รายงานการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อผลิตไฮโดรเจน

OPTIMIZATION OF *CHLORELLA* SP. CULTIVATION FOR HYDROGEN PRODUCTION

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ROH
QK
569
.C49
ส๖๑๙ส
ตขหมู่.....
เลขทะเบียน 115593 ๒.1
วัน,เดือน,ปี 21 มิ.ย. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๓

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12313130
i.
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อผลิตไฮโดรเจน ดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2553 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณ นางสาวศรินยา ใจตรง ผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการนี้ นักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัย นางสาวสุรัตน์ติพร รัตนะ และนายสามารถ ต่ายขาว ที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อผลิตไฮโดรเจน

Optimization of *Chlorella* sp. Cultivation for Hydrogen Production

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553 จำนวนเงิน 200,000 บาท
ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัดและเลขหมายโทรศัพท์
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนนฉลองกรุง จังหวัดกรุงเทพฯ 10520 โทร. 0-2329-8400-11 ต่อ 336 โทรสาร 0-2329-8427

บทคัดย่อ

ไบโอไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทดแทนที่สะอาดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 โดยพบว่าสาหร่าย *C. vulgaris* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทริส-อะซีเตท-ฟอสเฟต (TAP) ภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีแสงและบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ความเข้มแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. vulgaris* คือ 3,000 ลักซ์ และ 25 องศาเซลเซียส แหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายชนิดนี้ คือ น้ำตาลซูโครส นอกจากนี้ การขาดแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณที่สูงขึ้น สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนคือ อาหารเหลว TAP ที่ปราศจากกรดอะซีติกและแมกนีเซียมซัลเฟต และประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.0196 มิลลิโมลาร์ และ เฟอร์รัสซัลเฟต 0.09 มิลลิโมลาร์

ABSTRACT

Biohydrogen is an environmental friendly clean alternative energy produced by a number of different organisms. Green microalgae can produce hydrogen via the photobiological-H_2 production process. In this work, hydrogen production of a unicellular green alga *Chlorella vulgaris*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

var. vulgaris TISTR 8261 was investigated. It could produce hydrogen under photoheterotrophic growth conditions in Tris Acetate Phosphate (TAP) medium. The highest hydrogen was produced when cultivated cells in TAP medium for 18 hours under light and then incubated under anaerobic adaptation for 2 hours. The optimum light intensity and incubation temperature for both algal growth and hydrogen production were 3,000 lux and 25 °C, respectively. Sucrose was the best organic carbon source for hydrogen production by this alga. In addition, the deprivation of magnesium sulfate in the medium promoted the higher hydrogen production. The optimal medium for its hydrogen production was 17.4 mmol C/l of sucrose, 0.0196 mM of ammonium chloride and 0.09 mM of ferrous sulfate containing TAP medium without adding acetic acid and magnesium sulfate.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....I
บทคัดย่อ.....II
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....V
สารบัญรูป.....VI
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....17
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....50
บรรณานุกรม.....52
ภาคผนวก.....55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ.....21
[Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	พลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ	6
2.2	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	8
2.3	การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการสังเคราะห์แสง	12
2.4	บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น (Fe-hydrogenase) ในสาหร่ายสีเขียว	14
2.5	*Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า	16
3.1	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในฟลาสก์	19
4.1	การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM, BG11, N8 และ TAP	28
4.2	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM, BG11, N8 และ TAP	28
4.3	การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในอาหาร TAP	29
4.4	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่มีอายุเซลล์ 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP	30
4.5	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 โดยการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ	31
4.6	การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืดและที่มีแสง	32
4.7	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืดและที่มีแสง	33
4.8	การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงต่างๆ	34
4.9	การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ	35
4.10	การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

4.11 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....37
ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

4.12 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....38
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.13 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....39
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.14 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....40
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของซูโครส

4.15 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....41
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.16 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....42
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

4.17 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....43
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

4.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....44
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต

4.19 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....45
ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต

4.20 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....46
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต

4.21 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....47
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต

4.22 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....48
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสม (optimal TAP) เปรียบเทียบกับอาหาร
สูตรเดิม (TAP)

4.23 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261.....49
ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสม (optimal TAP) เปรียบเทียบกับอาหาร
สูตรเดิม (TAP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันพลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก ทำให้เกิดความสะดวกสบายในชีวิตประจำวัน พลังงานส่วนใหญ่ที่ผลิตขึ้นจะถูกนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมและการผลิตกระแสไฟฟ้า โดยผลิตมาจากน้ำมัน ถ่านหิน หรือก๊าซธรรมชาติ ซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และคาดว่ากำลังจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นานนัก นอกจากนี้ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานเหล่านี้ยังก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เถ้าและฝุ่นละออง เป็นต้น สำหรับปริมาณพลังงานทรัพยากรเชื้อเพลิงสำรองภายในประเทศไทย พบว่ามีปริมาณน้ำมัน 0.714 พันล้านบาร์เรล ซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี มีปริมาณก๊าซธรรมชาติ 33 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุต ซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 30 ปี และมีปริมาณถ่านหิน 0.984 พันล้านตัน ซึ่งใช้ได้อีกประมาณ 60 ปี (ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร, 2547) ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานคิดเป็นร้อยละ 12 ของมูลค่าการนำเข้าสินค้าทั้งหมด ซึ่งพลังงานที่นำเข้ามาส่วนใหญ่คือ น้ำมันเชื้อเพลิง (ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร, 2547) ดังนั้น เพื่อป้องกันปัญหาการขาดแคลนพลังงานในอนาคต จึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เพื่อลดอัตราการนำเข้าจากต่างประเทศและพลังงานทดแทนนั้นจะต้องไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างพลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานน้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน เป็นต้น (ชัชวาลย์ ชัยชนะ, 2547; ภานุทัศน์ อินใจมา, 2550)

