, USA)
- 3.2.4.3 ฟีนอล์ฟทาลีน ( $C_{20}H_{14}O_4$ ) (Sigma, USA)

### 3.2.5 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

- 3.2.5.1 ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (Praxair, Thailand)
- 3.2.5.2 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์) (Thonburiwattana Ltd., Thailand)

### 3.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

- 3.2.6.1 โซเดียมไดไทโอไนต์ ( $Na_2O_4S_2$ ) (Sigma, Germany)

- 3.2.6.2 โปแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Potassium phosphate buffer) (Carlo Erba Reagents, Italy)
- 3.2.6.3 เมทิลไวโลเจนไดคลอไรด์ไฮเดรต ( $C_{12}H_{14}Cl_2N_7$ ) (Sigma, Germany)
- 3.2.6.4 สารละลายไตรตันเอกซ์-100 (Triton X-100)

### 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 กระจกบอทวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
- 3.3.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิดถ่ายภาพได้ (Camera microscope) (Nikon Eclipse Ci-L, Japan)
- 3.3.3 กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)
- 3.3.4 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Vial)
- 3.3.5 เข็มฉีดยาก๊าซ (Gas syringe) (Scientific Glass Engineering, Australia)
- 3.3.6 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Hewlett-Packard, HP5890A GC, Japan)
- 3.3.7 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate with magnetic stirrer) (Vision VS130SH, Korea)
- 3.3.8 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
- 3.3.9 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
- 3.3.10 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.3.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 3.3.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)
- 3.3.13 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.3.14 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.15 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
- 3.3.16 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV- 50, Japan)
- 3.3.17 คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)
- 3.3.18 จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)
- 3.3.19 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.3.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 3.3.21 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

- 3.3.22 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.3.23 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.3.24 ปิเปตทิป (Pipette tip)
- 3.3.25 พาราฟิล์ม (Parafilm) (Bemis company, USA)
- 3.3.26 ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) (Pyrex, USA)
- 3.3.27 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Labnet, USA)
- 3.3.28 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.3.29 หลอดเหวี่ยง (Centrifuge tube)
- 3.3.30 หินป้องกันการเดือด (Pumic stone)
- 3.3.31 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) (Precicolor HBG, Germany)

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

##### 3.4.1.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* บนอาหารแข็ง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยเขี่ยเชื้อสาหร่าย *Scenedesmus* มาลากหรือขีด (Streak) ลงบนอาหารแข็ง TAP (ภาคผนวก ก) จากนั้น นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน

##### 3.4.1.2 วิธีการเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ในอาหารเหลว

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยเขี่ยเชื้อสาหร่ายจากอาหารแข็ง TAP ที่เลี้ยงไว้ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 จำนวน 1 ลูบมากระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน

##### 3.4.1.3 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ในอาหารเหลว

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ตามวิธีในข้อ 3.4.1.2 และเพาะเลี้ยงจนครบ 3 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการนำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้ง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) ของเซลล์แขวนลอยเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ในอาหาร TAP ย้ายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด

250 มิลลิลิตร จากนั้น นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

### 3.4.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 84 จำนวน 3 ข้ำ นำเซลล์แขวนลอยไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ดังแสดงในภาคผนวก ข และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

### 3.4.3 วิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

ศึกษารูปร่าง ลักษณะโคโลนี และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยนำเซลล์สาหร่ายที่อยู่ในรูปของสารแขวนลอยเซลล์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พื้นหลังสว่างชนิดถ่ายภาพได้ (Nikon Eclipse Ci-L, Japan) ที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า ผ่านโปรแกรม NIS-Elementsn

### 3.4.4 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

สกัดคลอโรฟิลล์จากเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในหลอดทดลองด้วย ตัวทำละลายเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรเซลล์แขวนลอยต่อเมทานอลเท่ากับ 1:9 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้น นำหลอดทดลองไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำสารสกัดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามสมการที่ 3.1 (Lee and Shen, 2004)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) =  $(A_{665} \times 4.0) + (A_{650} \times 25.5)$  สมการที่ 3.1

### 3.4.5 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

ในการทดลองนี้ การเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถแบ่งเป็น 2 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1: การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเพื่อผลิตชีวมวล

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะทำตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 โดยจะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

ระยะที่ 2: การผลิตไฮโดรเจน

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แขวนลอยที่มีอายุ 36 ชั่วโมงในระยะที่ 1 โดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย

อาหารที่ทำการทดสอบ จำนวน 2 ครั้ง กระจายเซลล์และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหารทดสอบให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น ฟังก์ชันอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์สำหรับไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในช่วงเวลาที่ 2, 6, 24, 48 และ 72 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatograph) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนแสดงดังตารางที่ 3.1 และวิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจนแสดงในภาคผนวก ค

**ตารางที่ 3.1** สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Taikhao *et al.*, 2013)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Packed column 2m; Molecular sieve 5 <sup>0</sup> A 60/80 mesh
Detector	Thermal conductivity detector (TDC)
Temperature Program	Injector temperature: 100 °C Column temperature: 50 °C Detector temperature: 100 °C
Carrier gas	Argon flow rate 20 ml/min (99.999% purity)

### 3.4.6 วิธีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*

นำสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มาใส่ขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ที่มีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Potassium phosphate buffer) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 12.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายไตรตันเอกซ์-100 (Triton X-100) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เมทิลไวโอเลนไดคลอไรด์ไฮเดรต (Methylviologen dichloride hydrate) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไดไทโอไนต์ (Sodium dithionite) ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ และผ่านการฟุ้งด้วยก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มีดเป็นเวลา 20 นาที และ

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) นำค่าที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสต่อไป

### 3.4.7 การคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

#### 3.4.7.1 วิธีการศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มาศึกษาอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเป็นเวลา 12, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้ง กระจายเซลล์และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหาร TAP ให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้นพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

#### 3.4.7.2 วิธีการศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เตรียมได้จากหัวข้อที่ 3.4.1.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างเซลล์สาหร่ายด้วยอาหาร TAP จำนวน 2 ครั้ง และกระจายลงในอาหาร TAP สูตรปกติ โดยมีการแปรผันความเข้มข้นเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหาร TAP ให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้นพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

#### 3.4.7.3 วิธีการศึกษาสภาวะการขาดธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มาศึกษาสภาวะการขาดธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหารทดสอบ TAP, อาหาร TAP ที่มีการขาดซัลเฟอร์ (TAP-S), อาหาร TAP ที่มีการขาดไนโตรเจน (TAP-

N), อาหาร TAP ที่มีการขาดฟอสฟอรัส (TAP-P) และ อาหาร TAP ที่มีการขาดโพแทสเซียม (TAP-K) จำนวน 2 ครั้ง กระจายเซลล์และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหารทดสอบให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น พนก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ คัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

### 3.4.8 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

#### 3.4.8.1 วิธีการศึกษาสภาวะการขาดธาตุอาหารร่วมที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก มาศึกษาสภาวะการขาดธาตุอาหารร่วมที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหารทดสอบ TAP, TAP-K, อาหาร TAP ที่มีการขาดโพแทสเซียมและซัลเฟอร์ (TAP-KS), อาหาร TAP ที่มีการขาดโพแทสเซียมและไนโตรเจน (TAP-KN), อาหาร TAP ที่มีการขาดโพแทสเซียมและฟอสฟอรัส (TAP-KP), อาหาร TAP ที่มีการขาดโพแทสเซียม ซัลเฟอร์ และไนโตรเจน (TAP-KSN), อาหาร TAP ที่มีการขาดโพแทสเซียม ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส (TAP-KSP) และ อาหาร TAP ที่มีการขาดโพแทสเซียม ฟอสฟอรัส และไนโตรเจน (TAP-KPN) จำนวน 2 ครั้ง กระจายเซลล์และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหารที่ทดสอบให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น พนก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

#### 3.4.8.2 วิธีการศึกษาชนิด ความเข้มข้น และการปรับตัวของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก มาศึกษาสภาวะชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งด้วยอาหาร TAP-K ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดอะซิติก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลซูโครส โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และ โซเดียมอะซิเตท เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนเดิม คือ กรดอะซิติก (TAP) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร นำเซลล์มากระจายในอาหารทดสอบและปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหารทดสอบให้ได้ 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้นพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสายห้อยไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากนั้น คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือก โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนให้มีค่าเท่ากับ 0, 8.7, 17.4, 34.8 และ 174 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เมื่อคัดเลือกความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนได้แล้ว นำความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพการปรับตัว (Adaptation time) ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสายห้อยสีเขียวภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนและไม่มีแหล่งคาร์บอน โดยจะเพิ่มระยะเวลาปรับตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเซลล์เข้าสู่ระยะการผลิตไฮโดรเจน

#### 3.4.8.3 วิธีการศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสายห้อยสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก มาศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สายห้อยให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สายห้อยโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-K จำนวน 2 ครั้ง และกระจายลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารที่ทำการทดสอบ นำพลาสติกไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์สายห้อย ล้างและปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหาร TAP-K ให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสายห้อยไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 0, 10, 30 และ 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

#### 3.4.8.4 วิธีการศึกษาอุณหภูมิของการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสายห้อยสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สายห้อยให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำ

การเก็บเกี่ยวเซลล์สำหรับโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-K จำนวน 2 ครั้ง ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและกระจายลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TAP-K นำพลาสติกบ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์สำหรับอีกครั้ง ล้างและปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหาร TAP-K ให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

#### 3.4.8.5 วิธีการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก มาศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-K จำนวน 2 ครั้ง ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและกระจายลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TAP-K และบ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย ล้างและปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ด้วยอาหาร TAP-K ที่มีพีเอชเท่ากับ 4, 5, 6, 7.0, 7.2, 8, 9 และ 10 (อาหาร TAP ปกติมีพีเอช 7.2) นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น พ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

#### 3.4.8.6 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือก มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยคัดเลือกสภาวะการทดลองที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.8.1-3.4.8.5 มาใช้ โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายให้ได้ชีวมวลตามวิธีในข้อ 3.4.1.3 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-K จำนวน 2 ครั้ง ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและกระจายลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารที่ทำการทดสอบและบ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย ล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP-K จำนวน 2 ครั้ง และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหาร TAP-K ปริมาตรเท่ากับ 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้น ฟันก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสงที่เหมาะสม ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2, 6, 12, 24, 48 และ 72 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ การทดลองนี้จะทำการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายในสภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ

### 3.4.9 วิธีการศึกษาความสามารถในการบำบัดน้ำเสียและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

#### 3.4.9.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

น้ำเสียที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์มาจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร จำนวน 3 โรงงาน คือ โรงงานผลิตอาหารปรุงสำเร็จรูปแช่แข็ง (Nip), โรงงานผลิตนมข้นหวาน (FN), และโรงงานผลิตอาหารแช่แข็งและผงชูรส (Aji) โดยแต่ละโรงงานจะมีน้ำเสีย 2 ชนิด คือ น้ำเสียก่อนบำบัด (Be) และน้ำเสียหลังบำบัด (Af) นำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 3.4.1.2 เมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 3 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการนำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 7.2 จำนวน 2 ครั้ง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) ของเซลล์แขวนลอยเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ในน้ำเสียแต่ละชนิด ย้ายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเสียแต่ละชนิดปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง

#### 3.4.9.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

นำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ตามวิธีในข้อ 3.4.9.1 ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 84 จำนวน 3 ซ้ำ นำเซลล์แขวนลอยไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่า  $OD_{750}$  ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์

### 3.4.9.3 วิธีการศึกษาคคุณภาพน้ำเสียหลังจากผ่านการบำบัดด้วยสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

นำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ตามวิธีในข้อ 3.4.9.1 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น แยกเซลล์แขวนลอยออกจากน้ำเสียโดยการนำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดโดยสาหร่ายไปวิเคราะห์คุณภาพน้ำโดยการวัดค่าดีโอ (Dissolved oxygen, DO) ค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD) ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) ตามวิธีทำที่แสดงในภาคผนวก ง

### 3.4.9.4 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน

นำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ตามวิธีในข้อ 3.4.9.1 โดยแหล่งน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองจะมีการเติมกรดอะซีติกความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร (กรดอะซีติกที่มีความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหาร TAP) จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 84 จำนวน 3 ซ้ำ นำเซลล์แขวนลอยไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่า OD<sub>750</sub> ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์

### 3.4.9.5 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียดั้งเดิมและน้ำเสียที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน

นำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกสุดท้ายเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ตามวิธีในข้อ 3.4.9.1 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำเสียชนิดต่างๆ ทั้งที่มีการเติมและไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน กระจายเซลล์และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยอาหารที่ทดสอบให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในขวดแก้วขนาด 12 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น จากนั้นพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที นำสาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อ

วินาที ทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ  
เปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียและอาหาร  
TAP-K โดยมีอาหาร TAP สูตรปกติเป็นตัวแปรควบคุม

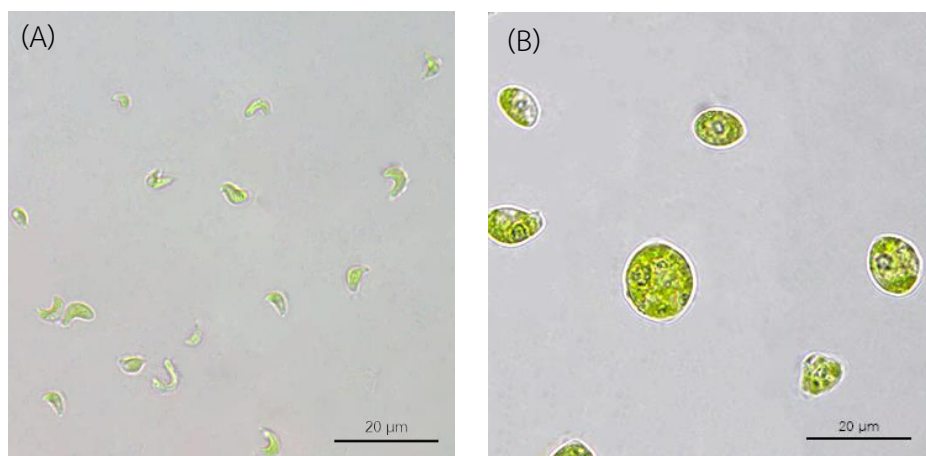
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน

##### 4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 โดยนำเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง TAP เป็นเวลา 3 วัน มาศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างชนิดถ่ายภาพได้ด้วยกำลังขยายภาพ 1,000 เท่า พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว มีความกว้างและความยาวเท่ากับ  $2.58 \pm 0.156$  และ  $9.232 \pm 1.159$  ไมโครเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1A) และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีรูปร่างค่อนข้างกลมรีและมีขนาดใหญ่กว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 โดยมีความกว้างและความยาวเท่ากับ  $6.081 \pm 0.473$  และ  $11.830 \pm 1.681$  ไมโครเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1B)

