



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา	จุลชีววิทยา
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพแบบมีแสง จากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลัง และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิต
	Photoproduction of Biohydrogen using Cassava Wastewater from Cassava Starch Manufacturing and Factors Affecting
نامผู้วิจัย	นางสาวน้ำทิพย์ เดชแพร
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(รองศาสตราจารย์เลอลักษณ์ จิตรคอน, Dr.Agr.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์ชรรษา ชีรภัทรสกุล, Ph.D.)
หัวหน้าภาควิชา	(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพแบบมีแสง จากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลัง
และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิต

Photoproduction of Biohydrogen using Cassava Wastewater
from Cassava Starch Manufacturing
and Factors Affecting

โดย

นางสาวน้ำทิพย์ เดชแพร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำทิพย์ เดชแพร่ 2555: การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพแบบมีแสง จากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมัน
สำปะหลังและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์
เลอลักษณ์ จิตรดอน, Dr.Agr. 203 หน้า

งานวิจัยนี้ ประสบความสำเร็จในการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งแป้งมันสำปะหลัง การผลิตไฮโดรเจนนี้
เป็นการผลิตทางชีวภาพแบบมีแสงด้วยแบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ทำการทดลองทั้งในขนาด
18 23 และ 60 มล. และในถังแบบผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร ผลของการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้ง แสดงให้
เห็นว่ามีจำเป็นต้องเพิ่มสารอาหาร แร่ธาตุ วิตามิน และควบคุมพีเอชเริ่มต้นให้เป็นกลางคือ 6.8 ซึ่งทำให้
อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นได้ 5-6 เท่า และได้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมเพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่า ความ
เข้มข้นของน้ำทิ้งที่เหมาะสมในการเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ คือ
27 เปอร์เซ็นต์

สารเคมีที่มีอิทธิพลต่อเมแทบอลิซึมการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 มีหลายประการ
ได้แก่ ไบโอดีเจนจำเป็นสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ส่วนไทอะมีน พารา-อะมิโนเบนโซอิกแอซิด และนิโคตินิกแอซิด
ช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน เหล็กไอออนและโมลิบดีนัมไอออนเป็นสารจำเป็นต่อเอนไซม์ในไกลการผลิต
ไฮโดรเจน ส่วนสาร EDTA ไม่จำเป็นต่อกลไก แต่การมี EDTA ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

ด้วยการใช้ทฤษฎีทางคณิตศาสตร์ประเมินความสัมพันธ์ทางสถิติของเหล็ก โมลิบดีนัม และ EDTA
ได้ผลว่าปริมาณสารทั้ง 3 ที่เหมาะสม คือ 10.48 0.38 และ 7.98 มก./ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทดลองในอาหาร
ที่ยังไม่เติมน้ำทิ้ง พบว่าอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดได้ถึง 13-15 มล./ลิตร/ชม. และได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสม
เท่ากับ 8 ลิตร จากปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจน 6 ลิตร อย่างไรก็ตาม สภาวะที่เหมาะสมนี้ไม่
สามารถใช้กับน้ำทิ้งแป้งมันได้ เพราะปริมาณโลหะหนักสูงส่งผลให้น้ำทิ้งเปลี่ยนเป็นสีดำ

ปัจจัยที่มีความสำคัญมากต่อการผลิตไฮโดรเจนครั้งนี้คือ ความเข้มข้นแสง การเพิ่มความเข้มข้นจาก 2
กิโลลักซ์ เป็น 3 กิโลลักซ์ ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 2.4 เท่า การกำจัดตะกอนและเส้นใยมันสำปะหลัง
ออกจากรูน้ำทิ้งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซจากน้ำทิ้ง การผลิตไฮโดรเจนจากน้ำ
ทิ้งมันสำปะหลังที่ได้สูงสุดได้จากน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์ ได้ไฮโดรเจนเท่ากับ 4 ลิตรจากถังผลิต
ไฮโดรเจนที่มีปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร และมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 13.7 มล./ลิตร/ชม.

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Numtip Dechprae 2012: Photoproduction of Biohydrogen using Cassava Wastewater from Cassava Starch Manufacturing and Factors Affecting. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Lerluck Citradon, Dr.Agr. 203 pages.

This research is successful in production of biohydrogen from cassava wastewater. It is a photoproduction of hydrogen by *Rubrivivax gelatinosus* SB24. The experiments in 18, 23, 60 mL culture and 5.7 L-reactor showed that the H₂ production from the cassava wastewater required supplementation of nutrient, vitamins and initial pH adjustment to neutral pH of 6.8. Maximum rate of H₂ production was 5-6 fold improved. Cumulative hydrogen increased by 2-fold. Concentration of the wastewater optimal for being an electron donor for H₂ production by this bacteria was 27%.

Chemical agents that effected to H₂ production metabolism of *R. gelatinosus* SB24 are biotin, thiamine, *p*-aminobenzoic acid and nicotinic acid. Biotin was necessary for H₂ production, the others enhanced the metabolism. Ferrous and molybdenum ions were essential ions for an enzyme catalyzed H₂ production pathway. EDTA isn't necessary on the pathway but high concentration of EDTA affected to the metabolism of H₂ production.

Using mathematical theory evaluated statistical relationships between Fe, Mo and EDTA could predicted and verified that optimal concentrations of the 3 factors were 10.48, 0.38 and 7.98 mg/L, respectively. Experimental results from original medium without cassava wastewater showed that the highest rate of H₂ production could achieved to 13-15 mL/L culture/h with cumulative hydrogen gas of 8 L from 5.7 L cell suspension culture in the 6 L-reactor. However, the optimized conditions could not be implemented to cassava wastewater because of the addition of high amount of heavy metal ions resulting the wastewater color to be darkened.

An important factor on the photobiohydrogen production of H₂ was light intensity. Increasing light intensity from 2 klux to 3 klux increased the H₂ production by 2.4 fold. Elimination of the suspended fibre in the wastewater increased the production. The highest H₂ production obtained in 27% of non-sediment cassava wastewater was 4 liter from 5.7 L-culture with the highest rate H₂ production of 13.7 mL/L culture/h.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลืองานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาและสนับสนุนในการหาทุนการศึกษา และช่วยแก้ปัญหาอุปสรรคต่างๆ รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ชูภา ธีรภัทรสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในหลายๆ ด้าน และกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ ประธานการสอบ และ ดร. สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บริษัท ปตท. เคมิคอล จำกัด (มหาชน) ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และวิจัยตลอดการศึกษาระดับปริญญาโท

ขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทยา หาญศุภลักษณ์ อาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้คำแนะนำการใช้โปรแกรมมินิแทบ

ขอขอบคุณโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังชลเจริญ จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งแป้งมันด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และบุคคลากรในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เป็นกำลังใจอย่างดียิ่งตลอดมา

น้ำทิพย์ เดชแพร

มีนาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	59
ผลและวิจารณ์	74
สรุปและข้อเสนอแนะ	180
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	183
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	203

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่ใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจน ดังนี้	16
2 เปรียบเทียบข้อดี และข้อจำกัด ของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ ด้วยจุลินทรีย์ต่างๆ	19
3 เปรียบเทียบการสังเคราะห์แสงของ phototrophic bacteria กับ cyanobacteria และพืช	27
4 สภาวะที่มีผลต่อกิจกรรมไนโตรจีเนสกับกลไกการผลิตไฮโดรเจน ในสภาวะมีแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง	38
5 องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานแป่งมันสำปะหลัง ของประเทศบราซิล และโรงงานเอเซียซีตริก จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย	44
6 การเลือกการออกแบบการทดลองตามวัตถุประสงค์	49
7 การออกแบบการทดลองเพื่อการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพด้วยแบคทีเรียต่างๆ	54
8 แผนการทดลองออกแบบโดย Box-Behnken Design สำหรับ 3 ปัจจัย 3 ระดับ	70
9 แสดงการเจริญของ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 และการเกิดก๊าซในน้ำทิ้งแป่งมัน เปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตร ที่เจือจางด้วยน้ำ ไม่มีการปรับพีเอช	80
10 คุณสมบัติของน้ำทิ้งแป่งมันเก็บครั้งที่ 1 (วันที่ 19 มิถุนายน 2549)	81
11 แสดงการเจริญของ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 และการเกิดก๊าซใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้งแป่งมันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตร ที่เจือจาง ด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium ปรับพีเอชก่อน autoclave เท่ากับ 6.8	86

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
12 ค่าการตรวจวัดที่ได้จากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 เมื่อน้ำทิ้งแบ่งความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 27 45 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate (น้ำทิ้ง 90 เปอร์เซ็นต์ คือ ปริมาณน้ำทิ้ง : ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 90:10 ไม่มี glutamate แต่จะใช้ไนโตรเจนในน้ำทิ้งเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่านั้น) พีเอชเริ่มต้น 6.8 ปมภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ขนาด 23 มล. (น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1)	92
13 ผลสรุปพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองผลิตไฮโดรเจนเมื่อน้ำทิ้งแบ่ง ความเข้มข้นต่างๆ เจือจางด้วยน้ำ ปริมาตร 60 มล. (น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1)	96
14 ผลสรุปพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองผลิตไฮโดรเจนเมื่อน้ำทิ้งแบ่ง ความเข้มข้นต่างๆ เจือจางด้วยอาหารเหลว ปริมาตร 60 มล. (น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1)	101
15 คุณสมบัติของน้ำทิ้งแบ่งเก็บครั้งที่ 2 (วันที่ 2 เมษายน 2551)	105
16 ผลสรุปพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองผลิตไฮโดรเจนเมื่อน้ำทิ้งแบ่ง เก็บครั้งที่ 2 ความเข้มข้นต่างๆ เจือจางด้วยอาหารเหลว ปริมาตร 60 มล.	107
17 ผลสรุปของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการผลิตไฮโดรเจนเมื่อน้ำทิ้งแบ่ง เก็บครั้งที่ 2 ความเข้มข้น 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยอาหารเหลว ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร	114
18 ผลสรุปของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการผลิตไฮโดรเจนเมื่อน้ำทิ้งแบ่งที่มี ตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's-minimal-glutamate เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่ใช้ความเข้มแสง 2,000 กับ 3,000 ลักซ์ ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร	123

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
19	ผลสรุปของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแบ่งมัน ที่ไม่มีตะกอน 18 และ 27 เปอร์เซนต์เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's-minimal- glutamate เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร 128
20	แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้าย ของการผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's ในขนาด 60 มิลลิลิตร ที่ไม่เติมวิตามินชนิดใดชนิดหนึ่ง และที่ไม่เติมวิตามินทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Ormerod's ที่เติมวิตามินครบ (Control) 135
21	แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้าย และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's malate- glutamate ปริมาตรบรรจุ 60 มล. ที่มี $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ 143
22	ตาราง ANOVA แสดงความสำคัญทางสถิติของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ต่อการผลิตไฮโดรเจน 143
23	แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้าย และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's malate- glutamate ในปริมาตรบรรจุ 60 มล. ที่มี $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ 147
24	ตาราง ANOVA แสดงความสำคัญทางสถิติของ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ต่อการผลิตไฮโดรเจน 147
25	แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้าย และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's malate- glutamate ในปริมาตรบรรจุ 60 มล. ที่มี EDTA ความเข้มข้นต่างๆ 151

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
26 ตาราง ANOVA แสดงความสำคัญทางสถิติของ EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจน	151
27 แสดงความเข้มข้นของสารประกอบ 3 ชนิดเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรของปัจจัยทั้งสาม ที่นำมากำหนดให้เป็นระดับต่างๆ ที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง โดย Box-Behnken	155
28 ผลการออกแบบการทดลองโดยใช้ Box-Behnken design ของปัจจัย 3 ปัจจัย และปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองจริง (experimental value) หรือ true value และปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทำนาย (predicted value) ด้วยสมการที่ 14	156
29 แสดงผลของการวิเคราะห์รีเกรสชัน (regression) หรือค่าถดถอยของ การวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design สำหรับการผลิตไฮโดรเจน ด้วยโปรแกรม SPSS-Statistica	159
30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในสมการถดถอยที่ใช้สำหรับหาสถานะ ที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสง (Analysis of variance in the regression model for optimization of photoproduction of H ₂) ที่ได้ จากโปรแกรม SPSS-Statistica	160
31 แสดงผลของการวิเคราะห์รีเกรสชัน (regression) หรือค่าถดถอยของการวางแผน การทดลองแบบ Box-Behnken design สำหรับการผลิตไฮโดรเจน ด้วยโปรแกรมมินิแทบ โดยใช้ค่าโค้ด (code value)	166
32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในสมการถดถอยที่ใช้สำหรับหาสถานะที่เหมาะสม ของการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสง (Analysis of variance in the regression model for optimization of photoproduction of H ₂) ที่ได้จาก โปรแกรม Minitab	167
33 เปรียบเทียบผลการทำนายปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในสถานะที่เหมาะสมของ ปัจจัยทั้งสาม ที่ทำนายด้วย SPSS-Statistica และ Minitab ปรับแกนครึ่งที่ 1 (1 st) เปรียบเทียบกับสถานะเดิม (Original medium)	169

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

หน้า

- 34 เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้งสาม ที่ทำนายด้วย SPSS-Statistica หรือ Minitab ปรับแก้ครั้งที่ 2 (2nd) และ Minitab ปรับแก้ครั้งที่ 1 (1st) และค่าไฮโดรเจนจากการทำนาย (predicted H₂) ค่าเฉลี่ยปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองจริง (Exp H₂) และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเฉลี่ยเปรียบเทียบกับสภาวะเดิม (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 8 ซ้ำ)

172

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพของจุลินทรีย์	15
2 แสดงโครงสร้างของ Chlorophyll a และ Bacteriochlorophyll a	26
3 ระบบการขนส่งอิเล็กตรอนในสภาวะมีแสงของ purple non-sulfur phototroph ชนิด <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	29
4 ปฏิกริยาการตรึงไนโตรเจน (N_2 -fixation)	31
5 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับไฮโดรเจนของ purple non sulfur bacteria (PNS)	34
6 ความสามารถของ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ในการย่อยแบ่งในน้ำทิ้ง แบ่งมันความเข้มข้นน้ำทิ้ง 81 เปอร์เซ็นต์ (ก) โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญได้ บนอาหารที่มีน้ำทิ้ง 81 เปอร์เซ็นต์ (%) (ข) clear zone แสดงการย่อยแบ่ง รอบโคโลนีของแบคทีเรียหลังจากทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน	76
7 การเจริญของเชื้อ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ในน้ำทิ้งแบ่งมันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตร ที่เจือจางด้วยน้ำ ไม่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น บ่มในที่มืด และไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 84 ชม. โดย (ก) ก่อนบ่ม (ข) การเจริญของเชื้อใน ชั่วโมงที่ 60 โดยเปอร์เซ็นต์ของน้ำทิ้งเรียงจากมากไปน้อยคือ 90 81 72 63 54 45 36 27 18 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (%) และหลอดควบคุม คือ อาหาร Ormerod's ที่ไม่มีน้ำทิ้ง เรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา	79
8 การเจริญของ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้งแบ่งมัน เปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตร เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate ปรับพีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มในที่มืดและไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชม. โดย (ก) ก่อนบ่ม (ข) การเจริญของเชื้อในชั่วโมงที่ 24 โดยเปอร์เซ็นต์ของน้ำทิ้ง เรียงจากมากไปน้อยคือ 90 81 72 63 54 45 36 27 18 และ 9 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (น้ำทิ้ง 90 เปอร์เซ็นต์ คือ ปริมาณน้ำทิ้ง : ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 90:10 ไม่มีสารประกอบอื่นๆ) และหลอดควบคุม คือ อาหาร Ormerod's ที่ไม่มีน้ำทิ้ง เรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9	การผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 จากน้ำทิ้งแบ่งมัน ในปริมาตรการทดลอง 23 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 27 45 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (น้ำทิ้ง 90 เปอร์เซ็นต์ คือ ปริมาณน้ำทิ้ง : ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 90:10 ไม่มี glutamate แต่จะใช้ไนโตรเจนในน้ำทิ้งเป็นแหล่ง ไนโตรเจนเท่านั้น) พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. 91
10	การผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 จากน้ำทิ้งแบ่งมัน ในปริมาตรการทดลอง 60 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยน้ำ ความเข้มข้นสุดท้าย เป็น 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-11 วัน 95
11	การเจริญของ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ในน้ำทิ้งแบ่งมันที่เจือจาง ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ (ก) เจือจางด้วยน้ำ (ข) เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal glutamate ในขนาด 60 มล. เมื่อบ่มใน ที่ไม่มีออกซิเจน และมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. เรียงจากซ้ายไปขวา หลอดควบคุม คือ อาหาร Ormerod's ที่ไม่มีน้ำทิ้ง, น้ำทิ้ง 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ 98
12	การผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 จากน้ำทิ้งแบ่งมัน ในปริมาตรการทดลอง 60 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal- glutamate ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน 100

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13	การผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน ที่เก็บครั้งที่ 2 ในปริมาตรการทดลอง 60 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน 106
14	การผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน 18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน 113
15	การผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน 27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 117
16	การผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน 27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 122

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

17

การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแบ่งมันที่ไม่มีตะกอน 18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

127

18

การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแบ่งมันที่ไม่มีตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

130

19

การผลิตก๊าซสะสมโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในอาหาร Ormerod's ในขนาด 60 มิลลิลิตร ที่ขาดวิตามินอาหารละ 1 ชนิด แตกต่างกัน และที่ไม่เต็มวิตามินทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (Control) ซึ่งเป็นอาหาร Ormerod's สูตรปกติ ที่มีครบ 4 ชนิด คือ พาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (*p*-aminobenzoic acid) ไทอะมีน (thiamine) ไบโอติน (biotin) และนิโคตินิกแอซิด (nicotinic acid)

134

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20 การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ปริมาตร 60 มล. เมื่อนำน้ำทิ้งแบ่งมันความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรเจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium ที่เติมยีสต์สกัด 0.1 กรัมต่อลิตร แทนวิตามินทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ น้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium ที่มีวิตามินครบ บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	137
21 ก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ผลิตในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ที่มี $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0 10.6 53.1 106.2 531.0 และ 1,062.0 มก./ลิตร ในปริมาตรบรรจุ 60 มล.	142
22 ก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ผลิตในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ที่มี $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0 0.7 6.8 33.8 และ 67.5 มก./ลิตร ในปริมาตรบรรจุ 60 มล.	146
23 ก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 ผลิตในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ที่มี EDTA ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0 4.5 9.0 13.5 18.0 และ 90.0 มก./ลิตร ในปริมาตรบรรจุ 60 มล.	150
24 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสุดท้ายที่วัดได้จริง เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ก) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ข) และ EDTA (ค)	155
25 (ก) แผนภาพพื้นผิวสามมิติ (3D response surface plot) และคอนทัวร์ (contour plot) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และโซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดย <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24	161

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- (ข) แผนภาพพื้นผิวสามมิติ (3D response surface plot) และคอนทัวร์ (contour plot) แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และ EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจน โดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 162
- (ค) แผนภาพพื้นผิวสามมิติ (3D response surface plot) และคอนทัวร์ (contour plot) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจน โดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 163
- 26 กราฟแสดงผลตอบสนองของระดับปัจจัยที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการ วิเคราะห์โดย optimizer mode ในโปรแกรม Minitab (ก) แสดงผล ก่อนปรับแก (ข) แสดงผลหลังปรับแกครั้งที่ 1 ตามคำแนะนำ ของ ดร.นันทิยา และ (ค) แสดงผลหลังปรับแกครั้งที่ 2 โดยตั้งค่าโค้ดตามสภาวะ 168
- 27 แสดงการผลิตไฮโดรเจนในถังผลิตไฮโดรเจน ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โดย (ก) การผลิตก๊าซไฮโดรเจน และ (ข) การเจริญของเชื้อ ในอาหารสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จาก SPSS-Statistica (Optimal medium) (—■—) และในอาหารดั้งเดิม (Original or Ormerod's medium) (—▲—) 176

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 28 การผลิตไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในถังผลิตไฮโดรเจน ขนาดบรรจุ 5.7 ลิตร ในสภาวะไม่มีออกซิเจน แต่มีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ประกอบ กับเจือจางด้วย Optimal medium บ่มที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (▲) ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ (■) เปรียบเทียบกับเมื่อใช้น้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยสูตรอาหารดั้งเดิม (Original medium) ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (△)

178

การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพแบบมีแสง จากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลัง และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิต

Photoproduction of Biohydrogen using Cassava Wastewater from Cassava Starch Manufacturing and Factors Affecting

คำนำ

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1979 กลุ่มของหัวหน้าโครงการวิจัย รศ.ดร.เลอลักษณ์ จิตรดอน ได้รายงานการใช้แบคทีเรียกลุ่ม non-sulfur purple photosynthetic bacteria หรือ anoxygenic photosynthetic bacteria ในการผลิตพลังงานทดแทนในรูปก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ ซึ่งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงนั้น คัดแยกได้จากดิน และน้ำข้าว ในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และไทย (Takahashi *et al.*, 1979, 1980; Watanabe *et al.*, 1980, 1981; Kim *et al.*, 1980, 1981, 1982; Okuda *et al.*, 1981; Buranakarl *et al.*, 1982, 1983, 1985a, 1985b, 1986a, 1986b) โดยกลุ่มของหัวหน้าโครงการวิจัย รศ.ดร. เลอลักษณ์ และกลุ่มนักวิทยาศาสตร์อื่นๆได้มีการศึกษา และวิจัยเรื่อยมา จนถึงปัจจุบันมีรายงานมากมาย ที่ผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Zhu *et al.*, 1999; Yetis *et al.*, 2000; Ngmjarearnwong *et al.*, 2003, 2004; Eroglu *et al.*, 2004, 2006, 2008; Mahakhan *et al.*, 2005; Chitradon *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009a, 2009b; Melniki *et al.*, 2009; Dechprae *et al.*, 2009, 2010a, 2010b; Channarong *et al.*, 2010; Kars and Gunduz, 2010)

กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* สายพันธุ์ SB24 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม purple non-sulfur มีรงควัตถุในเซลล์ทำให้เห็นเซลล์เป็นสีแดง และไม่มีเม็ดซัลเฟอร์ (sulfur granule) อยู่ในเซลล์ เป็นสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีในสภาวะไม่มีออกซิเจนและมีแสงมากกว่าในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีแสง จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลำดับเบสบนยีน 16S rDNA จัดจำแนกเป็น *Rubrivivax gelatinosus* อยู่ใน beta subclass (Ngmjarearnwong *et al.*, 2003, 2004; Mahakhan *et al.*, 2005) มีความแตกต่างจากแบคทีเรียในยีนส์ *Rhodobacter* sp. ที่มีการศึกษากันมากในเรื่องการผลิตไฮโดรเจน ซึ่ง *Rhodobacter* จัดอยู่ในกลุ่ม alfa subclass (Sasikala *et al.*, 1992, 1995; Boone *et al.*, 2001; Koku *et al.*, 2002, 2003; Eroglu *et al.*, 2004, 2006,

2008; He *et al.*, 2005; Ozturk *et al.*, 2006; Kars *et al.*, 2006, 2008; Markov and Weaver, 2008) คณะผู้วิจัยได้รายงานความสามารถของแบคทีเรียนี้ในการใช้กรดอินทรีย์ หรือสารอินทรีย์ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน (จินตนา, 2543; มงคล, 2547; Mahakhan *et al.*, 2005) พบว่า สายพันธุ์ SB24 สามารถใช้โซเดียมอะซิเตด (sodium acetate) ไพรูเวต (pyruvate) แลคเตต (lactate) มาเลต (malate) ซัคซิเนต (succinate) แอสปาร์เตต (aspartate) กลูตาเมต (glutamate) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose) เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนได้หลากหลาย ชนิด และยังสามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกชนิดที่ย่อยแป้งได้ดีด้วย (Mahakhan *et al.*, 2005; Chitradon *et al.*, 2008) โดยที่ *Rubrivivax gelatinosus* สายพันธุ์ SB24 สามารถใช้แป้งดิบของมันสำปะหลัง ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวโพด และถั่วเขียว เป็นแหล่งสำหรับให้อิเล็กตรอน เพื่อการผลิตไฮโดรเจนได้ด้วยประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างจากการใช้แป้งสุกหรือในบางกรณีดีกว่า ด้วย ในสภาวะมีแสงและไร้ออกซิเจน และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังดิบผลิตไฮโดรเจนในถังหมักขนาด 5.7 ลิตร อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 39 มิลลิลิตรของไฮโดรเจนต่อลิตรเซลล์ซัสเพนชันต่อชั่วโมง (มล./ลิตร/ชม.) ในถังหมักขนาด 5.7 ลิตร (Mahakhan *et al.*, 2005; Chitradon *et al.*, 2008) และจากคุณลักษณะของแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่สามารถใช้สารอินทรีย์ได้หลายชนิดเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน ดังนั้นอีกทางเลือกหนึ่งคือ การใช้น้ำทิ้ง และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตพลังงานไฮโดรเจน (Sasikala *et al.*, 1992; Yigit *et al.*, 1999; Eroglu *et al.*, 2004, 2006, 2008; Chitradon *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008; Dechprae *et al.*, 2009) โครงการวิจัยนี้มีความประสงค์จะใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรประเภทแป้งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน คือ น้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดแป้งจากหัวมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นน้ำทิ้งของโรงงานผลิตแป้งที่พบว่ายังคงมีคาร์โบไฮเดรตอยู่มาก น้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดแป้งนี้ค่อนข้างสะอาด มีการปนเปื้อนจากเศษตะกอนดิน หินน้อย อย่างไรก็ตาม น้ำเหลือทิ้งจากการสกัดแป้งจากหัวมันที่เก็บแต่ละครั้ง มีคาร์โบไฮเดรต และโลหะหนัก ในปริมาณที่ไม่แน่นอนซึ่งย่อมส่งผลกระทบต่อกลไกการเจริญ และกลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ดังนั้น งานวิจัยนี้นอกจากจะทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานประเภทแป้งแล้วยังได้ศึกษาถึงปัจจัยที่สำคัญบางประการต่อกลไกของแบคทีเรีย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย เมื่อใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นสารตั้งต้นผลิตพลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ดี เพราะเป็นพลังงานที่สะอาด และให้พลังงานสูง การใช้ประโยชน์จากไฮโดรเจนมีหลายด้าน โดยเฉพาะใช้เป็น

เซลล์เชื้อเพลิง ที่เป็นเซลล์บรรจุก๊าซไฮโดรเจน และแปรรูปก๊าซนี้ไปผลิตเป็นกระแสไฟฟ้า (สารานุกรมออนไลน์ทางอินเทอร์เน็ต, 2550; Wikipedia, the free cyclopedia, 2009; บริษัท ลีโอนิคส์ จำกัด, 2552) ในปัจจุบัน วิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีหลายวิธี เกือบ 90 เปอร์เซนต์ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการ steam reforming ซึ่งผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ และยังมีวิธีอื่นอีกที่ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่วิธี coal gasification, thermal cracking, partial oxidation of heavy oil และ electrolysis แต่วิธีผลิตไฮโดรเจนเหล่านี้ ส่วนใหญ่แหล่งที่มาของไฮโดรเจนมาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งเป็นพลังงานไม่หมุนเวียน และไม่สามารถทดแทนได้ ยกเว้น กระบวนการ electrolysis ที่ใช้น้ำเป็นวัตถุดิบ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรม ถ้าไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษ ก็ต้องเสียพลังงานสูง ในทางตรงกันข้ามกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ ซึ่งเป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตและจากสารอินทรีย์เป็นกระบวนการผลิตที่ไม่ใช้พลังงานมากเท่าและกระบวนการไม่รุนแรง อีกทั้งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แต่กระบวนการจะเกิดอย่างช้าๆ ตามกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต การได้ก๊าซไฮโดรเจนจึงเป็นแบบสะสม ปัจจุบันได้รับความสนใจทั่วโลก

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพ มีการใช้กระบวนการของจุลินทรีย์ 2 กระบวนการหลักๆ คือ กระบวนการในสภาวะที่มีแสง และในสภาวะเฟอร์เมนต์ โดยใช้จุลินทรีย์ 3 กลุ่มคือ 1. กลุ่มจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่เป็น Anoxygenic phototrophic bacteria ได้แก่ sulfur และ non-sulfur bacteria ทั้งที่เป็น green และ purple bacteria 2. กลุ่มจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่เป็น Oxygenic photosynthetic microorganisms ได้แก่ สาหร่าย และ cyanobacteria และ 3. แบคทีเรียกลุ่มที่มีกิจกรรมแบบเฟอร์เมนต์ (fermentative bacteria) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม Anoxygenic phototrophic bacteria มีข้อได้เปรียบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Das and Veziroglu, 2001) คือมีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนแปลงสับสเตรตไปเป็นไฮโดรเจนที่ให้เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งในกระบวนการ ไม่มีการสร้างออกซิเจนเป็นผลผลิตสุดท้าย ซึ่งออกซิเจนเป็นสาเหตุของการยับยั้งกลไกการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย และการที่ก๊าซมี ส่วนประกอบของออกซิเจนจะส่งผลเสียต่อเซลล์เชื้อเพลิง นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังสามารถใช้ช่วงคลื่นแสงที่กว้าง และสามารถใส่สารอินทรีย์ได้หลายชนิดเป็นแหล่งอาหาร รวมทั้งสารอินทรีย์ที่ได้มาจากของเหลือทิ้ง ซึ่งการใช้ของเหลือทิ้งได้ เช่น การใช้น้ำเสีย (Sasikala *et al.*, 1992; Arik *et al.*, 1995) เป็นผลพลอยได้ให้เกิดการบำบัดน้ำทิ้งด้วย จึงเป็นแบคทีเรียที่กลุ่มวิจัยให้ความสนใจ

วัตถุประสงค์

1. ทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยใช้น้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง
2. ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้น้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมันสำปะหลัง
3. ศึกษาความจำเป็นของวิตามิน 4 ชนิด ต่อกลไกการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24
4. ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่อใช้สารอินทรีย์เชิงซ้อนประเภทยีสต์สกัดแทนที่วิตามินทั้ง 4 ชนิด
5. ศึกษาอิทธิพลของโลหะไอออนได้แก่ เฟอรัสไอออน โมลิบดีนัมไอออน และสาร chelating agent ชนิด EDTA ต่อกลไกการเจริญ และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24
6. ใช้วิธีทางสถิติหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัย 3 ปัจจัย ในการผลิตไฮโดรเจนโดย *R. gelatinosus* SB24
7. ทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากน้ำทิ้งจากการสกัดแป้งจากหัวมันสำปะหลัง โดยใช้สภาวะที่มีความเข้มข้นของโลหะไอออนและสาร chelating agent ที่เหมาะสม

การตรวจเอกสาร

พลังงาน เป็นปัจจัยที่สำคัญ ในการตอบสนองความต้องการขั้นพื้นฐานของมนุษย์ และพลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานของการผลิตในภาคธุรกิจและอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงต้องมีการจัดหาพลังงานให้มีปริมาณเพียงพอ มีราคาเหมาะสม และมีคุณภาพดี สอดคล้องกับความต้องการของผู้ใช้ นอกจากนี้พลังงาน ยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้โลกปัจจุบันขับเคลื่อนไปข้างหน้า

การใช้พลังงานและแหล่งสำรองพลังงาน

แหล่งพลังงานที่มนุษย์ใช้มานานแล้ว คือ พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งแปรรูปมาจากพลังงานธรรมชาติที่สะสมมานานนับศตวรรษ เมื่อพืชและสัตว์สมัยดึกดำบรรพ์ (ยุคไดโนเสาร์) เสียชีวิตลงจะถูกย่อยสลายและทับถมกันเป็นชั้นๆ อยู่ใต้ดินหรือใต้พิภพ ใช้เวลาหลายล้านปีกว่าที่จะเปลี่ยนซากเหล่านี้ให้กลายเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิล อย่างเช่น ปิโตรเลียม (น้ำมันดิบ) ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ในปี พ.ศ. 2552-2553 โลกมีการใช้พลังงานฟอสซิลเท่ากับ 9,876-10,442 ล้านตันเทียบเท่าน้ำมันดิบ (MTOE) ต่อปี คิดเป็นสัดส่วนการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 87 จากแหล่งพลังงานทั้งหมด ซึ่งมีค่าต่ำลงเล็กน้อยจาก พ.ศ. 2550 ที่มีการใช้พลังงานฟอสซิลร้อยละ 88 ต่อแหล่งพลังงานทั้งหมดคือใช้ 9,768 MTOE ต่อปี และอีกร้อยละ 12 เป็นพลังงานที่ได้จากพลังงานนิวเคลียร์ น้ำ และพลังงานหมุนเวียนจากแหล่งอื่นๆ (BP Statistical Review of World Energy, 2008, 2011) ซึ่งเป็นไปตามการคาดการณ์ ที่ว่าการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นพลังงานขั้นต้น (primary energy) จะเปลี่ยนแปลงไปโดยจะลดลงในช่วง พ.ศ. 2550-2578 และทั่วโลกจะใช้พลังงานจากแหล่งอื่นๆ เพิ่มขึ้น เช่น พลังงานนิวเคลียร์ และพลังงานหมุนเวียนอื่นๆ (दनय, 2554) ปี พ.ศ. 2553 โลกมีการบริโภคน้ำมัน 87 ล้านบาร์เรลต่อวันหรือ 4,028.1 MTOE ต่อปี ถ่านหิน 3,555.8 MTOE ต่อปี และก๊าซธรรมชาติ 3,169 พันล้านลูกบาศก์เมตรต่อปีหรือ 2,858.1 MTOE ต่อปี สัดส่วนการบริโภคพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลชนิดต่างๆคือ น้ำมันต่อถ่านหินต่อก๊าซธรรมชาติ เป็น 37:34:27 (BP Statistical Review of World Energy, 2011) จะเห็นว่าถ่านหินเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีปริมาณสำรองมากกว่าก๊าซธรรมชาติ และน้ำมัน ราคาถ่านหินมีราคาค่อนข้างต่ำ และเพราะยังคงจัดหาได้อย่างสม่ำเสมอ ด้วยเหตุนี้ทั่วโลกจึงใช้ถ่านหินเป็นเชื้อเพลิงหลักในการผลิตไฟฟ้ามาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 ด้วย การใช้ถ่านหินเป็นแหล่งพลังงานขั้นต้น (primary energy) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปจาก 12 ปีที่แล้ว คือใน ปี พ.ศ. 2540 ที่ทั่วโลกบริโภคน้ำมันเป็นแหล่งพลังงานขั้นต้นมากที่สุด โดย

บริเวณน้ำมันต่อถ่านหินต่อก๊าซธรรมชาติเท่ากับ 44:30:26 (สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ, 2542; ดนัย, 2554) ในส่วนพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลที่คงอยู่ในโลกตามการประมาณการ ในปี พ.ศ. 2553 มีปริมาณถ่านหิน 860,938 ล้านตันหรือ 582,148.3 MTOE น้ำมันดิบ 1,383 พันล้านบาร์เรลหรือ 188,641.2 MTOE และก๊าซธรรมชาติ 187.1 ล้านล้านลูกบาศก์เมตรหรือ 168,390 MTOE รวมพลังงานฟอสซิลทั้งหมด 929,981.6 MTOE (Redstar Canada Ltd, n.d.; BP Statistical Review of World Energy, 2011) ซึ่งถ้าหากมีการใช้พลังงานฟอสซิลชนิดต่างๆ ในระดับปัจจุบัน และไม่มีการค้นหาเพิ่มเติม BP Statistical Review of World Energy (2011) รายงานว่า ในสิ้นปี พ.ศ. 2553 แหล่งสำรองถ่านหินจะยังใช้ได้อีก 118 ปี ในขณะที่ก๊าซธรรมชาติมีเหลือใช้ได้ 59 ปี ส่วนน้ำมันนั้นมีเหลือใช้อีกเพียง 46 ปี เท่านั้น คือใช้ได้ถึงปี พ.ศ. 2599

สำหรับประเทศไทย ปี พ.ศ. 2550 มีสัดส่วนการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นพลังงานขั้นต้น (primary energy) ต่อแหล่งพลังงานทั้งหมดสูงถึงร้อยละ 97.4 ได้แก่ น้ำมันดิบร้อยละ 41 ก๊าซธรรมชาติร้อยละ 38.4 และถ่านหินร้อยละ 17.8 ส่วนอีกร้อยละ 2.6 มาจากพลังงานน้ำและไฟฟ้านำเข้า และเมื่อพิจารณาการใช้พลังงานขั้นสุดท้าย (final energy) ที่ผู้บริโภคใช้ซึ่งไม่รวมเชื้อเพลิงที่นำมาใช้ในการแปรรูปพลังงาน มีสัดส่วนการใช้พลังงานฟอสซิลเป็นพลังงานขั้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 78.2 จากแหล่งพลังงานทั้งหมด (สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน [สนพ.], กระทรวงพลังงาน, 2550) และในปี พ.ศ. 2553 มีสัดส่วนการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นพลังงานขั้นสุดท้ายต่อแหล่งพลังงานทั้งหมดร้อยละ 63.1 อีกร้อยละ 37 มาจากพลังงานไฟฟ้าและพลังงานหมุนเวียน ที่นิยมใช้กันมากขึ้น ได้แก่ ไม้ฟืน ถ่าน กากอ้อย และแกลบ เป็นต้น (ดนัย, 2554) จากสถิติ 5 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2548-2553 ของสำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน (สนพ.) กระทรวงพลังงาน ประเทศไทยมีสัดส่วนการใช้ก๊าซธรรมชาติเป็นเชื้อเพลิงหลักในการผลิตไฟฟ้าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี พ.ศ. 2552 ประเทศไทยใช้ก๊าซธรรมชาติเป็นเชื้อเพลิงในการผลิตไฟฟ้ามีสัดส่วนสูงถึงร้อยละ 72.5 ถ่านหินร้อยละ 19.4 พลังงานน้ำร้อยละ 4.7 พลังงานทดแทนร้อยละ 1.4 น้ำมันเตาและดีเซลร้อยละ 0.3 นำเข้าร้อยละ 1.7 และเมื่อ ปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยใช้ก๊าซธรรมชาติเป็นเชื้อเพลิงหลักที่ใช้ในการผลิตไฟฟ้ามีสัดส่วนสูงถึงร้อยละ 72.8 (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน [สนพ.] กระทรวงพลังงาน, 2552; สำนักพัฒนาโครงการไฟฟ้าโรงไฟฟ้าพลังงานนิวเคลียร์, กระทรวงพลังงาน, 2554)

เมื่อสิ้นปี พ.ศ. 2552 ประเทศไทย มีปริมาณสำรองน้ำมันดิบ 180 ล้านบาร์เรล ก๊าซธรรมชาติ 11,026 พันล้านลูกบาศก์ฟุต และถ่านหิน 1,181 ล้านตัน โดยปี พ.ศ. 2552 มีปริมาณการผลิตพลังงานในประเทศ (production) เพื่อนำมาใช้ ดังนี้ น้ำมันดิบอยู่ในระดับ 56 ล้านบาร์เรล ก๊าซธรรมชาติ อยู่ในระดับ 1,092 พันล้านลูกบาศก์ฟุต และถ่านหินอยู่ในระดับ 18 ล้านตัน ดังนั้นถ้าการผลิตอยู่ในระดับนี้และยังมีการใช้ในระดับเดียวกันนี้จะสามารถใช้น้ำมันดิบได้อีก 3 ปี ก๊าซธรรมชาติ 10 ปี และถ่านหิน 67 ปี แต่หากค้นพบแหล่งพลังงานฟอสซิลในไทยได้เพิ่มเติมซึ่งเป็นไปได้ว่าก็เป็นไปได้ที่จะสามารถเพิ่มเวลาการใช้ทรัพยากรต่างๆ ไปได้อีก โดยประมาณการว่าอาจจะสามารถใช้น้ำมันดิบได้อีก 15 ปี ก๊าซธรรมชาติ 27 ปี และถ่านหิน 114 ปี (สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน [สนพ.] กระทรวงพลังงาน, 2554) จะเห็นได้ว่าในประเทศไทยยังคงใช้น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานมากที่สุด ดังนั้นน้ำมันจะเป็นแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลที่จะหมดเป็นแหล่งแรก แหล่งพลังงานทั้ง 3 แหล่งนี้ล้วนเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลใช้แล้วมีแต่จะหมดไป ทั่วโลกตระหนักในเรื่องนี้เสมอมา ดังนั้นนอกจากการใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพแล้วจึงมีความพยายามที่จะค้นหาและคิดค้นวิธีสร้างพลังงานทดแทน (sustainable energy) หรือพลังงานทางเลือก (alternative energy) มาใช้ เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 (ในปี พ.ศ. 2513) ที่เกิดวิกฤตการณ์น้ำมัน (Oil crisis) ไปทั่วโลก ส่งผลให้ราคาน้ำมันในประเทศไทยปรับตัวขึ้นสูงจาก 8 บาทต่อลิตร เป็น 14 บาทต่อลิตร และในปีนั้นเริ่มมีการพัฒนาเชื้อเพลิงเอทานอลในประเทศสวีเดนนำไปใช้ในยานยนต์ในรูปแบบน้ำมันผสม การใช้เอทานอลกับยานยนต์นั้นสามารถใช้โดยตรง หรือผสมกับน้ำมันเบนซิน เป็นก๊าซโซฮอล (Gasohol) หรือผสมกับดีเซลเป็นดีโซฮอล (Diesohol) กระบวนการผลิตเอทานอลมี 2 แบบ คือ แบบที่ใช้วิธีทางเคมี โดยใช้เอทีลีน (ethylene) เป็นวัตถุดิบ และแบบที่ใช้วิธีทางชีวเคมีหรือการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง และข้าวโพด เป็นต้น ประเทศไทย เริ่มการใช้เชื้อเพลิงผสมเอทานอลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา ทดลองผสมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ กับก๊าซโซลีนธรรมชาติ อัตราส่วน 4:1 เป็นก๊าซโซฮอล และปี พ.ศ. 2541 โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา และการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย (ปตท.) ทดลองใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ กับน้ำมันดีเซล และผสมสารอีมีลซิไฟเออร์ ในอัตราส่วน 14:85:1 เป็นดีโซฮอล (Diesohol) ใช้กับรถเครื่องยนต์ดีเซลได้ แล้วพัฒนาต่อมาเรื่อยๆ ในปี 2544 เริ่มจำหน่ายเอทานอลต่อเบนซินไร้สารตะกั่ว 91 ในอัตราส่วน 10:90 เมื่อถึงปีพ.ศ. 2551 ที่ผ่านมามีวิกฤตการณ์น้ำมันครั้งที่ 3 ของโลก โดยราคาน้ำมันดิบเริ่มขยับตัวสูงขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 จาก 10 เหรียญสหรัฐ ต่อบาร์เรล เป็นกว่า 38 เหรียญสหรัฐ ต่อบาร์เรล และสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงช่วงปลายปี พ.ศ. 2550 ราคาน้ำมันดิบพุ่งสูงเกิน 100 เหรียญสหรัฐ ต่อบาร์เรล ในสัปดาห์ที่ 2 ของเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2551 ราคาน้ำมันขยับถึง

130 เหรียญสหรัฐ ต่อบาร์เรล (พลาซพล, 2551) ส่งผลให้ราคาน้ำมันขายปลีกกรุงเทพฯ และปริมาณพลปรับตัวสูงขึ้นที่สุด คือดีเซลราคา 44.24 บาทต่อลิตร ก๊าซโซฮอล 91 ราคา 37.79 บาทต่อลิตร และก๊าซโซฮอล 95 ราคา 39.19 บาทต่อลิตร ปัจจุบันราคาน้ำมันดิบเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน พ.ศ.2554 อยู่ที่ประมาณ 95-120 เหรียญสหรัฐ ต่อบาร์เรล และคาดว่าอีก 5 ปีข้างหน้าราคาน้ำมันอาจพุ่งถึง 300 เหรียญสหรัฐ ต่อบาร์เรล (บริษัท ไทยออยล์ จำกัด (มหาชน), 2554) ส่วนราคาน้ำมันขายปลีก กรุงเทพฯ และปริมาณพล ประจำปี 2554 ตั้งแต่เดือนมกราคม จนถึงเดือนธันวาคม มีราคาน้ำมันดีเซล 26.99-29.99 บาทต่อลิตร ก๊าซโซฮอล 91 ราคา 31.54-36.94 บาทต่อลิตร ก๊าซโซฮอล 95 ราคา 33.29-39.44 บาทต่อลิตร และก๊าซธรรมชาติเอ็นจีวี (NGV) ราคา 8.5 บาทต่อกิโลกรัม โดยเอ็นจีวีมีราคาคงที่มาตลอด 4 ปีที่ผ่านมา โดยคาดว่าราคาน้ำมันขายปลีกโดยเฉพาะดีเซลจะขยับตัวสูงขึ้นเรื่อยๆ จะเห็นได้จาก 10 ปีที่แล้ว ราคาขยับสูงกว่าเมื่อปี พ.ศ. 2541 จากราคาน้ำมันดีเซลราคาอยู่ในช่วงเพียง 7-11 บาทต่อลิตร ก๊าซโซฮอล 91 ราคา 9-12 บาทต่อลิตร และก๊าซโซฮอล 95 ราคา 10-13 บาทต่อลิตร (บริษัท ปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย [ปตท.] จำกัด (มหาชน), 2554) จากปัญหาราคาน้ำมันที่ราคาสูงขึ้น และปัญหาโลกร้อน ทำให้ประชากรตระหนักถึงการปรับเปลี่ยนการใช้เชื้อเพลิงจากแหล่งฟอสซิลเป็นพลังงานหมุนเวียน (Renewable energy) ซึ่งเป็นพลังงานหมุนเวียนที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติสามารถผลิตขึ้นใหม่ได้ เช่น แสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานชีวมวล พลังงานน้ำ และพลังงานความร้อนใต้พิภพ เช่น น้ำพุร้อน รวมทั้งการนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ตลอดจนสิ่งปฏิกูลจากผลผลิตของมนุษย์และสัตว์มาใช้เป็นแหล่งผลิตพลังงานทดแทน

เมื่อกล่าวถึงราคาเชื้อเพลิงและต้นทุนการผลิตจากข้อมูลการไฟฟ้าเพื่อการผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) ปี พ.ศ. 2541 ต้นทุนเชื้อเพลิงในการผลิตไฟฟ้าของโรงไฟฟ้าที่ใช้เชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ใช้น้ำมันเตาราคา 1.10 บาท/หน่วย ดีเซลราคา 2.72 บาท/หน่วย ถ่านหินราคา 0.50 บาท/หน่วย และก๊าซธรรมชาติราคา 0.93 บาท/หน่วย (1 หน่วย = 1 กิโลวัตต์-ชั่วโมง) (สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ, 2542) และมีต้นทุนการผลิตไฟฟ้าของโรงไฟฟ้าที่ใช้พลังงานทดแทนประเภทหมุนเวียน ดังนี้ พลังงานแสงอาทิตย์ต้นทุนราคา 11.46 บาท/หน่วย พลังงานลมราคาเป็น 2.84 บาท/หน่วย พลังงานชีวมวลราคา 2.27 บาท/หน่วย ก๊าซชีวภาพจากอุตสาหกรรมแปรรูปการเกษตรราคา 1.91 บาท/หน่วย น้ำเสียราคา 1.3-1.6 บาท/หน่วย และขยะชุมชนราคา 2.23 บาท/หน่วย (1 หน่วย = 1 กิโลวัตต์-ชั่วโมง) ถึงแม้ว่าต้นทุนการผลิตในช่วงเริ่มต้นจะมีราคาค่อนข้างแพงเมื่อเทียบกับปิโตรเลียม เพราะอยู่ในระหว่างการพัฒนาและวิจัย แต่ก็มี ความจำเป็นที่ต้องมีการคิดค้นและพัฒนาต่อไป เพื่อให้มีทางเลือกที่จะมีพลังงานใช้ไม่มีวันหมด

ข้อจำกัดของพลังงานหมุนเวียน คือบางชนิดมีอยู่มาก แต่ไม่สามารถนำมาใช้ได้ตลอดเวลาและไม่เพียงพอ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม และพลังงานน้ำ เช่น ถ้าท้องฟ้ามีดครึ้มจะไม่มีแสงอาทิตย์ หรือลมสงบจะไม่มีลมไปหมุนกังหัน หรือระดับน้ำในเขื่อนไม่เพียงพอก็ผลิตไฟฟ้าไม่ได้ ทำให้ต้องใช้เทคโนโลยีเข้ามาช่วยเก็บพลังงานไว้หรือเพิ่มการผลิตให้มากขึ้นเพื่อนำพลังงานไปใช้ได้ต่อเนื่อง ทำให้ต้นทุนเพิ่ม แม้พลังงานหมุนเวียนอาจใช้แก้ปัญหาพลังงานไม่ได้ทั้งหมด แต่ก็ยังเป็นอีกหนึ่งทางเลือกจากธรรมชาติที่มีคุณค่า ช่วยลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี สำหรับสถานการณ์โลกในปัจจุบันที่มีภัยธรรมชาติเกิดขึ้นมาก การคำนึงถึงความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ก็เป็นประเด็นที่สำคัญมากด้วย (บริษัท ลีโอนิคส์ จำกัด, 2552)

พลังงานไฮโดรเจน

1. ไฮโดรเจนพลังงานทางเลือก

ไฮโดรเจน เป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน แทนน้ำมัน จากเหตุผลที่ว่า ประการแรก ไฮโดรเจน นั้นเป็นธาตุที่มีอยู่ในปริมาณมากที่สุดในจักรวาล และมีมากเป็นอันดับ 3 บนโลก และเป็นองค์ประกอบของสสารแทบจะทุกชนิด ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือ น้ำ ในน้ำหนึ่งโมเลกุลมีไฮโดรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ถึงสองอะตอม ประการที่สำคัญที่สุดคือ ก๊าซไฮโดรเจนให้พลังงานสูง ค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนเท่ากับ 140 เมกะจูลต่อกิโลกรัมมากกว่าค่าพลังงานน้ำมันประมาณ 3 เท่า มากกว่าถ่านหินกว่า 4 เท่า และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอลถึง 5 เท่า ตามลำดับ (หน่วยวิจัยพลังงานด้านความร้อนและส่งเสริมอนุรักษ์พลังงาน [TECP], ม.ป.ป.) ส่วนในด้านสิ่งแวดล้อมการสันดาปก๊าซไฮโดรเจนนั้นสะอาดมาก สิ่งที่ได้คือน้ำบริสุทธิ์ ดังนั้นไฮโดรเจนจึงจัดเป็นพลังงานสะอาด (clean energy) หรือพลังงานสีเขียว (green energy) เช่นเดียวกับ น้ำ แสงอาทิตย์ และลม เป็นต้น ซึ่งต่างจากแหล่งพลังงานดั้งเดิมที่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก โดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ที่เกิดจากการสันดาปของสารประกอบอินทรีย์ อย่างเช่น น้ำมัน นอกจากนี้การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงดั้งเดิมไม่ว่าจากยานพาหนะหรือแหล่งอุตสาหกรรมต่างๆ ยังก่อให้เกิดควัน และฝุ่นละออง มลพิษทางอากาศ

อีกประการหนึ่งก็คือ ไฮโดรเจน นั้นไม่มีวันหมดไปจากโลก ก๊าซไฮโดรเจน สามารถสกัดได้จากน้ำ แล้วเมื่อเผาผลาญ จะได้น้ำกลับมาอีก เป็นวัฏจักรต่อเรื่อยๆ จึงจัดเป็นพลังงานทดแทน

จากแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วสามารถหมุนเวียนมาใช้ได้อีก เรียกว่า “พลังงานหมุนเวียน” (renewable energy) พลังงานที่ใช้แล้วสามารถผลิตขึ้นมาใหม่หรือเกิดขึ้นใหม่ได้ในระยะเวลาที่ไม่นานมาก อาจเรียก พลังงานทดแทน พลังงานหมุนเวียนและพลังงานที่ใช้ไม่หมด เป็นต้น

ข้อจำกัดของการใช้พลังงานไฮโดรเจน คือด้านการกักเก็บ เพราะไฮโดรเจนเป็นก๊าซไวไฟ หากมีในบรรยากาศเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถทำให้เกิดการติดไฟได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ไฮโดรเจนสามารถแทนที่ออกซิเจนในบรรยากาศได้ ทำให้เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิต การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีอิเล็กโทรไลซิส (electrolysis) ที่ใช้ไฟฟ้าในการแยกไฮโดรเจนจากน้ำมีต้นทุน 2-2.5 เหรียญสหรัฐ ต่อการผลิตไฮโดรเจน 1 กิโลกรัม การผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวล โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ด้วยวิธีไพโรไลซิส (pyrolysis) มีต้นทุน 2.6-3.0 เหรียญสหรัฐ ต่อไฮโดรเจน 1 กิโลกรัม และหากผลิตจากเชื้อเพลิงเหลวมีต้นทุน 1.5 เหรียญสหรัฐ ต่อไฮโดรเจน 1 กิโลกรัม (วัชร, 2553) ถึงแม้ว่าต้นทุนการผลิตไฮโดรเจนยังแพงอยู่ แต่หากมีการวิจัยและพัฒนาในประเด็นดังกล่าวก็มีแนวโน้มที่จะลดลง ในขณะที่น้ำมันราคาแพงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นก๊าซไฮโดรเจนก็เป็นตัวเลือกที่ดีที่จะใช้ เป็นพลังงานทดแทน

2. สมบัติของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำที่เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิตบนโลก เป็นโมเลกุลมีทั่วไปตามธรรมชาติ บรรยากาศในโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ppm โดยก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มองไม่เห็น สามารถแพร่ไปบริเวณต่างๆ ได้รวดเร็ว มีความหนาแน่นต่ำ ดังนั้นจึงเคลื่อนที่ผ่านอากาศได้รวดเร็ว มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุล เท่ากับ 436 kJ/mol หรือ 104 kcal/mol การเผาไหม้ไฮโดรเจนเกิดขึ้นได้เมื่อรวมตัวกับอากาศต้องการพลังงานในการติดไฟต่ำ ไฮโดรเจนแบ่งเป็น 3 สถานะ คือ ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็ง ไม่มีสี โครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม ปริมาตรต่อโมลาร์เท่ากับ 22.56 ลูกบาศก์เซนติเมตร/โมล (cm^3/mol) ไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวไม่มีสี ค่าความหนืด (viscosity) ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว และไฮโดรเจนที่เป็นก๊าซ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม (หน่วยวิจัยพลังงานด้านความร้อน และส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน [TECP], ม.ป.ป.)

3. ประโยชน์ของไฮโดรเจน

3.1 ใช้เป็นเซลล์เชื้อเพลิง (TECP, ม.ป.ป.)

เซลล์เชื้อเพลิง คือ อุปกรณ์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมี-ไฟฟ้า (electro-chemical reaction) ระหว่างออกซิเจนกับไฮโดรเจนซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงพลังงานของเชื้อเพลิง ไปเป็นพลังงานไฟฟ้าโดยตรง ไม่ต้องผ่านการเผาไหม้ ทำให้เครื่องยนต์ที่ใช้เซลล์เชื้อเพลิงนี้ไม่ก่อมลพิษทางอากาศ นอกจากนี้เซลล์เชื้อเพลิง ยังเป็นอุปกรณ์แปลงพลังงานโดยไม่มีการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วน อุปกรณ์ ดังนั้นเซลล์เชื้อเพลิงจึงเงียบ ทั้งยังมีประสิทธิภาพสูงกว่าเครื่องยนต์เผาไหม้ 1-3 เท่า แบ่งระบบเซลล์เชื้อเพลิงได้ตามประเภทของอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้แบ่งได้ 5 ชนิด เซลล์เชื้อเพลิงทุกชนิดจะใช้ไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิง หรืออาจใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ เป็นเชื้อเพลิงก็ได้ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเซลล์เชื้อเพลิงชนิดนั้นๆ ชนิดที่นิยมใช้คือ เซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจน-ออกซิเจน เพราะเมื่อปฏิกิริยาในเซลล์เกิดขึ้นแล้วนอกจากพลังงานจะได้น้ำบริสุทธิ์ และความร้อน เซลล์เชื้อเพลิงชนิดนี้ยังไม่ทำลายชั้นบรรยากาศโอโซนเพราะไม่ก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เช่นเซลล์เชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ

เซลล์เชื้อเพลิงมีลักษณะคล้ายกับเซลล์สะสมไฟฟ้าแบบตะกั่วหรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่าแบตเตอรี่ในด้านที่สามารถอัดประจุใหม่ได้เรื่อยๆ เซลล์เชื้อเพลิงยังไม่เป็นที่นิยมใช้ทั่วไปแพร่หลาย เพราะราคาแพงต้นทุนการผลิตสูง

ประโยชน์ของเซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจน ได้แก่ ใช้เป็นแหล่งพลังงานพกพา (Portable Power) รถยนต์พลังงานเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel Cell Electric Vehicle : FCEV) และใช้ผลิตไฟฟ้า เป็นต้น

Department of Energy (DOE) ของสหรัฐอเมริกาได้กำหนดนโยบาย ในระยะยาวว่าจะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำและแสงแดด ใช้ไฮโดรเจน เป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) และให้แพร่หลายสู่ชุมชนจนเป็นหนึ่งในสินค้าตัวที่ทุกคนต้องการ เช่นเดียวกับน้ำมันในปัจจุบัน

การวิจัยและพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงในประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยมีแหล่งเชื้อเพลิงมากมายหลายชนิดนอกจากน้ำที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนได้ ตัวอย่างเช่น ก๊าซธรรมชาติ ก๊าซชีวภาพ วัสดุชีวมวล ถ่านหินหรือแม้แต่เอทานอลจากพืช ประเทศไทยจึงมีข้อได้เปรียบในการใช้

เทคโนโลยีเชื้อเพลิงไฮโดรเจน ทำให้มีงานวิจัยในประเทศเรื่อยมาที่ศึกษาการเปลี่ยนวัตถุดิบดังกล่าวไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน และได้มีการนำเทคโนโลยีและความรู้จากต่างประเทศมาใช้พัฒนาเทคโนโลยีการแปรรูปเชื้อเพลิงจากวัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศ ถึงแม้ว่าไทยต้องซื้อเทคโนโลยีเซลล์เชื้อเพลิงจากต่างประเทศเข้ามาก็ตาม แต่ก็ยังลดต้นทุนด้านพลังงานของประเทศได้มาก และประสิทธิภาพของระบบโดยรวมก็ยิ่งสูงกว่าการซื้อเทคโนโลยีทั้งระบบจากต่างประเทศ เนื่องจากคุณสมบัติของวัตถุดิบในแต่ละประเทศแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในประเทศไทยในหลายสถาบันที่ผลิตเซลล์เชื้อเพลิงไฟฟ้า และพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไฟฟ้าตามต้องการ เช่นกรมการพลังงานทหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดย รศ.ดร. ถิรพัฒน์ วิสัยทอง งานวิจัยของคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บัณฑิตวิทยาลัยร่วมด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อม (JGSEE) โดย รศ.ดร. อภิชาติ เทิดเทียนวงษ์ และงานวิจัยของภราดร แสงสุวรรณ และคณะ (ไทยรัฐ, 2552; TECP, ม.ป.ป.)