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่ให้ความร้อนสูง โดยสามารถให้ความร้อนสูงถึง 142 เมกกะจูลต่อกิโลกรัม เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อนและเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศจะเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ กระบวนการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอุตสาหกรรมมีได้หลายวิธี เช่น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลโดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming process) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (water electrolysis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry) และการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพ (biohydrogen production) เป็นต้น ในปัจจุบัน มีการใช้พลังงานไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวด และในการขับดันยานอวกาศ นอกจากนี้ ยังมีการประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน ซึ่งในการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลโดยวิธีสตีมรีฟอร์มมิง เป็นวิธีการที่ยังต้องใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด ส่วนการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้านั้นต้องใช้ความดันสูงและมีความเสี่ยงต่อการระเบิดสูง ด้วยเหตุนี้ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่า **"ไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)"** มากขึ้น

สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว ฯลฯ แบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักน้ำตาลหรือสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เพื่อให้ได้โปรตอนและอิเล็กตรอนมากพอสำหรับใช้ในการผลิตไฮโดรเจน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นหลายกลุ่ม ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia coli*, *Clostridium butylicum* และ *Thermohydrogenium kirishis* เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและไซยาโนแบคทีเรียจะผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ตัวอย่างของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* และ *Rhodopseudomonas sphaeroides* เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Nostoc muscorum* เป็นต้น และสำหรับสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิต นอกจากนี้ ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลอีกด้วย สาหร่ายสีเขียวที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* และ *Scenedesmus obliquus* เป็นต้น

ในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีความได้เปรียบในแง่ของการเพาะเลี้ยงที่สามารถทำได้ง่ายทั้งในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรป และสภาวะโฟโตออโตโทรป โดยสามารถเลือกใช้คาร์บอนไดออกไซด์หรือสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาลกลูโคส และกรดอะซิติก ฯลฯ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ ยังใช้พลังงานแสงซึ่งมีอยู่อย่างไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำกัดเป็นแหล่งพลังงาน มีรายงานการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* ขึ้นเป็นครั้งแรก เมื่อชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศในที่มืด (Gaffron, 1939) และเซลล์จะผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลแทนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน (Gaffron และ Rubin, 1942) นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่มีแสงได้เช่นกัน โดยการผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มมากขึ้นในความเข้มแสงต่ำ แต่เมื่อให้ความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงมากกว่า 500 ลักซ์ การผลิตไฮโดรเจนก็จะลดลง (Gaffron และ Rubin, 1942) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในสาหร่ายสีเขียว จัดเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ หรือที่เรียกว่า "Iron- หรือ Fe-hydrogenase" ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสิ่งมีชีวิตอื่นที่ประกอบด้วยเหล็กและนิกเกิลเป็นโคแฟกเตอร์ (Schnackenberg และคณะ, 1993) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความไวต่อออกซิเจนเป็นอย่างมาก จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวถ้ามีออกซิเจนในกระบวนการมาก ออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Greenbaum และ Lee, 1998) ได้มีรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว โดยพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์จะทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงหยุดลง ส่งผลให้ไม่เกิดออกซิเจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Melis, 2002) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า เมื่อปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ หรือเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ การผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสภาวะดังกล่าวจะมีผลทำให้กระบวนการหายใจภายในเซลล์ลดลง (Kruse และคณะ, 2005) นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นอีก เช่น *Chlorella fusca* (Winkler และคณะ, 2002), *Scenedesmus obliquus* (Abeliovich และ Weisman , 1978), *Platymonas subcordiformis* (Guan และคณะ, 2004) เป็นต้น

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา สายพันธุ์ *vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ซึ่งได้ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ ทำการแปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนโดยแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะไร้อากาศ ในที่มืดและแสงสว่าง ศึกษาปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย อันได้แก่ อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ความเข้มแสง การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน การแปรผันปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา สายพันธุ์ *vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในการผลิตไฮโดรเจนในระดับเขย่า โดยศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ ทำการแปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนโดยแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะไร้อากาศ ในที่มืดและแสงสว่าง ศึกษาปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย อันได้แก่ อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ความเข้มแสง การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน การแปรผันปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา สายพันธุ์ *vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และศึกษาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนโดยชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน โดยศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ ทำการแปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนโดยแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะไร้อากาศ ในที่มืดและแสงสว่าง ศึกษาปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย อันได้แก่ อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ความเข้มแสง การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน การแปรผันปริมาณไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสภาวะที่เหมาะสมของสาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา สายพันธุ์ *vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจน เพื่อเป็นแนวทางในการนำสาหร่ายมาผลิตไฮโดรเจนให้มีปริมาณที่สูงขึ้นในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