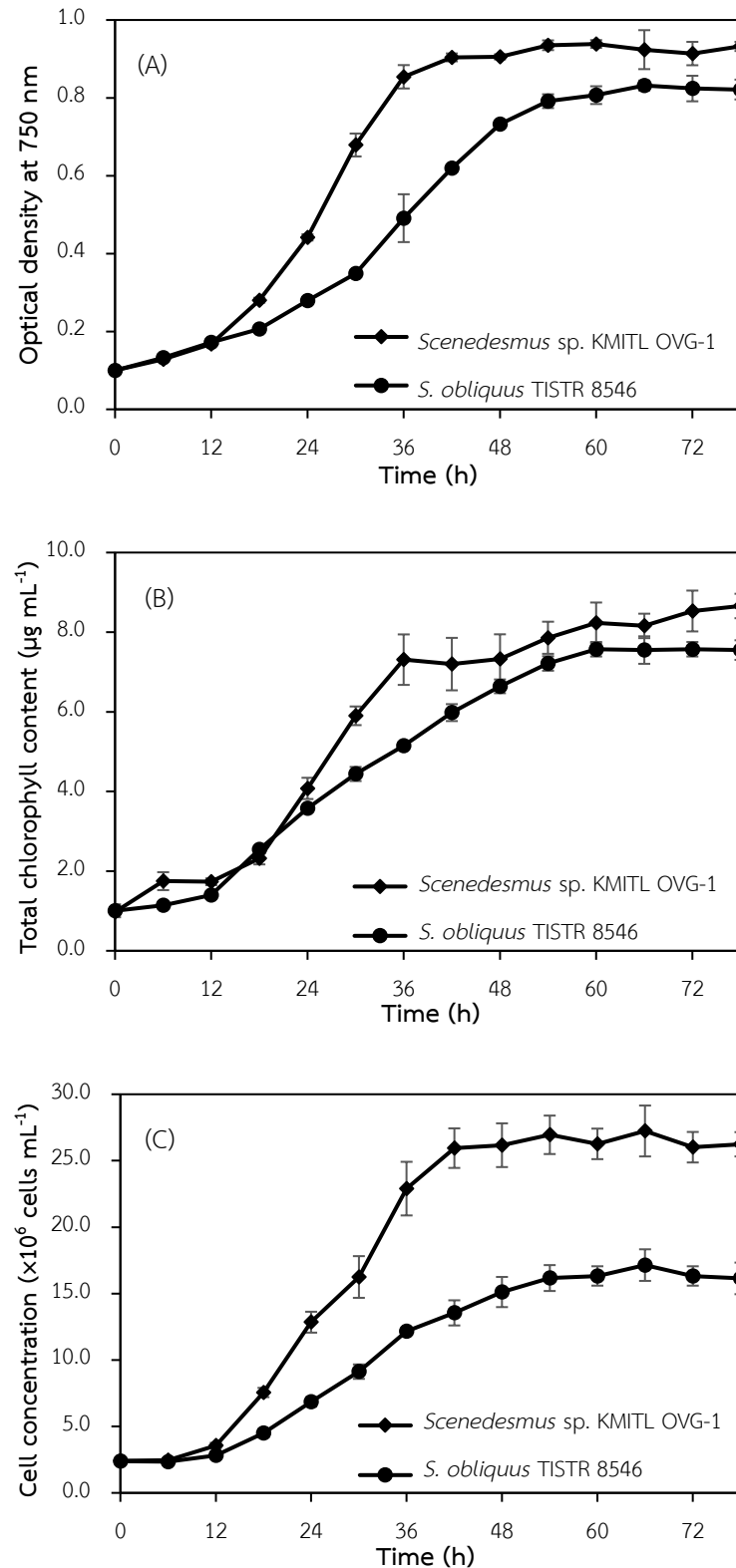


รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 (A) และ *S. obliquus* TISTR 8546 (B)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีรูปร่างลักษณะและขนาดที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า สาหร่ายในจีส *Scenedesmus* นี้มีขนาดและลักษณะรูปร่างที่หลากหลาย ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามสปีชีส์ของสาหร่าย เช่น สาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kutzing มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว และมีขนาดของเซลล์ใกล้เคียงกับสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kutzing มีรูปร่างกลมรี และมีขนาดของเซลล์ใกล้เคียงกับสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 (Akgul *et al.*, 2017)

#### 4.1.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่าย จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร TAP โดยสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 มีการเจริญเติบโตโดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความเข้มข้นของเซลล์จากการนับจำนวนเซลล์ ที่สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.2) สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกัน โดยสามารถแบ่งช่วงการเจริญเติบโตออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ (1) ระยะพัก (Lag phase) อยู่ในช่วง 12-18 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง (2) ระยะเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Logarithmic phase) อยู่ในชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ อยู่ในชั่วโมงที่ 18 ถึงชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (3) ระยะเฉื่อย (Late-logarithmic phase) อยู่ในชั่วโมงที่ 36-48 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และอยู่ในชั่วโมงที่ 48-60 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 และ (4) ระยะคงที่ (Stationary phase) ภายหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และภายหลังจากชั่วโมงที่ 60 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.1A)



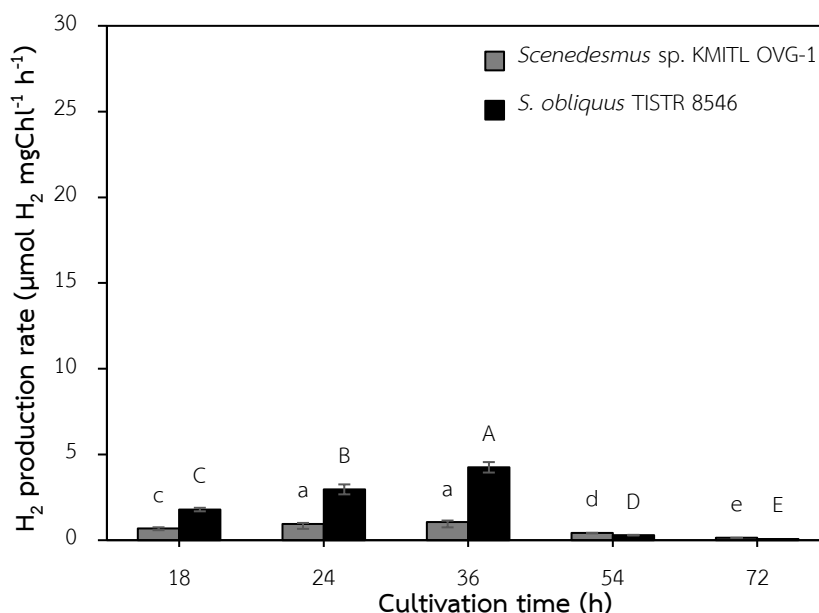
รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) คลอโรฟิลล์ (B) และจำนวนเซลล์ (C) ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* สามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic condition) โดยเซลล์สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศมาเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพลังงานของเซลล์ และสามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรฟิก (Heterotrophic condition) โดยเซลล์สามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนในอาหารมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการทดลองนี้ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด ในอาหาร TAP ซึ่งมีกรดอะซิติกเป็นแหล่งอินทรีย์คาร์บอน ทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จากเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิดพบว่า *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่า *S. obliquus* TISTR 8546 ทั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (รูปที่ 4.2A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.2B) และจำนวนเซลล์ (รูปที่ 4.2C) โดยค่าทั้งหมดมีความสัมพันธ์สอดคล้องกัน สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate,  $\mu_{max}$ ) เท่ากับ  $1.250 \pm 0.028$  ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ  $1.200 \pm 0.015$  ต่อชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด มีกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน รวมถึงเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการหายใจที่แตกต่างกัน มีรายงานพบว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ภายใต้ความเข้มแสง 150 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที มีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ  $0.863 \pm 0.104$  ต่อชั่วโมง (Sforza *et al.*, 2014) ซึ่งต่ำกว่าอัตราการเจริญของสาหร่าย *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 เนื่องจากอาหาร BG11 เป็นอาหารที่ปราศจากแหล่งอินทรีย์คาร์บอน นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะโฟโตออโตโทรฟิก สาหร่ายจำเป็นต้องตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศเพื่อผลิตน้ำตาล จึงทำให้มีอัตราการเจริญที่น้อยกว่า จากการศึกษารูปแบบการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด สามารถแบ่งระยะการเจริญได้เป็น 4 ช่วง ใน 12-18 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำมาก เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวอยู่ในช่วงปรับตัวต่ออาหารและสภาวะแวดล้อมใหม่ ในระหว่างชั่วโมงที่ 12-18 และ 36-48 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว เนื่องจาก สามารถปรับตัวได้แล้วและอาหารมีสารอาหารที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการเจริญเติบโต ทำให้ปริมาณเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้นในรูปแบบกราฟ Exponential นอกจากปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแล้ว ปริมาณคลอโรฟิลล์ก็จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน ในชั่วโมงที่ 36-48 และ 48-60 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ตามลำดับ สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง เนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้น

และธาตุอาหารลดน้อยลง เรียกระยะนี้ว่า ระยะเฉื่อย หรือ Late-logarithmic phase ซึ่งเซลล์สาหร่ายจะมีการปรับตัวโดยการเริ่มทำการสะสมแป้งมากขึ้น (Kim *et al.*, 2005) ภายหลังจากชั่วโมงที่ 36 และ 48 ของการเพาะเลี้ยงในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ตามลำดับ สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิดจะไม่มีอาการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น หรือมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากธาตุอาหารเริ่มขาดแคลน จึงเป็นช่วงที่สาหร่ายเข้าสู่ระยะคงที่ หรือ Stationary phase

#### 4.1.3 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18, 24, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ต่างๆ มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่อายุเซลล์ 36 ชั่วโมง เท่ากับ  $1.52 \pm 0.092$  และ  $4.249 \pm 0.304$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.3)

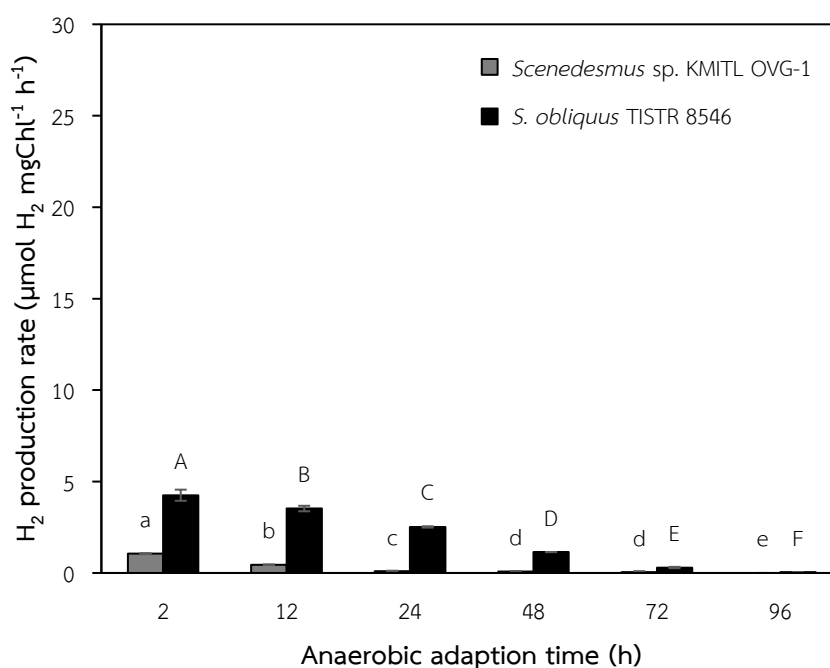


**รูปที่ 4.3** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้อาหาร TAP โดยมีอายุเซลล์ 18, 24, 36, 54 และ 72 ชั่วโมง ที่บ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ ))

จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด ในระยะ Early-logarithmic phase (ชั่วโมงที่ 18), Mid-logarithmic phase (ชั่วโมงที่ 24 และ 36), Late-logarithmic phase (ชั่วโมงที่ 54) และ Stationary phase (ชั่วโมงที่ 72) พบว่า สาหร่าย *Scenedesmus* ที่อยู่ในระยะ Early-logarithmic phase หรือมีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเซลล์สาหร่ายอยู่ในช่วงการปรับตัวในสภาวะแวดล้อมใหม่ พลังงานและสารอาหารจะถูกใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน อิเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือการย่อยสลายแบ่งในวิถีไกลโคไลซิสจึงเหลือไม่มากพอที่จะส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียวที่อยู่ในระยะ Mid-logarithmic phase หรือมีอายุเซลล์ 24 และ 36 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงเนื่องจากสาหร่ายมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์สูงขึ้น การเพิ่มขึ้นของคลอโรฟิลล์เป็นจำนวนมากนั้น ส่งผลให้ระบบแสงสองทำงานได้มากขึ้น อิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะถูกนำไปใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น (Kim *et al.*, 2005) สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ที่อยู่ในระยะ Late-logarithmic phase หรือมีอายุเซลล์ 54 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างเห็นได้ชัด อาจเนื่องมาจาก เซลล์มีกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ที่ลดลง เมื่อสารอาหารที่อยู่ภายในอาหารลดลง เซลล์สาหร่ายจึงเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมลดกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้อิเล็กตรอนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำลดลงและส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ที่อยู่ในระยะ Stationary phase หรือมีอายุเซลล์ 72 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด เนื่องจากสาหร่ายอยู่ในระยะที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนเท่ากับอัตราการตาย สารอาหารที่อยู่ภายในอาหารมีปริมาณลดลงไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต เซลล์สาหร่ายจึงเก็บพลังงานและสารต่างๆ ไว้เพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด ส่งผลให้อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ มีปริมาณไม่มากพอที่จะถ่ายทอดและส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน การทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 ที่ให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในเซลล์ที่อยู่ในระยะ Mid-logarithmic และ Late-logarithmic (Kim *et al.*, 2005) นอกเหนือจากอายุเซลล์ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ยังมีปัจจัยต่างๆ เช่น สายพันธุ์ของสาหร่ายและสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน ดังนั้น ในการทดลองถัดไป จะทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิดนี้ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง ภายใต้การบ่มในสภาวะปราศจากอากาศเป็นระยะเวลาต่างๆ ต่อไป

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็น

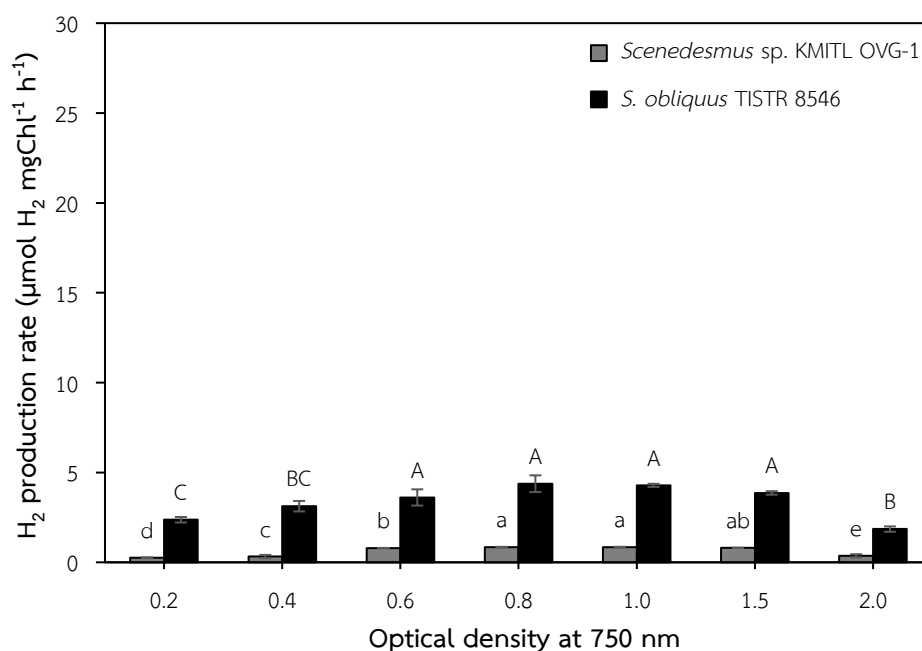
ระยะเวลา 36 ชั่วโมง มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจน โดยบ่มภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากอากาศ เป็นเวลา 2, 12, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 2 เท่ากับ  $1.053 \pm 0.025$  และ  $4.250 \pm 0.305$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า ระยะแรกเริ่มของการบ่มเซลล์สาหร่ายในสภาวะปราศจากออกซิเจน มีอิเล็กตรอนและโปรตอนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุด ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น เมื่อเซลล์ถูกบ่มเป็นระยะเวลานานขึ้น ออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจึงมีปริมาณมากขึ้น ออกซิเจนที่เกิดขึ้นนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Stripp *et al.*, 2009) ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ลดลงตามระยะเวลาในการบ่ม (รูปที่ 4.4) จากผลการทดลองนี้จึงได้นำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง และบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



**รูปที่ 4.4** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้การบ่มในระยะเวลาช่วงการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศในที่ที่มีแสงต่างกัน (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ ))

#### 4.1.4 ผลของความหนาแน่นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง มาทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีความการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 และบ่มเซลล์ภายใต้สภาวะมีแสงและปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ  $0.849 \pm 0.014$  และ  $4.375 \pm 0.465$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.5) โดยสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 ถึงประมาณ 5 เท่า (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีการปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ ))

ความหนาแน่นของเซลล์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว จากผลการทดลอง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีแนวโน้มจะเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้น ( $OD_{750}$  0.2-1.0) เนื่องจากเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้น จะมีผลให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงขึ้นตามไปด้วย โดยคลอโรฟิลล์มีหน้าที่ในการรับพลังงานแสง และส่งพลังงานแสงต่อมายังศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาในระบบแสง ทำให้อิเล็กตรอนถูกกระตุ้นและถูกส่งต่อไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมากขึ้น และเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน (Batyrova *et al.*, 2012) ดังนั้น ความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม หากความหนาแน่นของเซลล์มากเกินไป เช่น สาหร่ายที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง ทั้งในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องจาก เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์เกิดการบดบังกันเอง แสงไม่สามารถส่องเข้าไปถึงเซลล์ที่อยู่ภายในได้ (Kim *et al.*, 2005) ในทางกลับกัน เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นน้อยจนเกินไป จะทำให้สาหร่ายสีเขียวรับพลังงานแสงได้น้อย จึงมีแหล่งอิเล็กตรอนน้อยตามไปด้วย ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจึงลดลง มีรายงานว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตร และจะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ลดลงเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นเพิ่มเป็น 1.40 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในช่วงที่เซลล์มีความหนาแน่นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8-1.0 ดังนั้น จึงเลือกความหนาแน่นเซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนที่สุดมาเพียงช่วงเดียวคือที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 เนื่องจากเป็นความหนาแน่นที่เซลล์ของสาหร่ายสีเขียวทั้งสองชนิดให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด และมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ไม่มากเกินไป

