ส่วนที่ 2

# รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
## โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)23.53

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ โดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่อง

Improvement Bio-Hydrogen Production using semi-continuous system

*(1)เลอลักษณ์ จิตรดอน,*

*(1)Lerluck Chitradon,*

---

บทคัดย่อ

รองศาสตราจารย์ ดร.เลอลักษณ์ จิตรดอน1 *

Associate Professor Dr. Lerluck Chitradon1

บทคัดย่อ

ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงระบบการผลิตพลังงานไฮโดรเจนจาก Rubrivivax gelatinosus SB24 โดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่องทั้งแบบ repeated batch และ repeated fed batch และระบบที่ดีที่สุด คือ repeated batch ที่มีการถ่ายเทสารละลายทุกๆ 96 ชั่วโมง ปริมาตรสารละลายถ่ายเทเข้า-ออก คือ 25-50% ให้เวลาในการผลิตก๊าซนานขึ้นจาก 96 ชม.เป็น 365 ชม. การผลิตไฮโดรเจนสะสมมากขึ้น 3 เท่า ของการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ ปริมาณสารละลายเติมเข้า -เอาออก และเวลาในการถ่ายเทสารละลายมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการเจริญ ของแบคทีเรีย Rubrivivax gelatinosus SB24 ที่ใช้กำหนดค่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่องทั้งแบบ repeated batch และ repeated fed batch ได้แก่ อายุเชื้อเริ่มต้นในช่วง late log phase ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.21 มก.เซลล์แห้ง/ มล., ความเข้มแสง 5,000-7,000 ลักส์ และปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด 0.5-5 mM จากการกำหนดปัจจัยต่างๆ ข้างต้น เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch) Rubrivivax gelatinosus SB24 เริ่มผลิตก๊าซใน ชม.ที่ 24 ผลิตก๊าซได้นานเพียง 96 แล้วเริ่มช้าลงและหยุดในชม.ที่ 120 ผลิตไฮโดรเจนสะสมได้ 450-500 มล. ที่ ชม.ที่ 96

ระบบการผลิตก๊าซที่ได้ผลดีที่สุด คือระบบกึ่งต่อเนื่องแบบ repeated batch โดยกำหนดปริมาณการถ่ายเทสารละลาย 50% ทุกรอบ พบว่าแบคทีเรียผลิตก๊าซได้ต่อเนื่อง ข้อได้เปรียบ คือ อัตราการผลิตคงที่ในทุกๆ รอบ แม้จะมีระยะเวลาที่ชะงักการผลิตก๊าซในแต่ละรอบหลังจากถ่ายเทสารละลายเฉลี่ย 40 ชม. ในชม.ที่ 365 ชม.(สิ้นสุดรอบที่ 3) ได้ไฮโดรเจนสะสมมากกว่า 1,300 มล.เล็กน้อย ซึ่งมากกว่าระบบเบ็ดเสร็จ 3 เท่า และยังสรุปว่า หากถ่ายเทสารละลายทุกๆ 96 ชั่วโมงโดยไม่รอให้หยุดการผลิตไฮโดรเจนในแต่ละรอบ โดยใช้ปริมาณการถ่ายเทสารละลาย 25% จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากให้ผลในการลดระยะเวลาที่ชะงักการผลิตก๊าซในแต่ละรอบลง 19 ชม.

คำสำคัญ : การเพิ่มประสิทธิภาพ , การผลิตไฮโดรเจน , ไฮโดรเจนชีวภาพ , แบคทีเรียสังเคราะห์แสง , ระบบเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง

## ABSTRACT

ABSTRACT

We were successful in improving the bio-hydrogen production from Rubrivivax gelatinosus SB24 by semi-continuous cultivation either repeated batch or repeated fed batch. The best system was repeated batch cultivation that volume of solution feeding in and out was 25-50% every 96 h. Hydrogen was continuously produced. At 365 h, accumulated hydrogen 3 times higher than that from batch cultivation. Volume of solution feeding in and out was important.

Factors affecting hydrogen production and growth of this bacterial strain in semi-continuous cultivation were inoculum age at late log phase with initial inoculum size of 0.21 mg DCW/mL including 5,000-7,000 lux light intensity and a limited nitrogen source, 0.5-5 mM. In batch culture under the above conditions, Rubrivivax gelatinosus SB24 produced 400-500 mL cumulative H2. Rate of production reduced in 96 h and stopped at 120 h.

The best semi-continuous system for H2 production was repeated batch. Under the prescribed conditions, using 50% of cell suspension-feeding out and fresh medium-feeding in at 96 h, gave the best results in improving the biohydrogen production. The bacteria continuously produced biohydrogen upto 365 h with the highest H2 accumulated. Advantages of this semi-continuous system was that the rates of biohydrogen production was constant in each cycle, though there was a lag time of H2 production after new medium was added, average 40 h in each cycle. Cumulative H2 at the end of 3rd cycle, 365 h, was slightly higher than 1,300 mL which was 3 times higher than those from batch cultivation. We also found that decreasing volume of the solution feeding in and out to 25%, the lag time of biohydrogen production in each cycle could be 19 h shortened.

Using repeated fed batch cultivation with 5% fresh medium added at every 96 h, hydrogen was also continuously produced until 313 h. Cumulative H2, 800 mL was obtained at 313 h. No H2 was produced in the 4th cycle, though, fresh medium was added at 288 h. There was no lag time after new medium was added. However, rate of H2 production was 50% decreased in each cycle. Biohydrogen production at the end of the 3rd cycle by this repeated fed batch system was 2 times better than that from the batch cultivation, but 1.6 times less than that from the former repeated batch one.

However, We are concerning on scaling up the repeated batch cultivation using our 6-10 litre designed photobioreactor in order to improve the biohydrogen production.

Key words : Improvement efficiency , Hydrogen production , Biohydrogen , Phototrophic bacteria , Repeated batch , Repeated fed batch

---

*(1)ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน*

*(1)Faculty of Science*

*ส่วนที่ 2*

**รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์**

**โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ** 2553

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)23.53

# การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ โดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่อง

Improvement Bio-Hydrogen Production Using Semi-continuous System

*รองศาสตราจารย์ ดร.เลอลักษณ์ จิตรดอน*[1]*

*Associate Professor Dr. Lerluck Chitradon*[1]

## บทคัดย่อ

ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงระบบการผลิตพลังงานไฮโดรเจนจาก *Rubrivivax gelatinosus* SB24 โดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่องทั้งแบบ repeated batch และ repeated fed batch และระบบที่ดีที่สุด คือ repeated batch ที่มีการถ่ายเทสารละลายทุกๆ 96 ชั่วโมง ปริมาตรสารละลายถ่ายเทเข้า-ออก คือ 25-50% ให้เวลาในการผลิตก๊าซนานขึ้นจาก 96 ชม.เป็น 365 ชม. การผลิตไฮโดรเจนสะสมมากขึ้น 3 เท่า ของการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ ปริมาณสารละลายเติมเข้า-เอาออก และเวลาในการถ่ายเทสารละลายมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการเจริญ ของแบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ที่ใช้กำหนดค่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่องทั้งแบบ repeated batch และ repeated fed batch ได้แก่ อายุเชื้อเริ่มต้นในช่วง late log phase ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 0.21 มก.เซลล์แห้ง/มล., ความเข้มแสง 5,000-7,000 ลักส์ และปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด 0.5-5 mM จากการกำหนดปัจจัยต่างๆ ข้างต้น เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch) *Rubrivivax gelatinosus* SB24 เริ่มผลิตก๊าซใน ชม.ที่ 24 ผลิตก๊าซได้นานเพียง 96 แล้วเริ่มช้าลงและหยุดในชม.ที่ 120 ผลิตไฮโดรเจนสะสมได้ 450-500 มล. ที่ ชม.ที่ 96

ระบบการผลิตก๊าซที่ได้ผลดีที่สุด คือระบบกึ่งต่อเนื่องแบบ repeated batch โดยกำหนดปริมาณการถ่ายเทสารละลาย 50% ทุกรอบ พบว่าแบคทีเรียผลิตก๊าซได้ต่อเนื่อง ข้อได้เปรียบ คือ อัตราการผลิตคงที่ในทุกๆ รอบ แม้จะมีระยะเวลาที่ชะงักการผลิตก๊าซในแต่ละรอบหลังจากถ่ายเทสารละลายเฉลี่ย 40 ชม. ในชม.ที่ 365 ชม.(สิ้นสุดรอบที่ 3) ได้ไฮโดรเจนสะสมมากกว่า 1,300 มล.เล็กน้อย ซึ่งมากกว่าระบบเบ็ดเสร็จ 3 เท่า และยังสรุปว่า หากถ่ายเทสารละลายทุกๆ 96 ชั่วโมงโดยไม่รอให้หยุดการผลิตไฮโดรเจนในแต่ละรอบ โดยใช้ปริมาณการถ่ายเทสารละลาย 25% จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากให้ผลในการลดระยะเวลาที่ชะงักการผลิตก๊าซในแต่ละรอบลง 19 ชม.

---

(1) *ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

*Department of Microbiology Faculty of Science Kasetsart University*

เมื่อใช้ระบบกึ่งต่อเนื่องแบบ repeated fed batch ที่อัตราการเติมอาหารใหม่ 5% ทุก 96 ชม. พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตก๊าซต่อเนื่อง โดยไม่มีระยะเวลาที่ชะงักการผลิตก๊าซในแต่ละรอบที่เติมอาหารใหม่ แต่อัตราการผลิตในรอบที่ 2 และ 3 ลดลงรอบละ 50% และหยุดผลิตในชม.ที่ 313 (สิ้นสุดรอบที่ 3) แม้จะเติมอาหารใหม่ในชม.ที่ 288 ก็ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนอีกในรอบที่ 4 ได้ไฮโดรเจนสะสมทั้งหมดเฉลี่ย 800 มล. ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงแบบ batch เกือบ 2 เท่า แต่น้อยกว่าระบบ repeated batch 1.6 เท่า

อย่างไรก็ตาม กลุ่มผู้วิจัยได้พิจารณาถึงการศึกษาผลของการขยายขนาดการผลิตไฮโดรเจนในถัง reactor ที่ได้ออกแบบไว้ ขนาด 6-10 ลิตร ด้วยระบบกึ่งต่อเนื่อง แบบ repeated batch เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพต่อไป

คำสำคัญ: การเพิ่มประสิทธิภาพ, การผลิตไฮโดรเจน, ไฮโดรเจนชีวภาพ, แบคทีเรียสังเคราะห์แสง, ระบบเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง

## ABSTRACT

We were successful in improving the bio-hydrogen production from *Rubrivivax gelatinosus* SB24 by semi-continuous cultivation either repeated batch or repeated fed batch. The best system was repeated batch cultivation that volume of solution feeding in and out was 25-50% every 96 h. Hydrogen was continuously produced. At 365 h, accumulated hydrogen 3 times higher than that from batch cultivation. Volume of solution feeding in and out was important.

Factors affecting hydrogen production and growth of this bacterial strain in semi-continuous cultivation were inoculum age at late log phase with initial inoculum size of 0.21 mg DCW/mL including 5,000-7,000 lux light intensity and a limited nitrogen source, 0.5-5 mM. In batch culture under the above conditions, *Rubrivivax gelatinosus* SB24 produced 400-500 mL cumulative $H_2$. Rate of production reduced in 96 h and stopped at 120 h.

The best semi-continuous system for $H_2$ production was repeated batch. Under the prescribed conditions, using 50% of cell suspension-feeding out and fresh medium-feeding in at 96 h, gave the best results in improving the biohydrogen production. The bacteria continuously produced biohydrogen upto 365 h with the highest $H_2$ accumulated. Advantages of this semi-continuous system was that the rates of biohydrogen production was constant in each cycle, though there was a lag time of $H_2$ production after new medium was added, average 40 h in each cycle. Cumulative $H_2$ at the end of 3$^{rd}$ cycle, 365 h, was slightly higher than 1,300 mL which was 3 times higher than those from batch cultivation. We also found that decreasing volume of the solution feeding in and out to 25%, the lag time of biohydrogen production in each cycle could be 19 h shortened.