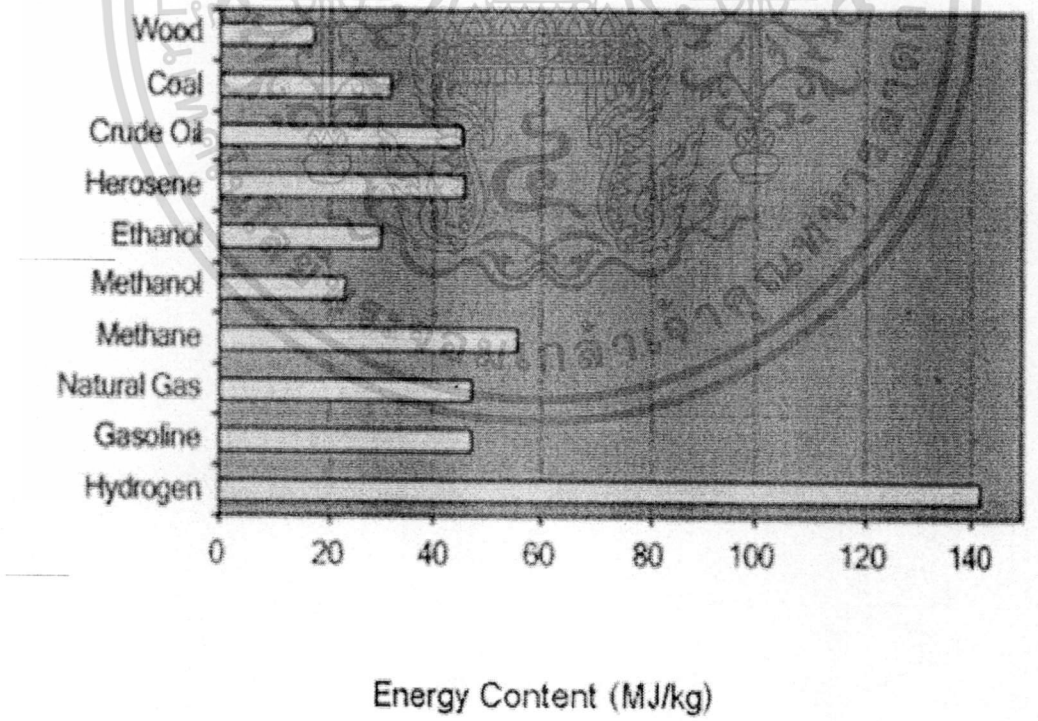
จากวิกฤตการณ์การขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา เนื่องมาจากการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้น้ำมันมีราคาที่สูงขึ้นมากจนส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ น้ำมันเชื้อเพลิงส่วนใหญ่ผลิตมาจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งกำลังจะหมดไป ด้วยเหตุนี้ ในช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา จึงได้มีความพยายามในการค้นคว้าและพัฒนาพลังงานแหล่งใหม่ในการทดแทนการใช้น้ำมันเชื้อเพลิง โดยพลังงานแหล่งใหม่ที่จะนำมาทดแทนแหล่งพลังงานเดิมนั้นจะต้องเป็นพลังงานที่สะอาด ปลอดภัย และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ไฮโดรเจน จึงเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต ไฮโดรเจน (อังกฤษ: Hydrogen; ละติน: Hydrogenium) เป็นธาตุลำดับแรกในตารางธาตุ มีสัญลักษณ์ธาตุ คือ H และมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 ที่อุณหภูมิห้องและในสภาวะความดันบรรยากาศมาตรฐาน ไฮโดรเจนมีสถานะเป็นก๊าซที่มี 2 อะตอม และมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดหรือเวเลนซ์อิเล็กตรอนตัวเดียว ไฮโดรเจนสามารถพบในองค์ประกอบของน้ำ ในสารประกอบอินทรีย์ทุกตัวและในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไฮโดรเจนสามารถทำปฏิกิริยาได้กับคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้ ไฮโดรเจนซึ่งจัดเป็นธาตุที่เบาที่สุดโดยเบากว่าอากาศถึง 14 เท่า สามารถลอยกระจายไปในอากาศได้อย่างรวดเร็วและไม่ตกค้างบนพื้นดิน เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย และให้พลังงานเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูง โดยไฮโดรเจนให้พลังงานต่อหน่วยได้สูงสุดในบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ และมีค่าพลังงานเชื้อเพลิงสูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงถึง 3 เท่า (รูปที่ 2.1) ไฮโดรเจนสามารถติดไฟได้แต่ไม่ได้ช่วยให้ไฟติด หมายความว่า ต้องอาศัยตัวออกซิเจนในการเผาไหม้ ไฮโดรเจนมีจุดติดไฟที่ 570 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าแก๊สโซลีนที่ติดไฟประมาณ 500 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่ต่ำมากที่ -253 องศาเซลเซียส ไฮโดรเจนถือว่ามีอันตรายน้อยกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นมาก เนื่องจากไฮโดรเจนเบากว่าอากาศมาก เมื่อมีการรั่วออกมาไฮโดรเจนจะกระจายตัวขึ้นไปในอากาศอย่างรวดเร็ว และเมื่อเกิดการเผาไหม้ เปลวไฟจะขึ้นข้างบนและจะหมดไปอย่างรวดเร็ว เกิดการเผาไหม้เร็วมากและมีการแผ่รังสีความร้อนในระดับต่ำ ซึ่งต่างจากเบนซินและดีเซล ซึ่งไอของเบนซินและดีเซลหนักกว่าอากาศทำให้มีการลุกไหม้อยู่นานกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ศิริจันทร์ และ มานิจ ทองประเสริฐ, 2008) ด้วยคุณสมบัติของไฮโดรเจนที่ไม่เป็นพิษ ทำให้สามารถออกแบบระบบการใช้พลังงานไฮโดรเจนให้มีความปลอดภัยมากกว่าหรืออย่างน้อยเท่ากับระบบเครื่องยนต์แก๊สโซลีน (สิริชนก จันทร์ใบ, 2008)

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด เมื่อทำการเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้น้ำและความร้อนเป็นผลิตภัณฑ์ และเมื่อเผาไหม้ไฮโดรเจนในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน โดยไม่ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก นอกจากนี้ ก๊าซไฮโดรเจนยังมีค่าอ๊อกเทน (ค่าความต้านทานการน็อคของเครื่องยนต์ : antiknock quality) สูงถึง 120 โดยเชื้อเพลิงที่มีค่าอ๊อกเทนสูงจะทำให้เกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สมบูรณ์ เครื่องยนต์เดินเรียบไม่สะดุด ทำให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อเทียบกับพลังงานอื่นๆ ไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ยิ่งไปกว่านั้น พลังงานไฮโดรเจนยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนกับงานที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิม เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับครัวเรือน เครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น ได้อีกด้วย (Bak และคณะ 2002)



รูปที่ 2.1 พลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ

ที่มา : http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีได้หลายวิธี ทั้งการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ดังต่อไปนี้