#### 4.1.5 ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-S, TAP-N, TAP-P และ TAP-K โดยมีอาหาร TAP ปกติที่มีธาตุอาหารครบเป็นตัวแปรควบคุม จากนั้น นำเซลล์ไปฟุ้งไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน และบ่มภายใต้สภาวะมีแสงเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจน และกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส พบว่า

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียม (TAP-K) โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $6.921 \pm 0.140$  และ  $10.642 \pm 0.315$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้ ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหารที่ขาดธาตุโพแทสเซียมเช่นเดียวกัน โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่ากับ  $0.091 \pm 0.002$  และ  $0.104 \pm 0.011$  นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อนาที่ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมสูงกว่าเมื่อบ่มในอาหาร TAP สูตรปกติ ประมาณ 3-4 เท่า นอกจากนี้ การขาดธาตุซัลเฟอร์และไนโตรเจนยังส่งผลให้สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.1) ในขณะที่การขาดฟอสฟอรัสจะทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 ลดลง แต่อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *S. obliquus* TISTR 8546 ไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

**ตารางที่ 4.1** อัตราการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 เมื่อบ่มในอาหาร TAP, TAP-S, TAP-N, TAP-P และ TAP-K ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ชนิดของอาหาร	<i>Scenedesmus</i> sp. KMITL OVG-1		<i>S. obliquus</i> TISTR 8546	
	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ( $\mu\text{mol H}_2$ mgChl <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ( $\mu\text{molH}_2$ mgChl <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ( $\mu\text{mol H}_2$ mgChl <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ( $\mu\text{molH}_2$ mgChl <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
TAP	$1.811 \pm 0.263^C$	$0.047 \pm 0.005^C$	$4.203 \pm 0.213^d$	$0.030 \pm 0.006^c$
TAP-S	$2.485 \pm 0.394^B$	$0.051 \pm 0.007^C$	$7.325 \pm 0.345^c$	$0.074 \pm 0.005^b$
TAP-N	$6.906 \pm 0.433^A$	$0.074 \pm 0.002^B$	$8.691 \pm 0.126^b$	$0.092 \pm 0.011^a$
TAP-P	$0.312 \pm 0.133^D$	$0.049 \pm 0.001^C$	$4.333 \pm 0.249^d$	$0.036 \pm 0.003^c$
TAP-K	$6.921 \pm 0.140^A$	$0.091 \pm 0.002^A$	$10.642 \pm 0.315^a$	$0.104 \pm 0.011^a$

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ )

จากการศึกษาผลของการขาดซัลเฟอร์ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Scenedesmus* โดยมีอาหาร TAP สูตรปกติอาหารควบคุม พบว่า สาหร่าย *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด ที่บ่มในอาหาร TAP อัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุด (ตารางที่ 4.1) เนื่องจาก อาหาร TAP สูตรปกติมีสารอาหารต่างๆ ครบถ้วน เซลล์สาหร่ายมีกระบวนการเมแทบอลิซึมไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง การหายใจ และกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต จึงทำให้พลังงานหรืออิเล็กตรอนถูกใช้ในกระบวนการอื่นมากกว่านำไปใช้ผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้เซลล์ยังมีการทำงานของระบบแสงสองตามปกติ ส่งผลให้มีการแตกตัวของน้ำมากขึ้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจนมากขึ้น ซึ่งออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่ในการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด

สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-S มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเมื่อบ่มในอาหาร TAP ปกติ (ตารางที่ 4.1) เนื่องจาก การขาดธาตุซัลเฟอร์จะไปยับยั้งการสังเคราะห์เมไธโอนีน (Methionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน D1 โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมการทำงานของระบบแสงสองที่ถูกทำลาย เมื่อขาดซัลเฟอร์ จึงส่งผลให้การทำงานของระบบแสงสองลดลงเซลล์จึงเข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้เร็วขึ้น ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้น เนื่องจากหากมีออกซิเจนในระบบ ออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยเข้าจับกับบริเวณกระตุ้น (Active site) ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อกันไม่ให้เอนไซม์ไปออกฤทธิ์รบกวนของโปรตอนและอิเล็กตรอนและเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจน (Melis *et al.*, 2000)

จากการทดลองพบว่า การขาดไนโตรเจนในอาหาร ทำให้สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในอาหาร TAP-N สูงและใกล้เคียงกับเมื่อบ่มในอาหาร TAP-K (ตารางที่ 4.1) เนื่องจาก ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักของกรดอะมิโนและโปรตีนภายในเซลล์ และยังเป็นองค์ประกอบสำคัญในหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เมื่อระบบแสงภายในเซลล์ถูกทำลาย จะไม่มีโปรตีนหมุนเวียนที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมระบบแสง ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง ปริมาณออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำจึงลดลงด้วย และออกซิเจนบางส่วนยังถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ เมื่อภายในระบบมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงไม่ถูกยับยั้งทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น ภายใต้สภาวะการขาดธาตุไนโตรเจน จะทำให้พลาสโตควิโนนพูล (PQ-pool) ถูกทำลายจึงทำให้มีการหมุนเวียนกันของอิเล็กตรอนระหว่างควิโนนมากขึ้น ( $Q_A$  และ  $Q_B$ ) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อมายังไซโตโครม  $b_6f$  (Cytochrome  $b_6f$ ) ระบบแสงหนึ่ง

และเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น (Lemeille and Rochaix, 2010) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า เซลล์สาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนจะทำให้เซลล์สาหร่ายมีการสะสมแป้งมากขึ้น เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ แป้งที่เก็บสะสมภายในเซลล์จะสลายเพื่อให้ได้พลังงาน อิเล็กตรอนที่ได้จากการย่อยสลายแป้งจะถูกนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Peltier and Schmidt, 1991)

ในการขาดฟอสฟอรัส สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่พบเมื่อบ่มในอาหาร TAP (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากการขาดธาตุฟอสฟอรัสจะไปลดการเกิดปฏิกิริยาในวิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) ซึ่งนำไปสู่การลดลงของปริมาณของสารประกอบพลังงานสูงในรูปของ NADPH ที่เป็นผลพลอยได้จากวิถีเพนโตสฟอสเฟต เมื่อไม่มีสารตัวกลางที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดพลังงาน จึงส่งผลต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนภายในระบบแสงสอง (Brooks, 1985) ถึงแม้ว่าการขาดธาตุฟอสฟอรัสจะทำให้ปริมาณออกซิเจนในระบบลดลง (Herzig and Falkowski, 1989) แต่การขาดธาตุฟอสฟอรัสทำให้ไม่มีอิเล็กตรอนมากพอที่จะนำไปใช้ผลิตไฮโดรเจนจึงทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงหรือเท่าเดิม

จากการทดลองพบว่า การบ่มสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด ในอาหาร TAP-K ส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากการขาดธาตุโพแทสเซียมทำให้ความสามารถของการสังเคราะห์โปรตีน D1 ที่มีหน้าที่ซ่อมแซมการทำงานของระบบแสงสองลดลง ปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำจึงลดลงตามไปด้วย อีกทั้งออกซิเจนจะถูกใช้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ ทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ การขาดธาตุโพแทสเซียมจะส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ไพรูเวทไคเนส (Pyruvate kinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตทำให้เซลล์สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโต เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นแป้งได้ เมื่อมีน้ำตาลมากเกินไปและไม่ถูกใช้ในการเจริญเติบโต น้ำตาลจึงถูกนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนแทน ส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Papazi *et al.*, 2014) จากการทดลองสรุปได้ว่า การขาดธาตุโพแทสเซียมมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 และ *S. obliquus* TISTR 8546 ได้สูงที่สุด โดยสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น จึงคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

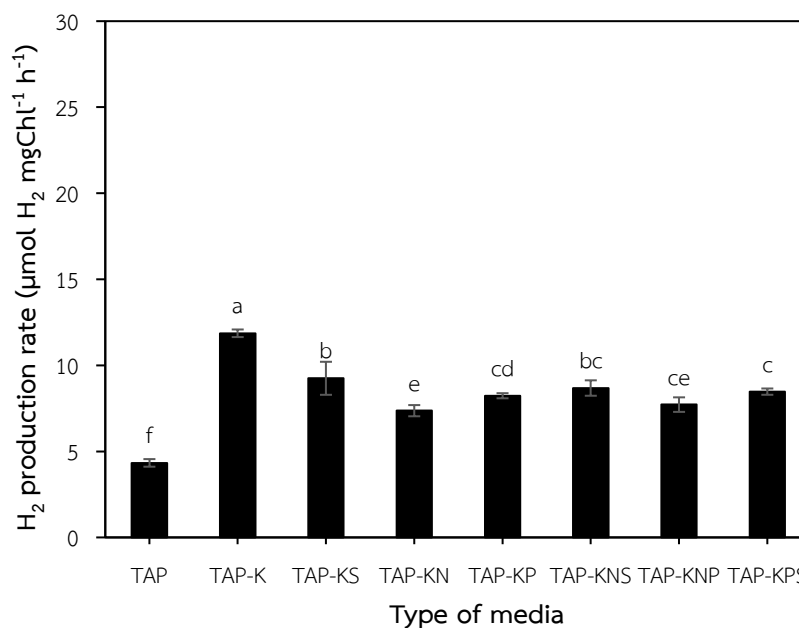
นอกจากการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนแล้ว ในการทดลองนี้ยังวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสอีกด้วย กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถบอกถึงประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ จากการทดลองพบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนแปรผันตามกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (ตารางที่ 4.1)

## 4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

การทดลองนี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร โดยศึกษา สภาวะการขาดธาตุอาหารร่วม ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ความเข้มแสง อุณหภูมิของการบ่ม และพีเอชของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจน

### 4.2.1 ผลของการขาดธาตุอาหารร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K, TAP-KS, TAP-KN, TAP-KP, TAP-KNS, TAP-KNP และ TAP-KNS โดยมีอาหาร TAP สูตรปกติเป็นอาหารควบคุม จากนั้น นำเซลล์ไปปั่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน และบ่มภายใต้สภาวะมีแสงเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมเพียงตัวเดียว (TAP-K) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $11.073 \pm 0.310$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิลิตรกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.6) รองลงมาคือ สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP ที่ขาดโพแทสเซียมร่วมกับซัลเฟอร์ (TAP-KS) โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $9.247 \pm 0.959$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิลิตรกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่า การขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมร่วมกับการขาดธาตุอาหารอื่น ไม่ส่งเสริมการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ตัวนี้อาจเนื่องมาจาก การขาดธาตุอาหารหลายชนิดส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์หลายกระบวนการในเวลาเดียวกัน ทำให้เซลล์ต้องปรับตัวเป็นอย่างมากและอาจมีผลกระทบที่แตกต่างจากการขาดธาตุอาหารเพียงชนิดเดียว ด้วยเหตุนี้ในการทดลองต่อไป จึงเลือกอาหาร TAP-K ไปทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546



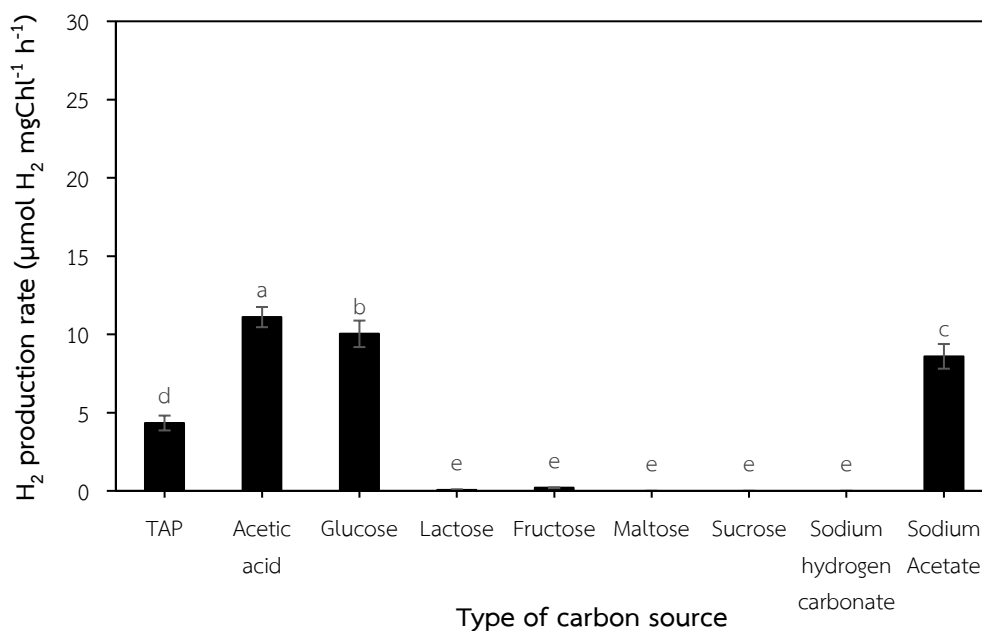
**รูปที่ 4.6** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP, TAP-K, TAP-KS, TAP-KN, TAP-KP, TAP-KNS, TAP-KNP และ TAP-KNS ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงค่าทางสถิติที่ไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ ))

#### 4.2.2 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

##### 4.2.2.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลซูโครส โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และโซเดียมอะซิเตท ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอะซิติกในอาหาร TAP สูตรปกติ คือ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร โดยมีอาหาร TAP สูตรปกติที่มีธาตุอาหารครบเป็นตัวแปรควบคุม จากนั้น นำเซลล์ไปพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ และบ่มภายใต้สภาวะมีแสงเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีการดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ  $11.103 \pm 0.645$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมีอัตราการ

ผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีโซเดียมอะซิเตทและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญ ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $8.593 \pm 0.788$  และ  $10.033 \pm 0.846$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) ในขณะที่สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีน้ำตาลแลคโทส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลซูโครส และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำมาก (รูปที่ 4.7)



**รูปที่ 4.7** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนคือ กรดอะซิติก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลซูโครส โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต และโซเดียมอะซิเตท ภายหลังจากบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน แสดงค่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ))

จากการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 พบว่า เซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เนื่องจากกรดอะซิติกเป็นอินทรีย์คาร์บอนที่มีขนาดเล็ก สามารถดูดซึมได้ง่าย เมื่อเข้าสู่เซลล์กรดอะซิติกจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิลโคเอ (Acetyl CoA) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ได้ผลิตภัณฑ์คือ NADH และ FADH<sub>2</sub> (Johnson และ Alric, 2012) ซึ่งสามารถให้โปรตอนและอิเล็กตรอนกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจน มีความเป็นไปได้ว่าเมื่อนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีกรดอะซิติกร่วมกับการขาดธาตุอาหารโพแทสเซียมจะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เนื่องจากเกิดการส่งเสริมร่วมกันทำให้เกิด

การลดลงของปริมาณออกซิเจนในระบบ จากการสูญเสียการทำงานของโปรตีน D1 ในระบบแสงสอง ทำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะปราศจากออกซิเจนได้เร็วขึ้น รวมถึงเกิดการเพิ่มการสลายแป้ง ทำให้มีอิเล็กตรอนมากขึ้นและเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย (Papazi *et al.*, 2014) มีรายงานพบว่า เมื่อใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สาหร่ายจะมีการปริมาณออกซิเจนลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Heifetz *et al.*, 2000)

จากการทดลอง สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีโซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำกว่าเมื่อใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.7) โดยทฤษฎี โซเดียมอะซิเตทก็คือเกลือของกรดอะซีติกนั่นเอง ซึ่งมีสูตรทางเคมีคือ  $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$  เมื่อเกิดการแตกตัวจะได้อะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) และโซเดียมไอออน ( $\text{Na}^+$ ) ในขณะที่กรดอะซีติกมีสูตรทางเคมีคือ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  เมื่อเกิดการแตกตัวจะได้อะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) และโปรตอน ( $\text{H}^+$ ) ซึ่งโปรตอนเป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งของการผลิตไฮโดรเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้สาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหารที่มีโซเดียมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำกว่า