Using repeated fed batch cultivation with 5% fresh medium added at every 96 h, hydrogen was also continuously produced until 313 h. Cumulative $H_2$, 800 mL was obtained at 313 h. No $H_2$ was produced in the 4$^{th}$ cycle, though, fresh medium was added at 288 h. There was no lag time after new medium was added. However, rate of $H_2$ production was 50% decreased in each cycle. Biohydrogen production at the end of the 3$^{rd}$ cycle by this repeated fed batch system was 2 times better than that from the batch cultivation, but 1.6 times less than that from the former repeated batch one.

However, We are concerning on scaling up the repeated batch cultivation using our 6-10 litre designed photobioreactor in order to improve the biohydrogen production.

Keywords : Improvement efficiency, Hydrogen production, Biohydrogen, Phototrophic bacteria, Repeated batch, Repeated fed batch

## บทนำ

พลังงาน เป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญต่อการดำรงชีวิต พาณิชย์ เศรษฐกิจ และสังคม รวมถึงความมั่นคงของประเทศ ประเทศไทยมีความต้องการใช้พลังงานปีละกว่า 9 แสนล้านบาท โดยเป็นพลังงานไฟฟ้ากว่า 1,800 กิโลวัตต์-ชั่วโมงต่อคน มีอัตราเพิ่มขึ้น 6-8 % และนำเข้าพลังงานปีละประมาณ 7 แสนล้านบาท นอกจากนี้ยังมีอัตราการขยายตัวของความต้องการใช้พลังงานเพิ่มขึ้นถึงกว่า 14 % ซึ่งสูงสุดในทวีปเอเชีย และประเทศไทยยังต้องพึ่งพาพลังงานจากต่างประเทศสูงถึง 70 % โดยก๊าซธรรมชาติเป็นพลังงานที่พบในประเทศมากที่สุด มีปริมาณสำรองที่พบแล้วเพียง 2,188 ล้านบาร์เรล ในขณะที่คนไทยมีความต้องการใช้ ก๊าซธรรมชาติถึงปีละ 147 ล้านบาร์เรล ซึ่งจะสามารถใช้ก๊าซธรรมชาติได้อีกไม่ถึง 15 ปี ส่งผลให้ประเทศเข้าสู่วิกฤตด้านพลังงานจำเป็นอย่างยิ่งที่คนไทยจะต้องตระหนักและมีสติในการใช้พลังงาน

ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาค้นคว้า เสาะแสวงหาพลังงานในรูปแบบต่างๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคต ทางเลือกหนึ่งของแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคตก็คือ ก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (Clean fuel) ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษ เนื่องจากในกระบวนการเผาไหม้ด้วยก๊าซไฮโดรเจนนั้นได้เพียงน้ำและพลังงานความร้อนเป็นผลิตภัณฑ์เท่านั้น โดยกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้จุลินทรีย์ ไม่ก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม อีกทั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ยังมีความสามารถในการใช้สารอินทรีย์เป็นสารเริ่มต้นได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์, สารประกอบซัลเฟอร์ เป็นต้น

จากการที่หัวหน้าโครงการวิจัยได้เคยศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียกลุ่ม Anoxygenic photosynthetic bacteria มาตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1979 พบว่า เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาใช้เพื่อผลิตพลังงานดังกล่าวได้จำนวนมากพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง โดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม Non-sulfur purple Phototroph เช่น *Rhodopseudomonas sphaeroides Rhodocyclus*

*gelatinosus, Rubrivivax gelatinosa* และ *R. palustris* (Takahashi, *et al.*, 1979, 1980, 1981; Okuda, *et al.*, 1980, 1981; Watanabe, *et al.*, 1980, 1981; Yoneyama, *et al.*, 1981, 1982, 1983; Buranakarl, *et al.*, 1982, 1984, 1985, 1986 a,b,c, 1988; Mahakhan, *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับที่สนใจศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ด้วยเช่นเดียวกับที่สนใจศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ด้วย (Barbosa, *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาต่อถึงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการใช้แป้งดิบชนิดต่าง ๆ (Ngmjareounwong, *et al.*, 2003, 2005) รวมถึงการใช้แป้งสุกชนิดต่างๆ และน้ำทิ้งประเภทแป้งมาเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน (Chitradon, L., *et al.*, 2008; Dechprae, N., *et al.*, 2010a, b; Channarong, W. *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามการทดลองที่ผ่านมา แม้จะสามารถขยายขนาดการผลิตได้ด้วยถังหมักขนาด 10 ลิตร แต่เป็นการผลิตก๊าซด้วยระบบ Batch ซึ่งไม่มีความต่อเนื่อง

คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์เทคโนโลยีการผลิตแบบ semi-continuous เข้ามาพัฒนาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยแบคทีเรีย ซึ่งเป็นวิธีทางชีวภาพนี้ เพื่อให้มีประสิทธิภาพขึ้น ในการศึกษาเบื้องต้นในปี งบประมาณ พ.ศ.2551 ที่ผ่านมา ผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเห็นความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพนี้ โดยใช้ระบบกึ่งต่อเนื่อง แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของขนาดการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการที่มีขนาดเล็ก ผลการทดลองติดตามได้แต่ในระยะชั่วโมงเริ่มต้น (initial rate of production) และ เมื่อใช้ถังหมักแบนขนาดใหญ่เลย คือ 6 ลิตร พบว่า มีอุปสรรคอยู่ เนื่องจากลักษณะถังหมักที่ออกแบบเองยังไม่เหมาะสมกับการประยุกต์มาใช้ระบบกึ่งต่อเนื่อง เช่น ความไม่เหมาะสมในการถ่ายเทของเหลวเข้าและออกจากถังหมัก ปัญหาการปนเปื้อน (contaminate) จากจุลินทรีย์ที่เราไม่ต้องการเมื่อมีการถ่ายเทของเหลวซ้ำหลายหน ดังนั้น คณะผู้วิจัย จึงขอเสนอโครงการวิจัย เพื่อศึกษาและทดลองการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) เพื่อศึกษาระบบที่เหมาะสมรวมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้อง พร้อมหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ขนาดบรรจุ 1.7 ลิตรและความเป็นไปได้ในการขยายขนาดบรรจุเป็น 6-10 ลิตร

## วิธีวิจัย

### การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการหมักแบบ Batch fermentation โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในถังหมักขนาด 1.7 ลิตร (roux flask)

ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยระบบกึ่งต่อเนื่อง ทั้งระบบ repeated batch และระบบ repeated-fed batch cultivation มีปัจจัยหรือพารามิเตอร์ที่มีสำคัญที่ต้องกำหนดต่างๆ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญและ กลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เช่น ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture), อายุของเชื้อเริ่มต้น, ปริมาณอาหารใหม่ (fresh medium) ที่จะเติมเข้าไปแทนที่ปริมาณ cell suspension ที่จะเอาออกจาก reactor, เวลาที่จะถ่ายเทสารละลาย นั่นคือช่วงอายุของเชื้อในการเจริญ, องค์ประกอบของอาหารใหม่ที่จะใส่เข้าไป (โดยเฉพาะองค์ประกอบที่มีผลยับยั้งกลไกการผลิตก๊าซ รวมทั้งความเข้มแสงเมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1) ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่อไปนี้ ต่อการเจริญและกลไกการผลิตไฮโดรเจน :

1.1 อายุของเชื้อเริ่มต้น โดยเลือกเวลาที่เชื้อเจริญในช่วง log phase จากความรู้เรื่อง growth curve ที่มีอยู่แล้ว พิจารณาจากอัตราการเจริญ และอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) วัดการเจริญที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และคำนวณอัตราการเจริญค่า (ln) รวมถึงอัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) วัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ โดยวัดทุกๆ 6 ชั่วโมง จนกว่าจะหยุดผลิตไฮโดรเจน

1.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยกำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 ค่า $OD_{660}$นาโนเมตร 0.25 และ 0.5 ซึ่งเท่ากับจำนวนเซลล์เท่ากับ 0.105 และ 0.21 mg DCW/mL ใช้ปริมาณ 10% (v/v) ของปริมาตรการหมัก (working volume) เปรียบเทียบการเจริญ ลักษณะและปริมาณของการผลิตไฮโดรเจน

1.3 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (L-glutamic acid) ต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูตามิคที่ต่างๆ กัน 2 ค่า คือ 5.0 mM และ 0.5 mM มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งอิเล็คตรอน คือ DL-malic acid เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน

1.4 ความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน การทดลองใช้แสงที่ความเข้มต่างๆ ตั้งแต่ 1,100; 1,400; 3,200; 3,500; 5,000; 6,000 และ 7,200 ลักส์ เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน

ทุกการทดลองศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ที่ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใน photobioreactor ขนาด 1.7 ลิตร มีกรดมาลิค และกรดกลูตามิค เป็นแหล่งอิเล็ตรอน แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ

อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2) ทดลองผลิตไฮโดรเจนแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยกำหนดปัจจัยตามข้อ 1)

## 1. อุปกรณ์วิธีการทดลอง

### 1.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย คือ สายพันธุ์ *Rubrivivax gelatinosus* SB24

### 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ใช้ คือ Minimal medium of Ormerod's (Ormerod *et al*, 1961) ที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน เป็นกรดอินทรีย์โดยใช้ DL-Malic acid และ L-Glutamic acid monosodium salt เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ใน

Photobioreactor ที่เป็น Roux flask ปริมาตรอาหารเริ่มต้น vary ตามการทดลองแต่ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.7 ลิตรเสมอ

**1.3 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (starter culture)**

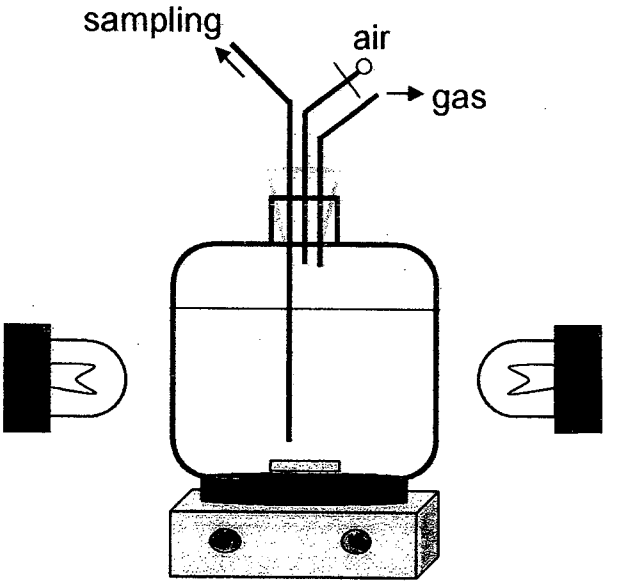
เชื้อเริ่มต้นเป็นแบคทีเรียบริสุทธิที่เจริญในอาหารเหลว Ormerod's ที่มี Malic acid 30 mM เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน และ Glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน อายุ 39-42 ชั่วโมง คือ เจริญในระหว่างระยะ middle logarithmic phase ถึง late logarithmic phase

ล้างเซลล์ด้วย normal saline 2 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ปราศจากสารอาหาร

Suspend ตะกอนเซลล์ในอาหารเหลว Minimal Ormerod's ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ให้ได้ cell suspension เท่ากับ 0.5 เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UNICO 2802 UV/VIS spectrophotometer

**1.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงใน Photobioreactor (Roux flask) ขนาด 1.7ลิตร**

เติมเซลล์เริ่มต้นที่เตรียมได้ในข้อ 1.3 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 (แสดงดังภาพที่ 1) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีการกวนตลอดเวลาด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที




Roux-flask 1.7 ลิตร

**ภาพที่ 1** ระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจนในขวดแบนขนาด 1.7 ลิตร (แผนภาพ)

จากภาพที่ 1 สามารถเก็บตัวอย่างสารละลายเซลล์ เพื่อไปหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ รวมทั้งวัดการเจริญเติบโต โดยเก็บตัวอย่างได้ทางปลายด้าน sampling ปิดปลายด้าน gas และเปิดปลายด้าน air เพื่อให้อากาศเข้ามาแทนที่เมื่อเวลาดูดตัวอย่างออกไป ซึ่งปลายด้าน air จะต่อกับ air filter เพื่อกรองอากาศที่เข้ามาใน photobioreactor

### 1.5 การตรวจวัดค่าที่เกิดจาก Photobioreactor ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ขนาด 1.7 ลิตร

#### 1.5.1 การวัดปริมาตรก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตขึ้น

วัดปริมาตรก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตขึ้นทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 5-10 วัน จนกระทั่งไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ถือเป็นวันสุดท้ายของการผลิตไฮโดรเจน โดยการวัดปริมาณก๊าซที่ผลิตได้ด้วยวิธีการแทนที่น้ำและวิเคราะห์ชนิดของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatography เพื่อยืนยันว่าเป็นไฮโดรเจน

#### 1.5.2 การตรวจวัดการเจริญของเซลล์

ก) เก็บตัวอย่างจาก photobiooreactor ทุกๆ 6 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นของเซลล์ใน photobioreactor ที่ความยาวช่วงคลื่น 660 nm เปรียบเทียบกับ mg protein ของเซลล์ ในกราฟมาตรฐาน

ข) นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเซลล์ โดยนำตัวอย่างจาก photobiooreactor ที่เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วย normal saline แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Lowry, *et al.* (1951)

ค) หามิลลิกรัมของเซลล์แห้ง (dried cell weight, DCW) ของเซลล์แขวนลอยของตัวอย่างจาก photobioreactor ที่เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด ในวันสุดท้าย โดยใช้เซลล์ที่ล้างตะกอนเซลล์แล้ว โดยนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

หาความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณโปรตีนเซลล์ มิลลิกรัมเซลล์แห้ง และค่าความขุ่นของเซลล์ จะได้เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์กับปริมาณโปรตีนเซลล์ และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างมิลลิกรัมเซลล์แห้งกับค่าความขุ่นของเซลล์ ในรายงานนี้เสนอค่าเป็น มิลลิกรัมเซลล์แห้ง

#### 1.5.3 การตรวจวัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

วัดค่าพีเอชของ cell suspension ขณะเซลล์เจริญทุก ๆ ครั้งในตัวอย่างที่เก็บจาก photobiooreactor ด้วยเครื่องวัดพีเอช CyberScan 20

## ผลและวิจารณ์

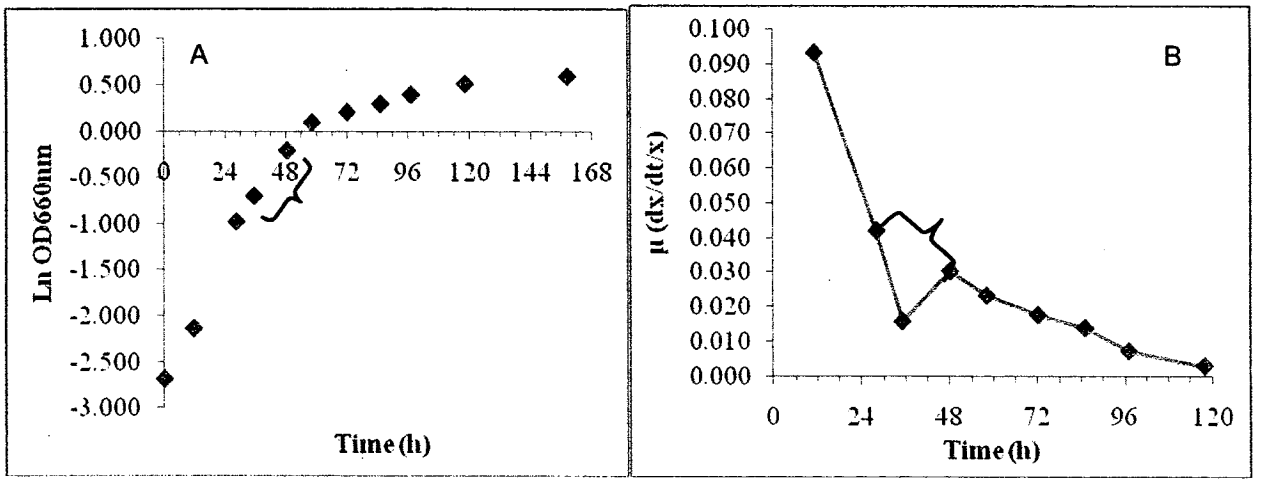
### 2. การศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในขวดแบนขนาด 1.7 ลิตร เมื่อกำหนดพารามิเตอร์ต่าง ๆ

#### 2.1 อายุของเชื้อเริ่มต้น

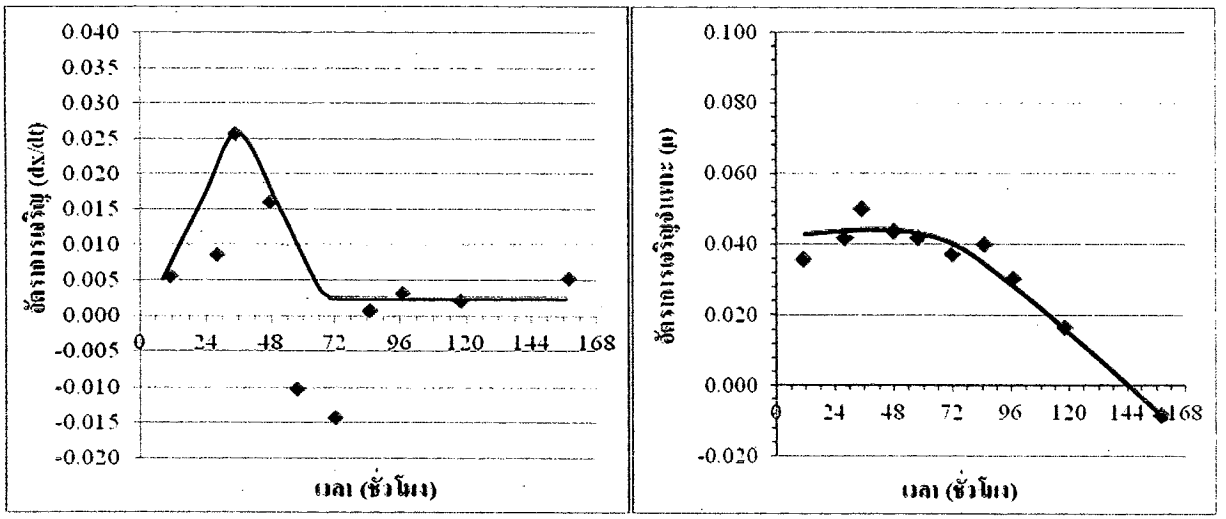
จากรายงานการศึกษาโดยกลุ่มนักวิจัย พบว่า ช่วงที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการผลิตไฮโดรเจนแตกต่างกันเล็กน้อย ส่วนใหญ่ใช้แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในช่วง late log phase (Watanabe, *et al.*, 1980, 1981; Yoneyama, *et al.*, 1981, 1982, 1983; Buranakarl, *et al.*, 1982, 1984, 1985, 1986 a,b,c, 1988) ไปจนถึง early stationary phase (Sasikala *et al.*, 1995) รายงานของ Basak, *et al.* (2007)

ใช้ช่วงกว้างในระยะการเจริญช่วง exponential phase ดังนั้น จึงทดลองหาเวลาที่เป็นระยะ late logarithmic phase เมื่อเพาะเลี้ยงในขวด inoculum ที่จะนำมาใช้ ปริมาตร 380 มล.

(A) (B)




(C) (D)




**ภาพที่ 2** การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 แสดงเป็นค่า ln ของอัตราการเจริญแสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (A) และ ln ของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ ) แสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (B) ค่า ln ของอัตราการเจริญแสดงเป็น มก.เซลล์แห้ง/เวลา (C) และ ln ของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ ) แสดงเป็นค่ามก.เซลล์แห้ง/เวลา (D) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาตรฐานที่มีกรด malic เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 1,000 ลักส์ ในขวด inoculum ที่จะนำมาใช้ ปริมาตร **380 มล.**

อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามากยิ่งเพิ่มจำนวนมากยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว ถ้าเซลล์ไม่มีการเจริญค่า μ มีค่า = 0 ในช่วง exponential phase ค่า μ ค่อนข้างคงที่ นั่นคือ จุลินทรีย์มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ dx/dt เพิ่มขึ้นตาม x ที่

เพิ่มขึ้น จากภาพที่ 2A, 2C อัตราการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นจนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 อัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งคงที่ในชั่วโมงที่ 84 ซึ่งเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำเพาะ (ภาพที่ 2B, 2D ช่วงที่มีอัตราการเจริญจำเพาะหรือ μ ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-58 ซึ่งอยู่ในช่วง exponential phase

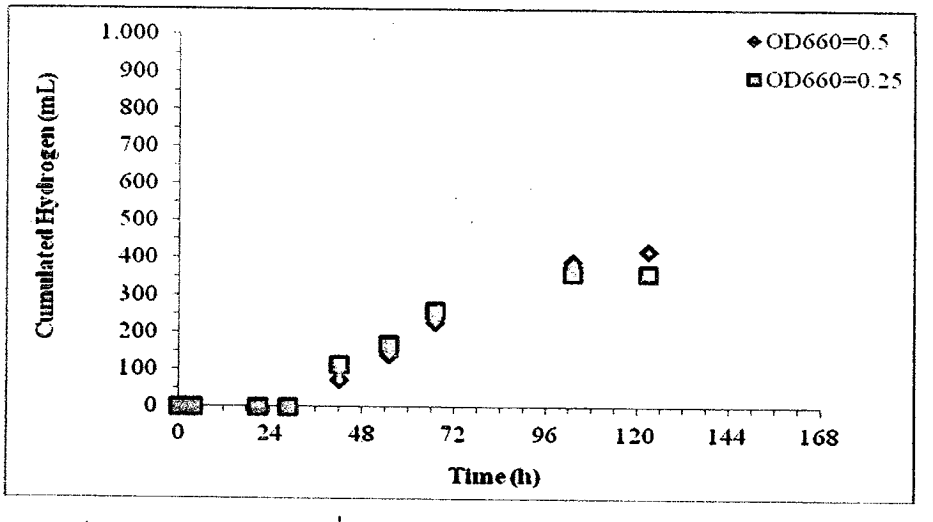
ผลการทดลองที่ได้จากค่าอัตราการเจริญ และ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (ภาพ 2) แสดงให้เห็นว่า ช่วง late log phase ของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในอาหารเหลวมาตรฐานที่มีกรด malic เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง ที่ 40 องศาเซลเซียส คือชั่วโมงที่ 32-48 เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมจะนำมาใช้เป็นแบคทีเรียเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในแต่ละการทดลอง