รศ. เทอดไทย วัฒนธรรม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมี และวัสดุขั้นสูง และศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติได้พัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนไฮโดรเจนไปเป็นพลังงานไฟฟ้า ผลิตไฟฟ้าขนาด 350 วัตต์ 500 วัตต์ และ 1 กิโลวัตต์ ตามลำดับ (เทอดไทย และสุนันท์, 2549) พัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงเดี่ยว เซลล์เชื้อเพลิงแถว พัฒนาช่องทางไหล และส่วนประกอบอิเล็กโทรดเมมเบรน (Membrane electrode assembly: MEA) ตลอดจนระบบควบคุมการทำงาน และชุดเดินเครื่องทดสอบ เพื่อให้เป็นเทคโนโลยีในประเทศซึ่งอาจนำไปใช้ผลิตไฟฟ้าโดยเฉพาะในชนบทที่ห่างไกล และนำไปสู่การพัฒนาเป็นแหล่งพลังงานสำหรับรถยนต์ต่อไปด้วย (เทอดไทย และสุนันท์, 2549) และในปี พ.ศ. 2548 คณะวิจัยของ รศ.ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำโครงการวิจัยร่วมกับกลุ่มของ รศ. เทอดไทย วัฒนธรรม โดยทำโครงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยีที่ใช้กับเซลล์เชื้อเพลิงได้ โดยคาดหวังว่าในอนาคตเซลล์เชื้อเพลิงจะช่วยลดปริมาณการใช้ปิโตรเลียมในประเทศได้

3.2 ประโยชน์ของไฮโดรเจนด้านอื่นๆ

นอกจากนำไฮโดรเจนมาใช้เป็นเชื้อเพลิงหรือแปลงเป็นไฟฟ้าสำหรับรถยนต์และยานยนต์อื่นๆ ไฮโดรเจนยังใช้เป็นเชื้อเพลิงในกระสวยอวกาศ จรวด รวมถึงให้ความร้อน ไฟฟ้าและทำน้ำบริสุทธิ์ให้นักบินอวกาศ เป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงให้เครื่องมือชนิดพกพา เช่น คอมพิวเตอร์ กระเป๋าคอมพิวเตอร์และโทรศัพท์มือถือ นำไปหมนกังหันหรือเซลล์กำเนิดไฟฟ้า เป็นแหล่งให้ความร้อนและไฟฟ้าแก่อาคารด้วย นอกจากนี้ไฮโดรเจนยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตปุ๋ย แอมโมเนีย กลั่นน้ำมันปิโตรเลียม การสังเคราะห์แอมโมเนีย และเมทานอล เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในกระบวนการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) กับสารอินทรีย์ที่ไม่อิ่มตัว เช่น น้ำมันที่ไม่อิ่มตัว ใช้เป็นตัวรีดิวซ์ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ และในการถลุงโลหะ ใช้เตรียมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และกรดโบรมไนด์ (HBr) และใช้ในกระบวนการเตรียมโลหะที่มีความบริสุทธิ์สูง ปัจจุบัน มีโรงงานผลิตไฮโดรเจนขนาดใหญ่และท้องถิ่น และในต่างประเทศกำลังก้าวหน้าไปถึงมีการใช้พลังงานไฮโดรเจนและมีสถานีเติมไฮโดรเจน (สารานุกรมออนไลน์ทางอินเทอร์เน็ต, 2550; Wikipedia, the free cyclopedia, 2009; บริษัท ลิโอไนส์ จำกัด, 2552)

4. เทคโนโลยีการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนใช้กระบวนการทั้งทางกายภาพและเคมีไฟฟ้าที่แยกโมเลกุลของน้ำหรือก๊าซธรรมชาติออกเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน และกระบวนการทางชีวภาพ

4.1 เทคโนโลยีของการผลิตไฮโดรเจนทางกายภาพและเคมีไฟฟ้าแบ่งเป็น 3 เทคโนโลยีหลัก ได้แก่

4.1.1 Thermal Process เป็นการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้ความร้อนเป็นเครื่องมือ ในการควบคุม ให้เกิดปฏิกิริยา เช่น reforming, gasification, partial oxidation และ high-temperature water splitting (thermolysis) แต่ละกระบวนการในการผลิตจะมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน แต่กระบวนการที่ได้รับความนิยมเชิงพาณิชย์มากที่สุดคือ steam reforming วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คือ เชื้อเพลิงฟอสซิล (ก๊าซธรรมชาติ) เชื้อเพลิงชีวมวล หรือน้ำ ขึ้นอยู่กับกระบวนการที่ใช้

4.1.2 Electrolytic Process เป็นการใช้ไฟฟ้าแยกน้ำให้กลายเป็นไฮโดรเจน และออกซิเจน วัตถุดิบ คือน้ำ

4.1.3 Photolytic Process หรือ Biophotolysis เป็นการใช้พลังงานแสงเพื่อแยกน้ำเป็นไฮโดรเจน และออกซิเจน เช่น photoelectrochemical water splitting ที่ใช้เทคโนโลยีของ semiconductor เพื่อที่จะแยกน้ำโดยใช้แสงแดด เช่น ใช้ไฟฟ้าจากเซลล์แสงอาทิตย์ (solar cell) และ photobiological water splitting ที่ใช้แสงแดดและกระบวนการทางชีวภาพของสาหร่ายเซลล์เดียว และแบคทีเรีย ในการแยกน้ำกลายเป็นไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นต้น (TECP, ม.ป.ป.; กระทรวงพลังงาน, 2550)

4.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ แบ่งเป็น 4 วิธี ดังนี้ (Das and Veziroglu, 2001)

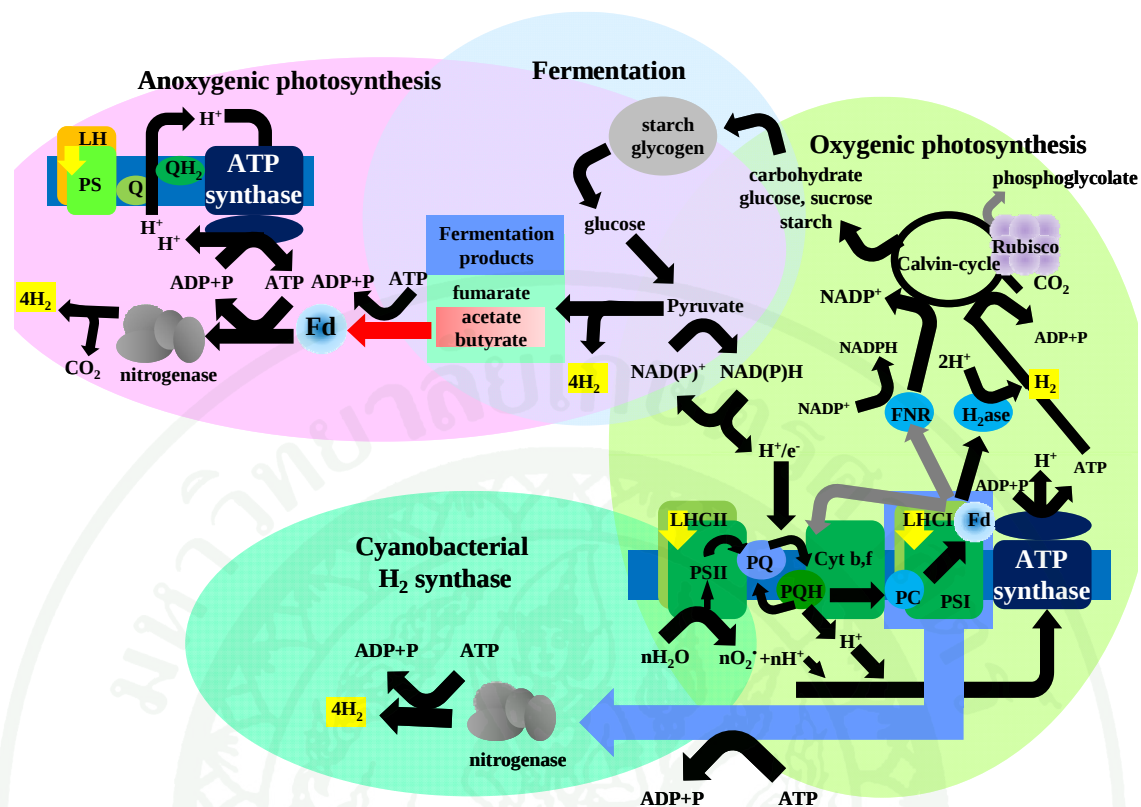
4.2.1 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ด้วยกลไกการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic decomposition of organic compounds using photosynthetic bacteria) ด้วยแบคทีเรียกลุ่ม Anoxygenic phototrophic bacteria

4.2.2 กระบวนการทางชีวภาพที่ใช้พลังงานแสงในการแตกตัวของน้ำ (Biophotolysis of water using algae and cyanobacteria)

4.2.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักสารประกอบอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียเฮเทอโรโทรฟ (Fermentative hydrogen production from organic compounds using heterotrophic bacteria)

4.2.4 ระบบผสมโดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงและแบคทีเรียกลุ่มเฟอร์เมนเตทีฟ (Hybrid systems using photosynthetic and fermentative bacteria)

ภาพที่ 1 แสดงกระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีชีวภาพของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ด้วยกระบวนการแตกต่างกัน อาทิเช่น กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบให้ออกซิเจน (Oxygenic photosynthesis) กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบไม่ให้ออกซิเจน (Anoxygenic photosynthesis) กระบวนการสังเคราะห์ไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรีย หรือกระบวนการหมัก (Fermentation) ตารางที่ 1 แสดงจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่ใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจน



ภาพที่ 1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพของจุลินทรีย์

ที่มา: The Solar Bio-Fuels Consortium (2008)

ตารางที่ 1 แสดงจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่ใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจน ดังนี้

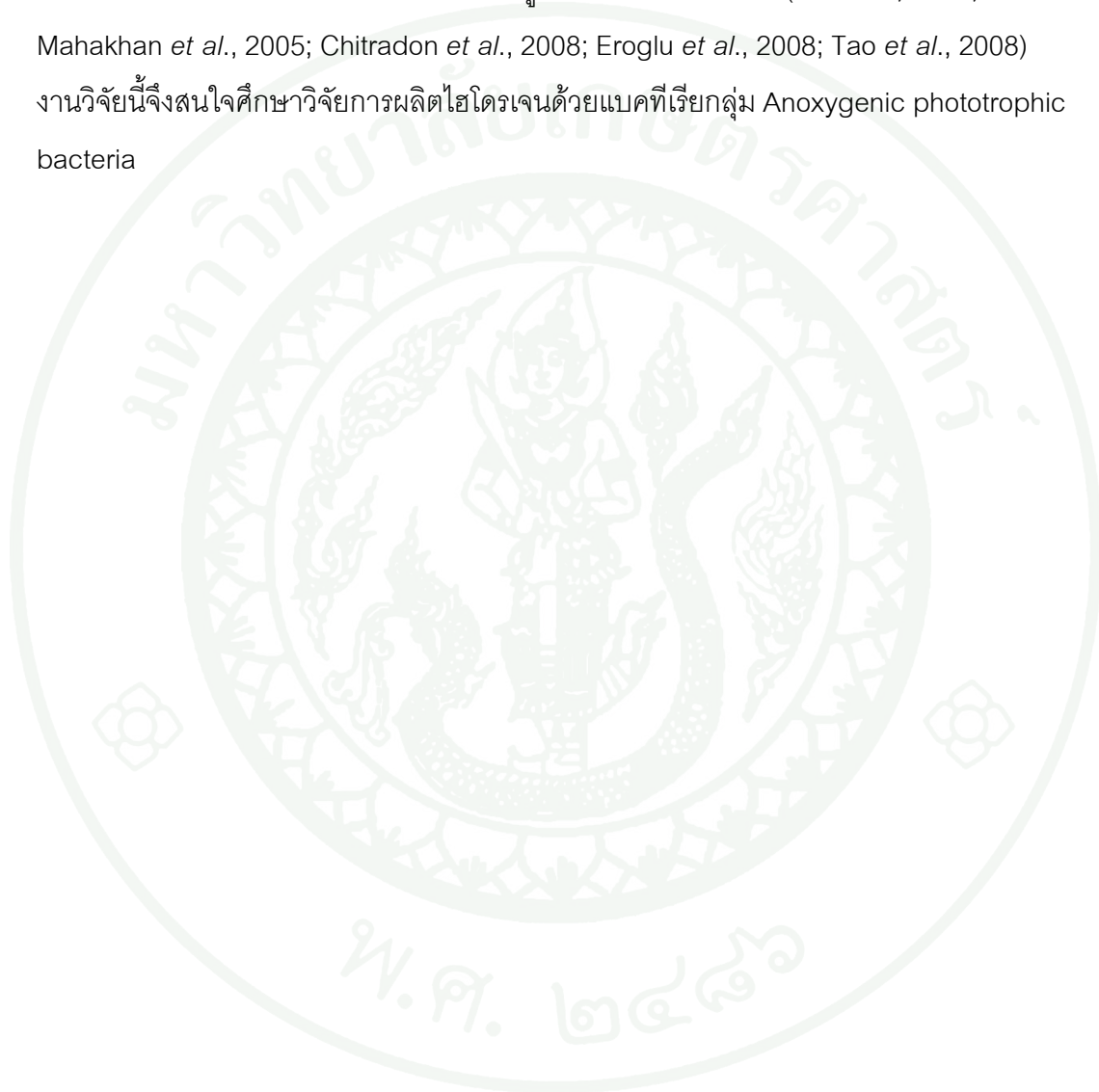
กลุ่มจุลินทรีย์	สายพันธุ์
สาหร่ายสีเขียว	<i>Scenedesmus olliquus</i> , <i>Chlamydomonas reinhardii</i>
ไซยาโนแบคทีเรีย	
กลุ่มมีเฮเทอโรไซตัส (heterocystous)	<i>Anabaena azollae</i> , <i>Anabaena</i> sp. สายพันธุ์ CA <i>A. variabilis</i> , <i>A. cylindrina</i> <i>Nostoc muscorum</i> , <i>N. spongiaeforme</i>
กลุ่มไม่มีเฮเทอโรไซตัส (non-heterocystous)	<i>Plectonema boryanum</i> , <i>Oscillatoria</i> Miami BG7 <i>O. limnetica</i> , <i>Synechococcus</i> sp. <i>Aphanothece halophytico</i> <i>Mastidocladus laminosus</i>
แบคทีเรีย	
กลุ่ม photobacteria	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>R. capsulatus</i> <i>R. sulidophilus</i> <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> <i>R. palustris</i> , <i>R. capsulata</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Chromatium</i> sp. Miami PSB 1071 <i>Chlorobium limicola</i> , <i>Chloroflexu aurantiacus</i> <i>Thiocapsa roseopersicina</i>
เฟอร์เมนเตฟแบคทีเรีย	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> <i>Clostridium butyricum</i> , <i>C. pasteurianum</i> <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Magashaera elsdenii</i> <i>Citrobacter intermedius</i> , <i>Escherichia coli</i>

ที่มา: ดัดแปลงจาก Das and Veziroglu (2001)

5. การเปรียบเทียบกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพของแบคทีเรีย

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีชีวภาพส่วนมากเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และในบรรยากาศปกติ กระบวนการเหล่านี้ไม่ใช้พลังงานมาก แตกต่างจากเทคโนโลยีการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมด้วยวิธีกายภาพและเคมีไฟฟ้าที่กล่าวข้างต้น แบคทีเรีย 2 กลุ่มใหญ่ๆ ที่มีรายงานการใช้ผลิตไฮโดรเจน คือ กลุ่ม Anaerobic heterotrophic bacteria ที่มีการสร้างพลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) และให้ไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ ร่วมกับก๊าซอื่น กลุ่มที่ 2 คือแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยๆ กลุ่มที่สังเคราะห์แสงและได้ออกซิเจน (Oxygenic phototrophic bacteria) ได้แก่ ไชยานินแบคทีเรีย และกลุ่มที่สังเคราะห์แสงแต่ไม่ได้ออกซิเจน (Anoxygenic phototrophic bacteria) ได้แก่ sulfur และ non-sulfur bacteria ทั้งที่เป็น purple และ green bacteria แต่เมื่อต้องการผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวล แบคทีเรียกลุ่ม Oxygenic phototrophic bacteria ไม่เป็นที่สนใจนัก เพราะจุลินทรีย์เหล่านั้นเป็นกลุ่มที่ใช้สารอนินทรีย์ คือเป็น autotroph (Westermann *et al.*, 2007) และมีข้อจำกัดของการผลิตไฮโดรเจนที่เกิดจากออกซิเจนที่จะไปยับยั้งกลไกการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ผลผลิตของก๊าซไฮโดรเจนที่ได้มีสัดส่วนต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของก๊าซทั้งหมดที่แบคทีเรียผลิต รวมทั้งยังมี doubling time ที่ยาวกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มเฟอร์เมนเตทีฟ หรือ Anaerobic heterotrophic bacteria จะมีอัตราการผลิตเร็วกว่าของจุลินทรีย์กลุ่มสังเคราะห์แสง แต่ข้อจำกัดคือ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียกลุ่มเฟอร์เมนเตทีฟ มีการผลิตกรดไขมันบางชนิด เช่น แลคติก อะซิติก บิวทิริก และอื่นๆ และก๊าซผสมอื่นๆ สัดส่วนของไฮโดรเจนในก๊าซผสมน้อย ซึ่งต้องทำการแยกหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเช่นเดียวกับการกระบวนการ oxygenic photolysis ส่วนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม Anoxygenic photoheterotrophic bacteria ผลิตปริมาณกรดไขมันในปริมาณที่ต่ำ ดังตารางที่ 2 (Das and Veziroglu, 2001) ให้สัดส่วนไฮโดรเจนในก๊าซทั้งหมดที่เซลล์ผลิตสูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซอื่นที่ได้ด้วยมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นจึงเหมาะแก่การใช้ผลิตไฮโดรเจนเพื่อนำไปป้อนเซลล์เชื้อเพลิง (PEM fuel cell) ที่ไฮโดรเจนเจือต้องมีความบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ (Wang *et al.*, 2003) ทำให้ไม่ต้องเสียเวลา และค่าใช้จ่ายมากในการทำให้ไฮโดรเจนบริสุทธิ์ ตรงกันข้ามกับการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรีย Anaerobic heterotrophic bacteria และ Oxygenic phototrophic bacteria ที่ให้ก๊าซไฮโดรเจนความบริสุทธิ์น้อย ก๊าซที่ได้จากการผลิตด้วยกลุ่ม Anaerobic heterotrophic bacteria มีองค์ประกอบของไฮโดรเจน 25-69 เปอร์เซ็นต์ (Chang *et al.*, 2002; Fang and Liu, 2002; Shin, *et al.*, 2004) และของกลุ่ม Oxygenic phototrophic bacteria เช่น

Spirulina maxima มีองค์ประกอบของไฮโดรเจนเพียง 18 เปอร์เซ็นต์ (Ananyev *et al.*, 2008) ส่วนก๊าซที่ผลิตจาก *Oscillatoria* sp. Miami BG7 และ *Anabaena cylindrica* มีองค์ประกอบของไฮโดรเจน 60 เปอร์เซ็นต์ (Weissman and Benemann, 1977; Philips and Mitsui, 1983) ซึ่งมีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง กลุ่ม Anoxygenic photoheterotrophic bacteria ซึ่งก๊าซที่ผลิตได้มีองค์ประกอบของไฮโดรเจนสูงถึง 93-99 เปอร์เซ็นต์ (He *et al.*, 2005; Mahakhan *et al.*, 2005; Chitradon *et al.*, 2008; Eroglu *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาวิจัยการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียกลุ่ม Anoxygenic phototrophic bacteria



ตารางที่ 2 เปรียบเทียบข้อดี และข้อจำกัด ของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพด้วย
จุลินทรีย์ต่างๆ

ชนิดจุลินทรีย์	ข้อดี	ข้อจำกัด
สาหร่ายสีเขียว	ผลิตไฮโดรเจนจากน้ำด้วย กระบวนการสังเคราะห์แสง	1. มีสัดส่วนของไฮโดรเจนต่อก๊าซอื่นต่ำ กว่า 40 เปอร์เซ็นต์ 2. ต้องการแสง 3. ออกซิเจนมีผลยับยั้งกิจกรรมของ เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ที่ เร่งกลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนใน สภาวะมีแสง
ไซยาโน แบคทีเรีย	1. ผลิตไฮโดรเจนจากน้ำด้วย กระบวนการสังเคราะห์แสงแบบพีช 2. ใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนสผลิต ไฮโดรเจนเป็นหลัก 3. มีความสามารถในการตรึง ไนโตรเจนจากบรรยากาศ 4. สามารถใช้แสงช่วงกว้าง	1. มีสัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนต่อก๊าซ อื่นน้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ 2. ต้องการพลังงานแสง 3. พบออกซิเจน 30 เปอร์เซ็นต์ ในก๊าซ ผสมรวมอยู่กับไฮโดรเจน ออกซิเจนมี ผลยับยั้งเอนไซม์ไนโตรจีเนส และ ออกซิเจนมีผลต่อ fuel cell 4. ก๊าซมีคาร์บอนไดออกไซด์ผสม
Phototrophic bacteria	1. มีสัดส่วนของไฮโดรเจนสูงถึง 93-99 เปอร์เซ็นต์ 2. สามารถใช้ของเสียเป็นวัตถุดิบ ได้หลายชนิด	1. ต้องการแสงในการผลิตไฮโดรเจน 2. เพาะเลี้ยงยาก เพราะต้องการแสง ในสภาวะไม่มีออกซิเจนอย่างมาก

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดจุลินทรีย์	ข้อดี	ข้อจำกัด
Fermentative bacteria	1. สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ตลอดวันโดยไม่ต้องการแสง 2. สามารถใช้สับสเตรดอินทรีย์ได้หลายชนิด อย่างเช่น แป้ง เซลโลไบโอส ซูโครส ไซโลส ฯลฯ และวัตถุดิบอื่นๆอีกมากมาย 3. ผลิตภัณฑ์ (metabolites) ที่มีราคา เช่น กรดบิวทิริก กรดแลคติก กรดอะซิติก ฯลฯ เป็นผลพลอยได้ 4. เทคโนโลยีการหมักเป็นที่รู้จักและควบคุมได้	1. มีสัดส่วนของก๊าซไฮโดรเจนน้อย 2. มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผสม 3. ของเหลวที่ได้จากการหมัก ต้องมีกระบวนการบำบัดก่อนการกำจัด มิฉะนั้นจะเป็นการเพิ่มปัญหามลพิษทางน้ำ

6. การผลิตไฮโดรเจนของ Anoxygenic phototrophic bacteria

ข้อได้เปรียบของการใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน คือ

ก. ก๊าซที่ผลิตได้มีองค์ประกอบของไฮโดรเจนสูงถึง 93-99 เปอร์เซ็นต์ (He *et al.*, 2005; Mahakhan *et al.*, 2005; Chitradon *et al.*, 2008; Eroglu *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008)

ข. ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงสับสเตรดไปเป็นไฮโดรเจนทางทฤษฎีสูง โดยสามารถใช้สับสเตรดเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน สำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจน แล้วมีกรดอินทรีย์เหลืออยู่ในระบบน้อย ต่างจากพวก Fermentative bacteria

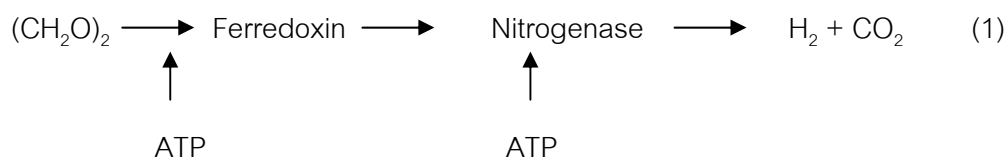
ค. ไม่มีกิจกรรมการสร้างออกซิเจน ซึ่งเป็นสาเหตุของปัญหาการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน และเป็นอันตรายต่อ fuel cell

ง. สามารถใช้สารอินทรีย์ได้หลายชนิด รวมทั้งสารอินทรีย์ที่ได้มาจากของเสีย และจึงให้ผลพลอยได้ในการบำบัดน้ำทิ้ง

แบคทีเรียกลุ่ม Anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ 1. Non-sulfur purple bacteria ได้แก่ Family *Athiorhodaceae* และ *Rhodospirillaceae* 2. Sulfur purple bacteria ได้แก่ Family *Chromatiaceae* และ *Thiorhodaceae* และ 3. Green sulfur bacteria ได้แก่ Family *Chlorobiaceae*

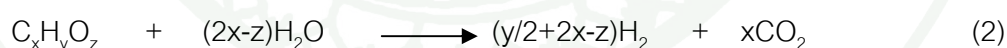
ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1979 กลุ่มวิจัยของ รศ.ดร.เลอลักษณ์ จิตรดอน ที่มี Prof. Hajime Takahashi มหาวิทยาลัยโตโฮกุ ประเทศญี่ปุ่นเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รายงานการใช้แบคทีเรียกลุ่ม Anoxygenic phototrophic bacteria ชนิด non-sulfur purple ในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเป็นกลุ่มหนึ่งของแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ โดยศึกษาในหลายแง่มุมทั้งการคัดเลือกสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และไทย การหายใจ เอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับกลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและเทคโนโลยีการผลิต (Takahashi *et al.*, 1979, 1980; Watanabe *et al.*, 1980, 1981; Kim *et al.*, 1980, 1981, 1982; Okuda *et al.*, 1981; Buranakarl *et al.*, 1982, 1983) และต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบันที่ รศ.ดร. เลอลักษณ์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยที่ศึกษาถึงสรีรวิทยาที่สำคัญหลายประการ ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เอนไซม์วิทยา และการใช้วัสดุทางการเกษตรและน้ำทิ้งประเภทแบ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิต รวมถึงการออกแบบถังผลิตไฮโดรเจน (photobioreactor) ให้เหมาะสมกับสรีรวิทยา และกลไกของเซลล์ที่ทำให้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์ได้ในปริมาณสูง (เลขที่คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ที่ 0801002594 วันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 และเลขที่ 1001000317 วันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553) (Ngmjarearnwong *et al.*, 2003, 2004; Mahakhan *et al.*, 2005; Chitradon *et al.*, 2008; Dechprae *et al.*, 2009, 2010a, 2010b; Channarong *et al.*, 2010) กลุ่มนักวิทยาศาสตร์อื่นๆ ที่ได้มีการศึกษาวิจัยการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรีย non-sulfur purple phototroph เช่น Zhu *et al.* (1999); Yetis *et al.* (2000); Eroglu *et al.* (2004, 2006, 2008); Tao *et al.* (2008); Liu *et al.* (2009a, 2009b); Melniki *et al.* (2009); Kars and Gunduz, (2010)

สมการแสดงกระบวนการทางชีวเคมีโดยรวมสำหรับกระบวนการที่ใช้แสงในการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ของแบคทีเรีย phototroph จะเห็นว่าอาศัยสาร Ferredoxin และเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังสมการที่ 1 (Das and Veziroglu, 2001)



เมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย non-sulfur purple phototroph ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไร้ออกซิเจน แสงจะไปกระตุ้นแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนเพื่อไปสังเคราะห์พลังงานสูง (ATP) ทำให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงแบคทีเรียจะเจริญโดยเมแทบอลิซึมที่ต่างไปคือ ได้พลังงานจากกระบวนการ TCA cycle เอนไซม์ที่สำคัญในการคatabolize กระบวนการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส (Hydrogen uptake hydrogenase) จะมีกิจกรรมที่จะดึงไฮโดรเจนกลับไปใช้ในเซลล์ ซึ่งพบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงหลายชนิด (Asada and Miyake, 1999)

ปัจจุบันพบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสง กลุ่ม purple non sulfur phototroph สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน ในการเกิดก๊าซไฮโดรเจนได้ ภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีออกซิเจน แต่อาจเป็นบรรยากาศของไนโตรเจนหรืออาร์กอน สมการที่ 2 แสดงสมดุลของการ oxidize สารประกอบอินทรีย์ แล้วให้ก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์โดย non-sulfur purple phototroph (Koku *et al.*, 2002)



กลุ่มผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* สายพันธุ์ SB24 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม purple non-sulfur phototroph ที่ไม่มีเมตชีลเฟอรูอยู่ในเซลล์ และมีรงควัตถุสามารถสังเคราะห์แสงได้ และเป็นสายพันธุ์ที่ทนร้อน และเจริญได้ดีโดยไม่ใช้ออกซิเจน (thermotolerant anoxygenic purple non-sulfur phototrophic bacteria) จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลำดับเบสบนยีน 16S rDNA จัดจำแนกได้ว่าอยู่ใน beta subclass (Ngmjarearnwong *et al.*, 2003, 2004; Mahakhan *et al.*, 2005) มีความแตกต่างจากแบคทีเรียในยีนัส *Rhodobacter* sp. และ *Rhodopseudomonas* sp. ที่มีการศึกษากันมากในเรื่องการผลิตไฮโดรเจนที่จัดอยู่ในกลุ่ม alpha subclass (Sasikala *et al.*, 1992, 1995; Barbosa *et al.*, 2001; Boone *et al.*, 2001; Koku *et al.*, 2002, 2003; Eroglu *et al.*, 2004, 2006, 2008;

He *et al.*, 2005; Ozturk *et al.*, 2006; Kars *et al.*, 2006, 2008; Li *et al.*, 2008) ในปี พ.ศ. 2547 คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์ หรือสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งให้อิเล็กตรอนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง พบว่า สายพันธุ์ SB24 สามารถใช้ โซเดียมอะซิเตด (sodium acetate) ไพรูเวต (pyruvate) แลคเตต (lactate) มาเลต (malate) ซัคซิเนต (succinate) แอสปาร์เตต (aspartate) กลูตาเมต (glutamate) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose) เป็นแหล่งอิเล็กตรอนได้ และยังสามารถผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติกที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ด้วย (จินตนา, 2543; Ngmjarearnwong *et al.*, 2003, 2004; Mahakhan *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถย่อยแป้งดิบได้ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด และแป้งถั่วเขียว *Rubrivivax gelatinosus* สายพันธุ์ SB24 สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งสำหรับให้อิเล็กตรอน เพื่อการผลิตไฮโดรเจนได้โดยไม่จำเป็นต้องทำให้แป้งสุก (gelatinized) ก่อน (Chitradon *et al.*, 2008) และให้ก๊าซไฮโดรเจนในอัตราผลิตสูงเมื่อเทียบกับรายงานในต่างประเทศคือ อยู่ในช่วง 30-45 มล./ลิตร/ชม. ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร จากคุณลักษณะที่สามารถใช้แป้งได้หลายชนิดเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน ดังนั้นอีกทางเลือกหนึ่งคือ การใช้น้ำทิ้งประเภทแป้ง เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตพลังงานไฮโดรเจน มีรายงานการใช้น้ำทิ้งและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรผลิตไฮโดรเจน เช่น Sasikala *et al.* (1992); Yigit *et al.* (1999); Eroglu *et al.* (2004, 2006, 2008)

6.1 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของ Anoxygenic phototrophic bacteria

Anoxygenic purple non-sulfur phototrophic bacteria โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Rhodobacter* sp. และ *Rhodopseudomonas* sp. เป็นสายพันธุ์ที่ศึกษาการผลิตไฮโดรเจน และปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนกันมาก ส่วน *Rubrivivax gelatinosus* ยังมีการศึกษาน้อยอยู่ กลไกการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียกลุ่มนี้เกิดในสภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสง โดยเจริญแบบ photoheterotroph โดยใช้สารอินทรีย์เป็นสับสเตรตได้หลายชนิด แล้วผลิตกรดอินทรีย์ขึ้น สุดท้ายกรดอินทรีย์นั้นก็สามารถูกใช้ต่อไปและถูกเปลี่ยนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจน ดังนั้นพลังงานที่ได้จากแสงไม่ได้นำมาจากการออกซิไดซ์น้ำ (Eroglu *et al.*, 2004, 2008; Tao *et al.*, 2008; Redwood *et al.*, 2009)

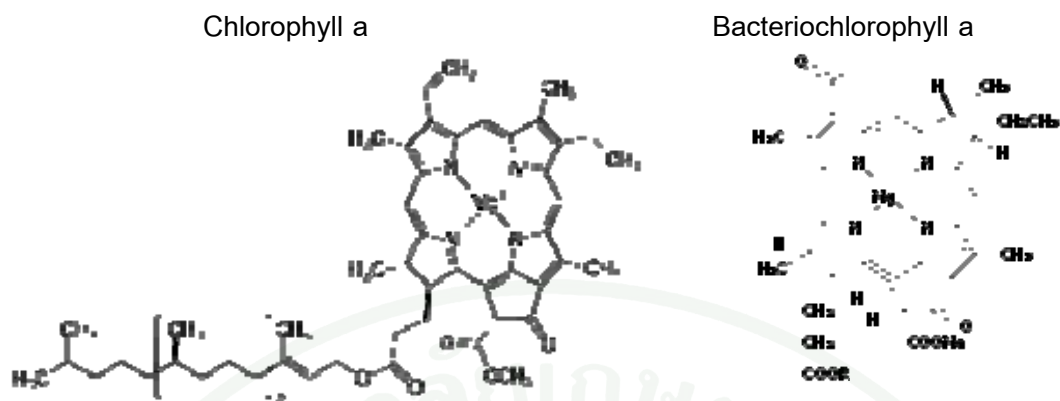
6.1.1 กระบวนการสังเคราะห์แสง (Prescott *et al.*, 1999)

กระบวนการสังเคราะห์แสงทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานพันธะเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง adenosine triphosphate (ATP) โดยที่ ATP ที่สร้างขึ้นจะใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ กระบวนการสังเคราะห์แสงของ Anoxygenic phototrophic bacteria ทุกชนิดไม่ได้ออกซิเจน และเป็น Cyclic photophosphorylation ซึ่งแตกต่างจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่มีแสงหรือปฏิกิริยาที่ใช้แสง (light reaction) ของพืชหรือไซยาโนแบคทีเรียจะเกิดกระบวนการ Non-cyclic photophosphorylation ในปฏิกิริยา light reaction ของแบคทีเรีย non-sulfur purple จะใช้สารประกอบอินทรีย์ และแบคทีเรียกลุ่ม sulfur purple หรือ sulfur green จะใช้สารประกอบอนินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช้น้ำ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นตัวรีดิวซ์หรือแหล่งให้อิเล็กตรอน ได้พลังงาน ATP และโคเอนไซม์ (Coenzyme) ในรูปรีดิวซ์ โดยแสงจะทำหน้าที่กระตุ้น (excitation) แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาแล้วจะขนถ่ายอิเล็กตรอนผ่าน carrier system ควบคู่ไปกับการสร้าง ATP และเซลล์จะนำเอา ATP และโคเอนไซม์ในรูปรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน และเป็นตัวร่วมกับเอนไซม์ในการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงพวก sulfur green หรือ sulfur purple bacteria จะใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและไฮโดรเจนซัลไฟด์ หรือสารประกอบอนินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน สำหรับแบคทีเรียพวก non-sulfur purple bacteria ซึ่งเป็น photoheterotroph จะใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและกรดอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และสามารถใช้ไฮโดรเจนเป็น reductant ได้ ส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่สามารถ oxidize ซัลไฟด์ (S^{2-}) ได้ แต่ oxidize ซัลไฟท์ (SO_3^{2-}) หรือ thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) ได้ purple non sulfur bacteria กลุ่มนี้จัดเป็น heterotroph สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย มีเมแทบอลิซึมของกระบวนการหายใจ (respiratory metabolism) ได้ในสภาวะไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจน แต่ใช้สารอินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนแต่ไม่มีแสง และในสภาวะ strictly anaerobes ที่ค่า redox potential ต่ำกว่า -300 mV แบคทีเรีย non-sulfur purple จะเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 45 องศาเซลเซียส ได้อีกด้วย (Buranakarl *et al.*, 1986a)

ปฏิกิริยาที่ต้องใช้แสง (light reaction) ของกลุ่ม anoxygenic phototrophic bacteria ต่างจากไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) และพืชสรุปได้ ดังตารางที่ 3 แบคทีเรีย purple และ green phototroph มีรงควัตถุชนิดแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) ที่ต่างชนิดกับคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ที่พบในพืชและไซยาโนแบคทีเรีย กล่าวคือมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน (Kim and Gadd, 2008) ดังภาพที่ 2 โครงสร้างหลักของคลอโรฟิลล์และแบคทีเรียโ

คลอโรฟิลล์จะประกอบด้วยอนุพันธ์ของ pyrole 4 วง เชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ของ แมกนีเซียม บริเวณ side chain ที่แตกต่างกันจะส่งผลให้แบ่งชนิดเป็นหลายชนิด ทำให้มี คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน นอกจากนี้แบคทีเรีย phototroph ยังมี แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นรงควัตถุอีกชนิดอยู่ด้วย และในกลุ่ม purple phototroph จะมี ปริมาณมากจนเห็นเซลล์เป็นสีแดง carotenoid จะดูดซึมพลังงานแสง และส่งต่อไปยังแบคทีเรีย โคลอโรฟิลล์

แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์เอ และบีของ green และ purple phototrophic bacteria ที่ละลายในสารละลายอีเทอร์ สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 775 และ 790 นาโนเมตร ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์เอในเซลล์ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความ ยาวคลื่นสูงกว่าคือเท่ากับ 830-890 นาโนเมตร และแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์บี มีค่าการดูดกลืนแสง สูงสุดที่ความยาวคลื่น 1020-1040 นาโนเมตร



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของ Chlorophyll a และ Bacteriochlorophyll a

ที่มา: Wikipedia, the free cyclopedia. (2011a, 2011b)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการสังเคราะห์แสงของ phototrophic bacteria กับ cyanobacteria และพืช

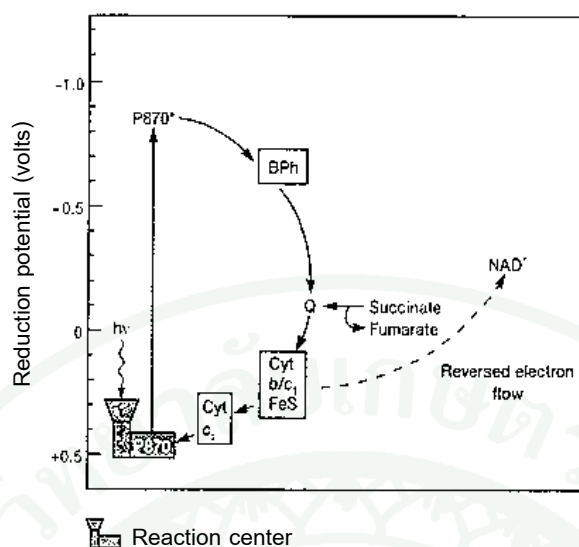
คุณสมบัติ	Green และ purple phototrophic bacteria	ไซยาโนแบคทีเรีย	พืช
1. รงควัตถุที่ใช้กระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthetic pigment)	แบคทีเรียคลอโรฟิลล์	คลอโรฟิลล์	คลอโรฟิลล์
2. การมี Photosystem II	ไม่มี	มี	มี
3. จัดเป็น Photophosphorylation แบบ	Cyclic	Non-cyclic	Non-cyclic
4. แหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthetic electron donors)	ไฮโดรเจน, ไฮโดรเจนซัลไฟด์, ซัลเฟต, สารอินทรีย์	น้ำ	น้ำ
5. รูปแบบการผลิตไฮโดรเจน (H_2 production pattern)	Anoxygenic	Oxygenic*	Oxygenic
6. แหล่งคาร์บอน (Carbon source)	สารประกอบอินทรีย์ และ/หรือ คาร์บอนไดออกไซด์	คาร์บอนไดออกไซด์	คาร์บอนไดออกไซด์

หมายเหตุ *ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบ Anoxygenic เช่น *Oscillatoria* ที่สามารถใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแทนน้ำได้

ที่มา: Prescott *et al.* (1999)

ข้อแตกต่างของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง green และ purple phototroph เมื่อเทียบกับพืชและไซยาโนแบคทีเรีย คือการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นแบบ cyclic ไม่มี photosystem II ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถใช้น้ำเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน จึงไม่สามารถผลิตออกซิเจนในการสังเคราะห์แสง แบคทีเรีย purple และ green sulfur phototroph เกือบทุกชนิดเป็น strictly anaerobe รูปแบบการถ่ายเทอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic electron transport chain) ดังแสดงดังภาพที่ 3 เมื่อได้รับแสง reaction center P870 ถูกกระตุ้น (excite) จะให้อิเล็กตรอนส่งไปยัง แบคเทอริโอโอฟโรไฟติน (BPh) และเคลื่อนที่ต่อไปยังควิโนน (Quinone) และส่งผ่านห่วงโซ่การขนย้ายอิเล็กตรอนกลับไปยัง P870 ผ่าน cytochrome b และ cytochrome C₁ ขณะที่ผลักดันให้เกิดการสร้าง ATP และเกิด reverse reaction flow ให้ NAD^+

ในการสร้าง NADH และ NADPH ของ green และ purple bacteria ต้องใช้แหล่งให้อิเล็กตรอนประเภทไฮโดรเจน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ element sulfur และสารประกอบอินทรีย์ สารเหล่านี้มีค่าความต่างศักย์มาก (redox potential) ซึ่งมากกว่าน้ำจึงเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนที่ดี (Prescott *et al.*, 1999) purple bacteria ไม่ได้ผลิต NADH โดยตรงในปฏิกิริยาใช้แสง แต่ใช้แรง proton motive force ที่จะเปลี่ยนเส้นทางของอิเล็กตรอนใน electron transport chain และย้ายอิเล็กตรอนเหล่านั้นจากสารประกอบอินทรีย์หรือกรดอินทรีย์ที่เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนส่งไปยัง NAD^+ ส่วน green bacteria สามารถรีดิวซ์ NAD^+ ได้โดยตรงระหว่างปฏิกิริยาใช้แสง (Kim and Gadd, 2008)



ภาพที่ 3 ระบบการขนส่งอิเล็กตรอนในสภาวะมีแสงของ purple non sulfur phototroph ชนิด *Rhodobacter sphaeroides*

ที่มา: Prescott *et al.*, (1999)

สรุปได้ว่ากระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรีย ใช้พลังงานแสงทำให้อิเล็กตรอนถูกขนส่ง สาร high energy substance ที่ได้ในแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น *Rhodospirillum rubrum* ได้เฉพาะ $\text{NADH} + \text{H}^+$ ขณะที่ *Rhodopseudomonas* sp. ได้ ATP และ $\text{NADH} + \text{H}^+$

6.1.2 กระบวนการตรึงไนโตรเจน

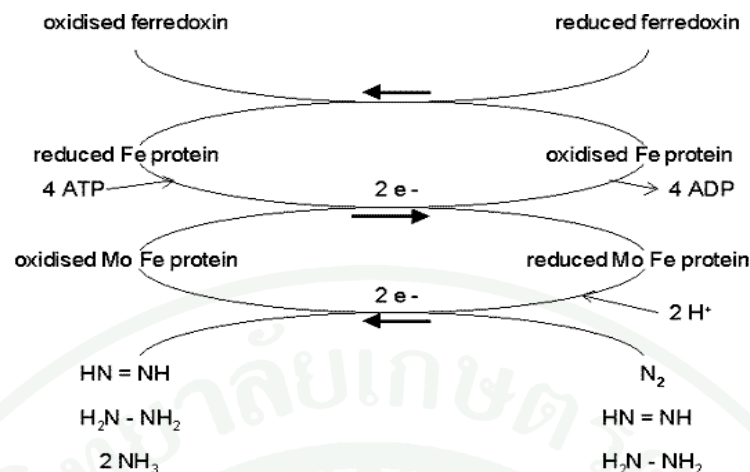
หลังจากที่พบแบคทีเรีย *Azotobacter* เป็นพวกตรึงไนโตรเจนประมาณ 50 ปี Lindstrom *et al.* (1949) ได้พิสูจน์ว่า *Rhodospirillum rubrum* เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์แรกพบว่าตรึงไนโตรเจน และต่อมาจึงพบใน *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rp. capsulatus*, *Rp. palustris*, *Chromatium* sp. และ *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* (Lindstrom *et al.*, 1949)

จากการศึกษาสรีรวิทยาของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง พบว่าแบคทีเรียจะตรึงไนโตรเจนได้ ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีแสง (Lindstrom *et al.*, 1949; Yoch, 1978)

ในการทดลองให้แสงสลັบกับไม่ให้แสงพบว่า *Rs. rubrum* และ *Chromatium* sp. ตรึงไนโตรเจนได้อย่างมีนัยสำคัญในสภาวะไม่มีแสง และไม่มีออกซิเจน เมื่อหยุดให้แสงกับ *Chromatium vinosum* สายพันธุ์ D พบว่าแบคทีเรียไม่ได้หยุดตรึงไนโตรเจนในทันที แต่ยังคงกิจกรรมต่อไปได้อีก 30 นาที จากการศึกษาใน *Rs. rubrum* แสดงว่าเมื่อหยุดให้แสงระยะแรกกระบวนการตรึงไนโตรเจนจะยังสามารถใช้สารตัวกลาง (intermediate) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงเดิมต่อไปได้ และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสารอินทรีย์ที่เป็นสับสเตรดได้พลังงานและสารตั้งต้นไปใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Yoch, 1978)

เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) คือเอนไซม์ที่สำคัญที่คะตะไลส์กระบวนการตรึงไนโตรเจน (Yoch, 1978) เช่น เอนไซม์ไนโตรจีเนสของ *Azotobacter chroococcum* ประกอบด้วย โปรตีน 2 subunit คือ subunit แรกเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบเรียก Fe-protein และ subunit ที่สองเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบเรียก Mo-Fe protein (Robson, 1978)

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ โปรตีน subunit Fe-protein จะรับอิเล็กตรอนจาก reduced ferredoxin ไปเป็น reduced Fe-protein ต่อจากนั้น reduced Fe-protein จะจับ ATP และผลักดันอิเล็กตรอนให้กับโปรตีน subunit ที่สอง คือ Mo-Fe protein ซึ่งจะทำหน้าที่รีดิวซ์โมเลกุลของไนโตรเจน ($N \equiv N$) ไปเป็น $HN=NH$ แล้ว $HN=NH$ จะถูกรีดิวซ์ไปเป็น H_2N-NH_2 และรีดิวซ์ต่อไปได้เป็น NH_3 (Deacan, 2009) แอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จะเข้าสู่ Anabolism สังเคราะห์กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิกเป็นส่วนใหญ่ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ปฏิกริยาการตรึงไนโตรเจน (N_2 -fixation)

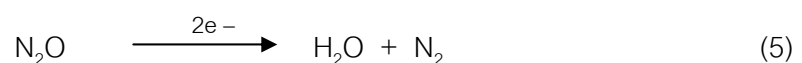
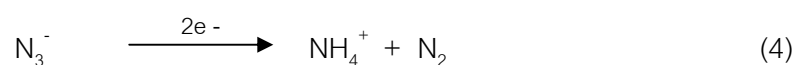
ที่มา: Deacan (2009)

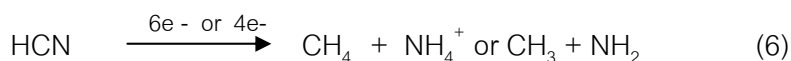
แหล่งของอิเล็กตรอนที่ใช้ได้มาจากเฟอรีดอกซินในรูปรีดิวซ์ (reduced ferredoxin) หรือฟลาโวโปรตีนในรูปรีดิวซ์ (reduced flavoprotein) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย โดยอิเล็กตรอนถูกผลิตขึ้นโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) การหายใจ (respiration) หรือกระบวนการหมัก (fermentation) ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ (Deacan, 2009)

อิเล็กตรอนที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจน 1 โมเลกุล ดังแสดงสมการที่ 3 (Oelze and Klein, 1996)

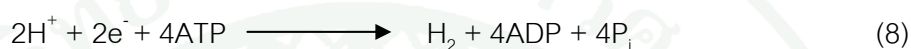


Rs. rubrum สามารถรีดิวซ์ไซยาไนด์ (CN^-) เอไซด์ ($-N_3$) และไอโซไซยาไนด์ ($-N_3C$) ได้ดีพอๆกับไนโตรเจน อะซิทีลีน และโปรตรอน ด้วยการคะตะไลส์ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังสมการ 4-7 นั้นสารดังกล่าวจึงเป็นตัวยับยั้งการตรึงไนโตรเจน





นอกจากนี้ โปรตรอน (H^+) ก็สามารถถูกรีดิวซ์ไปเป็นไฮโดรเจนได้จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ ATP ดังสมการที่ 8 (Koku *et al.*, 2002)



6.1.3 ไฮโดรเจนเมแทบอลิซึม (hydrogen metabolism) (Yoch, 1978)

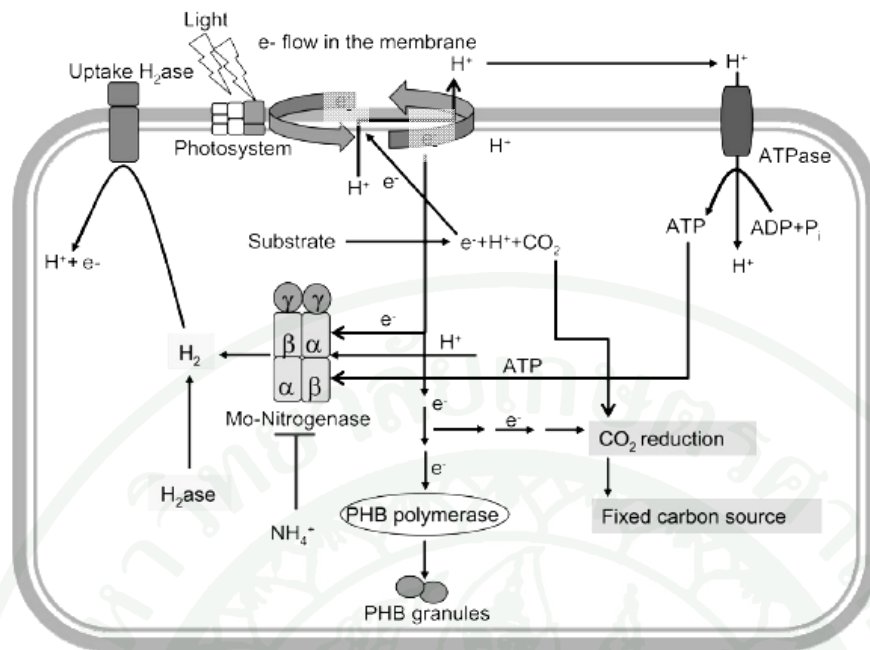
ไฮโดรเจนเมแทบอลิซึมมี 2 แบบ คือ

ก. การผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสง (Photoevolution of Hydrogen)

ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม non-sulfur purple จะเกิดกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสง (Photoevolution of Hydrogen) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นหลัก จากรายงานของ Gest and Kamen (1949) กล่าวว่า NH_4^+ จะยับยั้งการสังเคราะห์ไฮโดรเจนในสภาวะมีแสง (photoevolution of H_2) ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ *Rs. rubrum* เช่นเดียวกับกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation bacteria) จากข้อสังเกตนี้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนกับการตรึงไนโตรเจน

การผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เกิดในสภาวะที่มีแสงนั้นอาศัยพลังงาน ATP และอิเล็กตรอนนั่นคือ reducing power หรือ low potential reductant ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง light reaction (Yoch, 1978) เช่น *Rhodospseudomonas palustris* ผลิตไฮโดรเจนปริมาณมากเมื่ออยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน และมีแสง โดยมีสารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *R. palustris* ในที่มีแสง กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในเซลล์ของแบคทีเรียสอดคล้องกับการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ต้องการพลังงาน ATP (ATP-dependent H_2 evolution) เป็นปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของโปรตรอนด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Kim *et al.*,

1980) และ *Rhodopseudomonas sphaeroides* B5 และ *R. gelatinous* T-20 จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงชันมาก และที่อุณหภูมิสูงชันถึง 45 องศาเซลเซียส เมื่ออยู่ในสภาวะ strictly anaerobe และมีแสง และมีค่า Redox potential ต่ำระดับ -300 mV (Buranakarl *et al.*, 1986a) ภาพที่ 5 แสดงกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของ purple non sulfur bacteria (Kars and Gunduz *et al.*, 2010) เริ่มตั้งแต่เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยแสงจะกระตุ้นให้แบคทีเรียโอฟิลล์เกิดการแตกตัวของอิเล็กตรอน แล้วขนถ่ายของอิเล็กตรอนผ่านตัวขนส่งอิเล็กตรอน ทำให้ได้ ATP เมื่อเกิดสภาวะที่มี reducing power มากเกินไป เซลล์จะนำโปรตรอนและอิเล็กตรอนที่ได้จากการสังเคราะห์แสงไปใช้ผลิตไฮโดรเจน หรือนำไปในกระบวนการอื่นๆ เช่น carbondioxide reduction และ PHB production ขึ้นอยู่กับสภาวะและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และไฮโดรเจนที่ได้อาจเปลี่ยนกลับไปเป็นโปรตรอนและอิเล็กตรอนได้อีกด้วยโดยกระบวนการ hydrogen uptake ของเอนไซม์ไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส (Hup hydrogenase)



ภาพที่ 5 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับไฮโดรเจนของ purple non sulfur bacteria (PNS)

ที่มา: Kars and Gunduz (2010)

ข. การผลิตไฮโดรเจนในกระบวนการหมักในสภาวะไม่มีแสง จากกิจกรรมของไฮโดรเจนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส (Dark fermentative hydrogen evolution)

ไฮโดรเจนสามารถถูกดึงกลับเข้าไปใช้ในเซลล์หรืออาจถูกสร้างขึ้นโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งจะถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วยคาร์บอนมอนอกไซด์ การเกิด hydrogen evolution ในสภาวะไม่มีแสง ส่วนใหญ่รายงานว่าพบในแบคทีเรีย heterotroph หลายชนิด และ sulfur bacteria ซึ่งเป็นเมแทบอลิซึมของการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ เช่น ฟอर्मेट (formate) กลูโคส (glucose) กลีเซอรอล (glycerol) กลีเซอโรฟอสเฟต (glycerophosphate) และไพรูเวต (pyruvate) ปฏิกริยาการเกิดไฮโดรเจนจากการหมักจากสับสเตรดเหล่านี้ไม่ถูกยับยั้งโดย NO₂⁻, NO₃⁻ หรือ NH₄⁺ เหมือนกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนหรือการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสง เนื่องจากไม่ได้เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แต่เป็นกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรจีเนส เช่น formate hydrogenlyase (FHL) (Yoch, 1978)

มีรายงานการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรีย non-sulfur purple ชนิด *Rhodospirillum rubrum* ในสภาวะไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจน เช่นกัน แบคทีเรียใช้โซเดียมฟอร์มเมตเป็นสับสเตรด และพบว่าก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) สามารถยับยั้งการย่อยสลายฟอร์มเมตได้ อย่างสมบูรณ์ การย่อยสลายฟอร์มเมตนี้เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ formate hydrogenlyase โดยที่ไม่ต้องการพลังงาน ATP คล้ายกับกระบวนการของจุลินทรีย์กลุ่ม anaerobe heterotrophic ในทางตรงกันข้าม การผลิตไฮโดรเจนของ *Rs. rubrum* ในสภาวะมีแสงและไม่มีออกซิเจน ก๊าซ CO ไม่มีผลต่อไฮโดรเจนเมแทบอลิซึมแบบที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ต้องการ ATP (Thauer *et al.*, 1972; Voelskow and Schon, 1980)

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Kim *et al.* (1980) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของ *Rhodopseudomonas palustris* ไม่สัมพันธ์กับการสร้างก๊าซไฮโดรเจน แต่การสร้างก๊าซไฮโดรเจนมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในทางตรงข้ามในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม purple non sulfur มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่ทำหน้าที่นำไฮโดรเจนที่เกิดจากกระบวนการ hydrogen evolution กลับเข้าไปในเซลล์ (hydrogen uptake) ทำให้ไม่เกิดการปลดปล่อยโมเลกุลของก๊าซออกมานอกเซลล์ (Kars *et al.*, 2008; Kars and Gunduz, 2010) จึงเป็นสาเหตุให้ได้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนน้อย เอนไซม์ชนิดนี้เรียก hydrogen uptake hydrogenase ซึ่งต่างจากเอนไซม์ hydrogenase ในแบคทีเรีย heterotroph มีรายงานเกี่ยวกับการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย non-sulfur purple ให้เป็นสายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรเจนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสต่ำลงหรือไม่เกิดกิจกรรม หรือ *hup⁻* mutant ซึ่งทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) (Buranakarl *et al.*, 1982; Kern *et al.*, 1994; Kars and Gunduz, 2010)

7. ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบใช้แสงของ Anoxygenic phototrophic bacteria

ปัจจัยที่มีผลต่อกลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง anoxygenic phototroph โดยเฉพาะ non-sulfur purple ได้แก่

7.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งให้อิเล็กตรอนหรือแหล่งคาร์บอน

Barbosa *et al.* (2001) รายงานแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด คือ แลคเตต (lactate) มาเลต (malate) บิวทิเรต (butyrate) และอะซิเตต (acetate) ต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Rhodopseudomonas* sp. และ *R. palustris* พบว่าเมื่อใช้อะซิเตต 50 มิลลิโมลาร์ (mM) *Rhodopseudomonas* sp. มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 25 มล./ลิตร/ชม. ส่วน *R. palustris* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อใช้ malate 15 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 5.8 มล./ลิตร/ชม. เช่นเดียวกับ *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ที่ให้อัตราการผลิตสูงสุด เท่ากับ 10 มล./ลิตร/ชม. (4.6 โมลต่อสับสเตรตที่ใช้หนึ่งโมล) เมื่อใช้ malate 15 มิลลิโมลาร์ (Eroglu *et al.*, 2008)

7.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสงถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์โดยแอมโมเนีย , yeast extract หรือ peptone ที่มีปริมาณสูง (Gest and Kamen, 1949; Kim *et al.*, 1980) หรือ กรดอะมิโนเช่น alanine และ serine แบบที่เรียกว่าใช้ (assimilation) สารประกอบข้างต้นเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วปลดปล่อย (mineralization) NH_4^+ ออกมา ถ้ามีมากจะยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแต่ควบคุมให้มีความเข้มข้นต่ำและคงที่ในเซลล์ซึ่งทนขึ้นได้ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสงยังคงเกิดขึ้นได้ (Ormerod *et al.*, 1961)

Sasikala *et al.* (1995) ศึกษาผลของการเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูตาเมตต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ในอาหารที่มี malate 30 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ และเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูตาเมตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนระหว่างช่วง 2-11 มิลลิโมลาร์ แบบที่เรียผลิตไฮโดรเจนได้สูงแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาเมตมากกว่า 11 มิลลิโมลาร์ การผลิตไฮโดรเจนลดลง

Li *et al.* (2008) ศึกษาผลของการเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยตะกอนเชื้อผสมของแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง ที่ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *Rhodobacter* sp. พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 2 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียจะยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน ทั้งนี้เพราะแอมโมเนียยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสนั่นเอง

7.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรเจนัลเพคไฮโดรจีเนส

ตารางที่ 4 แสดงสถานะที่มีอิทธิพลต่อเอนไซม์ไนโตรจีเนสกับการผลิตไฮโดรเจนของ
แบคทีเรียสังเคราะห์แสง non-sulfur purple

Ormerod and Gest (1962) กล่าวว่าแอมโมเนียจะไปกดการสังเคราะห์
(biosynthesis repression) ของเอนไซม์จำเพาะที่จำเป็นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนในที่ที่มีแสง ซึ่ง
อาจมีหนึ่งชนิดหรือมากกว่า ในลักษณะของการยับยั้งแบบ feed back repression Kim et al.
(1980) พบว่าการผลิตไฮโดรเจนของ *Rs. palustris* และกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสถูกยับยั้ง
โดยสมบูรณ์เมื่อเติมเกลือแอมโมเนียมปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ แสดงประสิทธิภาพของอัตราการ
ผลิตไฮโดรเจน เป็นสัดส่วนโดยตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับ
เอนไซม์ไฮโดรเจนอัสเทคไฮโดรจีเนส และพบว่าสายพันธุ์กลาย *Nif⁻ mutant* ที่สูญเสียกิจกรรม
ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้

ตารางที่ 4 สภาวะที่มีผลต่อกิจกรรมไนโตรจีเนสกับกลไกการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

สภาวะ	กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส
1. การมีแสง และมีสารให้อิเล็กตรอน	ต้องการทั้งสองชนิด	ต้องการแสง อิเล็กตรอน และ ATP ตัวให้อิเล็กตรอนต้องมีสภาวะรีดิวซ์ เช่น reduced ferredoxin
2. การมีแอมโมเนียมมากเกินไปในอาหารสำหรับการเจริญ	ยับยั้ง	ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์
3. ระดับของแอมโมเนียมต่ำกว่าสภาวะสมดุล	ไม่มีผลกระทบ	ไม่มีผลกระทบ (เอนไซม์ไนโตรจีเนสไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมต่ำกว่า 10^{-6} M)
4. การมีออกซิเจน	ยับยั้ง	ยับยั้ง
5. สภาวะเจริญในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจนและไม่มีสารประกอบไนโตรเจนอื่นแหล่ง	เกิดกระบวนการ	เกิดกิจกรรม
6. แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอินทรีย์กลูตาเมต	เกิดกระบวนการ	เกิดกิจกรรม

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สภาวะ	กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน	กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (การผลิตไฮโดรเจนที่ขึ้นอยู่กับ ATP)
7. เซลล์ย้ายจากอาหารที่มีแอมโมเนียมไปเป็นอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนแต่		
ก. เดิมคลอแรมเฟนิคอลล	ก. ยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน	ก. ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์
ข. เดิมกลูตาเมต	ข. กระตุ้นการผลิตไฮโดรเจน	ข. กระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์
8. การมีคาร์บอนมอนอกไซด์	ไม่มีผลกระทบ	ไม่มีผลกระทบ
9. การมีโมลิบดีนัมในอาหารสำหรับการเจริญ	จำเป็น	จำเป็น
10. การมีสารยับยั้งกระบวนการฟอสโฟริเรชั่น	ยับยั้ง	ยับยั้ง เพราะกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสต้องการ ATP

ที่มา: Yoch (1978)

Kern *et al.* (1992) รายงานถึงการศึกษาอิทธิพลของ chelating agent ชนิด ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ต่อกลไกการผลิตไฮโดรเจนว่าสารดังกล่าวมีผลกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนให้เพิ่มขึ้น เนื่องจากไปยับยั้งการสังเคราะห์ของเอนไซม์ไฮโดรเจนัสเฟเทคไฮโดรจีเนส (Hup hydrogenase) และเคลื่อนย้าย (transfer) เฟอรัสไอออน ไปยังกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Koku *et al.*, 2002)

Ozturk et al. (2006) ปรับปรุงสายพันธุ์ *Rhodobacter capsulatus* ของที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับไซโตโครม (cytochrome) ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอน และยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไฮโดรเจนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส พบว่าเมื่อทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับไซโตโครม *cytc₂* หรือ *cytc_y* ไม่แสดงออก ส่งผลการผลิตไฮโดรเจนลดลง 3-4 เท่า แต่สายพันธุ์กลายที่ทำให้ยีนของเอนไซม์ไฮโดรเจนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสไม่แสดงออก มีการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเหมือนกับรายงานของ Kars et al. (2008) ที่พบว่าสายพันธุ์กลายที่ดัดแปลงพันธุกรรมของยีนส่วน *hupSL* ของเอนไซม์ไฮโดรเจนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส ผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติ โดยที่การเจริญไม่ต่างกัน

7.4 การให้แสง ความเข้มของแสง (light intensity) และความยาวคลื่น (wavelength) ของแสง

Uyar et al. (2007) พบว่า *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มแสง โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่ความเข้มแสง 270 วัตต์ต่อตารางเมตร แต่เมื่อจำกัดช่วงแสงอินฟราเรดให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 750-950 นาโนเมตร กลับส่งผลให้ลดการผลิตไฮโดรเจนลง 39 เปอร์เซ็นต์

Koku et al. (2003) ศึกษาผลของการผลิตไฮโดรเจนของ *R. sphaeroides* O.U.001 เมื่อทดลองบ่มในสภาวะมีแสงสลับกับไม่มีแสง (light-dark cycle) โดยใช้แสงความเข้มแสง 150-250 วัตต์ต่อตารางเมตรของพื้นผิวถึงผลิตไฮโดรเจนเป็นเวลา 14 ชม. สลับกับสภาวะไม่มีแสงจากหลอดไฟ 10 ชม. จุดประสงค์เพื่อผลิตไฮโดรเจนของ non-sulfur purple phototroph นอกห้องปฏิบัติการ (outdoor) ที่ใช้แสงจากแหล่งธรรมชาติ ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียเริ่มผลิตไฮโดรเจนเวลาเดียวกันกับสภาวะมีแสงตลอด และกิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเมื่อบ่มในสภาวะที่มีแสงตลอด ทำให้ได้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนมากกว่า

7.5 พีเอช

Sasikala *et al.* (1995) พบว่าเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้น 7.5 *R. sphaeroides* O.U.001 เริ่มผลิตช่วงกลาง log phase ซึ่งเร็วกว่าการใช้พีเอชเริ่มต้นที่ต่ำกว่า กล่าวคือที่พีเอช 6.5-7.0 แบคทีเรียเริ่มผลิตไฮโดรเจนช่วงต้น stationary phase ส่วนที่พีเอชเริ่มต้น 5.0-5.5 แบคทีเรียไม่เจริญ อย่างไรก็ตามรายงานของ Li *et al.* (2008) รายงานการใช้ตะกอนเชื้อผสมแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง ที่ส่วนใหญ่เป็น *Rhodobacter* sp. ว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนคือ 8.5 ซึ่งเป็นต่างก่อน

7.6 ความเข้มข้นของโลหะไอออน

7.6.1 ความเข้มข้นของเหล็กไอออน (Ferrous ion)

Kars *et al.* (2006) รายงานว่า *R. sphaeroides* O.U.001 ผลิตไฮโดรเจนทั้งหมดในระยะเวลา 240 ชม. 1.14 ลิตร/ลิตร เมื่อใช้เฟอร์ริกซิเตรท ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

Zhu *et al.* (2007) รายงานกับ *R. sphaeroides* DSM158 ว่าแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด 2.3 ลิตร/ลิตร เมื่อความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออนเท่ากับ 2.4 มก./ลิตร หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 11.8 มก./ลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออนเป็น 3.2 มก./ลิตร พบว่าการผลิตไฮโดรเจนลดลง

7.6.2 ความเข้มข้นของโมลิบดีนัมไอออน (molybdenum ion)

Kars *et al.* (2006) รายงานกับ *R. sphaeroides* O.U.001 ว่าเมื่อใช้โซเดียมโมลิบเดตความเข้มข้น 16.5 ไมโครโมลาร์ ให้ปริมาตรไฮโดรเจนทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 0.84 ลิตร/ลิตร ในระยะเวลา 168 ชม.