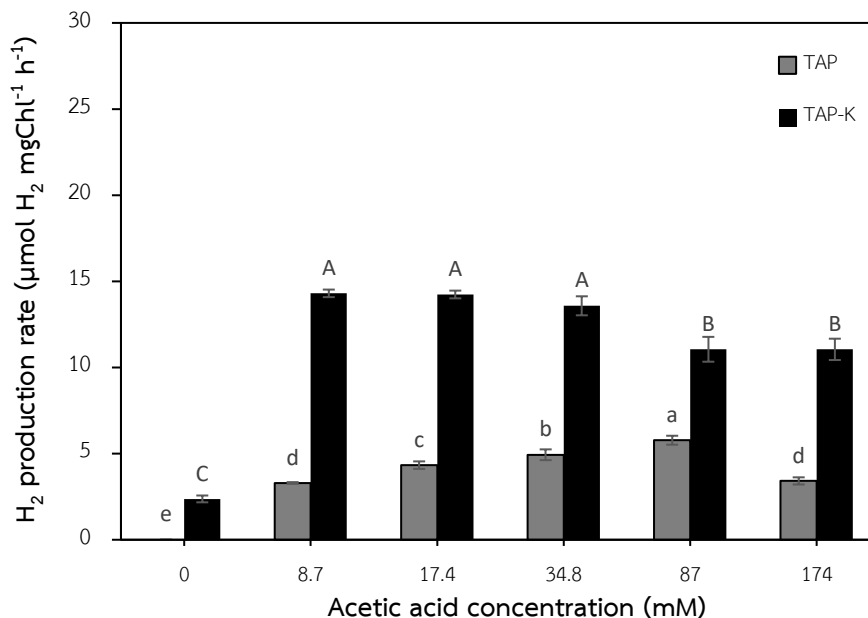
จากการบ่มสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP-K ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนมีเพียงน้ำตาลกลูโคสตัวเดียวที่ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงรองจากการใช้กรดอะซีติก (รูปที่ 4.7) อาจเนื่องมาจาก กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถดูดซึมและย่อยได้ง่าย และยังเป็นสารตั้งต้นของวิถีไกลโคลิซิสซึ่งจะทำการเปลี่ยนเป็นไพรูเวทและอะซีติลโคเอ นอกจากนี้ ยังผลิต ATP และ NADH ทำให้เซลล์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจนได้อีกด้วย ในขณะที่น้ำตาลชนิดอื่น แทบจะไม่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 อาจเนื่องมาจาก การสลายน้ำตาลชนิดต่างๆ เหล่านี้ทำได้ยากกว่าหรืออาจใช้ระยะเวลาจนถึงจะส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการบ่มสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP-K ที่มีโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *S. obliquus* TISTR 8546 ไม่สามารถเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรเจนได้ (รูปที่ 4.7) โดยปกติแหล่งคาร์บอนจะแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลักๆ คือ อินทรีย์คาร์บอนและอนินทรีย์คาร์บอน ในการทดลองนี้ แหล่งอินทรีย์คาร์บอนคือ กรดอะซีติก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโทส น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลมอลโทส น้ำตาลซูโครส และโซเดียมอะซิเตท ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแหล่งอินทรีย์คาร์บอนบางชนิดมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ส่วนแหล่งอนินทรีย์คาร์บอนมีเพียง 1 ชนิดคือ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ซึ่งผลการทดลองพบว่า หากขาดโซเดียมอะซิเตทสาหร่ายจะไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนได้ดีและเร็วกว่าอนินทรีย์คาร์บอน เนื่องจาก โดยปกติสาหร่ายชนิดนี้ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองนี้พบว่าอาหาร TAP-K ที่มีกรดอะซีติกส่งเสริมการผลิต

ไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ได้ดีที่สุดจึงทำการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกต่อไป

#### 4.2.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K และ TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ดังนี้ 0, 8.7, 17.4, 34.8, 87, 174 มิลลิโมลลาร์ จากนั้น นำเซลล์ไปฟุ้งไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน และบ่มภายใต้สภาวะมีแสงเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 8.7, 17.4 และ 34.7 มิลลิโมลลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ  $14.303 \pm 0.220$ ,  $14.237 \pm 0.225$ ,  $13.580 \pm 0.552$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) และเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ  $5.777 \pm 0.260$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.8)



**รูปที่ 4.8** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ที่ความเข้มข้น 0, 8.7, 17.4, 34.8, 87 และ 174 มิลลิโมลลาร์ ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน แสดงค่าทางสถิติที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ))

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกในอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 พบว่า ในอาหาร TAP-K ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 8.7, 17.4 และ 34.8 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (รูปที่ 4.8) การผลิตไฮโดรเจนในปริมาณมากของสาหร่ายเนื่องมาจาก เมื่อมีการเติมกรดอะซิติกในอาหาร กรดอะซิติกจะแตกตัวได้เป็นอะซิเตทและโปรตอนจำนวนมาก อะซิเตทจะถูกดูดซึมไปใช้เป็นพลังงานภายในเซลล์ ส่วนโปรตอนจะถูกใช้ป้อนสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ กรดอะซิติกยังมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว เป็นผลให้มีการใช้ออกซิเจนไปในกระบวนการหายใจ (Chen and Johns, 1994) เมื่อระดับของออกซิเจนลดลง อัตราการผลิตไฮโดรเจนจึงสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่มากเกินไป (87 และ 174 มิลลิโมลาร์) ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ลดลง ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น จะทำให้ได้โปรตอนเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้พีเอชในอาหารเป็นกรดมากขึ้น การที่พีเอชลดลงมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง มีรายงานพบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-125 มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในอาหารที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้น 3.7, 7.4 และ 14.7 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับอัตราการเจริญในอาหารที่ไม่มีกรดอะซิติก แต่อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกมากเกินไป (29.4 มิลลิโมลาร์) (Heifetz *et al.*, 2000) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกน้อยมาก จะทำให้เซลล์มีพลังงานและสารตั้งต้นไม่เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เหมาะสมในอาหารมีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เป็นอย่างมาก

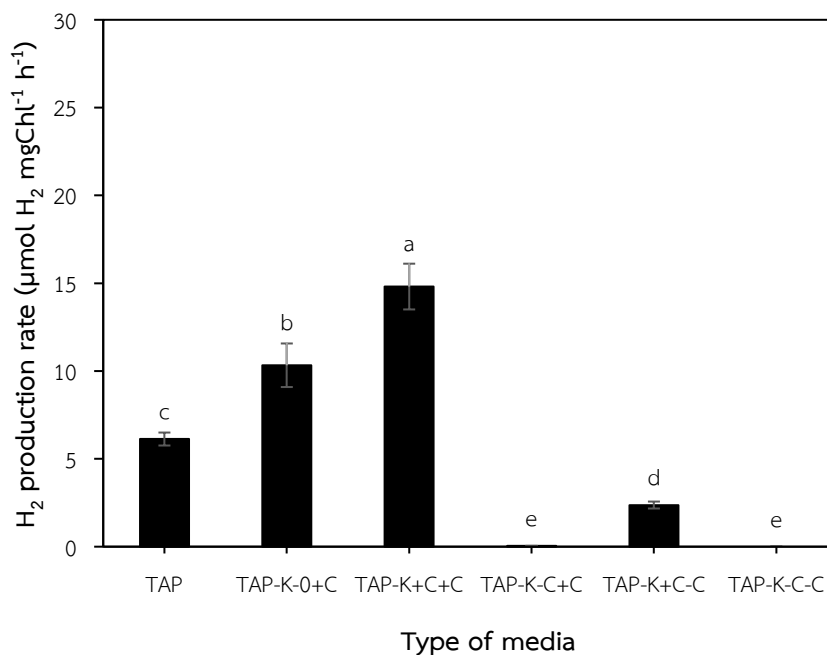
เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP สูตรปกติที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกรดอะซิติก พบว่าสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP สูตรปกติที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 87 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ซึ่งแตกต่างจากการบ่มสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP-K ที่ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ต่ำกว่า อาจเนื่องมาจาก การบ่มสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP สูตรปกติซึ่งมีสารอาหารที่ครบถ้วน เซลล์มีความสามารถในการต้านทานสภาวะแวดล้อมที่มีโปรตอนเพิ่มขึ้นจากการแตกตัวของกรดอะซิติกได้มากกว่า ดังนั้นสาหร่ายสีเขียวที่มีการบ่มในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซิติกในอาหาร TAP สูตรปกติ จึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในความเข้มข้นกรดอะซิติกที่สูง อย่างไรก็ตาม อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกถึง 174 มิลลิโมลาร์ ถึงแม้ว่าเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดแต่ต้องใช้ความเข้มข้นกรดอะซิติกสูงถึง 87

มิลลิโมลาร์ แต่อัตราการผลิตนี้ยังน้อยกว่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีความเข้มข้นกรดอะซีติกเพียง 8.7, 17.4 และ 34.8 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.8)

จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของกรดอะซีติกมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยขึ้นกับชนิดของอาหารด้วย ในการทดลองนี้ ได้เลือกอาหาร TAP-K เนื่องจากให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่สูงกว่าเมื่อบ่มในอาหาร TAP ความเข้มข้นของอะซีติกที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไปคือ 17.4 มิลลิโมลาร์ เนื่องจาก เป็นความเข้มข้นที่ไม่สูงและต่ำจนเกินไปและเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในอาหาร TAP สูตรปกติเหมาะแก่เมแทบอลิซึมของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 และให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

#### 4.2.2.3 ผลของกรดอะซีติกในอาหารในระยะการปรับตัวและระยะผลิตไฮโดรเจน

การทดลองนี้จะทำการศึกษาผลของกรดอะซีติกต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะการเจริญเติบโต ซึ่งจะมีการให้กรดอะซีติก 17.4 มิลลิโมลาร์ ระยะปรับตัว จะทำการให้และไม่ให้กรดอะซีติก โดยระยะนี้จะทำในพลาสติกภายใต้สภาวะมีแสง และระยะการผลิตไฮโดรเจนซึ่งจะทำการให้และไม่ให้กรดอะซีติกโดยจะทำใน glass vial ภายใต้สภาวะมีแสงและปราศจากอากาศ โดยเริ่มจากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีการเติมกรดอะซีติก (TAP-K+C) และไม่ได้เติมกรดอะซีติก (TAP-K-C) ความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 17.4 มิลลิโมลาร์ ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ที่มีการเติมกรดอะซีติก (+C) และไม่ได้เติมกรดอะซีติก (+C) โดยมีอาหาร TAP สูตรปกติที่มีธาตุอาหารครบเป็นตัวแปรควบคุม จากนั้น นำเซลล์ไปปั่นไล่อากาศด้วยก้ำซออาร์กอน และบ่มภายใต้สภาวะมีแสงเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า การบ่มสาหร่ายสีเขียวที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีการเติมกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในระยะการปรับตัวและระยะการผลิตไฮโดรเจน (TAP-K+C+C) ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ  $14.810 \pm 1.303$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่ไม่ผ่านการบ่มในพลาสติก (TAP-K+C) หรือไม่ได้บ่มในระยะการปรับตัว โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $10.330 \pm 1.240$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งลดลงจากเดิมถึง 43.368 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.9) ส่วนการบ่มสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะอื่นๆ สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.9)



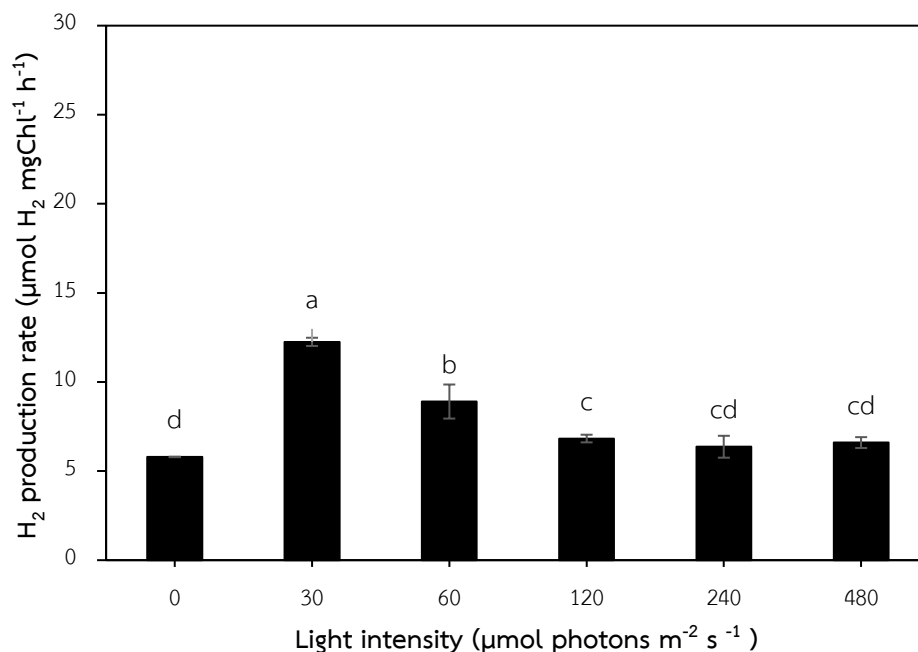
**รูปที่ 4.9** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหารที่มีหรือไม่มีกรดอะซีติก (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน แสดงค่าทางสถิติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p>0.05$ ))

ในการบ่มเซลล์สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K ที่มีหรือไม่มีกรดอะซีติกในช่วงระยะการปรับตัว หรือในขั้นตอนผลิตไฮโดรเจน พบว่าการมีกรดอะซีติกในอาหารสำหรับปรับสภาพและสำหรับผลิตไฮโดรเจนเป็นเรื่องสำคัญ ในช่วงที่มีการปรับตัวของเซลล์ เซลล์จะนำแหล่งคาร์บอนนี้ไปเก็บสะสมไว้ในรูปของแป้ง และเมื่อเซลล์เข้าสู่สภาวะการผลิตไฮโดรเจนแป้งที่เก็บสะสมจะถูกสลายได้แหล่งอิเล็กตรอนจำนวนมาก และสามารถนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

#### 4.2.3 ผลการศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ปริมาตร 100 มิลลิลิตรทำการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ด้วยสารแขวนลอยเซลล์ลงใน Glass vial จากนั้น นำเซลล์ไปพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน และบ่มภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ ดังนี้ 0, 30, 60, 120, 240, 480 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็น

ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า ที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $12.253 \pm 0.955$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.10) ส่วนสาหร่ายที่บ่มในที่มืดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนน้อยที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $5.793 \pm 0.231$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.10)



**รูปที่ 4.10** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K ที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 0, 30, 60, 120, 240 และ 480 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที บ่มและสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน แสดงค่าทางสถิติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p > 0.05$ ))

จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ พบว่าสาหร่ายที่บ่มในที่มืดมีอัตราการการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำสุด เนื่องจาก โดยปกติสาหร่ายสีเขียวผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน พลังงานแสงทำให้อิเล็กตรอนบริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงถูกกระตุ้น เปลี่ยนเป็นอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงขึ้น อิเล็กตรอนจึงหลุดออกจากโมเลกุลของคลอโรฟิลล์และเกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังโมเลกุลต่างๆ ตามลำดับ จนกระทั่ง ส่งมาถึงตัวอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์ริดอกซิน จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนขึ้น ในสภาวะมืด เมื่อไม่มีพลังงานแสงไปกระตุ้นอิเล็กตรอนบริเวณศูนย์กลางการ

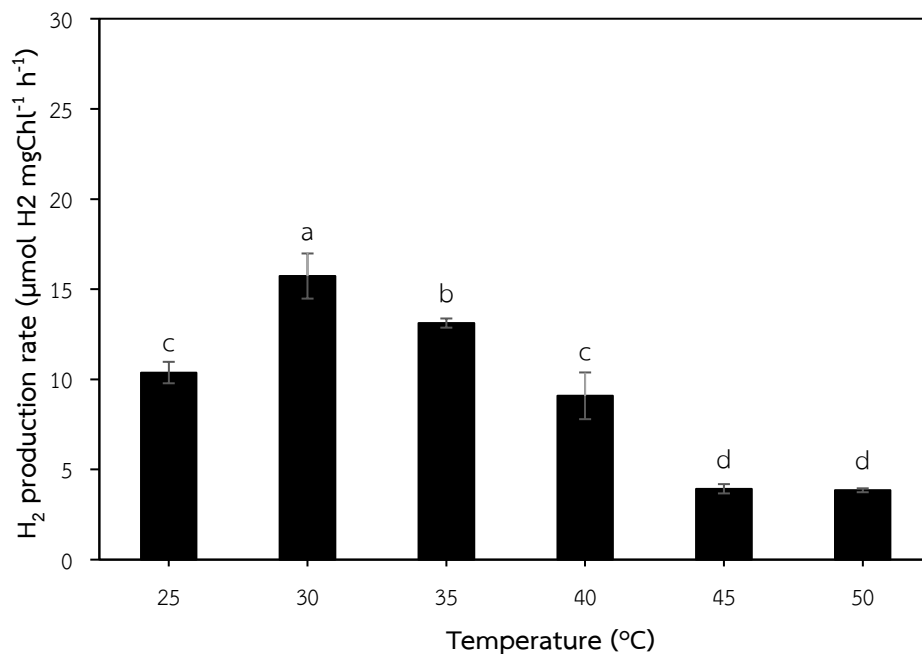
เกิดปฏิกิริยาของระบบแสง จึงส่งผลให้ไม่มีอิเล็กตรอนสำหรับผลิตไฮโดรเจน ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีค่าต่ำที่สุด (รูปที่ 4.10)