### 2.2 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ต่อการผลิตไฮโดรเจน

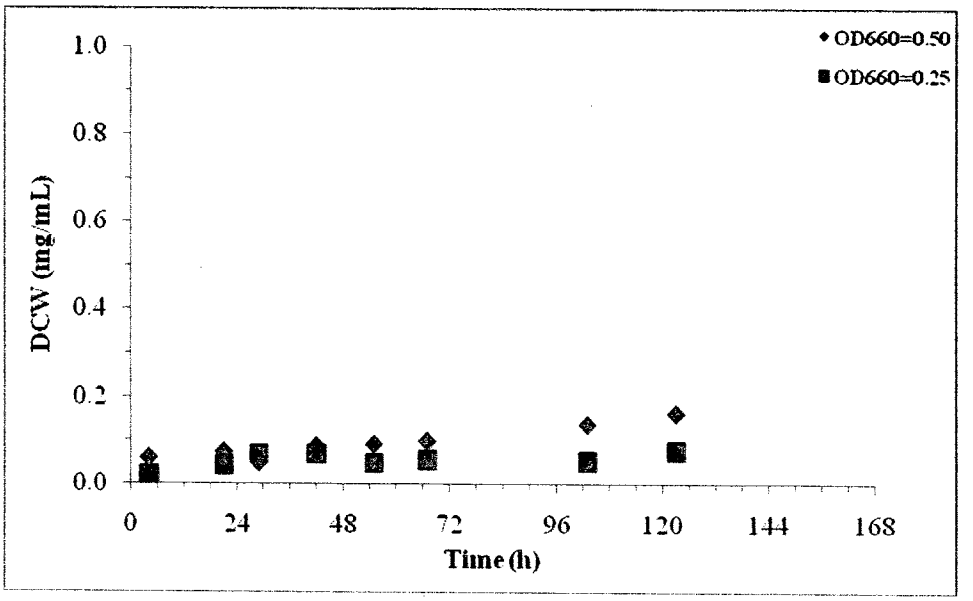
ทดลองใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ที่ต่างกัน 2 ค่า โดยกำหนดปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็นค่าความขุ่นที่ความยาวช่วงคลื่น 660 nm ($OD_{660}$) 2 ค่า คือ 0.25 และ 0.5 ต่อการผลิตไฮโดรเจน

แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ที่มีค่า $OD_{660}$ 0.25 และ 0.5 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 0.105 และ 0.21 mg DCW/mL ตามลำดับ

ผลการทดลอง (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่าปริมาณไฮโดรเจนสะสมเมื่อเซลล์เริ่มต้นมีค่า $OD_{660}$ 0.5 หรือ 0.25 ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนเพราะเซลล์เริ่มผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่เท่ากัน ระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนเท่ากันและ อัตราการผลิตเป็นมิลลิลิตรต่อลิตรของเชื้อต่อ ชม. ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม พอสังเกตได้ว่า เมื่อใช้ เซลล์เริ่มต้นปริมาณน้อยกว่า (ค่า $OD_{660}$ 0.25) จะมีอัตราการผลิตน้อยกว่าเล็กน้อย ดังนั้น จึงเลือกใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีค่า $OD_{660}$=0.5 สำหรับเป็นสารละลายเซลล์เริ่มต้นต่อไป แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควรคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในระบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน




**ภาพที่ 3** ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสม (มล.) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ใน photobioreactor ขนาด 1.7 ลิตร ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 3,000 ลักส์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เมื่อวัดความขุ่นให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร =0.5, 0.25



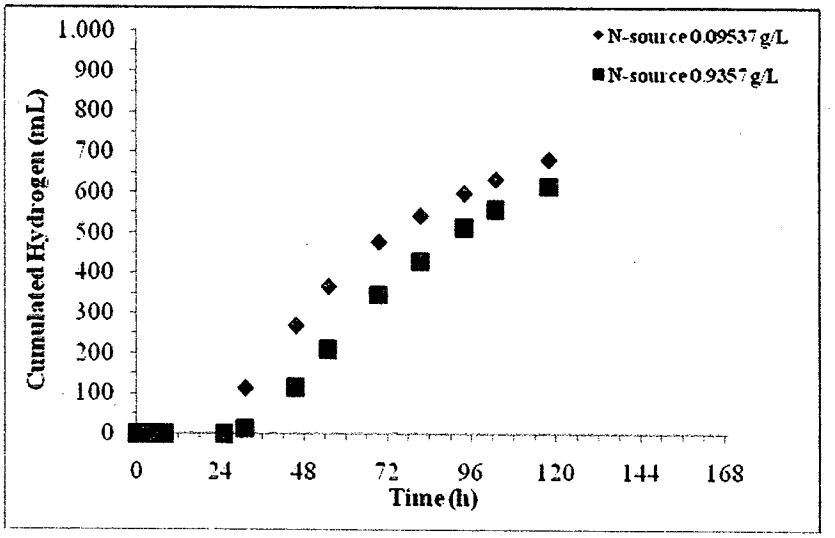

**ภาพที่ 4** ปริมาณมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 3000 ลักส์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์เริ่มต้น เมื่อวัดความขุ่น ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร =0.5, 0.25

### 2.3 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจน

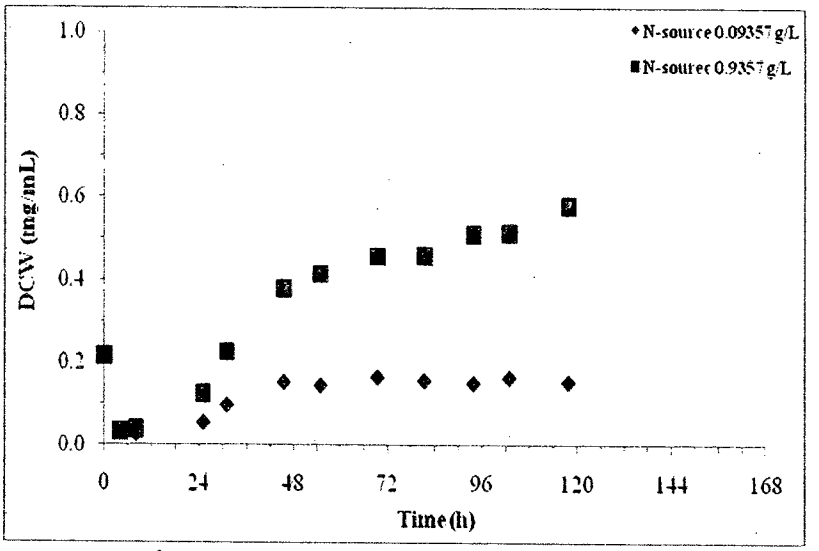
กลไกการผลิตไฮโดรเจนเกิดได้ดีในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด และต้องไม่เป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจากมีผลยับยั้งเอนไซม์สำคัญในกลไก การทดลองนี้ จึงใช้ glutamic acid และลดปริมาณไนโตรเจนลงจากอาหารมาตรฐาน 10 เท่า คือ จาก 5 mM (0.9357 กรัม/ลิตร) ลงเหลือ 0.5 mM (0.09357 กรัม/ลิตร) ผลการทดลองดังภาพที่ 5 แสดงว่า การลดปริมาณแหล่งไนโตรเจนลง 10 เท่ามีผลช่วยทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้นแม้เพียงเล็กน้อย แต่ทำให้เซลล์เริ่มผลิตก๊าซได้เร็วขึ้น เช่น ในชั่วโมงที่ 31 วัดปริมาณไฮโดรเจนจากเซลล์ที่เจริญในที่มีกลูตาเมต 0.5 mM ได้ 115 มล. ในขณะที่ในอาหารมาตรฐานเพิ่งเริ่มผลิตก๊าซวัดได้ 12.5 มล. และอัตราการผลิตไฮโดรเจนก็สูงกว่าด้วย

แต่การลดปริมาณแหล่งไนโตรเจนมีผลเสียต่อการเจริญของเซลล์อย่างชัดเจน (ภาพที่ 6) คือ เซลล์เจริญเข้าสู่ log phase ช้ากว่าและให้ปริมาณเซลล์ที่ ชม.ที่ 120 ลดลงกว่าอาหารมาตรฐาน 3 เท่า

เมื่อคิดปริมาณไฮโดรเจนที่เซลล์ผลิตได้ ได้ผลว่า เมื่อใช้อาหารมาตรฐานที่มี L-Glutamic acid 5 mM ความสามารถของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 1.83 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อเซลล์ 1 มิลลิกรัม และเมื่อลดปริมาณ L-Glutamic acid ลง 10 เท่า ความสามารถของเซลล์ ในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 3 เท่า คือ เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้ 5.74 มิลลิลิตรต่อเซลล์ 1 มิลลิกรัม สรุปได้ว่า การจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนชนิด glutamate มีผลส่งเสริมกลไกในเซลล์ให้ผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้น แต่การจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนมากไปอาจมีผลให้เซลล์ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนสำหรับการสร้างเซลล์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องให้เกิดความสมดุลระหว่างปริมาณที่เซลล์จะนำไปเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณที่ส่งเสริมกลไกการผลิตก๊าซของแต่ละเซลล์




**ภาพที่ 5** ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสม (มล.) ที่แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตในอาหารที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนเป็น L-Glutamic acid ในปริมาณต่างกัน คือ 0.9357 และ 0.09357 กรัม/ลิตร และมีกรด malic เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนและแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 3,000 ลักส์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



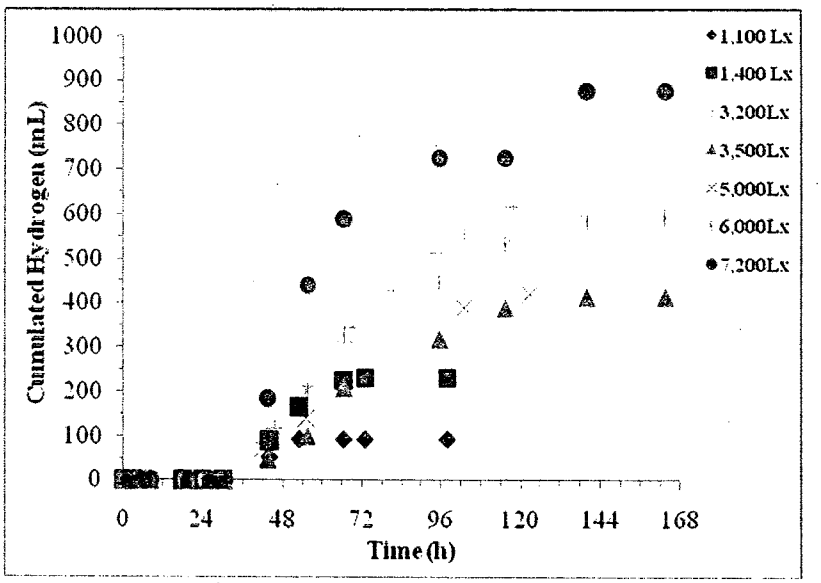

**ภาพที่ 6** ปริมาณมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ที่เจริญในอาหารที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนเป็น L-Glutamic acid ในปริมาณต่างกัน คือ 0.9357 และ 0.09357 กรัม/ลิตร และมีกรด malic เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนและแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 3,000 ลักส์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

### 2.4 แสงต่อการผลิตไฮโดรเจน

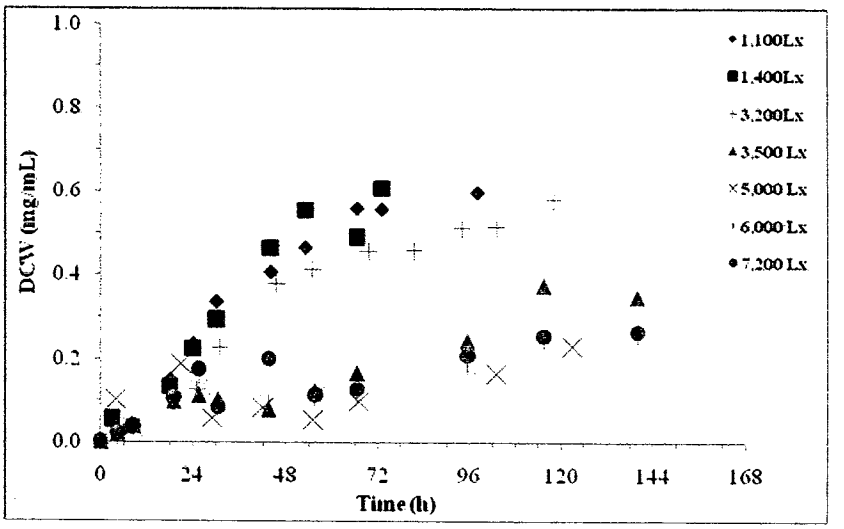
จากผลการทดลอง สรุปได้ว่ากลไกในการผลิตไฮโดรเจนไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกับการเจริญ (ภาพที่ 9) กลไกการสังเคราะห์แสงที่เกิดที่ผนังเซลล์ กลไกทั้งสองแย่งอิเล็กตรอนจากการสังเคราะห์แสงกันเอง อย่างไรก็ตาม เซลล์ก็ต้องการอิเล็กตรอนเพื่อใช้สร้างพลังงานและโปรตีน รวมทั้งสาร derivative ของรงควัตถุที่จำเป็นในการสังเคราะห์แสง พบว่า ยิ่งเพิ่มความเข้มแสงมากขึ้น อิเล็กตรอนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าการเจริญ ความเข้มแสงสูงกว่ามีผลดีมากกว่าต่อการผลิตไฮโดรเจน (ภาพที่ 7)