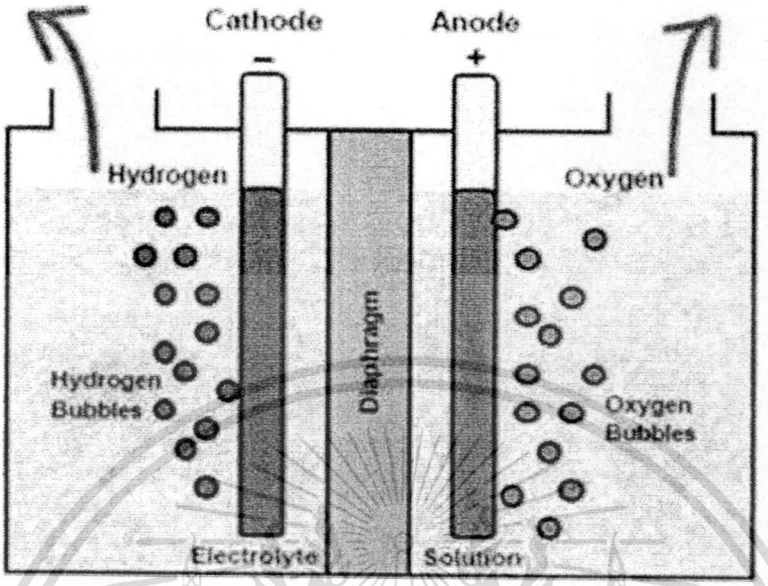
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำในรูปของไอน้ำ โดยอาศัยพลังงานความร้อนทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการทางอุตสาหกรรมที่นิยมใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนี้ถูกเรียกว่า coal gasification ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยไฟฟ้า เป็นวิธีการที่ใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง (water electrolysis) ทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม โดยอาศัยอิเล็กโทรด (electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (cathode) วิธีการเตรียม คือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้มีความเป็นตัวนำมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโตรไลท์ (electrolyte) เช่น กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) หรือ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.2) วิธีนี้ต้องใช้กระแสไฟฟ้าสูงถึง 90 กิโลวัตต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะให้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ และจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า
ที่มา : http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (thermochemistry)

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี เป็นกระบวนการที่พัฒนาการผลิตไฮโดรเจนโดยการใช้สารประกอบปรอทโบรไมด์และแคลเซียมในกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถนำความร้อนของถังปฏิกรณ์นิวเคลียร์มาผลิตไฮโดรเจนได้ โดยพลังงานทั้งหมดจึงจะถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่ข้อเสีย คือ ปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนัก อันได้แก่ ปรอท และโบรไมด์

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen)

การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียบางชนิดผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก สาหร่ายสีเขียวใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตไฮโดรเจน และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Kosaric และ Lyng, 1988)

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน

ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพนั้น จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มี 3 ชนิดดังนี้

2.3.1 แบคทีเรีย (bacteria)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ 2 กลุ่ม คือ

2.3.1.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (phototrophic bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (anoxygenic phototrophic bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) แบคทีเรียสีม่วงชนิดไม่สะสมกำมะถัน (non-sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. เป็นต้น (2) แบคทีเรียสีม่วงชนิดสะสมกำมะถัน (sulfur purple bacteria) ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceaes* sp. เป็นต้น (3) แบคทีเรียสีเขียวชนิดสะสมกำมะถัน (green sulfur bacteria) ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มนี้ผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียเหล่านี้จะใช้รงควัตถุที่แตกต่างกับรงควัตถุของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ในกระบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ไธโอซัลเฟตซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์เป็นสารให้อิเล็กตรอน

2.3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้กระบวนการหมัก (dark fermentation bacteria)

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลหรือแหล่งอินทรีย์คาร์บอนชนิดอื่นเพื่อผลิตตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับใช้ในการผลิตไฮโดรเจน แบคทีเรียที่มีความสามรถในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจน ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* และ *Escherichia coli* เป็นต้น

2.3.2 ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (oxygenic phototrophic prokaryote) ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์คล้ายกับสาหร่ายสีเขียวและพืช กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่ายสีเขียว โดยผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสง และบางชนิดอาจผลิตจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) ได้ ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp. และ *Nostoc* sp. เป็นต้น

2.3.3 สาหร่ายสีเขียว (green algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจน ในที่มืดและที่มีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้แสงถูกเรียกว่า photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำจะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ผลิตไฮโดรเจนลดลงจากสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการพัฒนาและนำมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่ายทั้งในสภาวะโฟโตออโตโทรป และสภาวะเฮเทอโรโทป โดยใช้เพียงน้ำและแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน

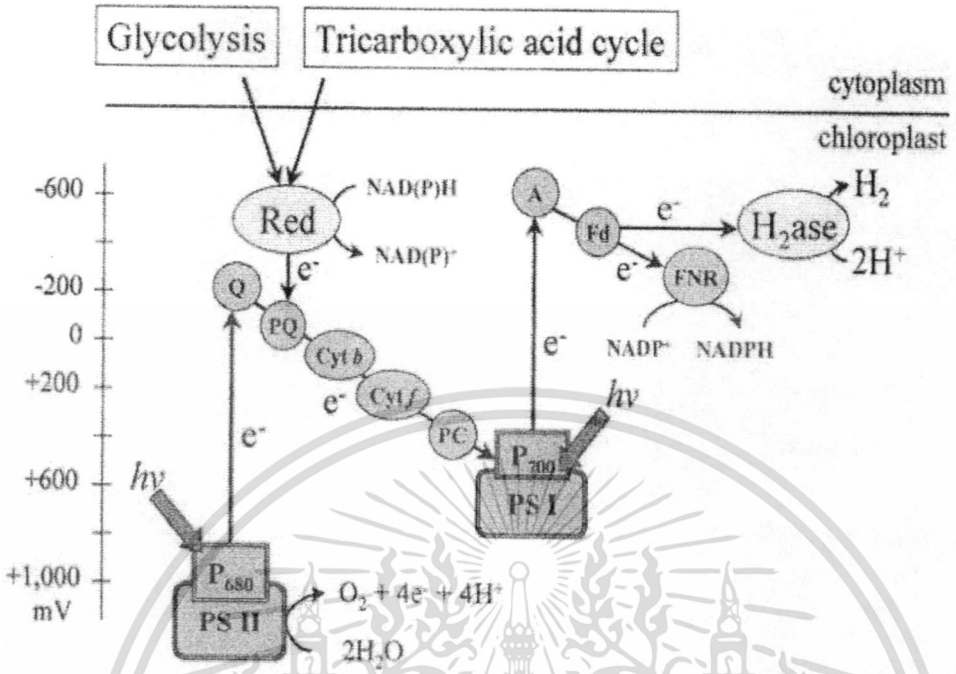
2.4 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ซึ่งในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้งแคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (reaction center) ซึ่งอยู่ในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอ ซึ่งเมื่อโมเลกุลคลอโรฟิลล์เอได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอจะถูกกระตุ้นให้มีระดับพลังงานที่สูงขึ้น และพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนนซึ่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : primary electron acceptor of PSII) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : plastoquinone) ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวออกหรือที่เรียกว่า water splitting ได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ จากนั้น อิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมบี (cytochrome b) ไซโตโครมเอฟ (cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PSI) ระบบแสงหนึ่งจะประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (A : primary electron acceptor of PSI) และเมื่อโฟตอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง (PSI) คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin : Fd) แล้วเมื่ออิเล็กตรอนออกจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น (รูปที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวจากกระบวนการสังเคราะห์แสง
ที่มา : Melis และ Happe (2001)