เมื่อเพิ่มความเข้มแสงสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น โดยมีอัตราการผลิตสูงสุดเมื่อบ่มภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (รูปที่ 4.10) เนื่องจากเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น ทำให้มีพลังงานแสงไปกระตุ้นอิเล็กตรอนบริเวณศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงหนึ่งได้มากขึ้น ส่งผลให้มีการส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจนมากขึ้นในทางกลับกัน ภายใต้สภาวะความเข้มแสงที่มากเกินไป (สูงกว่า 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวเกิดกระบวนการยับยั้งด้วยแสง (Photoinhibition) ส่งผลให้โปรตีนในระบบแสงสองและระบบแสงหนึ่งถูกทำลาย (Styring *et al.*, 1990) การผลิตไฮโดรเจนจึงลดต่ำลง มีรายงานว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* UTEX 90 มีค่าการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด 225 มิลลิลิตรต่อลิตรอาหารเพาะเลี้ยง ที่ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และค่าการผลิตไฮโดรเจนสะสมจะลดลงเท่ากับ 185 มิลลิลิตรต่อลิตรอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อบ่มภายใต้ความเข้มแสง 300 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (Kim *et al.*, 2006) แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะส่งผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที จึงเลือกความเข้มแสงนี้ไปใช้ในการทดลองถัดไป

#### 4.2.4 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ปริมาณ 100 มิลลิลิตรทำการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ที่แปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส จากนั้น นำเซลล์ไปพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน และบ่มภายใต้สภาวะมีแสงเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $15.728 \pm 1.251$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.11) นอกจากนี้ สาหร่ายที่บ่มภายใต้อุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศา

เซลเซียส จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.11)



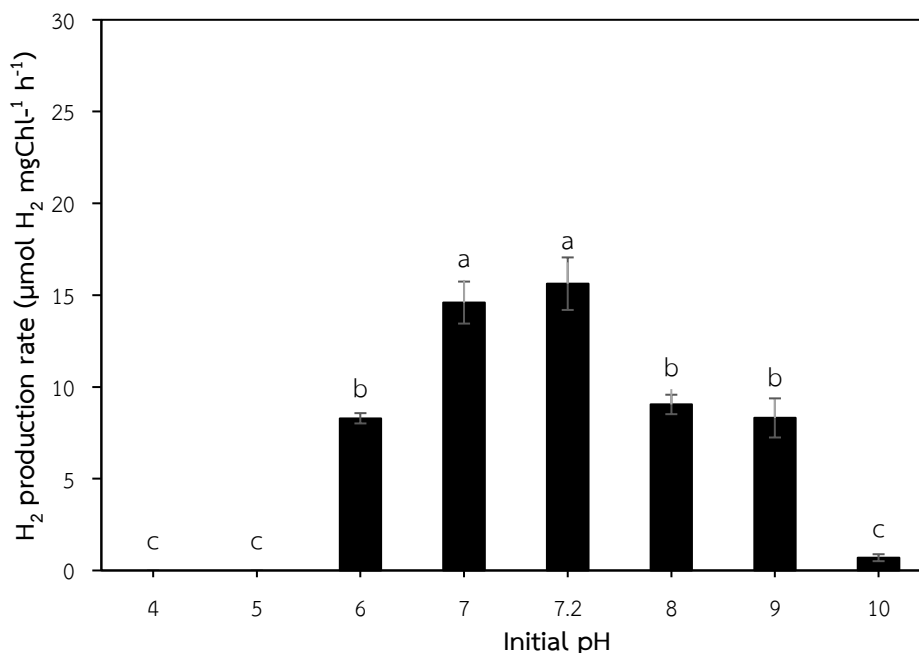
**รูปที่ 4.11** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K ที่อุณหภูมิของการบ่มที่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน แสดงค่าทางสถิติที่ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ ))

จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนพบว่า ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ไม่สูงมากนัก เนื่องจาก เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนในระดับที่ไม่สูงนัก (Wang and Wan, 2008) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการบ่มเป็น 30 องศาเซลเซียส สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 จะให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด (รูปที่ 4.11) เนื่องจาก การเพิ่มอุณหภูมิการบ่มจะเป็นการเร่งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ รวมถึงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้กระบวนการผลิตไฮโดรเจนเกิดได้มากขึ้น และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยังเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย มีรายงานว่า สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. LX1 สามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 22-28 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 6,000 ลักซ์ (Su et al., 2011) การเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มช่วยเร่งอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้เพียงช่วงอุณหภูมิหนึ่งเท่านั้น หากบ่มในอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ

สาหร่ายลดลง เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเสียสภาพด้วยความร้อนหรืออุณหภูมิที่สูง อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายสีเขียวและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ต่างๆ *C. reinhardtii* strain 137 C+ มีรายงานพบว่าอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่มีกิจกรรมการทำงานสูงสุด (Happe and Naber, 1993) ในขณะที่สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดมีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงทำการคัดเลือกอุณหภูมิของการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสไปใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป

#### 4.2.5 ผลการศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในอาหาร TAP-K ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.2, 8.0, 9.0 และ 10.0 โดยมีอาหาร TAP-K ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 เป็นอาหารควบคุม จากนั้น นำเซลล์ไปปั่นใส่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน และบ่มภายใต้สภาวะมีแสงความเข้ม 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $15.624 \pm 1.431$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร TAP-K ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 สาหร่ายที่บ่มในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6, 8 และ 9 จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อบ่มในอาหาร TAP-K ที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็นกรดและเป็นด่างมาก (พีเอช 4-5 และ 10) สาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำสุด (รูปที่ 4.12)



**รูปที่ 4.12** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ 4, 5, 6, 7, 7.2, 8, 9 และ 10 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงค่าทางสถิติไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ ))

จากการวิเคราะห์อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร TAP-K เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 7.2 (รูปที่ 4.12) ภายหลังจากบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่พีเอชของอาหารจะเพิ่มขึ้นเป็น 7.42 (ตารางที่ 4.2) พีเอชที่เพิ่มขึ้นระหว่างการบ่มสาหร่ายสีเขียวนั้นอาจเนื่องมาจากการที่ กรดอะซิติกที่ละลายในอาหารเกิดการแตกตัวได้อะซิเตท ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) และโปรตอน ( $\text{H}^+$ ) เมื่อสาหร่ายสีเขียวใช้โปรตอนเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน จึงส่งผลให้โปรตอนภายในอาหารลดลง อาหารจึงมีความเป็นเบสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อพีเอชของอาหารเริ่มต้นมีค่าระหว่าง 6.5-7.0 (Antal *et al*, 2016)

ตารางที่ 4.2 ค่าพีเอชเริ่มต้นและค่าพีเอชหลังจาก 72 ชั่วโมง ของการบ่มเซลล์ในอาหารที่ควบคุม บัฟเฟอร์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

พีเอช	พีเอชเริ่มต้น	พีเอชชั่วโมง 72
4.0	4.02 ± 0.02	4.36 ± 0.32
5.0	5.03 ± 0.03	6.37 ± 0.23
6.0	6.04 ± 0.03	7.32 ± 0.25
7.0	7.04 ± 0.05	7.33 ± 0.36
7.2	7.21 ± 0.01	7.42 ± 0.64
8.0	7.99 ± 0.02	7.69 ± 0.18
9.0	8.98 ± 0.03	8.07 ± 0.21
10.0	9.98 ± 0.06	8.48 ± 0.33

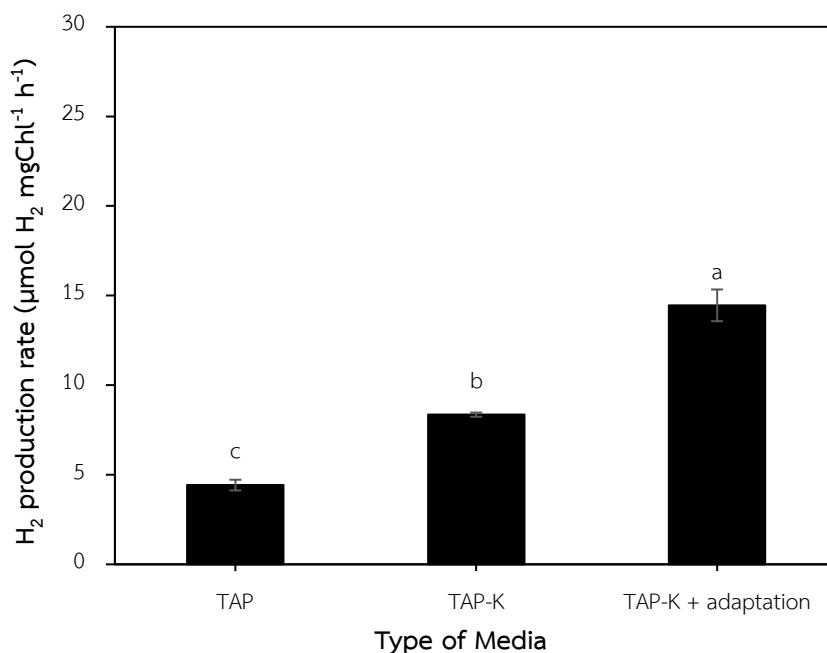
จากการทดลองพบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 โดยพบว่าสาหร่ายมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อบ่มในอาหารที่มีพีเอชเป็น 8 และแทบจะไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ซึ่งเป็นผลมาจากการลดลงของประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีหน้าที่ในการเปลี่ยนโปรตอนและอิเล็กตรอนให้เป็นโมเลกุลไฮโดรเจน (Antal *et al.*, 2016) นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นเมื่อบ่มในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 เนื่องจาก ในสภาวะความเป็นกรด โปรตีนรวมถึงเอนไซม์ภายในเซลล์สาหร่ายจะสูญเสียสภาพ และไม่เหมาะสมต่อการทำงาน นอกจากนี้ ความเป็นกรดยังมีผลกระทบต่อรงควัตถุและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงโดยสังเกตได้จากสีของสาหร่ายที่เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง มีรายงานว่า การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว *Euglena gracilis* จะหยุดลงเมื่อบ่มในอาหารที่มีพีเอชต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 8 (Danilov and Ekelund, 2001) ในขณะที่สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 6.5 (ตารางที่ 4.2) (Maneeruttanarungroj and Phunpruch, 2017) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน อย่างไรก็ตามพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของสาหร่าย

#### 4.2.6 ผลการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในสภาวะต่างๆ

จากการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยทำการแปรผันชนิดของอาหารและสภาวะการบ่มที่เหมาะสมดังนี้ (1) อาหาร TAP (2) อาหาร TAP-K (3) อาหาร TAP-K ที่มีการปรับตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น บ่มเซลล์ในอาหารและสภาวะที่แตกต่างกันสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $14.455 \pm 0.885$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-K ซึ่งมีการปรับตัวใน TAP-K มาก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าในอาหาร TAP และ TAP-K ที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ  $4.422 \pm 0.298$  และ  $8.354 \pm 0.116$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.13) อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของเซลล์สาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP-K ที่มีการปรับตัวมากกว่าอัตราการผลิตในอาหาร TAP และ TAP-K 3.27 และ 1.73 เท่า ตามลำดับ

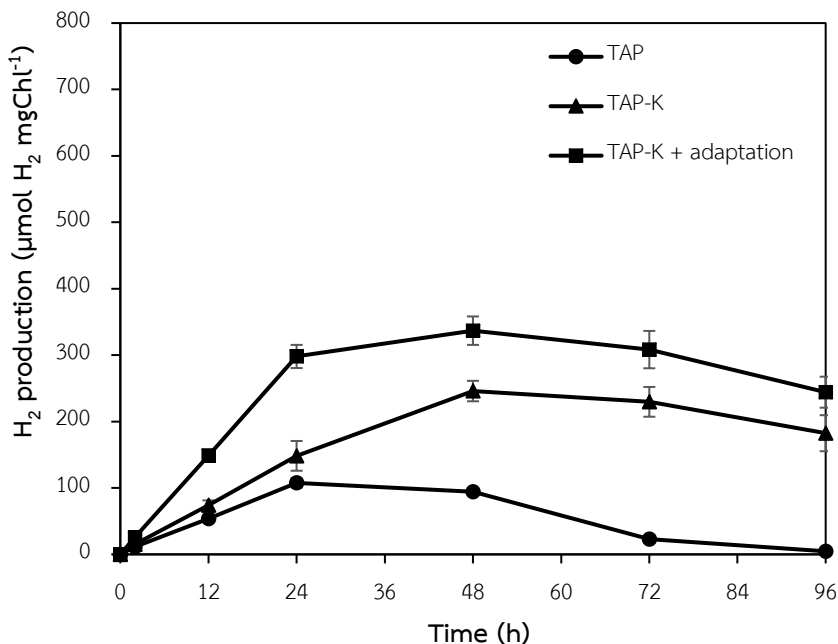
**ตารางที่ 4.3** ชนิดของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาสภาวะการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

สภาวะ	ชนิดของอาหารและสภาวะที่ใช้		
	TAP	TAP-K	TAP-K + adaptation
อายุเซลล์ (h)	36	36	36
การขาดธาตุอาหาร	-	K	K
ชนิดของแหล่งคาร์บอน	กรดอะซีติก	กรดอะซีติก	กรดอะซีติก
ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (mM)	17.4	17.4	17.4
การปรับตัวในฟลาสก์ (h)	-	-	24



**รูปที่ 4.13** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP, TAP-K และ TAP-K ที่มีการปรับตัวในพลาสติก 24 ชั่วโมง (TAP-K + adaptation) (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงค่าทางสถิติที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p > 0.05$ ))

จากการวัดไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในสภาวะดังที่กล่าวมา (ตารางที่ 4.3) ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP-K และมีระยะเวลาในการปรับตัว 24 ชั่วโมง จะมีผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงใน 24 ชั่วโมงแรกของการบ่มและให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $336.859 \pm 21.416$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในชั่วโมงที่ 48 โดยให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียวที่บ่มใน TAP และ TAP-K ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $94.424 \pm 5.166$  และ  $245.931 \pm 15.417$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) ภายหลังจาก 48 ชั่วโมง การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายจะลดลงในทุกสภาวะ



**รูปที่ 4.14** ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP, TAP-K และ TAP-K ที่มีการปรับตัวในพลาสติก 24 ชั่วโมง (TAP-K + adaptation) (ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน แสดงค่าทางสถิติที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p>0.05$ ))

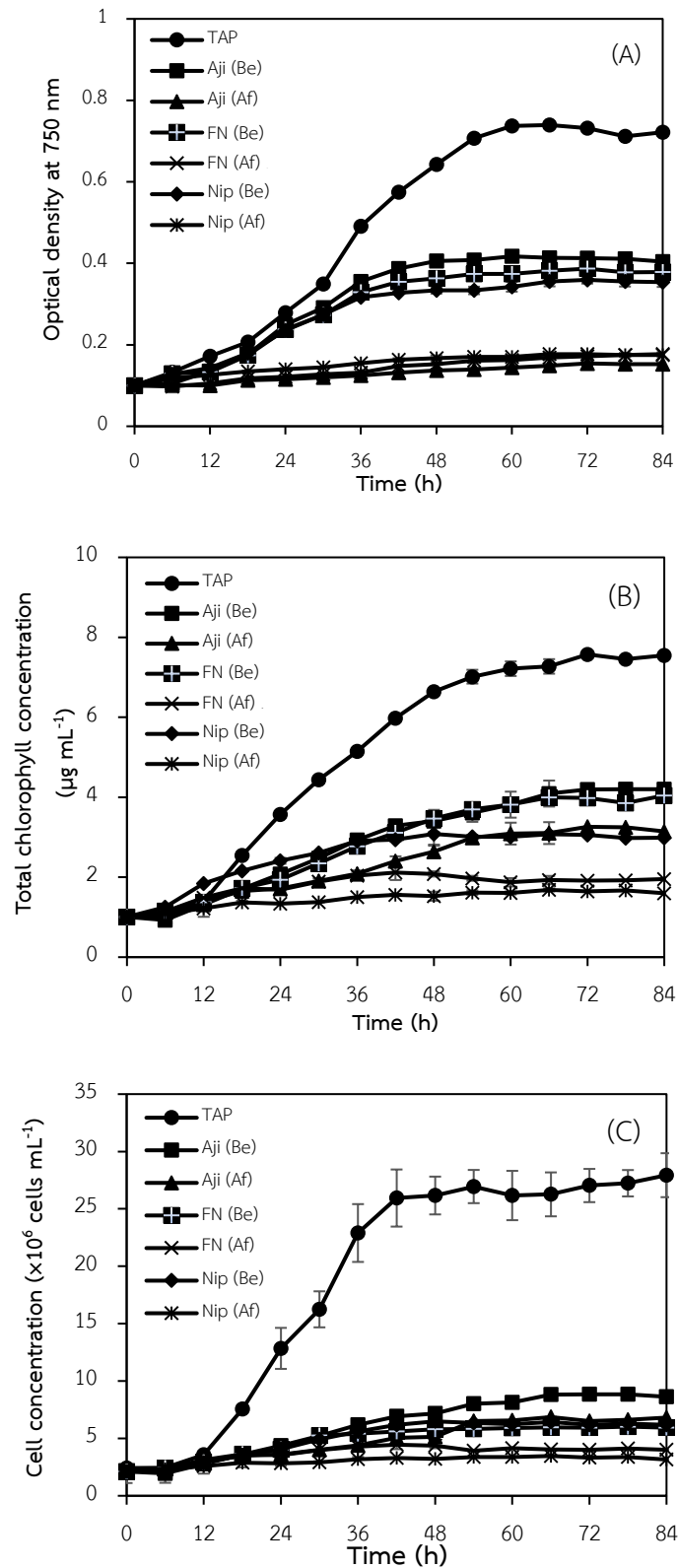
สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร TAP มีการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ภายหลังจากชั่วโมงที่ 24 การสะสมไฮโดรเจนจะลดลง เนื่องจาก ในระยะเริ่มต้นของการบ่มเซลล์สาหร่าย เซลล์สาหร่ายจะถูกพันด้วยก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศ ทำให้สภาวะแวดล้อมของระบบเป็นสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเกิดการผลิของไฮโดรเจนมากขึ้น แต่เมื่อบ่มสาหร่ายภายใต้สภาวะมีแสง สาหร่ายจะเกิดการสังเคราะห์แสง ทำให้มีออกซิเจนเกิดขึ้นจากกระบวนการแตกตัวของน้ำ เมื่อออกซิเจนในระบบเพิ่มขึ้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงาน อัตราการผลิตไฮโดรเจนจึงลดต่ำลงในชั่วโมงที่ 24 และไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในชั่วโมงที่ 96 ในการบ่มเซลล์สาหร่ายในอาหาร TAP-K ที่มีการปรับตัวในอาหาร TAP-K เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สาหร่ายมีการสะสมไฮโดรเจนสูงที่สุดและสูงกว่าการบ่มสาหร่ายสีเขียวในอาหาร TAP-K เนื่องจากในการขาดธาตุโพแทสเซียม เซลล์สาหร่ายจะยับยั้งการสะสมแป้งและลดการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ สารอินทรีย์คาร์บอน คือ กรดอะซิติกจะถูกใช้ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ผลิตสารรีดิวซ์ NADH และ FADH<sub>2</sub> เมื่อเซลล์สาหร่ายไม่สามารถสะสมแป้งอเล็กตรอนที่เหลือนอกพอจะถูกส่งไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อผลิตไฮโดรเจน ประกอบกับปริมาณของคลอโรฟิลล์ที่ลดลง ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงตามไปด้วย มีผลทำให้ออกซิเจนที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำใน

ระบบแสงที่สองลดลงเช่นกัน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยออกซิเจน ทำให้เกิดการสะสมไฮโดรเจนสูง ยิ่งเมื่อเพิ่มระยะเวลาการปรับตัวในอาหาร TAP-K นานขึ้น ทำให้เซลล์สาหร่ายมีความพร้อมในการปรับตัวเข้าสู่สภาวะปราศจากอากาศได้เร็วขึ้น ทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้นและรวดเร็วยิ่งขึ้น

### 4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการบำบัดน้ำเสียและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

#### 4.3.1 ผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร น้ำเสียที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นน้ำเสียก่อนการบำบัดและหลังการบำบัดของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร 3 โรงงานคือ โรงงานผลิตอาหารแช่แข็งและผงชูรส (Aji) โรงงานผลิตนมข้นหวาน (FN) และโรงงานผลิตอาหารปรุงสำเร็จรูปแช่แข็ง (Nip) ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุกๆ 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 84 นำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่าย จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ( $OD_{750}$ ) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ พบว่า ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียมาแล้ว (รูปที่ 4.15) สาหร่ายมีการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำหรือแทบจะไม่มี การเจริญเติบโตเลย ในขณะที่สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารก่อนการบำบัด มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมาแล้ว (รูปที่ 4.15) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารกับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP พบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (รูปที่ 4.15) เนื่องจากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาณน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย



รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และจำนวนเซลล์ (C) ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ

นอกจากสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแล้ว องค์ประกอบแร่ธาตุของอาหารเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว จากการทดลองใช้น้ำเสียก่อนและหลังการบำบัดการศึกษากการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียหลังการบำบัดมีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียก่อนการบำบัด เนื่องจากน้ำเสียหลังการบำบัดมีสารอาหารและแร่ธาตุน้อยกว่าน้ำเสียก่อนการบำบัด การบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมต้องผ่านส่วนที่เรียกว่า การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ (Biological treatment) ซึ่งเป็นการบำบัดน้ำเสียโดยอาศัยหลักการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบภายใต้สภาวะที่สามารถควบคุมได้ เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ให้รวดเร็วขึ้นกว่าที่เกิดขึ้นตามปกติในธรรมชาติ และ การบำบัดขั้นสูง (Advance treatment) เป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำที่ไม่สามารถกำจัดได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ คือ ฟอสฟอรัส และไนโตรเจน ส่งผลให้มีแร่ธาตุและสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวถูกกำจัดออกไป ทำให้แหล่งน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดจากโรงงานอุตสาหกรรมมาแล้วสามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ แต่จะไม่เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งอาหารของสาหร่ายสีเขียวอีกต่อไป ในทางกลับกันการใช้แหล่งน้ำเสียที่ยังไม่ผ่านการบำบัดมาเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียว ให้ผลการเจริญที่สูงกว่าการใช้แหล่งน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดมาแล้ว เนื่องมาจากแหล่งน้ำทิ้งอันเกิดจากอุตสาหกรรมอาหารนั้นอุดมไปด้วยสารอินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของสาหร่าย อย่างไรก็ตาม การเจริญยังไม่สูงเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการเจริญของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP (รูปที่ 4.15)

#### 4.3.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

จากการนำน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาวิเคราะห์ค่า DO, BOD, COD และ พีเอช พบว่า ภายหลังกการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 น้ำเสียมีปริมาณ DO เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ค่า BOD และ COD ลดลง และมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นในช่วง 105-3.48 (ตารางที่ 4.4) โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในแหล่งน้ำเสีย FN (Be) ทำให้น้ำเสียมีค่า BOD ลดลงมากที่สุด โดยลดลงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในแหล่งน้ำเสีย Aji (Af) ทำให้น้ำเสียมีค่า COD ลดลงมากที่สุดโดยลดลง 69.96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เป็นเวลา 84 ชั่วโมง ค่า DO ในน้ำเสียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวสามารถ

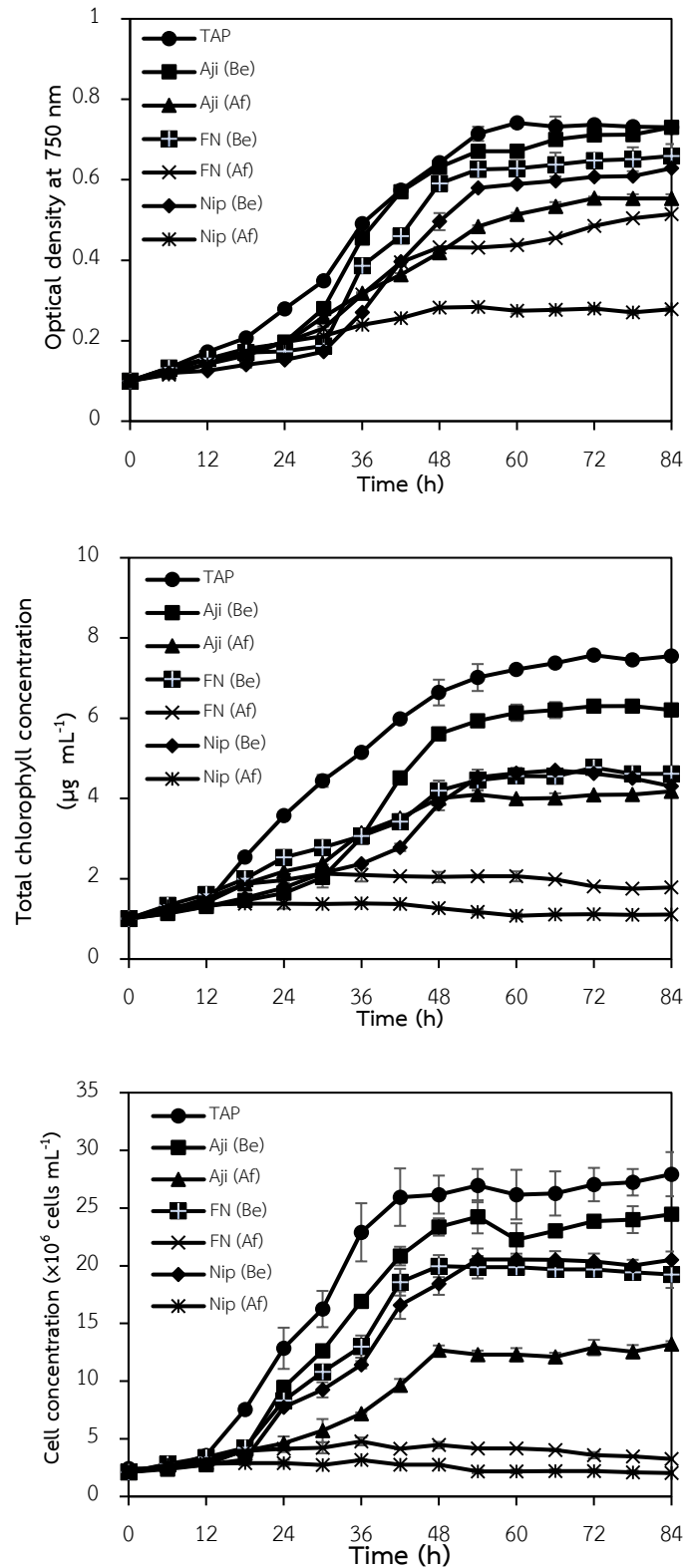
ใช้สารอาหารภายในแหล่งน้ำเสียเพื่อการเจริญเติบโตได้ จึงเกิดการสังเคราะห์แสงทำให้มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำหรือค่า DO เพิ่มขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารแช่แข็งและผงชูรสก่อนการบำบัด Aji (Be) สามารถเพิ่มค่า DO ได้สูงที่สุดจาก 0.02 เป็น 3.54 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับผลการเจริญของสาหร่ายในน้ำเสียชนิดนี้ทำให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุด (รูปที่ 4.15) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารปรุงสำเร็จรูปแช่แข็งหลังบำบัด Nip (Af) มีค่า DO เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นคือ จาก 3.10 เป็น 3.45 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจเนื่องมาจาก สาหร่ายสีเขียวไม่มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตภายใต้แหล่งน้ำเสีย Nip (Af) จึงไม่มีออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้น จากตารางที่ 4.4 พบว่าค่า BOD ในน้ำเสียมีแนวโน้มลดลง หลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในน้ำเสียทุกชนิดแสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวสามารถใช้อินทรีย์สารที่มีอยู่ในน้ำเสียในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ได้ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในแหล่งน้ำเสีย Aji (Be) สามารถลดค่า BOD ได้สูงที่สุดคือจากค่า BOD เท่ากับ 960 เป็น 645.13 มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร โดยลดลงถึง 75.00 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่า COD ในน้ำเสียมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันกับค่า BOD เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถใช้สารอินทรีย์ในการเจริญเติบโต ส่งผลให้แร่ธาตุที่อยู่ในน้ำเสียลดลง แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าค่า BOD และ COD ในแหล่งน้ำเสีย Nip (Be) มีปริมาณสูงถึง 800 และ 1549.12 มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อผ่านการบำบัดด้วยสาหร่ายก็มีค่าลดลงเพียง 35 และ 21.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เท่านั้น จึงเป็นไปได้ว่าสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ใช้อินทรีย์สารมีอยู่ในน้ำเสียในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควร ทำให้ประสิทธิภาพการเจริญค่อนข้างต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในแหล่งน้ำเสีย Aji (Be) และ FN (Be) อย่างไรก็ตาม จึงนำแหล่งน้ำเสียแหล่งเดิมมาไปใช้ในการคัดเลือกในการทดลองอื่นๆต่อไป

**ตารางที่ 4.4** ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากการวัดค่า DO, BOD และ COD ของน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร 6 แห่ง ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546

น้ำเสียจากโรงงาน อุตสาหกรรม	น้ำเสียก่อนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546				น้ำเสียหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>S. obliquus</i> TISTR 8546				ค่าการเปลี่ยนแปลง			
	DO (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	BOD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	COD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	pH	DO (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	BOD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	COD (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	pH	DO ที่เพิ่มขึ้น (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	% BOD ที่ลดลง	% COD ที่ลดลง	pH ที่ เปลี่ยนไป
อาหารแช่แข็งและผงชูรส ก่อนบำบัด (Aji (Be))	0.02	1250	2762	7.46	3.54	750	1136.64	8.66	3.52	40.00	58.85	1.20
อาหารแช่แข็งและผงชูรส หลังบำบัด (Aji (Af))	0.22	87	369.71	6.90	2.21	75	111.05	8.40	1.99	13.79	69.96	1.50
นมข้นหวานก่อนบำบัด (FN (Be))	0.10	960	1290.24	6.72	2.89	240	645.13	8.84	2.79	75.00	49.99	2.12
นมข้นหวานหลังบำบัด (FN (Af))	1.88	13.20	84.63	5.22	2.45	10	65.16	8.70	0.57	24.24	23.01	3.48
อาหารปรุงสำเร็จรูปแช่ แข็งก่อนบำบัด (Nip (Be))	0.13	800	1964	7.23	2.68	520	1549.12	8.28	2.55	35.00	21.12	1.05
อาหารปรุงสำเร็จรูปแช่ แข็งหลังบำบัด (Nip (Af))	3.10	27	69.79	6.01	3.45	15	68.83	8.58	0.35	44.44	1.37	2.57

### 4.3.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมกรดอะซีติก

จากการทดลอง 4.3.1 พบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทั้ง 6 ชนิด ซึ่งคาดว่าน่าจะมาจากการที่ น้ำเสียมีแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการเจริญของสาหร่าย ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงทำการเติมกรดอะซีติก ความเข้มข้นสุดท้าย 1.74 มิลลิโมลาร์ ลงไปในน้ำเสียและศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง และผงชูรสก่อนบำบัด (Aji (Be)) ที่มีการเติมกรดอะซีติกมีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ และจำนวนเซลล์ (รูปที่ 4.16) สาหร่ายมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารปรุงสำเร็จรูปแช่แข็งหลังบำบัด (Nip (Af)) ที่มีการเติมกรดอะซีติก (รูปที่ 4.16) แสดงให้เห็นว่า การเติมแหล่งคาร์บอนในน้ำเสียบางชนิดไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ เนื่องจาก น้ำเสียแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของอาหารและแร่ธาตุที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำเสียหลังการบำบัดจะมีอาหารและแร่ธาตุในปริมาณน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของอินทรีย์คาร์บอนในน้ำเสียก่อนการบำบัดชนิดต่างๆ พบว่า น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งและผงชูรส (Aji) มีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนมากที่สุด โดยมีค่า 533.50 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารปรุงสำเร็จรูปแช่แข็ง (Nip) และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมนมข้นหวาน (FN) ซึ่งมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนเท่ากับ 128.80 และ 95.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโต โดยหากมีปริมาณคาร์บอนมาก สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตสูง จากการทดลองนี้ สามารถเพิ่มปริมาณชีวมวลของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ได้โดยการเติมกรดอะซีติกความเข้มข้นสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์ เมื่อได้ชีวมวลแล้วจึงนำสาหร่ายไปศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่อไป



รูปที่ 4.16 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และจำนวนเซลล์ (C) ของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่างๆ ที่มีการเติมกรดอะซิติกความเข้มข้นสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์สารอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดและแร่ธาตุอาหารทั้งหมดในแหล่งน้ำเสีย Aji (Be), FN (Be) และ Nip (Be)