เมื่อความเข้มแสงสูงถึง 7,200 ลักส์ สายพันธุ์ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 เจริญ ผลิตไฮโดรเจนสะสมได้สูงถึง 877 มล.ในชม.ที่ 96 และให้อัตราการผลิตที่เร็วกว่าเมื่อใช้ความเข้มแสงที่ต่ำกว่า เช่น เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มแสง 1,100 ลักส์ แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าถึง 7.5 เท่า ที่ความเข้มแสงสูงถึง 7,200 ลักส์ อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 10 มิลลิลิตร/ลิตร/ชั่วโมง อัตราการผลิตไฮโดรเจนต่อ 1 เซลล์ (คิดในวันสุดท้าย) เท่ากับ 1.95 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (ภาพที่ 7)

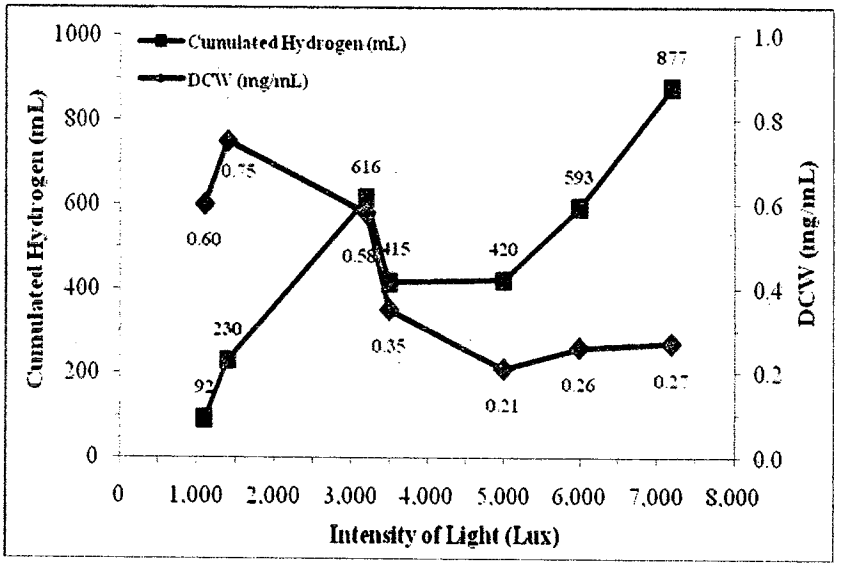
สำหรับการเจริญของเชื้อเมื่อเพิ่มความเข้มแสง (ภาพที่ 8) พบว่า ไม่สามารถได้ค่าจริงของการเจริญได้ เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มแสง จากน้อยไปมาก เกิดปรากฏการณ์ที่ยิ่งเพิ่มความเข้มแสงขึ้น เซลล์ยิ่งเกาะที่ข้าง reactor มากขึ้นและ/หรือตกตะกอนมากขึ้น ส่งผลให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเซลล์มาวัดค่าได้ถูกต้อง ปริมาณเซลล์แห้งในภาพที่ 8 ในช่วงชม.ต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างจึงเป็นแค่ค่าที่แสดงปริมาณเซลล์แขวนลอย และไม่ใช่ค่าจริงของการเจริญ




**ภาพที่ 7** ปริมาณไฮโดรเจนสะสม (มล.) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสงต่างๆ (1,100 1,400 3,200 3,500 5,000 6,000 และ 7,200 ลักส์)




**ภาพที่ 8** ปริมาณของเซลล์แขวนลอยที่ไม่เกาะข้าง photobioreactor ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ตามเวลาต่างๆ คิดเป็นมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (มก./มล.) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสงต่างๆ (1,100 1,400 3,200 3,500 5,000 6,000 และ 7,200 ลักส์)




**ภาพที่ 9** ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด (มล.) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 และปริมาณมิลลิกรัมเซลล์แห้งในวันสุดท้าย (มก./มล.) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสงต่างๆ (1,100 1,400 3,200 3,500 5,000 6,000 และ 7,200 ลักส์)

### 3. การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 แบบกึ่งต่อเนื่อง

กำหนดปัจจัยในการศึกษาเบื้องต้นที่จะผลิตไฮโดรเจนด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องในครั้งที่ 1 นี้ใช้อาหารเหลวมาตรฐาน ที่มี DL-Malic acid เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอิเล็กตรอน ใช้กรดกลูตามิค (L-Glutamic acid) เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 5,000 ลักส์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการกำหนดปัจจัยที่จะทำการทดลองในการผลิตไฮโดรเจนแบบกึ่งต่อเนื่อง ทั้งใน repeated batch และ repeated fed-batch

### *3.1 การทดลองที่ 1*

ใช้อาหารเหลวมาตรฐานที่มี กรดกลูตามิค 5.0 mM (0.9357 กรัม/ลิตร) และ DL-Malic acid 30.0 mM (4.0227 กรัม/ลิตร) ในขนาดความจุ 1,700 มล. ติดตาม profile การสร้างไฮโดรเจนในเวลาต่างๆ อย่างต่อเนื่อง แล้วทุกๆ 96 ชั่วโมง คือ ชม.ที่ 96, 192 และ 288 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์ ออกปริมาตร 5%และเติมอาหารเหลวมาตรฐานใหม่ลงไป โดยกำหนดให้เมื่อเติมอาหารเหลวใหม่ลงไป จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดกลูตามิค เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเท่ากับลดความเข้มข้นของกลูตามิคลง 10 เท่าจากอาหารมาตรฐานเริ่มต้น ส่วนความเข้มข้นสุดท้ายของกรดมาลิคยังเท่าเดิม คือ 30.0 มิลลิโมลาร์ (ทั้งนี้เนื่องจากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ที่ความเข้มข้นของกรดกลูตามิคลดลง 10 เท่า ช่วยทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น) การทดลองนี้ จัดเป็นการเพาะเลี้ยงแบบ **repeated fed batch** คือมีการเติมสารอาหารใหม่และเติมในความเข้มข้นหรือปริมาณน้อยๆ

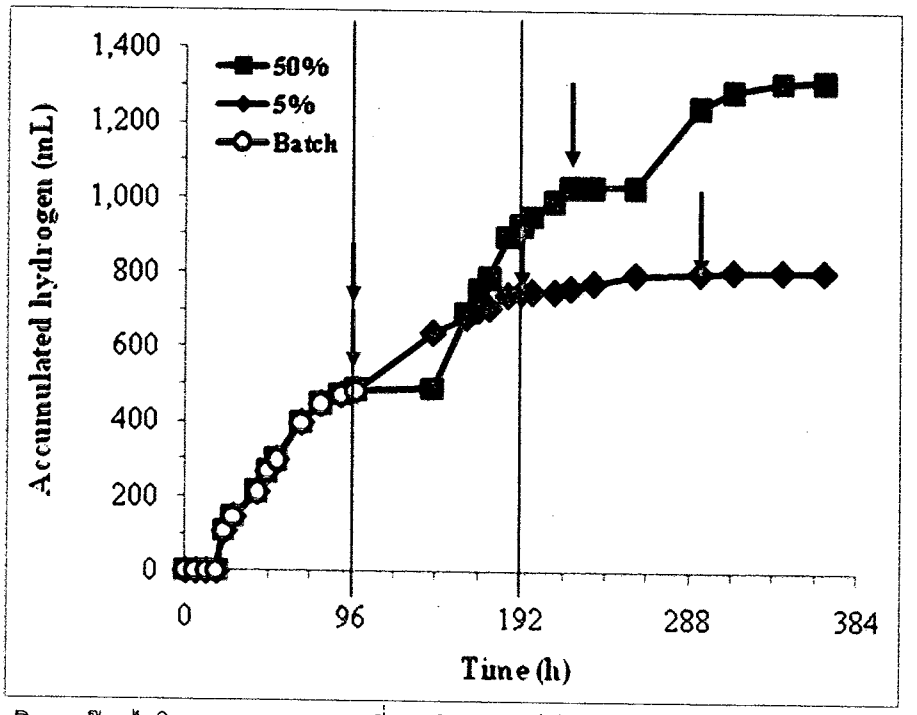
### *3.2 การทดลองที่ 2*

ใช้อาหารเหลวมาตรฐานที่มีกรดกลูตามิค 5.0 mM (0.9357 กรัม/ลิตร) และ DL-Malic acid 30.0 mM (4.0227 กรัม/ลิตร) ในขนาดความจุ 1,700 มล. ติดตาม profile การสร้างไฮโดรเจนในเวลาต่างๆ อย่างต่อเนื่อง และ เมื่อการผลิตไฮโดรเจนเริ่มคงที่ (คือ ที่ชั่วโมงที่ 96 และ 220) นำสารละลายเซลล์ออก 50% ของปริมาตรการหมัก (850 มล.) และเติมอาหารเหลวมาตรฐานใหม่ลงไป ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดกลูตามิค เท่ากับ 5.0 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นสุดท้ายของกรดมาลิคยังคงเท่าเดิม การทดลองนี้จัดเป็น **repeated batch** คือ การใช้สารละลายเซลล์เดิมที่เจริญช่วง late log phase มาเป็นเชื้อเริ่มต้นในขั้นต่อไปเมื่อเติมอาหารใหม่

ภาพที่ 10 เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในขวด 1.7 ลิตร ที่เพาะเลี้ยง 2 วิธี คือ แบบ repeated fed batch และ repeated batch จะเห็นว่าลักษณะการผลิตก๊าซไฮโดรเจน มี profile เหมือนกันในรอบแรก (0-96 ชม.) และเป็นลักษณะเดียวกับการเลี้ยงเชื้อแบบ batch

ภาพที่ 11 แสดงมิลลิกรัมเซลล์แห้ง (A) และการเปลี่ยนแปลง pH ใน reactor 1.7 ลิตรที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบ repeated fed batch และ repeated batch (B)

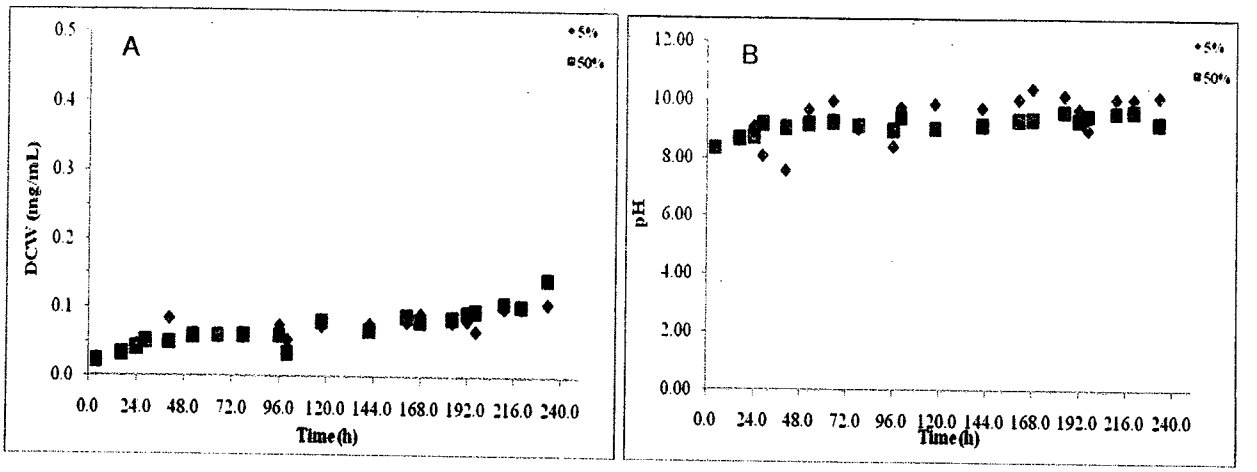
ผลการทดลอง พบว่า ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture แบคทีเรียเริ่มผลิตไฮโดรเจนใน ชม.ที่ 24 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจะสูงในช่วงสั้นๆ เฉพาะตั้งแต่ชม.ที่ 18-29 ได้ 12 มล./ลิตร/ชั่วโมง แล้วค่อยๆ ลดอัตราการผลิตลงเหลือ 3-4 มล./ลิตร/ชั่วโมง และที่ชม.ที่ 96 อัตราการผลิตก๊าซช้าลงมากและหยุดใน ชม.ที่ 123 ได้ไฮโดรเจนสะสมอยู่ในช่วง 450-500 มล.