2.5 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Gaffron ในปี ค.ศ.1939 จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase ; acceptor oxidoreductase, EC1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99.1) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 1.1

$$H_2 \xleftrightarrow{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad \text{สมการที่ 1.1}$$

Stephenson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ "hydrogenase" ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบการผลิตไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Unidirectional หรือ Uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน

2. Bidirectional หรือ Reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด (Schulz และคณะ, 1998) ดังนี้

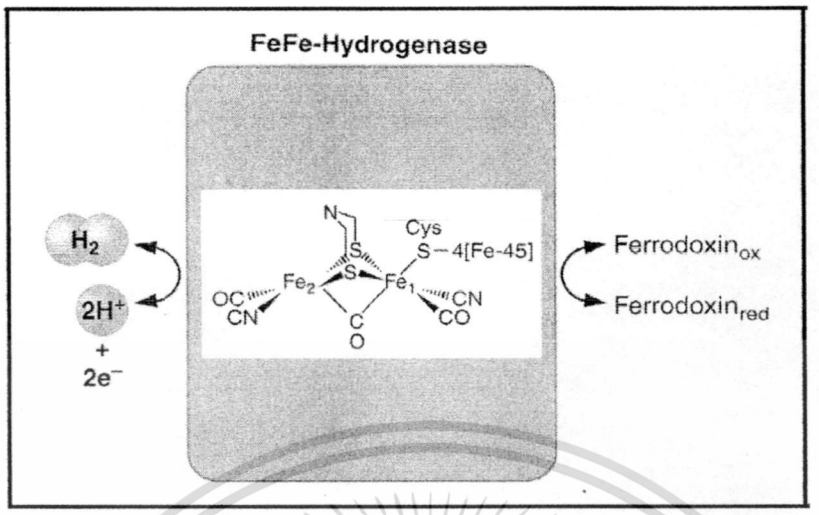
1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็ก (NiFe–hydrogenase) ในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์

2. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กเท่านั้นที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Fe-hydrogenase)

3. ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่บริเวณกระตุ้นประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก (Fe–hydrogenase) ซึ่งสามารถทำงานได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น มีการศึกษาเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca* และ *Chlamydomonas moewusii* และพบยีนไฮโดรจีเนสที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน (kDa) และพบความคล้ายคลึงของยีนไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมี 1 หน่วยย่อย มีบริเวณกระตุ้นหรือบริเวณ H-cluster ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอม เหล็กจะจับเข้ากับซัลเฟอร์ในกรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) และทำหน้าที่เป็น Fe-S cluster นอกจาก อะตอมของเหล็กที่อยู่ตรงกลางของบริเวณนี้จะจับกับซีสเทอีนแล้ว ยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย (Maness และคณะ, 2009) (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น (Fe-hydrogenase) ในสาหร่ายสีเขียว

ที่มา : Maness และคณะ (2009)

2.6 สาหร่ายสีเขียว (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2546)

สาหร่ายสีเขียวแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ สาหร่ายสีเขียวที่พบในทะเลซึ่งมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายทะเลมักจะพบบริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง อาจจะมีบ้างที่พบในระดับความลึกถึง 300 ฟุต ที่แสงสามารถส่องถึง อีกชนิดหนึ่งก็คือสาหร่ายน้ำจืด ซึ่งมีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมด สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ หรือน้ำลึก บางชนิดขึ้นอยู่บนก้อนหิน ทราย โคลน เปลือกหอย บนพืช สัตว์อื่น หรืออาจเจริญอยู่ในพืชก็ได้ สาหร่ายสีเขียวจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสง และความสมบูรณ์ของอาหาร สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดเป็นแพลงก์ตอนพืช

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงที่ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์ ได้แก่ แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น (แต่บาง Class ก็ไม่มีผนังเซลล์ มีเยื่อหุ้มเซลล์แทน) ผนังชั้นนอกประกอบด้วยสารจำพวกเพคติน ผนังชั้นในเป็นสารจำพวกเซลลูโลส บางชนิดมีหนวด (flagella) ซึ่งพบเฉพาะในสาหร่ายที่เคลื่อนไหวได้ หนวดมีลักษณะเรียบคล้ายแส้ (acronematic type) หรือเป็นวง ถ้ามีหนวดมากกว่า 1 เส้น ความยาวของหนวดจะเท่ากันทุกเส้น สาหร่ายที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนวดจะมีออร์กาเนลล์ที่มีสีเรียกว่าตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบมีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicellular) โคโลนี (colony) และเส้นสาย (filament) พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีมีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และเคลื่อนไหวไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวเป็นอาหารสะสมประเภทแป้งและสะสมแป้งในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่า ไพรีนอยด์ โดยแป้งประกอบด้วยอะไมโลส และอะไมโลเพคติน

วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียวมี 2 แบบ คือ แบบแฮพลอนติก (heplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะไซโกต แบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ พบใน Order *Volvocales* และแบบดิบพลอนติก (diplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะสร้างแกมมีท พบในบางสกุลของ Order *Chlorococcales* การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการรวมกันของแกมมีท ซึ่งมีทั้งแบบ isogamy, anisogamy และ oogamy ส่วนแบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ สร้างสปอร์ และสร้างอะคินีต (akinete) เป็นต้น

2.7 สาหร่ายสีเขียวคลอเรลลา (ลัดดา, 2542)

สาหร่ายสีเขียวคลอเรลลาตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) พบว่า *Chlorella vulgaris* จัดอยู่ใน