7.7 เชื้อเริ่มต้น (inoculum)

Koku *et al.* (2003) เปรียบเทียบอายุของเชื้อเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ระหว่าง exponential phase และ stationary phase ของ *R. sphaeroides* O.U.001 พบว่าเมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นในช่วง exponential phase ให้ก๊าซไฮโดรเจนทั้งหมดสูงกว่า และใช้เวลาผลิตน้อยกว่า เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นในช่วง stationary phase

7.8 ยีสต์สกัดที่ใช้เป็นแหล่งอาหาร

Koku *et al.* (2003) พบว่าการใส่ยีสต์สกัดแทนวิตามิน เพื่อเพาะเลี้ยง *R. sphaeroides* O.U.001 แบบที่เรียวยาวของได้เพิ่มขึ้น และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจาก 8.0 มล./ลิตร/ชม. เป็น 12.0 มล./ลิตร/ชม. และพบว่าช่วง lag phase ของการผลิตไฮโดรเจนสั้นลง จาก 27 ชม. เหลือเพียง 13 ชม.

7.9 ก๊าซในเซลล์ซัสเพนชัน

ชนิดของก๊าซในเซลล์ซัสเพนชันเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะมีแสง เมื่อก๊าซเป็น ฮีเลียม ไฮโดรเจน หรืออาร์กอน มีผลให้การผลิตไฮโดรเจนเกิดได้เร็วในสภาวะมีแสง (Yoch, 1978)

น้ำทิ้งจากโรงงานแปรงมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และเป็นพืชอาหารที่สำคัญในลำดับที่ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวเจ้า และมันฝรั่ง ภูมิภาคที่นิยมบริโภคมันสำปะหลัง ได้แก่ แอฟริกา อเมริกาใต้ รวมทั้งเอเชียบางประเทศ เช่น อินโดนีเซีย และอินเดีย ทั่วโลกผลิตมันสำปะหลังใช้เป็นอาหารมนุษย์ 60 เปอร์เซ็นต์ ทำอาหารสัตว์ 27.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือใช้ประโยชน์อย่างอื่น สำหรับประเทศไทยมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้เกษตรกรมากเป็นอันดับที่ 4 รองจากยางพารา อ้อย และข้าว ประเทศไทยส่งออกมันสำปะหลังมากที่สุดในโลก แต่ใช้บริโภคภายในประเทศน้อย การส่งออกมันสำปะหลังของไทยจะแปรูปเป็น

มันอัดเม็ด มันเส้น และแป้งมัน ตลาดสำคัญของมันอัดเม็ดของไทย คือ สหภาพยุโรป ในขณะที่ตลาดสำคัญของแป้งมันคือ ญี่ปุ่น (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

ในประเทศไทยมีการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักในหลายอุตสาหกรรม เช่น การผลิตผงชูรส (โมโนโซเดียมกลูตาเมต) กรดอะมิโนอื่นๆ ฟรุคโตสไซรัปและเอทานอล แป้งมันสำปะหลังจึงเป็นที่ต้องการ และมีการผลิตสูงขึ้นเรื่อยๆ ภายหลังกรรมวิธีการผลิตแป้งมันสำปะหลังมีน้ำทิ้งและของเหลือทิ้งจากแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตในปริมาณมาก น้ำทิ้งหรือของเหลือทิ้งยังคงมี แป้ง กากมันสำปะหลัง สารประกอบอินทรีย์ต่างๆ และไซยาไนด์ในปริมาณที่สูง (กรมวิชาการเกษตร, 2552) เฉพาะกากมันสำปะหลังส่วนเดียวก็มีแป้งคงเหลือค้างอยู่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Poonpairoj *et al.*, 2011) สารอาหารที่ยังคงเหลืออยู่ในน้ำทิ้งในปริมาณที่สูงนี้ ถ้าปล่อยน้ำทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อมจะเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษทางน้ำ หรืออากาศตามมา ทำให้น้ำทิ้งเป็นปัญหาของอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยเฉลี่ยโรงงานที่มีกำลังการผลิตขนาด 200 ตันแป้งต่อวัน ผลิตปีละ 200 วัน ในแต่ละวันจะมีประมาณน้ำทิ้งสูงถึง 4,000 ลูกบาศก์เมตร มีการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตกรดซิตริกจากแป้งมันสำปะหลังของโรงงานเอเชียซิตริก จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย มีค่าซีโอดี (COD; Chemical Oxygen Demand) เท่ากับ 22.6 กรัม/ลิตร ปริมาณไนโตรเจน (total N) เท่ากับ 0.26 กรัม/ลิตร, ฟอสฟอรัส (phosphorous) เท่ากับ 54 มก./ลิตร และพีเอช 5.02 (ตารางที่ 5) (อรรณพ, 2552; Reungsang *et al.*, 2004) การบำบัดน้ำทิ้งส่วนใหญ่จะใช้บ่อเปิดจำนวนมาก ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นรบกวนชุมชนและพื้นที่ใกล้เคียง ปัจจุบันหลายโรงงาน เช่น โรงงานชลเจริญ จ. ชลบุรี ได้นำน้ำทิ้งไปผลิตก๊าซชีวภาพหมუნเวียนกลับมาใช้ในโรงงาน ก๊าซชีวภาพที่ได้เป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่ง ที่มีองค์ประกอบของก๊าซมีเทน (CH_4) 50-70 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 25-35 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน (N_2) 2-5 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน (H_2) 1-5 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และก๊าซไฮโดรเจนไดซัลไฟด์ (H_2S) ซึ่งเมื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิง การเผาไหม้ยังคงก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก หากสามารถนำน้ำทิ้งมาผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ จะได้เชื้อเพลิงสะอาดที่ให้พลังงานได้สูงกว่าด้วย

ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบของน้ำทิ้งบางประการจากโรงงานเอเชียซิตริก จังหวัดกาฬสินธุ์ เปรียบเทียบกับน้ำทิ้งโรงงานในประเทศบราซิล ที่เรียกว่า *Manipueira* (Nitschke and Pastore, 2003; Marostica and Pastore, 2007)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปมันสำปะหลัง ของประเทศบราซิลและโรงงานเอเชียซิตริก จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น	
	รัฐเปาโล ประเทศบราซิล	จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid; g/L)	60.0-62.0	-
Chemical oxygen demand (COD; g/L)	53.4-60.0	22.6
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/L)	39.5-58.2	-
Non-reducing sugars (g/L)	20.1-23.3	-
Reducing sugars (g/L)	18.3-38.0	-
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (g/L)	1.6-2.1	0.3
ฟอสฟอรัส (mg/L)	83.3-369.0	54.00
โพแทสเซียม (mg/L)	895.0-3640.0	-
แคลเซียม (mg/L)	184.0-293.0	-
แมกนีเซียม (mg/L)	173.0-519.0	-
ซัลเฟต (mg/L)	38.0-154.0	-
เหล็ก (mg/L)	2.7-8.0	-
สังกะสี (mg/L)	2.8-4.5	-
แมงกานีส (mg/L)	1.5-3.5	-
ทองแดง (mg/L)	0.8-1.1	-
ฟิเอร์	5.3-5.8	5.0

ที่มา: รวบรวมจาก Nitschke and Pastore (2003); Reungsang *et al.* (2004); Marostica and Pastore (2007)

ตัวอย่างการนำน้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมันสำปะหลังไปใช้ เช่น การผลิตกลิ่นรสผลไม้โดย *Geotrichum fragrans* ที่ใช้ของเหลวที่ได้จากการสกัดหัวมัน (*manipueira* or cassava flour wastewater) (Damasceno *et al.*, 1999) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำทิ้งจากการสกัดแป้ง (*manipueira*) ด้วย *Bacillus* sp. (Nitschke and Pastore, 2003) และการผลิตก๊าซ

ชีวภาพจาก *manipueira* ด้วยกระบวนการย่อยสลายในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic digester) (Paixao *et al.*, 2000) เป็นต้น

การที่จะนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังที่มีองค์ประกอบต่างๆ ในปริมาณที่ไม่แน่นอนมาใช้อย่างมีผลต่อประสิทธิภาพกระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ ดังนั้นอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียที่ใช้ คือ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จึงจำเป็นต้องศึกษาและจะช่วยให้ผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง

การหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) เป็นวิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงการทำงานของระบบหรือกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด การวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ทำได้โดยหาที่ละปัจจัยขณะที่ควบคุมอิทธิพลของปัจจัยอื่นให้คงที่เรียก one factor at a time หรือใช้วิธีทางคณิตศาสตร์สถิตินำปัจจัยมากกว่า 2 ปัจจัยมาหาความสัมพันธ์ เรียก multivariable statistics techniques ซึ่งนิยมกันมากขึ้นในปัจจุบัน

ข้อจำกัดของวิธีการ one factor at a time คือ (1) ไม่สามารถหาผลกระทบร่วมระหว่างปัจจัยที่ทำการศึกษาทั้งหมด (2) ไม่สามารถรับรองผลได้ว่าปัจจัยที่ศึกษานั้นให้ค่าตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด และ (3) จำนวนการทดลองที่ใช้ศึกษา ถ้าต้องให้ครบทุกปัจจัยอย่างมีความสัมพันธ์กันหรือในทางสถิติเรียก full factorial method จะมีจำนวนการทดลองมาก (Araujo and Brereton, 1996; Wang and Wan, 2009)

วิธี Multivariate Statistic Techniques สามารถนำมาใช้หาสภาวะที่เหมาะสมได้โดยจะได้ความสัมพันธ์ระหว่างทุกปัจจัยจากวิธีพื้นผิวตอบสนองหรือ Response Surface Methodology (RSM) ซึ่งเป็นกระบวนการนำความรู้ทางคณิตศาสตร์ และทางสถิติ เข้ามาใช้ร่วมกับการทดลองจริงเพื่อช่วยในการหาผลตอบสนองที่ดีที่สุด (Optimum Response) และให้ได้ผลเร็วที่สุดอีกทั้งเป็นการลดจำนวนการทดลองลงได้ ช่วยให้ประหยัดทรัพยากรและเวลาที่ใช้ในการทดลอง แล้วได้ผลคือได้สภาวะที่ใกล้เคียงที่ดีที่สุดได้มากกว่าวิธี one factor at a time ทำโดยการนำสมการพหุนาม (Polynomial Equation) มาฟิต (fitted) เข้ากับผลการทดลอง ซึ่งจะทำให้สามารถอธิบายพฤติกรรมของชุดข้อมูลที่ศึกษาได้โดยวิธีทางสถิติ วิธีพื้นผิวตอบสนองหรือ RSM นั้น

นำไปใช้ได้ดีเมื่อต้องการศึกษาผลที่ได้จากการทดลอง (Response หรือ set of response) ที่ขึ้นกับอิทธิพลของหลายปัจจัย หลายระดับ

การนำวิธีการพื้นผิวตอบสนองหรือ RSM ประกอบด้วยวิธีการออกแบบการทดลอง (experimental design) ความรู้พื้นฐานในการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และความรู้ในการใช้โปรแกรมที่สร้างแผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) การออกแบบการทดลองต้องพิจารณาถึงวิธีการด้วย เช่น หากชุดข้อมูลที่ได้จากการทดลองนั้นแสดงผลเป็นเส้นตรง จะเลือกวิธีการออกแบบที่เป็น 1st order model แต่ถ้าแสดงผลเป็นเส้นโค้ง (curvature) จะใช้วิธีการออกแบบการทดลองที่เป็น 2nd order model เช่น Three-level factorial Design Box-Behnken Design, Central Composite Design และ Doehlert design เป็นต้น (อนุวัตร, 2549; Bezerra *et al.*, 2008)

1. ขั้นตอนการทำ RSM (อนุวัตร, 2549)

1.1 เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอ โดยเลือกทฤษฎีที่ออกแบบการทดลองที่เหมาะสม แล้วทำการทดลองจริงตามที่โปรแกรมออกแบบ

1.2 จากข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองจริงนำมาสร้างสมการถดถอย (regression) ที่ดีที่สุดสามารถใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติได้ เช่น SAS, SPSS หรือ MINITAB

1.3 สร้างแผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) จากสมการที่หามาได้ software ที่ใช้ เช่น STATISTICA หรือ MINITAB

1.4 ตรวจสอบ optimization ด้วยการทำการทดลองจริงอีกครั้งตามค่าที่ดีที่สุดจากคอนทัวร์

1.5 Verification โดยการทำ independent run ภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัว

1.6 ถ้า model ไม่เหมาะสม (invalid) ให้สร้าง model ใหม่ (ทำซ้ำข้อ 1.2 ถึง 1.5)

2. การเลือกแบบจำลอง (model selection) และการวางแผนการทดลอง (experimental design) (อนุวัตร, 2549)

การใช้วิธี RSM มีหลายเทคนิคในการสร้างและคัดเลือกแบบจำลอง (model) ที่ดีที่สุด นั้นขึ้นอยู่กับ การวางแผนเริ่มต้น และเมื่อมีแผนการทดลองแล้วจะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลองที่ใช้ อย่างไรก็ตาม บางการทดลองที่ไม่มีการวางแผนล่วงหน้าอาจเลือกใช้เทคนิคดังนี้

2.1. เทคนิคการสร้างแบบจำลองแบบสมบูรณ์ (full model technique) วิธีการนี้จะระบุแบบจำลองที่ต้องการใช้ เช่น แบบจำลองอันดับหนึ่ง (first order model) หรืออันดับสอง (second order model) แล้วทำการวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อประมาณค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรทุกตัว

2.2. เทคนิคการสร้างแบบจำลองลดรูป (reduced model technique) วิธีการนี้จะแสดงแบบจำลองแบบลดรูป (reduced model) โดยเลือกเฉพาะตัวแปรที่มีนัยสำคัญในแบบจำลองมาใช้สร้างแผนภาพคอนทัวร์ หรือ surface plot โดยวิเคราะห์สมการถดถอยด้วยเทคนิค ได้แก่ stepwise technique, all possible regression technique

แบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับ RSM ขึ้นอยู่กับแบบจำลองที่ใช้ ถ้าใช้แบบจำลองอันดับหนึ่ง การทดลองที่มีปัจจัย 2 ระดับก็เพียงพอ แผนการทดลองที่นำมาใช้ได้แก่ แฟคทอเรียล 2×2 ใน CRD หรือ RBD หรือแฟคทอเรียลบางส่วนของ 2^k series ซึ่งอิทธิพลหลัก (main effect) ไม่อัลเลียด (alias) ซึ่งกันและกัน เมื่อใช้แบบจำลองอันดับหนึ่งต้องระวัง และควรแน่ใจก่อนว่าปัจจัยที่นำมาศึกษาไม่อันตรกิริยากัน เพราะจะไม่สนใจในเทอมอันตรกิริยา (interaction term) หรือ cross product ส่วนในกรณีที่ต้องการใช้สมการลำดับ 2 (second order model) หรือตัวแปรมีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง จำเป็นต้องเลือกแผนการทดลองที่มีปัจจัย 3 ระดับขึ้นไป ได้แก่ 3^k fractional factorial in CRD หรือ RBD ซึ่งจะรวม cross product โดย k คือจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา และถ้าจำนวนปัจจัยทดลองมีมากเกินไปจะการใช้แผนการทดลองที่ดัดแปลงจากแฟคทอเรียล เช่น การทดลองแบบหมุน (Rotatable design), Central composite design (CCD) หรือ Box-Behnken design

Box-Behnken design เป็นวิธีที่ถูกยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการประมาณสัมประสิทธิ์ของ first และ second order ในสมการคณิตศาสตร์ เป็นวิธีที่ใช้ใน RSM เพื่อใช้หาข้อมูลมาใช้ในการประมาณพื้นผิวตอบสนองด้วยแบบจำลองความสัมพันธ์อันดับสอง และเป็นแผนการทดลองที่ใช้กับปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ และตัวแปรตอบสนองที่เป็นตัวแปรเชิงปริมาณ โดยแต่ละปัจจัยศึกษา 3 ระดับ การออกแบบการทดลองนี้สามารถลดจำนวนการทดลองลงจากเดิมที่ใช้แผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่ใช้ปัจจัยละ 3 ระดับ มีจำนวนมากทดลองทั้งหมดถึง 27 การทดลอง โดยจำนวนการทดลองของ Box-Behnken design หาได้จากสมการ 9

$$N = 2k(k-1) + C_p \quad (9)$$

เมื่อ N คือจำนวนการทดลอง

k คือจำนวนตัวแปร

C_p คือจำนวนครั้งของการทำซ้ำที่จุดตรงกลาง

Box-Behnken design ทำการทดลองตัวแปรแต่ละตัวด้วย 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับสูงกว่า (+1) และระดับกลางหรือระดับศูนย์ (0) ซึ่งในแต่ละระดับมีช่วงห่างเท่ากัน เช่น ศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่ 4 7 และ 10 เป็นต้น โดยช่วงห่างระหว่างแต่ละระดับมีค่าเท่ากัน ในที่นี้ห่างเท่ากับ 3 มีการนำ Box-Behnken design ไปประยุกต์ใช้นั้นจะนำไปใช้กับกระบวนการทางด้านเคมีและฟิสิกส์ แต่ด้านของการวิเคราะห์ทางเคมีนั้น จะนิยมใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design มากกว่า นอกจากนี้ในทางชีวภาพก็มีการใช้แบบการทดลองทั้ง 2 แบบ ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงาน (Bezerra *et al.*, 2008; Wang and Wan, 2009)

Central Composite Design หรือเรียกว่า A Box-Wilson Central Composite Design เป็นการออกแบบการทดลองที่ถูกเสนอโดย Box และ Wilson วิธีนี้พัฒนาจากแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลเชิงส่วน (Fractional factorial Design) เดิมแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ ($2k$ factorial design) จะเรียกระดับต่ำ (-) และเรียกระดับสูงกว่า (+) แต่การออกแบบการทดลองวิธี Central composite นั้นจะเพิ่มการทดลองที่จุดตรงกลาง หรือระดับกลาง (0) และทำการทดลองตามแนวแกน ซึ่งเป็นจุดโคออร์ดิเนต ($+\alpha$ และ $-\alpha$) เพื่อหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง โดยจะกำหนดค่าแต่ละระดับของปัจจัยด้วยตัวแปรรหัส (code variable) โดยแต่ละปัจจัยศึกษา 5 ระดับ การหาจำนวนการทดลองโดยวิธี Central Composite

Design หาได้จากสมการ 10 (Bezerra *et al.*, 2008; National Institute of Standards and Technology, US Department of Commerce Semiconductor Manufacturing Technology [NIST SEMATECH], 2006)

$$N = 2^k + 2k + C_p \quad (10)$$

เมื่อ N คือ จำนวนการทดลอง

k คือ จำนวนตัวแปร

C_p คือ จำนวนครั้งของการทำซ้ำที่จุดตรงกลาง

ตารางที่ 6 แสดงการเลือกการออกแบบการทดลองตามวัตถุประสงค์ และจำนวนของปัจจัยที่ต้องการศึกษา

ตารางที่ 6 การเลือกการออกแบบการทดลองตามวัตถุประสงค์

จำนวนปัจจัย	จุดประสงค์		
	เพื่อเปรียบเทียบ	เพื่อคัดเลือก	หาพื้นผิวตอบสนอง
1	1-factor completely randomized design	-	-
2-4	randomized block design	Full หรือ fractional factorial	Central composite หรือ Box-Behnken
มากกว่า 5	randomized block design	fractional factorial หรือ Plackett-Burman	Screen first to reduce number of factor

ที่มา: NIST SEMATECH (2006)

3. โปรแกรมสำเร็จรูปที่ทางสถิติใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (อนุวัตร, 2549)

โปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้มีให้เลือกมากมายหลายโปรแกรม ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงาน ความชำนาญ และความสะดวกของผู้ใช้ อาจใช้หลายโปรแกรมรวมกันหรือใช้เพียงโปรแกรมเดียว ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแต่ละโปรแกรม แต่ข้อควรระวังเมื่อใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ คือการใส่ข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ และทฤษฎีเบื้องหลังและข้อกำหนด (assumption) ของแต่ละโปรแกรมที่ใช้ ผู้ใช้ควรเข้าไปอ่านคู่มือ และข้อมูลทางด้านเทคนิคก่อนการใช้งาน บางโปรแกรมนั้น ต้องใส่ข้อมูลในรูปแบบที่โปรแกรมกำหนดไว้ บางโปรแกรมมีความยืดหยุ่นมากสามารถดัดแปลง และแก้ไขในตัวโปรแกรมได้

3.1 โปรแกรม SPSS มีข้อดีคือใช้งานง่ายโดยเฉพาะงานวิจัยทางด้านสังคมศาสตร์จะนิยมใช้มากแต่ปัจจุบันมีการพัฒนาและสามารถประยุกต์ใช้ได้กับงานเกือบทุกประเภท การแสดงผลลัพธ์จะออกมาพร้อมกันในหน้าต่างเดียวกัน

3.2 โปรแกรม SAS เป็นโปรแกรมที่ต้องการชุดคำสั่งสั้นๆ ข้อดีของ SAS คือ สามารถประยุกต์ใช้ได้ตามความต้องการของนักวิจัย

3.3 โปรแกรม STATISTICA มีข้อเด่น คือ งานทางด้านกราฟแสดงผลได้สวยงาม และใช้งานง่ายกว่าสองโปรแกรมข้างต้น โดยเฉพาะการสร้างแผนภาพคอนทัวร์ และ surface plot

3.4 โปรแกรม MINITAB เป็นโปรแกรมที่เหมาะสมในการวางแผนการทดลองโดยเฉพาะวิธี RSM จะให้ผลการวิเคราะห์ที่สมบูรณ์พร้อมกับสร้างแผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) และแผนภาพพื้นผิวสัมผัส (surface plot)

โปรแกรมมินิแทบ (MINITAB) เป็นโปรแกรมที่สามารถออกแบบการทดลอง การวิเคราะห์ และการสร้างกราฟ ได้กับทุกประเภทของการทดลอง โดยหลังจากการทดลองตามที่โปรแกรมได้ออกแบบไว้และใส่ผลการทดลองเข้าไปในโปรแกรมแล้ว โปรแกรมมินิแทบ สามารถทำการวิเคราะห์ ตลอดจนสร้างกราฟในหลากหลายรูปแบบที่จะช่วยให้ง่ายต่อการทำความเข้าใจกับผลลัพธ์ ผู้วิจัยจึงนำโปรแกรมมินิแทบมาใช้เป็นเครื่องมือในการออกแบบการทดลอง วิเคราะห์หาผลกระทบของปัจจัยที่ส่งผลในขณะเดียวกันต่อผลลัพธ์ที่เราสนใจตอบสนอง (response) ใน

โปรแกรมมินิแทบ สามารถที่จะออกแบบการทดลองได้ 4 ประเภทคือ 1. แฟคทอเรียล (Factorial) 2. พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface) 3. มิกเจอร์ (Mixture) และ 4. ทาгуชิ (Taguchi) (Minitab Inc., 2007)

นอกจากนี้ยังมีโปรแกรมอื่นอีก เช่น Unscrambler XLSTAT Compusense Senstools MVSP LISREL และ Lingo

การสร้างแผนภาพคอนทัวร์ (contor plot) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป เช่น SURFER, SAS, SIGMA PLOT, STATISTICA, MINITAB มีข้อจำกัด คือต้องรู้เทคนิคของแต่ละโปรแกรม ดังนี้

- SURFER: ใช้ข้อมูลดิบและสร้าง contour plot มีคุณภาพดี แต่ไม่สร้างสมการให้
- SAS: การเขียนโปรแกรมค่อนข้างยุ่งยาก แต่จะให้รายละเอียดของสมการและการทดสอบทางสถิติ รวมทั้งจุดสูงสุดต่ำสุด รูป contour plot ปัจจุบันมีรายละเอียดดี
- SIGMA PLOT: การใช้งานค่อนข้างง่าย ให้รายละเอียดของ contour plot ดี แต่ต้องเอาสมการที่ดีที่สุดจาก SAS หรือ SPSS มา generate ข้อมูลเพื่อทำ contour plot
- STATISTICA: การใช้งานค่อนข้างง่าย ให้รายละเอียดของ contour plot ดีมาก สามารถที่นำเอาสมการที่ดีที่สุดจาก SPSS หรือ SAS มาสร้าง contour plot ได้ด้วย
- MINITAB: การใช้งานค่อนข้างง่าย ให้รายละเอียดของ contour plot ดีพอสมควร สามารถที่นำเอาสมการที่ดีที่สุดจาก SPSS หรือ SAS มาสร้าง contour plot ได้ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบ lack of fit ของสมการได้ด้วย ปัจจุบันเป็นโปรแกรมที่นำมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์มากขึ้น

4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

4.1 สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2 : Coefficient of Determination) เป็นการวิเคราะห์ที่ใช้พิจารณาความเหมาะสมของการออกแบบที่ได้ ซึ่งในการทดลองทุกครั้ง จะต้องมีความผันแปรที่

อธิบายไม่ได้ (Unexplained Variable) หรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ การออกแบบการทดลองที่ดีจะต้องทำให้เกิดความผันแปรที่อธิบายไม่ได้ให้น้อยที่สุด ดังนั้นหากมีสมการมีค่า R^2 ยิ่งสูง ความแม่นยำของการนำสมการไปใช้เพื่อทำนายหรือคาดคะเนผลลัพธ์จะสูงมาก โดยทั่วไปสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 ถ้า R^2 มีค่าเป็นศูนย์ แสดงว่าตัวแปรตามและตัวแปรอิสระไม่มีความสัมพันธ์กันเลย ถ้าค่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปรอิสระนั้นในสมการถดถอยมีค่าเป็นศูนย์ (นิรนาม, ม.ป.ป.; Anderson and Whitcomb, 2005; Sykes, 1993) ส่วนในกรณีที่มีการเพิ่มปัจจัยเข้าไปในสมการถดถอย (Regression model) แม้ว่าปัจจัยนั้นจะไม่มีผลต่อตัวแปรตาม ก็จำเป็นต้องปรับค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเป็นค่า R^2_{adj}

เมื่อค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมีค่าต่ำ สามารถแก้ไขโดยเพิ่มจำนวนการทดลองหรือตรวจสอบหาปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องแล้วออกแบบการทดลองใหม่ แต่ถ้าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจยังต่ำอีก แสดงว่าผลจากการรบกวน (Noise factor) มีมากต้องทำการบล็อก (blocking) เพื่อลดปัจจัยรบกวน

4.2 F-test เป็นการทดสอบสมมุติฐานเพื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มหรือเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป โดยกลุ่มตัวอย่างต้องสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ นำค่า $F_{vreg, vres}$ ที่ได้จากการคำนวณมาเปรียบเทียบกับค่าวิกฤตที่ได้จากการเปิดตาราง $F_{critical} = F_{\alpha/2, vreg, vres}$

5. งานวิจัยหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

งานวิจัยก่อนหน้านี้ของ รศ.ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน ประสบความสำเร็จในการใช้วิธีทางสถิติ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคส และสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แลคเคสสำหรับย่อยสลาย โดยจำนวนของปัจจัยที่ศึกษามี 7 ปัจจัย และ 3 ปัจจัย ตามลำดับ ซึ่งใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design และ Latin square experimental design ตามลำดับ (Teerapatsakul et al., 2007, 2008) ด้วยสภาวะที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนแบบมีแสงของแบคทีเรียกลุ่ม Anoxygenic non-sulfur phototrophic bacteria มีหลายปัจจัย ดังนั้นในการผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จึงควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะให้ประโยชน์ต่อการใช้วัตถุดิบทาง

การเกษตร เช่น แบ่งชนิดต่างๆ หรือน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผลิตผลทางการเกษตร ที่มีองค์ประกอบที่ไม่แน่นอนและไม่คงที่ ด้วยวิธีทางสถิติ

เหล็กและโมลิบดีนัมเป็นไอออนที่สำคัญที่มีการรายงานว่ามีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Robson, 1978) เช่น ไอออนเหล็กมีผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Rhodobacter sphaeroides* (Kars et al., 2006; Zhu et al., 2007) และ *Rhodopseudomonas faecalis* RLD 53 (Liu et al., 2009b) และไอออนเหล็กสามารถกดการแสดงออกของยีน *nifH* โดยทำให้ยีนไม่สามารถถอดรหัสภายใต้สภาวะที่ขาดโมลิบดีนัมของ *Azotobacter vinelandii* (Jacobson, 1986) และในสภาวะขาดโมลิบดีนัมทำให้ *R. sphaeroides* ผลิตไฮโดรเจนได้น้อย (Kars et al., 2006) ในทางตรงกันข้ามใน *R. capsulatus* การมีโมลิบดีนัมไอออนกลับไปกดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ alternative nitrogenase (Schneider, 1991) นอกจากนี้ Kern et al. (1992) ได้ศึกษาอิทธิพลของ chelating agent ชนิด ethylenediamine tetraacetic acid; EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Rhodospirillum rubrum* สรุปได้ว่าสารดังกล่าวปริมาณ 0.5 mM มีผลให้กระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ของเอนไซม์ไฮโดรเจนฮัพเทคไฮโดรจีเนส (Hup hydrogenase) และเคลื่อนย้าย (transfer) เฟอรัสไอออนไปสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Koku et al., 2002) ดังนั้นสารทั้ง 3 ได้แก่ เฟอรัสไอออน โมลิบดีนัมไอออน และ EDTA จึงนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 ด้วยวิธีทางสถิติ

งานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้วิธีทางสถิติในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และเฟอร์เมนเตทิฟแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 7 แต่ละงานวิจัยใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลแบบต่างๆ โดยศึกษาปัจจัยแตกต่างกันไป แบบการทดลองที่ใช้ได้แก่ Central Composite Design (CCD) (Shi and Yu, 2005; Mu et al., 2006; Chen et al., 2007) Random Central Composite Design (RCCD) (Chen et al., 2008) Full Factorial CCD (Mu et al., 2009) Plackett Burman Design (Pan et al., 2008) และ Box-Behnken design (BBD) (Jo et al., 2008; Pan et al., 2008; Jamil et al., 2009)

ตารางที่ 7 การออกแบบการทดลองเพื่อการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพด้วยแบคทีเรียต่างๆ

แบคทีเรีย	สับสเตรด	วิธี	ปัจจัยที่ศึกษา	ผลการหาสภาวะ ที่เหมาะสมของ ปัจจัย	ผลของการผลิต ไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.)	คณะวิจัย
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	กรดไขมันระเหย ผสม (volatile fatty acids) อะซิเตด (acetate) โพรพิโอเนต (propionate) และ บิวทิเรต (butyrate)	Central Composite Design (CCD) (2 factors, 3 levels)	ความเข้มข้น ของกลูตาเมต (glutamate) และ ค่าพีเอช (2 ปัจจัย)	กลูตาเมต 7.01 mM และพีเอช 7.31	18.72	Shi and Yu, 2005
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> WP3-5	บิวทิเรต	CCD (3 factors, 5 levels)	ความเข้มข้นของ บิวทิเรต กลูตาเมต และ FeCl ₃ (3 ปัจจัย)	บิวทิเรต 1,832 มก./ลิตร กลูตาเมต 607 มก./ลิตร และ FeCl ₃ 54 มก./ ลิตร	24.90	Chen <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สปีสเตรด	วิธี	ปัจจัยที่ศึกษา	ผลการหาสภาวะ ที่เหมาะสมของ ปัจจัย	ผลของการผลิต ไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.)	คณะวิจัย
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> WP3-5	กรดอินทรีย์ (อะซิเตด และ บิวทิเรด)	Random Central Composite Design (RCCD) (5 levels)	ความเข้มข้น ของอะซิเตด และ บิวทิเรด (2 ปัจจัย)	อะซิเตด 1,835 มก.-COD/ลิตร และบิวทิเรด 2,570 มก.-COD/ ลิตร	41.10	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> PBUM001	น้ำทิ้งจากโรงงาน น้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent: POME)	Box Behnken Design (BBD) (5 factors, 3 levels)	ความเข้มข้นของ POME ปริมาณ เชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นแสง พีเอช และ ความเร็วรอบการ กวน (5 ปัจจัย)	ปริมาณน้ำทิ้ง POME 100% เชื้อเริ่มต้น 10% ความเข้มข้นแสง 4 klux พีเอช 6 และความเร็วรอบ การกวน 250 rpm	10.00 มล./ลิตรของ ปริมาตรน้ำทิ้ง/ชม.	Jamil <i>et al.</i> , 2009

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สปีชีส	วิธี	ปัจจัยที่ศึกษา	ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัย	ผลของการผลิตไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.)	คณะวิจัย
<i>Clostridium sp.</i> Fanp2	กลูโคส	Plackett-Burman Design (8 factors, 2 levels)	สารที่เติมในอาหาร 7 ชนิด และพีเอชเริ่มต้น (8 ปัจจัย)	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจน คือ กลูโคส ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ และวิตามิน	-	Pan et al., 2008
		BBD (3 levels)	ความเข้มข้นของกลูโคส, ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ และวิตามิน (3 ปัจจัย)	กลูโคส 23.75 กรัมต่อลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.159 M และวิตามิน 13.3 มล./ลิตร	4165.9 มล./ลิตร*	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สับสเตรด	วิธี	ปัจจัยที่ศึกษา	ผลการหาสภาวะ ที่เหมาะสมของ ปัจจัย	ผลของการผลิต ไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.)	คณะวิจัย
<i>Enterobacter aerogenes</i>	กลูโคส	Box- Behnken (3 factors, 3 levels)	ความเข้มข้น กลูโคส พีเอช และ อุณหภูมิ (3 ปัจจัย)	กลูโคส 118.06 mM พีเอช 6.13 และอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส	425.8 มล./กรัมของน้ำหนัก เซลล์แห้ง/ชม.	Jo <i>et al.</i> , 2008
Anaerobic sludge	ซูโครส	Central composite Design (3 factors, 5 levels)	ความเข้มข้นของ ซูโครส พีเอช และ อุณหภูมิ (3 ปัจจัย)	ปริมาณซูโครส 25.4 กรัม/ลิตร พีเอช 5.5 และ อุณหภูมิ 35.5 องศาเซลเซียส	503.67	Mu <i>et al.</i> , 2006

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สับสเตรด	วิธี	ปัจจัยที่ศึกษา	ผลการหาสภาวะ ที่เหมาะสมของ ปัจจัย	ผลของการผลิต ไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.)	คณะวิจัย
Anaerobic sludge	กลูโคส	Full fractorial CCD (3 factors, 5 levels)	ความเข้มข้นของ กลูโคส พีเอช และ อุณหภูมิ (3 ปัจจัย)	กลูโคส 9.7 กรัม/ ลิตร พีเอช 5.7 และอุณหภูมิ 38.8 องศาเซลเซียส	1.75 mmol-H ₂ /mmol- glucose**	Mu <i>et al</i> , 2009

หมายเหตุ *H₂ production potential (มล./ลิตร)
**H₂ yield (mmol-H₂/mmol-glucose)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Rubrivivax gelatinosus* สายพันธุ์ SB24 คือแบคทีเรียสังเคราะห์แสง non-sulfur purple phototroph สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย จากดิน จังหวัดสระบุรี แยกโดยนางจินตนา ขอบวิจักขณ์ (จินตนา, 2543; Ngmjarearnwong *et al.*, 2004; Mahakhan *et al.*, 2005; Chitradon *et al.*, 2008)

2. การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลว Ormerod's ที่มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน และ glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง (anaerobic-light conditions) ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ (lux) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเจริญเข้าสู่ระยะ logarithmic โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย normal saline (0.85%) 2 ครั้ง จนปราศจากสารอาหาร แล้ว resuspend เซลล์ด้วย minimal medium ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ปริมาณเซลล์วัดโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ซัสเพนชัน (cell suspension) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (UNICO 2802 UV/VIS) เจือจางให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 ด้วยสารละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ resuspend และใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น เชื้อเริ่มต้นมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 8.0×10^8 เซลล์ต่อเซลล์ซัสเพนชัน 1 มิลลิลิตร หรือจำนวนโปรตีนเซลล์เท่ากับ 217 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. อาหารที่ใช้ทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจน

3.1 อาหารสังเคราะห์ Ormerod's medium ที่มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน และ glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน (Ormerod *et al.*, 1961) ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.8

3.2 น้ำทิ้งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานแปรงมันชลเจริญ อ. พนัสนิคม จ.ชลบุรี เป็นน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดแป้งจากหัวมันสำปะหลังที่ผ่านขั้นตอนกระบวนการสกัด และไม่แบ่งออกจากหัวมันสำปะหลังโดยตรงยังไม่เข้าสู่บ่อกักน้ำทิ้ง จึงไม่มีการหมัก ในที่นี้ขอใช้คำว่า “น้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมัน หรือน้ำทิ้งแป้งมัน” (เก็บ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เก็บเมื่อวันที่ 19 มิถุนายน 2549 และครั้งที่ 2 เก็บเมื่อวันที่ 2 เมษายน 2551)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำทิ้งแป้งมันใช้อาหาร Ormerod's minimal medium ที่มี glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน (minimal-glutamate medium) ใส่ น้ำทิ้ง ปริมาตรต่างๆ ตามกำหนดในแต่ละการทดลอง โดยใช้น้ำทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอนแทน malic acid และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.8 หรือเป็นไปตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง

3.4 อาหารที่ใช้ศึกษาปัจจัยต่อการผลิตไฮโดรเจนใช้ Ormerod's medium ที่มี malic acid 30 mM เป็นแหล่งอิเล็กตรอน glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสาร 3 ชนิด คือ เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ chelating agent ชนิด EDTA

4. การวิเคราะห์น้ำทิ้งแป้งมัน

การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้งแป้งมันดังนี้

4.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ตามวิธีของ Nelson (1944)

4.2 วิเคราะห์ปริมาณแป้ง (Starch) ด้วยวิธีปรับปรุงจากวิธีของ Kawaguchi *et al.* (2001)

4.3 วิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD) ด้วยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด (close reflux method) (คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย, 2540; มั่นสิน, 2540) และส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร; LCFA สำนักงานใหญ่และสาขากรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

4.4 การวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช Cyber Scan 20

4.5 การวิเคราะห์ค่า Total Dissolved Solids Total Suspended Solids บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand: BOD) Total Solids Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) ปริมาณแคลเซียม (Calcium) แมกนีเซียม (Magnesium) เหล็ก (Iron) และตะกั่ว (Lead) ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร; LCFA สำนักงานใหญ่ สาขารุงเทพฯ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

5. การศึกษาเชิงคุณภาพ (qualitative test) ความสามารถในการใช้น้ำทิ้งแอมัน เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และการย่อยแอมันในน้ำทิ้งของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24

ใช้อาหารแข็งที่มีน้ำทิ้งแอมัน เจือจางด้วย Ormerod's medium ที่ไม่เติม malic acid แต่มี glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยอาหารแข็งจะมี final strength ขององค์ประกอบต่างๆ เท่ากับ 1 เท่า และมีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำทิ้งเท่ากับ 81 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี point inoculation ด้วยเชื้อเริ่มต้นที่เจริญในช่วง middle log phase (อายุประมาณ 3 วัน) แล้วบ่มในสภาวะภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนและมีแสงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเป็นโคโลนี ในเวลา 3-5 วัน และทดสอบการย่อยแอมันในน้ำทิ้ง ด้วยสารละลายไโอดีน สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น

6. การทดสอบเบื้องต้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในน้ำทิ้งแอมันความเข้มข้นต่างๆ กัน ในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 18 มิลลิลิตร

เจือจางน้ำทิ้งแอมันให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยน้ำหรือ Ormerod's minimal-glutamate medium การเจือจางด้วยน้ำไม่มีการปรับพีเอช ความเข้มข้นน้ำทิ้ง คือ 10 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ปริมาตรอาหารเหลว 18 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร สำหรับการทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น full strength ทำให้ปราศจากเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธีการ autoclave แล้ว inoculate เชื้อเริ่มต้นที่อยู่ใน normal saline ในปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้มีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 251 มก./ลิตร ส่วนการทดลองที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเชื้อเริ่มต้นใน Ormerod's minimal-glutamate medium แล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 84 ชม. สังเกต

การเจริญเป็นเซลล์สีแดง สังเกตตะกอน และการเกิดฟองก๊าซและบันทึกระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกันทุกหลอด และภายหลังการบ่มเชื้อ 72-84 ชม. วัดค่าพีเอชของเซลล์ที่ขึ้นใน น้ำทิ้ง เปรียบเทียบกับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งความเข้มข้นต่างๆ หลัง autoclave หรือก่อนเพาะ เชื้อ

หมายเหตุ: ความเข้มข้นน้ำทิ้ง 10 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดย ปริมาตร เมื่อเติมเชื้อเริ่มต้นลงไปอีก 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำทิ้ง เปลี่ยนไป เป็น 9 18 27 36 45 54 63 72 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

7. การศึกษาเชิงปริมาณ ในระดับห้องปฏิบัติการ ของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 ในน้ำทิ้งแป้งมัน ความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลองในปริมาตรขนาด 23 และ 60 มิลลิลิตร

7.1 การทดลองขนาด 23 มล. ที่ใช้น้ำทิ้งแป้งมัน เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate

ที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยเจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal medium ที่มี glutamic acid 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน (Ormerod's minimal-glutamate) และไม่มี malate ปรับพีเอชเป็น 6.8 ก่อน autoclave และ inoculate แบคทีเรียเริ่มต้น ที่มีแบคทีเรีย 251 มก./ลิตร ในปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เชื้อเริ่มต้นเตรียมอยู่ในอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate medium การทดลองในขนาด 23 มล. ใช้หลอดทดลอง side arm test tube ขนาด 30 มล. ปิดด้วยจุกซิลิโคน เปลี่ยนบรรยากาศภายในหลอดที่เหลือเป็นก๊าซไนโตรเจน บ่มในที่มืดแสง ความเข้ม 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ติดตามวัดปริมาณก๊าซที่แบคทีเรียผลิต ด้วยการแทนที่น้ำที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 72 ชม. เก็บตัวอย่างในวันสุดท้าย นำไปวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ตามวิธีของ Nelson (1944), วิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD) ด้วยวิธีฟลักซ์แบบปิด (close reflux method) (คณะกรรมการจัดทำ คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย, 2540; มั่นสิน, 2540) และวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช Cyber Scan 20 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์อาหารเริ่มต้น

7.2 การทดลองในขนาด 60 มล. ที่ใช้น้ำทั้งแบ่งมัน เจือจางด้วยน้ำ

ใช้น้ำทั้งเก็บครั้งที่ 1 ความเข้มข้นต่างๆ ที่เจือจางด้วยน้ำ ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.8 ก่อน autoclave ใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีเซลล์ 251 มก./ลิตร ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ เชื้อเริ่มต้นอยู่ใน normal saline เพียงเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 80 มล. ไม่มีการเปลี่ยนบรรยากาศภายในหลอด แต่ด้วยปริมาตรบรรจุ 60 มล. ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ทุกการทดลอง กวนบน stirrer ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันตลอดเวลา บ่มในที่มืดแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ติดตามวัดปริมาณก๊าซที่แบคทีเรียผลิต ด้วยการแทนที่น้ำที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 3-10 วัน และวัดค่าพีเอชของเซลล์ที่สเฟนขึ้นด้วยเครื่องวัดพีเอช Cyber Scan 20

เก็บตัวอย่างเซลล์ที่สเฟนขึ้นทั้งหมดในวันสุดท้าย ไปวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD) ด้วยวิธีฟลักซ์แบบปิด (close reflux method) (คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย, 2540; มั่นสิน, 2540) และนำตัวอย่างในวันสุดท้ายมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย normal saline แล้วนำตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีปรับปรุงจากวิธีของ Lowry *et al.* (1951) แล้วนำ supernatant มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่มีอยู่ในน้ำทั้งซึ่งเกิดจากการย่อยแบ่งในน้ำทั้ง ตามวิธีของ Nelson (1944) วิเคราะห์ปริมาณแป้ง (starch) ด้วยวิธีปรับปรุงจากวิธีของ Kawaguchi *et al.* (2001) และวิเคราะห์ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD) ด้วยวิธีฟลักซ์แบบปิด (close reflux method) (คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย, 2540; มั่นสิน, 2540) เปรียบเทียบกับค่าการวิเคราะห์อาหารเริ่มต้นที่ไม่มีการตกตะกอน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณประสิทธิภาพในการลดลงของค่า COD แบ่ง และน้ำตาลรีดิวซ์ นำส่วนตะกอนมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ตะกอนโปรตีนก่อนการบ่มเชื้อของสารละลายเชื้อภายหลังการผลิตไฮโดรเจน

7.3 การทดลองในขนาด 60 มล. เมื่อใช้น้ำทั้งแบ่งมัน ที่เจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate

ใช้น้ำทั้งเก็บครั้งที่ 1 และเก็บครั้งที่ 2 ความเข้มข้นต่างๆ ที่เจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.8 ก่อน autoclave ปริมาตรอาหาร

เหลว 60 มล. ใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีเซลล์ 251 มก./ลิตร ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ เชื้อเริ่มต้นอยู่ในอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate และวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 7.2

ทดสอบแบ่งในน้ำทิ้งแบ่งมันที่เก็บมาจากโรงงานครั้งที่ 1 และ 2 ด้วยสารละลายไอโอดีน สังเกตสีของสารละลาย เปรียบเทียบกัน

8. การศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในถังผลิตไฮโดรเจนแบบแบนขนาด 6 ลิตร จากน้ำทิ้งแบ่งมัน

8.1 ใช้น้ำทิ้งที่มีตะกอน

ทดลองในถังแบนผลิตไฮโดรเจน (flat-plate photobioreactor) ขนาด 6 ลิตร (เลขที่คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ 0801002594 เมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2551) และใช้ระบบการควบคุมอุณหภูมิ (เลขที่คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ที่ 1001000317 วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2553) ใช้อาหารเหลวที่มีน้ำทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอน ความเข้มข้นน้ำทิ้งและสารประกอบใดๆ ตามที่กำหนดในแต่ละการทดลองหรือที่เลือกจากผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ เติมเซลล์เริ่มต้นที่มีปริมาณเซลล์แห้ง 251 มก./ลิตร ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรบรรจุสุดท้ายเท่ากับ 5.7 ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบจะมีการไหลวนของสารละลายในถังด้วยปั๊ม เพื่อไม่ให้เกิดการตกตะกอนหรือจับตัวเป็นก้อนของตะกอนและลดการเกาะของเซลล์ที่ผนังของถัง เมื่อแบคทีเรียเจริญไประยะหนึ่ง เพาะเลี้ยงในที่มืดแสง ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในหลอดต่างๆ เก็บตัวอย่างทุกๆ 6-12 ชม. ตรวจวัดค่าต่างๆ ต่อไปนี้

8.1.1 ปริมาตรก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตขึ้น

การวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตขึ้น กระทำทุกๆ 6-12 ชม. เป็นเวลา 5-10 วัน โดยการวัดปริมาตรน้ำที่ถูกแทนที่ และคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่อปริมาตรบรรจุ 1 ลิตร (มล./ลิตร/ชม.) จากกราฟการผลิตไฮโดรเจน

8.1.2 การเจริญของเซลล์

ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยนำตัวอย่างจากถังหมักทุกๆ 6-12 ชม. มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย normal saline แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีปรับปรุงจากวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

หมายเหตุ ผลการวิเคราะห์ตะกอนโปรตีน มีค่าโปรตีนที่ได้จากตะกอนเซลล์ รวมกับค่าโปรตีนของตะกอนน้ำทิ้งที่เบคทีเรียไม่สามารถย่อยได้

8.1.3 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

วัดค่าพีเอชของสารละลายเชื้อ ขณะเชื้อเซลล์เจริญทุกๆ ครั้งที่มีการเก็บตัวอย่างด้วยเครื่องวัดพีเอช Cyber Scan 20

8.1.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่างที่เก็บจากถังหมัก มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ supernatant มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งหรือที่เกิดจากการย่อยแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน ตามวิธีของ Nelson (1944)

8.1.5 วัดปริมาณแป้งที่ถูกใช้ไป

นำตัวอย่างที่เก็บจากถังหมัก ตามระยะเวลาต่างๆ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิต่ำ แล้วนำ supernatant มาละลายกับสารละลาย perchloric acid (HClO_4) ความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียม

ไฮดรอกไซด์ โดยให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วย volumetric flask ให้ได้ปริมาตร 50 มล. วิธีปรับปรุงจากวิธีของ Kawaguchi *et al.* (2001) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Nelson (1944) แล้วสร้างกราฟคำนวณปริมาณแบ่งที่ถูกต้องที่เรียกใช้ไป

หมายเหตุ เนื่องจากน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ที่นำมาใช้ในการทดลองส่วนนี้เมื่อทดสอบแบ่งด้วยสารละลายไอโอดีนแล้วไม่พบแบ่งในน้ำทิ้ง จึงไม่มีการวิเคราะห์ปริมาณแบ่งที่ถูกต้องไป

8.1.6 กิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน

นำตัวอย่างที่เก็บจากถังหมักในชม. ที่หยุดผลิตก๊าซไฮโดรเจน มาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำเฉพาะตะกอนไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีปรับปรุงจากวิธีของ Lowry *et al.* (1951) และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่หยุดผลิตก๊าซ กิจกรรมจำเพาะของเซลล์มีหน่วยเป็น มล./มก. โปรตีนเซลล์ (mL-H₂/mg cell protein)

8.1.7 ค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand: COD) (คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย, 2540; มั่นสิน, 2540)

นำตัวอย่างอาหารเริ่มต้นทั้งหมดมาวิเคราะห์ค่า COD และเก็บตัวอย่างชั่วโมงสุดท้ายมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ supernatant มาวิเคราะห์ค่าซีโอดี และนำไปคำนวณประสิทธิภาพในการลดลงของค่า COD ของเซลล์สดปนชั้นภายหลังการผลิตเปรียบเทียบกับค่าซีโอดีของอาหารเริ่มต้น

8.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในถังผลิตไฮโดรเจน ขนาด 6 ลิตร

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 8.1 แต่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ความเข้มข้นที่ใช้ คือ 2,000 และ 3,000 ลักซ์ วัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ เก็บตัวอย่างทุกๆ 6-12 ชม. ตรวจวัดค่าต่างๆ ตามการทดลองที่ 8.1

8.3 ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน

ทดลองผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของน้ำทิ้ง โดยการตั้งน้ำทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นเวลา 30 นาที และนำเฉพาะส่วนใสด้านบนของน้ำทิ้งมาใช้ผลิตไฮโดรเจนในถัง 6 ลิตร โดยเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate และความเข้มข้นของน้ำทิ้งเป็นไปตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง ซึ่งจะพิจารณาจากผลการทดลองที่ได้ข้อ 8.1 และ 8.2 วัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ เก็บตัวอย่างทุกๆ 6-12 ชม. ตรวจวัดค่าต่างๆ ตามการทดลองที่ 8.1

9. การศึกษาปัจจัยสำคัญบางประการที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจน

9.1 การศึกษาอิทธิพลของวิตามิน 4 ชนิดต่อ การผลิตไฮโดรเจน และการเจริญของแบคทีเรีย

ใช้อาหาร Ormerod's medium ที่มี malate 30 mM เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนและแหล่งคาร์บอน และมี glutamate 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งที่ไม่เติมวิตามินชนิดใดชนิดหนึ่ง ได้แก่ ไทอะมีน (thiamine HCl) พาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (*p*-aminobenzoic acid) กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) ไบโอติน (biotin) และอาหารที่ไม่เติมวิตามินทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม คืออาหารเหลวที่เติมวิตามินครบทั้ง 4 ชนิด ทำการทดลองในหลอดขนาด 60 มล. วัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และวัดปริมาณเซลล์แบคทีเรียหลังจากเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ด้วยการวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณโปรตีนเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์กับความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรกับปริมาณโปรตีนเซลล์ที่วิเคราะห์ โดยวิธีปรับปรุงจากวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

9.2 การใช้สารยีสต์สกัด (yeast extract) แทนวิตามินทั้ง 4 ชนิด ใน minimal medium ที่ใช้เชื้อจางน้ำทิ้ง

การทดลองขนาด 60 มล. ใช้น้ำทิ้งเชื้อจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate ที่มี glutamate 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน และไม่มี malate และใช้น้ำทิ้งเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน ที่เติมสารสกัดยีสต์ 0.1 กรัม/ลิตร แทนวิตามินทั้ง 4 ชนิด บ่มเชื้อในสภาวะเดียวกันกับข้างต้น วัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ และที่เวลา 72 ชม.

9.3 การศึกษาอิทธิพลของโลหะไอออน และสารจับโลหะไอออน ต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การศึกษาลำดับที่มีความสำคัญ ต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 โดยเป็นการศึกษาเชิงปริมาณใน ขนาด 60 มล. ใช้อาหารเหลว Ormerod's medium ที่มี malate 30 mM เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และแหล่งคาร์บอน และมี glutamate 5 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเป็น 6.8 และทำการศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time) ได้แก่

9.3.1 เหล็กไอออน (Fe^{2+}) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สาร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 จนถึง 1,062 มก./ลิตร

9.3.2 โมลิบดีนัมไอออน (Mo^{6+}) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สาร $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 จนถึง 67.5 มก./ลิตร

9.3.3 สารจับโลหะไอออน (chelating agent) ชนิด EDTA ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 จนถึง 90 มก./ลิตร

หมายเหตุ ทำการทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารต่อไปนี้ทีละหนึ่งชนิด (กำหนดให้ความเข้มข้นของอีก 2 สารคงที่)

ตรวจวัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย และวัดปริมาณเซลล์แบคทีเรียหลังจากเพาะเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ด้วยการวัดความขุ่นของเซลล์ซึ่งสัมพันธ์กับความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ซึ่งสัมพันธ์กับความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรกับมิลลิกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร (มก./ลิตร) และคำนวณกิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน หน่วยเป็นมิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง (มล./มก.ของเซลล์แห้ง)

10. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเหล็กไอออน (Fe^{2+}), โมลิบดีนัมไอออน (Mo^{6+}) และอีดีทีเอ (EDTA) ในการผลิตไฮโดรเจน ด้วยวิธีทางสถิติ และทำการทดลองเพื่อยืนยันผล

10.1 การออกแบบการทดลอง (Experimental design)

นำข้อมูลจากการทดลองทีละหนึ่งปัจจัย (one-factor-at-a-time) ของสาร 3 ชนิด ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และ EDTA) จากข้อ 9.3 ไปใช้สำหรับการกำหนดระดับโค้ด (code level) ของความเข้มข้นสารทั้ง 3 ปัจจัย สำหรับการออกแบบการทดลองใช้ Box-Behnken Design (Teerapatskul *et al.*, 2007, 2008; Jo *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008) เพื่อให้ทดลองในอาหาร Ormerod's malate-glutamate จำนวนการทดลอง (experiment no.) ที่ออกแบบโดย Box-Behnken Design ด้วย 3 ปัจจัย (3 factors) และมีจำนวนระดับ 3 ระดับ (3 levels) ได้ 15 การทดลอง ดังตารางที่ 8 ความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 ระดับคือ 10.6 (-1) 53.1 (0) และ 95.6 (+1) ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 ระดับคือ 0 (-1) 0.7 (0) และ 1.4 (+1) และความเข้มข้นของ EDTA 3 ระดับคือ 0 (-1) 9 (0) และ 18 (+1)

ตารางที่ 8 แผนการทดลองออกแบบโดย Box-Behnken Design สำหรับ 3 ปัจจัย 3 ระดับ

จำนวนการ ทดลอง (experiment no.)	โค้ดระดับของปัจจัย (coded levels)		
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	EDTA
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

10.2 วิเคราะห์ความถดถอยหรือ ค่า regression ของการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken design และทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยทั้งสามด้วยวิธีทางสถิติ

ทำการทดลองจริง ตามจำนวนการทดลองที่โปรแกรม Box Behnken กำหนด 15 การทดลอง ติดตามการผลิตไฮโดรเจน และจดบันทึกปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมสุดท้าย เป็นค่าตอบสนอง (response value) ของทั้ง 15 การทดลอง และนำผลการทดลองทั้งหมดไปวิเคราะห์ค่ารีเกรสชัน (regression) หรือค่าความถดถอยของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design แล้วสร้างสมการคณิตศาสตร์หรือสมการถดถอย (regression model) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของปัจจัยทั้ง 3 และค่าตอบสนอง ที่แสดงเป็นปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (มล.) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) ในสมการถดถอย และทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยทั้ง 3 ด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1) ใช้ SPSS-Statistica วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS และสร้างกราฟพื้นผิวสัมผัส response surface plot หรือ contour plot โดยใช้โปรแกรม Statistica แล้วทำนายสภาวะที่ดีที่สุดของความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิด จาก contour plot และวิธีที่ 2) ใช้ Minitab (ด้วยความอนุเคราะห์ของ ดร. นันทิยา หาญสกุลลักษณ์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์) ที่วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Minitab และทำนายสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Optimizer mode

ทำนายปริมาณไฮโดรเจนเป็นมิลลิลิตรเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารทั้งสามตามที่ทั้งสองโปรแกรมทำนาย โดยใช้สมการถดถอย (regression model) เดียวกันเพื่อเปรียบเทียบกัน

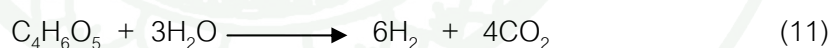
10.3 ทำการทดลองจริง เพื่อยืนยันผลการทำนายจากสถิติ

นำสภาวะความเข้มข้นของสารทั้งสามที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรมสถิติทั้งสองวิธี มาใช้ผลิตไฮโดรเจน เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการทำนายด้วยสถิติ ทำการทดลองในอาหารเหลว Ormerod's malate-glutamate ความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ EDTA ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทำนายด้วยสถิติ เปรียบเทียบกับอาหารเดิม ตรวจวัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ วัดปริมาณไฮโดรเจนสะสมสุดท้าย (มล.) และคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.)

11. การผลิตไฮโดรเจนในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร ของ *R. gelatinosus* SB24 ในอาหารปรับปรุงใช้สถิติ

ทำการทดลองโดยใช้อาหารมาตรฐาน Ormerod's malate-glutamate medium ที่มีความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ EDTA ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทำนายด้วยสถิติ เปรียบเทียบกับอาหารดั้งเดิม ทำการทดลองในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสง ที่มีความเข้ม 3,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ วัดปริมาณไฮโดรเจนสะสมสุดท้าย (มล.) และคำนวณอัตราการผลิตไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.) และติดตามการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยการวัดความขุ่นของเซลล์ซึ่งเพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร) ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ซึ่งเพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร)

คำนวณประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรดไปเป็นไฮโดรเจน (Substrate conversion efficiency) ในอาหาร Ormerod's malate-glutamate โดยเปรียบเทียบปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองกับปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากทฤษฎีตามสมการที่ 11-12 ด้านล่าง (Eroglu *et al.*, 2008; Koku *et al.*, 2002)



$$\% \text{Substrate conversion efficiency} = 100 \times \left[\frac{\text{Actual hydrogen}}{\text{Theoretical hydrogen}} \right] \quad (12)$$

% Substrate conversion efficiency คือเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสับสเตรดไปเป็นไฮโดรเจน

Actual hydrogen คือปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองจริงต่อสับสเตรดคือ malate 1 mole ที่ถูกใช้ ($\text{mol H}_2/\text{mol malate}$)

Theoretical hydrogen คือปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ตามทฤษฎีต่อสับสเตรด คือ malate 1 mole ที่ถูกใช้ ($\text{mol H}_2/\text{mol malate}$)

12. การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมันที่เจือจางด้วยอาหารปรับปรุง Ormerod's minimal-glutamate ด้วยวิธีทางสถิติ ในถังแบบผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร

ใช้อาหาร Ormerod's minimal-glutamate ที่มีส่วนผสมของน้ำทิ้งเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสม และมีปริมาณปัจจัยทั้งสามตามสภาวะเหมาะสม เพาะเลี้ยงในถังแบบผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสง ความเข้มแสงตามที่กำหนดในการทดลอง และตรวจวัดปริมาณก๊าซที่เกิดด้วยการแทนที่น้ำในระยะเวลาต่างๆ วัดปริมาณไฮโดรเจนสะสมสุดท้าย (มล.) คำนวณอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.) เปรียบเทียบกับอาหารที่มีน้ำทิ้งเปอร์เซ็นต์เดียวกันที่เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium และมีความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิดตามสูตรดั้งเดิม

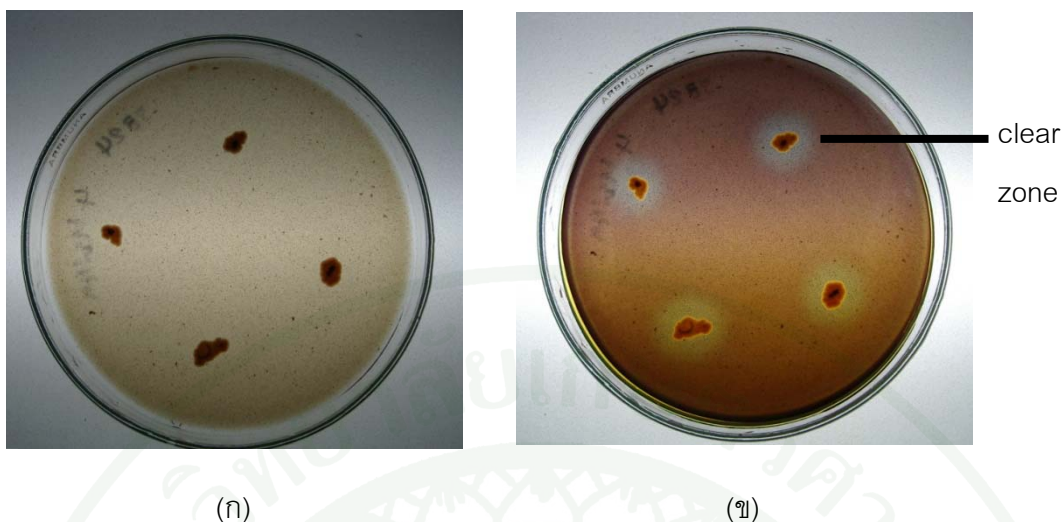
ผลและวิจารณ์

1. การทดสอบเชิงคุณภาพ (Qualitative test) เกี่ยวกับความสามารถในการใช้น้ำทิ้งจากการสกัดแบ่งมันเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการเจริญและการย่อยแบ่งในน้ำทิ้งของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24

Chitradon *et al.* (2008) ได้รายงานถึงการใช้ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในการผลิตพลังงานไฮโดรเจนจากวัสดุทางการเกษตรประเภทแป้ง และ Mahakhan *et al.* (2005) ได้รายงานถึงความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ในการใช้กรดอินทรีย์ได้หลายชนิด ได้แก่ โซเดียมอะซิเตด (sodium acetate) ไพรูเวต (pyruvate) แลคเตต (lactate) มาเลต (malate) ซัคซิเนต (succinate) แอสปาร์เตต (aspartate) และกลูตาเมต (glutamate) ซึ่งเป็นปกติทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่ม non-sulfur purple phototrophic bacteria ที่แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ กรดอินทรีย์มากกว่าสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่น แต่ *R. gelatinosus* SB24 สามารถใช้สารอินทรีย์ประเภทแป้งชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอนได้ โดยเฉพาะที่มีความพิเศษคือ ใช้แบ่งดิบได้ (Chitradon *et al.*, 2008) นอกจากนี้ *R. gelatinosus* SB24 ยังสามารถผลิตเอนไซม์ α -amylase ที่ย่อยแบ่งทั้งแป้งดิบคือ starch granule และแป้งสุกคือ gelatinized starch ได้ด้วย (Mahakhan *et al.*, 2005) จากคุณลักษณะที่ดีที่สามารถใช้สารอินทรีย์ได้หลายชนิดรวมทั้งวัสดุทางการเกษตร ดังนั้นการผลิตไฮโดรเจนจึงมีศักยภาพมากขึ้น เพราะมีทางเลือกของการใช้สับสเตรดที่หลากหลายขึ้น รวมทั้งชนิดที่เป็นวัสดุทางการเกษตรราคาถูก จึงเป็นการลดต้นทุน การใช้น้ำทิ้ง และวัสดุเหลือทิ้งเป็นสับสเตรดก็เป็นทางเลือกหนึ่ง เช่นงานของ Sasikala *et al.* (1992); Yigit *et al.* (1999); Eroglu *et al.* (2006); Li and Fang (2007); Eroglu *et al.* (2008) การทดลองนี้จึงต้องการที่จะใช้น้ำทิ้งจากการโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่เหลือหลังจากการสกัดแป้งแล้วนำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน Reungsang *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตกรดซิตริกจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเปรียบเทียบระบบการผลิต 3 แบบคือ (1) การใช้ตะกอนจุลินทรีย์ (anaerobic seed sludge) จากกระบวนการหมักสิ่งปฏิกูลของโรงงานในญี่ปุ่นในที่มืด (dark fermentation) (2) ใช้ anaerobic seed sludge ร่วมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง non-sulfur purple ชนิด *Rhodospirillum rubrum* ในถัง reactor เดียวกันที่ไม่มีออกซิเจน และ (3) ใช้วิธีการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน (two step system) คือ ขั้นตอนที่ 1 ใช้ anaerobic seed sludge หมักน้ำทิ้งด้วยกระบวนการ dark fermentation ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และไม่มีแสง แล้วนำเฉพาะส่วนใสจากการหมักมาเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นระบบผลิตไฮโดรเจนด้วย

กระบวนการ light fermentation ที่ใช้แบคทีเรีย *Rhodospirillum rubrum* ขั้นตอนนี้ทำในสภาวะไม่มีออกซิเจน แต่มีแสง ผลการทดลองคือ เมื่อใช้เฉพาะ anaerobic seed sludge อย่างเดียว ได้ก๊าซไฮโดรเจนเช่นกัน แต่ที่อุณหภูมิต่างกันให้ก๊าซไม่เท่ากันที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสได้ก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด เท่ากับ 1.17 ลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อลิตรของปริมาตรบรรจุ (ลิตร/ลิตร) แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ก๊าซไฮโดรเจน 0.006 ลิตร/ลิตร เมื่อใช้เชื้อร่วม (co-culture) คือ anaerobic seed sludge ร่วมกับ *Rs. rubrum* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ 0.25 ลิตร/ลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกับการใช้ anaerobic seed sludge อย่างเดียว บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ผลิตได้สูงขึ้นเล็กน้อย และการทดลองสุดท้าย ที่ใช้ 2 ขั้นตอน แบคทีเรียผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากถึง 1.34 ลิตร/ลิตร

การศึกษาเบื้องต้นนี้ เพื่อดูความสามารถในการใช้น้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมันเป็นแหล่งคาร์บอน และความสามารถการย่อยแป้งในน้ำทิ้งแป้งมัน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 6 พบว่าแบคทีเรียเจริญด้วยน้ำทิ้งแป้งมันได้ และย่อยแป้งในน้ำทิ้งได้ เนื่องจากเห็นโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญ แสดงว่าสอดคล้องกับการศึกษาจากรายงานที่ผ่านมา ที่รายงานว่า *R. gelatinosus* SB24 สามารถใช้ทั้งแป้งสุกและแป้งดิบของแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งให้อิเล็กตรอนได้ (มงคล, 2547; Ngmjarearnwong et al., 2004; Chitradon et al., 2008) จากคุณสมบัติที่ดีอื่นๆของ *R. gelatinosus* SB24 (Mahakhan et al., 2005) งานวิจัยนี้จึงใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งแป้งมัน ซึ่งเป็นน้ำทิ้งจากขั้นตอนการสกัดแป้งมันโดยตรงและยังไม่ได้ทิ้งไว้ในบ่อน้ำทิ้ง จึงยังไม่มีเปลี่ยนแปลงด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติอื่นๆ



ภาพที่ 6 ความสามารถของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในการย่อยแป้งในน้ำทิ้งแป้งมัน ความเข้มข้นน้ำทิ้ง 81 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (ก) โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหารที่มีน้ำทิ้ง 81 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (ข) clear zone แสดงการย่อยแป้งรอบโคโลนีของแบคทีเรียหลังจากทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน

2. การทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับความเป็นไปได้ที่ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จะเจริญในน้ำที่มีน้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมันเป็นส่วนผสมในความเข้มข้นต่างๆ ทดลองในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 18 มล.

2.1 เมื่อเจือจางน้ำทิ้งแป้งมันด้วยน้ำ ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อใช้น้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันล่าปะหลังเก็บครั้งที่ 1 ที่ทำให้เจือจางด้วยน้ำ ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และไม่มีสารปรับพีเอชใดๆ มาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วเติมเซลล์ซัสเพนชันที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 18 มล. ผลการทดลองที่สังเกตจากสีชมพูของเซลล์ที่เจริญ แสดงให้เห็นการเจริญดีเฉพาะในน้ำทิ้งความเข้มข้น 9-36 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนที่ความเข้มข้นสูงกว่า 36 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการเจริญได้ยากกว่า (ภาพที่ 7, ตารางที่ 9) และการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร Ormerod's ทั่วไป (malate-glutamate medium) ให้สีชมพูอ่อนกว่า ข้อสังเกต ในน้ำทิ้งเปอร์เซ็นต์สูงๆ มีตะกอนค่อนข้างมาก และตะกอนอาหารมีสีน้ำตาลอมชมพู ทำให้สังเกตการเจริญได้ยากมาก สาเหตุของการเจริญที่ไม่ดีในน้ำทิ้งความเข้มข้นสูง อาจเป็นเพราะ 1) ในน้ำทิ้งมีสารยับยั้งการเจริญยิ่งเข้มข้น ยิ่งมีสารมาก 2) การมี

ตะกอนมากบดบังแสงซึ่งมีผลต่อการเจริญด้วยการสังเคราะห์แสง และ 3) พีเอชเริ่มต้นมีค่าต่ำกว่า 6.8 เพราะตัวอย่างน้ำทิ้งที่เก็บมามีพีเอชเท่ากับ 5.7 (ตารางที่ 10) เมื่อเจือจางด้วยน้ำ และ ภายหลัง autoclave พีเอชเริ่มต้นจะต่ำกว่า 6.8 โดยเฉพาะในน้ำทิ้งความเข้มข้นสูง ค่าพีเอชเริ่มต้น ยิ่งต่ำ (ตารางที่ 9) ไม่เหมาะสมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ชอบพีเอช 6.8 และในระหว่างการทดลอง ไม่มีบัพเพอร์จึงไม่มีการควบคุมพีเอชที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการบ่มเชื้อ ทำให้พีเอชเปลี่ยนแปลงไปมาก โดยเฉพาะในน้ำทิ้ง 27-90 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชลดลงมากภายหลังการบ่มเชื้อ

ผลการสร้างก๊าซสังเกตได้ชัดเจน ในน้ำทิ้งความเข้มข้น 9-27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 36 เปอร์เซ็นต์ สังเกตได้เฉพาะที่ 66 ซม. และน้อยมาก

Eroglu et al. (2004) ผลิตไฮโดรเจนด้วยเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 จากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันมะกอก ที่ใช้เป็นสับสเตรดหลัก โดยปรับพีเอชของน้ำทิ้งอยู่ในช่วง 6.8-7.0 ในถังปฏิกรณ์ขนาด 400 มล. โดยใช้น้ำทิ้งความเจือจางในน้ำให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 1-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำทิ้งในน้ำ (final concentration คือ 0.9-18%) พบว่า เมื่อใช้น้ำทิ้ง 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 145 มล. จากปริมาตรบรรจุ 400 มล. และไม่พบว่าแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนในน้ำทิ้ง 5-20 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองนี้ พบว่าสามารถใช้ น้ำทิ้งความเข้มข้นสูงได้ถึง 27 เปอร์เซ็นต์ ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำทิ้งแป้งมันมี ปริมาณสารอินทรีย์ โดยวัดจากค่าซีโอดี (Chemical oxygen demand; COD) และบีโอดี (Biochemical oxygen demand: BOD) ของน้ำทิ้งแป้งมัน มีค่าเท่ากับ 25 และ 9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกซึ่งมีค่าเท่ากับ 72 และ 18 กรัมต่อลิตร (Eroglu et al., 2004) การที่สามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำทิ้งแป้งมันได้มากกว่าน้ำทิ้งโรงงาน น้ำมันมะกอก อาจเป็นเพราะน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอกมีปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ใช้ ไม่ได้ (COD) ในปริมาณที่สูง แบคทีเรียใช้ได้ยากจึงอาจเป็นสาเหตุให้น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมัน มะกอกได้ความเข้มข้นต่ำ และการใช้น้ำทิ้งแป้งมันได้ถึง 27 เปอร์เซ็นต์ อีกสาเหตุหนึ่งอาจเป็น เพราะน้ำทิ้งแป้งมันมีปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ใช้ได้ (BOD) ในปริมาณที่น้อยกว่า จึงต้องใช้ น้ำทิ้งแป้งมันในปริมาณหรือความเข้มข้นที่มากกว่าจึงจะมีสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ใช้ได้เท่ากับการ ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันมะกอก นอกจากค่า COD และ BOD ที่ต้องพิจารณาแล้ว ปริมาณ สารอินทรีย์ที่มาจากแหล่งไนโตรเจนและไขมันก็ควรคำนึงถึงด้วย ซึ่งการมีแหล่งไนโตรเจนสูงและมี ไขมันมากอาจมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้

ผลการทดลองแสดงว่า แบคทีเรียนี้สามารถเจริญในน้ำทิ้งแ่งมันได้ และใช้เป็นแหล่งผลิตก๊าซได้ แต่น้ำทิ้งเจือจางในน้ำยังมีค่าพีเอชต่ำคือ 5.3-5.6 การปรับปรุงสารละลายน้ำทิ้งเริ่มต้นด้วยการควบคุมพีเอชน่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตก๊าซได้





(ก)

(ข)

ภาพที่ 7 การเจริญของเชื้อ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในน้ำทิ้งแปรงฟันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดย ปริมาตร ที่เจือจางด้วยน้ำ ไม่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น บ่มในที่มืดและไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 84 ชม. โดย (ก) ก่อนบ่ม (ข) การเจริญของเชื้อในชั่วโมงที่ 60 โดยเปอร์เซ็นต์ ของน้ำทิ้งเรียงจากมากไปน้อยคือ 90 81 72 63 54 45 36 27 18 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (%) และหลอดควบคุม คือ อาหาร Ormerod's ที่ไม่มีน้ำทิ้ง เรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 9 แสดงการเจริญของ *R. gelatinosus* SB24 และการเกิดก๊าซในน้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตร ที่เจือจางด้วยน้ำ ไม่มีการปรับพีเอช

เวลา (ชม.)	การเจริญของเชื้อและการเกิดก๊าซในน้ำทิ้งจากการสกัดแป้งมันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตร ที่เจือจางด้วยน้ำ										
	Ormerod's	9	18	27	36	45	54	63	72	81	90
6	w	+1	+2	+2	+2	w	w	w	w	w	w
12	+2	+2	+3	+3	+2	+2	+2	w	w	w	w
18	+3	+2	+3	+3	+2	w	w	w	w	w	w
24	+3/G	+3	+4/G	+4/G	+3	w	w	w	w	w	w
30	+3/G	+3	+4	+4/G	+3	w	w	w	w	w	w
36	+3/G	+3/G	+4	+4	+3	w	w	w	w	w	w
42	+3/G	+3/G	+4	+4	+4	w	w	w	w	w	w
54	+3/G	+3/G	+4/G	+4	+4	w	w	w	w	w	w
60	+3/G	+3/G	+4/G	+4	+4	w	w	w	w	w	w
66	+3/G	+3/G	+4/G	+4	+4/G	w	w	w	w	w	w
72	+3/G	+3/G	+4/G	+4/G	+4	w	w	w	w	w	w
84	+3/G	+3/G	+4/G	+4/G	+4	w	w	w	w	w	w
พีเอชเริ่มต้นหลัง autoclave	6.86	6.59	6.46	6.33	6.20	6.10	6.01	5.95	5.79	5.69	5.68
พีเอช (84 ชม.)	7.20	6.74	6.40	5.30	5.60	5.31	5.26	5.26	5.34	5.38	5.32

หมายเหตุ สัญลักษณ์ +1 +2 +3 และ +4 แสดงการเจริญของเซลล์ สังเกตจากสีแดงชมพูจากน้อยไปหามาก ตามลำดับ

สัญลักษณ์ (-) แสดงว่าไม่ได้ตรวจผล หรือไม่ได้ทำการทดสอบ

สัญลักษณ์ (w) แสดงผลไม่ชัดเจน เนื่องจากอาหาร และสังเกตการเจริญได้ยากมาก หรือไม่มีการเจริญ

สัญลักษณ์ (G) แสดงว่ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น

ตารางที่ 10 คุณสมบัติของน้ำทิ้งแป้งมันเก็บครั้งที่ 1 (วันที่ 19 มิถุนายน 2549)

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	วิธีทดสอบอ้างอิง
Total Dissolved Solids*	9,385.91	mg/L	APHA, AWWA, WEF2540C: Total Dissolved Solids Dried at 108°C
Total Suspended Solids*	11,539.0	mg/L	APHA, AWWA, WEF2540D: Total Suspended Solids Dried at 103-105°C
Total Solids*	20,925.00	mg/L	APHA, AWWA, WEF2540C: Total Solids Dried at 103-105°C
BOD*	9,625.00	mg/L	APHA, AWWA, WEF5210B: 5-Day BOD Test
COD	25,572.80*	mg/L	*APHA, AWWA, WEF5210B: Open Reflux Method ตรวจสอบเองในห้องปฏิบัติการ
Reducing Sugar	26,375.17	mg/L	
Starch	6,580.64	mg/L	
Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)*	16,140.00	mg/L	APHA, AWWA, WEF4500-N _{org} C: Nitrogen (Organic)B; Macro-Kjeldahl Method
Calcium*	34.14	mg/L	Standard method for examination of water and water 20 th edition, 1998, Part 3030E by P 3-8 ICP-OES
Magnesium*	62.46	mg/L	
Iron*	62.36	mg/L	
Lead*	1.211	mg/L	
pH	0.028	mg/L	ตรวจสอบเองในห้องปฏิบัติการ
	5.70		

หมายเหตุ *ส่งตรวจห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร; LCFA

สำนักงานใหญ่และสาขากรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.2 เมื่อเจือจางน้ำทิ้งแป้งมันด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate ให้มีความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 8 และตารางที่ 11 ได้ผลว่า การใช้น้ำทิ้งที่เจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 แบคทีเรียเจริญได้ในน้ำทิ้งที่ทุกๆ ความเข้มข้น และเจริญดีกว่าเมื่อนำน้ำทิ้งเจือจางในน้ำ ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ต้องการวิตามินไบโอติน (biotin) และไทอะมีน (thiamine-HCl) (จินตนา, 2543; Mahakhan *et al.*, 2005) และสาร trace element ต่างๆ อีกทั้งการใช้อาหาร Ormerod's ที่มีบีฟเฟอร์ จะมีการควบคุมค่าพีเอชเริ่มต้นให้เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดกับการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรียเจริญได้เร็วในน้ำทิ้ง 9 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ในช่วงเวลาที่ 24 เซลล์ซัสเพนชันมีสีสีแดงเข้มกว่าในน้ำทิ้งความเข้มข้นสูงกว่า (36-90%) พบทั้งเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารและตกตะกอนอยู่ด้านล่างหลอดบ้าง และในช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมงเดียวกันตะกอนแบ่งที่ก้นหลอด มีปริมาณลดลงจนหมดหรือเกือบหมด และแบคทีเรียเจริญได้สูงที่สุด ในช่วงเวลาที่ 36 ชั่วโมงในอาหารที่มีน้ำทิ้ง 36 45 54 63 72 และ 81 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียเจริญได้เช่นกัน แต่ช้ากว่า กล่าวคือ ในน้ำทิ้ง 36 และ 45 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียเจริญสูงสุด ในช่วงเวลาที่ 36 (แต่เจริญน้อยกว่า 9-27%) และในน้ำทิ้ง 54 63 72 และ 81 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียเจริญสูงสุดในช่วงเวลาที่ 42 และตะกอนอาหารลดลงด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามน้ำทิ้งที่เปอร์เซ็นต์สูงกว่า จะเหลือตะกอนมากกว่า ตามลำดับ และในน้ำทิ้ง 90 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่ได้เจือจางซึ่งไม่มีแร่ธาตุหรือสารอาหารอื่น แบคทีเรียเจริญได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้ง 63 72 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ไปถึง 84 ชม. เซลล์ซัสเพนชันในน้ำทิ้งเปลี่ยนสีซีดลงเป็นสีเหลือง การที่สารละลายเซลล์มีสีซีดลงอาจเพราะเซลล์ตาย เนื่องจากพีเอชลดต่ำลง การที่แบคทีเรียเจริญได้ในน้ำทิ้งแป้งมันแม้ความเข้มข้นสูงมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งต่างจากการเจริญในน้ำทิ้งผสมน้ำ) เนื่องจาก (1) การทดลองนี้มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.8 ด้วยอาหารก่อน autoclave แม้ที่ 90 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชด้วยภายหลังการ autoclave ค่าพีเอชจะลดต่ำลงเหลือเท่ากับ 6.25 ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่ 2.1 ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.68 ซึ่งมีสภาพเป็นกรดกว่า ดังนั้นสภาพพีเอช 5.68 ไม่เหมาะสมสำหรับเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบของน้ำทิ้งแป้งมันเก็บครั้งที่ 1 พบว่าประกอบด้วยสารอินทรีย์จำนวนหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียเจริญ จะเห็นได้จากค่า COD BOD Total suspended solid โปรตีน และแป้ง (ตารางที่ 10) น้ำทิ้งแป้งมันเก็บครั้งที่ 1 นี้ได้มาจากปลายท่อน้ำทิ้งก่อนลงบ่อน้ำ

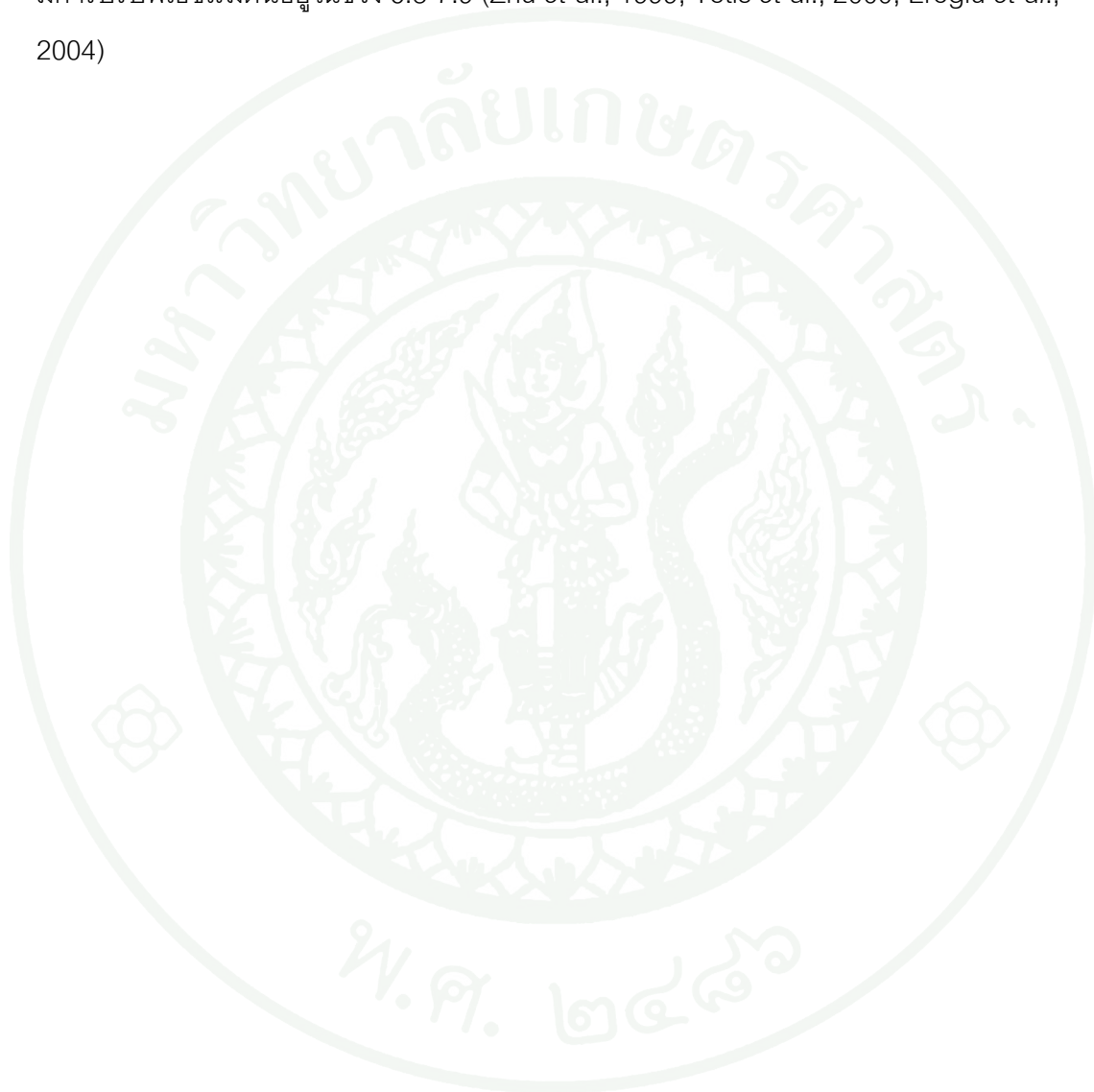
ทั้งเป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดแป้งจากหัวมันที่รวม ขั้นตอนการล้างหัวมันและการแยกแป้ง ใน น้ำทิ้งมีแป้งหลงเหลืออยู่ในปริมาณสูง คือ 16.4 กรัม/ลิตร ดังนั้น น้ำทิ้ง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 90%) จึงมีการเจริญของแบคทีเรียได้ นั่นคือแบคทีเรีย สามารถใช้น้ำทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้

นอกจากนี้ ยังพบด้วยว่า ในน้ำทิ้งความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ และมีแสงนี้ แบคทีเรียสร้างก๊าซได้ หมายความว่า แบคทีเรียใช้น้ำทิ้งความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนได้ สังเกตมีฟองก๊าซเกิดในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้น 9 18 27 36 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ได้ในชั่วโมงที่ 24-42

Yetis *et al.* (2000) ศึกษาการใช้น้ำทิ้งจากโรงงานฟอกน้ำตาล (sugar refinery wastewater) ในการผลิตไฮโดรเจนแบบให้แสงด้วย *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 โดยเจือจางน้ำทิ้งอยู่ในช่วง 10-50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Biebl and Pfenning medium และเติมน้ำทิ้งเปอร์เซ็นต์ต่างๆ แทนแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน นั่นคือ malate และ glutamate ตามลำดับ ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ผลิตก๊าซในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์แก้ว (glass column bioreactor) ขนาด 150 มล. พบว่า เมื่อใช้น้ำทิ้ง 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เกิดก๊าซขึ้น แต่ไม่เกิดก๊าซในน้ำทิ้ง 30 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์ที่สูงขึ้น แสดงว่าใช้น้ำทิ้งดังกล่าวเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนหรือแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองนี้ จะเห็นว่า *Rubrivivax gelatinosus* SB24 สามารถใช้น้ำทิ้งโรงงานแป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งให้อิเล็กตรอนเพื่อการเจริญและการผลิตก๊าซได้ เพราะแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ มีการสร้างเอนไซม์ α -amylase ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (Mahakhan *et al.*, 2005) ซึ่งในน้ำทิ้งนี้มีทั้งแป้งและน้ำตาลรีดิรซ์สูง ตามที่ตรวจวัดได้ดังตารางที่ 10 และอาจมีกรดอินทรีย์อื่นอยู่ด้วยซึ่งไม่ได้ทำการวิเคราะห์แต่สังเกตได้จากค่าความเป็นกรดเบสซึ่งค่อนข้างต่ำ (พีเอช 5.7) ส่วนแหล่งไนโตรเจนมีทั้งในน้ำทิ้งเอง คือ ค่า Kjeldahl Nitrogen 34.14 มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ลิตร) และ glutamate 5 mM ที่มีอยู่ในอาหาร Ormerod's ดังนั้น จึงถือว่าเพียงพอ

สรุปได้ว่า น้ำทิ้งโรงงานแป้งสาลีเป็นแหล่งให้เฉพาะเลี้ยง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ให้เจริญได้ แม้ความเข้มข้นน้ำทิ้งสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าเมื่อน้ำทิ้งเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate เมื่อเปรียบเทียบกับที่เจือจางด้วยน้ำ นอกจากนี้แบคทีเรียสามารถใช้น้ำทิ้งเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนได้

โดยเฉพาะในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้น 9 18 27 36 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วยอาหารเหลว ส่วนน้ำทิ้งที่เจือจางในน้ำ พบการสร้างก๊าซเล็กน้อย ที่น้ำทิ้งความเข้มข้นไม่เกิน 27 เปอร์เซ็นต์ เพราะน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยน้ำขาดสารอาหารจำเป็นและไม่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น การปรับพีเอช เริ่มต้นจึงสำคัญ เช่นเดียวกับที่มีรายงานหลายฉบับที่แสดงการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้ง โดย มีการปรับพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 6.8-7.9 (Zhu *et al.*, 1999; Yetis *et al.*, 2000; Eroglu *et al.*, 2004)





(ก)



(ข)

ภาพที่ 8 การเจริญของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้งแป้งมันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตร เจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate ปรับพีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มที่มีแสงและไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชม. โดย (ก) ก่อนบ่ม (ข) การเจริญของเชื้อในชั่วโมงที่ 24 โดยเปอร์เซ็นต์ของน้ำทิ้งเรียงจากมากไปน้อยคือ 90 81 72 63 54 45 36 27 18 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (น้ำทิ้ง 90 เปอร์เซ็นต์ คือ ปริมาณน้ำทิ้ง : ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 90:10 ไม่มีสารประกอบอื่นๆ) และหลอดควบคุม คือ อาหาร Ormerod's ที่ไม่มีน้ำทิ้ง เรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 11 แสดงการเจริญของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 และการเกิดก๊าซในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทิ้งแ่งมันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยปริมาตรที่เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium ปรับพีเอชก่อน autoclave เท่ากับ 6.8

เวลา (ชม.)	การเจริญของเชื้อและการเกิดก๊าซในน้ำทิ้งแ่งมันเปอร์เซ็นต์ต่างๆ ที่เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium										
	Ormerod's	9	18	27	36	45	54	63	72	81	90
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+3	+3	+3	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+1
24	+3/G	+3/G	+3/G	+3/G	+2/w	+2	+2	+2	+2	+2/w	+1
30	+3/G	+3/G	+3/G	+3/G	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+1
36	+4/G	+4/G	+4/G	+4/G	+3/G	+3/G	+2	+2	+2	+2	+1
42	+4/G	+4/G	+4/G	+4/G	+3/G	+3/G	+3/w	+3	+3	+3	+1
54	+4	+4	+4	+4	+3	+3	+1	+3	+3	+3	+1
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	+4	+4	+4	+4	+3	+3	+1	+3	+3	+3	+1
พีเอชเริ่มต้น หลัง autoclave	6.80	7.20	6.96	6.87	6.86	6.80	6.72	6.60	6.59	6.53	6.25
พีเอช (72 ชม.)	8.36	7.00	6.40	6.28	6.20	6.02	5.77	5.60	5.50	5.50	5.54

หมายเหตุ สัญลักษณ์ +1 +2 +3 และ +4 แสดงการเจริญของเซลล์ สังเกตจากสีแดงชมพูจากน้อยไปหามาก

สัญลักษณ์ (-) แสดงว่าไม่ได้ตรวจผล หรือไม่ได้ทำการทดสอบ

สัญลักษณ์ (w) แสดงผลไม่ชัดเจน เนื่องจากอาหารมีความขุ่น และสังเกตการเจริญได้ยากมาก หรือไม่มีการเจริญ

สัญลักษณ์ (G) แสดงว่ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น

3. การศึกษาเชิงปริมาณ ในระดับห้องปฏิบัติการ ของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในน้ำทิ้งแป้งมันความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลองในปริมาตรขนาด 23 และ 60 มล.

3.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแป้งมัน เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate ขนาดการทดลอง 23 มล.

เมื่อนำ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 มาเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งแป้งมันที่เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal medium ที่มี glutamate เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้มีความเข้มข้น 27 45 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์ น้ำทิ้งจะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (อนึ่ง น้ำทิ้งความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณน้ำทิ้ง : ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 90:10 ไม่มี glutamate แต่จะใช้ไนโตรเจนในน้ำทิ้งเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่านั้น) ทดลองในหลอด side-arm tube ขนาด 30 มล. ปริมาตรบรรจุ 23 มล. และต่อระบบให้สามารถวัดปริมาตรก๊าซได้ในเวลาต่างๆ ผลการทดลอง พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ในน้ำทิ้งทุกๆ ความเข้มข้น โดยที่ 90 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีแหล่งไนโตรเจนอื่นที่เติมลงไป ซึ่งยืนยันผลในการทดลองที่ผ่านมาข้อ 2.2 แสดงว่าน้ำทิ้งมีสารประกอบไนโตรเจนเพียงพอที่จะทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ (จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งในตารางที่ 10 พบว่าค่า Total Kjeldahl Nitrogen เท่ากับ 34.14 มก./ลิตร)

ส่วนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แสดงในภาพที่ 9 แบคทีเรียผลิตก๊าซเร็วที่สุด และดีที่สุด ในน้ำทิ้งความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ เริ่มตรวจวัดการผลิตก๊าซได้ ในชั่วโมงที่ 18 ความเข้มข้นน้ำทิ้งสูงขึ้นการผลิตก๊าซช้าลง ตามลำดับ เมื่อใช้น้ำทิ้งความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียผลิตก๊าซต่อเนื่องถึง 72 ชม. ได้ก๊าซทั้งสิ้น 5.3 มล. (ตารางที่ 12) จากปริมาตรบรรจุ 23 มล. หรือคิดเป็น 0.23 ลิตร/ลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำทิ้งสูงขึ้นเป็น 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบการเริ่มผลิตก๊าซในชั่วโมงที่ 24 และ 30 ตามลำดับ และมีระยะเวลาการผลิตที่สั้นกว่า คือถึงชั่วโมงที่ 60 เท่านั้น ยิ่งเมื่อใช้น้ำทิ้งความเข้มข้นสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบการเริ่มผลิตก๊าซในชั่วโมงที่ 30 เช่นกัน แต่ระยะเวลาในการผลิตก๊าซสั้นมาก คือผลิตถึงชั่วโมงที่ 54 ก็หยุด ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่วัดได้จากน้ำทิ้งความเข้มข้น 45 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ลดน้อยลงกว่ากันตามลำดับ คือเท่ากับ 4.0 2.6 และ 1.2 มล. จากปริมาตรบรรจุ 23 มล. หรือคิดเป็น 0.17 0.11 และ 0.05 ลิตร/ลิตร

เมื่อนำค่ามาคำนวณอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด (ตารางที่ 12) ได้ดังนี้ ที่ความเข้มข้นน้ำทิ้งแป้งมันที่ 27 45 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด (maximum hydrogen production rate) เท่ากับ 7.39 5.69 3.04 และ 1.74 มิลลิลิตรต่อลิตรของปริมาตรบรรจุต่อชั่วโมง (มล./ลิตร/ชม., mL/L culture/h) ซึ่งน้อยลงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เริ่มต้นและในชั่วโมงที่ 72 ประสิทธิภาพการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 60.0 14.6 18.0 และ 16.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12) จะเห็นว่า เมื่อน้ำทิ้งความเข้มข้นสูงขึ้นกว่า 27 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะต่ำลง 3-4 เท่า สอดคล้องกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดก็ต่ำลงตามด้วย ส่วนค่า COD ซึ่งเป็นค่าที่วัดจากสารละลายรวมเซลล์ทั้งหมด พบว่าลดลงเล็กน้อย เมื่อคิดประสิทธิภาพการลดลงของ COD เท่ากับ 9.8 18.9 21.1 และ 21.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการนำน้ำทิ้งมาใช้เป็นสับสเตรตตั้งต้นในการทดลองการผลิตไฮโดรเจนยังให้ผลพลอยได้ คือ สามารถลดความสกปรกของน้ำทิ้งลงได้ แต่ยังได้น้อย เนื่องจากค่า COD ที่วัดในวันสุดท้ายวัดจากสารละลายทั้งหมดที่มีเซลล์รวมอยู่ด้วย จึงมีค่าค่อนข้างสูง เนื่องจากรวมค่า COD ที่เกิดจากตะกอนเซลล์ด้วย ซึ่งส่วนใหญ่ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียจะมีขั้นตอนการตกตะกอน หรือแยกตะกอนออกก่อนอีกขั้นตอน แล้ววัดค่า COD BOD และค่ากำหนดอื่นก่อนที่จะปล่อยน้ำทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม

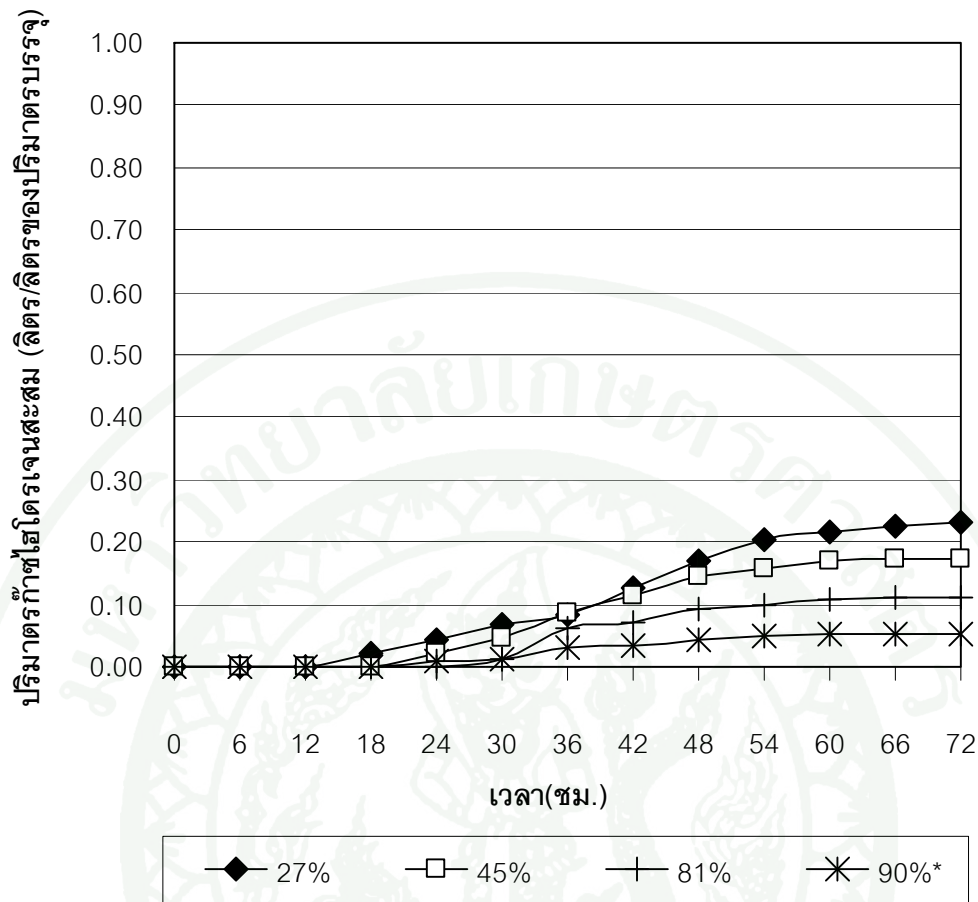
แม้แบคทีเรียจะนำน้ำทิ้งไปใช้เจริญได้ดี แต่กระบวนการผลิตไฮโดรเจนกลับถูกยับยั้งเมื่อนำน้ำทิ้งความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ เนื่องจาก กระบวนการผลิตไฮโดรเจน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) ถูกยับยั้งได้โดยสมบูรณ์โดยสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น สารประกอบแอมโมเนียมไอออน (ammonium ion; NH_4^+) ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) และสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือเปปโทน (peptone) ที่มีปริมาณสูง (Gest and Kamen, 1949) หรือกรดอะมิโนเช่น อะลานีน (alanine) และซีรีน (serine) โดยสารประกอบเหล่านี้ สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วแล้วปล่อยแอมโมเนียมไอออนออกมา (Bregoff and Kamen, 1952) แต่พบว่า ถ้าแอมโมเนียมไอออนถูกควบคุมให้มีความเข้มข้นต่ำและคงที่ในเซลล์ซัสเพนชัน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสงจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว สำหรับการทดลองนี้ น้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังมีค่า Total Kjeldahl Nitrogen ถึง 34.14 มก./ลิตร ปริมาณของแข็งละลายน้ำ (total dissolved solid มากกว่า 9,000 มก./ลิตร ของแข็งแขวนลอย (total suspended solids) มากกว่า 11,000 มก./ลิตร (ตารางที่ 10) ซึ่งมีค่าที่ค่อนข้างสูง จึงเป็นไปได้ที่จะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ และกระบวนการผลิต

ไฮโดรเจน รวมถึงสารอื่นในน้ำทิ้งที่ยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจน เช่น แอมโมเนียที่สามารถยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนโดยกลไกแบบย้อนกลับ (feedback repression) และโลหะหนักต่างๆ จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้ง พบว่า มีตะกั่วปนเปื้อนอยู่สูง เท่ากับ 0.028 มก./ลิตร ซึ่งอาจมีผลต่อเซลล์และกระบวนการผลิตก๊าซด้วย (Ormerod and Gest, 1962) นอกจากนี้การที่มีของแข็งแขวนลอยอยู่สูงจะไปมีผลต่อการบดบังแสง เนื่องจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย non-sulfur purple phototroph ต้องการแสง การที่เราใช้น้ำทิ้งโดยตรงซึ่งมีตะกอนแบ่งจะทำให้บดบังแสง ยิ่งใช้เปอร์เซ็นต์น้ำทิ้งมากยิ่งบดบังแสงมาก การศึกษาการผลิตโดยใช้น้ำทิ้งส่วนใหญ่จะมีการกรองเพื่อเอาตะกอนที่ไม่ละลายน้ำออกก่อน (Yigit *et al.*, 1999; Yetis *et al.*, 2000; Eroglu *et al.*, 2004)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับงานวิจัยอื่นที่ใช้น้ำทิ้งเป็นสับสเตรตเริ่มต้น ได้แก่ Yetis *et al.* (2000); Yigit *et al.* (1999) ที่ใช้น้ำทิ้งโรงงานฟอกน้ำตาล (sugar refinery wastewater) ในการผลิตไฮโดรเจนในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้น้ำทิ้งความเข้มข้น 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ *R. sphaeroides* O.U.001 ได้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.00 และ 6.00 มล./ลิตร/ชม. ตามลำดับ จะเห็น ได้ใกล้เคียงกันหรืออย่างน้อยกว่าการทดลองนี้เล็กน้อย ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า การใช้น้ำทิ้งแ่งมันที่มีคุณสมบัติ ดังตารางที่ 10 เป็นสับสเตรตให้กับ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้อัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 7.39 มล./ลิตร/ชม. ในน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ormerod's minimal glutamate medium

กลุ่มวิจัยของ รศ.ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน ได้รายงานการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แ่งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน โดยใช้ *R. gelatinosus* SB24 พบว่าปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 9.8 มล. จากปริมาตรบรรจุ 23 มล. โดยแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 8.8 มล./ลิตร/ชม. แต่เมื่อขยายขนาดเป็น 5.7 ลิตร พบว่าปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 8.3 ลิตร จากปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร และแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นมากเป็น 25.4 มล./ลิตร/ชม. (มณฑล, 2547; Chitradon *et al.*, 2008) เมื่อใช้แ่งมันสำปะหลังสุก 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน พบว่า *R. gelatinosus* SB24 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมได้ 10 มล. จากปริมาตรบรรจุ 23 มล. ในเวลา 72 ชม. มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 21.7 มล./ลิตร/ชม. และเมื่อทำการขยายขนาดการผลิตไปเป็น 5.7 ลิตร พบว่าแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 10.6 ลิตร แต่มีอัตราการผลิต

ไฮโดรเจนลดลงเป็น 12.0 มล./ลิตร/ชม. แม้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแป้งดิบจะสูงกว่าแป้งสุกในถึงขนาด 5.7 ลิตร แต่การใช้แป้งสุกเริ่มผลิตก๊าซได้เร็วกว่า ซึ่งเห็นได้ชัด ในขนาด 23 มล. ทั้งนี้เป็นเพราะแป้งสุกใช้ได้ง่ายกว่า เพราะเป็น gelatinized starch ละลายนํ้ามากกว่า นอกจากนี้ อาจเป็นเพราะระบบการกวน แป้งดิบซึ่งเป็นตะกอนไม่เพียงพอทำให้วัดปริมาณไฮโดรเจนทั้งหมด (total hydrogen) ได้น้อย เมื่อเอาความรู้ข้างต้นนี้มาวิเคราะห์ผลการทดลองที่ใช้ น้ำทั้งนี้ น้ำทั้งนี้ ที่ใช้ในแต่ละการทดลองได้มาเชื่อมป้อนก่อนด้วยการ autoclave ทำให้แป้งที่อยู่ในน้ำทั้งนี้ นั้น เปลี่ยนเป็น gelatinized starch หรือแป้งสุก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแป้งพบว่าในน้ำทั้งนี้มีแป้ง 16 กรัม/ลิตร สรุปผลการผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากการใช้น้ำทั้งนี้แป้งมัน คือความเข้มข้นที่ให้ก๊าซสูงสุด คือความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ ที่เมื่อคำนวณปริมาณแป้งสุกในน้ำทั้งนี้ 27 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 4 กรัม/ลิตร ได้ก๊าซทั้งสิ้น 5.3 มล. จากปริมาตรบรรจุ 23 มล. น้อยกว่าเมื่อใช้แป้งสุกหรือแป้งดิบ 10 กรัม/ลิตร อยู่ครึ่งหนึ่ง และแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 7.4 มล./ลิตร/ชม. อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถใช้น้ำทั้งนี้ได้สูงกว่านี้ได้ เนื่องจากในน้ำทั้งนี้มีองค์ประกอบอื่นอีกมาก ที่อาจมีผลยับยั้งกลไกการผลิตไฮโดรเจน



ภาพที่ 9 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน

ในปริมาตรการทดลอง 23 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 27 45 81 และ 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (น้ำทิ้ง 90 เปอร์เซ็นต์ คือ ปริมาณน้ำทิ้ง : ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 90:10 ไม่มี glutamate แต่จะใช้ไนโตรเจนในน้ำทิ้งเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่านั้น) พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

ตารางที่ 12 _ค่าการตรวจวัดที่ได้จากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 เมื่อใช้น้ำทิ้งแบ่งมันความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 27 45 81

และ 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate (น้ำทิ้ง 90 เปอร์เซ็นต์ คือ ปริมาณน้ำทิ้ง : ปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 90:10 ไม่มี glutamate แต่จะใช้นิโตรเจนในน้ำทิ้งเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่านั้น) พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. ขนาด 23 มล. (น้ำทิ้งเก็บครั้งที่1)

ชนิดของ อาหารเลี้ยงเชื้อ (เปอร์เซ็นต์น้ำทิ้ง โดยปริมาตร)	ปริมาตรก๊าซ ไฮโดรเจน สะสมทั้งหมด (มล.)	ชั่วโมงที่ เริ่ม ผลิตก๊าซ ไฮโดรเจน	พีเอชสุดท้าย ของอาหาร เลี้ยงเชื้อหลัง บ่มเชื้อ 72 ชม.	อัตราการผลิต ก๊าซไฮโดรเจน (มล./ลิตร/ชม.)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./ลิตร)		ค่า COD (มก./ลิตร)	
					ก่อนเพาะเชื้อ	หลังเพาะเชื้อ 72 ชม.	ก่อนเพาะเชื้อ	หลังเพาะเชื้อ 72 ชม.
น้ำทิ้ง 27%	5.30	18	6.45	7.39	1,752.28	700.00	8,981.28	8,102.60
น้ำทิ้ง 45%	3.99	24	6.00	5.65	2,892.36	2,468.75	17,851.68	14,479.12
น้ำทิ้ง 81%	2.55	30	5.80	3.04	5,277.78	4,326.38	31,933.44	25,206.72
น้ำทิ้ง 90%	1.20	30	5.36	1.74	5,560.61	4,621.22	28,816.64	22,720.00

3.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแบ่งมันเชื้อจากด้วยน้ำ ขนาดการทดลอง 60 มล.

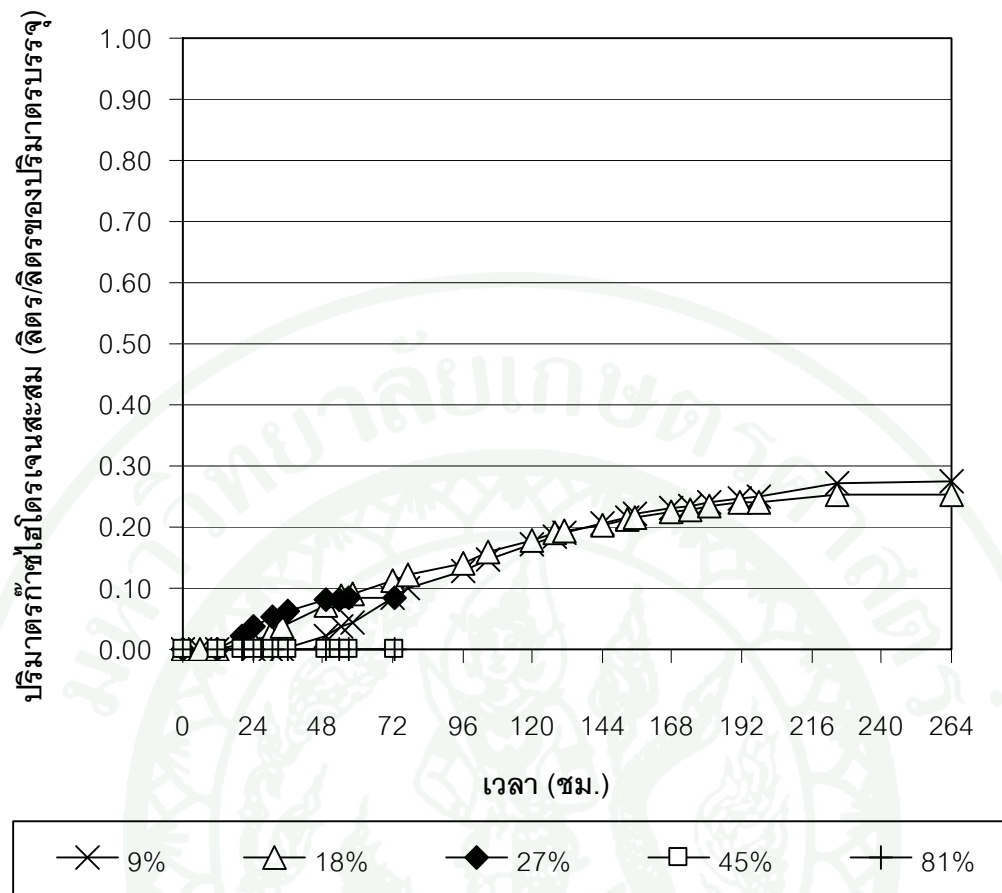
เนื่องจากยังต้องการลดต้นทุนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งด้วยการเชื้อจากน้ำทิ้งด้วยน้ำ แต่ขนาดการทดลอง 23 มล. เห็นผลไม่ชัดเจน จึงเพิ่มขนาดการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็น 60 มล. เพื่อให้การสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นรวมทั้งการตรวจวัดก๊าซ และพารามิเตอร์อื่นทำได้ชัดเจนขึ้น การทดลองนี้เชื้อจากน้ำทิ้งด้วยน้ำที่มีพีเอช 5.7 เชื้อจากแล้วปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ก่อน autoclave ความเข้มข้นสุดท้ายของเป็น 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุดกับน้ำทิ้ง 9 และ 18 เปอร์เซ็นต์ คือได้ก๊าซสะสม 15 มล. จากปริมาตรบรรจุ 60 มล. (ภาพที่ 10) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้น้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียเริ่มผลิตก๊าซที่ชั่วโมงที่ 24 ได้เร็วกว่าเมื่อใช้น้ำทิ้ง 9 เปอร์เซ็นต์ ที่เริ่มผลิตในชั่วโมงที่ 49 แต่เมื่อใช้น้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ เริ่มผลิตก๊าซที่ชั่วโมงที่ 20 เร็วกว่าในน้ำทิ้ง 9-18 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3 มล./ลิตร/ชม. มากกว่าในน้ำทิ้ง 9-18 เปอร์เซ็นต์ด้วย แต่ผลิตก๊าซในช่วงเวลาสั้นๆ ทำให้ได้ปริมาณก๊าซที่ได้น้อยลง 3 เท่า คือได้เพียง 5.1 มล. และเมื่อใช้น้ำทิ้ง 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถตรวจวัดก๊าซได้ และค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ (ตารางที่ 13) พบว่า ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์แบ่ง และซีไอดี มีค่าที่ต่ำที่สุดในน้ำทิ้ง 9 เปอร์เซ็นต์ คือ เท่ากับ 68.7 71.6 และ 44.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การที่ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซ และการใช้สารอาหารไม่ดีในน้ำทิ้งความเข้มข้นที่สูงขึ้น เป็นผลมาจากการใช้น้ำเป็นตัวทำเชื้อจาก จึงไม่มีความเป็นบัฟเฟอร์ไรท์ แม้จะมีการปรับพีเอชเริ่มต้นให้เหมาะกับแบคทีเรีย คือ 6.8 ก็ตาม แต่เมื่อ autoclave พีเอชของสับสเตรตเริ่มต้นก็ยังลดลงอยู่ระหว่าง 6.4-6.5 ค่าพีเอชของน้ำทิ้งเป็นกรดมากขึ้นตามความเข้มข้นที่มากขึ้นของน้ำทิ้ง และเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไปแล้ว 3-10 วัน และวัดพีเอชสุดท้าย พบว่าค่าพีเอชสุดท้ายในน้ำทิ้ง 18-81 เปอร์เซ็นต์ ยังมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ยิ่งความเข้มข้นของน้ำทิ้งสูงการเปลี่ยนแปลงพีเอชเป็นกรดยิ่งมากขึ้น น้ำทิ้งความเข้มข้น 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์มีค่าพีเอชสุดท้าย 5.1-5.4 ซึ่งลดต่ำกว่าค่าที่เหมาะสมกับการเจริญ (มณฑล, 2547) เช่นเดียวกัน มีรายงานว่าพีเอชเป็นกรดไม่เหมาะสมกับการผลิตไฮโดรเจนโดย *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 นั่นคือ หากใช้พีเอชเริ่มต้นต่ำถึง 5.0-5.5 แบคทีเรียไม่เจริญ (Sasikala et al., 1995)

ภาพที่ 11ก เห็นการเจริญชัดเจนในน้ำทิ้งที่เชื้อจากด้วยน้ำให้มีความเข้มข้น 9 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ และสังเกตไม่เห็นตะกอนน้ำทิ้งในน้ำทิ้ง 9 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ พบตะกอนน้ำทิ้งเล็กน้อยสอดคล้องกับค่าโปรตีน (ตารางที่ 13) ค่าโปรตีนในที่นี้เป็น

ค่าที่รวมโปรตีนจากเซลล์ที่เจริญ และโปรตีนจากน้ำทิ้ง ถ้าพิจารณาจากค่าโปรตีนจะเห็นค่าสุดท้ายเพิ่มสูงกว่าค่าเริ่มต้นชัดเจน นั้นแสดงว่าเซลล์เจริญใช้กากตะกอนในน้ำทิ้งและเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ในน้ำทิ้ง 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ พบการเจริญเล็กน้อย และมีตะกอนน้ำทิ้งจำนวนมาก (ภาพที่ 11ก) ดังนั้นค่าโปรตีนวันสุดท้ายน่าจะเป็นค่าโปรตีนจากตะกอนน้ำทิ้งมากกว่าโปรตีนจากเซลล์สอดคล้องกับภาพที่สังเกตสีแดงของเชื้อได้น้อยมาก การเจริญไม่ดีในน้ำทิ้ง 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อไม่ผลิตก๊าซในน้ำทิ้งความเข้มข้นทั้งสองนี้

เมื่อคำนวณประสิทธิภาพการลดลงของสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยน้ำจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และปริมาณแป้ง และ COD (ตารางที่ 13) พบว่าในน้ำทิ้ง 9 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสามารถใช้สารอินทรีย์ต่างๆได้มากที่สุด โดยมีประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์แป้ง และ COD เท่ากับ 69 72 และ 44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รองลงมาคือในน้ำทิ้ง 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ที่มีประสิทธิภาพการลดสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพการลดสารอินทรีย์น้อยที่สุดในน้ำทิ้งความเข้มข้น 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองยืนยันว่า การใช้น้ำทิ้งแป้งมันเจือจางด้วยน้ำเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน แบคทีเรียผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้แต่ในปริมาณที่น้อย เนื่องจากไม่มีฟัฟเฟอรีในการควบคุมพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง ดังจะเห็นจากค่าพีเอชสุดท้ายลดลงต่ำ มีผลให้แบคทีเรียเจริญและผลิตก๊าซไฮโดรเจนไม่ดี ทำให้ประสิทธิภาพการลดลงของ COD และน้ำตาลรีดิวซ์น้อยเพราะแบคทีเรียใช้สารอินทรีย์ได้น้อย ดังนั้นการใช้น้ำทิ้งไม่ควรใช้น้ำเป็นตัวทำเจือจาง



ภาพที่ 10 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน ใน ปริมาตรการทดลอง 60 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยน้ำ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มี ออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-11 วัน

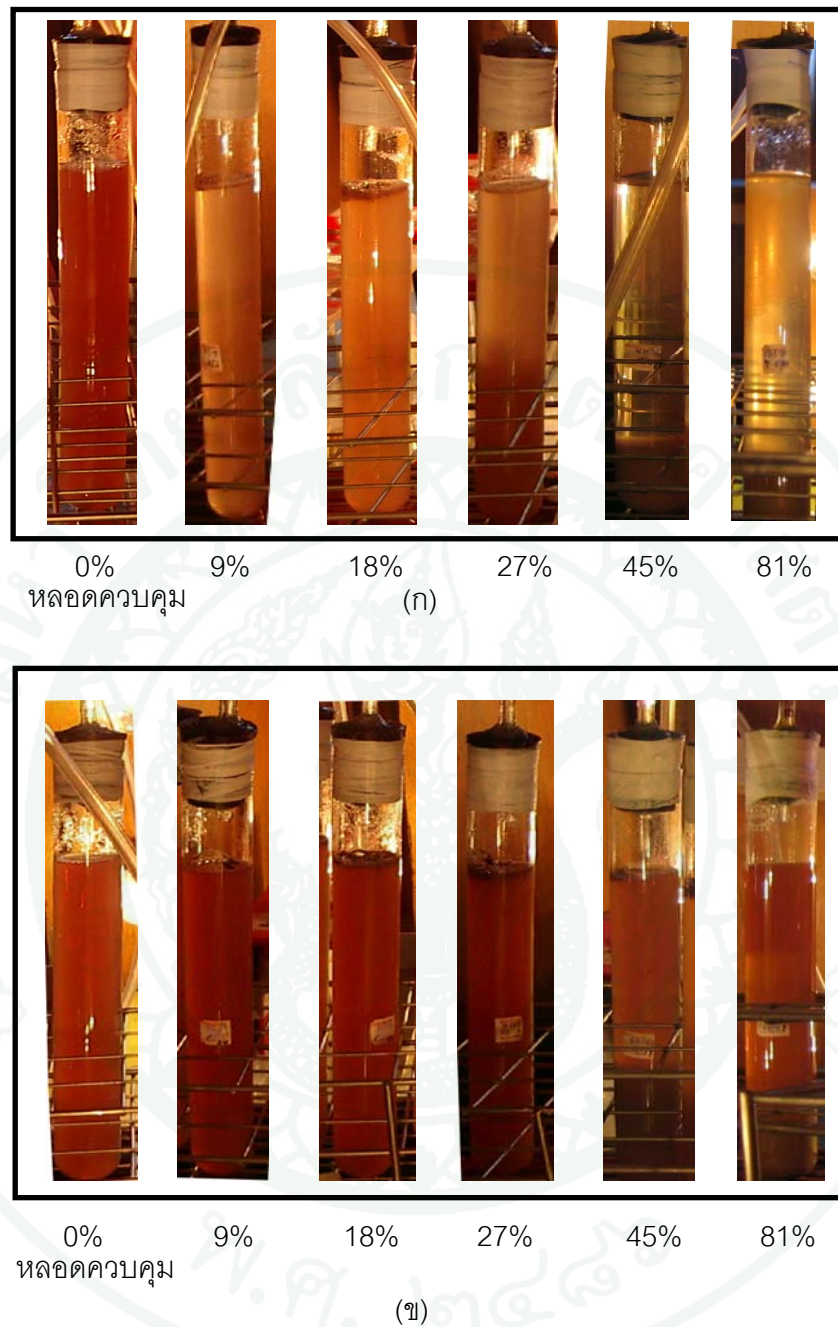
ตารางที่ 13 ผลสรุปพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองผลิตไฮโดรเจนเมื่อนำน้ำทิ้งแบ่งตามความเข้มข้นต่างๆ เจือจางด้วยน้ำ ปริมาตร 60 มล.
(น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1)

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	9%	18%	27%	45%	81%
เจือจางน้ำทิ้งด้วย	เจือจางด้วยน้ำ				
ความเข้มแสง: light intensity (ลักซ์)	700				
เวลาเริ่มการผลิตไฮโดรเจน: lag time, t_{lag} (ชม.)	49	24	20	-	-
อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด; Max. H_2 evolution rate (มล./ลิตร/ชม.)	2.64 (49-77 ชม.)	2.39 (24-58 ชม.)	2.95 (20-30 ชม.)	-	-
ปริมาตรไฮโดรเจนทั้งหมด; V_{H_2} (มล.)	16.25	15.10	5.10	-	-
ระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจน; Δt_{H_2} (ชม.)	176	192	29	-	-
พีเอชอาหารเริ่มต้นหลัง autoclave; pH_i	6.50	6.42	6.54	6.47	6.44
พีเอชสุดท้าย; pH_f	7.34	6.19	6.22	5.48	5.13
เวลาบ่ม; incubation time (ชม.)	264	264	72	168	168
ชีโอดีของอาหารเริ่มต้นทั้งหมด; COD_i (มก./ลิตร)	2,643.14	5,317.94	7,002.94	12,497.76	22,651.20
ชีโอดีสุดท้ายเฉพาะส่วนใส; COD_{is} (มก./ลิตร)	1,475.89	3,896.64	5,636.47	8,933.76	18,216.00

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เปอร์เซ็นต์/ค่าที่วัด	9%	18%	27%	45%	81%
ประสิทธิภาพการลดลงของค่าซีไอดีในน้ำทิ้ง (COD removal eff., %)*	44.16	26.73	19.51	28.52	19.58
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (มก./ลิตร)	586.5	1,027.03	1,709.46	3,205.9	5,396.6
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายเฉพาะส่วนใส (มก./ลิตร)	183.78	743.24	1,283.34	2,813.24	4,603.45
ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์: RS removal eff. (%)	68.7	27.6	24.9	12.2	14.7
ปริมาณแป้งเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	1.69	3.24	4.57	8.70	15.48
ปริมาณแป้งสุดท้ายเฉพาะส่วนใส (กรัม/ลิตร)	0.48	1.73	2.49	5.82	11.25
ประสิทธิภาพการลดลงของแป้ง: starch removal eff. (%)	71.60	46.60	45.51	33.10	27.32
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น (มก./ลิตร)	216.25	362.81	550.62	1,228.75	2,016.36
ปริมาณโปรตีนสุดท้าย (มก./ลิตร)	249.17	528.13	595.83	853.13	968.75

หมายเหตุ *COD removal eff. (%) เปรียบเทียบระหว่างค่า COD เริ่มต้น (COD_i) กับค่า COD สุดท้ายของส่วนใส (COD_{is})

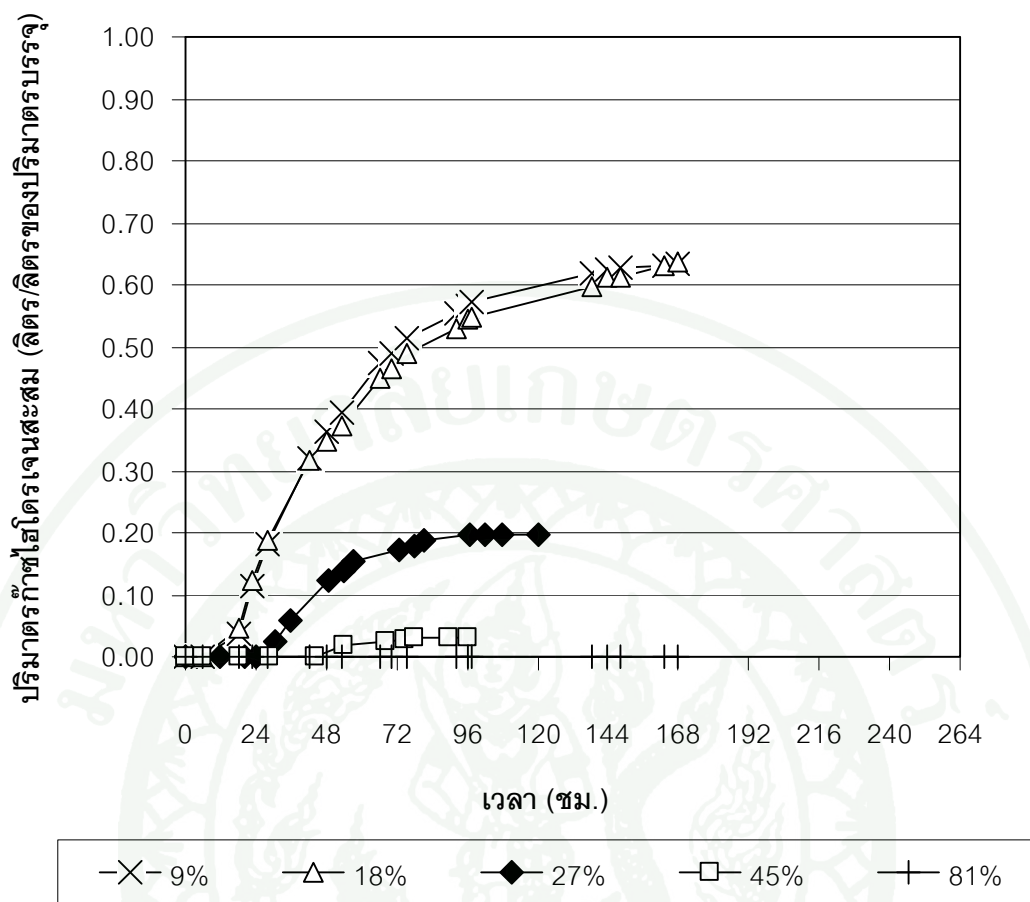


ภาพที่ 11 การเจริญของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในน้ำทิ้งแบ่งมันที่เจือจางที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดย (ก) เจือจางด้วยน้ำ (ข) เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal glutamate ในขนาด 60 มล. เมื่อป่มในที่ไม่มีออกซิเจน และมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. เรียงจากซ้ายไปขวา หลอดควบคุม คือ อาหาร Ormerod's ที่ไม่มีน้ำทิ้ง, น้ำทิ้ง 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแป้งมัน เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate ขนาดการทดลอง 60 มล.