**ภาพที่ 10** ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสม (มล.) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 5000 ลักส์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบ 2 วิธี คือ repeated fed batch ปริมาตรอาหารใหม่ที่เติมเข้าเป็น 5% และความเข้มข้นสุดท้ายของกรดกลูตามิคเป็น 0.5 mM และแบบ repeated batch ที่ปริมาตรอาหารใหม่และเซลล์ ที่นำเข้าและเอาออกเป็น 50% ที่ทำให้ ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดกลูตามิคเป็น 5 mM

◆ ปริมาตรที่เอาออก และที่เติมอาหารใหม่ = 5% โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดกลูตามิค เป็น 0.5 mM ↓เติมทุกๆ 96 ชั่วโมง

■ ปริมาตรที่เอาออกและที่เติมอาหารใหม่ = 50% โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดกลูตามิค เป็น 5 mM ↓เติมเมื่อปริมาณก๊าซที่ผลิตได้เริ่มคงที่ คือ ที่ชม.ที่ 96 และ 220)




**ภาพที่ 11** ปริมาณเซลล์แห้ง (มก./มล.) ที่เปลี่ยนแปลงตลอดการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แบบกึ่งต่อเนื่อง (A) ค่า pH ใน photobioreactor (B); Repeated fed batch ( ◆) Repeated batch ( ■)

เมื่อปรับปรุงระบบ ให้เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ repeated fed batch สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่อง จากชม.ที่ 96 เป็นต้นไปได้โดยไม่มีระยะหยุดชะงัก เมื่อเพาะเลี้ยงไปจน

สิ้นสุดรอบที่ 2 คือที่ 192 ชม. ได้ไฮโดรเจนสะสม 748 มล.และหยุดผลิตก๊าซไฮโดรเจนในชม.ที่ 313 ได้ไฮโดรเจนทั้งสิ้นประมาณ 800 มล. ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงแบบ batch เกือบ 2 เท่า และสามารถยืดเวลาการผลิตได้เป็น 217 ชม. แต่อัตราการผลิตในรอบที่ 2 และรอบที่ 3 ลดลงรอบละ 50%และ หยุดผลิตในชั่วโมงที่ 313 ชม.แม้จะมีการเติมอาหารใหม่อีกในชม.ที่ 288 ก็ไม่พบว่ามีก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้นอีก ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้แหล่งไนโตรเจนจำกัดเกินไป ดังนั้นแม้ปริมาณแหล่งไนโตรเจน 5%จะเหมาะสมกับระบบ Batch แต่จะเห็นว่า ในระบบ Fed Batch ปริมาณไนโตรเจนขนาดนี้ยังไม่เหมาะสม

เมื่อใช้ ระบบ repeated batch มาปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยถ่ายอาหารเก่าพร้อมเซลล์บางส่วนออกไป แล้วเติมอาหารใหม่ในปริมาณ 50% ของ photobioreactor พบว่า แบคทีเรียให้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่องต่อจากชม.ที่ 96 เป็นต้นไปเช่นกัน และให้ปริมาณไฮโดรเจนดีกว่าระบบแรกและระบบเบ็ดเสร็จมาก แต่มีระยะหยุดชะงักหลังนำสารละลายเข้าออก ประมาณ 40 ชม.ก่อนแบคทีเรียจะเริ่มผลิตก๊าซไฮโดรเจนใหม่ในแต่ละรอบ ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซ (คิดจากอัตราการผลิตต่อลิตรของเชื้อต่อชม.) ดีกว่าระบบแรก กล่าวคือ แบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ต่อเนื่องต่อไป ถึง 365 ชม. อัตราการผลิตคงที่ในทุกๆ รอบใกล้เคียงกับรอบที่ 1 ทำให้ได้ไฮโดรเจนสะสมมากกว่า 1,000 มล.ใน 233 ชม.(สิ้นสุดรอบที่ 2) และได้ไฮโดรเจนสะสมทั้งหมดมากกว่า 1,300 มล.เล็กน้อย ในชม.ที่ 365 ชม.(สิ้นสุดรอบที่ 3) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าการผลิตไฮโดรเจนแบบ batch เกือบ 3 เท่าและมากกว่าระบบ repeated fed batch 1.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตก๊าซในรอบที่ 2 และ 3 กับระบบ repeated fed batch ได้ผลที่ดีกว่ามาก และยังมีข้อสังเกตว่า ในรอบที่ 3 ระยะเวลาหยุดชะงักการผลิตสั้นลงด้วย หากยังคงถ่ายเทอาหารเก่าและเติมอาหารใหม่ต่อไป ก็น่าจะยังคงการผลิตไฮโดรเจนในอัตราที่สูงนี้ต่อไปได้

วิธีการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ให้ปริมาณเซลล์เท่ากัน นั่นคือ เซลล์สามารถเจริญได้ดีในระบบทั้งสองไม่แตกต่างกัน ค่า pH ในระบบทั้งสองอยู่ในช่วง pH 9 มีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อยในช่วงชม.ท้ายๆ ของการเจริญแต่ละรอบก่อนเติมอาหารใหม่ เมื่อเติมอาหารใหม่ เซลล์นำไปใช้ในเมแทบอลิซึม แล้วทำให้ค่า pH กลับขึ้นไปที่ 9 แต่ในระบบ repeated fed batch การเปลี่ยนแปลงค่า pH มีมากกว่า

***3.3 การทดลองที่ 3*** (=repeated batch ที่กำหนดปริมาตรเอาเข้าเอาออก 3 ค่า 25,75,90)

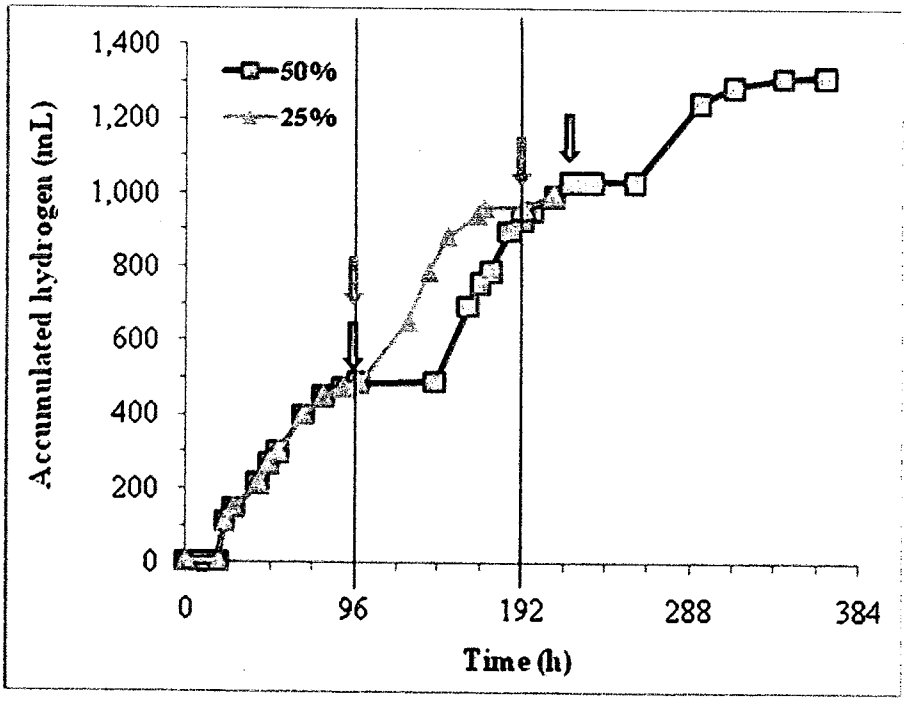
จากการเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนแบบกึ่งต่อเนื่องโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ใน repeated batch และ repeated fed-batch culture จึงเลือกใช้ระบบ repeated batch มาใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากรายงานของ Radmann *et. al.*,2007 ที่รายงานการเพิ่มผลผลิตของเซลล์จุลินทรีย์ได้ดีเมื่อใช้การเพาะเลี้ยงแบบ Repeated batch เช่นกัน นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงการใช้ Repeated batch เพาะเลี้ยงแบคทีเรียอื่นแล้วสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนในกระบวนการ dark fermentation เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานแป้ง ด้วยแบคทีเรียผสม *Clostridium butyricum* และ *Enterobacter aerogenes* ที่สามารถเพิ่มขึ้นได้ถึง 70% (Yokoi *et. al.*, 2002, Yokoyama *et. al.*, 2007)

ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ขึ้นไปอีก เราจึงศึกษาเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสมของสารละลายที่ควรจะถ่ายเทเข้า-ออก ในระบบ repeated batch ระหว่าง 25, 75 และ 90% ของปริมาตรทั้งหมด (1,700 มล.) เปรียบเทียบกับ 50% แต่การทดลองครั้งนี้ เติมอาหารใหม่เมื่อครบทุกๆ 96 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 96 และ 192) คือก่อนที่เซลล์จะหยุดสร้างก๊าซ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดกลูตามิคและกรดมาลิคคงที่ ปริมาตรสุดท้ายในระบบคงที่เท่ากับ 1,700 มล.