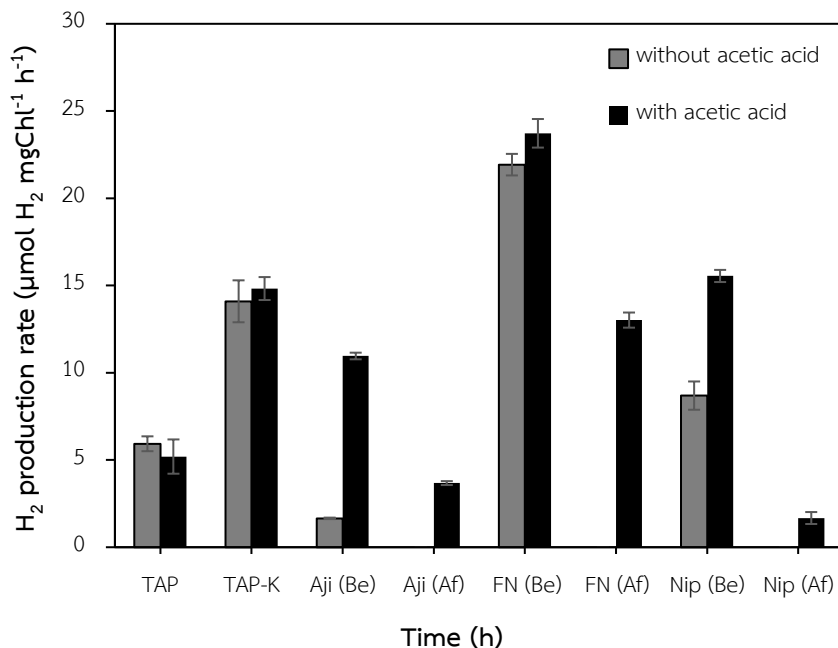
Measurement	Sample			
	Aji (Be)	FN (Be)	Nip (Be)	TAP
pH	7.46	6.72	7.23	7.20
TOC (mg L <sup>-1</sup> )	533.50	95.93	128.80	419.20
S (mg L <sup>-1</sup> )	10.52	5.09	6.06	16.03
N (mg L <sup>-1</sup> )	26.97	4.86	10.89	108.60
P (mg L <sup>-1</sup> )	6.82	6.87	4.14	46.42
K (mg L <sup>-1</sup> )	18.30	26.80	18.70	97.60
Ca (mg L <sup>-1</sup> )	10.80	30.50	22.80	13.63
Mg (mg L <sup>-1</sup> )	5.67	7.89	8.81	9.75
Fe (mg L <sup>-1</sup> )	0.50	0.47	0.47	1.00
Mn (mg L <sup>-1</sup> )	0.02	0.05	0.04	1.42
Cu (mg L <sup>-1</sup> )	0.01	0.01	0.01	0.04
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	0.01	0.03	0.02	5.00
Na (mg L <sup>-1</sup> )	79.90	237.00	158.00	0.06
B (mg L <sup>-1</sup> )	10.50	5.09	6.07	0.20

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารอินทรีย์คาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เป็นอย่างมาก ถึงแม้สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญเติบโตได้แบบโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic) ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างอาหาร แต่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศมีเพียงแค่ 0.03 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น การที่มีสารอินทรีย์ละลายอยู่ในอาหารและสัมผัสกับสาหร่ายสีเขียวโดยตรงจะทำให้สาหร่ายสามารถนำแหล่งคาร์บอนนั้นมาใช้ได้ง่ายและรวดเร็วกว่า ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตได้สูงขึ้น เมื่อนำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในแหล่งน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมาเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP จะเห็นได้ว่า สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำเสียก่อนบำบัด Aji (Be)

และ FN (Be) ให้ผลการเจริญที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เพียงเล็กน้อยคือ 4.29 และ 12.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีรายงานการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* เปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบสภาวะแบบโฟโตออโตโทรฟิก และโฟโตออโตเฮเทอโรโทรฟิก ให้ชีวมวลเท่ากับ  $250 \pm 7$  และ  $987 \pm 9$  มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ (Liang *et al.*, 2009) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองเมื่อมีสารอินทรีย์คาร์บอนที่เพียงพอในอาหารจะทำให้สาหร่ายสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น ในการทดลองถัดไป จึงนำอาหารจากแหล่งน้ำเสียที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 และศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

#### 4.3.4 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

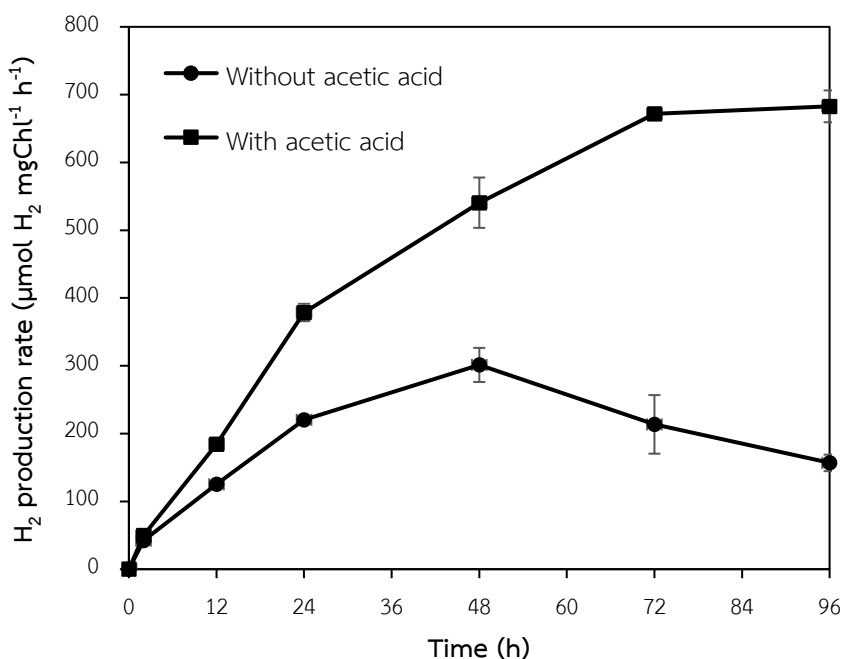
จากการนำสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทั้ง 6 ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายลงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่เติมหรือไม่เติมกรดอะซิติก บ่มเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียวที่บ่มในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตนมชั้นหวาน (FN (Be)) ที่มีการเติมกรดอะซิติก ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด  $23.724 \pm 0.819$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.17) โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสาหร่ายสีเขียวที่บ่มในน้ำเสียชนิดเดียวกัน แต่ปราศจากการเติมกรดอะซิติก ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $21.927 \pm 0.618$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.17) อัตราการผลิตไฮโดรเจนนี้จะสูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-K ถึง 5 และ 2 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 4.17)



**รูปที่ 4.17** อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทั้ง 6 ชนิด ที่มีการเติมและไม่เติมกรดอะซิติกภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่า น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร FN ก่อนการบำบัดทั้งที่มีการเติมและไม่เติมกรดอะซิติกความเข้มข้นสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์ เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก องค์ประกอบและปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสีย FN เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบและปริมาณของสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ ในน้ำเสียก่อนการบำบัดทั้ง 3 แหล่งพบว่า น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร FN มีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด ปริมาณซัลเฟอร์ ปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าน้ำเสียจากโรงงานอีก 2 แหล่ง (ตารางที่ 4.5) ด้วยเหตุนี้ อาจเป็นไปได้ว่า การมีปริมาณซัลเฟอร์และไนโตรเจนเพียงเล็กน้อยจะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายชนิดนี้ นอกจากนี้ หากพิจารณาปริมาณโพแทสเซียมพบว่า น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม FN มีปริมาณโพแทสเซียมสูงกว่าน้ำเสียอีก 2 แหล่งประมาณ 1.4 เท่าแต่น้อยกว่าอาหาร TAP ประมาณ 4 เท่า (ตารางที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าปริมาณโพแทสเซียมในน้ำเสียทุกชนิดมีปริมาณที่ต่ำมาก ซึ่งมีผลทำให้สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนได้สูงเมื่อบ่มในน้ำเสียทั้ง 3 ชนิดเทียบกับในอาหาร TAP (รูปที่ 4.17)

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร FN ทั้งที่เติมและไม่เติมกรดอะซิติกมาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีแสงและปราศจากอากาศเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายที่บ่มในน้ำเสียที่มีการเติมกรดอะซิติกมีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าในน้ำเสียที่ไม่มีการเติมกรดอะซิติกอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.18) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $682.778 \pm 23.540$  และ  $301.306 \pm 25.153$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร FN ที่มีการเติมและไม่เติมกรดอะซิติกในชั่วโมงที่ 96 และ 48 ของการบ่ม ตามลำดับ (รูปที่ 4.18) แสดงให้เห็นว่าการเติมกรดอะซิติกในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร FN มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยกรดอะซิติกจัดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอิเล็กตรอนหรือเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 เป็นสาหร่ายสีเขียวชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมแค่กรดอะซิติกในน้ำเสียเท่านั้น โดยกรดอะซิติกมีข้อดีคือ มีราคาถูกทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง ยิ่งไปกว่านั้น สาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ยังสามารถเพาะเลี้ยงและบ่มในน้ำเสียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนได้



**รูปที่ 4.18** ผลผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 จากการเปรียบเทียบอาหารที่ได้จากแหล่งน้ำเสียอุตสาหกรรมอาหาร FN (Be) ที่มีการเติมและไม่มีการเติมกรดอะซิติก บ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลวิจัย

#### 5.1.1 สรุปผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน

1) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP แต่มีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่า

2) จากการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 และ *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 พบว่า อายุเซลล์ที่เหมาะสมต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด คือ 36 ชั่วโมง ระยะเวลาการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ความหนาแน่นเซลล์โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8

3) การขาดโพแทสเซียมในอาหาร TAP เพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Scenedesmus* ทั้ง 2 ชนิด โดย *S. obliquus* TISTR 8546 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่า *Scenedesmus* sp. KMITL OVG-1 ประมาณ 1.5 เท่า

#### 5.1.2 สรุปสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546

1) การขาดธาตุอาหารอื่นร่วมกับการขาดโพแทสเซียมไม่ส่งเสริมการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546

2) ชนิดและความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 คือ กรดอะซิติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์

3) การเพิ่มระยะปรับตัวให้เซลล์อยู่ในอาหาร TAP-K เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ได้

4) ความเข้มแสง, อุณหภูมิการบ่ม และพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *S. obliquus* TISTR 8546 คือ ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2

5) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 ในอาหาร TAP-K พบว่า *S. obliquus* TISTR 8546 มีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ  $14.455 \pm 0.885$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $336.859 \pm 21.416$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 5.1.3 สรุปผลการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

1) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 มีการเจริญเติบโตได้สูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมกรดอะซิติกความเข้มข้นสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์

2) น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารภายหลังการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. obliquus* TISTR 8546 มีค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO) มากขึ้น ค่าออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยสิ่งมีชีวิต (Biochemical oxygen demand, BOD) และค่าออกซิเจนที่ต้องการใช้เพื่อออกซิไดซ์สารอินทรีย์ด้วยสารเคมี (Chemical oxygen demand) ลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดและองค์ประกอบของสารต่างๆ ในน้ำเสีย

3) สาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงและบ่มในน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมผลิตนมข้นหวาน (FN) ที่มีการเติมกรดอะซิติกความเข้มข้นสุดท้าย 17.4 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $23.724 \pm 0.819$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ  $682.778 \pm 23.540$  ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1) จากผลการทดลองนี้พบว่าการขาดโพแทสเซียมในอาหารเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในขณะที่การขาดโพแทสเซียมในอาหารไม่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* และ *Chlorella* sp. ดังนั้น ควรจะมีการศึกษาเมแทบอลิซึมของการขาดโพแทสเซียมต่อกลไกการผลิตไฮโดรเจนใน *S. obliquus* TISTR 8546 เพื่อให้เข้าใจกลไกการผลิตและสามารถเพิ่มศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนต่อไปในอนาคต

2) ควรศึกษาการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus* TISTR 8546 ในน้ำเสียที่มาจากแหล่งต่างๆ มากขึ้น เนื่องจาก น้ำเสียแต่ละชนิดมีปริมาณและองค์ประกอบของสารอาหารที่แตกต่างกัน

## เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. สารานุกรมพลังงานทดแทน. กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย.
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2559. สถานการณ์พลังงานของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย.
- กลุ่มงานเคมีส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์. 2550. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. สำนักวิจัยและพัฒนา. กรมชลประทาน.
- ชัยศรี ธาราสวัสดิ์พิพัฒน์. 2553. เอกสารคำสอนรายวิชา เทคโนโลยีในการบำบัดน้ำเสีย. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Akgul, F., Tuney K.I., Akgul, R. and Erdugan, H. 2017. "Morphological and molecular characterization of *Scenedesmus* like species from ergene river basin (Thrace, Turkey)." *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 17(3): 609-18.
- Antal, T.K., Kukarskikh, G.P., Volgusheva, A.A., Krendeleva, T.E., Tyystjärvi, E. and Rubin, A.B. 2016. "Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH." *Algal Research*. 17: 38-45.
- Batyrova, K.A., Tsygankov, A.A. and Kosourov, S.N. 2012. "Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(10): 8834-9.
- Becker, E.W. 2007. "Micro algae as a source of protein" *Biotechnology Advances*. 25:207-10.
- Benoit, D., Jeremy P., Gwendoline, C., Jean, F.C., Guillaume C. and Jack, L. 2010. "Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 35: 10741-9.

- Boichenko, V.A. and Hoffmann, P. 1994. "Photosynthetic hydrogen production in prokaryotes and eukaryotes: occurrence, mechanism, and functions." *Photosynthetica*. 30: 527–52.
- Brooks, A. 1985. "Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some Calvin-cycle metabolites in spinach leaves." *Plant Physiology*. 13: 221-37.
- Chen, F. and Johns, M.R. 1994. "Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture." *Proc Biochem*. 29: 245-52.
- Chen, M., Zhang, L., Li, S., Chang, S., Wang, W., Zhang, Z., Wang, J., Zhao, G., Xu, W. 2014 "Characterization of cell growth and photobiological H<sub>2</sub> production of *Chlamydomonas reinhardtii* in ASSF industry wastewater." *International Journal of Hydrogen Energy*. 29: 13462-7.
- Chen, P., Fan, S., Chiang, C., and Lee, C. 2008. "Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CH3." *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(5): 1460-4.
- Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z.L., Li, X., Zhang and D. 2006. "Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31: 539-49.
- Danilov, R.A. and Ekelund, N.G.A. 2001. "Effects of pH on the growth rate, motility and photosynthesis in *Euglena gracilis*." *Folia Microbiologica*. 46(6): 549–54
- Das, D. and Verziroglu, T.N. 2001. "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature." *International Journal of Hydrogen Energy*. 26: 13–28.
- Desikachary, T.V. 1959. "Cyanophyta. botany department university of madras, indian council of agricultural research. *NewDelhi*. pp. 686.
- Florin, L., Tsokoglou, A., and Happe, T. 2001. "A novel type of [Fe]-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain." *Journal of Biological Chemistry*. 276: 6125-32.
- Gaffron, H. 1939. "Über auffallende Unterschiede in der Physiologie nahe verwandter Algenstämme, nebst Bemerkungen über der Lichtatmung." *Biologisches Zentralblatt*. 59: 302-13.

- Gaffron, H. 1942. "The effect of specific poisons upon the photoreduction with hydrogen in green algae." *The Journal of General Physiology*. 26: 241-67.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." *The Journal of General Physiology*. 26: 219-40.
- Happe, T. and Naber, J.D. 1993. "Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *European Journal of Biochemistry*. 214(2): 475-81.
- Harris, E.H. 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press. San Diego.
- Hartman, H. and Krasna, A. 1963. "Studies on the adaptation of hydrogenase in *Scenedesmus*." *Journal of Biological Chemistry*. 238: 49-757.
- Healey, F. 1970. "Hydrogen evolution by several algae." *Planta*. 91(3): 220-6.
- Heifetz, P.B., Förster, B., Osmond, B.C., Giles, L.J., and Boynton, J.E. 2000. "Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses." *Plant Physiology*. 122(4): 1439-46.
- Herzig, R., and Falkowski, G. 1989. "Nitrogen limitation in *isochrysis galbana* (haptophyceae)." *Journal of Phycology*. 25(3): 462-71.
- Hindák, F., and Hindáková, A. 2008. "Morphology and taxonomy of some rare chlorococcalean algae (Chlorophyta)." *Biologia*. 63(6): 781-90.
- Horch, M., Lauterbach, L., Lenz, O., Hildebrandt, P., and Zebger, I. 2011. "NAD(H)-coupled hydrogen cycling structure function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases." *FEBS Letters*. 586(5): 545-56.
- Ji, C.F., Yu, X.J., Chen, Z.A., Xue, S., Legrand, J. and Zhang W. 2011. "Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo-hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*" *International Journal of Hydrogen Energy*. 36: 5817-21.
- Johnson, X. and Alric, J. 2012. "Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*." *J Biol Chem*. 287(31): 26445-52.
- Kessler, E. 1974. "Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth." In: Stewart WDP (ed) *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell, Oxford. Pp. 456-73.

- Kong, QX., Li, L., Martinez, B., Chen, P. and Ruan, R. 2010. "Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160(1): 9-18.
- Kosaric, N. and Lyng, R.P. 1988. "Microbial production of hydrogen." In: *Biotechnology*, 6B, Rehm HJ, Reed G. VCH Publ Germany. Pp. 101-34.
- Kosourov, S., Seibert, M., and Ghirardi, M.L. 2003. "Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H<sub>2</sub>-Producing *Chlamydomonas reinhardtii* Cultures." *Plant and Cell Physiology*. 44(2): 146-55.
- Kim, P.J., Kang, C.D., Sim, S.J., Kim, M.S., Hyunark, T., Lee, D., Kim, D., Kim, J.H., Lee, Y.K. and Pak, D. 2005. "Cell age optimization for hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90." *Journal Microbiology Biotechnology*. 15(1): 131-5.
- Kim, P.J., Kang, C. D., Park, T.H., Kim, M.S. and Sim, S.J. 2006. "Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31: 1585-90.
- Lee, K.Y., and Shen, H. 2004. Basic culturing techniques. In: Richmond, A. [Eds], *Handbook of microalgal culture*. IS Press Pp. 40-50.
- Lemeille, S., and Rochaix, J.D. 2010. "State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways." *Photosynthesis Research*. 106(1-2): 33-46.
- Li, Y.L., Wu, Y., Wei, J., Wei, J., Xie, B., Zou, L.K., Cheng, J., Wang, Z., He, J., Wu, M.L., Zhao, P.H. 2017. "Investigations on the synthesis, structural characterization and electrochemical properties of diiron azadithiolate complexes and phosphine-substituted derivatives." *Polyhedron*. 135: 231-6.
- Liang, Y., Sarkany, N., and Cui, Y. 2009. "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions." *Biotechnology Letters*. 31(7): 1043-9.
- Light-dependent reactions of photosynthesis at the thylakoid membrane [ออนไลน์] : [https://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent\\_reactions](https://en.wikipedia.org/wiki/Light-dependent_reactions)
- Lyer, G., Gupte, Y., Vaval, P. and Nagle, V. 2015. "Uptake of potassium by algae and potential use as biofertilizer." *Plant Physiology*. 20(3): 285-8.