3.3.1 เมื่อใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 ที่เก็บตัวอย่างเมื่อ 19 มิถุนายน พ.ศ. 2549 เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate เป็นการเติมธาตุอาหารจำเป็น พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตก๊าซได้ในน้ำทิ้งที่ความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำทิ้งความเข้มข้น 9 และ 18 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไฮโดรเจนเริ่มได้เร็วในช่วงเวลาที่ 18 และได้ไฮโดรเจนปริมาณสูงสุดคือ 38 มล. และมีอัตราการผลิตใกล้เคียงกัน เท่ากับ 14 มล./ลิตร/ชม. และเพิ่มความเข้มข้นของน้ำทิ้งสูงขึ้นเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ กลับพบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเหลือ 5 มล./ลิตร/ชม. ได้ปริมาณก๊าซลดลงเป็น 11.75 มล. และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำทิ้งสูงถึง 45 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้น้อยมากเพียง 1.8 มล. และไม่พบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งความเข้มข้น 81 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12, ตารางที่ 14) เช่นเดียวกับการใช้น้ำทิ้งเจือจางด้วยน้ำ ที่พบว่าเมื่อใช้น้ำทิ้งความเข้มข้นสูงเกินกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ลดลง แต่การเจือจางน้ำทิ้งด้วยอาหารเหลวช่วยให้แบคทีเรียผลิตก๊าซได้เร็วขึ้น อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงขึ้น และได้ปริมาณที่มากขึ้นกว่า 2 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้น้ำทิ้งที่เจือจางด้วยน้ำที่ความเข้มข้นเดียวกัน

เมื่อพิจารณาเฉพาะการเจริญของแบคทีเรีย จากภาพที่ 11ข แบคทีเรียเจริญได้ดีเมื่อใช้อาหารเจือจางน้ำทิ้ง โดยสังเกตจากสีแดงของแบคทีเรียได้ชัดเจน ในน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยอาหารเหลวทุกความเข้มข้นของน้ำทิ้ง คือ 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าในน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยน้ำ (ภาพที่ 11ก) สอดคล้องกับค่าโปรตีนสุดท้ายของเซลล์ซัสเพนชัน ในน้ำทิ้งทุกความเข้มข้นที่เจือจางด้วยอาหารเหลวมีค่าสูงกว่า โปรตีนสุดท้ายของสารละลายเชื้อ ในน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยน้ำ (ตารางที่ 14 เปรียบเทียบกับตารางที่ 13) และไม่สังเกตเห็นตะกอนน้ำทิ้งในน้ำทิ้งคงเหลือหลังจากแบคทีเรียเจริญในน้ำทิ้ง 9-27 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11ข) พบแต่ตะกอนเซลล์ ในขณะที่ในน้ำทิ้ง 45-81 เปอร์เซ็นต์ ยังคงเหลือตะกอนน้ำทิ้งอยู่หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเจริญแล้ว นั่นคือค่าโปรตีนสุดท้ายไม่ใช่ค่าจริงแต่เป็นค่าของโปรตีนเซลล์ รวมกับโปรตีนจากตะกอนน้ำทิ้ง



ภาพที่ 12 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน
 ในปริมาตรการทดลอง 60 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยอาหารเหลว Ormerod's
 minimal-glutamate ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 18 27 45 และ 81 เปอร์เซ็นต์โดย
 ปริมาตร พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่อุณหภูมิ 40
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน

ตารางที่ 14 ผลสรุปพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองผลิตไฮโดรเจนเมื่อนำน้ำทิ้งแบ่งตามความเข้มข้นต่างๆ เจือจางด้วยอาหารเหลว ปริมาตร 60 มล. (น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1)

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	9%	18%	27%	45%	81%
เจือจางน้ำทิ้งด้วย	Ormerod's-minimal-glutamate medium				
ความเข้มแสง: light intensity (ลักซ์)	700				
เวลาเริ่มการผลิตไฮโดรเจน: lag time, t_{lag} (ชม.)	18	18	30	54	-
อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด; Max. H_2 evolution rate (มล./ลิตร/ชม.)	14.42 (18-28 ชม.)	14.17 (18-28 ชม.)	5.22 (30-49 ชม.)	0.50 (54-74 ชม.)	-
ปริมาตรไฮโดรเจนทั้งหมด; V_{H_2} (มล.)	37.95	38.30	11.75	1.80	-
ระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจน; Δt_{H_2} (ชม.)	126	>150	67	20	-
พีเอชอาหารเริ่มต้นหลัง autoclave; pH_i	6.70	6.68	6.74	6.61	6.60
พีเอชสุดท้าย; pH_f	7.08	6.43	6.34	5.48	5.48
เวลาบ่ม; incubation time (ชม.)	168	168	120	168	168
ซีโอดีของอาหารเริ่มต้นทั้งหมด; COD_i (มก./ลิตร)	3,665.66	6,819.84	7,009.20	14,160.96	20,592.00
ซีโอดีสุดท้ายของส่วนใส; COD_{fs} (มก./ลิตร)	1,173.22	2,980.13	5,155.92	8,838.72	16,869.60

ตารางที่ 14 (ต่อ)

เปอร์เซ็นต์/ค่าที่วัด	9%	18%	27%	45%	81%
ประสิทธิภาพการลดลงของค่าซีไอดีในน้ำทิ้ง (COD removal eff., %)*	67.99	56.30	26.44	37.58	18.08
ปริมาณน้ำตาลรีเวิร์สเริ่มต้นทั้งหมด (มก./ลิตร)	641.38	1,395.44	1,590.52	3,026.47	5,747.13
ปริมาณน้ำตาลรีเวิร์สสุดท้ายเฉพาะส่วนใส (มก./ลิตร)	80.00	222.99	945.40	3,083.82	5,000.00
ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีเวิร์ส: RS removal eff. (%)	87.53	84.03	40.56	-	13.00
ปริมาณแป้งเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	1.30	3.55	4.12	9.21	15.31
ปริมาณแป้งสุดท้ายเฉพาะส่วนใส (กรัม/ลิตร)	0.09	0.76	1.73	4.64	8.89
ประสิทธิภาพการลดลงของแป้ง: starch removal eff. (%)	93.08	78.59	58.01	49.62	41.93
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น (มก./ลิตร)	159.38	306.25	414.38	914.85	1,707.50
ปริมาณโปรตีนสุดท้าย (มก./ลิตร)	616.41	770.05	994.79	1,173.96	1,570.83

หมายเหตุ *COD removal eff. (%) เปรียบเทียบระหว่างค่า COD เริ่มต้น (COD_i) กับค่า COD สุดท้ายของส่วนใส (COD_{is})

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล แป้ง และ COD ในน้ำทั้งความเข้มข้นต่างๆ หลังแบคทีเรียใช้ผลิตไฮโดรเจน (ตารางที่ 14) แล้วคำนวณประสิทธิภาพการลดลงของสารอินทรีย์ ประสิทธิภาพการลดลงของแป้ง น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือน้ำทั้งความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 93 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการลดลงของ COD มากที่สุดตามไปด้วย โดยมีค่าเท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงถึงความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทั้งได้ดีในน้ำทั้งความเข้มข้นดังกล่าว และเมื่อแบคทีเรียใช้น้ำทั้ง 18 เปอร์เซ็นต์ ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกับในน้ำทั้ง 9 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพการลดลงของแป้งมีค่าน้อยกว่าคือเท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการลดลงของ COD น้อยลงด้วย คือลดลงได้เพียง 56 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อน้ำทั้งความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 45-81 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพการใช้สารอินทรีย์ในน้ำทั้งลดลงตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้น้ำและอาหารเหลวเจือจางน้ำทั้ง น้ำทั้งที่เจือจางด้วยอาหารเหลว ให้ค่าประสิทธิภาพการลดลงของสารอินทรีย์ทั้งค่า COD และน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเจริญในน้ำทั้งที่เจือจางด้วยอาหารได้ดีกว่า

สรุปได้ว่า การจะใช้น้ำทั้งแป้งมันที่เก็บครั้งที่ 1 นี้เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับ *R. gelatinosus* SB24 ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ต้องเจือจางน้ำทั้งด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate ปรับพีเอชเป็น 6.8 และความเข้มข้นของน้ำทั้งที่เหมาะสมคือ 9-18 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีอัตราการผลิตไฮโดรเจน และได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่มากกว่าเปอร์เซ็นต์อื่น แต่พบว่าที่น้ำทั้ง 9 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และแป้งมากกว่าในน้ำทั้ง ทำให้ได้ผลพลอยได้คือมีประสิทธิภาพการลดลงของ COD สูงด้วย เมื่อพิจารณาน้ำทั้ง 18 เปอร์เซ็นต์ มีแหล่งอิเล็กตรอนมากกว่าในน้ำทั้ง 9 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ได้ก๊าซไฮโดรเจนมากกว่านี้ อาจเป็นเพราะพีเอชในระหว่างการผลิตมีค่าต่ำไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ดังจะเห็นจาก พีเอชสุดท้ายในน้ำทั้ง 18 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 6.4 ขณะที่พีเอชสุดท้ายในน้ำทั้ง 9 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 7.1

3.3.2 เมื่อใช้น้ำทิ้งแป้งมันที่เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 2 เมษายน 2551

วิเคราะห์คุณภาพของน้ำทิ้งใหม่ ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าไม่สามารถตรวจพบแป้งในน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 2 เมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน ซึ่งแตกต่างน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 1 ที่มีปริมาณแป้งเท่ากับ 16 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ น้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 2 มีค่า COD total suspended solids total solids โลหะต่างๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก ตะกั่ว น้อยกว่าน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 1 ยกเว้นแมกนีเซียมที่มากกว่า ส่วนค่า BOD total dissolved solids total kjeldahl nitrogen และ น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเท่ากับ 12,080 14,362 401 และ 9,871 มก./ลิตร ตามลำดับสูงกว่าในน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 1 และค่าพีเอชของน้ำทิ้งที่เก็บทั้งสองครั้งมีค่าเท่ากัน คือเท่ากับ 5.7 นอกจากนี้จากการสังเกต พบว่าน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 2 มีความขุ่นน้อยกว่าน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 1 ซึ่งมีตะกอนขุ่นขาวมากกว่า สอดคล้องกับค่า total suspended solids ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณของแข็งแขวนลอยในน้ำทิ้ง แสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติของน้ำทิ้งที่เก็บในช่วงเวลาหนึ่งที่แตกต่างกันมีคุณสมบัติไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นอาจจะทำให้การผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 1 และ 2 แตกต่างกัน จึงต้องทำการทดลองในขนาด 60 มล. เพื่อเปรียบเทียบกัน

นำน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate ปรับพีเอชก่อน autoclave เท่ากับ 6.8 และเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์ชัลเฟนชั้นเริ่มต้น 10 เพอร์เซ็นต์ บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจนและมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากน้ำทิ้งความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 13 และตารางที่ 16 เมื่อใช้น้ำทิ้งความเข้มข้น 9 เพอร์เซ็นต์ แบคทีเรียเริ่มผลิตก๊าซไฮโดรเจนในช่วงเวลาที่ 24 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 8.8 มล./ลิตร/ชม. ได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 16 มล. จากปริมาตรบรรจุ 60 มล. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำทิ้งเป็น 18 เพอร์เซ็นต์ มีอัตราการผลิตสูงขึ้นเป็น 11.8 มล./ลิตร/ชม. และแบคทีเรียผลิตก๊าซได้มากขึ้น 2 เท่า มีปริมาณเท่ากับ 35 มล. และผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงขึ้นอีก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำทิ้งเป็น 27 เพอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 52 มล. โดยมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 10.8 มล./ลิตร/ชม. แต่เมื่อใช้น้ำทิ้ง 45 และ 81 เพอร์เซ็นต์ ไม่พบการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

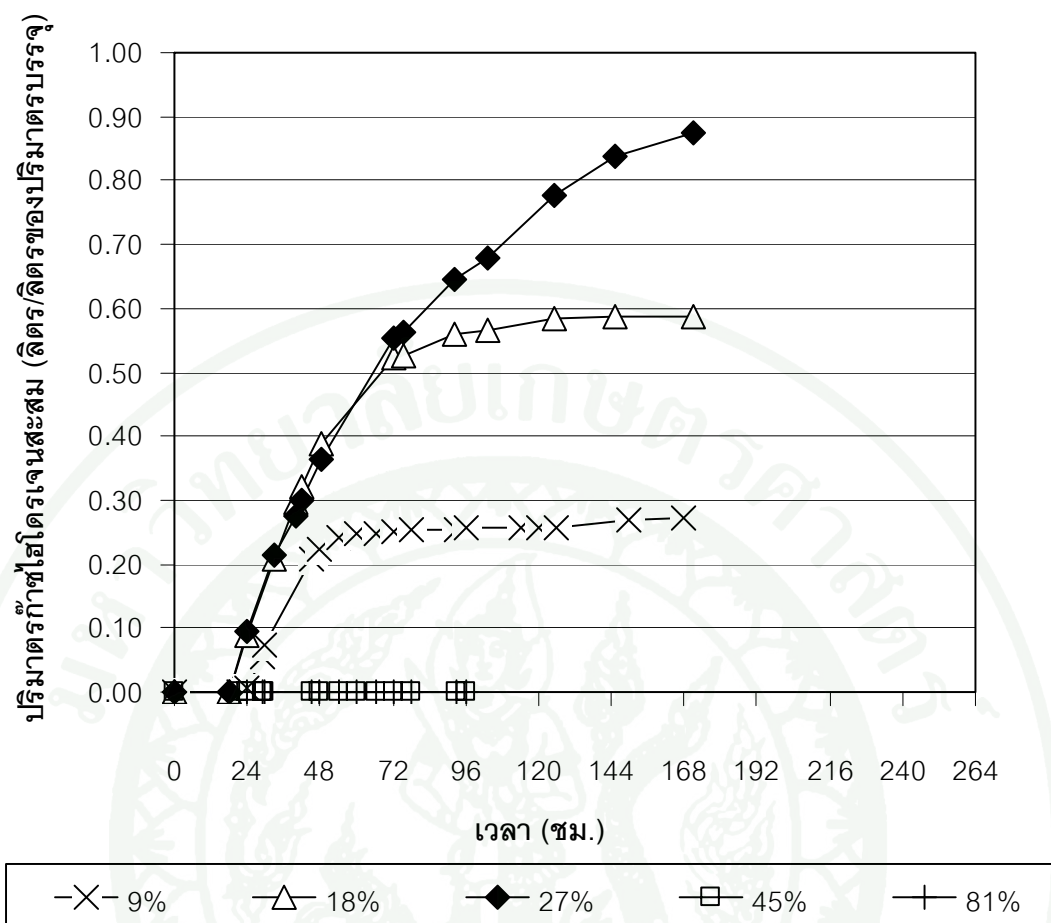
เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียจากปริมาณโปรตีนสุดท้าย (ตารางที่ 16) มีค่ามากกว่าปริมาณโปรตีนเริ่มต้นอย่างชัดเจน แสดงว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีในน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 2 ในทุกความเข้มข้น (9-81%)

ตารางที่ 15 คุณสมบัติของน้ำทิ้งแป้งมันเก็บครั้งที่ 2 (วันที่ 2 เมษายน 2551)

รายการทดสอบ	ผลทดสอบ	หน่วย	วิธีทดสอบอ้างอิง
Ammonia Nitrogen (SC)*	25.20, 1.48	mg/L,mM	APHA, AWWA1998
Total Dissolved Solids*	14,362.00	mg/L	APHA, AWWA1998
Total Suspended Solids*	2,150.0	mg/L	APHA, AWWA1998
Total Solids*	16,513.00	mg/L	APHA, AWWA1998
BOD*	12,080.00	mg/L	APHA, AWWA1998
COD	16,561.15	mg/L	ตรวจสอบเองใน ห้องปฏิบัติการ
Reducing Sugar	9,870.97	mg/L	
Starch	nd	mg/L	
Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)*	401.10	mg/L	APHA, AWWA1998
Total Organic Carbon (TOC)*	8,200.00	mg/L	In house method based on AWWA21
Calcium* (Ca)	47.90	mg/L	In house Method base on APHA-AWWA2005
Magnesium*(Mg)	62.99	mg/L	
Iron*(Fe)	0.36	mg/L	
Molybdenum* (Mo)	0.02	mg/L	
Lead*(Pb)	<0.0050	mg/L	
EDTA (Na ₂ CaEDTA)	Not detected	mg/kg	In house method (TE-CH- 021) based on 1. Anal. Chem. 56(1984)p 315-317 2. Bull. Dept. Med. Sci; 36(4) Oct-Dec 1994
pH	5.67	-	ตรวจสอบเองใน ห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ *ส่งตรวจห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร; LCFA

สำนักงานใหญ่และสาขากรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



ภาพที่ 13 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน
 ที่เก็บครั้งที่ 2 ในปริมาณการทดลอง 60 มล. เจือจางน้ำทิ้งด้วยอาหารเหลว
 Ormerod's minimal-glutamate ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 9 18 27 45 และ 81
 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พีเอชเริ่มต้น 6.8 บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง ที่
 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน

ตารางที่ 16 ผลสรุปพารามิเตอร์ต่างๆ จากการทดลองผลิตไฮโดรเจนเมื่อนำน้ำทิ้งแป้งมันที่เก็บครั้งที่ 2 ความเข้มข้นต่างๆ เจือจางด้วยอาหารเหลว ปริมาตร 60 มล.

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	9%	18%	27%	45%	81%
เจือจางน้ำทิ้งด้วย	Ormerod's-minimal-glutamate medium				
ความเข้มแสง: light intensity (ลักซ์)	700				
เวลาเริ่มการผลิตไฮโดรเจน: lag time, t_{lag} (ชม.)	24	24	24	-	-
อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด; Max. H_2 evolution rate (มล./ลิตร/ชม.)	8.83 (30-45 ชม.)	11.77 (24-48 ชม.)	10.84 (24-48 ชม.)	-	-
ปริมาตรไฮโดรเจนทั้งหมด; V_{H_2} (มล.)	16.3	35.2	52.4		
ระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจน; Δt_{H_2} (ชม.)	>144	139	>168	-	-
พีเอชอาหารเริ่มต้นหลัง autoclave; pH_i	6.75	6.61	6.56	6.54	6.48
พีเอชสุดท้าย; pH_f	7.32	6.70	6.74	5.72	5.44
เวลาบ่ม; incubation time (ชม.)	168	125	168	168	168
ชีโอดีของอาหารเริ่มต้นทั้งหมด; COD_i (มก./ลิตร)	2,244.61	3,833.86	5,718.02	9,256.96	15,990.78
ชีโอดีสุดท้ายของส่วนใส; COD_{fs} (มก./ลิตร)	1,059.80	1,450.53	3,114.27	4,370.11	9,063.66

ตารางที่ 16 (ต่อ)

เปอร์เซ็นต์/ค่าที่วัด	9%	18%	27%	45%	81%
ประสิทธิภาพการลดลงของค่าซีโอดีในน้ำทิ้ง (COD removal eff., %)*	61.36	59.74	52.68	49.22	49.29
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นทั้งหมด (มก./ลิตร)	772.22	1,633.33	2,388.89	3,703.70	6,268.52
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายเฉพาะส่วนใส (มก./ลิตร)	60.65	59.17	107.04	2,763.89	2,803.24
ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์: RS removal eff. (%)	92.15	96.38	95.52	25.37	55.28
ปริมาณแป้งเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	nd	nd	nd	nd	nd
ปริมาณแป้งสุดท้ายเฉพาะส่วนใส (กรัม/ลิตร)	nd	nd	nd	nd	nd
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น (มก./ลิตร)	85.59	140.00	250.48	452.50	803.57
ปริมาณโปรตีนสุดท้าย (มก./ลิตร)	486.61	665.48	784.52	1,207.14	1,644.05

หมายเหตุ *COD removal eff. (%) เปรียบเทียบระหว่างค่า COD เริ่มต้น (COD_i) กับค่า COD สุดท้ายของส่วนใส (COD_{fs})

nd= not detected (ตรวจไม่พบ)

การใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 ได้ปริมาณไฮโดรเจนมากในน้ำทิ้ง 9-18 เปอร์เซ็นต์ ที่วัดค่า COD ได้เท่ากับ 3,666-6,820 มก./ลิตร และเมื่อเพิ่มน้ำทิ้งเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ วัดค่า COD ได้เท่ากับ 7,009 มก./ลิตร แบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนและได้ปริมาณก๊าซสะสมน้อยลงมากกว่าหนึ่งเท่า ถึงแม้จะมีปริมาณสับสเตรดมากขึ้น อาจเป็นเพราะมีปริมาณสารอินทรีย์ที่แบคทีเรียไม่สามารถใช้ได้มากขึ้น โดยสังเกตจากค่า COD ซึ่งเป็นค่าแสดงถึงความสกปรกของน้ำทิ้ง เป็นปริมาณสารอินทรีย์ทั้งหมดในน้ำทิ้งที่จุลินทรีย์ย่อยสลายได้และที่ย่อยสลายไม่ได้ ซึ่งปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ย่อยสลายไม่ได้อาจยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน ดังเช่นในน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 ที่ 27 เปอร์เซ็นต์ มีค่า COD สูงถึง 7,009 มก./ลิตร ขณะที่เมื่อเก็บน้ำทิ้งครั้งที่ 2 มาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ได้ปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 52 มล. โดยใช้น้ำทิ้งความเข้มข้นสูงถึง 27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่า COD เพียง 5,718 มก./ลิตร แสดงให้เห็นว่าเมื่อค่า COD ในน้ำทิ้งที่เก็บมาเริ่มต้นมีค่าต่ำมีแนวโน้มจะผลิตไฮโดรเจนได้ดีเมื่อใช้น้ำทิ้งในปริมาณหรือความเข้มข้นที่สูง ดังจะเห็นได้จากค่า COD ของน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 มีค่าเท่ากับ 16,561 มก./ลิตร ต่ำกว่าค่า COD ของน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 ที่มีค่า COD เท่ากับ 26,375 มก./ลิตร ทำให้เมื่อใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ให้ปริมาณไฮโดรเจนที่มากเมื่อใช้น้ำทิ้งความเข้มข้นสูงถึง 27 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ นั่นคือ ค่า BOD ในน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 มีค่ามากกว่า ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ในการเจริญได้ดีกว่า อีกทั้งในน้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นแหล่งสับสเตรดมากแต่ไม่มีแป้ง แตกต่างจากน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 ที่มีแป้งเป็นแหล่งสับสเตรดมากกว่า ซึ่งแบคทีเรียใช้ได้ยากกว่า และสับสเตรดที่เป็นแป้งยังส่งผลต่อค่าพีเอชที่ต่ำลงในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย สังเกตจากค่าพีเอชสุดท้ายเมื่อใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 มีค่าต่ำกว่าใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 เกือบทุกความเข้มข้นน้ำทิ้ง (ตารางที่ 14, 16)

ดังนั้นตัวอย่างน้ำทิ้งแป้งมันที่มีค่า COD ต่ำ และมีค่า BOD สูง รวมถึงมีแหล่งสับสเตรดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียใช้ได้ง่ายในปริมาณมาก และมีแป้งน้อย มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณไฮโดรเจนมาก ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองที่เมื่อใช้น้ำทิ้งที่เก็บครั้งที่ 2 สามารถใช้น้ำทิ้งความเข้มข้นที่มีค่า COD เท่ากับ 5,718 มก./ลิตร คือความเข้มข้นของน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 2,388 มก./ลิตร ทำให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุด เมื่อคิดประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อผลิตไฮโดรเจนได้เป็น 0.43 มล./มก. ของน้ำตาลรีดิวซ์

นอกจากปริมาณสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งจะมีอิทธิพลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแล้ว ยังมีปัจจัยร่วมอื่นอีกที่มีผลต่อความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรีย เช่น ค่า total suspended solids (TSS) คือ ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำและแขวนลอยอยู่ในสารละลายของน้ำทิ้ง โดยค่า TSS ในน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 น้อยกว่าเก็บครั้งที่ 1 เกือบ 5 เท่า ซึ่งไปมีผลต่อการบดบังแสงได้น้อยกว่า จึงทำให้แบคทีเรียเจริญ และย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ได้มากกว่า ดังแสดงจากประสิทธิภาพการลดลงของค่า COD และน้ำตาลรีดิวซ์ของการใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ที่มากกว่าการใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 ในทุกความเข้มข้นของน้ำทิ้ง (ตารางที่ 14, 16) นอกจากนี้ในน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ยังมีปริมาณโลหะหนักอยู่น้อยกว่าด้วย ซึ่งทำให้ความเป็นพิษของน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 น้อยกว่า จึงทำให้ *R. gelatinosus* SB24 ใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ได้ความเข้มข้นได้สูงกว่า

ในการทดลองครั้งนี้ที่น่าสนใจ คือ เมื่อบ่มเซลล์ในน้ำทิ้งความเข้มข้น 9-27 เปอร์เซ็นต์ เพื่อผลิตไฮโดรเจนแล้ว การลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำทิ้งมีประสิทธิภาพสูงถึง 92- 96 เปอร์เซ็นต์ และประสิทธิภาพการลดลงของ COD ในน้ำทิ้งทุกความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 49 เปอร์เซ็นต์ โดยประสิทธิภาพการลดลงของค่า COD และน้ำตาลรีดิวซ์ของการใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 มากกว่าการใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 1 ในทุกความเข้มข้นของน้ำทิ้ง (ตารางที่ 14,16)

สรุปว่าการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้น้ำทิ้งแป้งมันเป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์ความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 18-27 เปอร์เซ็นต์ คือมีค่า COD อยู่ในช่วง 5,718-6,819 มก./ลิตร โดยแบคทีเรียจะผลิตได้ดีในน้ำทิ้งความเข้มข้นใดให้พิจารณาจากค่า COD BOD TSS น้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแป้งของตัวอย่างน้ำทิ้งที่เก็บมา นอกจากนี้ต้องคำนึงถึงปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยไม่ควรมีค่าสูงเกินไปกว่าปกติ เนื่องจากสารอินทรีย์ไนโตรเจนสามารถเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียมมีผลยับยั้งเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมคือ ถ้าน้ำทิ้งมีการปนเปื้อนของแป้งสูงอาจต้องมีการควบคุมฟิโอสไม่ให้ต่ำกว่า 7 ตลอดการผลิต

4. การผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร โดยใช้น้ำทิ้งจากการสกัด แป้งมันสำปะหลัง

4.1 การใช้น้ำทิ้งที่มีตะกอน

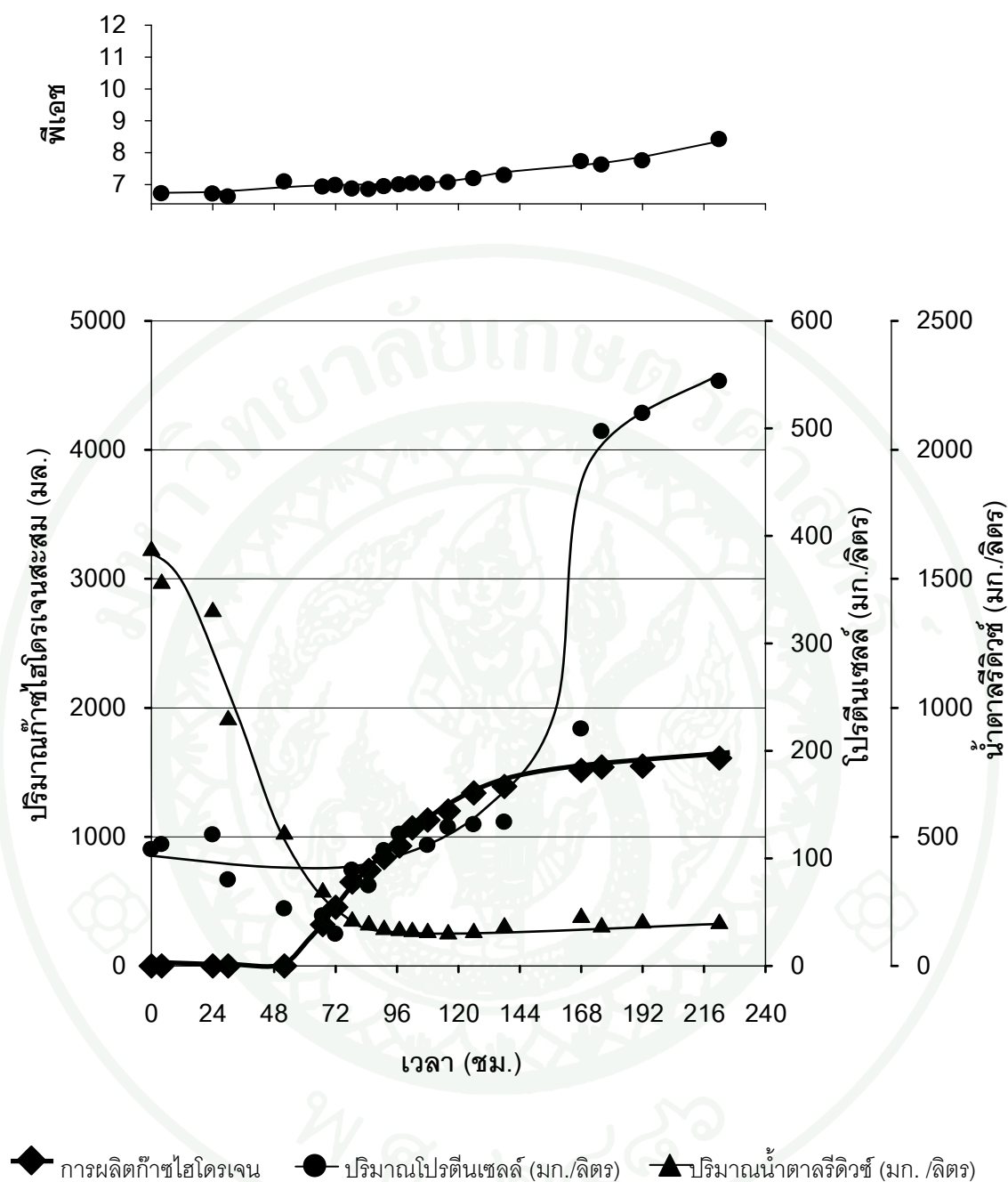
การทดลองขยายขนาดนี้ใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 จากการทดลองขึ้นต้น ความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่นำมาขยายการผลิตไฮโดรเจน คือ 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางใน Ormerod's minimal-glutamate medium ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ก่อนนำไป autoclave ในการทดลองนี้ใช้ถังผลิตไฮโดรเจน และระบบควบคุมอุณหภูมิที่ออกแบบเอง ขนาด 6 ลิตร ขอจดสิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่ 0801002594 เมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 และเลขที่ 1001000317 วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2553 ใส่สารละลายน้ำทิ้งและเชื้อเริ่มต้นรวม 5.7 ลิตร ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 21.7 มก./โปรตีน/มล. และบ่มเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ได้ผลการทดลองดังนี้

เมื่อใช้น้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ ทดลองในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร (ภาพที่ 14, ตารางที่ 17) ได้ผลการทดลองดังนี้ แบคทีเรียใช้เวลามากกว่าจะเริ่มผลิตก๊าซคือใช้เวลา 53 ชม. และผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้นานถึงชั่วโมงที่ 168 หรือ 7 วัน จึงหยุดผลิตไฮโดรเจน ได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 1,516 มล. และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 67-108 เท่ากับ 3.36 มล./ลิตร/ชม. ภายหลังจากชั่วโมงที่ 108 อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง

อนึ่งค่าโปรตีนที่วัดได้ในแต่ละวันมีบางค่าไม่ใช่ค่าแท้จริงของเซลล์ทั้งหมดในถัง เนื่องจากแบคทีเรียเกาะติดข้างถังชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเพราะอาหารที่ผสมน้ำทิ้งมีความชุ่มและมีส่วนของเส้นใย (fibre) ที่ไม่ใช่แป้ง เมื่อแบคทีเรียเจริญมากขึ้นก็ต้องการแสงมากขึ้น จึงมาเกาะที่ข้างถังเพื่อรับแสง และหลังจากที่แบคทีเรียเริ่มผลิตก๊าซชั่วโมงที่ 53 เซลล์จะเริ่มหลุดออกจากข้างถัง และสารละลายเซลล์เป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น ดังนั้นค่าโปรตีนที่วัดได้ในชั่วโมงที่ 24-53 ไม่ใช่ค่าแท้จริงของเซลล์ทั้งหมดในถัง แต่ชั่วโมงสุดท้ายของการผลิตที่ชั่วโมงที่ 168 สารละลายเซลล์เป็นเนื้อเดียวกันได้ค่าโปรตีนเซลล์เชื่อถือได้ มีปริมาณโปรตีนเซลล์เท่ากับ 220 มก./ลิตร คำนวณประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 1.21 มิลลิลิตรของไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมเซลล์โปรตีน (มล./มก. ของโปรตีนเซลล์) นอกจากนั้นค่าพีเอชตลอดการผลิตอยู่ในช่วง 6.7-8.4

เมื่อพิจารณาอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลาที่ 24-67 ซึ่ง
เป็นช่วงที่เจริญและเริ่มสร้างก๊าซ แบคทีเรียใช้น้ำตาลในอัตราสูงสุดคือ เท่ากับ 23.4 มก./ลิตร/ชม.
เมื่อสิ้นสุดช่วงเวลาที่ 120 แบคทีเรียใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไป 92 เปอร์เซ็นต์ แต่ลดความสกปรกในน้ำทิ้งไป
ได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์





ภาพที่ 14 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน
18 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-
glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร
เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์
อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

ตารางที่ 17 ผลสรุปของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแบ่งมันเก็บครั้งที่ 2 ความเข้มข้น 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยอาหารเหลว ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	18%	27%
เจือจางน้ำทิ้งด้วย	Ormerod's minimal-glutamate medium	
ความเข้มแสง; light intensity (ลักซ์)	2,000	2,000
เวลาเริ่มการผลิตไฮโดรเจน; t_{lag} (ชม.)	53	30
อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด; Max. H_2 evolution rate (มล./ลิตร/ชม.)	3.36 (67-108 ชม.)	5.27 (30-54 ชม.)
ปริมาตรไฮโดรเจนทั้งหมด; V_{H_2} (มล.)	1,271.00 (ชั่วโมงที่ 120)	917.00 (ชั่วโมงที่ 120)
	1,516.00 (ชั่วโมงที่ 168)	-
เวลาที่ใช้ก๊าซได้ทั้งหมด; incubation time (ชม.)	222	120
ระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจน; Δt_{H_2} (ชม.)	115	44
ปริมาณโปรตีนเซลล์ในชั่วโมงที่หยุดผลิต (มก./ลิตร)	220.20 (ชั่วโมงที่ 168)	308.30 (ชั่วโมงที่ 74)
กิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน (มล./มก. ของโปรตีนเซลล์)*	1.21	0.52
ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้าย; X_{max} (กรัม/ลิตร)	1.19	1.79
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นทั้งหมด (มก./ลิตร)	1,609.09	2,117.17
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายเฉพาะส่วนใส (มก./ลิตร) ที่ชั่วโมงที่ 120	126.14	212.32
ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ (RS removal efficiency, %)	92.16	89.97
อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./ลิตร/ชม.)	23.42 (24-67 ชม.)	39.32 (18-48 ชม.) 11.45 (48-74 ชม.)

ตารางที่ 17 (ต่อ)

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	18%	27%
พีเอชอาหารเริ่มต้นหลัง autoclave; pH_i	6.71	6.55
พีเอชสุดท้าย; pH_f	8.41	6.42
ซีโอดีของอาหารเริ่มต้นทั้งหมด; COD_i (มก./ลิตร)	3,964.90	5,627.00
ซีโอดีสุดท้ายของส่วนใส; COD_{fs} (มก./ลิตร)	2,705.60	2,740.35
ประสิทธิภาพการลดลงของค่าซีโอดีในน้ำทิ้ง (COD removal efficiency, %)**	31.80	51.30

หมายเหตุ * กิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนคำนวณที่ชั่วโมงที่หยุดผลิตก๊าซ

**COD removal efficiency (%) เปรียบเทียบระหว่างค่า COD เริ่มต้น (COD_i) กับค่า COD สุดท้ายของส่วนใส (COD_{fs})

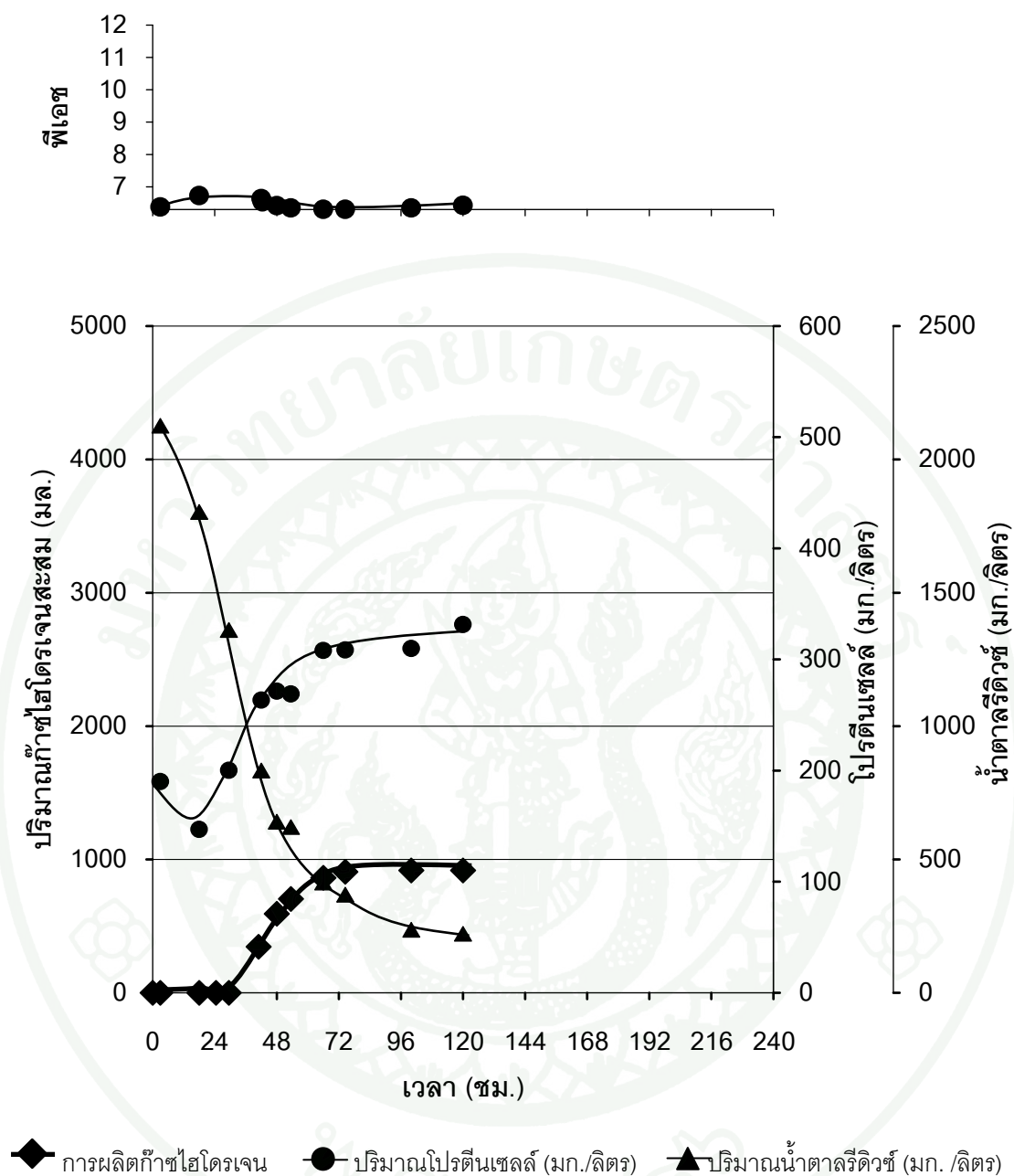
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำทิ้งเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ ทดลองในถังปฏิกิริยาบรรจุ 5.7 ลิตร ระบบเดียวกัน (ตารางที่ 17, ภาพที่ 15) ได้ผลการทดลองดังนี้ แบคทีเรียเริ่มผลิตก๊าซเร็วขึ้น คือเริ่มตรวจวัดก๊าซได้ในชั่วโมงที่ 30 แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนเพียง 24 ชม. คือในช่วงชั่วโมงที่ 30-54 และหยุดผลิตในชั่วโมงที่ 74 ได้ไฮโดรเจนสะสมเพียง 917 มล. แต่ข้อดีของการใช้น้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ คือพบว่าอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 5.3 มล./ลิตร/ชม.

เนื่องจากเซลล์เกาะติดข้างถังตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ค่าโปรตีนที่วัดได้ไม่ใช่ค่าแท้จริงของเซลล์ทั้งหมดเช่นกัน การเกาะติดข้างถังนี้เช่นเดียวกับที่ใช้น้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อแบคทีเรียเริ่มผลิตก๊าซไประยะหนึ่ง แบคทีเรียที่เกาะอยู่ข้างถังจะหลุดออกแล้วทำให้เซลล์ชั้นบนเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น และชั่วโมงสุดท้ายของการผลิตที่ชั่วโมงที่ 74 สารละลายเซลล์เป็นเนื้อเดียวกันได้ ค่าโปรตีนเซลล์เชื้อถือได้ มีปริมาณโปรตีนเซลล์เท่ากับ 308.3 มก./ลิตร ค่าความประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.52 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์

เมื่อพิจารณาอัตราสูงสุดในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเกิดในชั่วโมงที่ 18-48 มีอัตราเท่ากับ 39.3 มก./ลิตร/ชม. ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วง exponential

phase และช่วงการเริ่มผลิตก๊าซชั่วโมงที่ 30-48 ที่ชั่วโมงที่ 48 น้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือสำหรับเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนเพียง 632 มก./ลิตร นั่นคือแบคทีเรียใช้น้ำตาลไปแล้ว 70 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48-72 อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเป็น 11.4 มก./ลิตร/ชม. ซึ่งจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่น้อยกับอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเป็น 11.4 มก./ลิตร/ชม. ส่งผลให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในช่วงนี้ลดลงด้วย หลังจากชั่วโมงที่ 74 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนน้อยมาก น้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือเพียง 359 มก./ลิตร นั่นคือ ปริมาณแหล่งให้อิเล็กตรอนไม่เพียงพอต่อการผลิตก๊าซแล้ว ที่ชั่วโมงที่ 120 ได้ก๊าซไฮโดรเจนทั้งหมด 917 มล. น้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 212 มก./ลิตร แบคทีเรียใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในระบบไป 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาการลดลงของความสกปรกในน้ำทิ้ง (COD) พบว่าระบบนี้มีประสิทธิภาพลดความสกปรกได้ถึง 51 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17) ค่าพีเอชตลอดการผลิตอยู่ในช่วง 6.3-6.7

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้ง 18 กับ 27 เปอร์เซ็นต์ ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร พบว่าเมื่อใช้น้ำทิ้ง 2 เปอร์เซ็นต์ ไม่ให้ความแตกต่างในการผลิตในการผลิตไฮโดรเจน แม้ว่า 27 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการผลิตสูงกว่า และเริ่มผลิตเร็วกว่า แต่เวลาที่แบคทีเรียผลิตสั้นกว่า อย่างไรก็ตามปริมาณก๊าซสะสมไม่ต่างกันชัดเจนนัก ถ้าเปรียบเทียบที่ชั่วโมงที่ 120 ในน้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 1,200 มล. และน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 917 มล. เมื่อพิจารณาอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าแบคทีเรียใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตรา 39 มก./ลิตร/ชม. ซึ่งเป็นอัตราที่สูงกว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพียง 23 มก./ลิตร/ชม. เมื่อพิจารณาค่าปริมาณโปรตีนเซลล์ในช่วงที่หยุดผลิตไฮโดรเจน พบว่าในน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโปรตีนเซลล์สุดท้ายมากกว่าในน้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าในน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ในกระบวนการเจริญมากกว่าใช้เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ทำให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนเพียง 917 มล. เมื่อคำนวณกิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนได้เพียง 0.52 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนในน้ำทิ้ง 18 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าเท่ากับ 1.21 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์



ภาพที่ 15 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน 27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เมื่อเทียบกับงานวิจัยเดิมที่ใช้แ่งมันสำปะหลังสุก 10 กรัม/ลิตร ที่เวลาเดียวกันคือ 120 ชม. ได้ก๊าซไฮโดรเจนถึง 5,000 มล. และเมื่อใช้แ่งสุกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนยังคงต่อเนื่องไปถึง 204 ชม. ซึ่งได้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมถึง 10,000 มล. ซึ่งมากกว่าการใช้น้ำทิ้ง 10 เท่า ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากแหล่งให้อิเล็กตรอนเริ่มต้นในน้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 นี้ มาจากน้ำตาลรีดิวซ์ ไม่ได้มาจากแ่ง โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนนี้น้อยกว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียสามารถย่อยได้จากแ่ง 10 กรัม/ลิตร (รายงานโครงการวิจัยรหัส วท.(ด)6/50) ผลจากการวิเคราะห์แ่งมันสำปะหลัง 1 กรัม เมื่อผ่านการย่อยด้วยกรดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 975 มก. ดังนั้นถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยแ่ง 10 กรัม/ลิตร ได้สมบูรณ์จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 9,750 มก./ลิตร ซึ่งมากกว่าในน้ำทิ้ง 18-27 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 1,609-2,117 มก./ลิตร

นอกจากนี้การเจริญของแบคทีเรียที่มากในน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ทำให้จำนวนของแบคทีเรียมีปริมาณมาก และมีเซลล์เกาะข้างถังมากขึ้นเพื่อรับแสง ทำให้แสงส่องผ่านเข้าไปในถังผลิตไฮโดรเจนยิ่งน้อยลง (Fascedii and Todini, 1995) ถ้าแบคทีเรียได้รับแสงไม่เพียงพอ ทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณน้อยลง เพราะแสงซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Hillmer and Gest, 1977; Yoch, 1978; Kim *et al.*, 1980; Uyar *et al.*, 2007; Kars and Gunduz, 2010) นี่อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ในน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณไฮโดรเจนน้อยในถัง reactor ขนาด 6 ลิตร ดังนั้นปัจจัยสำคัญหนึ่งสำหรับการใช้น้ำทิ้งในการผลิตไฮโดรเจน คือความเข้มแสง จึงทำการทดลองเพิ่มความเข้มแสงจาก 2,000 ลักซ์ ไปเป็น 3,000 ลักซ์

4.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อนำน้ำทิ้งแป้งมัน ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร

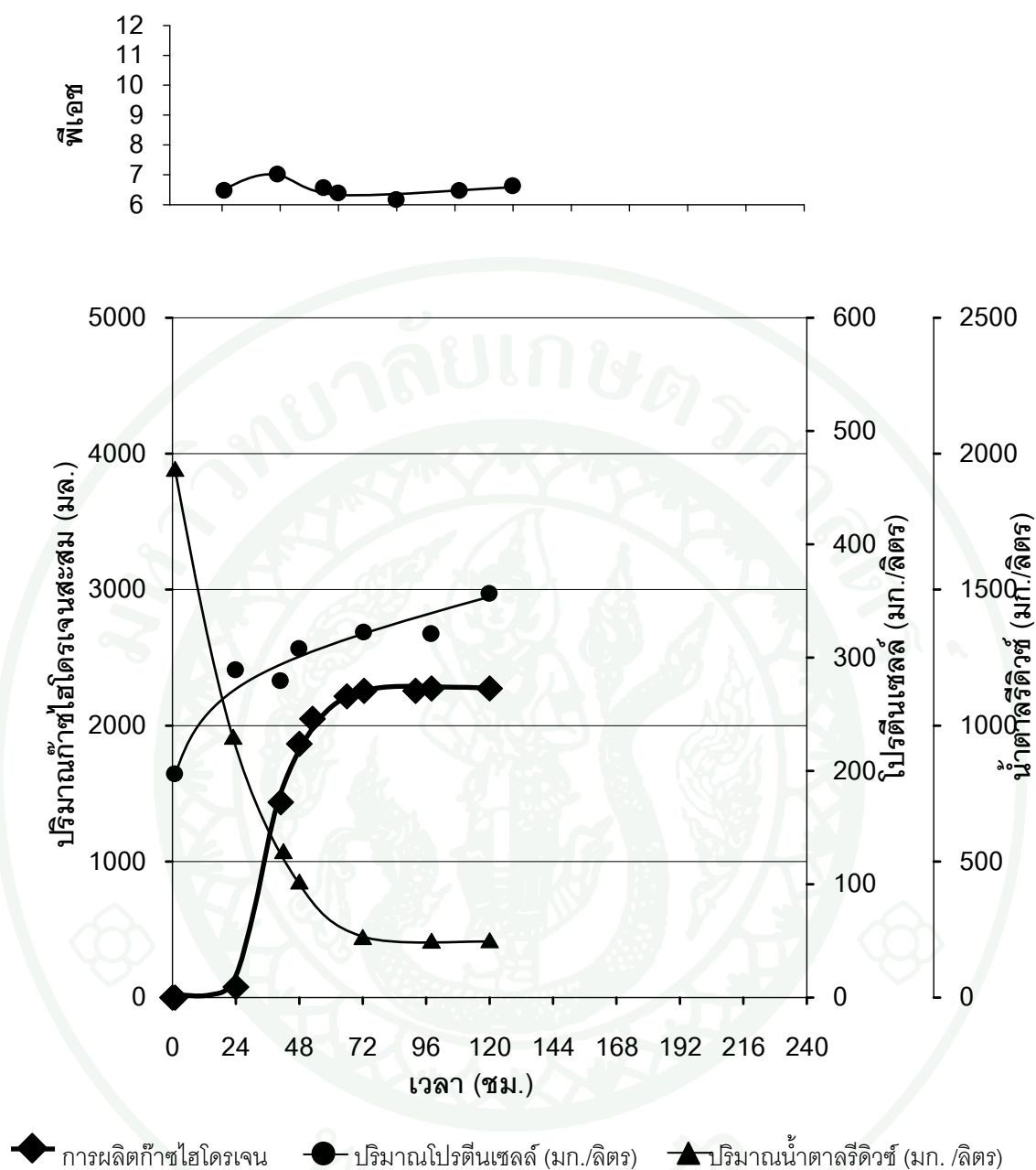
การศึกษาอิทธิพลของความเข้มแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน เมื่อนำน้ำทิ้งแป้งมัน ด้วยการใช้ความเข้มแสงที่สูงขึ้นข้อควรระวังหนึ่ง คือจะเกิดความร้อนมากขึ้น จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 40 องศาเซลเซียส ด้วยระบบควบคุมอุณหภูมิและถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร ซึ่งออกแบบโดย รศ.ดร.เลอลักษณ์ จิตรดอน และคณะ (เลขที่คำขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์ 0801002594 เมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2553, สิทธิบัตรที่ 2) การใช้ถังหมักและระบบควบคุมอุณหภูมิเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในการทดลองนี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ที่ต้องการเพิ่มอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับรายงานของ Eroglu *et al.* (2008) ที่กล่าวว่า ความแตกต่างของรูปทรงถังหมักและขนาด มีผลให้มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรแตกต่างกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการรับพลังงานแสงของแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสงแตกต่างกันด้วย และส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียกลุ่มนี้

จากผลการทดลองข้างต้นในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 60 มล. พบว่าเมื่อนำน้ำทิ้งแป้งมันเก็บครั้งที่ 2 ความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนมาก และให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมสูงที่สุด อีกทั้งผลการทดลองในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร พบว่าเมื่อนำน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงเช่นกัน แต่ยังผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณน้อย สมมติฐานว่าอาจเกิดจากแบคทีเรียเจริญมากขึ้นในถังหมัก ส่งผลให้แบคทีเรียได้รับแสงไม่เพียงพอสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นถ้าต้องการใช้น้ำทิ้งความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ และได้ปริมาณไฮโดรเจนสูงขึ้นอาจทำได้โดยการเพิ่มความเข้มแสง การทดลองนี้จึงใช้น้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย *R. gelatinosus* SB24 เพาะเลี้ยงเชื้อในที่มืด ความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 3,000 ลักซ์ จากเดิม 2,000 ลักซ์ ผลการทดลองนี้คือ เมื่อใช้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ แบคทีเรียเริ่มผลิตไฮโดรเจนเร็วขึ้น 7 ชม. คือ เริ่มที่ชั่วโมงที่ 23 (ภาพที่ 16) ได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมทั้งหมดเท่ากับ 2,273 มล. และอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 14.0 มล./ลิตร/ชม. ในชั่วโมงที่ 24-48 (ตารางที่ 18) ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และการลดลงของค่า COD มีค่าเท่ากับ 90 และ 56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ฟิเอชสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 6.6

เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 3,000 ลักซ์ ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เร็วขึ้น 7 ชม. อัตราการผลิตก๊าซสูงขึ้น 2.5

เท่า คือมีอัตราเป็น 14.0 มล./ลิตร/ชม. จาก 5.3 มล./ลิตร/ชม. และได้ปริมาณไฮโดรเจนทั้งหมดมากขึ้น 2.4 เท่า ถ้าคิดเฉพาะช่วงการผลิตที่ดีที่สุด แบคทีเรียผลิตก๊าซในเวลาเพียง 48 ชม. หรือ 2 วัน ได้ก๊าซ 1,866 มล. และในชั่วโมงที่ 72 หรือ 3 วัน ได้ไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นเป็น 2,255 มล. ในขณะที่ถ้าใช้แสง 2,000 ลักซ์ ช่วงเวลาการผลิตที่ดีที่สุดคือ 60-72 ชม. หรือ 3 วัน และได้ก๊าซต่ำกว่า 1,000 มล. และที่ 120 ชม. ได้ก๊าซสะสมเพียง 917 มล. ส่วนประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า COD มีค่าใกล้เคียงกัน นั่นคือประสิทธิภาพการใช้สารอาหารใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณากิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนที่ชั่วโมงสุดท้ายเมื่อใช้แสงความเข้มสูง 3,000 ลักซ์ เซลล์มีกิจกรรมสูงเท่ากับ 1.23 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์ ซึ่งสูงกว่า เมื่อใช้แสงที่ความเข้มน้อย 2,000 ลักซ์ ซึ่งเท่ากับ 0.52 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์ จึงสรุปได้ว่า เมื่อความเข้มแสงสูงขึ้น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ให้มีกิจกรรมในการผลิตไฮโดรเจน เมื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณไฮโดรเจนที่ได้ต่อปริมาตรบรรจุ พบว่าเมื่อใช้แสง 2,000 และ 3,000 ลักซ์ ในถังหมักให้ค่าเท่ากับ 0.16 และ 0.39 ลิตร/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่าที่ได้เมื่อทดลองในขนาด 60 มล. ที่ได้ปริมาณไฮโดรเจนสูงถึง 0.87 ลิตร/ลิตร แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงที่แบคทีเรียได้รับจากถังหมัก 6 ลิตร ยังน้อยกว่าในหลอดแก้ว 60 มล. ถึงแม้จะใช้ความเข้มแสงที่สูงขึ้นเป็น 3,000 ลักซ์ ทั้งนี้ เพราะความสามารถในการส่องผ่านแสงเข้าไปด้านใน reactor และหลอดแตกต่างกัน ความหนาของผนัง reactor ที่หนากว่า 1 ซม. ซึ่งหนากว่าหลอดแก้วมาก และวัสดุที่ใช้ทำ reactor เป็น acrylic ก็ทำให้แบคทีเรียได้รับพลังงานแสงใน reactor แตกต่างไปจากแก้ว Hillmer and Gest (1997) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มแสงในการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรีย *Rhodospseudomonas capsulata* ทำให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงขึ้น และเมื่อความเข้มแสงมากกว่า 6,500 ลักซ์ แบคทีเรียมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคงที่ เช่นเดียวกับรายงานของ Fascetti and Todini (1995) พบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Rhodobacter sphaeroides* RV สูงขึ้น ที่ความเข้มแสงสูงขึ้นเช่นกัน และเมื่อความเข้มแสงสูงกว่า 10,000 ลักซ์ แบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนคงที่ ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงสอดคล้องกับงานของ Fascetti and Todini (1995); Hillmer and Gest (1997) แต่ในการทดลองนี้ถ้าเพิ่มความเข้มแสงเกิน 3,000 ลักซ์ จะทำให้ระบบเกิดความร้อน ยากในการควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรีย อาจต้องเพิ่มระบบหล่อเย็น ดังนั้นการเพิ่มความเข้มแสงเท่ากับเป็นการเพิ่มพลังงานแสงและพลังงานไฟฟ้าของระบบหล่อเย็นเข้าในระบบ ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตขึ้น อาจต้องคำนวณอย่างละเอียดว่าผลผลิตที่ได้คุ้มกับต้นทุนที่ลงไปหรือไม่ ดังนั้นจึงพยายามที่จะหาวิธีอื่นที่ทำให้ผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นโดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มแสงในขั้นต่อไป

อย่างไรก็ตาม ในน้ำทิ้งมีตะกอน ซึ่งเป็นส่วนของเส้นใย (fibre) ที่ไม่ใช่แป้ง ทำให้น้ำทิ้งมีความขุ่น ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าน้ำทิ้งแป้งมันมีปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำเท่ากับ 2.15 กรัม/ลิตร การมีของแข็งแขวนลอยอยู่สูงจะไปมีผลต่อการบดบังแสง จากการทดลองข้างต้นพบว่าแสงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการผลิตไฮโดรเจนแบบใช้แสง ดังนั้นก็เป็นข้อจำกัดหนึ่งในการใช้น้ำทิ้งในการผลิตไฮโดรเจนควรมีปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำในปริมาณที่น้อย นอกจากนี้เมื่อแบคทีเรียเจริญมากขึ้น ก็ต้องการแสงมากขึ้น และถ้าแบคทีเรียใช้เส้นใยเหล่านั้นไม่ได้สักด้วย เซลล์ก็จะไปเกาะกับเส้นใย จับเป็นก้อนตกตะกอนหรือใช้เป็น supporter ช่วยให้เซลล์เกาะที่ข้างถังเพื่อรับแสงได้มากขึ้นเป็นลำดับ และเมื่อถึงระยะที่มีเซลล์เกาะเป็นแผ่นมากเกินไป ก็จะหลุดลอกออกมา และการมีเซลล์ตกตะกอนหรือเซลล์มากบังแสงกันและกันจะทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณน้อย ดังนั้น จึงเกิดความคิดที่จะกำจัดตะกอนที่มีอยู่ในน้ำทิ้งออกก่อนนำมาใส่ถังหมัก ซึ่งเป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งทางกายภาพซึ่งคาดว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งทางหนึ่ง โดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มแสงให้ระบบ เพราะการเพิ่มความเข้มแสงนั้นเท่ากับเป็นการเพิ่มพลังงานหรือต้นทุนการผลิตของระบบ รวมทั้งยังทำให้เกิดความรื้อนยากในการควบคุม มีรายงานการกำจัดความขุ่นของเส้นใยหรือของแข็งแขวนลอยในน้ำทิ้ง โดยวิธีการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน (Yigit *et al.*, 1999; Yetis *et al.*, 2000 และ Eroglu *et al.*, 2004) แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยาก และไม่เหมาะสม เนื่องจากเมมเบรน 0.45 ไมครอน ใช้กรองแบคทีเรียและมีราคาแพง อีกทั้งถ้าทำกับน้ำทิ้งจำนวนมากๆ จะใช้เวลานาน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้การตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ของแข็งตกตะกอนบ้างบางส่วน แล้วนำน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนมาผสมกับอาหาร Ormerod's-minimal-glutamate medium ใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนในลำดับต่อไป



ภาพที่ 16 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน 27 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 18 ผลสรุปของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแบ่งมันที่มี

ตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's-minimal-glutamate
เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่ใช้ความเข้มแสง 2,000 กับ 3,000 ลักซ์ ปริมาตร
บรรจุ 5.7 ลิตร

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	27%	27%
เจือจางน้ำทิ้งด้วย	Ormerod's minimal-glutamate medium	
ความเข้มแสง; light intensity (ลักซ์)	2,000	3,000
เวลาเริ่มการผลิตไฮโดรเจน; t_{lag} (ชม.)	30	23
อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด; Max. H_2 evolution rate (มล./ลิตร/ชม.)	5.27 (30-54 ชม.)	14.01 (24-48 ชม.)
ปริมาตรไฮโดรเจนทั้งหมด; V_{H_2} (มล.)	907.00	2,255.00
	(ชั่วโมงที่ 74)	(ชั่วโมงที่ 72)
	917.00	2,273.00
	(ชั่วโมงที่ 120)	(ชั่วโมงที่ 120)
เวลาที่ให้ก๊าซได้ทั้งหมด; incubation time (ชม.)	120	120
ระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจน; Δt_{H_2} (ชม.)	44	49
ปริมาณโปรตีนเซลล์ในชั่วโมงที่หยุดผลิต (มก./ลิตร)	308.30	321.90
	(ชั่วโมงที่ 74)	(ชั่วโมงที่ 72)
กิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน (มล./มก. ของโปรตีนเซลล์)*	0.52	1.23
ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้าย; X_{max} (กรัม/ลิตร)	1.79	-
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นทั้งหมด (มก./ลิตร)	2,117.17	1,935.35
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายเฉพาะส่วนใด (มก./ลิตร) ที่ชั่วโมงที่ 120	212.32	201.62
ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ (RS removal efficiency, %)	89.97	89.58
อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./ลิตร/ชม.)	39.32 (18-48 ชม.)	35.59 (1-41 ชม.)
	11.45 (48-74 ชม.)	