ผลการทดลอง พบว่า ผลที่ดี คือปริมาณสารละลายและเซลล์ที่ถ่ายเทเป็น 25, 50% ที่ผลิตก๊าซได้อย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกันและ ในรอบที่ 2 ให้ปริมาณก๊าซสะสมเท่ากัน อัตราการผลิตเท่ากัน แต่เมื่อปริมาณสารละลายและเซลล์ที่ถ่ายเทเป็น 25% ระยะชะงักการสร้างก๊าซสั้นลง 19 ชม. (ภาพที่ 12) ส่วนการถ่ายเทสารละลายเซลล์เข้า-ออกในปริมาณสูง คือ 75 และ 90% ให้ผลไม่ดีเท่า(ภาพที่ 13) ทั้งในแง่ของอัตราการผลิตที่ลดลงและปริมาณไฮโดรเจนสะสม และระยะชะงักการสร้างก๊าซที่นานกว่า

มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่ลดลงเล็กน้อยในช่วงชม.ท้ายๆ ของการเจริญแต่ละรอบก่อนเติมอาหารใหม่เช่นกัน เมื่อเติมอาหารใหม่ เซลล์นำไปใช้ในเมแทบอลิซึม แล้วทำให้ค่า pH กลับขึ้นไปที่ 9 เช่นเดิม (ภาพที่ 14)

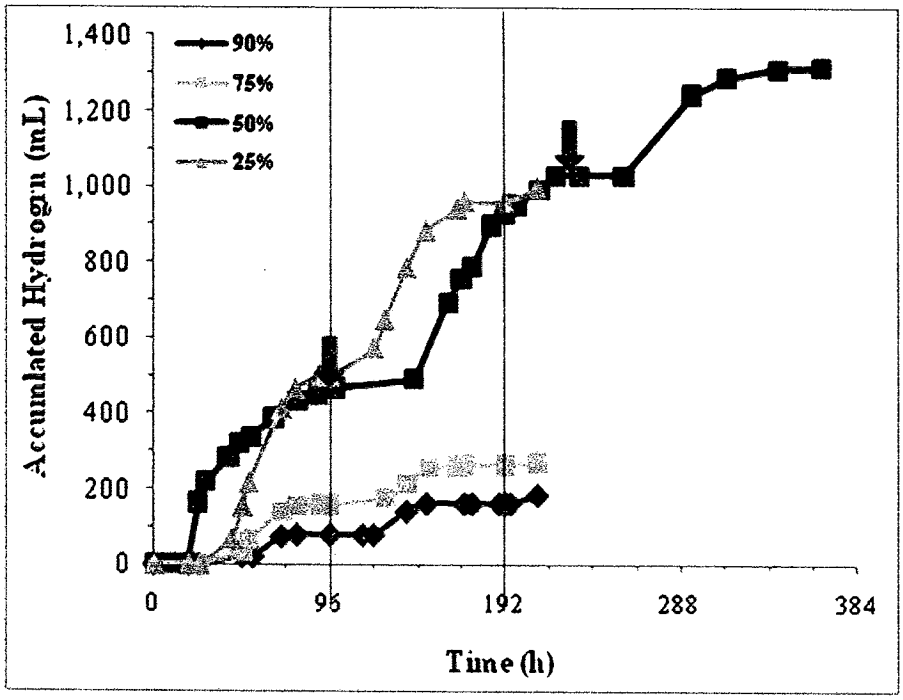
จากภาพที่ 15 จะเห็นว่า ก๊าซที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างขึ้น เป็นก๊าซไฮโดรเจน เพียงชนิดเดียว




**ภาพที่ 12** ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสม (มล.) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 แบบกึ่งต่อเนื่อง Repeated batch ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง 5000 ลักส์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบปริมาตรสารละลายและเซลล์ ที่นำเข้า-เอาออก ต่างๆ กัน คือ 25%, 75% และ 90% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ 50%

( ▲ ปริมาตรที่เอาออก-เติมอาหารใหม่ = 25% เติมทุกๆ 96 และ 192 ชั่วโมง)

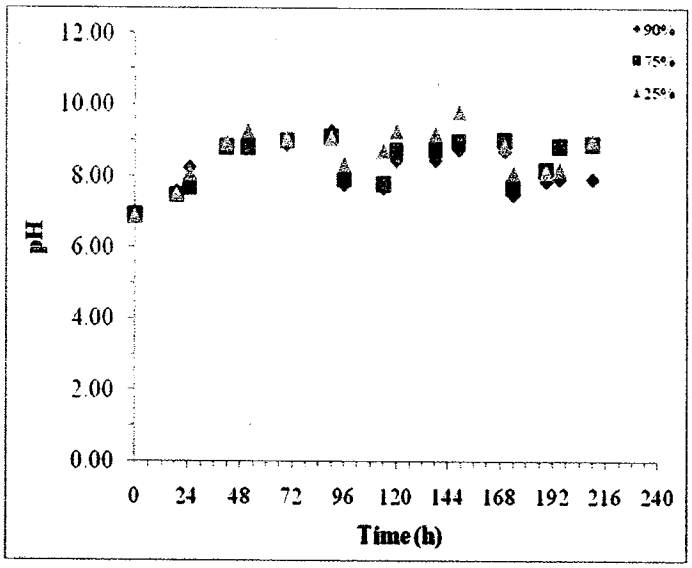
( ▼ ปริมาตรที่เอาออก-เติมอาหารใหม่ =50% เติมเมื่อปริมาณก๊าซเริ่มคงที่ คือ 96 และ 220 ชั่วโมง)



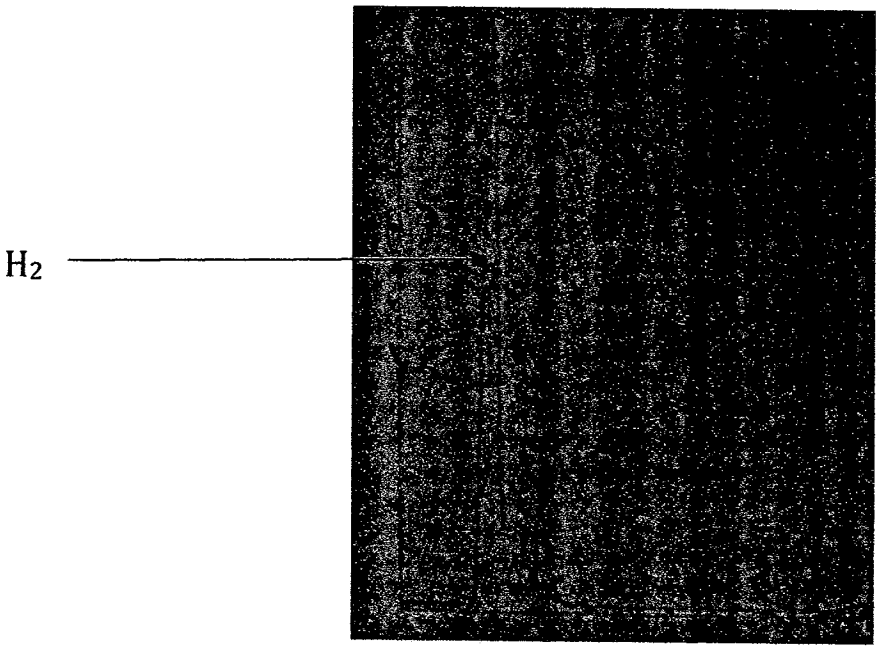

**ภาพที่ 13** ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสม (มล.) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 แบบกึ่งต่อเนื่อง Repeated batch ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบปริมาตรสารละลายเซลล์ ที่นำเข้า-เอาออก ต่างๆ กัน คือ 25% (425 มล.) 75% (1,2750 มล.) และ 90% (1,530) ตามลำดับ

( ▲, ▒ และ◆ปริมาตรที่เอาออก-เติมอาหารใหม่= 25% 75% และ 90% ตามลำดับ เติมทุกๆ 96= ชั่วโมง ( | 96 และ 192 ชั่วโมง)

( ■ปริมาตรที่เอาออก-เติมอาหารใหม่=50% เติมเมื่อปริมาณก๊าซที่ผลิตได้เริ่มคงที่ คือ↓96 และ 220 ชั่วโมง)




**ภาพที่ 14** ค่า pH เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แบบกึ่งต่อเนื่อง Repeated batch




**ภาพที่ 15** แสดงก๊าซไฮโดรเจนเมื่อวัดโดยวิธี Gas Chromatography

(หมายเหตุ 2 peak หลังเป็น artifact เกิดจากการฉีด GC ด้วยเข็มที่ใช้ พบว่าเกิดเสมอ แม้เมื่อฉีด gas ที่เป็น control)

## สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเบื้องต้นแบบ batch เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 แบบ batch ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Ormerod's ที่มีกรดมาลิค เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอิเล็คตรอน ได้ค่า *ln* และ อัตราการเจริญจำเพาะ ($\mu$) ที่แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่มีการเจริญภายใต้สภาวะที่กำหนด ในช่วง late log phase คือชั่วโมงที่ 32-48 เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การใช้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น ที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 0.21 mg DCW/mL และ 0.105 mg DCW/mL ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนอย่างเห็นได้ชัด เมื่อใช้เซลล์ที่มีอายุ 32-48 ชม.พบว่าเริ่มผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่เท่ากัน ระยะเวลาในการผลิตไฮโดรเจนเท่ากัน และ อัตราการผลิตเป็น มล./ลิตรของเชื้อ/ชม. ใกล้เคียงกัน แต่จากการทดลอง พบว่า การใช้จำนวนเซลล์ 0.21 mg DCW/mL จะเห็นอัตราการผลิตก๊าซและปริมาณไฮโดรเจนสะสมมากกว่าเล็กน้อย ในการวิจัยนี้เสนอแนะให้ใช้ เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.21 mg DCW/mL

การเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด คือ กรด Glutamic เป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากชนิดของไนโตรเจนมีผลต่อเอนไซม์ที่คะตะไลส์กระบวนการผลิตไฮโดรเจน และปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินไปมีผลยับยั้งเอนไซม์นั้น พบว่า L-Glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมและไม่ควรใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ผลการทดลองใน batch culture พบว่า เมื่อใช้ L-Glutamic acid 5 mM ความสามารถของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 1.83 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อเซลล์ 1 มิลลิกรัม และเมื่อลดปริมาณ L-Glutamic acid ลง 10 เท่า ความสามารถของเซลล์ ในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 3 เท่า คือ

เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้ 5.74 มิลลิลิตรต่อเซลล์ 1 มิลลิกรัม ดังนั้น การจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนชนิด glutamate มีผลส่งเสริมกลไกในเซลล์ให้ผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้น

ความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แต่การเจริญของเซลล์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มแสง และเกิดปรากฏการณ์ที่เซลล์เกาะที่ข้าง reactor มากขึ้นและ/หรือตกตะกอนมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสงขึ้น

สรุปได้ว่า ในผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการเจริญ ของแบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 นอกจากสภาวะการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน, มีแสง ที่อุณหภูมิสูง (40 องศาเซลเซียส) แล้ว ปัจจัยที่สำคัญอื่นที่สำคัญ ได้แก่ อายุเชื้อเริ่มต้น, ความเข้มแสง และปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด และปัจจัยที่ควรพิจารณาด้วย คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น

ในการผลิตไฮโดรเจนแบบเบ็ดเสร็จ (batch) แบคทีเรียเริ่มผลิตก๊าซใน ชม.ที่ 24 ผลิตก๊าซได้นานเพียง 96 แล้วเริ่มช้าลงและหยุดในชม.ที่ 120 ได้ไฮโดรเจนสะสม 450-500 มล. ที่ชม.ที่ 96

ในการผลิตไฮโดรเจนแบบกึ่งต่อเนื่องแบบ repeated fed-batch ที่เติมอาหารใหม่ 5% ทุก 96 ชม. พบว่า แบคทีเรียผลิตก๊าซต่อเนื่อง โดยไม่มีระยะเวลาที่ชะงักการผลิตก๊าซในแต่ละรอบที่เติมอาหารใหม่ แต่อัตราการผลิตในรอบที่ 2 และรอบที่ 3 ลดลงรอบละ 50% ผลิตก๊าซได้นาน 313 ชม. แล้วหยุดลง แม้จะมีการเติมอาหารใหม่อีกในชม.ที่ 288 ก็ไม่พบการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นในรอบสุดท้าย ก๊าซไฮโดรเจนสะสมในชม.สุดท้ายคือชม.ที่ 313 ได้ไฮโดรเจนสะสมประมาณ 800 มล. ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงแบบ batch เกือบ 2 เท่า และสามารถยืดเวลาการผลิตได้ไปได้อีก 193 ชม.