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Trebouxiophyceae

Order Chlorococcales

Family Chlorellaceae

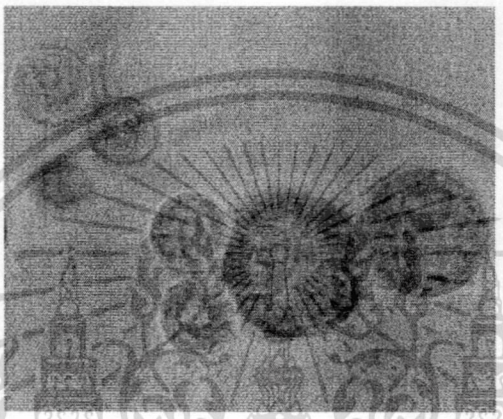
Genus *Chlorella*

Specie *Chlorella vulgaris*

สาหร่ายในแฟมิลีนี้พบได้ง่ายโดยเฉพาะในดิน แม้กระทั่งในขวดน้ำ หรือถังบรรจุน้ำที่ไม่ค่อยได้ล้างก็จะพบเสมอ และมักจะพบอาศัยอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิส (Symbiosis) กับสัตว์ เช่น พารามิเซียม ไฮดรา ฟองน้ำ เป็นต้น การสืบพันธุ์ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตสปอร์ ซึ่งมีจำนวน 4, 8 หรือ 16 เซลล์ (ซึ่งพบได้น้อยมาก) คลอเรลลาเป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีขนาดเล็กมากประมาณ 2-12 ไมโครเมตร เซลล์มีรูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ คลอโรพลาสต์มักด้านข้าง หรือเป็นรูปถ้วย มีไพรีนอยด์ ผนังเซลล์ค่อนข้างบางโดยพบว่าประกอบไปด้วยสารพวก sporopollenin รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะรูปร่างของสาหร่ายคลอเรลลา สายพันธุ์ *vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 2.5 *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย (ภาคผนวก ก)

3.2.1.1 อาหาร BBM (Bold's Basal Medium) (Bold และ Wynne, 1971)

3.2.1.2 อาหาร BG11 (Blue-Green Medium) (Rippka และคณะ, 1979)

3.2.1.3 อาหาร N8 (Vonshak, 1986)

3.2.1.4 อาหาร TAP (Tris acetate phosphate medium) (Harris, 1989)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.2.1 กรดบอริก (H_3BO_3) (Merck, Germany)

3.2.2.2 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (J.T. Baker, USA)

3.2.2.3 กรดซิตริก (Citric acid) (Analar, England)

3.2.2.4 กรดอะซีติก (CH_3COOH) (Merck, Germany)

3.2.2.5 กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.6 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.7 คิวปริกคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (J.T. Baker, USA)

3.2.2.8 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analar®, England)

3.2.2.9 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.10 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.11 โคบอลต์ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) (Univar, Australia)

3.2.2.12 ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Fluka, Switzerland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
115593

3.2.2.13 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.14 ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.15 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Univar, Australia)

3.2.2.16 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Carloerba, Italy)

3.2.2.17 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.18 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$) (BDH chemical, England)

3.2.2.19 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Carloerba, Italy)

3.2.2.20 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.21 ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA) (Promega, USA)

3.2.2.22 ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไอรอนซอลท์ (Fe.EDTA) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.23 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) (Merck, Germany)

3.2.2.24 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Univar, Australia)

3.2.2.25 แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone) (BioMark™, India)

3.2.2.26 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carloerba, Italy)

3.2.2.27 โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) (Carloerba, Italy)

3.2.2.28 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) (Carloerba, Italy)

3.2.2.29 ฟรุกโตส ($C_6H_{12}O_6$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.30 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.31 เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_2$) (Fluka, Switzerland)

3.2.2.32 เฟอริคแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4 \cdot$Citrate) (BDH, England)

3.2.2.33 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$) (Carloerba, Italy)

3.2.2.34 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Univar, Australia)

3.2.2.35 ยีสต์สกัด (Yeast-extract) (Himedia®, India)

3.2.2.36 อะลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$) (J.T. Baker, USA)

3.2.2.37 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Univar, Australia)

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

เมทานอล (CH_3OH) (Scharlau, Spain)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus, CH30, Japan)

3.3.2 ขวดแก้ว (Headspace vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร (National Scientific, C4020-210, USA)

3.3.3 คิวเวต (Semimicro cuvette rectangular 10 mm) (Hellma, USA)

3.3.4 เครื่องแก๊สโครโมโตกราฟ (Gas Chromatograph) (Shimadzu 15-A, Kyoto, Japan)

3.3.5 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)

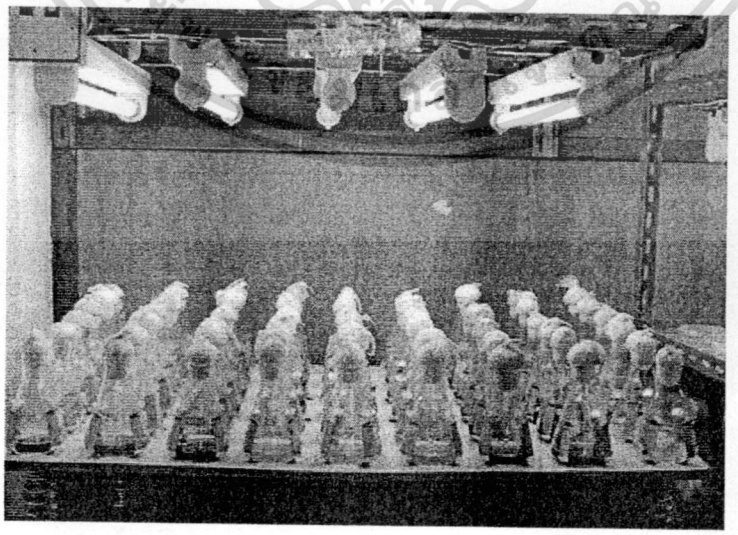
3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z383K, Germany)

3.3.7 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)

3.3.8 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวชนิดต่างๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน (รูปที่ 3.1) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีมาลากบนจานที่มีอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-3 สัปดาห์



รูปที่ 3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการวัดการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวชนิดต่างๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการศึกษาการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.6 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

นำเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามหัวข้อ 3.4 มา 100 ไมโครลิตร เติมเมทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 45 วินาที ห่อฟอยล์ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 และ 650 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee และ Shen (2004)