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	27%	27%
ความเข้มแสง; light intensity (ลักซ์)	2,000	3,000
พีเอชอาหารเริ่มต้นหลัง autoclave; pH _i	6.55	6.43
พีเอชสุดท้าย; pH _f	6.42	6.61
ซีไอดีของอาหารเริ่มต้นทั้งหมด; COD _i (มก./ลิตร)	5,627.00	5,627.00
ซีไอดีสุดท้ายของส่วนใส; COD _{f_s} (มก./ลิตร)	2,740.35	2,497.54
ประสิทธิภาพการลดลงของค่าซีไอดีในน้ำทิ้ง (COD removal efficiency, %)**	51.30	55.62

หมายเหตุ * กิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนคำนวณที่ชั่วโมงที่หยุดผลิตก๊าซ

**COD removal efficiency (%) เปรียบเทียบระหว่างค่า COD เริ่มต้น (COD_i) กับค่า COD สุดท้ายของส่วนใส (COD_{f_s})

4.3 การใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน

ได้ปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งทางกายภาพ โดยนำน้ำทิ้งมาตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 30 นาที และใช้เฉพาะส่วนใส หรือเรียกว่าน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน และเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ เจือจางน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal glutamate medium ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ นำมาใช้เป็นสับสเตรต บ่มในที่ที่มีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยไม่มีการเพิ่มความเข้มแสง พบว่าเมื่อใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนทำให้ลักษณะสับสเตรดใสกว่าเดิม ผลการทดลองพบว่าเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลานานถึง 64-84 ชม. แบคทีเรียเกาะติดข้างถังบ้างแต่น้อยกว่าการทดลองในข้อ 4.1 มาก ลักษณะเซลล์ซัสเพนชันในน้ำทิ้งไม่จับเป็นก้อนแต่เป็นเนื้อเดียวกันทั้งสองความเข้มข้น ทำให้แสงส่องผ่านได้มากขึ้น แบคทีเรียเจริญมากขึ้น และผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้น กับการทดลองที่ใช้น้ำทิ้งทั้งหมดที่มีตะกอนโดยตรง กล่าวคือ เมื่อใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน 18 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 17, ตารางที่ 19) แบคทีเรียเริ่มผลิตไฮโดรเจนเร็วขึ้น 10 ชม. คือ ตรวจวัดไฮโดรเจนได้ในชั่วโมงที่ 43 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเสร็จสิ้นในชั่วโมงที่ 84 ปริมาณไฮโดรเจน

สะสมสูงขึ้นเป็น 1,800 มล. จากเดิมเมื่อใช้น้ำทิ้งพร้อมตะกอนจะได้เพียง 1,500 มล. ใช้เวลานานถึง 168 ชม. (ภาพที่ 14) และอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 11.7 จาก 3.4 มล./ลิตร/ชม.

ส่วนเมื่อใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 18 และตารางที่ 19) แบคทีเรียเริ่มผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 30 เท่ากับเมื่อใช้น้ำทิ้งพร้อมตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 13.7 จาก 5.6 มล./ลิตร/ชม. และได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงขึ้น 4 เท่า คือได้ทั้งหมด 4,000 มล. จากเดิมที่ได้เพียง 900 มล.

เมื่อพิจารณาการเจริญ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงสุดท้าย เมื่อใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนทั้งสองความเข้มข้น คือ 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 0.69 และ 0.95 กรัม/ลิตร ตามลำดับ มีค่าต่ำกว่าที่ใช้น้ำทิ้งที่มีตะกอน ถึงแม้ความเข้มข้นของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งที่มีตะกอนจากตารางที่ 17 จะหักลบน้ำหนักตะกอนในน้ำทิ้งที่สันนิษฐานว่าแบคทีเรียไม่สามารถย่อยได้ออกแล้วก็ตาม โดยในน้ำทิ้งที่มีตะกอน 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.80 และ 1.21 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ก็ยังคงมากกว่าที่ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน นั่นเป็นเพราะเซลล์มีการเจริญในน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนทั้งสองความเข้มข้นได้น้อย โดยจะนำแหล่งพลังงานและแหล่งให้อิเล็กตรอนไปใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมากกว่า เมื่อคำนวณปริมาณไฮโดรเจนต่อเซลล์ในชั่วโมงสุดท้ายของน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 2.02 และ 2.69 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่มีตะกอน 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ได้เท่ากับ 1.21 และ 0.52 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์ ตามลำดับ และ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อตกตะกอนน้ำทิ้งแล้ว ทำให้สับสเตรดที่เซลล์รับแสงได้ความเข้มข้นประสิทธิภาพของแต่ละเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

อนึ่งการเอาตะกอนออกจากน้ำทิ้งก่อนนำมาใช้นี้ ไม่ได้มีผลต่อแหล่งสับสเตรดในน้ำทิ้ง เช่นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่า COD ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เปอร์เซ็นต์เดียวกันมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 17 และ 19 แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพเปลี่ยนไป คือสับสเตรดสีเข้ม เมื่อใช้ส่วนใสแสงส่องผ่านได้มากขึ้น ประมาณ 3 เท่า (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร) กล่าวได้ว่าการที่แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เกิดจากความสามารถของเซลล์ในการรับแสงได้มากขึ้นกระตุ้นให้มีการแตกตัวของอิเล็กตรอนมากขึ้น ทำให้มี reducing power และ ATP มากขึ้นสำหรับกลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่คะตะไลซ์โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส นั่นคือ กิจกรรมของเซลล์ในกระบวนการผลิต

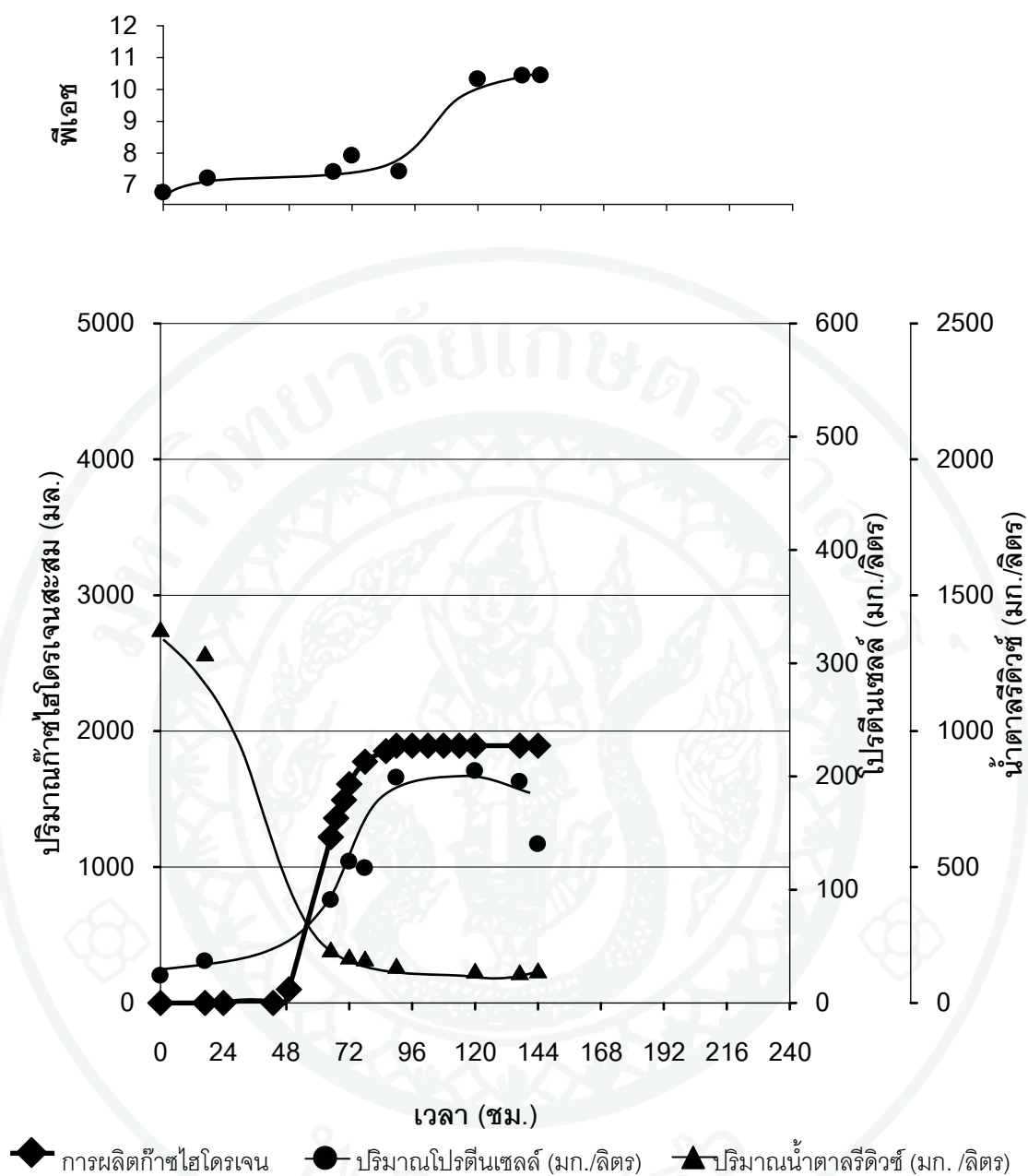
ไฮโดรเจนมีประสิทธิภาพดีขึ้นซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Koku *et al.* (2002); Kars and Gunduz (2010) ที่กล่าวว่าถึงแม้จะใช้แหล่งกำเนิดแสงความเข้มแสงเดียวกัน ถ้าแสงส่องผ่านไม่ดึระบบจะมีประสิทธิภาพการใช้แสงน้อยลง และจะเห็นได้ว่า

นอกจากนี้ยังมีข้อสังเกตอีกด้วยว่า แบคทีเรียนี้ใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอิเล็กทรอนิกส์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่า อาหารมาตรฐานที่มีกรดอินทรีย์ malic acid ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมสูงสุดได้เพียง 2,500 มล. ในอาหารมาตรฐาน ด้วยอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 8.0 มล./ลิตร/ชม. (มกค., 2547)

การทดลองต่อไปจึงจะใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนในความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 45 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่าเมื่อบ่ม นานถึง 96 ชม. ไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และในขณะที่ชั่วโมงที่ 69 ค่าพีเอชของสับสเตรดลดลงต่ำมากเหลือ 5.18 และเซลล์ที่สพบนในน้ำทิ้งเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งอาจเนื่องมาจากเซลล์ทนสภาวะเป็นกรดระดับนี้ไม่ได้และตายในที่สุด ดังนั้นการใช้น้ำทิ้ง 45 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่ได้ผลดี

จากผลการทดลองข้างต้น สรุปว่า ในการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งแ่งมันกับครั้งที่ 2 ด้วย *R. galatinosus* SB24 ให้ผลการผลิตไฮโดรเจนที่ดี เมื่อใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ บ่มภายใต้สภาวะมีแสงใช้ความเข้มแสงเพียง 2,000 ลักซ์ และให้ผลพลอยได้คือ สามารถลดความสกปรกในน้ำทิ้งได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์

ผลข้างต้นจึงสรุปข้อเสนอนะ ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งแ่งมันด้วย *R. galatinosus* SB24 ในถังบรรจุขนาด 6 ลิตร ดังนี้ 1) ให้นำน้ำทิ้งมาตกตะกอนเอาเฉพาะส่วนใสมาใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน 2) เจือจางน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในที่นี้คือ 27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 2,000 มก./ลิตร 3) ใช้ Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 เป็นสารละลายที่ใช้เจือจางน้ำทิ้ง และ 4) บ่มภายใต้ความเข้มแสงเพียง 2,000 ลักซ์ ก็ให้ผลการผลิตไฮโดรเจนที่ดี



ภาพที่ 17 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมัน

ที่ไม่มีตะกอน 18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

ตารางที่ 19 ผลสรุปของพารามิเตอร์ต่างๆ จากการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแ่งมัน
ที่ไม่มีตะกอน 18 และ 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's-
minimal-glutamate เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง
2,000 ลักซ์ ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร

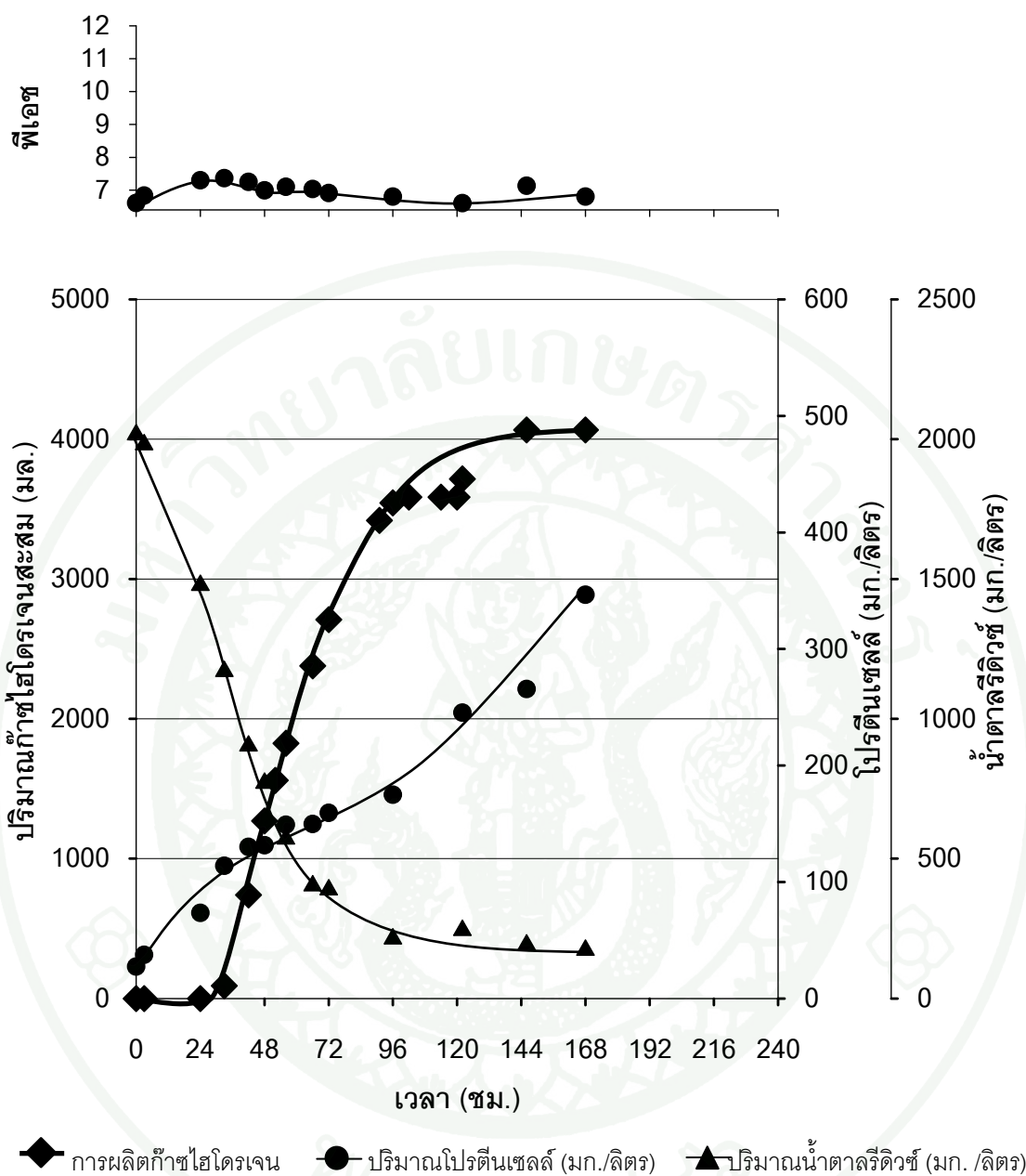
ความเข้มข้นของน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอน/ค่าที่วัด	18%	27%
เจือจางน้ำทิ้งด้วย	Ormerod's minimal-glutamate medium	
ความเข้มแสง; light intensity (ลักซ์)	2,000	2,000
ปริมาตรไฮโดรเจนทั้งหมด; V_{H_2} (มล.)	1,893.00	4,066.00
อัตราการผลิตไฮโดรเจน; Max. H_2 evolution rate (มล./ลิตร/ชม.)	11.67 (49-72 ชม.)	13.71 (33-52 ชม.)
เวลาเริ่มการผลิตไฮโดรเจน; t_{lag} (ชม.)	43	30
เวลาที่ให้ก๊าซได้ทั้งหมด; incubation time (ชม.)	144	168
ระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจน; Δt_{H_2} (ชม.)	41	116
ปริมาณโปรตีนเซลล์ในชั่วโมงที่หยุดผลิต (มก./ลิตร)	158.80 (ชั่วโมงที่ 84)	265.50 (ชั่วโมงที่ 154)
กิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน (มล./มก. ของโปรตีนเซลล์)*	2.02	2.69
ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้าย; X_{max} (กรัม/ลิตร)	0.69	0.95
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นทั้งหมด (มก./ลิตร)	1,366.67	2,016.13
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายเฉพาะส่วนใส (มก./ลิตร) ที่ชั่วโมงที่ 120	111.00	173.12
ประสิทธิภาพการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ (RS removal efficiency., %)	91.87	91.60
อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (มก./ลิตร/ชม.)	22.69 (17-65 ชม.)	28.16 (24-56 ชม.)
พีเอชอาหารเริ่มต้นหลัง autoclave; pH_i	6.43	6.76
พีเอชสุดท้าย; pH_f	10.44	6.8

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ความเข้มข้นของน้ำทิ้ง/ค่าที่วัด	18%	27%
ซีโอดีของอาหารเริ่มต้นทั้งหมด; COD _i (มก./ลิตร)	3,711.62	4,928.00
ซีโอดีสุดท้ายของส่วนใส; COD _{fs} (มก./ลิตร)	1,838.46	2,005.60
ประสิทธิภาพการลดลงของค่าซีโอดีในน้ำทิ้ง (COD removal efficiency, %)**	50.74	59.30

หมายเหตุ * กิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนคำนวณที่ชั่วโมงที่หยุดผลิตก๊าซ

**COD removal efficiency (%) เปรียบเทียบระหว่างค่า COD เริ่มต้น (COD_i) กับค่า COD สุดท้ายของส่วนใส (COD_{fs})



ภาพที่ 18 การผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 จากน้ำทิ้งแป้งมันที่ไม่มีตะกอน 27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเจือจางด้วยอาหารเหลว Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ปริมาตร 5.7 ลิตร ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และมีแสงความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

5. การศึกษาปัจจัยสำคัญบางประการที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากข้างต้นพบว่าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำทั้งแทน malic acid ในการผลิตไฮโดรเจน ทำให้ต้นทุนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลง และการเจือจางน้ำทั้งด้วยอาหารเหลว Ormerod's ช่วยให้แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะแบคทีเรียต้องการสารอาหาร แร่ธาตุ หรือวิตามินบางชนิดเพิ่มขึ้น ผลจากการวิเคราะห์น้ำทั้งพบว่ามีธาตุและสารประกอบต่างๆ ปนเปื้อนมากมาย ซึ่งหลายชนิดอาจจำเป็นและส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน และการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าปริมาณธาตุและสารประกอบจำเป็นที่มีอยู่ในน้ำทั้งมีปริมาณเพียงพออยู่แล้วก็จะไม่จำเป็นต้องใส่เพิ่ม หรือใส่เพิ่มในปริมาณน้อย เท่ากับเป็นการลดต้นทุนการผลิตลงอีก การทดลองนี้จึงต้องการศึกษาว่า มีความจำเป็นที่จะต้องเติมสารอาหารหรือวิตามินจำเป็นใดลงไปในน้ำทั้งแบ่งมันหรือไม่ วิตามินจำเป็นสำหรับแบคทีเรีย non-sulfur purple phototroph มี 4 ชนิด ได้แก่ biotin para-aminobenzoic acid thiamine และ nicotinic acid นอกจากนี้ยังต้องการได้ข้อมูลว่าหากเติมยีสต์สกัด (yeast extract) แทนวิตามินจะมีความเป็นไปได้หรือไม่ เพื่อลดต้นทุนการผลิต การทดลองทำในหลอดขนาด 60 มล. และศึกษาในอาหารมาตรฐาน Ormerod's malate-glutamate โดยไม่มีน้ำทั้ง เพื่อไม่ให้สารปนเปื้อนในน้ำทั้งที่เป็นปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้มารบกวนผลการทดลอง

5.1 การศึกษาอิทธิพลของวิตามิน 4 ชนิดต่อ การผลิตไฮโดรเจน และการเจริญของแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 ใช้อาหาร Ormerod's medium ที่ไม่เติมวิตามินที่ละชนิด คือ ไทอะมีน (thiamine HCl) พาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (*p*-aminobenzoic acid) กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) ไบโอติน (biotin) และอาหารที่ไม่เติมวิตามินทั้ง 4 เปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐานที่มีวิตามินครบทั้ง 4 ชนิด ที่เป็นหลอดควบคุม (Control) การทดลองทำในขนาด 60 มล. บ่มในที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชม.

วิตามิน มีหน้าที่ เป็นโคแฟกเตอร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ จำเป็นสำหรับการเจริญ กลไกบางกลไกในเซลล์ การเก็บรักษา และการมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย เมื่อขาดวิตามินแบคทีเรียจะอ่อนแอและสูญเสียคุณสมบัติของเซลล์ (Koku *et al.*, 2003) แบคทีเรียหลายชนิดสังเคราะห์วิตามินเองได้ แต่แบคทีเรียกลุ่ม non sulfur purple ส่วนใหญ่จะสร้างได้ไม่ครบ จึงต้องเติมลงไป วิตามินที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ ไทอะมีน (thiamine HCl) พาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (*p*-aminobenzoic acid) กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) และไบโอติน (biotin) (Ormerod *et al.*, 1961)

อาหารมาตรฐาน Ormerod's ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนเป็น synthetic medium มีสารอาหารแร่ธาตุ รวมถึงวิตามิน 4 ชนิดเป็นส่วนผสม (Ormerod *et al.*, 1961) โดยวิตามินเป็นสารที่มีราคาแพง เช่น ไทอะมีน (thiamine HCl) ราคา 108 บาท/กรัม พาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (p-aminobenzoic acid) ราคา 10 บาท/กรัม กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) ราคา 13 บาท/กรัม และไบโอติน (biotin) ราคา 19.5 บาท/มิลลิกรัม ถึงแม้การเตรียมอาหารเหลว 1 ลิตร ใส่วิตามินปริมาณที่น้อยมากในหน่วยมิลลิกรัม และน้อยที่สุดในหน่วยไมโครกรัม แต่วิตามินเสียสภาพง่ายจึงจำเป็นต้องเตรียมสารละลายวิตามินแต่ละชนิดเป็น stock ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 1,000-10,000 เท่า ทำให้เมื่อคำนวณราคารวม stock ของวิตามินทั้งหมดมีราคาสูงถึง 900 บาทต่อการเตรียม stock ชนิดละ 200-300 มล. การเตรียมอาหารที่มีวิตามินยังทำให้เกิดความยุ่งยาก เมื่อต้องการใช้ผลิตพลังงานในระดับ practical นอกจากนี้การเก็บ stock ต้องเก็บในตู้แช่แข็งต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้เสื่อมสภาพ ดังนั้นหากไม่จำเป็นต้องเติมวิตามินในสารตั้งต้นผลิตไฮโดรเจน จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตพลังงานไฮโดรเจน และความยุ่งยากต่างๆ อีกด้วย ข้อมูลความจำเป็นในการเติมวิตามิน 4 ชนิดจึงมีประโยชน์

ผลการทดลองพบว่า *R. gelatinosus* SB24 ต้องการวิตามินในการผลิตไฮโดรเจนไม่เติมวิตามินเลยไม่ได้ (ภาพที่ 19) โดยเฉพาะไบโอตินเป็นวิตามินที่จำเป็นที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรเจน พบว่าแบคทีเรียไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนในอาหารที่ไม่เติมไบโอติน แต่เมื่อไม่เติมนิโคตินิกแอซิด พารา-อะมิโนเบนโซอิกแอซิด หรือไทอะมีน พบว่าแบคทีเรียยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ แต่ได้ปริมาณไฮโดรเจนน้อยกว่าในอาหารที่ใส่วิตามินครบทั้ง 4 ชนิด ซึ่งแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้น้อยที่สุดในอาหารที่ขาดไทอะมีน ได้ปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 31.3 มล. และในอาหารขาดพารา-อะมิโนเบนโซอิกแอซิด แบคทีเรียผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เท่ากับ 38.7 มล. แต่ในอาหารขาดนิโคตินิกแอซิด แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจน 46 มล. ในขณะที่ในอาหารที่เติมวิตามินครบทั้ง 4 ชนิด ได้ก๊าซไฮโดรเจน 53 มล.

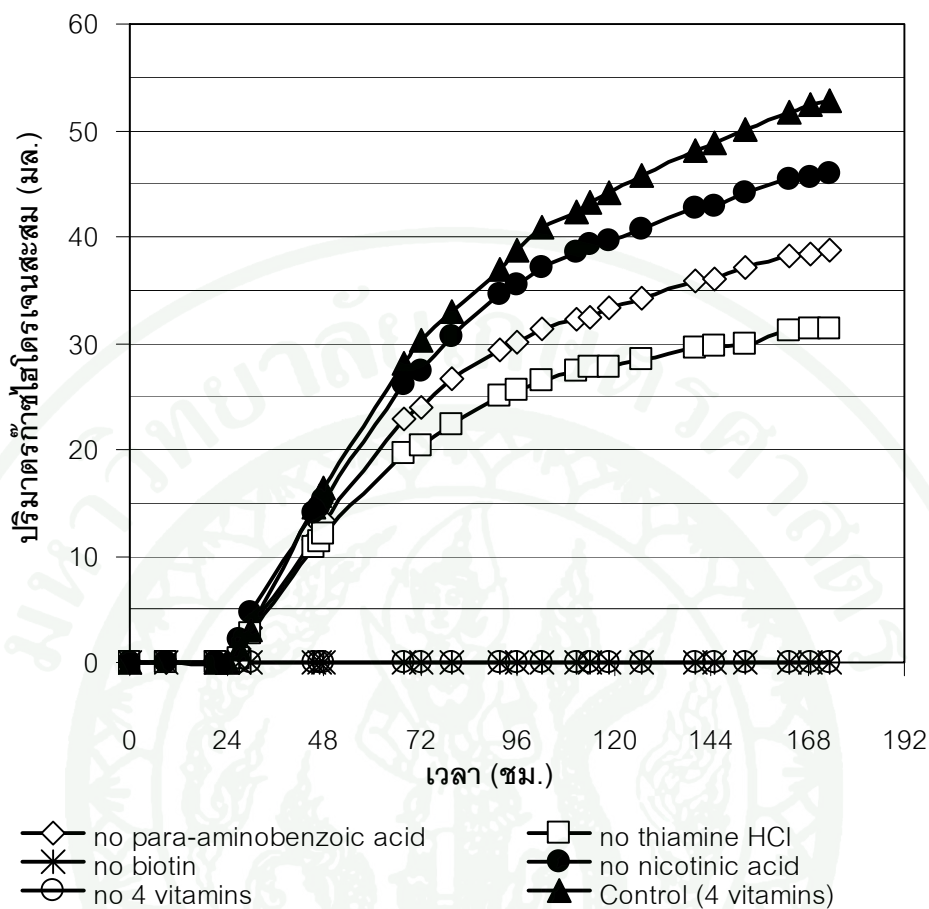
ตารางที่ 20 แสดงว่า *R. gelatinosus* SB24 สามารถเจริญได้ในทุกสภาวะ ถึงแม้ไม่เติมวิตามินทั้ง 4 ชนิด แต่ไม่ได้หมายความว่าวิตามินไม่จำเป็นสำหรับการเจริญ พบว่าในอาหารที่ไม่เติมไบโอติน การเจริญของแบคทีเรียได้ช้ากว่าอาหารที่เติมวิตามินครบ แสดงว่าไบโอตินสำคัญต่อการเจริญของ *R. gelatinosus* SB24 มากที่สุด เนื่องจากอาหารดังกล่าวมี glutamate เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในทุกอาหารถึงแม้ไม่เติมวิตามิน แตกต่างจากในขั้นตอนการจัดจำแนก (Identification) ที่

ทดสอบความจำเป็นของวิตามินต่อการเจริญ พบว่าไบโอติน และไทอะมีนจำเป็นต่อการเจริญของ *R. gelatinous* SB24 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบมีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนใช้สำหรับการเจริญแต่ไม่เหมาะสมกับการผลิตไฮโดรเจน (จินตนา, 2543; Mahakhan *et al.*, 2005)

อาหารเหลวที่ไม่เติมไบโอติน และไม่เติมวิตามินทั้ง 4 ชนิด แบคทีเรียไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีและให้ปริมาณเซลล์มาก ได้เท่ากับ 63 และ 65 มก. ของโปรตีนเซลล์ (mg cell protein) จากปริมาตรบรรจุ 60 มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 20) เมื่อเรียงลำดับปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากมากไปหาน้อย พบว่าแบคทีเรียผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอาหารที่ไม่เติมนิโคตินเอซิด > ไม่เติมพารา-อะมิโนเบนโซอิกเอซิด > ไม่เติมไทอะมีน > ไม่เติมไบโอติน หรือ ไม่เติมทั้ง 4 ชนิด ซึ่งตรงกันข้ามกับการเจริญของแบคทีเรีย ที่วัดจากปริมาณโปรตีนเซลล์ ในช่วงสูงสุดท้าย พบว่าเมื่อเรียงลำดับปริมาณเซลล์จากมากไปหาน้อยในอาหารที่ไม่เติมวิตามินชนิดใดชนิดหนึ่ง พบว่าในอาหารที่ไม่เติมทั้ง 4 ชนิด > ไม่เติมไบโอติน > ไม่เติมไทอะมีน > ไม่เติมพารา-อะมิโนเบนโซอิกเอซิด > ไม่เติมนิโคตินเอซิด ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับการผลิตไฮโดรเจน แสดงว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 ไม่แปรผันตามการเจริญของเชื้อ และพบว่าในสภาวะที่ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนหรือผลิตไฮโดรเจนได้น้อย แบคทีเรียมีการเจริญมากกว่า (Eroglu *et al.*, 1999)

การผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เกิดในสภาวะที่มีแสงนั้น อาศัยพลังงาน ATP และ reducing power (electrons) หรือ low potential reductant ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Yoch, 1978) ซึ่งเป็นสารตัวเดียวกับที่ใช้สำหรับกระบวนการสร้างเซลล์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียนำสารเหล่านั้นไปสร้างเซลล์ซึ่งเป็นกระบวนการหลักมากกว่าก็จะมีสารเหล่านั้นน้อยลงสำหรับที่จะเกิดกระบวนการทางเลือกอื่น เช่น กระบวนการผลิตไฮโดรเจน หรือการสะสม PHB

สรุปว่ากลไกการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 ไบโอตินมีความจำเป็นมากที่สุด วิตามินอีก 3 ชนิด ช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเซลล์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้น ดังจะเห็นได้จากค่ากิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในอาหารที่เติมวิตามินครบทั้ง 4 ชนิด (control) ที่มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.32 มล./มก. ของโปรตีนเซลล์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าอาหารทดสอบอื่นๆ



ภาพที่ 19 การผลิตก๊าซสะสมโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในอาหาร Ormerod's ในขนาด 60 มิลลิลิตร ที่ขาดวิตามินอาหารละ 1 ชนิดแตกต่างกัน และที่ไม่เต็มวิตามินทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (Control) ซึ่งเป็นอาหาร Ormerod's สูตรปกติ ที่มีครบ 4 ชนิด คือ พาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (*p*-aminobenzoic acid) ไทอะมีน (thiamine) ไบโอติน (biotin) และนิโคตินิกแอซิด (nicotinic acid)

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย

Rubrivivax gelatinosus SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้ายของ
การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's ในขนาด 60 มิลลิลิตร ที่ไม่
เติมวิตามินชนิดใดชนิดหนึ่ง และที่ไม่เติมวิตามินทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ
Ormerod's ที่เติมวิตามินครบ ซึ่งเป็นหลอดควบคุม (Control)

อาหาร/ค่าที่วัด	ปริมาณโปรตีน เซลล์ ใน 60 มล. (มก.)	ปริมาณ ไฮโดรเจน สุดท้าย (มล.)	กิจกรรมของเซลล์ ในการผลิตไฮโดรเจน (มล./มก. ของโปรตีนเซลล์)
no <i>p</i> -aminobenzoic acid	42.44	38.70	0.91
no thiamine	47.65	31.30	0.66
no biotin	63.27	0.00	0.00
no nicotinic acid	38.54	46.00	1.19
no 4 vitamins	64.84	0.00	0.00
Control (4 vitamins)	40.10	52.90	1.32

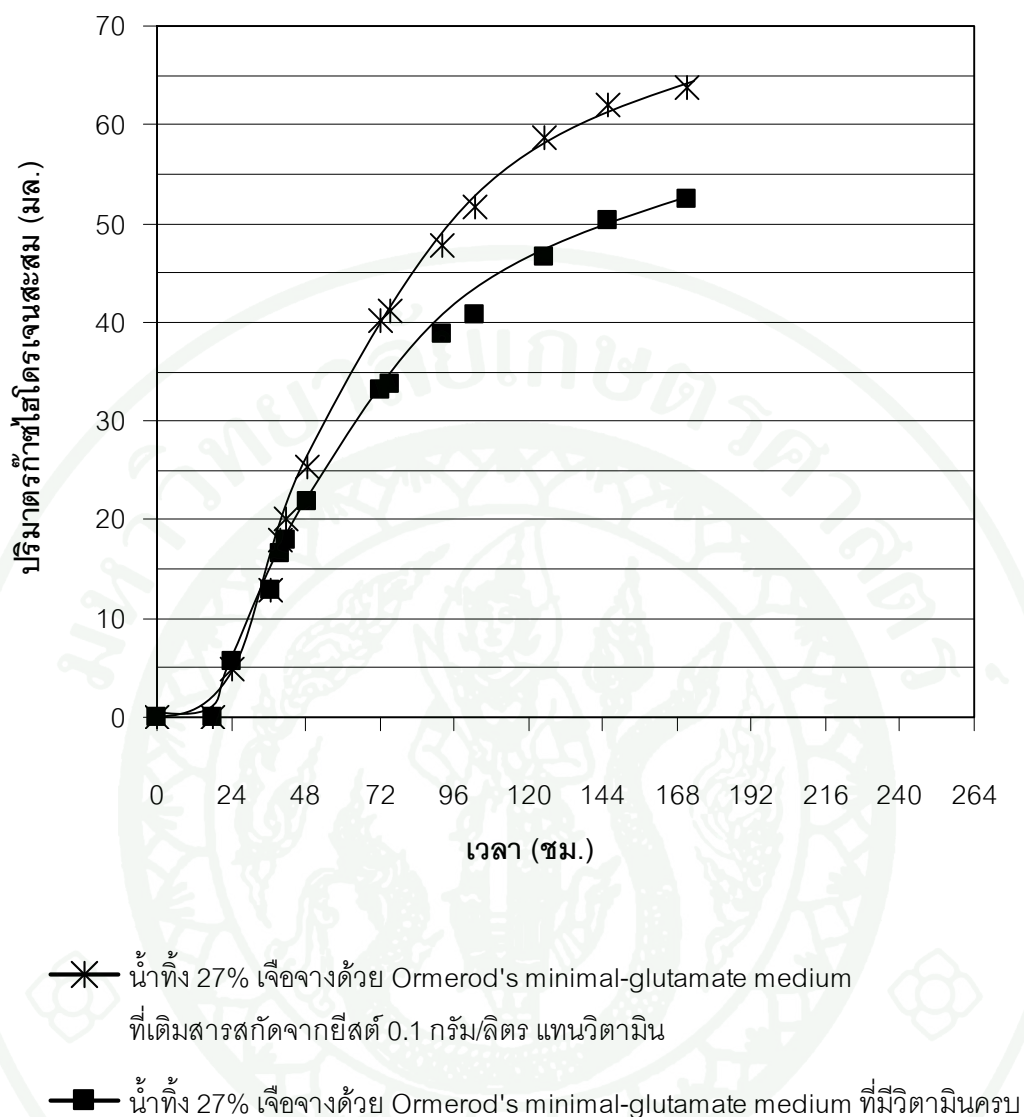
5.2 การใช้ยีสต์สกัด (yeast extract) 0.1 กรัม/ลิตร แทนวิตามินทั้ง 4 ชนิด ใน minimal-glutamate medium ที่ใช้น้ำทิ้งเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน

จากผลการทดลองข้อ 5.1 พบว่าวิตามินเป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย โดยเฉพาะไบโอติน ถึงแม้จะใช้ในปริมาณน้อยมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่วิตามินมีราคาแพง ทำให้ต้องเสียเงินในการลงทุนครั้งแรกในปริมาณมาก แต่ไม่เติมวิตามินไม่ได้ ดังนั้นจึงสนใจที่จะหาสารอื่นที่มีราคาถูกกว่า และคุณสมบัติใกล้เคียงวิตามินมาใส่แทน เมื่อตรวจสอบราคายีสต์สกัด (ยี่ห้อ Difco) มีราคาเท่ากับ 4.98 บาท/กรัม ถ้าใส่ในอาหาร 1 ลิตร แล้วคำนวณราคายีสต์สกัดเทียบกับราคาวิตามินทั้ง 4 ชนิดที่ใส่แต่เดิม พบว่ามีราคาไม่แตกต่างกัน คือ สารสกัดจากยีสต์ราคา 0.498 บาทต่ออาหาร 1 ลิตร และวิตามินทั้ง 4 ชนิดราคา 0.423 บาทต่ออาหาร 1 ลิตร อย่างไรก็ตามต้นทุนครั้งแรกของการผลิตไฮโดรเจนในอาหารที่ใส่ยีสต์สกัดเพียงชนิดเดียว ก็ยังน้อยกว่าที่ต้องใส่วิตามินทั้ง 4 ชนิด และการใช้ยีสต์สกัดแทนวิตามินมีความยุ่งยากในการเตรียมอาหารน้อยกว่า นอกจากนี้ยีสต์สกัดก็ยังเสื่อมสภาพยากกว่าวิตามิน ดังนั้นจึงทำการทดลองผลิตไฮโดรเจนจากการใช้น้ำทิ้งที่เจือจางด้วยอาหารเหลวที่ใส่ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตร แทน

วิตามินทั้ง 4 ชนิด ทำการทดลองขนาดปริมาตรบรรจุ 60 มล. อาหารที่ใช้คือน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium ที่ไม่มีวิตามินทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้นของ ยีสต์สกัดคือ 0.1 กรัม/ลิตร

ดังภาพที่ 20 ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่ใช้ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตร แทนวิตามิน 4 ชนิด มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 14.06 จาก 11.18 มล./ลิตร/ชม. และปริมาณ ก๊าซไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นเป็น 64 จาก 52 มล. เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยอาหาร เหลวที่มีวิตามินครบ สอดคล้องกับงานของ Koku *et al.* (2003) ที่ทำการทดลองการผลิต ไฮโดรเจนด้วย *Rhodobacter spheroides* O.U.001 ในอาหารมาตรฐานที่เติมยีสต์สกัด 0.2 กรัม/ ลิตร แทนวิตามิน พบว่า แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนสะสมได้ไม่แตกต่างจากในอาหารที่ใส่วิตามิน ครบอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แสดงว่าในอาหารสำหรับผลิต ไฮโดรเจนสามารถใส่ยีสต์สกัดแทนวิตามินได้ จากรายงานของ Fascedii and Todini (1995) พบว่าการเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดเป็น 0.5 กรัม/ลิตร จะทำให้แบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจน สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ยีสต์สกัดมีโปรตีนสูง ซึ่งการใส่ในปริมาณมากอาจมีผลยับยั้งกิจกรรมไนโตร จีเนส นั่นคือ ยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วย ตามรายงานของ Gest and Kamen (1949) ที่ กล่าวว่าสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น ยีสต์สกัด (yeast extract) หรือเปปโตน (peptone) ที่มี ปริมาณสูงยับยั้งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้สมบูรณ์

อีกหนึ่งแหล่งไนโตรเจนในการทดลองนี้ มีทั้งโซเดียมกลูตาเมต และไนโตรเจนในยีสต์ สกัดและไนโตรเจนปนเปื้อนในน้ำทิ้ง (ตารางที่ 15) ดังนั้นสารตั้งต้นในการทดลองนี้มีปริมาณ ไนโตรเจนสูงถึง 13.37 mM ซึ่งมากกว่าในงานของ Koku *et al.* (2003) ที่ใช้อาหารสำหรับผลิต ไฮโดรเจนที่มีโซเดียมกลูตาเมต เป็นแหล่งไนโตรเจน และใส่ยีสต์สกัด 0.2 กรัม/ลิตร แทนวิตามิน มี ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพียง 3.26 mM การเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดส่งผลให้อัตราส่วนระหว่าง สารอินทรีย์คาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของ แบคทีเรีย รายงานของ Eroglu *et al.* (1999) แสดงถึงความเหมาะสมของอัตราส่วนระหว่าง คาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการผลิต ไฮโดรเจนสูงสุดในอาหารที่มี L-malic acid 15 mM เป็นแหล่งคาร์บอน และมี sodium glutamate 2 mM เป็นแหล่งไนโตรเจน นั่นคือ C:N ratio เท่ากับ 35:1 และเมื่อความเข้มข้นของแหล่ง ไนโตรเจนสูงขึ้นทำให้แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้ลดลง ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้ยีสต์สกัดเพียง 0.1 กรัม/ลิตร คิดค่า C:N ratio ได้ประมาณ 15:1



ภาพที่ 20 การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ปริมาตร 60 มล. เมื่อใช้น้ำทิ้งแป้งมันความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium ที่เติมยีสต์สกัด 0.1 กรัมต่อลิตร แทนวิตามินทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ น้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium ที่มีวิตามินครบ บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

น้ำทิ้งที่เจือจางด้วยอาหารเหลวที่มีวิตามิน เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน มีพีเอชสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 6.7 แต่ในอาหารที่ใส่ยีสต์สกัดแทนวิตามิน เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พีเอชสุดท้ายจะต่ำลงเป็น 5.1 เซลล์ซัสเพนชันเปลี่ยนเป็นมีสีเหลือง และเซลล์ตาย ในสภาวะเป็นกรดระดับนี้ ดังนั้นหากจะขยายขนาดการผลิตจุดนี้น่าจะแก้ไข โดยต้องควบคุมพีเอชตลอดการผลิต ซึ่งน่าจะทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น สรุปได้ว่าสามารถใช้ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตร แทนวิตามินทั้ง 4 ชนิดได้ และแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจน และปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงขึ้น 12 มล. ในขนาดการผลิตขนาด 60 มล. ดังนั้นถ้าขยายขนาดการผลิตจาก 60 มล. เป็น 1 ตัน จากการคำนวณเมื่อใส่ยีสต์สกัดแทนวิตามินจะผลิตไฮโดรเจนมากกว่าส่วิตามินถึง 200 ลิตร และราคาต้นทุนการผลิตไฮโดรเจนใช้ยีสต์สกัดคิดเป็น 0.47 บาท/ลิตรไฮโดรเจน ขณะที่ใช้วิตามินราคาเท่ากับ 0.49 บาท/ลิตรไฮโดรเจน สรุปว่าการใส่ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตร ใช้ทดแทนวิตามินได้ เพราะให้ปริมาณไฮโดรเจนสูงขึ้น และต้นทุนการผลิตต่ำลง

5.3 การศึกษาอิทธิพลของโลหะไอออน และสารจับโลหะไอออน (chelating agent) ต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24

การมีสารปนเปื้อนโลหะหนักบางชนิด ในปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไปในน้ำทิ้งส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางชีวภาพ (Gamila and Naglaa, 1999; Lin and Shei, 2008; Wang and Wan, 2009) จึงคาดว่าหากมีโลหะหนักมากหรือน้อยในน้ำทิ้งแ่งมัน น่าจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 เหตุผลหนึ่งคือกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะมีแสง (Photoevolution of hydrogen) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นหลัก (Yoch, 1978; Ozturk et al., 2006; Liu et al., 2009b) เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยโปรตีน 2 subunit คือ เหล็กโปรตีน (Fe-protein subunit) ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ และโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีน (Mo-Fe protein subunit) ที่มีโมลิบดีนัม และเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Robson, 1978; Rubio and Ludden, 2008) รายงานก่อนหน้านี้กล่าวถึงผลกระทบของไอออนเหล็กต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม non-sulfur purple ยีสต์ *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodopseudomonas faecalis* RLD 53 กล่าวว่าการที่ขาดเหล็กไอออน จะทำให้เกิดการกด (repression) การผลิตไฮโดรเจน หากมีปริมาณที่เหมาะสมของเหล็กไอออนจะช่วยเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อมีปริมาณเหล็กไอออนสูงเกินไปจะเกิดการยับยั้งการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Kars et al., 2006; Zhu et al., 2007; Liu et al., 2009) มีรายงานที่กล่าวถึงปรากฏการณ์ในระดับยีนโมเลกุลที่เกิดขึ้นใน *Azotobacter*

vinelandii เมื่อเจริญในสภาวะที่ขาดโมลิบดีนัม เกิดการกด (repression) กระบวนการลดการหีสของยีน *nifH* (Jacobson, 1986) เช่นเดียวกับ รายงานของ Kars et al. (2006) ที่พบการกดกระบวนการลดการหีสของยีน *nifK* ในแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 เมื่อสภาวะขาดโมลิบดีนัมเช่นกัน ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อย ซึ่งตรงข้ามกับปรากฏการณ์ใน *Rhodobacter capsulatus* ที่มีรายงานว่า การมีโมลิบดีนัมระดับหนึ่งส่งผลให้เกิดการกด alternative nitrogenase (Schneider, 1991) ส่วนสาร chelating agent ชนิด ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Rhodospirillum rubrum* ด้วย โดย Kern et al. (1992) สรุปว่าสารดังกล่าวกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนให้เพิ่มขึ้นเนื่องจากไปยับยั้งการสังเคราะห์ของเอนไซม์ไฮโดรเจนอะปเทคไฮโดรจีเนส (Hup hydrogenase) และเคลื่อนย้าย (transfer) เหล็กไอออน ไปสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Koku et al., 2002) ด้วยเหตุนี้สารทั้ง 3 ได้แก่ เหล็กไอออน, โมลิบดีนัมไอออน และ EDTA จึงน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ด้วย การศึกษานี้เป็นเชิงปริมาณทำในขนาด 60 มล. ใช้อาหารมาตรฐาน Ormerod's malate-glutamate medium และเริ่มด้วยการศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time)

5.3.1 อิทธิพลของเหล็กไอออน ต่อการผลิตไฮโดรเจนและการเจริญของ *R. gelatinosus* SB24

ในอาหารเหลว malate-glutamate medium มีเหล็กไอออนอยู่ในรูปของสารประกอบเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ดังนั้นจึงทำการทดลองอิทธิพลของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 จนถึง 1,062 มก./ลิตร ผลการทดลอง (ภาพที่ 21 และตารางที่ 21) จะเห็นว่า ในอาหารที่ไม่เติมเฟอร์รัสซัลเฟต (0 มก./ลิตร) แบคทีเรียเจริญได้ สังเกตการเจริญได้ใน 24 ชม. แต่มีการเจริญช้าที่สุด เซลล์ซัสเพนชันมีความขุ่นน้อยที่สุด และแบคทีเรียไม่สามารถผลิตไฮโดรเจน เมื่อเติม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.6 มก./ลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เท่ากับที่อยู่ในอาหารดั้งเดิม (Original medium) แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้ 52.7 มล. การเจริญเมื่อวัดที่ชั่วโมงสุดท้ายมากกว่าเมื่อไม่เติม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เล็กน้อย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็น 53.1 106.2 และ 531.0 มก./ลิตร ซึ่งมีค่าเป็น 5 10 และ 50 เท่าของปริมาณ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในอาหารดั้งเดิม แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนสะสมได้ใกล้เคียงกัน คือ 58-59 มล. ซึ่งมากกว่าในอาหารดั้งเดิม เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียการเพิ่มเหล็กไอออนเป็น 22.4-224.0 มก./ลิตร ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 106.2-1,062.0$ มก./ลิตร) มีผลต่อการเจริญคือ ทำให้การเจริญลดลงตามลำดับ

ส่งผลให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของการผลิตไฮโดรเจนต่อเซลล์สูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ สูงขึ้นจาก 106.2 ไปจนถึง 531.0 มก./ลิตร อย่างไรก็ตาม อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีค่าอยู่ในช่วง 14-15 มล./ลิตร/ชม. เมื่อ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ มีความเข้มข้น 53.1 และ 106.2 มก./ลิตร ซึ่งสูงกว่าที่ความเข้มข้น 531.0 มก./ลิตร และสูงกว่าอาหารดั้งเดิมที่มี $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 10.6$ มก./ลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิตเพียง 12 มล./ลิตร/ชม. ถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้น 531.0 มก./ลิตร จะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนที่สูง นั่นเป็นผลมาจากปริมาณเซลล์มีค่าต่ำเนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้น้อยลงที่ความเข้มข้น 531.0 มก./ลิตร สรุปได้ว่าการผลิตไฮโดรเจนที่ได้ผลดี เมื่อความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 53.1 และ 106.2 มก./ลิตร โดยพิจารณาจากปริมาณไฮโดรเจนสะสม และอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงสุด และเมื่อความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ สูงขึ้นกว่าอาหารดั้งเดิม 100 เท่า เป็น 1,062 มก./ลิตร พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนช้าลง และให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนน้อยลงกว่าในอาหารดั้งเดิม กล่าวคือเมื่อความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ สูงขึ้นเป็น 1,062 มก./ลิตร แบคทีเรียมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพียง 10.4 มล./ลิตร/ชม. และได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเพียง 45 มล. (ตารางที่ 21) นอกจากนี้การเจริญก็ลดลงด้วย ส่งผลให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเซลล์เท่ากับในอาหารดั้งเดิม แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเจริญในอาหารดั้งเดิมได้ดีกว่า จึงมีจำนวนเซลล์ที่ผลิตไฮโดรเจนมาก ทำให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมที่แบคทีเรียผลิตในอาหารดั้งเดิมมากกว่าเมื่อเติม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ สูงขึ้น 100 เท่า

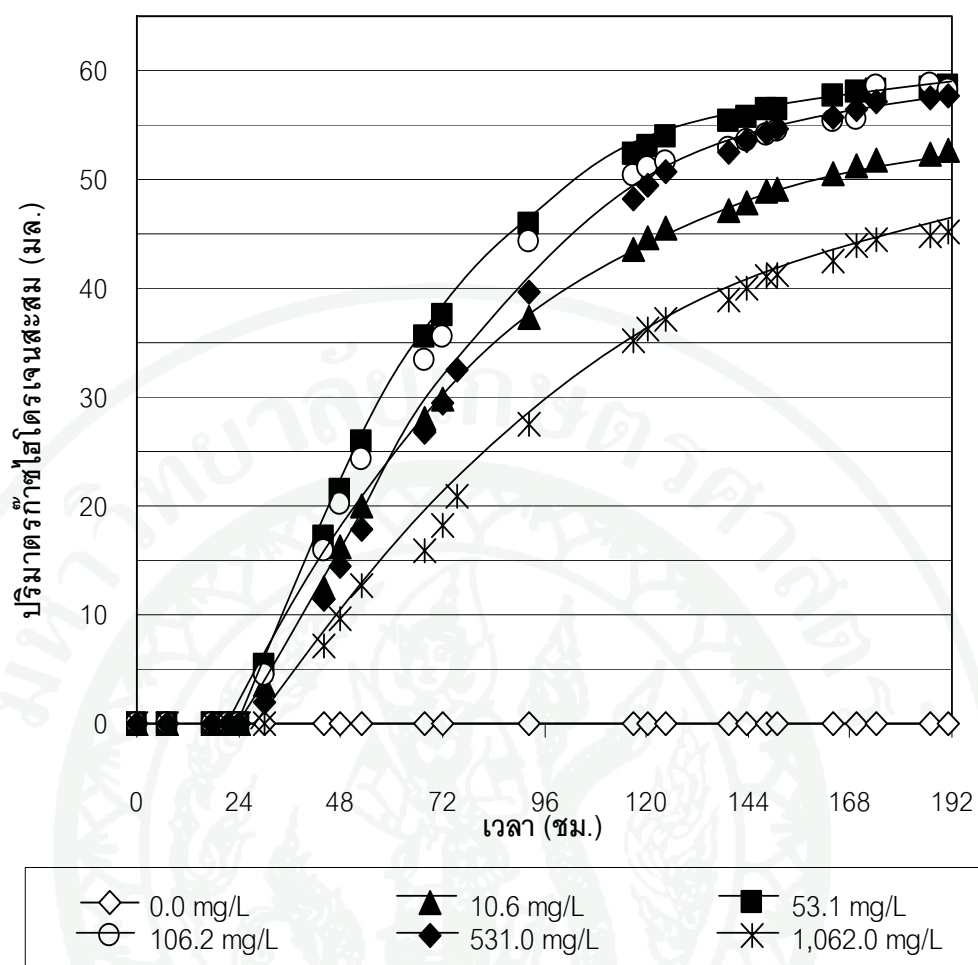
เมื่อนำปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดที่ผลิตได้ ในช่วงวันที่ 192 จากการใช้ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น มาสร้างตาราง ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS โดยกำหนดให้ปัจจัยอื่นคงที่ พบว่า การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในช่วง 0 -1,062 มก./ลิตร มีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value <0.01) (ตารางที่ 22)

เนื่องจากเหล็กเป็นองค์ประกอบในเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (International Union of Biochemistry and Molecular biology [IUBMB], 2011) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และเหล็กยังเป็นองค์ประกอบของเฟอริดอกซิน (ferredoxin) ซึ่งเป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอน (electron carrier) ไปยังเอนไซม์ไฮโดรจีเนส นอกจากนี้เอนไซม์ไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ชนิด Ni-Fe hydrogenase, สาร electron carrier บางชนิด และสารประกอบโปรตีนหลายชนิด (protein complex) ก็มีเหล็ก

เป็นองค์ประกอบด้วย ดังนั้นเหล็กจึงมีความจำเป็นต่อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงรวมทั้ง *R. gelatinosus* SB24 การผลิตไฮโดรเจนแบบใช้แสง (photoproduction of hydrogen)

Zhu *et al.* (2007) ทดลองอิทธิพลของเหล็กไอออน ต่อการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย non-sulfur purple ชนิด *Rhodobacter sphaeroides* DSM158 ในอาหาร GL-medium ที่มี sodium lactate เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอิเล็กตรอน และมี glutamate เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ช่วง 0-3.2 มก./ลิตร พบว่า *R. sphaeroides* DSM158 ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออนเท่ากับ 2.4 มก./ลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออนเป็น 3.2 มก./ลิตร พบว่าแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนลดลง งานวิจัยนี้ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อใช้ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 53.1 ถึง 106.2 มก./ลิตร คิดเป็นปริมาณเฟอร์รัสไอออน 11.2 และ 22.39 มก./ลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่า *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ต้องการเหล็กไอออนความเข้มข้นสูงถึง 4-9 เท่า ซึ่งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม non-sulfur purple เดียวกันนี้ แต่ต่างสายพันธุ์ต้องการเหล็กไอออนในกลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ไม่เท่ากัน การศึกษาอิทธิพลของสารนี้ในแต่ละสายพันธุ์จึงจำเป็น การที่ *R. gelatinosus* SB24 สามารถใช้เหล็กไอออนได้ความเข้มข้นสูงนี้ ก็เป็นข้อได้เปรียบหนึ่งที่จะนำสายพันธุ์นี้ไปใช้กับน้ำทิ้งที่อาจมีการปนเปื้อนของเหล็กไอออนอยู่สูง เมื่อนำน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันไปวิเคราะห์ปริมาณเหล็กไอออนในน้ำทิ้ง พบว่า ในน้ำทิ้งทั้งเก็บครั้งที่ 1 และที่ 2 มีปริมาณเหล็กไอออนอยู่ 1.2 และ 0.36 มก./ลิตร ตามลำดับ การเก็บตัวอย่างจากต่างฤดูกาลมีค่าแตกต่างกัน นอกจากนี้ น้ำทิ้งต้องมีการเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ทำให้ปริมาณเหล็กไอออนยิ่งต่ำลง จึงเสนอแนะให้เติมเฟอร์รัสไอออนให้ได้พอเหมาะ

ผลการทดลองกับ *R. gelatinosus* SB24 สรุปได้ว่า เหล็กไอออนมีความจำเป็นต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ และความเข้มข้นของเหล็กไอออนสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตก๊าซ ความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 11.2-22.4 มก./ลิตร ซึ่งอยู่ในรูปของเฟอร์รัสซัลเฟตความเข้มข้น 53.1-106.2 มก./ลิตร



ภาพที่ 21 ก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ที่มี $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 10.6 53.1 106.2 531.0 และ 1,062.0 มก./ลิตร ในปริมาตรบรรจุ 60 มล.

ตารางที่ 21 แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้าย และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ในปริมาตรบรรจุ 60 มล. ที่มี $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น ของเหล็ก ไอออน (มก./ลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง ใน 60 มล. (มก.)	ปริมาณ ไฮโดรเจน (มล.)	มล./มก. ของ น้ำหนัก เซลล์แห้ง	อัตราการผลิต ไฮโดรเจนสูงสุด (มล./ลิตร/ชม.)
0.00	0.00	38.42	0.00	0.00	0.00
10.60	2.24	42.79	52.73	1.23	11.93 (30-53 ชม.)
53.10	11.20	45.20	58.55	1.30	14.83 (30-53 ชม.)
106.20	22.39	41.06	58.21	1.42	14.32 (30-53 ชม.)
531.00	111.97	34.50	57.70	1.67	11.58 (30-53 ชม.)
1,062.00	223.95	38.19	45.15	1.18	10.35 (44-53 ชม.)