ในการผลิตไฮโดรเจนแบบกึ่งต่อเนื่องแบบ repeated batch มาปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเชื้อ ให้ผลการการผลิตไฮโดรเจนที่ดีกว่าระบบแรกมาก การผลิตไฮโดรเจนแบบ repeated batch นี้ กำหนดให้การถ่ายสารละลายเซลล์ออกจากระบบ 50% และเติมอาหารใหม่ปริมาตรเท่าเดิม ในชั่วโมงที่เซลล์หยุดผลิตไฮโดรเจน (คือ ที่ชั่วโมงที่ 96 และ 220) และควบคุมให้ปริมาตรในระบบคงเดิมและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแหล่งให้อิเล็กตรอนและแหล่งไนโตรเจนเท่าเดิม ผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ต่อเนื่องถึง 365 ชม.และอาจจะต่อไปอีก และได้ก๊าซไฮโดรเจนทั้งหมดในชม.ที่ 365 มากกว่า 1,300 มล. เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนแบบ batch ได้มากกว่าเกือบ 3 เท่า หากยังคงถ่ายเทอาหารเก่าและเติมอาหารใหม่ต่อไป ก็น่าจะยังคงการผลิตไฮโดรเจนในอัตราที่สูงนี้ต่อไปได้

จากการนำระบบ repeated batch มาศึกษาต่อ เพื่อดูปรับเปลี่ยนปริมาณการถ่ายเทสารละลายเข้า-ออกในช่วง 25, 75 และ 90% ถ่ายเทสารละลายเซลล์ ทุกๆ 96 ชั่วโมง (คือ ชั่วโมงที่ 96 และ 192) ซึ่งเป็นเวลาที่เซลล์เริ่มผลิตก๊าซน้อยแต่ยังไม่หยุดผลิตก๊าซ พบว่า เมื่อปริมาณสารละลายและเซลล์ที่ถ่ายเทเป็น 25, 50% เซลล์ผลิตก๊าซได้อย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกัน และในรอบที่ 2 ให้ปริมาณก๊าซสะสมเท่ากัน อัตราการผลิตเท่ากัน แต่พบว่า หากใช้ปริมาณสารละลายและเซลล์ที่ถ่ายเทเป็น 25% จะสามารถลดระยะชะงักการสร้างก๊าซให้สั้น

ลงได้ถึง 19 ชม. คือเซลล์ใช้เวลาเพียง 24 ชม.ก็สามารถสร้างก๊าซใหม่ได้แล้ว การถ่ายเทสารละลายเข้า-ออก 25%-50% ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเจริญและค่า pH

สรุปได้ว่า สามารถปรับปรุงระบบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่องทั้งแบบ repeated batch และ repeated fed batch และระบบที่ดีที่สุดคือ repeated batch และควรถ่ายเทสารละลายทุกๆ 96 ชั่วโมงปริมาตรสารละลายถ่ายเทเข้า-ออก คือ 25-50% เวลาในการผลิตก๊าซนานขึ้นจาก 96 ชม.เป็น 365 ชม. การผลิตไฮโดรเจนสะสมมากขึ้น 3 เท่า ของการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ ปริมาณสารละลายเติมเข้า-เอาออก และเวลาที่เติมก่อนเซลล์หยุดผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

## เอกสารอ้างอิง

1. Barbosa, M. J., J. M. S Rocha, J. Tramper and R. H. Wijffels. (2001). Acetate as a carbonsource for **hydrohen production by photo**synthetic bacteria. **J. Biotechnol.** 85: 25-33.
2. Basak, N. and D. Das. (2007). The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. **World J. Microbiol. Biotech.** 23: 31-42.
3. Buranakarl, L.; Fan, C.Y.; Ito, K.; Izaki, K. and Takahashi, H. Production of Molecular Hydrogen by Photosynthetic Bacterium with Raw Starch. **(a) ICME Ann. Reports. 8 : 105-108. (b) ICME Ann. Reports. 8 : 367-368. (1985)**
4. Buranakarl, L.; Fan,C.Y.; Ito, K.; Izaki, K. and Takahashi, H. Production of Molecular Hydrogen by Photosynthetic Bacteria with Raw Starch. **Agric. Biol. Chem. 49 : 3339-3341. (1985)**
5. Buranakarl, L.; Ito, K.; Izaki, K. and Takahashi, H. Purification and Characterization of a Raw Starch-digestive Amylase from Non-sulfur Purple Photosynthetic Bacterium. **Enzyme Microbial Technology. 10 : 173-179. (1988)**
6. Buranakarl, L.; Ito, K.; Izaki, K. and Takahashi, H. Raw Starch Digestive Amylase from Photosynthetic Bacteria. **An abstract in the first Princess Chalabhorn Science Congress: International Congress on Natural Products. p. 180. (1987)**
7. Buranakarl, L.; Ito, K.; Izaki, K.and Takahashi, H. Amylase Responsible for Raw Starch Digestion in the Process of Hydrogen Production by Non-sulfur Purple Photosynthetic Bacteria. **Ann. Reports of ICBiotech. 9 : 310-311. (1986)**
8. Buranakarl, L.; Ito,K.; Izaki, K. and Takahashi, H. Raw Starch-Digestive Amylase from Non-Sulfur Purple Photosynthetic Bacteria. **Microbial Utilization of Renewable Resources. 5 : 114-119. (1986)**
9. Buranakarl, L.; Okuda, S. and Takahashi, S. Hydrogen Production by Thermotolerant Photosynthetic Bacteria. **K.U. Science Journal. 1:36-46. (1983)**

10. Buranakarl, L.; Okuda, S.; Izaki, K. and Takahashi, H. Production of Molecular Hydrogen by Thermotolerant Purple Photosynthetic Bacteria. **ICME Ann. Reports. 5 : 235-244. (1982)**

11. Buranakarl, L.; Yoneyama, H. and Takahashi, H. Growth of Purple Non-sulfur Photosynthetic Bacterium at 45° C. **ICME Ann. Reports. 7 : 392. (1984)**

12. Buranakarl, L.; Yoneyama, H.; Iwata, T.; Kim; J.S.; Okuda,S.; Kampee, T.; Izaki, K. and Takahashi, H. Growth of Non-sulfur Purple Photosynthetic Bacteria under High Temperature. **Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology. 2(1) : 13-19. (1986)**

13. Chitradon, Lerluck (Buranakarl) *, Wilawan Channarong, Mongkol Ngmjarearnwong and Numthip Dechprae. Biohydrogen from Phototrophic Bacteria, A Renewable Energy Potentially Combine with Fuel Cell. **Journal of Research in Engineering and Technology. 5(3) : 183-201. (2008)**

14. Giridhar R, Srivastava AK. 2001. Repeated fed-batch sorbose fermentation by *Gluconobacter oxydans*. **Chem. Biochem. Eng. Q.** 15: 127–9.

15. Mahakhan, Polson; Chintana Chobvijuk; Mongkol Ngmjarearnwong; Savitr Trakulnalermsai; Christopher Bucke; Jisnuson Svasti; Weerasit Kanlayakrit and Lerluck Chitradon*. Molecular hydrogen production by a thermotolerant *Rubrivivax gelatinosus* using raw cassava starch as an electron donor. **Science Asia. 31 (4) : 415-424. ( 2005)**

16. Ngmcharoenwong, Mongkol; Chintana Chobvijuk; Naoki Abe; Patumporn Chim-anage; Sarote Sirisunsaneeyakul and Lerluck Chitradon. Capability in utilization of raw starch for hydrogen production by photosynthetic bacteria. **The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Science. p.160-167. (2004)**

17. Ngmjarearnwong, Mongkol; Chintana Chobvijuk; Patumporn Chim-anage; Sarote Sirisansaneeyakul and Lerluck Chitradon*. Utilization of Different Kinds of Raw Starch by non-sulfur purple Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production. **Abstract in Microbial Utilization for Recycling of Agricultural Waste. NRCT-JSPS-DOST-LIPI-VCC. Mahidol University.March 7-8 2003.**

18. Numtip Dechprae, Wilawan Channarong, Churapa Teerapatsakul, Lerluck Chitradon*. Evaluation of Important Factors Affecting Hydrogen Photoproduction of *Rubrivivax gelatinosus* SB24. **The 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT36) p. 228. (2010)**

19. Numtip Dechprae[1], Nunthiya Hansupaluk[2], Lerluck Chitradon[1]*. Statistical Methods Used in Optimizing Conditions of Biohydrogen Production. **The Proceedings of 48th Kasetsart Annual Conference. February 3-5, 2010 p. 77-84 (2010).**

20. Okuda, S.; Kampee, T. and Buranakarl, L. Isolation of Photosynthetic Bacteria, Antibiotic Producer and Brown Coal Utilizer. **ICME Ann. Reports. 3;272. (1980)**

21. Okuda, S.; Kim, J.S.; Iwata, T.; Ito, K.; Buranakarl, L.; Kampee, T. and Takahashi, H. Isolation of Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production in Thailand. **Microbial Utilization of Renewable Resources. 2 : 163-166. (1981)**

22. Radmann EM, Reinehr CO, Costa JAV. 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture**. 265: 118–26.

23. Sasikala, C. H., C. H. Raman and P. Raghuveer Rao. (1995). Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. **Int. J. Hydrogen Energy**. 20(2): 123-126.

24. Takahashi, H. and Buranakarl, L. Isotation of Photosynthetic Bacteria. **ICME Ann. Reports. 6 : 305. (1983)**

25. Takahashi, H.; Watanabe, K.; Kim, J.S.; Ito, K.; Buranakarl, L. and Kampee, T. Production of Hydrogen by Photosynthetic Bacteria Isolated from Thailand. **International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering. ICME. Ann. Reports. 2 : 314. (1979)**

26. Takahashi, H.; Okuda, S.; Kim, J.S.; Iwata, T.; Ito, K.; Buranakarl, L. and Kampee, T. Isolation of Photosynthetic Bacteria in Thailand. **ICME Ann. Reports. 3:312. (1980)**

27. Watanabe, K.; Kim, J.S.; Ito, K.; Buranakarl, L.; Kampee, T. and Takahashi, H. Thermostable Nature of Hydrogen Production by Non-Sulfur Purple Photosynthetic Bacteria Isolated in Thailand. **Agric. Biol. Chem. 45(1): 217-222. (1981)**

28. Watanabe, K.; Kim, J.S. ; Kampee, T.; Buranakarl, L. and Takahashi, H. Production of Hydrogen by Photosynthetic Bacteria from Thailand. **Microbial Utilization of Renewable Resources. 1 : 181-185. (1980)**

29. Watanabe, K.; Kim, J.S.; Ito, K.; Buranakarl, L.; Kampee, T. and Takahashi, H. Thermostable Nature of Hydrogen Production by Non-sulfur Purple Photosynthetic Bacteria Isolated in Thailand. **ICME Ann. Reports. 4 : 117-123. (1981)**

30. Wilawan Channarong, Mongkol Ngmjareamwong, Lerluck Chitradon. Hydrogen, An Alternative Energy, from starch biomass by Purple Non-Sulfur Phototrophic Bacteria Isolated in Thailand. **The 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT36) p. 229. (2010)**

31. Yokoi H, Maki R, Hirose J, Hayashi S. 2002. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. **Biomass Bioenergy**. 22(5): 389–95.

32. Yokoyama H, Waki M, Moriya N, Yasuda T, Tanaka Y, Haga K. 2007. Effect of fermentation temperature on hydrogen **production from** cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 74(2): 474–83.

33. Yoneyama, H., Iwata, T.; Okuda, S.; Kim, J.S.; Buranakarl, L.; Kampee, T. and Takahashi, H. Some Properties of Thermotolerant Non-sulfur Purple Photosynthetic Bacteria Isolated in the Bangkok Area. **ICME Ann. Reports. 5 : 325. (1982)**

34. Yoneyama, H.; Iwata, T.; Okuda, S.; Kim, J.S.; Buranakarl, L.; Kampee, T. and Takahashi, H. Isolation of Thermostable Nature Photosynthetic Bacteria. **ICME Ann. Reports 4 : 396. (1981)**

35. Yoneyama, H.; Iwata, T.; Okuda, S.; Kim, J.S.; Buranakarl, L.; Kampee, T. and Takahashi, H.. Non-sulfur Purple Photosynthetic Bacteria Capable of Growth at 45° C Isolated in the Bangkok Area. **ICME Ann. Reports. 6 : 311-312. (1983)**

**หมายเหตุ** : ให้ส่งรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับร่าง) จำนวน 3 ชุด ก่อน โดยสถาบันวิจัยและพัฒนาจะส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิ ประเมิน / วิจารณ์ หากไม่มีการแก้ไข จะแจ้งให้ส่งเพิ่ม แต่หากมีความเห็นข้อเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิให้ปรับแก้ไข จะแจ้งให้ดำเนินการแก้ไข และให้ส่งรายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง) **จำนวน 12 ชุด** พร้อม Diskette ต่อไป