3.7 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

นำสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามวิธีในหัวข้อ 3.4 มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย จากนั้น กระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรที่ห่อฟอยล์ปิดฝาขวด นำตัวอย่างไปพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที แล้วคว่ำขวดบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำก๊าซตรงบริเวณส่วนบนของขวด (head space) ไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (GC) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน แสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ [Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

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

3.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว*Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

3.8.1 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BBM, BG11, N8 และ TAP (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ วัดการจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 โดยวัดทุกวันจนครบ 1 สัปดาห์ นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย จากนั้น กระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM, BG11, TAP และ N8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แลวปิเปตสารละลายตัวอยางปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรที่ห่อฟอยล์ ปิดฝาขวด นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะหปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบ 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.3 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 โดยทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.4 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะมืดและสว่าง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและภายใต้สภาวะสว่างให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนภายใต้สภาวะมืดไม่ให้แสงสว่างตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.5 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.6 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ลักซ์ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.7 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันแหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ กรดอะซีติก (CH_3COOH) กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ซูโครส ($C_{12}H_{24}O_{11}$) ฟรุกโทส ($C_6H_{12}O_6$) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) โซเดียม-คาร์บอเนต (Na_2CO_3) และโซเดียมอะซีเตท (CH_3COONa) โดยให้มีจำนวนโมลของคาร์บอนอะตอมเท่ากัน คือเท่ากับ 34.8 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร (มาจากจำนวนโมลของคาร์บอนอะตอมในกรดอะซีติก (CH_3COOH) 17.4 มิลลิโมลาร์ของอาหาร TAP) และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.8 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของแหล่งคาร์บอน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกเท่ากับ 0, 4.35, 8.7, 17.4, 34.8, 174 และ 345 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.9 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เท่ากับ 0, 0.0196, 0.198, 0.98, 1.96, 9.8 และ 19.6 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.10 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของซัลเฟอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เท่ากับ 0, 0.004, 0.04, 0.2, 0.4, 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

3.8.11 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของเหล็กซัลเฟต ($FeSO_4$) เท่ากับ 0, 0.00018, 0.0018, 0.009, 0.018, 0.09 และ 0.18 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาที่เหมาะสม วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.12 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิม

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวที่คัดเลือกปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอน แอมโมนียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต และเฟอร์รัสซัลเฟต เปรียบเทียบกับอาหาร TAP สูตรปกติ โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดค่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3.5 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ครบตามกำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.8.1 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.7 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในข้อ 3.6.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

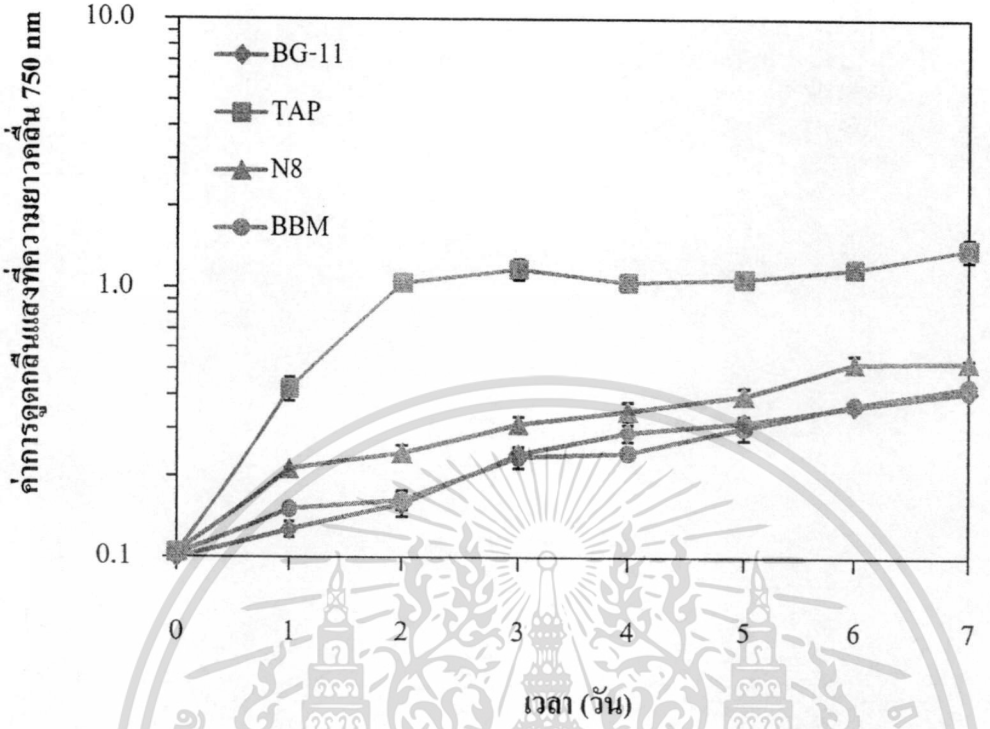
บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