ตารางที่ 22 ตาราง ANOVA แสดงความสำคัญทางสถิติของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ต่อการผลิตไฮโดรเจน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Response *	Between (Combined)	5238.542	5	1047.708	41.691	.000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Groups					
	Within Groups	150.781	6	25.130		
	Total	5389.322	11			

5.3.2 อิทธิพลของโมลิบดีนัมไอออน ต่อการผลิตไฮโดรเจน และการเจริญของแบคทีเรีย

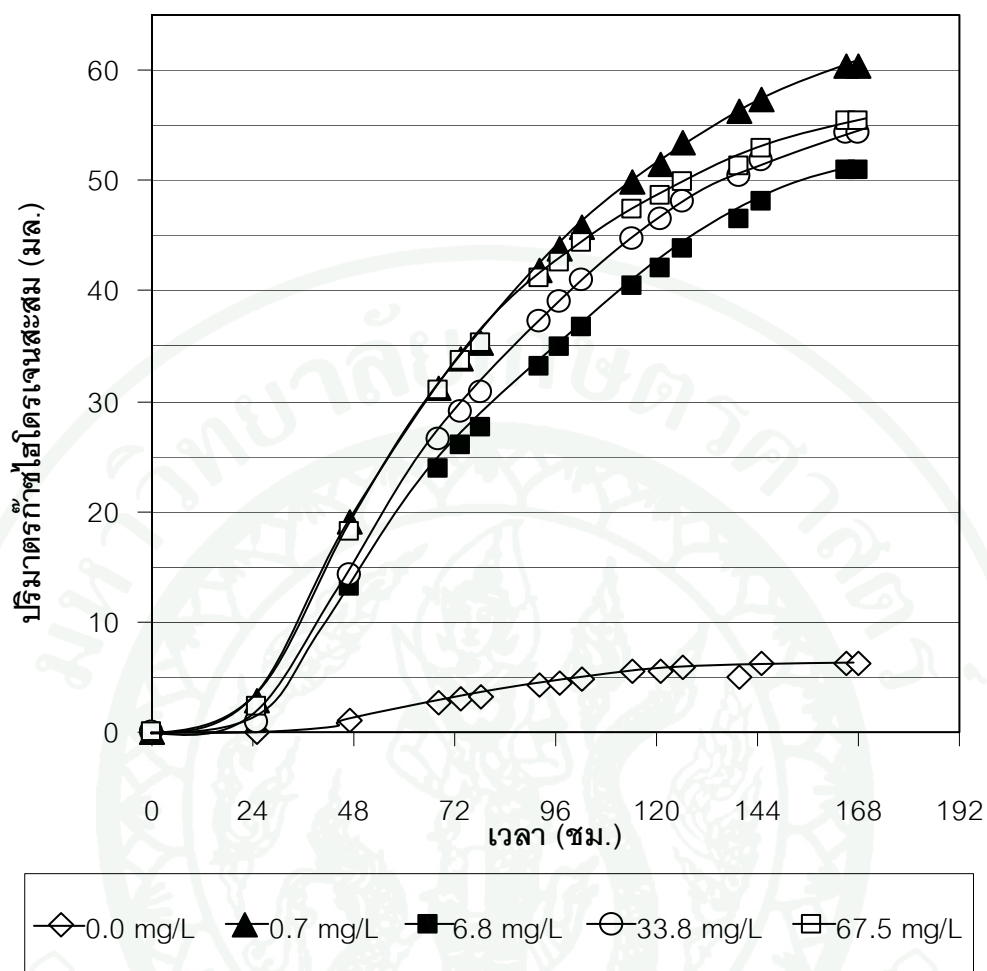
ในอาหารเหลว malate-glutamate medium มีโมลิบดีนัมไอออนอยู่ในรูปของสารประกอบโซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ดังนั้นจึงทำการทดลอง อิทธิพลของ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ อยู่ในช่วง 0-67.5 มก./ลิตร ผลการทดลอง (ภาพที่ 22, ตาราง 23) แสดงว่า โมลิบดีนัมไอออนมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 กล่าวคือ ในอาหารที่ขาดโมลิบดีนัมไอออน (0 มก./ลิตร) แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้น้อยมากเท่ากับ 6.25 มล. ใช้เวลานานถึง 5 วัน แต่โมลิบดีนัมไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้ดีมากกว่าในอาหารดั้งเดิม โดยมีปริมาณเซลล์ทั้งหมดในวันสุดท้ายเท่ากับ 78 มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากปริมาตรบรรจุ 60 มล. และในสภาวะที่ขาดโมลิบดีนัมไอออนไม่สังเกตเห็นความแตกต่างของการเจริญที่ช่วงเริ่มต้น ในสภาวะที่ขาดโมลิบดีนัมไอออนแบคทีเรียยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้บ้างเล็กน้อย แบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนน้อยเท่ากับ 1.27 มล./ลิตร/ชม. ในช่วงเวลาที่ 47-74 การผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดในอาหารที่มีโซเดียมโมลิบเดตเท่ากับ 0.68 มก./ลิตร ซึ่งเท่ากับปริมาณโซเดียมโมลิบเดตในอาหารดั้งเดิม ได้ปริมาณไฮโดรเจน 60.4 มล. และในช่วงเวลาที่ 25-68 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 11.02 มล./ลิตร/ชม. แต่มีการเจริญน้อยกว่าเกือบ 2 เท่าของสภาวะที่ขาดโมลิบดีนัม ทำให้มีกิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนดีขึ้นเท่ากับ 1.56 มล./มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แสดงว่าในสภาวะที่มีโมลิบดีนัมไอออน แบคทีเรียนำ reducing power ไปใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสภาวะขาดโมลิบดีนัม (Koku *et al.*, 2002; Kars and Gunduz, 2010) สังเกตได้จากเซลล์มีกิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น 20 เท่า

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมโมลิบเดตเป็น 10 เท่าของอาหารดั้งเดิม คือเพิ่มเป็น 6.8 มก./ลิตร เซลล์เจริญดีที่สุดมากกว่า และเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมโมลิบเดตมากขึ้นอีก คือ เป็น 50 และ 100 เท่า (33.8 และ 67.5 มก./ลิตร) กลับผลยับยั้งการเจริญ ทำให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนต่ำกว่าอาหารดั้งเดิม ได้ก๊าซไฮโดรเจน 54-55 มล. สรุปว่ากิจกรรมจำเพาะของแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 ในการผลิตไฮโดรเจนต่อหนึ่งหน่วยเซลล์สูงสุด ในอาหารดั้งเดิมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมโมลิบเดตเท่ากับ 0.68 มก./ลิตร และได้ปริมาณไฮโดรเจนมากที่สุด

เมื่อนำปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดที่ผลิตได้ ในช่วงเวลาที่ 192 ที่ได้จากการใช้ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น มาสร้างตาราง ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS กำหนดให้ปัจจัยอื่นคงที่ พบว่า การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในช่วง 0-67.5 มก./ลิตร มีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} < 0.01$) (ตารางที่ 24)

โมลิบดีนัมไอออนมีความสำคัญ และจำเป็นต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 เช่นเดียวกับเหล็กไอออน เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ในโครงสร้างของเอนไซม์ต้องมีทั้งเหล็กไอออน และโมลิบดีนัมไอออน (Robson, 1978; Kars et al., 2006) ดังนั้นการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของโมลิบดีนัมเพียง 0.28 มก./ลิตร แต่มีเหล็กไอออนสูงถึง 11.20 มก./ลิตร แสดงให้เห็นว่า การผลิตไฮโดรเจนของ non-sulfur purple phototroph ใช้เหล็กไอออนปริมาณมากกว่าโมลิบดีนัมไอออน เนื่องจากในโครงสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสชนิด Mo nitrogenase ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง มีอะตอมของเหล็กในปริมาณมากกว่าโมลิบดีนัม (Hallenbeck et al., 1982; Lee and Holm, 2003; Kars et al., 2008)

Kars et al. (2006) รายงานว่า *R. sphaeroides* O.U.001 เมื่อใช้โซเดียมโมลิบเดตความเข้มข้น $16.5 \mu\text{M}$ (3.99 มก./ลิตร) แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.84 ลิตร/ลิตร ในระยะเวลา 168 ชม. ส่วนงานวิจัยนี้ พบว่า *Rubrivivax gelatinosus* SB24 เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมโมลิบเดตความเข้มข้น 0.7 มก./ลิตร ได้ปริมาณไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.0 ลิตร/ลิตร ในระยะเวลา 168 ชม. และเมื่อใช้โซเดียมโมลิบดความเข้มข้น 6.8 33.8 และ 67.5 มก./ลิตร แบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 0.85 0.90 และ 0.97 ลิตร/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า *R. gelatinosus* SB24 ผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่า และใช้ความเข้มข้นของโซเดียมโมลิบดได้ในช่วงกว้างกว่าอีกด้วย คือความเข้มข้นตั้งแต่ 0.7-67.5 มก./ลิตร และปริมาณน้อยที่สุดที่เหมาะสมสำหรับผลิตไฮโดรเจนคือ 0.7 มก./ลิตร ซึ่งน้อยกว่าปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของ *R. sphaeroides* O.U.001 เกือบ 6 เท่า แต่ให้การผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่า จึงเป็นการลดต้นทุนในการใช้โมลิบดีนัมในการผลิตไฮโดรเจนลงได้ด้วย



ภาพที่ 22 ก๊าซไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ที่มี $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 0.7 6.8 33.8 และ 67.5 มก./ลิตร ในปริมาตรบรรจุ 60 มล.

ตารางที่ 23 แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้าย และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ในปริมาตรบรรจุ 60 มล. ที่มี $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ของ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น ของโมลิบดีนัม ไฮดรอกไซด์ (มก./ลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง ใน 60 มล. (มก.)	ปริมาณ ไฮโดรเจน (มล.)	มล./มก. ของ น้ำหนัก เซลล์แห้ง	อัตราการผลิต ไฮโดรเจนสูงสุด (มล./ลิตร/ชม.)
0.00	0.00	78.19	6.20	0.08	1.27 (47-74 ชม.)
0.70	0.28	38.57	60.40	1.57	11.02 (25-68 ชม.)
6.80	2.70	44.60	51.00	1.14	8.98 (25-68 ชม.)
33.80	13.40	38.12	54.28	1.42	9.92 (25-68 ชม.)
67.50	26.77	37.06	55.40	1.49	11.13 (25-68 ชม.)

ตารางที่ 24 ตาราง ANOVA แสดงความสำคัญทางสถิติของ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ต่อการผลิตไฮโดรเจน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Response *	Between (Combined)	4145.064	4	1036.266	40.782	.000
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Groups					
	Within Groups	177.868	7	25.410		
	Total	4322.932	11			

จากการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบของน้ำทิ้งแบ่งมันมีปริมาณโมลิบดีนัมน้อยมากเท่ากับ 0.02 มก./ลิตร แสดงดังตารางที่ 15 ดังนั้นในเบื้องต้นจึงตั้งข้อสมมติฐานว่าจำเป็นต้องเติมแหล่งโมลิบดีนัมให้ออกลงไปในน้ำทิ้งที่จะใช้ในการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24

5.3.3 อิทธิพลของสาร chelating agent ชนิด EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจนและการเจริญของแบคทีเรีย

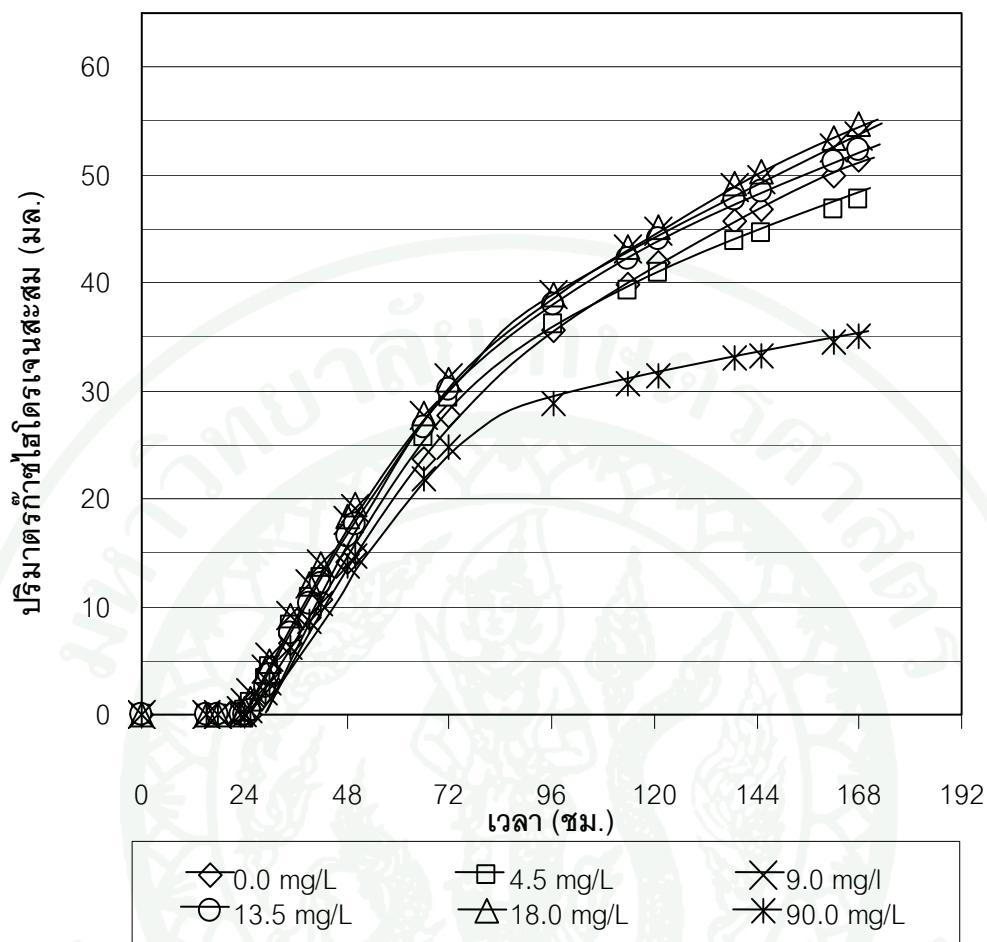
ในอาหารเหลว malate-glutamate medium ที่มีสาร chelating agent ชนิด EDTA ดังนั้นจึงทำการทดลอง อิทธิพลของ EDTA ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-90.0 มก./ลิตร ผลการทดลอง (ภาพที่ 23, ตาราง 25) แสดงว่า สาร EDTA ไม่มีผลต่อการเจริญและไม่จำเป็นต่อการผลิตไฮโดรเจน กล่าวคือ เมื่อไม่มีสาร EDTA แบคทีเรียเริ่มสร้างก๊าซในชั่วโมงที่ 24 เป็นปกติ ที่ความเข้มข้น 4.5-18 มก./ลิตร ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ได้ในชั่วโมงที่ 168 ได้ใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 48-55 มล. จากปริมาตรบรรจุ 60 มล. และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ดีใกล้เคียงกัน มีค่าเท่ากับ 11-12 มล./ลิตร/ชม. ในชั่วโมงที่ 24-50 ซึ่งมากกว่าในอาหารที่ไม่ใส่ EDTA เล็กน้อย กิจกรรมจำเพาะของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนดีใกล้เคียงกันเมื่อความเข้มข้นของ EDTA อยู่ในช่วง 9-18 มก./ลิตร และดีกว่าที่มี EDTA 0-4.5 มก./ลิตร ดังนั้น EDTA ระดับน้อย 9-18 มก./ลิตร จะส่งเสริมกิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA สูงขึ้นเป็น 90 มก./ลิตร ซึ่งมากกว่าอาหารดั้งเดิมที่มี EDTA เท่ากับ 18 มก./ลิตร แบคทีเรียยังคงเจริญได้ดี แต่ผลิตไฮโดรเจนได้น้อยลงชัดเจน แสดงให้เห็นในอาหารที่มี EDTA มากไปจะยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน ดังจะเห็นได้จากเซลล์มีกิจกรรมจำเพาะในการผลิตไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจนน้อยลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ EDTA ไปดึงโลหะให้ออกจนจำเป็น เช่น เหล็กและโมลิบดีนัมออกจากโครงสร้างของเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติว่า EDTA (0-90 มก./ลิตร) ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} > 0.05$) (ตารางที่ 26) แต่ถ้าดูผลการผลิตก๊าซจากภาพที่ 23 จะเห็นว่าความเข้มข้นของ EDTA 90 มก./ลิตร ยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนอย่างชัดเจน ในทางชีวภาพค่าความน่าเชื่อถือทางสถิติที่น้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยนั้นจะไม่ละทิ้ง

Kern *et al.* (1992) กล่าวว่า การมี EDTA ปริมาณน้อยเพียง 0.3-0.5 mM หรือเท่ากับ 74-123 มก./ลิตร จะกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจนด้วย *Rhodospirillum rubrum* ให้

เพิ่มขึ้น เนื่องจากจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ของเอนไซม์ไฮโดรเจนอะปเทคไฮโดรจีเนส (Hup hydrogenase) และเคลื่อนย้าย (transfer) เหล็กไอออน ไปสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Koku *et al.*, 2002) แตกต่างจากทดลองนี้ ที่ปริมาณ EDTA น้อย (9-18 มก./ลิตร) จะส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน และพบการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนในอาหารที่มี EDTA 90 มก./ลิตร เนื่องจาก EDTA เป็น chelating agent สามารถจับกับโลหะหนัก ด้วยหมู่ carboxylate และ amine ดังนั้นการมี EDTA มากไป มีโอกาสจะไปจับโลหะหนักชนิด เหล็กไอออน และโมลิบดีนัมไอออนออกจากโครงสร้างของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทำให้แบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนช้า และปริมาณที่น้อยลง

จากการวิเคราะห์น้ำทิ้งแป้งมัน (ตารางที่ 15) ไม่พบ EDTA จึงตั้งสมมติฐานว่า ควรเติม EDTA ในปริมาณไม่เกิน 18 มก./ลิตร แต่หากน้ำทิ้งมีการปนเปื้อนของ EDTA ปริมาณมากจึงควรพิจารณาปริมาณ EDTA ในน้ำทิ้งเพื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม



ภาพที่ 23 กรดไฮดรอกซีบิวเตอริกที่แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ที่มี EDTA ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 4.5 9.0 13.5 18.0 และ 90.0 มก./ลิตร ในปริมาตรบรรจุ 60 มล.

ตารางที่ 25 แสดงปริมาณเซลล์, ปริมาณไฮโดรเจนสะสม และปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรีย *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ผลิตได้ต่อ 1 มิลลิกรัมเซลล์ในชั่วโมงสุดท้าย และอัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย ในอาหาร Ormerod's malate-glutamate ในปริมาตรบรรจุ 60 มล. ที่มี EDTA ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ EDTA (มก./ลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง ใน 60 มล. (มก.)	ปริมาณ ไฮโดรเจน (มล.)	มล./มก. ของ น้ำหนักเซลล์ แห้ง	อัตราการผลิต ไฮโดรเจนสูงสุด (มล./ลิตร/ชม.)
0.00	36.61	51.38	1.40	10.28 (29-50 ชม.)
4.50	34.80	47.73	1.37	11.32 (24-50 ชม.)
9.00	32.24	53.63	1.66	11.73 (24-50 ชม.)
13.50	34.80	52.40	1.50	11.83 (26-50 ชม.)
18.00	32.39	54.75	1.69	12.32 (24-50 ชม.)
90.00	44.14	35.15	0.80	9.93 (26-50 ชม.)

ตารางที่ 26 ตาราง ANOVA แสดงความสำคัญทางสถิติของ EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Response * EDTA	Between Groups	529.854	5	105.971	3.185	.095
	Within Groups	199.604	6	33.267		
	Total	729.457	11			

ผลของการศึกษาอิทธิพลของโลหะหนัก และสารจับโลหะข้างต้น พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด ต้องมีการใส่ในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้การผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียให้ผลดีที่สุด

6. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเหล็กไอออน โมลิบดีนัมไอออน และ EDTA

ในการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 โดยใช้วิธีการทำนายทางสถิติ และทำการทดลองเพื่อยืนยันผล

สารบางชนิดอาจต้องใส่เพิ่ม หรือบางชนิดใส่ในปริมาณที่น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับในอาหารมาตรฐาน ส่งผลให้ราคาต้นทุนการผลิตไฮโดรเจนก็เปลี่ยนแปลงไปด้วย ความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ EDTA ที่ทำให้แบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด จากการทดลองที่ศึกษาที่ละปัจจัยข้างต้นนี้ อาจไม่ใช้ค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดจริง โดยข้อจำกัดของวิธีศึกษาที่ละปัจจัย (one factor at a time) นี้ คือไม่สามารถรับรองผลได้ว่าปัจจัยที่ศึกษานั้นให้คำตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด อีกทั้งถ้ามีปัจจัยหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกัน การศึกษาที่ละปัจจัยจะไม่สามารถหาผลกระทบร่วมของปัจจัยที่ทำการศึกษาได้ (Araujo and Brereton, 1996; Wang and Wan, 2009) จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงมีการนำเทคนิค Multivariate Statistics Techniques เข้ามาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสม ด้วยทฤษฎีพื้นผิวตอบสนองหรือ Response Surface Methodology (RSM) ซึ่งวิธีนี้เป็นกระบวนการที่นำความรู้ทางคณิตศาสตร์ และทางสถิติ เข้ามาใช้ร่วมกันเพื่อช่วยหาผลตอบสนองที่ดีที่สุด (Optimum Response) และเร็วที่สุดเพื่อเป็นการลดจำนวนการทดลองที่ซ้ำกันลงไป เป็นการประหยัดทรัพยากรและเวลาที่ใช้ในการทดลอง

งานวิจัยก่อนหน้านี้ของ รศ.ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน ประสบผลสำเร็จในการใช้ทฤษฎีทางคณิตศาสตร์และสถิติ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส และสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แลคเคสสำหรับย่อยสลาย โดยจำนวนของปัจจัยที่ศึกษามี 7 ปัจจัย และ 3 ปัจจัย ตามลำดับ ซึ่งใช้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design และ Latin square experimental design ตามลำดับ (Teerapatsakul et al., 2007, 2008) และมีงานวิจัยอื่นที่ใช้ทฤษฎีทางคณิตศาสตร์และสถิติในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยบางประการสำหรับการผลิตไฮโดรเจนด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอื่นๆ ได้ (Shi and Yu, 2005; Chen et al., 2007, 2008; Jamil et al., 2009) และเฟอร์เมนต์เทฟแบคทีเรีย (Van et al., 2001; Mu et al., 2006, 2009; Jo et al., 2008; Pan et al., 2008) แต่ยังไม่มียางานถึงการนำทฤษฎีทางคณิตศาสตร์และสถิติในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้ง 3 คือเหล็กไอออน, โมลิบดีนัมไอออน และ EDTA ในการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะ

หาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้ง 3 ต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 โดยใช้ทฤษฎีทางคณิตศาสตร์และสถิติ

6.1 การออกแบบการทดลอง (Experimental design) และทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีทางสถิติ

การทดลองนี้เลือกปัจจัย 3 ปัจจัย คือ เหล็กไอออน โมลิบดีนัมไอออน และ EDTA ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจน นำข้อมูลผลการผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดจากการทดลองแบบ one factor at a time เมื่อใช้สาร $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และ EDTA ความเข้มข้นต่างๆ กับปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมสุดท้าย (มล.) ที่แบคทีเรียผลิตได้ (ภาพที่ 24) มาเลือกค่าความเข้มข้นที่จะใช้กำหนดระดับของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken Design และกำหนดความเข้มข้นของแต่ละปัจจัยเป็น 3 ระดับ (3 level)

ภาพที่ 24 แสดงให้เห็นว่า (ก) ค่าความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ 53.1 มก./ลิตร ให้ปริมาณไฮโดรเจนสูงที่สุด และให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด (ตารางที่ 21) ดังนั้นจึงกำหนดค่านี้เป็นระดับกลาง (0) และกำหนดให้ความเข้มข้น 10.6 มก./ลิตร เป็นค่าระดับต่ำ (-1) และความเข้มข้น 95.6 มก./ลิตร เป็นค่าระดับสูง (+1) โดยให้ผลต่างของค่าที่เป็นระดับต่ำกับระดับกลาง และค่าที่เป็นระดับสูงกับระดับกลางมีผลต่างเท่ากัน (ภาพที่ 24ก) (ข) ค่าความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ที่ 0.7 มก./ลิตร ให้ปริมาณไฮโดรเจนสูงที่สุด (ตารางที่ 23) จึงกำหนดค่านี้เป็นระดับกลาง และกำหนดให้ความเข้มข้น 0 มก./ลิตร เป็นค่าระดับต่ำ (-1) และความเข้มข้น 1.4 มก./ลิตร เป็นค่าระดับสูง (+1) (ภาพ 24ข) (ค) ค่าความเข้มข้นของ EDTA ที่ 9 -18 มก./ลิตร ให้ปริมาณไฮโดรเจนค่าไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนนัก แต่ที่ความเข้มข้น 0 มก./ลิตร เกิดไฮโดรเจนช้าและอัตราการผลิตก๊าซช้ากว่าเล็กน้อย และเพื่อให้ครอบคลุมระดับความเข้มข้นที่ทำการศึกษาก็กำหนดให้ความเข้มข้น 9 มก./ลิตร เป็นระดับกลาง (0) ความเข้มข้น 0 มก./ลิตร เป็นค่าระดับต่ำ (-1) และความเข้มข้น 18 มก./ลิตร เป็นค่าระดับสูง (+1) (ภาพที่ 24ค) ตารางที่ 27 สรุปค่าระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้กับ Box-Behnken design

สมการที่ 13 เป็นสมการที่ใช้คำนวณหาจำนวนการทดลองทั้งหมด ที่ใช้ Box-Behnken design ออกแบบการทดลองสำหรับ 3 ปัจจัย ซึ่งกำหนดให้จำนวนการทดลองที่ค่ากลางมีจำนวน 3 ซ้ำ ได้ผลการออกแบบการทดลองทั้งสิ้น 15 การทดลอง ดังตารางที่ 28

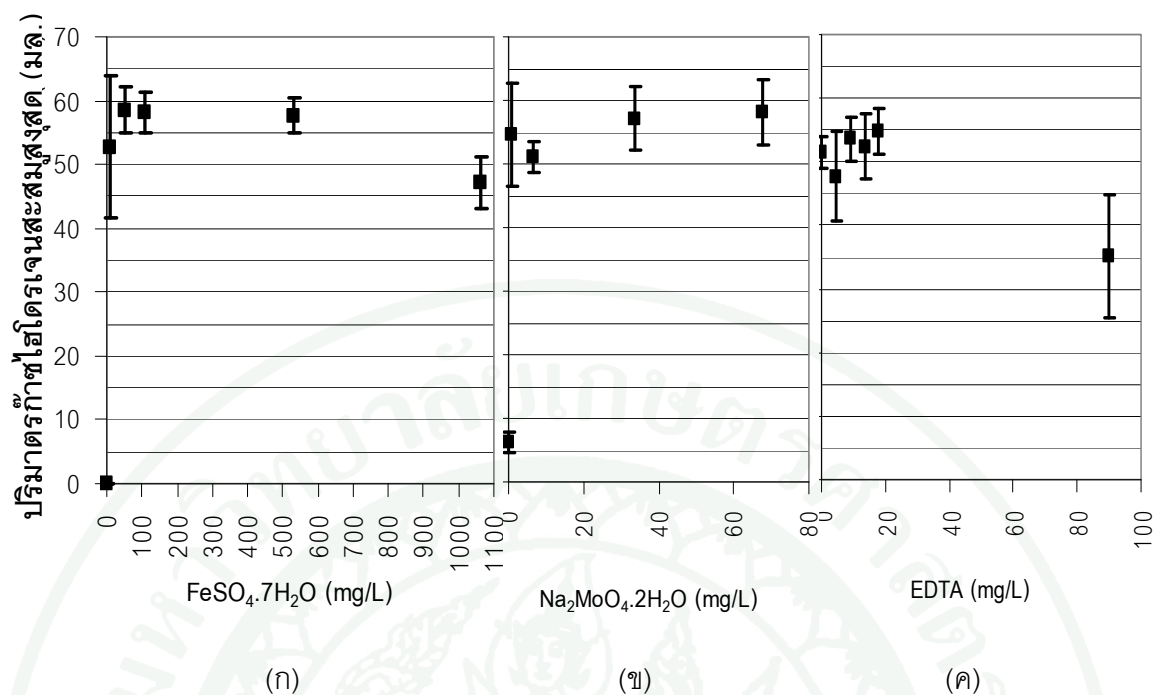
$$N = 2k(k-1) + C_p \quad (13)$$

N คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด (the number of experiments)

k คือ จำนวนปัจจัย (number of factors)

C_p คือ จำนวนการทดลองซ้ำที่ระดับกลาง (the number of central points)

ตารางที่ 28 แสดงจำนวนการทดลอง 15 การทดลองที่ออกแบบโดย Box-Behnken เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และ EDTA และแสดงให้เห็นผลการทดลองจริงของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่มีความเข้มข้นของปัจจัยต่างๆ และผลจากการทำนายไปในทางเดียวกัน และจะเห็นว่าค่าความเข้มข้นระดับกลาง (centre point) ของปัจจัยทั้งสามเป็นค่าที่ให้ผลดีที่สุด จากนั้น นำข้อมูลที่ได้ ไปวิเคราะห์ค่าถดถอย หรือค่า regression ของการวางแผนการทดลองแล้วสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสาม สร้างเป็นแผนภาพพื้นผิวสัมผัส (3D response surface plot) และ contour plot ซึ่งจะสามารถทำนายความเข้มข้นที่ดีที่สุดของปัจจัยทั้งสามได้ต่อไปในข้อ 6.2



ภาพที่ 24 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสุดท้ายที่วัดได้จริง เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ FeSO₄.7H₂O (ก) Na₂MoO₄.2H₂O (ข) และ EDTA (ค)

ตารางที่ 27 แสดงความเข้มข้นของสารประกอบ 3 ชนิดเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรของปัจจัยทั้งสาม ที่นำมากำหนดให้เป็นระดับต่างๆ ที่ใช้ในการออกแบบการทดลองโดย Box-Behnken

ปัจจัย	ระดับต่ำ (-1)	ระดับกลาง (0)	ระดับสูง (+1)
A. FeSO ₄ .7H ₂ O (มก./ลิตร)	10.6	53.1	95.6
B. Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (มก./ลิตร)	0	0.7	1.4
C. EDTA (มก./ลิตร)	0	9	18

ตารางที่ 28 ผลการออกแบบการทดลองโดยใช้ Box-Behnken design ของปัจจัย 3 ปัจจัย และปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองจริง (experimental value) หรือ true value และปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทำนาย (predicted value) ด้วยสมการที่ 14

จำนวนการ ทดลอง (experiment no.)	ได้ระดับของปัจจัย (coded levels)			ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มล.) ที่ได้จาก	
				การทดลองจริง	การทำนาย
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	EDTA	(experimental value)	(predicted value)
1	-1	-1	0	48.05	48.33
2	1	-1	0	43.80	45.14
3	-1	1	0	58.00	56.66
4	1	1	0	56.95	56.67
5	-1	0	-1	55.20	55.80
6	1	0	-1	47.55	47.09
7	-1	0	1	43.70	44.16
8	1	0	1	50.30	49.70
9	0	-1	-1	46.30	45.42
10	0	1	-1	52.70	53.44
11	0	-1	1	39.75	39.01
12	0	1	1	49.95	50.83
13	0	0	0	58.21	64.39
14	0	0	0	68.45	64.39
15	0	0	0	66.50	64.39

6.2 การวิเคราะห์ความถดถอยหรือ ค่า regression ของการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design, การวิเคราะห์ความแปรปรวนในสมการถดถอย และการทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยทั้งสามด้วยวิธีทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม 2 โปรแกรม คือ SPSS-Statistica และ Minitab แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

6.2.1 ด้วย SPSS-Statistica

ด้วยโปรแกรม SPSS-Statistica ที่นิยมใช้กันมากในภาควิชาจุลชีววิทยา จึงได้นำโปรแกรมนี้มาใช้วิเคราะห์ความแปรปรวนในสมการถดถอย ในการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design ผลการวิเคราะห์ความถดถอยของแผนการทดลอง แสดงในตารางที่ 29 จากการประเมินค่า coefficient และค่า P-value ของแต่ละพารามิเตอร์ แสดงให้เห็นว่า ในเทอมของสมการเส้นตรงของปัจจัยโซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) ส่วนในเทอมสมการเส้นตรงของเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และเทอมของ EDTA ไม่มีนัยสำคัญต่อปริมาณการผลิตไฮโดรเจน ($p\text{-value} > 0.05$) ในขณะเดียวกันในเทอมยกกำลังสองของสามปัจจัย พบว่า เฟอร์รัสซัลเฟต (Fe^2) และโซเดียมโมลิบเดต (Mo^2) มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) และส่วน EDTA (EDTA^2) มีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.01$) ส่วนในเทอมของปฏิกริยาร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยไม่มีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ของปัจจัยคู่ใดที่มีผลต่อกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$) ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในสมการถดถอยที่ใช้สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เมื่อทดสอบด้วย F-test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จะเห็นได้จากค่า F ที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 7.356 (ตารางที่ 30) ซึ่งสูงกว่าค่า F ที่ได้จากตารางที่ระดับ 5% (จากตารางค่า $F_{0.05}(9, 5) = 4.78$ และ $F_{0.01}(9, 5) = 10.15$) สะท้อนให้เห็นว่าโมเดลนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ (อนุวัตร, 2549) และสมการที่ได้สามารถอธิบายข้อมูลที่ได้จากการทดลองได้อย่างดีถึงร้อยละ 93 (R^2 มีค่าเท่ากับ 0.930) (ตารางที่ 30) ส่วนอีกร้อยละ 7 ไม่สามารถอธิบายได้ชี้ให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายสอดคล้องกัน ดังนั้น การใช้โมเดลนี้ในการทำนายการผลิตไฮโดรเจนจึงมีความน่าเชื่อถือ

จากผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ทดลองได้จริง (experimental value หรือ true value) จาก 15 การทดลองที่กำหนดโดย Box-Behnken (ตารางที่ 28) นำมาสร้างสมการ

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของปัจจัยทั้งสามกับปริมาณไฮโดรเจน (ค่าตอบสนอง, response) ด้วยโปรแกรม SPSS ได้สมการ Quadratic equation ดังสมการที่ 14

เมื่อนำความเข้มข้นจริงของปัจจัยทั้งสามมาแทนค่าในสมการ โดยหาความสัมพันธ์ที่ระบุโดยกำหนดให้ปัจจัยที่เหลือเป็นค่ากลางจะสามารถสร้างแผนภาพพื้นผิวสัมผัส (3D response surface plot) และคอนทัวร์ (contour plot) ด้วยโปรแกรม Statistica เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ระบุได้ และทำนายสภาวะที่ดีที่สุดของทั้ง 3 ได้ดังภาพที่ 25 ก, ข, ค

$$Y = 43.5297 + 0.1925X_1 + 25.3031X_2 + 1.3108X_3 - 0.0030X_1X_1 - 14.9991X_2X_2 - 0.1218X_3X_3 + 0.0269X_1X_2 + 0.0093X_1X_3 + 0.1508X_2X_3 \quad (14)$$

Y คือ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทำนาย (มล.) (predicted response variable, mL)

X₁ คือ ค่าความเข้มข้นจริงของเฟอรัสซัลเฟต (มก./ลิตร)

X₂ คือ ค่าความเข้มข้นจริงของโซเดียมโมลิบเดต (มก./ลิตร)

X₃ คือ ค่าความเข้มข้นจริงของ EDTA (มก./ลิตร)

จากภาพทั้งสามสามารถทำนายความเข้มข้นของปัจจัยทั้งสามที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนโดย *R. gelatinosus* SB24 ดังนี้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฟอรัสซัลเฟต เท่ากับ 49.6 มก./ลิตร โซเดียมโมลิบเดตเท่ากับ 0.95 มก./ลิตร และ EDTA เท่ากับ 7.98 มก./ลิตร

ตารางที่ 29 แสดงผลของการวิเคราะห์รีเกรสชัน (regression) หรือค่าถดถอยของการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design สำหรับการผลิตไฮโดรเจน ด้วยโปรแกรม SPSS-Statistica

เทอมของ	Unstandardized		Standardized		P < 0.05	
	Coefficients		Coefficients		t	Sig.
	B	Std. Error	Beta			
(Constant)	43.5297	5.159			8.437	0.000
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1925	0.131	0.751		1.472	0.201
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25.3031	7.094	1.625		3.567	0.016*
EDTA	1.3408	0.552	1.107		2.430	0.059
Fe ²	-0.0030	0.001	-1.269		-2.808	0.038*
Mo ²	-14.9991	3.879	-1.425		-3.866	0.012*
EDTA ²	-0.1218	0.023	-1.913		-5.188	0.004**
Fe.Mo	0.0269	0.061	0.128		0.438	0.680
Fe.EDTA	0.0093	0.005	0.572		1.951	0.109
Mo.EDTA	0.1508	0.290	0.138		0.520	0.625

R square (R^2) = 0.930, Adjusted R square (adj R^2) = 0.803

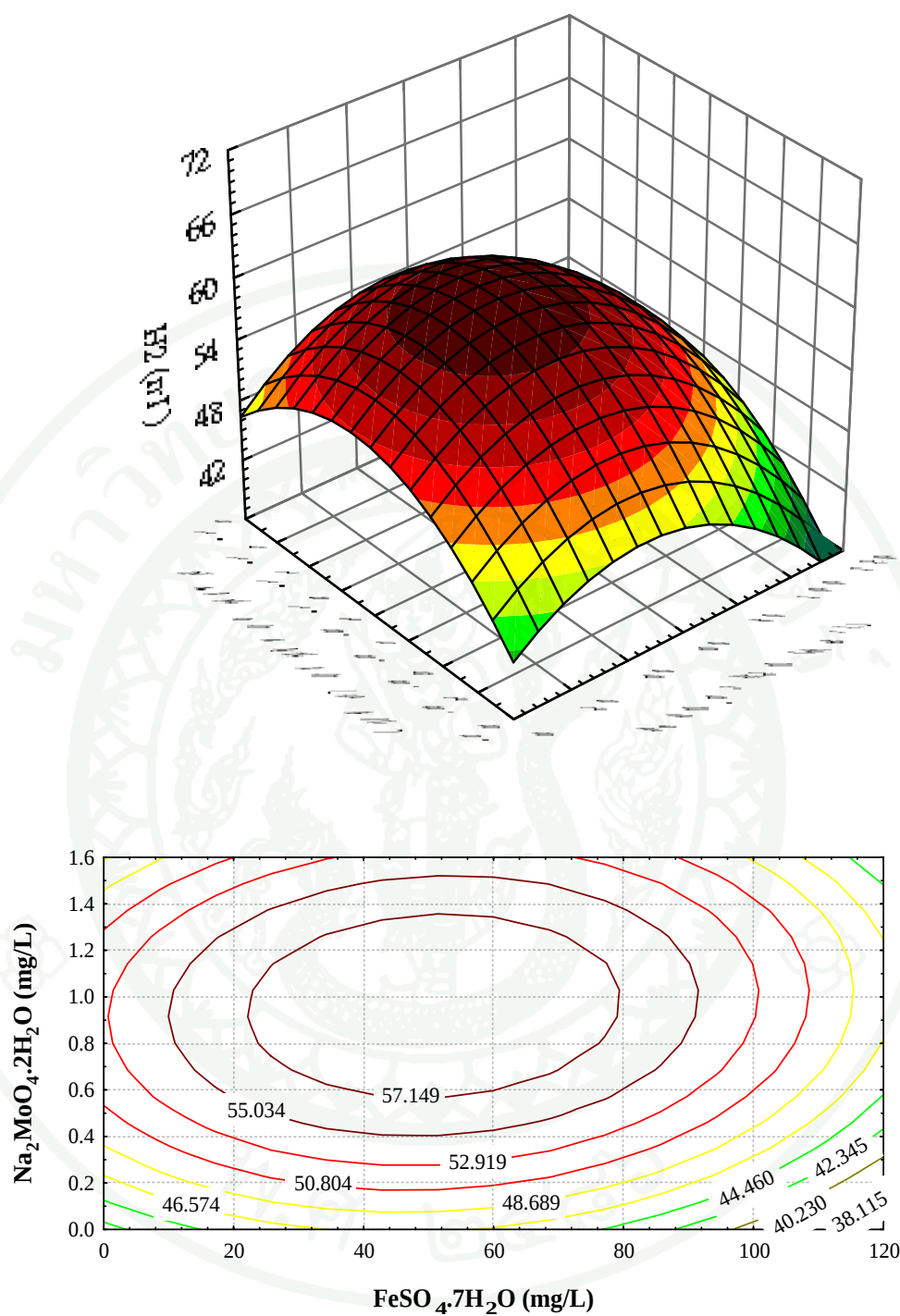
* มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 5% (significant at 5% level)

**มีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ ที่ระดับ 1% (highly significant at 1% level)

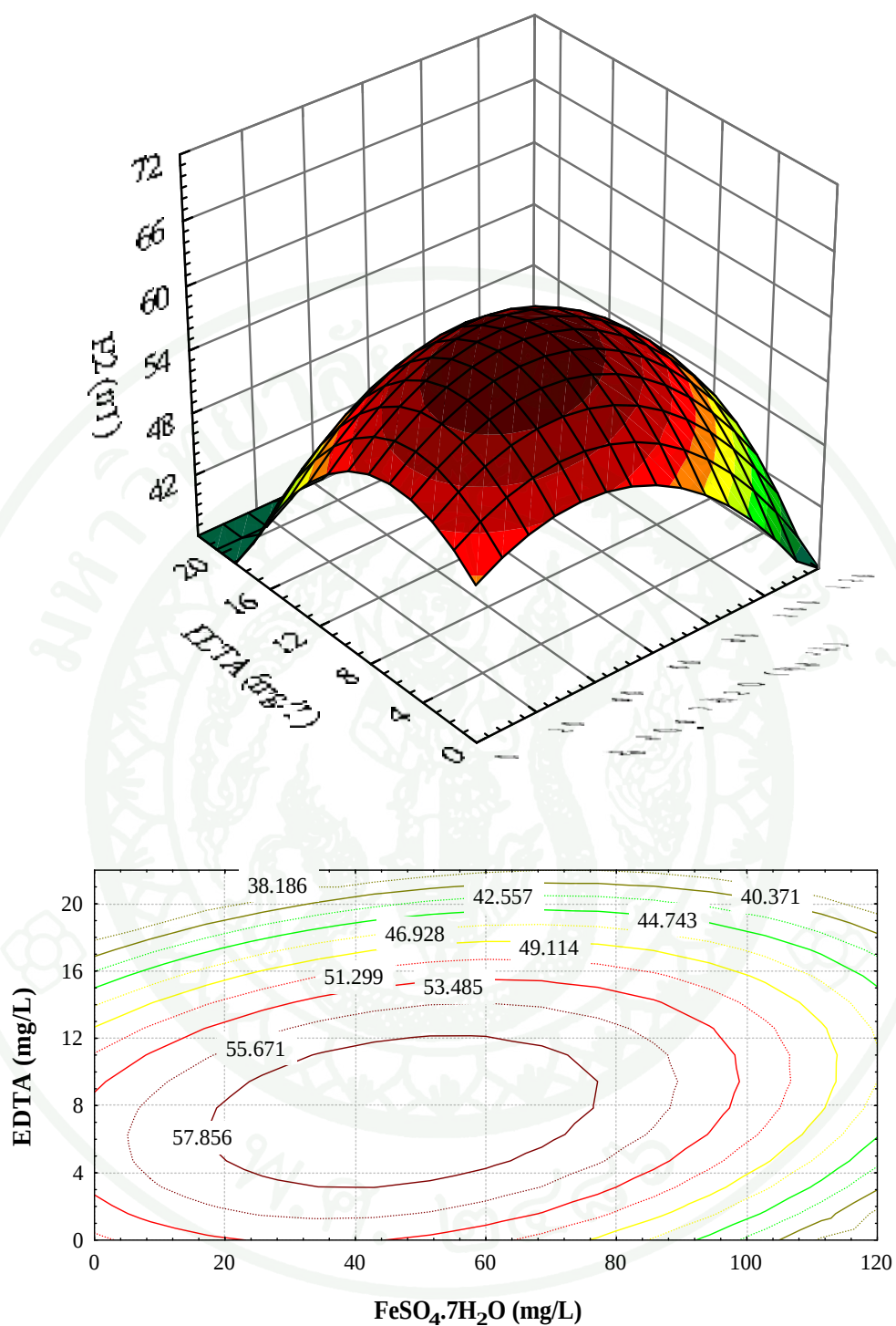
ตารางที่ 30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในสมการถดถอยที่ใช้สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสง (Analysis of variance in the regression model for optimization of photoproduction of H_2) ที่ได้จากโปรแกรม SPSS-Statistica

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	883.173	9	98.130	7.356	.020*
Residual	66.705	5	13.341		
Total	949.878	14			

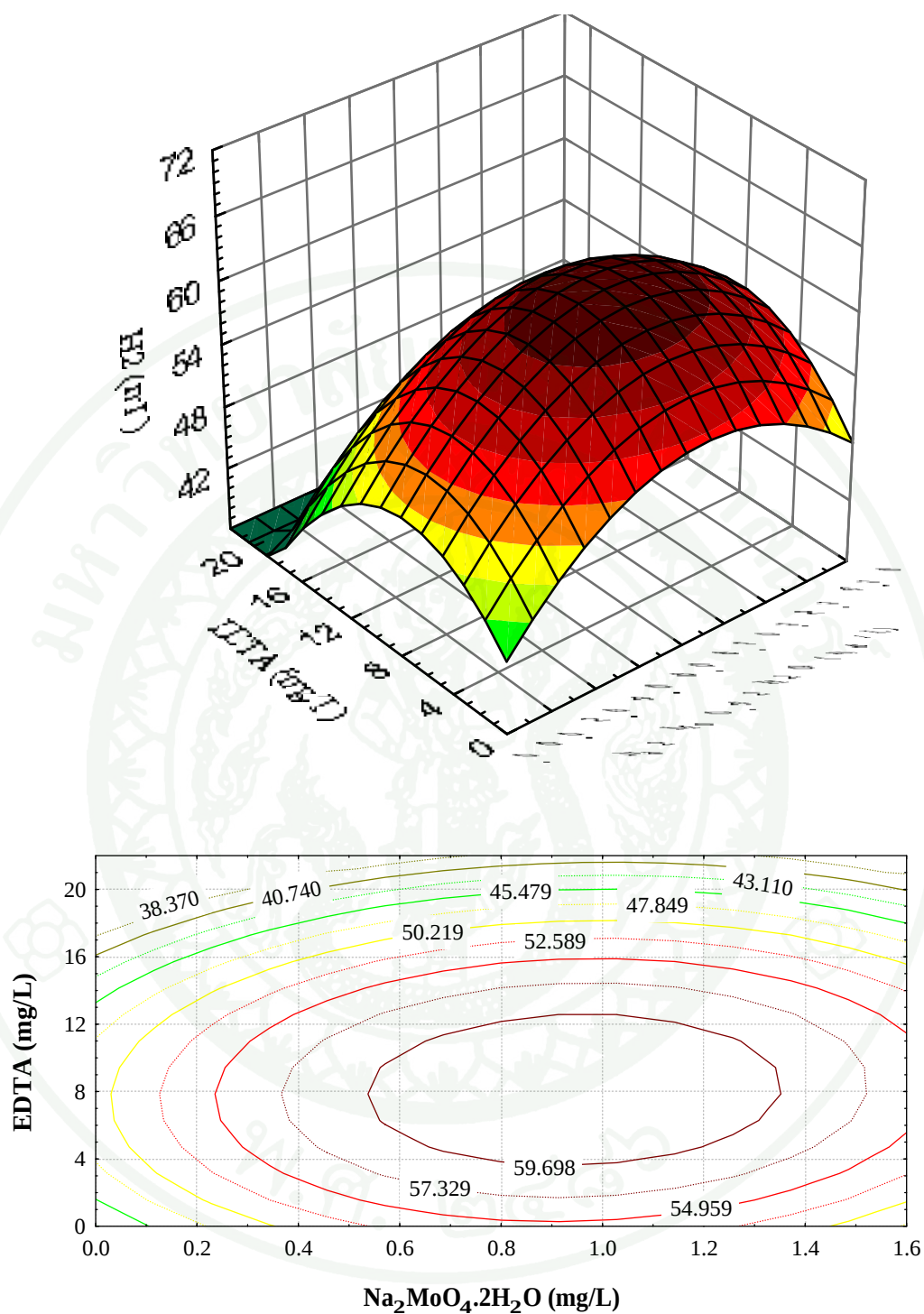
*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5%



ภาพที่ 25 (ก) แผนภาพพื้นผิวสามมิติ (3D response surface plot) และคอนทัวร์ (contour plot) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และ โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24



ภาพที่ 25 (ข) แผนภาพพื้นผิวสามมิติ (3D response surface plot) และคอนทัวร์ (contour plot) แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และ EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinosus* SB24



ภาพที่ 25 (ค) แผนภาพพื้นผิวสามมิติ (3D response surface plot) และคอนทัวร์ (contour plot) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) และ EDTA ต่อการผลิตไฮโดรเจนโดย *Rubrivivax gelatinous* SB24

6.2.2 ด้วย Minitab

การนำโปรแกรมมินิแทบ (Minitab) มาใช้ทำนายสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้งสาม เนื่องจากเป็นโปรแกรมที่ใช้งานง่ายบนวินโดว มีฟังก์ชันหลากหลาย เช่นสามารถปรับแก้ได้ด้วยมือ (manual adjustment) ทั้งการวิเคราะห์และแสดงผลทางสถิติ แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาออกมาในรูปแบบกราฟ และสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ของผลลัพธ์กับปัจจัยที่ศึกษาได้ รวมทั้งทำนายสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยได้อีกด้วย จึงทดลองใช้โปรแกรมดังกล่าวเปรียบเทียบกับ SPSS-Statistica

จากการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design แล้ววิเคราะห์ความถดถอยหรือค่า regression ของแผนการทดลองด้วยโปรแกรม Minitab ให้ผลการวิเคราะห์เช่นเดียวกับเมื่อใช้ SPSS-Statistica (ตารางที่ 31, 32) และชี้ให้เห็นว่าโมเดลที่ออกแบบเพื่อการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้งสามมีความน่าเชื่อถือที่ระดับร้อยละ 93 โดยค่าปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการสอดคล้องกัน เช่นเดียวกับเมื่อใช้ SPSS-Statistica

จากผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองจริง 15 การทดลอง ซึ่งออกแบบโดย Box-Behnken (ตารางที่ 28) สามารถสร้างสมการ Quadratic equation ด้วยโปรแกรม Minitab เป็นสมการที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของปัจจัยทั้งสามที่แสดงเป็นค่าโค๊ดกับปริมาณไฮโดรเจน (ค่าตอบสนอง, response)

$$Y = 64.3867 - 0.79375x_1 + 4.9625x_2 - 2.25625x_3 - 5.33708x_1^2 - 7.34958x_2^2 - 9.86208x_3^2 + 0.8x_1x_2 + 3.5625x_1x_3 + 0.95x_2x_3 \quad (15)$$

Y คือ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการทำนาย (มล.)

(predicted response variable, mL)

x_1 คือ ค่าโค๊ดของความเข้มข้นเฟอร์รัสซัลเฟต

x_2 คือ ค่าโค๊ดของความเข้มข้นโซเดียมโมลิบเดต

x_3 คือ ค่าโค๊ดความเข้มข้น EDTA

เมื่อได้สมการแล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้ Response Optimizer ของโปรแกรม มินิแทบ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลแสดงดังภาพ 26ก แสดงกราฟ 3 กราฟ ซึ่งมีความสัมพันธ์กันโดย แกนนอนเส้นประ แสดงถึงปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ได้จากการทำนาย และแนวตั้งแสดงค่าโค๊ด ของสารทั้งสาม ที่เป็นสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนสูงที่สุด จากภาพ 26ก ก่อนปรับแกนนอน พบ ว่าเฟอรัสซัลเฟต โซเดียมโมลิบเดต และ EDTA อยู่ที่ค่าโค๊ดเท่ากับ 0 0 และ -0.116 เมื่อใช้ สมการที่ 16 เปลี่ยนค่าโค๊ดไปเป็นความเข้มข้นของสารจะได้ค่าความเข้มข้นจริงเท่ากับ 53.1 0.7 และ 7.95 มก./ลิตร ตามลำดับ และทำนายผลการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดได้เท่ากับ 64.5 มล.

เมื่อทดลองปรับแกนนอนกราฟให้เข้าใกล้ยอด peak ครั้งที่ 1 จะทำให้ค่าโค๊ดของ เฟอรัสซัลเฟต, โซเดียมโมลิบเดต และ EDTA เปลี่ยนแปลงเป็น 0 0.216 และ -0.116 ดังภาพที่ 26ข คำนวณความเข้มข้นจริงของปัจจัยทั้งสามด้วยสมการที่ 16 ได้ค่าเท่ากับ 53.1 0.85 และ 7.95 มก./ลิตร ตามลำดับ แล้วสามารถทำนายปริมาณไฮโดรเจนสูงที่สุดได้มากขึ้นคือได้เท่ากับ 65.2 มล.

การปรับแกนนอนครั้งที่ 2 จะกล่าวถึงต่อไป

สมการที่ 16 แสดงสมการที่ใช้ในการเปลี่ยนค่าโค๊ดไปเป็นค่าความเข้มข้นจริง ของแต่ละปัจจัยสำหรับใช้ในการทดลอง

$$x_i = \frac{(X_i - X_o)}{\Delta X_i} \quad (16)$$

x_i = ค่าโค๊ดของปัจจัย (code value of variable)

X_i = ค่าความเข้มข้นจริงของปัจจัย (the actual value of variable)

X_o = ค่าความเข้มข้นจริงของปัจจัยที่ระดับกลาง (the actual value of the X_i at the centre point)

ΔX_i = ค่าความต่างของความเข้มข้นจริง (the step change of variable)

ตารางที่ 31 แสดงผลของการวิเคราะห์รีเกรสชัน (regression) หรือค่าถดถอยของการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design สำหรับการผลิตไฮโดรเจน ด้วยโปรแกรมมินิแทป โดยใช้ค่าโค้ด (code value)

เทอมของ	Unstandardized		Standardized		Sig.
	Coefficients		Coefficients		
	B	Std. Error	Beta	t	
(Constant)	64.3867	2.109		30.533	0.000
FeSO ₄ ·7H ₂ O	- 0.7938	1.291	-0.073	0.615	0.566
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4.9625	1.291	0.455	3.843	0.012*
EDTA	-2.2562	1.291	-0.207	-1.747	0.141
Fe ²	-5.3371	1.901	-0.355	-2.808	0.038*
Mo ²	-7.3496	1.901	-0.461	-3.866	0.012*
EDTA ²	-9.8621	1.901	-0.618	-5.188	0.004**
Fe.Mo	0.8000	1.826	0.052	0.438	0.680
Fe.EDTA	3. 5625	1.826	0.231	1.951	0.109
Mo.EDTA	0.9500	1.826	0.062	0.520	0.625

R square (R^2) = 0.930, Adjusted R square (adj R^2) = 0.803

* มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 5% (significant at 5% level)

**มีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติ ที่ระดับ 1% (highly significant at 1% level)

ตารางที่ 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในสมการถดถอยที่ใช้สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้แสง (Analysis of variance in the regression model for optimization of photoproduction of H_2) ที่ได้จากโปรแกรม Minitab

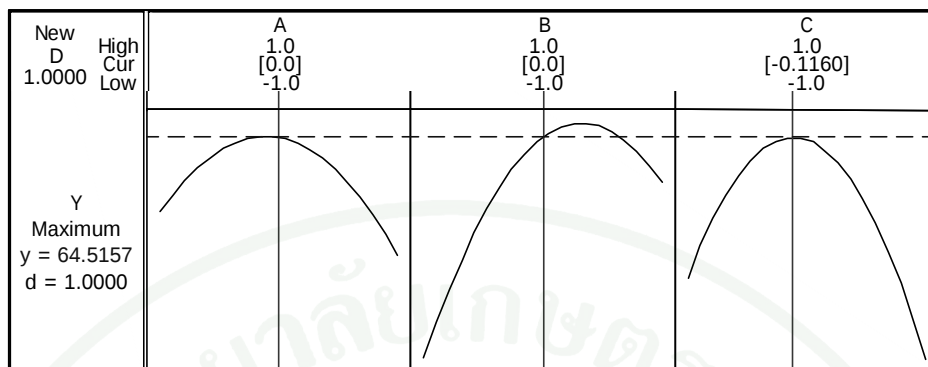
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	883.17	9	98.13	7.36	.020*
Residual	66.70	5	13.34		
Total	949.88	14			

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5%

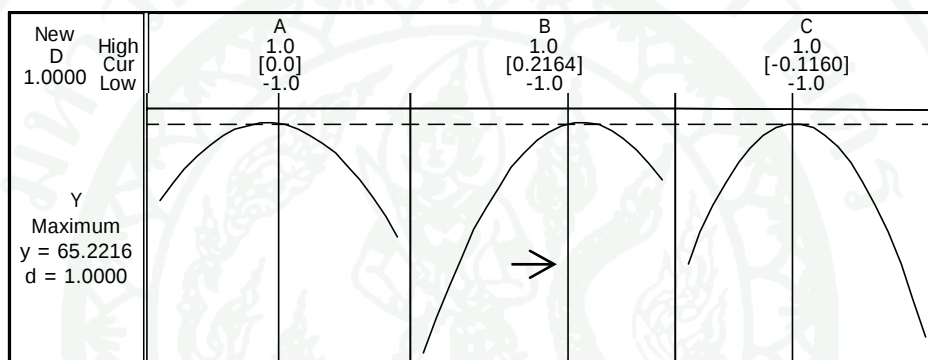
เส้นในแนวตั้งแสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย

Response surface graph from 1st derivative equation

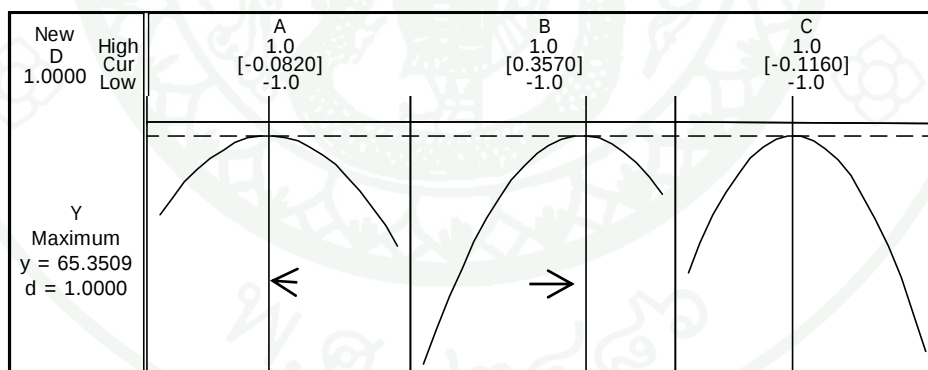
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลตอบสนองของระดับปัจจัยที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดย

optimizer mode ในโปรแกรม Minitab (ก) แสดงผลก่อนปรับแกน (ข)

แสดงผลหลังปรับแกนครั้งที่ 1 ตามคำแนะนำของ ดร.นันทิยา และ (ค) แสดงผล

หลังปรับแกนครั้งที่ 2 โดยตั้งค่าโค้ดตามสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทำนายจาก

SPSS-Statistica

ตารางที่ 33 เปรียบเทียบผลการทำนายปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ในสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้งสาม ที่ทำนายด้วย SPSS-Statistica และ Minitab ปรับแก้ครั้งที่ 1 (1st) เปรียบเทียบกับสภาวะเดิม (Original medium)

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)			ปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการทำนาย (มล.)
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	EDTA	
Optimization by SPSS-Statistica	49.60	0.95	7.98	65.3**
Optimization by Minitab ปรับแก้ 1 st	53.10	0.85	7.95	65.2**
อาหารดั้งเดิม (Original medium)	10.60*	0.68*	18.00*	44.0**

* ความเข้มข้นจริงที่ทำการทดลองในอาหารดั้งเดิม (true values)

** ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ได้จากการทำนายโดยใช้สมการที่ 15

ตารางที่ 33 สรุปสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม SPSS-Statistica คือความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต 49.6 มก./ลิตร โซเดียมโมลิบเดต 0.95 มก./ลิตร และ EDTA 7.98 มก./ลิตร และจากการทำนายหลังจากการปรับแก้ครั้งที่ 1 ด้วย Minitab คือความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต 53.1 มก./ลิตร โซเดียมโมลิบเดต 0.85 มก./ลิตร และ EDTA 7.95 มก./ลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย เมื่อทำนายปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสะสมจากสภาวะเหมาะสมทั้ง 2 ด้วยสมการเดียวกันคือสมการที่ 15 พบว่ามีค่าเท่ากับ 65.3 และ 65.2 มล. ตามลำดับ ในทางสถิตินั้นถือว่าค่าที่ได้จากการทำนายทั้ง 2 สภาวะไม่แตกต่างกัน และพบว่าอยู่ในช่วงที่ทำนายการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดคือ 65 มล. เท่ากัน และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารดั้งเดิม (Ormerod's) ที่มีเฟอร์รัสซัลเฟต 10.6 มก./ลิตร, โซเดียมโมลิบเดต 0.68 มก./ลิตร และ EDTA 18.0 มก./ลิตร ปริมาณไฮโดรเจนของสภาวะที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธีทางสถิติทั้งสอง มีค่ามากกว่าปริมาณไฮโดรเจนที่ทำนายจากสภาวะอาหารดั้งเดิมประมาณ 1.5 เท่า

จากตารางที่ 33 ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของปัจจัยทั้งสามที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรมทั้งสอง ได้ความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต 49.60-53.1 มก./ลิตร, โซเดียมโมลิบเดต 0.85-0.95 มก./ลิตร และ EDTA 7.95-7.98 มก./ลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารดั้งเดิม (Original medium) ที่มีเฟอรัสซัลเฟต, โซเดียมโมลิบเดต และ EDTA เท่ากับ 10.6 0.68 และ 18.0 มก./ลิตร พบว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตมากขึ้นจากอาหารดั้งเดิม 4-5 เท่า ความเข้มข้นของโซเดียมโมลิบเดตมากขึ้นจากอาหารดั้งเดิมเพียง 1.1-1.3 เท่าและความเข้มข้นของ EDTA น้อยลงจากอาหารดั้งเดิม 2 เท่า

อย่างไรก็ตามด้วยโปรแกรมมินิแทบเมื่อใช้ Optimizer mode จะได้ค่าที่ทำนายออกมา (ภาพที่ 26ก) แต่ผู้วิจัยสามารถปรับแก้เอง (manually mode) ทำให้ได้ค่าที่ต่างไปเล็กน้อยได้ ในทางสถิติแม้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในทางชีวภาพถือว่ามีความหมาย ดังนั้น เราจึงได้ทดลองปรับค่าแกนใน Minitab เป็นครั้งที่ 2 โดยให้แกนทั้งสาม อยู่ในสภาวะเดียวกับสภาวะที่ทำนายโดย Statistica คือความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต, โซเดียมโมลิบเดต และ EDTA เท่ากับ 49.6 0.95 และ 7.98 มก./ลิตร ตามลำดับ คำนวณกลับเป็นค่าโค้ดโดยสมการที่ 16 ได้ค่าโค้ด -0.082 0.360 และ -0.116 จะได้ภาพที่ปรับแก้แล้วดังภาพที่ 26ค เมื่อนำค่าโค้ดทั้ง 3 ไปทำนายผลการผลิตไฮโดรเจน พบว่าได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 65.3 มล. ซึ่งเท่ากับผลที่ทำนายโดยโปรแกรม SPSS-Statistica

แสดงให้เห็นว่าตัวโปรแกรมไม่ได้ทำให้การทำนายแตกต่างกัน แต่สิ่งที่ทำให้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับผู้ใช้โปรแกรม

6.3 การทดลองจริงเพื่อยืนยันผลการทำนายสภาวะที่ดีที่สุด

นำสภาวะเหมาะสมของปัจจัยทั้งสามที่ได้จาก SPSS-Statistica และ Minitab ที่ได้ครั้งที่ 1 ตามตารางที่ 33 ไปทำการทดลองจริงในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนในสภาวะทั้งสองได้เท่ากับ 76.4 และ 72.3 มล. ตามลำดับ ซึ่งก็มากกว่าปริมาณไฮโดรเจนที่แบคทีเรียผลิตได้ในสภาวะของอาหารสูตรดั้งเดิมที่ทำการทดลองจริงอยู่ 1.2 เท่า ที่ได้ปริมาณไฮโดรเจนเพียง 61.1 มล. เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียในสภาวะที่ทำนายโดย SPSS-Statistica หรือ Minitab ที่ได้จากการปรับแก้ครั้งที่ 2 มีค่าเท่ากับ 15.52 มล./ลิตร/ชม. สูงกว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียของสภาวะ Minitab ที่ได้จาก

การปรับแก้ครั้งที่ 1 ซึ่งมีอัตราการผลิตเท่ากับ 14.13 มล./ลิตร/ชม. ดังแสดงในตารางที่ 34 แสดงให้เห็นว่า การปรับปรุงปริมาณเหล็กไอออน โมลิบดีนัมไอออน และ EDTA ให้เหมาะสมนี้ นอกจากจะทำให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นแล้ว ยังมีผลเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้นด้วย โดยดูจากค่ามิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรของเซลล์ที่สัปดาห์ขึ้นต่อเวลาที่เซลล์ใช้เป็นชั่วโมงนั่นเอง