- Maneeruttanarungroj, C. and Phunpruch, S. 2017. "Effect of pH on biohydrogen production in green Alga *Tetraspora* sp. CU2551." *Energy Procedia*. 138: 1085-92.
- Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. "Photobiological hydrogen production prospects and challenges: Efforts to scale up the capacity of green algae and cyanobacteria to use sunlight to convert water into hydrogen gas for energy use." *Microbe*. 6(4): 275-80.
- Márquez-Reyes, L.A., Sanchez-Saavedra, M.D.P. and Valdez-Vazquez, I., 2015. "Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 40: 7291-300.
- Martinez, M.E., Sanchez, S., Jimenez, J.M., Yousfi, F.EL., Munoz and L. 2000. "Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*." *Bioresource Technology*. 73: 263-72.
- Mata, T.M., Melo, A.C., Simões, M., Caetano and N.S. 2012. "Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*." *Bioresource Technology*. 107: 151-8.
- Mayhew, S.G. 1978. "The redox potential of dithionite and SO<sub>2</sub> from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase." *European Journal of Biochemistry*. 85(2): 535-47.
- Melis, A. and Happe, T. 2001. "Hydrogen production. green algae as a source of energy." *Plant Physiology*. 127(3): 740-8.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L. and Seibert, M. 2000. "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiology*. 122: 127-35.
- Miura, Y., Yagi, K., Shoga, M. and Miyamoto, K. 1982. "Hydrogen production by a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in an alternating light/dark cycle." *Biotechnology Bioengineering*. 24(7): 1555-63.

- Nguyen, A.V., Thomas-Hall, S.R., Malnoë, A., Timmins, M., Mussnug, J.H., Rupprecht, J., Kruse, O., Hankamer, B. and Schenk, P.M. 2008. "Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Eukaryotic Cell*. 7(11): 1965-79.
- Oncel, S.S., Kose, A., Faraloni, C., Imamoglu, E., Elibol, M. and Torzillo, G. 2014. "Biohydrogen production using mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*: the effects of light intensity and illumination patterns." *Biochemical Engineering Journal*. 92: 47-52.
- Papazi, A., Gjindali, A.I., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K. and Kotzabasis, K. 2014. "Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*." *International Journal of Hydrogen Energy*. 39: 19452-64.
- Peltier, G., and Schmidt, G.W. 1991. "Chlororespiration: An adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 91-4795.
- Perry, J.H. 1963. "Chemical engineers' handbook." McGraw-Hill, New York.
- Prince, R.C., and Kheshgi, H.S. 2005. "The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel." *Critical Reviews in Microbiology*. 31: 19-31.
- Rashid, N., Lee, K. and Mahmood, Q., 2011. "Bio-hydrogen production by *Chlorella vulgaris* under diverse photoperiods." *Bioresource Technology*. 102(2): 2101-4.
- Rattana, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2010. "Hydrogen production by the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-01 under heterotrophic conditions." Proceedings of the 8th International symposium on biocontrol and biotechnology; Pattaya, Chonburi Province, Thailand. Pp. 114-20.
- Ronneau, C. 2004. "Energie, pollution de l'air et developpement durable" Louvain-la-Neuve: Presses Universitaires de Louvain. Pp. 304.

- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G. and Stephenson, T. 2010. "Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater." *Bioresource Technology*. 101(1): 58-64.
- Saeed, F.F.M., Ibrahim, M.A. 2012. "Hydrogen production by green alga GAF99 in sea water bioreactor: II modeling the effect of temperature." *Biotechnology*. 11(4): 258-62.
- Saleem, M., Chakrabarti, MH., Raman, A.A.A., Daud, W.M.A.W. and Mustafa, A. 2012. "Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* in a two-stage process with and without illumination at alkaline pH." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37: 4930-4.
- Schnackenberg, J., Schulz, R. and Senger, H. 1993. "Characterization and purification of hydrogenase from the eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus*." *The FEBS Journal*. 327: 21-4.
- Sforza, E., Gris, B., De Farias Silva, C.E., Morosinotto, T. and Bertucco, A. 2014. "Effects of Light on cultivation of *scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor" *Chemical Engineering Transactions*. 38: 211-6.
- Shashirekha V., Sivakumar M., and Seshadri S. 2016. "Effective C–N–P ratio for growth and nutrient removal efficiency of *Scenedesmus obliquus* in sugar mill effluent." *Energy, Ecology and Environment*, 1(5): 283-95.
- Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W. and Ermler, U. 2008. "The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site." *Science*. 321(5888): 572-5.
- Smith, P.R., Bingham, A.S., and Swartz, J.R. 2012. "Generation of hydrogen from NADPH using an [FeFe] hydrogenase." *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(3): 2977-83.
- Staeher, P.A., and Sand-Jensen, K. 2006. "Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities." *Freshwater Biology*. 51: 249-62.
- Stephenson, M. and Stickland, L.H. 1931. "Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme." *Biochemical Journal*. 25(1): 205-14.

- Stripp, S.T., Goldet, G., Brandmayr, C., Sanganas, O., Vincent, K.A., Haumann, M., Armstrong, F.A., Happe, T. 2009. "How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41): 17331-6.
- Styring, S., Virgin, I., Ehrenberg, A. and Anderson, B. 1990. "Strong light photoinhibition of electron transport in photosystem II. Impairment of the function of the first quinone acceptor QA." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1015: 269-79.
- Su, Z.F., X. Li, Hu, H.Y., Wu, Y.H. and Noguchi, T. 2011. "Culture of *Scenedesmus* sp. LX1 in the modified effluent of a wastewater treatment plant of an electric factory by photo-membrane bioreactor." *Bioresource Technology*. 102(17): 7627-32
- Taikhao, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. 2013. "Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*." *Journal of Applied Physiology*. 25: 575-85.
- Tsygankov, A., Kosourov, S., Tolstygina, I., Ghirardi, M., and Seibert, M. 2006. "Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions." *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11): 1574-84.
- Vignais, P.M. and Toussaint, B. 1994. "Molecular biology of membrane-bound H<sub>2</sub> uptake hydrogenases" *Archives of Microbiology*. 161: 1-10
- Wang, J. and Wan, W. 2008. "Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures." *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(20): 5392-7.
- Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A. and Grossman, A.R. 1998. "The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiology*. 117: 129-39.
- Yokoi, H., Saitsu, A.S., Uchida, H., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 2001. "Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91: 58-63.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP) (Harris, 1989)

#### อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร

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

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

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

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

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคน ปรับพีเอช 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอล เติมสารตามด้านล่างเพิ่มตามลำดับ

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

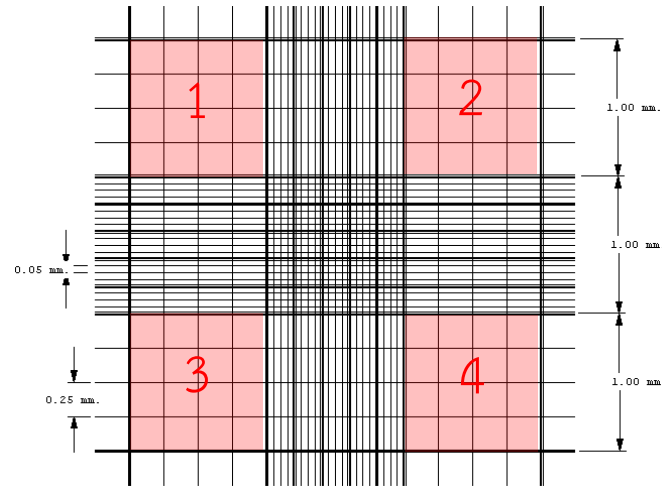
ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะมีสีเหลืองเขียว เปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้น เติมสารตามด้านล่าง ตามลำดับ

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (1M stock: 6.8 กรัม /50 มิลลิลิตร) (ปรับพีเอช 7.2)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 1 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (1M stock: 8.7 กรัม /50 มิลลิลิตร) (ปรับพีเอช 7.2)

## ภาคผนวก ข

### วิธีการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์



รูปที่ ก ฮีโมไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- 1) ทำการปิเปตสารแขวนลอยเซลล์สำหรับวางลงในฮีโมไซโตมิเตอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
- 2) นำฮีโมไซโตมิเตอร์ที่มีสารแขวนลอยเซลล์สำหรับส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 1000 เท่า
- 3) นับจำนวนเซลล์สำหรับวางผ่านกล้องจุลทรรศน์ในช่องสีแดงที่ 1, 2, 3 และ 4
- 4) หาค่าเฉลี่ยระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ในช่อง 1, 2, 3 และ 4

ปริมาตรสารแขวนลอยในช่องสีแดงแต่ละช่องมีค่าเท่ากับ กว้าง × ยาว × สูง (ความกว้างเท่ากับ 1 มิลลิเมตร, ความยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร และ ความลึกเท่ากับ 1 มิลลิเมตร) ดังนั้น ปริมาตรสารแขวนลอยในช่องสีแดงมีค่า

เท่ากับ  $1 \times 1 \times 1$  มิลลิเมตร

เท่ากับ  $0.1 \times 0.1 \times 0.1$  เซนติเมตร

เท่ากับ 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร

เท่ากับ  $10^4$  ลูกบาศก์เซนติเมตร

เพราะฉะนั้น ปริมาณเซลล์เท่ากับจำนวนเซลล์จากการนับ  $\times 10^4$  ลูกบาศก์เซนติเมตร

## ภาคผนวก ค

### วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

- 1) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากกราฟมาตรฐานไฮโดรเจน
- 2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาคำนวณเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
- 3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเทียบเป็น ปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
- 4) นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง
- 5) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็นปริมาณไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง
- 6) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาตรของอาหารในการเพาะเลี้ยงจะได้หน่วยเป็นปริมาณไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง

## ภาคผนวก ง

### วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. การวิเคราะห์ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO) (กลุ่มงานเคมีส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์, 2550)

#### วิธีวิเคราะห์

- 1) นำตัวอย่างน้ำบรรจุลงขวดบีโอดีโดยใช้น้ำตัวอย่างล้างภาชนะที่จะบรรจุ 2 ครั้ง บรรจุน้ำให้เต็มขวดและปิดฝาให้สนิทได้น้ำเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ
- 2) วัดค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำโดยเครื่อง Dissolved oxygen meter

2. การวิเคราะห์ค่าปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรีย (BOD) (กลุ่มงานเคมีส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์, 2550)

#### สารเคมี

- 1) สารละลายแมงกานีสซัลเฟต เตรียมโดยชั่งแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) 368 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
- 2) สารละลายอัลคาไลด์-ไอโอดีด-เอไซด์ เตรียมโดย ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัม และโซเดียมไอโอดีด 135 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และเติมโซเดียมเอไซด์ลงไป (ซึ่ง  $NaN_3$  10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร) ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร
- 3) กรดซัลฟูริกเข้มข้น 36 นอร์มอล
- 4) น้ำแป้ง เตรียมโดย ละลายแป้งมัน 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมกรดซาลิกไซคลิก 0.2 กรัม เพื่อกันบูด
- 5) สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.0250 นอร์มอล
- 6) สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.0250 นอร์มอล

#### วิธีวิเคราะห์

- 1) นำตัวอย่างน้ำบรรจุลงขวดบีโอดีโดยใช้น้ำตัวอย่างล้างภาชนะที่จะบรรจุ 2 ครั้ง บรรจุน้ำให้เต็มขวดและปิดฝาให้สนิทได้น้ำเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ
- 2) ปรับอุณหภูมิของตัวอย่างน้ำให้ได้ 20 องศาเซลเซียส
- 3) นำตัวอย่างน้ำมาเติมออกซิเจนละลายให้อิ่มตัว โดยใช้ปั๊มอากาศประมาณ 15 นาที
- 4) ใสสายยางดูดน้ำตัวอย่างลงในขวดบีโอดี 4 ขวด ประกอบด้วยขวดสีชาขาวใส 1 ขวดและสีดำ 3 ขวด ให้เต็มโดยให้ปลายสายยางอยู่ที่ก้นขวดบีโอดีปิดจุกให้สนิทระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

- 5) นำขวดสีชาใสมาหาค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำทันที ( $DO_0$ ) อีก 3 ขวดสีดำนำไปเพาะเชื้อที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจากครบ 5 วันแล้วทำการวัดออกซิเจนที่ละลายน้ำ ( $DO_5$ )

#### การคำนวณ

$$BOD \text{ (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = DO_0 - DO_5 \quad \text{สมการ ง1}$$

เมื่อ:  $DO_0$  = ค่าดีโอที่หาได้ในวันแรก (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$DO_5$  = ค่าดีโอที่หาได้เมื่อครบ 5 วัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

### 3. การวิเคราะห์ค่าปริมาณออกซิเจนที่ต้องการใช้เพื่อออกซิไดซ์สารอินทรีย์ด้วยสารเคมี (COD) (กลุ่มงานเคมีส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์, 2550)

#### สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (Standard potassium dichromate digestion solution) 0.0167 โมลาร์
2. กรดซัลฟูริกเกรดเอเจนท์ (Sulfuric acid reagent) เตรียมสารละลายผสมระหว่างซิลเวอร์ซัลเฟตและกรดซัลฟูริกเข้มข้น ในอัตราส่วน 5.5 กรัม ของซิลเวอร์ซัลเฟตต่อ 1000 กรัม ของกรดซัลฟูริกเข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลายจนหมด
3. สารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ (Ferroun indicator solution) เตรียมโดยละลาย 1,10 - ฟิแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต (1,10-phenanthroline monohydrate) 1.485 กรัม และสารเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 695 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
4. สารมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (Potassium hydrogen phthalate Standard, KHP) เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (Potassium hydrogen phthalate,  $HOOC_6H_4COOK$ ) 0.425 กรัม (อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
5. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Standard ammonium sulfate solution) เข้มข้น 0.25 โมลาร์ เตรียมโดยละลายสารมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 38.2 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลายและตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

### วิธีวิเคราะห์

- 1) ล้างภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก 20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปใช้งาน เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
- 2) นำตัวอย่างน้ำปริมาณ 5 มิลลิลิตร มาใส่หลอดย่อยสลายที่เตรียมไว้ เติมสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลาย 3 มิลลิลิตร
- 3) ค่อยๆ ใส่กรดซัลฟูริกเกรดเจนท์ 7 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดย่อยสลายตัวอย่างเพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ที่ชั้นตัวอย่างน้ำและสารละลายที่ใช้ในการย่อย
- 4) ปิดจุกหลอดย่อยสลายตัวอย่างให้สนิท แล้วคว่ำหลอดย่อยสลายไปมาหลายๆ ครั้ง เพื่อให้สารผสมกัน
- 5) นำหลอดย่อยสลายตัวอย่างไปใส่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง โดยนำหลอดย่อยสลายวางไว้บนที่วางหลอดทดลองทำ Blank เหมือนกับตัวอย่างทุกขั้นตอน โดยใช้ตัวอย่างเป็นน้ำกลั่น
- 6) เติมเฟอร์โรนินอินดิเคเตอร์ 2 หยด จากนั้น นำไปไทเทรตด้วยเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง)
- 7) นำปริมาตรที่ไทเทรตมาคำนวณใน สมการ ง2

### การคำนวณ

$$\text{COD (มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร)} = 8000M(A-B)/C \quad \text{สมการ ง2}$$

- A = ปริมาณของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตแบลงค์ (มิลลิลิตร)
- B = ปริมาณของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- M = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (โมลาร์)
- C = ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายกิตติพัฒน์ วาริชนันท์
วัน เดือน ปีเกิด	17 มิถุนายน 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	147/1 หมู่ที่ 3 ถนนเลียบคลองรังสิต ตำบลประชาธิปัตย์ อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12130
ประวัติการศึกษา	(2558) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.00 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.
ผลงานทางวิชาการ	Effect of cell density and nutrient deprivation on hydrogen production by unicellular green alga <i>Scenedesmus</i> sp. KMITL- OVG1. Asia-Pacific Journal of Science and Technology. Volume 24. Issue 02. Article ID: APST 24-02-03.