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟตที่ใช้จากทั้งสองสภาวะต่างกันอยู่ 4 มก./ลิตร ซึ่งในทางสถิตินั้นไม่ต่างกัน แต่ในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไม่เพียงแต่ต้องการการผลิตที่สูงที่สุด แต่ยังต้องการลดปริมาณของสารบางชนิดที่ไม่มีความจำเป็นเพื่อลดต้นทุนในการผลิตให้น้อยลงเมื่อจะขยายขนาด ดังนั้น หากขยายขนาดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เช่นทำในถัง reactor 6-10 ลิตรที่ออกแบบ การใช้ปริมาณสารน้อยกว่าย่อมจะคุ้มค่ากว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะที่ทำนายโดย SPSS-Statistica หรือ Minitab ที่ปรับแก้ครั้งที่ 2 ที่มีเฟอร์รัสซัลเฟต, โซเดียมโมลิบเดต และ EDTA เท่ากับ 49.6 0.95 และ 7.98 มก./ลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 34 เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยทั้งสาม ที่ทำนายด้วย SPSS-Statistica หรือ Minitab ปรับแก้ครั้งที่ 2nd และ Minitab ปรับแก้ครั้งที่ 1 (1st) และค่าไฮโดรเจนจากการทำนาย (predicted H₂) ค่าเฉลี่ยปริมาณไฮโดรเจนที่ได้จากการทดลองจริง (Exp H₂) และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเฉลี่ยเปรียบเทียบกับสภาวะเดิม (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 8 ซ้ำ)

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง	ความเข้มข้น (มก./ลิตร)			predicted H ₂ (มล.)	Exp. H ₂ (มล.) (เฉลี่ย 8 ซ้ำ)	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (มล./ลิตร/ชม.)
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	EDTA			
Optimization by SPSS-Statistica หรือ Minitab 2 nd	49.60	0.95	7.98	65.3**	76.4	15.5
Optimization by Minitab 1 st	53.10	0.85	7.95	65.2**	72.3	14.1
อาหารดั้งเดิม (Original medium)	10.60*	0.68*	18.0*	44.0**	61.1	12.6

* ความเข้มข้นจริงที่ทำการทดลองในอาหารดั้งเดิม (true values)

** ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ได้จากการทำนายโดยใช้สมการที่ 15

อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ไม่ได้ต้องการเปรียบเทียบการทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยโปรแกรม 2 โปรแกรม เพียงแต่ต้องการนำเสนอการนำโปรแกรมทางสถิติซึ่งเป็นศาสตร์ที่เกี่ยวกับสิ่งไม่มีชีวิต (*in vitro*) มาใช้กับงานทางด้านชีววิทยา (*in vivo*) เพื่อเป็นข้อคิดสำหรับการเลือกใช้โปรแกรมให้เหมาะสม

สรุปว่าการนำวิธีทางสถิติมาใช้กับงานทดลองกับสิ่งมีชีวิตนั้นให้ผลสำเร็จได้ดี แต่ต้องคำนึงถึงจุดประสงค์ของผู้ทำการทดลอง และควรระมัดระวังโดยเฉพาะหากใช้วิธี manual adjust

การจะเลือกใช้โปรแกรมได้นั้นขึ้นอยู่กับความสะดวก และความชำนาญของผู้ใช้ เพราะตัวโปรแกรมไม่ได้ทำให้ค่าที่ได้จากการทำนายต่างกัน แต่จะต่างกันเพราะผู้ใช้โปรแกรม ดังนั้นในการจะใช้วิธีทางสถิติกับงานทางสาขาสัตวศาสตร์มีชีวิตไม่เพียงแต่นักสถิติทำงานในคอมพิวเตอร์แล้วสรุปเลย แต่ต้องมีนักชีววิทยาควบคุมและทำการทดลองจริงเพื่อยืนยันผล เพื่อให้งานเป็นไปตามจุดประสงค์ เพราะในบางครั้งทางสถิติไม่แตกต่างกันโดยเฉพาะในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อทำการขยายขนาดเป็น pilot plant อาจจะต่างกันมากอย่างชัดเจน

ผลการทำนายให้ใช้เฟอรัสซัลเฟต 49.6 มก./ลิตร โซเดียมโมลิบเดต 0.95 มก./ลิตร และ EDTA 7.98 มก./ลิตร สรุปว่าใช้ปริมาณเฟอรัสซัลเฟต และโซเดียมโมลิบเดตมากกว่าในอาหารดั้งเดิมเดิม แต่ใช้ EDTA ปริมาณที่ลดลงจากอาหารดั้งเดิม ข้อดีอีกประการคือเมื่อคำนวณราคาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทำนาย ราคาไม่แตกต่างจากอาหารดั้งเดิม และสภาวะที่ได้ทำนายด้วยวิธีทางสถิติยังทำให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า นอกจากนี้การใช้สถิติมีข้อดีคือ ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ให้ผลตอบสนองที่ดีที่สุด (Optimum Response) โดยมีค่าทางสถิติรับรองผล และทำให้ทราบว่าไม่มีผลกระทบร่วมของปัจจัยทั้งสามที่ทำการศึกษาพร้อมกัน ซึ่งมีจำนวนการทดลองน้อยกว่าการศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time) ช่วยให้ประหยัดทรัพยากรและเวลาที่ใช้ในการทดลอง (Araujo and Brereton, 1996; Wang and Wan, 2009)

7. การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายด้วยวิธีทางสถิติ ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร ในอาหาร Ormerod's medium

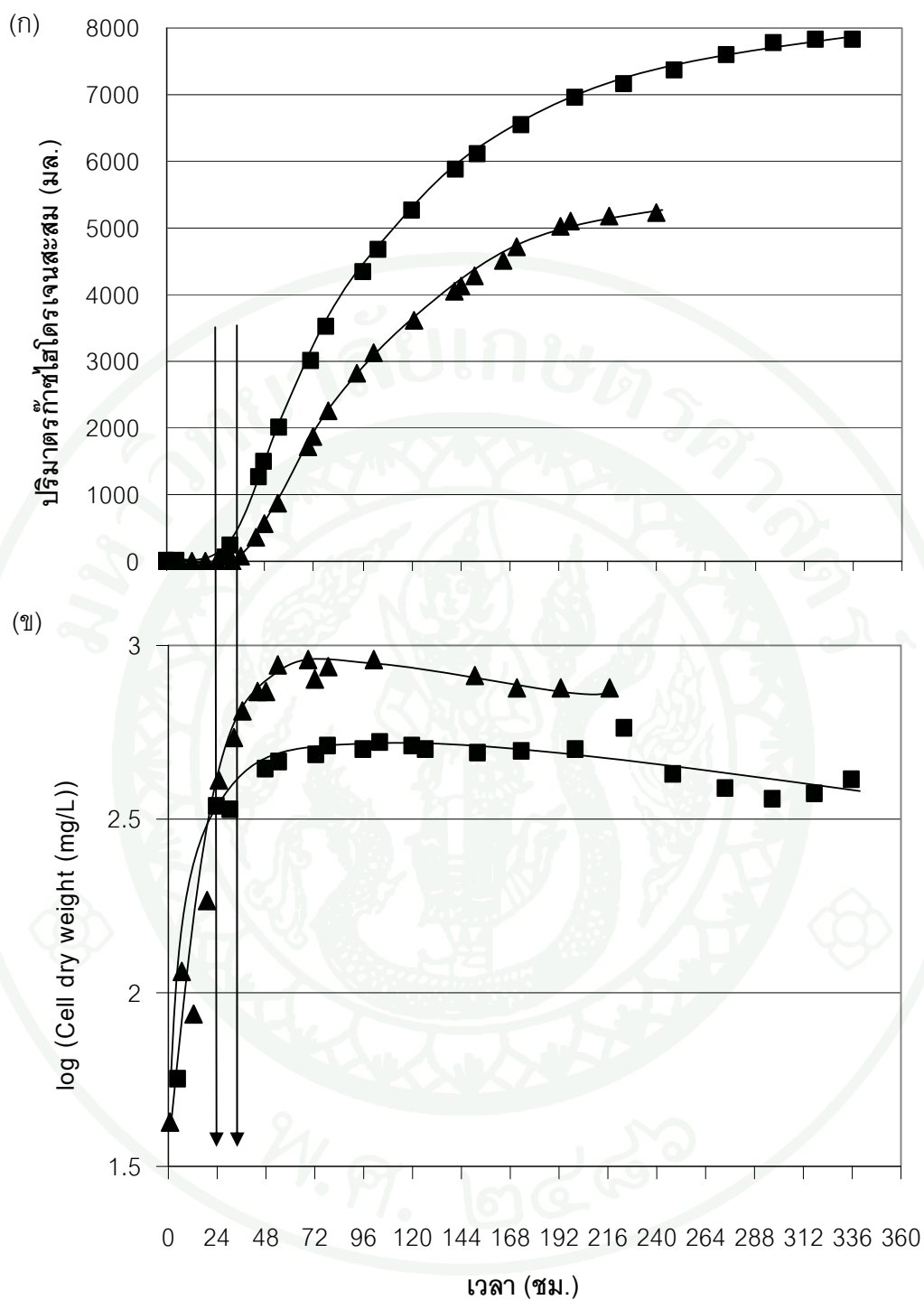
เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้วิธีทำนายด้วยคณิตศาสตร์ด้วยโปรแกรม SPSS-Statistical หรือ Minitab มาผลิตไฮโดรเจนในถังแบบ 6 ลิตร คือใช้เฟอร์รัสซัลเฟต, โซเดียมโมลิบเดต และ EDTA ความเข้มข้นเท่ากับ 49.6 0.95 และ 7.98 มก./ลิตร ตามลำดับ ในอาหาร Ormerod's malate-glutamate medium ในที่นี้จะเรียก Optimal medium ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 3,000 ลักซ์ ผลปรากฏว่า สามารถเพิ่มทั้งปริมาณไฮโดรเจนสะสม และเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดได้ (ภาพที่ 27ก) กล่าวคือ เมื่อผลิตไฮโดรเจนในอาหารสูตรดั้งเดิม ได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสม 5,000 มล. และอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 28-55 เท่ากับ 9.0 มล./ลิตร/ชม. เมื่อใช้ Optimal medium ได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมมากขึ้น 1.5 เท่า เท่ากับที่ทำนายด้วยวิธีทางสถิติ กล่าวคือได้ไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้นเป็น 8,000 มล. และอัตราการผลิตก๊าซสูงสุดในชั่วโมงที่ 28-55 เท่ากับ 13.0 มล./ลิตร/ชม.

เมื่อพิจารณาการเจริญใน Optimal medium (ภาพที่ 27ข) *R. gelatinosus* SB24 มีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 15.0 มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร/ชม. ในชั่วโมงที่ 5-24 ซึ่งต่ำกว่าในอาหารดั้งเดิมเล็กน้อย ในอาหารดั้งเดิม มีอัตราการเจริญเท่ากับ 16.2 มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร/ชม. ที่ชั่วโมงที่ 1-32 นอกจากนี้ ปริมาณเซลล์สุดท้ายใน Optimal medium เท่ากับ 572 มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร น้อยกว่าในอาหารดั้งเดิม ซึ่งวัดได้ 909 มก. ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร เกือบหนึ่งเท่า แสดงว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนไม่แปรผันตามการเจริญของเชื้อ ใน Optimal medium ผลิตไฮโดรเจนได้สูง แต่สร้างเซลล์ได้น้อยกว่าในอาหารดั้งเดิม หมายความว่าปริมาณสารทั้งสามที่จัดความเข้มข้นให้เหมาะสมแล้วใน Optimal medium ช่วย drive เซลล์ให้น้ำตาลไปยังกระบวนการการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าไปยังกระบวนการสร้างเซลล์ งานวิจัยของ Kars *et al.* (2006) ได้ให้ข้อมูลที่สอดคล้องกัน ว่าเมื่อใช้เหล็กไอออนที่มีความเข้มข้นมากขึ้น (0.1 mM Ferric citrate) กับแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเมื่อใช้เหล็กไอออนความเข้มข้นต่ำ (0.01 mM Ferric citrate) แต่ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดของเซลล์ใน Ferric citrate 0.1 mM ต่ำกว่า เช่นเดียวกับ ในอาหารที่มีโซเดียมโมลิบเดตเข้มข้นมากกว่า 16.5 μM แบคทีเรียการผลิตไฮโดรเจนสูง แต่ให้ปริมาณเซลล์สะสมต่ำกว่าในอาหารที่มีโซเดียมโมลิบเดตเจือจาง (0.016 μM) ในอาหาร Optimal medium และ Ormerod's medium สูตรดั้งเดิม แบคทีเรียเริ่มผลิตไฮโดรเจนเมื่อเจริญเข้าสู่ระยะ late log phase คือใน

ชั่วโมงที่ 24-31 แบคทีเรียมีอัตราการเจริญสูงสุดอยู่ในช่วงเวลา 24 ชม. อัตราการเจริญคิดเป็น 15-16 มก. ของน้ำหมักเซลล์แห้ง/ลิตร/ชม. หลังจากเริ่มผลิตไฮโดรเจน พบว่าทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ช้าลง เช่น ใน Optimal medium อัตราการเจริญช้าลงเป็น 5.3 มก. ของน้ำหมักเซลล์แห้ง/ลิตร/ชม. ในชั่วโมงที่ 30-55 ขณะที่ใน Ormerod's medium สูตรดั้งเดิม ยังคงมีการเจริญมากอยู่คือ เท่ากับ 11.9 มก. ของน้ำหมักเซลล์แห้ง/ลิตร/ชม. ระหว่าง 36-54 ชม.

เมื่อคำนวณปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ต่อ malate 1 โมล ในอาหาร Optimal medium ที่มี malate 30 mM จะได้ปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 1.87 mol H₂/mol malate และประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรดไปเป็นไฮโดรเจนเท่ากับ 31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าในอาหารดั้งเดิมที่ได้ปริมาณไฮโดรเจนเท่ากับ 1.18 mol H₂/mol malate และมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรดไปเป็นไฮโดรเจนเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์

จะเห็นว่า ความเข้มข้นที่ได้จากการใช้ทฤษฎีสถิติ ทำให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นจริง ทั้งการให้ปริมาณไฮโดรเจนสูงขึ้น อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เซลล์มีประสิทธิภาพของกิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น และประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรดไปเป็นก๊าซไฮโดรเจนดีขึ้น จึงถือเป็นการประสบความสำเร็จของการบูรณาการวิชาการและเทคโนโลยีต่างสาขา คือ ทางคณิตศาสตร์ สถิติ และชีววิทยาเข้าด้วยกัน ทำให้ได้ผลสัมฤทธิ์ที่ดีขึ้น

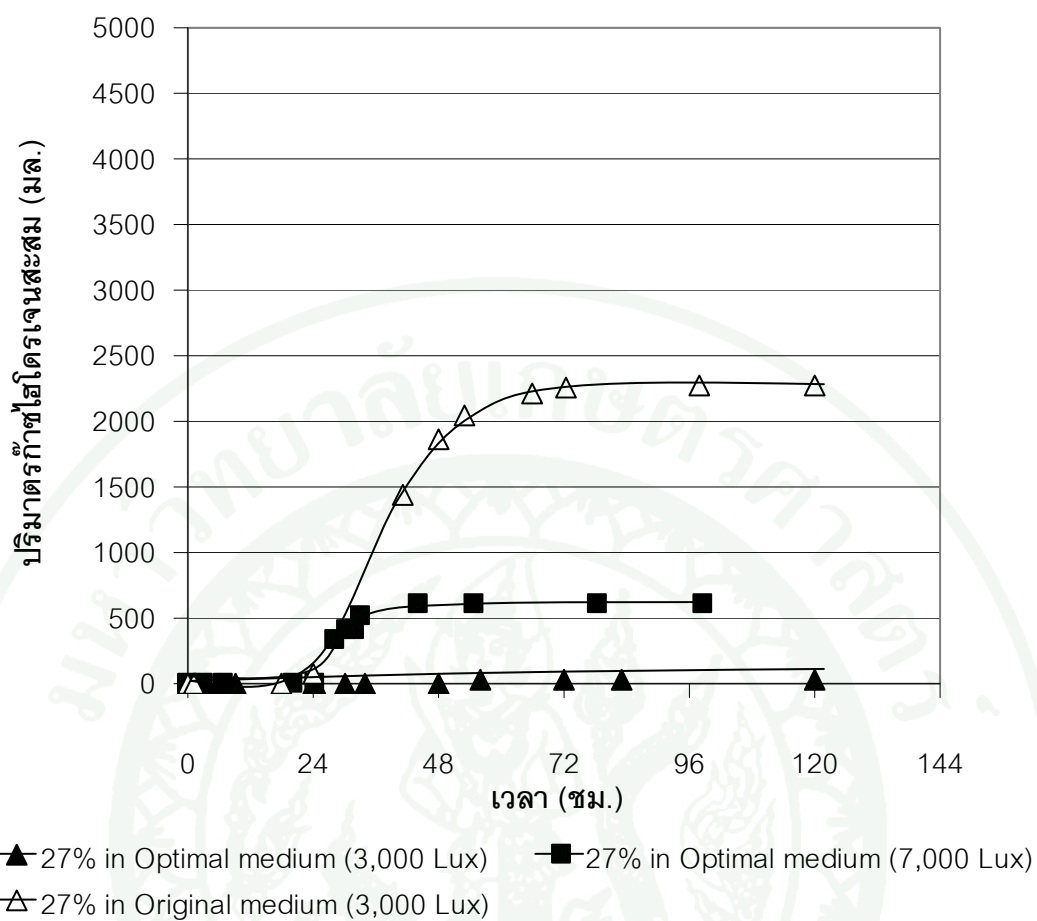


ภาพที่ 27 แสดงการผลิตไฮโดรเจนในถังผลิตไฮโดรเจน ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โดย (ก) การผลิตก๊าซไฮโดรเจน และ (ข) การเจริญของเชื้อในอาหาร สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จาก SPSS-Statistica (Optimal medium) (—■—) และในอาหารดั้งเดิม (Original or Ormerod's medium) (—▲—)

8. การผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งแป่งมันโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำนายโดยวิธีสถิติ ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาด 6 ลิตร ปริมาตรบรรจุ 5.7 ลิตร

จากผลการทดลองข้างต้น การใช้น้ำทิ้งเก็บครั้งที่ 2 ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ คือ 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางใน Ormerod's minimal glutamate medium บ่มที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ พบว่า และปรับปริมาณสาร 3 ชนิดตามที่กำหนดโดย SPSS-Statistica ผลปรากฏว่า อาหารเริ่มต้นมีสีดำ ดังแสดงในภาพที่ 32 มีผลต่อการรับแสง และเมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไป 5 วัน เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนน้อยมากเพียง 37 มล. พบว่ามีค่าน้อยกว่าน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยอาหาร Ormerod's minimal-glutamate medium ทั้งนี้จะเป็นเพราะปริมาณเหล็กไอออนที่ใส่มากขึ้น และไปทำปฏิกิริยากับสารปนเปื้อนในน้ำทิ้ง เช่น สารประกอบซัลเฟต ตกตะกอนเป็น FeS เป็นต้น อีกทั้งอาหารมีสีดำมีผลต่อประสิทธิภาพของเซลล์ในการรับแสง หรืออาจทำให้แบคทีเรียใช้เหล็กไอออนในการเจริญได้ยากขึ้น

จึงได้ทดลองเพิ่มความเข้มแสงเป็น 7,000 ลักซ์ และพยายามควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส แต่มีบางช่วงที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส พบว่าให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนปริมาณที่สูงขึ้นเป็น 600 มล. อย่างไรก็ตาม ก็ยังคงน้อยกว่าสภาวะที่เจือจางด้วย Ormerod's minimal-glutamate medium สูตรดั้งเดิมเช่นกัน ที่บ่มที่ความเข้มแสงเพียง 3,000 ลักซ์ ได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 2,200 มล. ตามลำดับ แสดงว่าการเพิ่มความเข้มแสงเซลล์มีประสิทธิภาพในการรับแสงดีขึ้นเล็กน้อย แต่เหล็กไอออนก็ยังอยู่ในรูปที่แบคทีเรียใช้ได้ยากจึงทำให้การผลิตไฮโดรเจนได้ไม่ดี ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งใส่เหล็กไอออนมากขึ้นไม่เหมาะสมจะนำมาใช้น้ำทิ้งเพราะทำให้เหล็กไอออนอยู่ในรูปที่แบคทีเรียได้ยาก และอาหารมีสีดำ ถึงแม้จะใช้ความเข้มแสงสูงมากก็ทำให้ประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อีกทั้งยังยากในการควบคุมอุณหภูมิของระบบ ไฮโดรเจนที่ผลิตได้จึงไม่คุ้มกับพลังงานที่ลงทุน (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 การผลิตไฮโดรเจนของ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ในถังผลิตไฮโดรเจน ขนาดบรรจุ 5.7 ลิตร ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีแสง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ประกอบกับเชื้อจากด้วย Optimal medium บ่มที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (▲) ความเข้มแสง 7,000 ลักซ์ (■) เปรียบเทียบกับเมื่อใช้น้ำทิ้ง 27 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจากด้วยสูตรอาหารดั้งเดิม (Original medium) ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (△)

แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้น้ำทิ้งแ่งมันที่เจือจางด้วย Optimal medium เพื่อปรับปรุงการผลิตในระบบนี้ได้ ถ้าได้จะต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้มาก ซึ่งก็ต้องเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งกำเนิดแสง มีผลทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นเกิน 45 องศาเซลเซียส ต้องมีระบบหล่อเย็นเพิ่มเติม เป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต สรุปได้ว่าสภาวะ Optimal medium ใช้ได้ดีกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส หรือจะนำไปใช้กับการนำน้ำทิ้งประเภทที่เมื่อปรับปริมาณสารทั้งสามตามสภาวะ Optimal medium แล้วไม่ทำให้น้ำทิ้งเปลี่ยนสภาพไป ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเพอร์สซัลเฟตมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของน้ำทิ้ง โดยความเข้มข้นของเพอร์สซัลเฟตที่สูงจะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำทิ้ง การที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในน้ำทิ้งน่าจะเพิ่มปัจจัยของปริมาณน้ำทิ้งไปด้วย เพื่อศึกษาปัจจัยร่วมระหว่างปริมาณน้ำทิ้ง และความเข้มข้นของเพอร์สซัลเฟต

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นการนำน้ำทิ้งแ่งมันมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการแบบใช้แสง พบข้อจำกัดของน้ำทิ้งที่นำมาใช้คือ ตะกอนที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง จะมีผลต่อการรับแสงของเซลล์ได้น้อย ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรีย *R. gelatinosus* SB24 ได้ไม่ดี อีกทั้งน้ำทิ้งยังมีสารปนเปื้อนหลายชนิด ไม่สามารถเติมสารจำเป็นลงในน้ำทิ้งแ่งมันตามปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนที่ทำนายด้วยวิธีทางสถิติ ได้แก่ปริมาณเหล็กไอออนที่เพิ่มขึ้น 4 เท่า จะทำให้น้ำทิ้งเกิดตะกอนสีดำมาก ทำให้ประสิทธิภาพการรับแสงของเซลล์น้อยลงเช่นกัน สรุปว่าเมื่อใช้น้ำทิ้งแ่งมัน จะต้องเอาตะกอนเส้นใยออกจากน้ำทิ้งเจือจางน้ำทิ้งที่ไม่มีตะกอนให้มีความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ COD เท่ากับ 2,000 และ 4,900 มก./ลิตร ตามลำดับ เจือจางด้วย minimal glutamate medium ให้แสงความเข้มข้นเพียง เช่น 2,000 ลักซ์ ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้สูงสุดคือ 4 ลิตร และเมื่อใช้น้ำทิ้งแ่งมันเป็นสับสเตรด จะให้ไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 2.6 ลิตรต่อน้ำทิ้ง 1 ลิตร (L/L WW) อย่างไรก็ตาม แม้จะปรับปรุงให้การใช้น้ำทิ้งแ่งมันสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าเดิมแล้วก็ตาม แต่ก็ยังได้ปริมาณไฮโดรเจนน้อยกว่าเมื่อใช้แ่งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน ที่ได้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสม 8 ลิตร ของงานวิจัยก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนที่ใช้น้ำทิ้งก็เป็นการนำของเหลือทิ้งมาใช้ เป็นการลดต้นทุนการผลิตลง และยังเป็นการกำจัดของเหลือทิ้งอีกทางหนึ่ง

สรุปและข้อเสนอแนะ

น้ำทิ้งจากโรงงานแปรงมันสำปะหลังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ด้วยวิธี เมื่อใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม non-sulfur purple bacteria สายพันธุ์ *Rubrivivax gelatinosus* SB24 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตคือ วิตามิน แสง ไอออนของโลหะหนัก และสารจับโลหะหนัก

ไบโอติน (biotin) เป็นวิตามินที่จำเป็นที่สุดสำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจน และการเจริญของ *R. gelatinosus* SB24 ส่วนวิตามินอีกสามชนิด ได้แก่ ไทอะมีน (thiamine) พาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิด (*p*-aminobenzoic acid) และกรดนิโคตินิค (nicotinic acid) ช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน การใช้ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตร สามารถทดแทนวิตามินทั้ง 4 ชนิดได้ และให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าเมื่อใส่วิตามินทั้ง 4 ชนิด

เหล็กไอออน โมลิบดีนัมไอออน เป็นโลหะหนักสำคัญและจำเป็นต่อประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน สาร chelating agent ชนิด EDTA มีอิทธิพลต่อเซลล์เนื่องจากเป็นสารที่จับไอออนของโลหะ เมื่อศึกษาทีละปัจจัย (one factor at a time) ในขนาด 60 มล. ในอาหาร malate-glutamate ที่ยังไม่เติมน้ำทิ้ง เหล็กไอออนความเข้มข้น 11-22 มก./ลิตร ให้ปริมาณไฮโดรเจนสูงที่สุด และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด การเพิ่มความเข้มข้นเหล็กไอออนขึ้นเป็น 224 มก./ลิตร จะยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 อย่างชัดเจน ในสภาวะที่ขาดโมลิบดีนัมไอออนแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนได้น้อยมาก และปริมาณโมลิบดีนัมไอออนเพียง 0.28 มก./ลิตร ให้การผลิตไฮโดรเจนดีที่สุด สำหรับสาร chelating agent ชนิด EDTA ไม่จำเป็นต่อกลไกการผลิตไฮโดรเจนของ *R. gelatinosus* SB24 แต่การมี EDTA ในปริมาณ 9-18 มก./ลิตร ช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจน ทำให้เซลล์มีกิจกรรมจำเพาะในการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น แต่การมี EDTA ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 90 มก./ลิตร จะยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำทฤษฎีทางคณิตศาสตร์และสถิติมาประเมินความสัมพันธ์และหาสภาวะที่ดีที่สุดร่วมกับการทดลองจริง โดยใช้ Box-Behnken design ออกแบบการทดลองสำหรับทั้ง 3 ปัจจัย และใช้วิธีทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS-Statistica หรือ Minitab ทำนายความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าสารทั้งสามชนิดไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ แต่ทั้งสามชนิดสำคัญต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ความเข้มข้นที่ดีที่สุดของเฟอรัสซัลเฟตที่ดีคือ 49.6 มก./ลิตร โซเดียม

โมลิบดีนัมเท่ากับ 0.95 มก./ลิตร และ EDTA เท่ากับ 7.98 มก./ลิตร ในการผลิตไฮโดรเจนด้วย *R. gelatinosus* SB24 ในถังผลิตไฮโดรเจนขนาดบรรจุ 5.7 ลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิดข้างต้น พบว่าการปรับปรุงสูตรอาหารให้มีความเข้มข้นของสารทั้งสามให้เหมาะสม ช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้แม้ว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ กล่าวคืออัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นจาก 9 มล./ลิตร/ชม. เป็น 13 มล./ลิตร/ชม. ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ทั้งหมดในเวลา 10 วัน ได้เพิ่ม 1.4 เท่า จาก 5 ลิตร เป็น 7 ลิตร และเซลล์มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสับสเตรดไปเป็นไฮโดรเจนได้สูงกว่าเดิม ในทางตรงกันข้ามปริมาณเซลล์สูงสุดในอาหาร Optimal medium มีปริมาณน้อยกว่าในอาหารดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนไม่แปรผันตามการเจริญของเชื้อ ดังนั้นสรุปปริมาณสารที่ปรับเปลี่ยนได้ดังนี้คือ มีเฟอรัสซัลเฟตเพิ่มขึ้น 5 เท่า โซเดียมโมลิบดีนัมใกล้เคียงกับอาหารดั้งเดิมและมี EDTA น้อยกว่าประมาณครึ่งหนึ่ง เมื่อคำนวณราคาอาหารทั้งสองชนิดแล้วไม่แตกต่างกัน แต่อาหารที่ปรับปรุงใหม่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่า อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารทั้งสามไม่เหมาะสมที่จะใช้กับน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันเพราะการใส่เฟอรัสความเข้มข้นสูงขึ้นกว่าอาหารดั้งเดิมถึง 5 เท่า ทำให้น้ำทิ้งมีสีดำ มีผลเสียต่อประสิทธิภาพการรับแสงของเซลล์ และได้ปริมาณไฮโดรเจนน้อยลงมาก

เมื่อใช้น้ำทิ้งแป้งมันในการผลิตไฮโดรเจนจำเป็นต้องเพิ่มสารอาหารโดยการเจือจางน้ำทิ้งในอาหาร minimal-glutamate และปรับพีเอชอาหารเริ่มต้นให้เป็น 6.8 ความเข้มข้นของน้ำทิ้งแป้งมันที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนด้วย *R. gelatinosus* SB24 คือความเข้มข้น 18-27 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแป้งมัน ได้แก่ ความเข้มแสง และการรับแสงของเซลล์ น้ำทิ้งมีความขุ่นเนื่องจากเส้นใยและตะกอนที่ปนเปื้อนมา การตกตะกอนน้ำทิ้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพเซลล์ในการรับแสงและความเข้มแสงทำให้แบคทีเรียมีกิจกรรมจำเพาะในการผลิตไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น และได้ปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 4 เท่า

การผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้น้ำทิ้งแป้งมัน 27 เปอร์เซ็นต์ ที่มีตะกอน พบว่าเมื่อให้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ได้ไฮโดรเจนสะสม 917 มล. และเมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 3,000 ลักซ์ ได้ไฮโดรเจนสะสม 2,000 มล. จากขนาดบรรจุ 5.7 ลิตร แบคทีเรียมีกิจกรรมของเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น และอัตราการผลิตก๊าซต่อชม.สูงขึ้น 2.5 เท่า

สรุปได้ว่าสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งแบ่งมันสำปะหลังคือ ใช้ น้ำทิ้งที่เอาตะกอนออกที่ความเข้มข้น 27 เปอร์เซ็นต์ เจือจางในอาหาร Ormerod's minimal-glutamate พีเอช 6.8 ไส้ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตร แทนวิตามิน 4 ชนิด และให้แสงที่ความเข้มแสงสูง 2,000 ลักซ์ ได้ไฮโดรเจนสะสมทั้งหมด 4 ลิตร จากขนาดบรรจุ 5.7 ลิตร อัตราการผลิตไฮโดรเจน 14 มล./ลิตร/ชม. และประสิทธิภาพของเซลล์ 2.7 มล./มก.โปรตีนเซลล์ และสามารถลดความสกปรก (COD) ของน้ำทิ้งลงได้ 59 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะคือ การจะนำน้ำทิ้งหรือของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนแบบใช้แสง (photohydrogen production) ด้วย non-sulfur purple phototroph ตะกอนที่อยู่ในน้ำทิ้งหรือของเหลือทิ้งจะทำให้ประสิทธิภาพการรับแสงของเซลล์น้อยลง ดังนั้นการกำจัดตะกอนน้ำทิ้งหรือของเหลือทิ้งออกก่อนในขั้นตอนแรกจะช่วยให้ประสิทธิภาพการรับแสงของเซลล์ได้มากขึ้น โดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มแสง และทำให้แบคทีเรียมีการผลิตไฮโดรเจนที่ดี

การที่จะนำสภาวะที่ได้จากการทำนายด้วยวิธีทางสถิติไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนด้วย *R. gelatinosus* SB24 จะใช้ได้ดีกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส หรือนำไปใช้เติมในน้ำทิ้งประเภทที่เมื่อปรับปริมาณสารทั้งสามชนิดตามสภาวะ Optimal medium แล้วไม่ทำให้น้ำทิ้งเปลี่ยนสภาพไป

การทดลองนี้มีการใช้วิธีทางสถิติซึ่งเป็นศาสตร์ที่เกี่ยวกับสิ่งไม่มีชีวิต (*in vitro*) มาใช้กับงานทางด้านชีววิทยา (*in vivo*) ในโอกาสที่ใช้โปรแกรมต่างกัน สรุปว่าการนำวิธีทางสถิติมาใช้กับงานทดลองกับสิ่งมีชีวิตนั้นต้องคำนึงถึงจุดประสงค์ของผู้ทำการทดลอง และการจะเลือกใช้โปรแกรมใดนั้นขึ้นอยู่กับความสะดวก และความชำนาญของผู้ใช้ เพราะตัวโปรแกรมไม่ได้ทำให้ค่าที่ได้จากการทำนายต่างกัน แต่จะต่างกันเพราะผู้ใช้โปรแกรม ดังนั้นในการจะใช้วิธีทางสถิติกับงานทางสาขาสสิ่งมีชีวิต นักสถิติและนักชีววิทยาก็ต้องมีความรู้ความเข้าใจในศาสตร์ของกันและกันพอสมควร เพื่อควบคุมให้งานเป็นไปตามจุดประสงค์ เพราะในบางครั้งทางสถิติไม่แตกต่างในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อทำการขยายขนาดอาจจะต่างกันมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2552. กรมวิชาการเกษตร ระบบข้อมูลทางวิชาการ. มั่นสำปะหลัง.

แหล่งที่มา: <http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=14>, 25 สิงหาคม 2554.

กระทรวงพลังงาน. 2550. พลังงานไฮโดรเจน พลังงานสมบูรณ์แบบ. พลังงานทางเลือก.

แหล่งที่มา: <http://www.energy.go.th/moen/Index.aspx?MenuID=28>, 25 พฤศจิกายน 2551.

คณะกรรมการจัดทำคู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. 2540. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. พิมพ์ครั้งที่ 3.

สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

จินตนา ขอบวิจักขณ์. 2543. การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยแป้งมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

दनัย เอกมล. 2554. ทิศทางพลังงานโลกกับสถานการณ์พลังงานของประเทศไทยในปัจจุบัน. กระทรวงพลังงาน. แหล่งที่มา:

http://www.ieat.go.th/ieat/attachments/721_Energy_Presentation.pdf, 9 มิถุนายน 2554.

เทอดไทย วัฒนธรรม และสุนันท์ ลิ้มตระกูล. 2549. พลังงานสะอาด. นวัตกรรมงานวิจัยบนเส้นทางงานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2549. แหล่งที่มา:

http://www.rdi.ku.ac.th/kasetfair49/Technology/t_30/t_30.htm, 30 มิถุนายน 2554.

ไทยรัฐ. 2552. เทคโนโลยีพลังงานชุมชน. พลังงานแห่งอนาคต: นวัตกรรมใหม่ใช้ไฮโดรเจนเป็นพลังงานขับเคลื่อน. แหล่งที่มา:

<http://www.energybase.net/FuelCell-Car.html>, 23 พฤศจิกายน 2552.

นิรนาม. ม.ป.ป. **การวิเคราะห์รีเกรสชัน (Regression Analysis)**. แหล่งที่มา:

http://www.agro.cmu.ac.th/e_books/605312/regression/regression_analysis/regression_analysis.html, 15 กันยายน 2552.

บริษัท ลีโอนิกส์ จำกัด. 2552. **เส้นทางสู่พลังงานสีเขียว ตอน พลังงานหมุนเวียน และ พลังงานสิ้นเปลือง. เรื่องของพลังงาน**. แหล่งที่มา:

<http://www.leonics.co.th/html/th/aboutpower/greenway05.php>, 1 กรกฎาคม 2552.

บริษัท ไทยออยล์ จำกัด (มหาชน). 2554. **รายงานสถานการณ์ราคาน้ำมัน. iwebgas ชุมชน คนใช้แก๊ส**. แหล่งที่มา: <http://www.iwebgas.com/oil/oil.html>, 9 มิถุนายน 2554.

บริษัท ปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย (ปตท.) จำกัด (มหาชน). 2554. **ราคาน้ำมันขายปลีก กทม. และปริมณฑล. บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)**. แหล่งที่มา:

<http://www.pttplc.com/th/news-energy-fact-oil-price-bangkok.aspx>, 14 ธันวาคม 2554.

พลายพล คุ้มทรัพย์. 2551. **สถานการณ์พลังงานโลก วิฤตการณ์น้ำมันครั้งที่ 3. บล็อก สารพันสาระความรู้**. แหล่งที่มา:

<http://www.wiseknow.com/blog/2008/07/10/474/#axzz1OfN5GuCz>, 9 มิถุนายน 2554.

มงคล งามเจริญวงศ์. 2547. **การใช้แบ่งดิบเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตก๊าซ ไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มันสิน ตันทุลเวศม์. 2540. **คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท แซน. อี. 68 แลบ จำกัด, กรุงเทพฯ.

วัชร มั่งวิฑิตกุล. 2553. Hydrogen car. **ไทยแลนด์อินดัสตรีดอทคอม**. แหล่งที่มา:

<http://thailandindustry.com/guru/view.php?id=10549§ion=9&rcount=Y>, 17

มิถุนายน 2554.

สารานุกรมออนไลน์ทางอินเทอร์เน็ต (eduzones e-library). 2550. **ไฮโดรเจน**. E-library.

แหล่งที่มา: <http://elibrary.eduzones.com>, 7 กรกฎาคม 2552.

สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ. 2542. **ความสำคัญของพลังงาน**.

พลังงาน และทางเลือกการใช้เชื้อเพลิงของประเทศไทย. แหล่งที่มา:

<http://www.eppo.go.th/doc/doc-AlterFuel.html>, 4 พฤษภาคม 2552.

สำนักงานนโยบายและแผนพลังงานแห่งชาติ [สนพ.] กระทรวงพลังงาน. 2550. **สถานการณ์**

พลังงานในปี 2550 และแนวโน้มปี 2551. ภาพรวมพลังงานปี 2550. แหล่งที่มา:

<http://www.eppo.go.th/info/report-2550/press-energy2550.pdf>, 9 มิถุนายน 2554.

_____. 2552. **การผลิตไฟฟ้าจากพลังงานในอนาคต**. สำนักงานนโยบายและแผน
พลังงานแห่งชาติ. แหล่งที่มา:

<http://202.44.52.249/thaienergynews/BlogDetail.aspx?id=4>, 9 มิถุนายน 2554.

_____. 2554. **ข้อมูลพลังงาน**. สำนักงานนโยบายและแผนพลังงานแห่งชาติ.

แหล่งที่มา: http://www.eppo.go.th/info/1summary_stat.htm, 17 มิถุนายน 2554.

สำนักพัฒนาโครงการไฟฟ้าโรงไฟฟ้าพลังงานนิวเคลียร์, กระทรวงพลังงาน 2554. **แก้วิกฤตความ**

มั่นคงพลังงานไทย. คลังความรู้พลังงานทางเลือก (Energy choices). แหล่งที่มา:

[www_energychoices_in_th.mht](http://www.energychoices_in_th.mht), 9 มิถุนายน 2554

หน่วยวิจัยพลังงานทางด้านความร้อน และส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน (TECP) ภาควิชาฟิสิกส์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มปป. **ไฮโดรเจน**. หน่วยวิจัยพลังงาน

ทางด้านความร้อน และส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน (TECP). แหล่งที่มา:

http://student.nu.ac.th/tecp/Energy_hidrogen.html, 6 กรกฎาคม 2552.

- อนุวัตร แจ่มชัด. 2549. **สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์**. ภาควิชา
พัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.(ัด
สำเนา)
- อรรณพ นพรัตน์. 2552. **โรงงานแป้งมันใช้จุลินทรีย์จากน้ำเสียผลิตก๊าซชีวภาพทดแทน
น้ำมันเตา. เว็บไซต์สิ่งแวดล้อมไทย. แหล่งที่มา:**
http://www.thaienv.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1, 14 ธันวาคม
2552.
- Ananyev, G., D. Carrieri and G.C. Dismukes. 2008. Optimization of metabolic capacity
and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the
cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*. **Appl. Environ. Microbiol.** 74(9):
6102-6113.
- Anderson, M.J. and P.J. Whitcomb. 2005. **RSM Simplified Optimizing Processes Using
Response Surface Methods For Design of Experiments**. Productivity press,
New York.
- Araujo, P.W. and G. Brereton. 1996. Experimental design II. Optimization. **Trends in
Analytical Chemistry**. 15: 63-70.
- Arik, T., U. Gunduz., M. Yucel., V. Sedirogh and I. Eruglu. 1995. Photoproduction of
hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **Int. J. Hydrogen. Energy**. 20:
2417-2426.
- Asada, Y. and J. Miyake. 1999. Review: Photohydrogen production. **J. Biosci.
Bioeng.** 88: 1-6.

- Barbosa, M.J., J.M.S. Rocha., J. Tramper and R.H. Wijffels. 2001. Acetate as carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *J. Biotechnol.* 85: 25-33.
- Bezerra, M.A., R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar and L.A. Escaleira. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization analytical chemistry. *Talanta*. 76: 965-977.
- Boone, D.R., R.W. Castenholz and G.M. Garrity. 2001. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- BP Statistical Review of World Energy. 2008. **BP Statistical Review of World Energy**. **BP Statistical Review of World Energy**. Available Source: http://www.bp.com/liveassets/bp_internet/globalbp/globalbp_uk_english/reports_and_publications/statistical_energy_review_2008/STAGING/local_assets/downloads/pdf/statistical_review_of_world_energy_full_review_2008.pdf, June 20, 2011.
- BP Statistical Review of World Energy. 2011. **BP Statistical Review of World Energy**. **BP Statistical Review of World Energy**. Available Source: http://www.bp.com/liveassets/bp_internet/globalbp/globalbp_uk_english/reports_and_publications/statistical_energy_review_2011/STAGING/local_assets/pdf/statistical_review_of_world_energy_full_report_2011.pdf, June 20, 2011.
- Bregoff, H.M. and M.D. Kamen. 1952. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XIV. Quantitative relations between malate dissimilation, photoproduction of hydrogen, and nitrogen metabolism in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochim. and Biophys.* 36(1): 202-220.

Buranakarl, L., C.Y. Fan, K. Ito, K. Izaki and H. Takahashi. 1985a. Production of molecular hydrogen by photosynthetic bacterium with Raw Starch. **ICME Ann. Reports.** 8:105-108.

_____, _____, _____, _____ and _____. 1985b. Production of molecular hydrogen by photosynthetic bacterium with Raw Starch. **Agri. Biol. Chem.** 49: 3339-3341.

_____, K. Ito, K. Izaki and H. Takahashi. 1986a. Raw Starch-Digestive amylase from non-sulfur purple photosynthetic bacteria. **Microbial Utilization of Renewable Resources.** 5: 114-119.

_____, _____, _____ and _____. 1986b. 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.

_____, S. Okuda, K. Izaki and H. Takahashi. 1982. Production of molecular hydrogen by thermotolerant purple photosynthetic bacteria. **ICME Ann. Reports.** 5: 235-244.

_____, _____ and S. Takahashi. 1983. Hydrogen production by thermotolerant photosynthetic bacteria. **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 1: 36-46.

Chang, J.S., K.S. Lee and P.J. Lin. 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 27: 1167-1174.

Channarong, W., M. Ngmjarearnwong and L. Chitradon. 2010. Hydrogen, an alternative energy from starch biomass by purple non-sulfur phototrophic bacteria isolated in Thailand. *In The Proceeding of 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 36) Section 14*. 26-28 October 2010, The Science Society of Thailand under The Patronage of His Majesty The King (STT), Bangkok.

Chen, C.Y., W.B. Lu, C.H. Liu and J.S. Chang. 2008. Improved phototrophic H₂ production with *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. *Biores. Technol.* 99: 3609-3161.

_____, J.F. Wu and J.S. Chang. 2007. Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodopseudomonas palustris* via statistical experimental design. *Int. J. Hydrogen. Energy.* 32: 940-949.

Chitradon, L., W. Channarong, M. Ngmjarearnwong and N. Dechprae. 2008. Biohydrogen from Phototrophic Bacteria, a Renewable Energy Potentially Combine with Fuel Cell. *J. Research Eng. Technol.* 5(3): 183-201.

Damasceno, S., M.P. Cereda and G.M. Pastore. 1999. Desenvolvimento de *Geotrichum fragrans* em manipueira. *Energia na Agricultura.* 14(2): 7-14.

Das, D. and T. N. Veziroglu. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen. Energy.* 26: 13-28.

Deacan, J. 2009. **Mechanism of Biological Nitrogen Fixation.** *The Microbial World: The Nitrogen Cycle and Nitrogen Fixation.* Available Source: <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/nitrogen.htm>, September 8, 2009.

Dechprae, N., N. Hansupaluk and L. Chitradon. 2009. Bioconversion of cassava wastewater into hydrogen : Statistical method used in optimizing factors affecting hydrogen photoproduction of *Rubrivivaxgelatinosus* SB24. *In JSPS-NRCT Summer School: Biomass Energy in Asia*. 21-23 February 2009, JSPS-NRCT. Bangkok, Thailand. .

_____, _____ and _____. 2010a. Statistical methods used optimizing conditions of biohydrogen production. pp. 77-84. *In The Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Science*. 3-5 February 2010, Kasetsart University, Bangkok.

_____, W. Channarong, C. Teerapatsakul and L. Chitradon. 2010b. Evaluation of important factors affecting hydrogen photoproduction of *Rubrivivax gelatinosus* SB24. n.p. *In The Proceeding of 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 36) Section 14*. 26-28 October 2010, The Science Society of Thailand under The Patronage of His Majesty The King (STT), Bangkok.

Eroglu, E., I. Eroglu, U. Gunduz, L. Turger and M.Yucel. 2006. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage process. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 31: 1527-1535.

_____, I., A. Tabanog, U. Gunduz, E. Eroglu and M. Yucel. 2008. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a flat plate solar bioreactor. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 33: 531-541.

Eroglu, I., K. Aslan, U. Gunduz, M. Yucel and L. Turker. 1999. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J. Bacteriol*. 70: 103-113.

Eroglu, I., U. Gunduz., M. Yucel, L. Turker and E. Inci. 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. **Int. J. Hydrogen. Energy**. 29: 163-171.

Fang, H.H.P. and H. Liu. 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture. **Bioresource Technology**. 82: 87-93.

Fascetti, E. and O. Todini. 1995. *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one-and two-stage chemostat. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44: 300-305.

Gest, H. and M.D. Kamen. 1949. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. **Science**. 109: 558-559.

Hallenbeck, P.C., C.M. Meyer and P.M. Vignais. 1982. Nitrogenase from the Photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulate*: purification and molecular properties. **J. Bacteriol.** 49: 708-717.

He, D., Y. Bultel, J.P. Magnin, C. Roux and J.C. Willison. 2005. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* coupling to a PEM fuel cell. **J. Power Source**. 141: 19-23.

Hillmer, P. and H. Gest. 1977. H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulatus*: H₂ production by Growing cultures. **Bacteriol.** 129(2): 724-731

International Union of Biochemistry and Molecular biology [IUBMB]. 2011. **Nomenclature of Electro-Transfer Protein. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry [NC-IUB]**. Available Source: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/etp/>, September 3, 2011.

- Jacobson, M.R., R. Premakumar and P.E. Bishop. 1986. Transcriptional regulation of nitrogen fixation by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.** 167: 480-486.
- Jamil, Z., M.S.M. Annuar, S. Ibrahim and S. Vikineswary. 2009. Optimization of phototrophic hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* PBUM001 via statistica experimental design. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 34: 7502-7512.
- Jo, J.H., D.S. Lee, D. Park, W. Choe and J.M. Park. 2008. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenase* using statistical methods. **Bioresource Technol.** 99: 2061-2066.
- Kars, G. and U. Gunduz. 2010. Towards a super H₂ producer: Improvements in photofermentative biohydrogen production by genetic manipulations. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 35: 6646-6656.
- _____, G. Rakhely, M. Yucel, I. Eroglu and K.L. Kovacs. 2008. Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 33: 3056-3060.
- _____, M.Yucel, L. Turker and I. Eroglu. 2006. Hydrogen production and transcriptional analysis of *nifD nifK* and *hupS* genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 growth in media with different concentrations of molybdenum and iron. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 31: 1536-1544.
- Kawaguchi, H., K. Hashimoto., K. Hirata and K. Miyamoto. 2001. H₂ production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodobium marium* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*. **J. Biosci. Bioeng.** 91: 277-282.

Kern, M., H.G. Koch and J.H. Klemme. 1992. EDTA activation of H₂ photoproduction by *Rhodospirillum rubrum*. **Appl. Microbiol. Biot.** 37: 496-500.

Kern, M., W. Klipp and J.H. Klemme. 1994. Increased Nitrogenase-dependent H₂ Photoproduction by hup Mutants of *Rhodospirillum rubrum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 1768-1774.

Kim, B.H. and G.M. Gadd. 2008. **Bacterial Physiology and Metabolism**. Cambridge university press, United Kingdom.

_____, J.S., K. Ito and H. Takahashi. 1980. The relationship between Nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodopseudomonas palutris*. **Agric.Biol. Chem.** 44(4): 827-833.

_____, _____ and _____. 1981. Hydrogen production by photosynthetic bacteria. **Microbial Utilization of Renewable Resource.** 2: 225-263.

_____, H. Yamauchi, K. Ito and H. Takahashi. 1982. Selection of photosynthetic bacteria suitable for hydrogen production in outdoor culture among strains isolated in the Seoul, Taegu, Sendai and Bangkok areas. **Agri. Biol. Chem.** 46: 1460-1474.

Koku, H., I. Eroglu, U. Gunduz, M. Yucel and L. Turker. 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter spaeroides*. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 27: 1315-1329.

_____, _____, _____, _____ and _____. 2003. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 28: 381-388.

Lee, S.C. and R.H. Holm. 2003. Speculative synthetic chemistry and the nitrogenase problem. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100: 3595-3600.

Li, C. and H.H.P. Fang. 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology.** 37(1): 1-39.

_____, R.Y., T. Zhang. and H.H.P. Fang. 2008. Characteristics of a phototrophic sludge producing hydrogen from acetate and butyrate. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 33: 2147-2155.

Lin, C.Y. and S.H. Shei. 2008. Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 33: 587-593.

Lindstrom, E.S., R.H. Burris. and P.W. Wilson. 1949. Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. **J. Bacteriol.** 58: 313-316.

Liu, B.F., N.Q. Ren., J. Ding., G.J. Xie and G.L. Cao. 2009a. Enhanced photo-H₂ production of *R. faecalis* RLD-53 by separation of CO₂ from reaction system. **Bioresource Technol.** 100: 1501-1504.

_____, _____, _____, _____ and _____. 2009b. The effect of Ni²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ concentration on photo-hydrogen production by *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53. **Int. J. Hydrogen Energy.** 34: 721-726.

Lowry, O.H., N.J. Rosebroug., A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Mahakhan, P., C. Chobvijuk., Ngmjarearnwong., S. Trakulnalermsai., C. Bucke., J.

Svasti., W. Kanlayakrit and L. Chitradon. 2005. Molecular hydrogen production by thermotolerant *Rubrivivax gelatinosus* using raw cassava starch as an electron donor. **Science Asia**. 31: 415-424.

Markov, S.A. and P.F. Weaver. 2008. Bioreactors for H₂ production by purple non-sulfur bacteria. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 145: 79-86.

Marostica Jr, M.R. and G.M. Pastore. 2007. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limone from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chem**. 101: 345-350.

Melniki, M.R., E. Ela and M. Anastasios. 2009. Changes in hydrogen production and polymer accumulation upon sulfur-deprivation in purple photosynthetic bacteria. **Int. J. Hydrogen. Energy**. 34: 6157-6170.

Minitab Inc. 2007. **Meet Minitab 15 for Window**. (Computer program) Minitab, Inc. USA.

Mu, Y., G. Wang and H.Q. Yu. 2006. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. **Enzyme Microb. Technol**. 38: 905-913.

_____, X.J. Zheng and H.Q. Yu. 2009. Determining optimum conditions for hydrogen production from glucose by an anaerobic culture using response surface methodology (RSM). **Int. J. Hydrogen. Energy**. 34: 7959-7963.

National Institute of Standards and Technology, US Department of Commerce

Semiconductor Manufacturing Technology (NIST SEMATECH). 2006.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Method. Central Composite Design.

Available Source:

<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>, September 15, 2009.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol.Chem.* 153: 375-380.

Ngmjarearnwong, M., C. Chobvijuk., N. Abe., P. Chim-anage., S. Sirisunsaneeyakul and L. Chitradon. 2004. Capability in utilization of raw starch for hydrogen production by photosynthetic bacteria. pp. 160-167. *In The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Science.* 3-5 February 2004, Kasetsart University, Bangkok.

_____, _____, P. Chim-anage, S. Sirisunsaneeyakul and L. Chitradon. 2003. Utilization of different kinds of raw starch by non-sulfur purple photosynthetic bacteria for hydrogen production. *In Microbial Utilization for Recycling of Agricultural Waste.* NRCT-JSPS-DOST-LIPI-VCC. 7-8 March 2003. Mahidol University, Thailand.

Nitschke, M. and G.M. Pastore. 2003. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105: 295-301.

Oelze, J. and G. Klein. 1996. Control of nitrogen fixation by oxygen in purple non sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 165: 219-225.

Okuda, S., J.S. Kim., T. Iwata., K. Ito., L. Buranakarl., T. Kampee and H. Takahashi

1981. Isolation of photosynthetic bacteria for hydrogen production in Thailand.

Microbial Utilization of Renewable Resources. 2: 163-166.

Ormerod, J.G. and H. Gest. 1962. Hydrogen photosynthesis and alternative metabolic pathways in photosynthetic bacteria. **Bacteriol. Rev.** 26: 51-66.

_____, K.S. Ormerod and H. Gest. 1961. Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: relationship with nitrogen metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.** 94: 449-463.

Ozturk, Y., M. Yucel., F. Daldal., S. Mandaci., U. Gunduz., L. Turker. and I. Eroglu. 2006. Hydrogen production by using *Rhodobacter capsulatus* mutants with genetically modified electron transfer chains. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 31: 1545-1552.

Paixao, M.A., C.R.G. Tavares., R. Bergamasco., A.L.E. Bonifacio and R.T. Costa. 2000. Anaerobic digestion of industrial cassava industrialization with acidogenic and methanogenic physical separation phases. **App. Biochem. Biotechnol.** 84: 809-819.

Pan, C.M., Y.T. Fan, Y. Xing, H.W. Hou and M.L. Zhang. 2008. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. **Bioresource Technol.** 99: 3146-3154.

Phlips, E.J. and A. Mitsui. 1983. Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Strain Miami BG7. **Appl. Environ. Microbiol.** 45(4): 1212-1220.

Poonpairaj, P. and L. Chitradon. 2011. Renewable utilization of cassava coat solid waste using fungal enzyme technology. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 45: 260-267.

Prescott, L., J.P. Harley. and D.A. Klein. 1999. **Microbiology**. 4th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., USA.

Redstar Canada Ltd. n.d. **Oil industry conversion**. Redstar Canada Ltd. Available Source: <http://redstarcanada.com/CONVERSIONS.htm>. June 20, 2011.

Redwood, M.D., M. Paterson-Beedle and Macaskie L.E. 2009. Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen ecodomy. **Rev Environ. Sci. Biotechnol**. 8: 149-185.

Reungsang, A., S. Sangyoka, T. Imai and P. Chaiprasert. 2004. Biohydrogen production from cassava starch manufacturing wastewater . pp. 319-327. *In* **Proceeding of JGSSE and Kyoto University Joint International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE)**. 1-3 December 2004. Hilton Hua Hin Resort&Spa, Hua Hin, Thailand.

Robson, R.L. 1978. Characterization of an oxygen-Stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*. **Biochem. J**. 181: 569-575.

Rubio, L.M. and P.W. Ludden. 2008. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annu. Rev. Microbiol**. 62: 93-111.

Sasikala, K., Ch.V. Ramana and P.R. Rao. 1992. Photoproduction of hydrogen from the waste water of a distillery by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **Int. J. Hydrogen. Energy**. 7: 23-27.

- Sasikala, K., Ch.V. Ramana and P.R. Rao. 1995. Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int. J. Hydrogen Energy*. 20:123-126.
- Schneider, K., A. Muller, U. Schramm and W. Klipp. 1991. Demonstration of a molybdenum and vanadium independent nitrogenase in a nifHDK-deletion mutant *Rhodobacter capsulatus*. *Eur. J. Biochem*. 195: 653–661.
- Shi, X.Y. and H.Q. Yu. 2005. Optimization of glutamate concentration and pH for H₂ production from volatile fatty acids by *Rhodopseudomonas capsulate*. *Lett Appl Microbiol*. 40: 401-406.
- Shin, H.S., J.H. Youn and S.H. Kim. 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 29: 1355-1363.
- Sykes, A.O. 1993. **An introduction to regression analysis**. Available Source: http://www.law.uchicago.edu/files/files/20.Sykes_.Regression.pdf, October 12, 2011.
- Takahashi, H., S. Okuda, J.S. Kim, T. Iwata, K. Ito, L. Buranakarl and T. Kampee. 1980. Isolation of photosynthetic bacteria in Thailand. *ICME. Ann. Reports*. 3: 312.
- Takahashi., K. Watanabe, J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakarl and T. Kampee. 1979. Production of Hydrogen by Photosynthetic Bacteria Isolated from Thailand. International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering. *ICME. Ann. Reports*. 2: 314.

- Tao, Y., Y. He., Y. Wu., F. Liu., X. Li., W. Zong. and Z. Zhou. 2008. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. **Int. J. Hydrogen. Energy.** 33: 963-973.
- Teerapatsakul, C., C. Bucke, R. Parra, T. keshavarz, L. Chitradon. 2008. Dye decolorisation by laccase entrapped in copper alginate. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 1367-1374.
- _____, R. Parra, C. Bucke and L. Chitradon. 2007. Improvement of laccase production from *Ganoderma* sp. KU-Alk4 by medium engineering. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 23: 1559-1567.
- Thauer, R.K., F.H. Kirchntawy and K.A. Jungermann. 1972. Properties and function of the pyruvate-formate-lyase reaction in Clostridia. **Eur. J. Biochem.** 27: 282-290.
- The Solar Bio-Fuels Consortium. 2008. **Biohydrogen. The Solar Bio-Fuels Consortium.**
Available Source:
<http://www.solarbiofuels.org/biofuels/Templates/biohydrogen.html>, July 28, 2009.
- Uyar, B., I. Eroglu., M. Yucel., U. Gunduz. and L. Turker. 2007. Effect of light intensity wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. **Int. Hydrogen. Energy.** 32: 4670-4677.
- Van G.S., S. Sung and J.J. Lay. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environ. Sci. Technol.** 35: 4726-4730.
- Voelskow, H. and G. Schon. 1980. H₂ production of *Rhodospirillum rubrum* during adaptation to anaerobic dark. **Arch. Microbiol.** 125: 245-249.

Wang, J and W. Wan. 2009. Experimental design method for fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 34; 235-244. Cited J.T. Luftig and V.S. Jordan. 1998. **Design of Experiments in Quality Engineering**. McGraw-Hill, New York.

_____, L., A. Husar., T. Zhou and H. Liu. 2003. A parametric study of PEM fuel cell performances. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 28: 1263-1272.

Watanabe, K., J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakarl, T. Kampee and H. Takahashi. 1981. Thermostable nature of hydrogen production by non-Sulfur purple photosynthetic bacteria isolated in Thailand. *Agric. Biol. Chem.* 45(1): 217-222.

_____, _____, T. Kampee, Buranakarl, L and H. Takahashi. 1980. Production of hydrogen by photosynthetic bacteria from Thailand. **Microbial Utilization of Renewable Resources**. 1: 181-185.

Weissman, J.C. and J.R. Benemann. 1977. Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of *Anabaena cylindrica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(1): 123-131.

Westermann, P., B. Jorgensen., L. Lange., B.K. Ahring and C.H. Christensen. 2007. Maximizing renewable hydrogen production from biomass in a bio/catalytic refinery. *Int. J. Hydrogen. Energy*. 32: 4135-4141.

Wikipedia, the free cyclopedia. 2009. **Hydrogen**. **Wikipedia**. Available Source: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen>, July 7, 2009.

_____. 2011a. **Chlorophyll a**. **Wikipedia**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll_a, June 17, 2011.

Wikipedia, the free cyclopedia. 2011b. **Bacteriochlorophyll a**. **Wikipedia**. Available

Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriochlorophyll_a, June 17, 2011.

Yetis, M., U. Gunduz., I. Eroglu., M. Yucel. and L. Turker. 2000. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. **Int. J. Hydrogen. Energy**. 25: 1305-1041.

Yigit, D.O., U. Gunduz, L. Turker, M. Yucel and I. Eroglu. 1999. Identification of by-product in hydrogen producing bacteria; *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown in the waste water of a sugar refinery. **Journal of Biotechnology**. 70: 125-131.

Yoch, D.C. 1978. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism by photosynthetic bacteria, pp. 657-671. *In* R.K. Clayton and W. R. Sistrom., eds. **The Photosynthetic Bacteria**. Plenum Press, New York.

Zhu, H., H.H.P. Fang., T. Zang. and L.A. Beaudette. 2007. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. **Int. J. Hydrogen. Energy**. 32: 4112-4118.

Zhu, H., T. Suzuki., A.A. Tsygankov., Y. Asada. and J. Miyake. 1999. Hydrogen production from tufu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. **Int. J. Hydrogen. Energy**. 24: 305-310.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นางสาว น้ำทิพย์ เดชแพร
เกิดวันที่	วันที่ 8 พฤษภาคม 2528
สถานที่เกิด	อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	--
ผลงานทางวิชาการ	- ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิสาขาวิทยาศาสตร์ และได้นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553 ในหัวข้อ วิธีการทางสถิติในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอไฮโดรเจน (Statistica Methods Used in Optimizing Conditions of Biohydrogen Productions) - ได้เข้าร่วมและเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 26-28 ตุลาคม 2553 ในหัวข้อ การประเมินปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนแบบมีแสงของ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24 (Evaluation of Important Factors Affecting Hydrogen Photoproduction of <i>Rubrivivax gelatinosus</i> SB24.)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนจากบริษัท ปตท. เคมีคอล จำกัด (มหาชน) สนับสนุนทุนด้านการศึกษา และดำเนินงานวิจัยตลอดการศึกษา