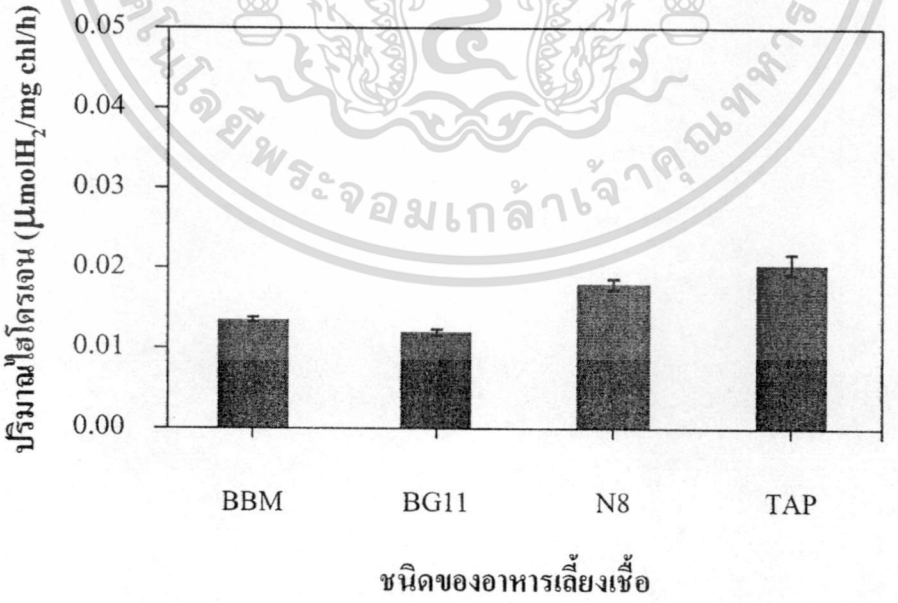
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว BBM, BG11, N8 และ TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP โดยพบว่าเซลล์จะอยู่ในระยะ log 2 วัน หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ stationary (รูปที่ 4.1) เนื่องจากอาหาร TAP มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่มากพอ สาหร่ายจึงนำเอากรดอะซีติกไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM, BG11 และ N8 เซลล์สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ และใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.1) และภายใน 1 สัปดาห์ เซลล์ยังไม่เข้าสู่ระยะ stationary เนื่องจากอาหารเหล่านี้บางชนิดไม่มีแหล่งคาร์บอน บางชนิดมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณน้อย ทำให้เซลล์สาหร่ายจำเป็นต้องตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศเพื่อใช้ในการสร้างน้ำตาลสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตมากขึ้น

จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเท่ากับ 0.021 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.2) โดยผลิตได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BBM, BG11 และ N8 ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.014, 0.012 และ 0.018 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) ด้วยเหตุนี้ จึงได้เลือกอาหาร TAP สำหรับศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. vulgaris* ต่อไป เนื่องจากทำให้เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วและผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง อีกทั้งยังประหยัดเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่มีข้อเสียเปรียบคือ การใส่กรดอะซีติกเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM, BG11, N8 และ TAP

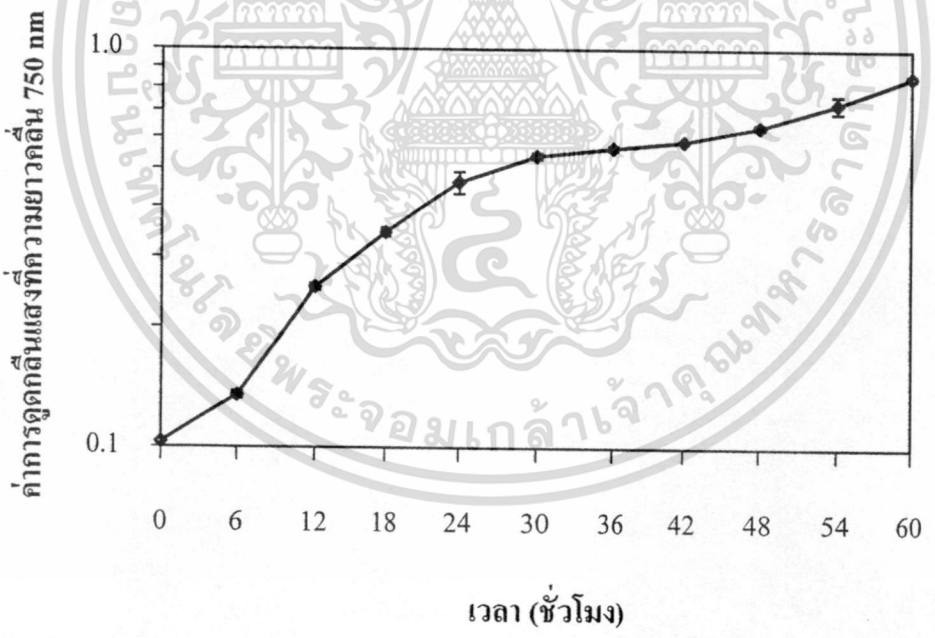


รูปที่ 4.2 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM, BG11, N8 และ TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

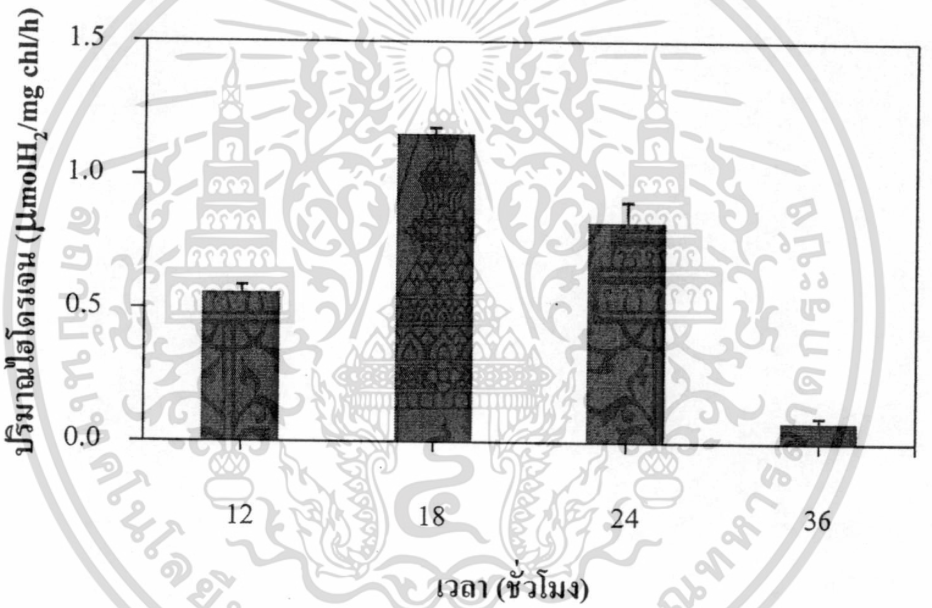
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ โดยแปรผันระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วงชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 30 การเจริญของสาหร่ายจะเข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในอาหาร TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่มีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมง ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด โดยผลิตได้ 1.152 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.4) และมากกว่าเซลล์ที่มีอายุเชื้อ 12, 24 และ 30 ชั่วโมง ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.559, 0.826 และ 0.079 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) ดังนั้น จึงเลือกระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีอายุของเชื้อที่เหมาะสมและมีความพร้อมในการผลิตไฮโดรเจนมาใช้ในศึกษาต่อไป



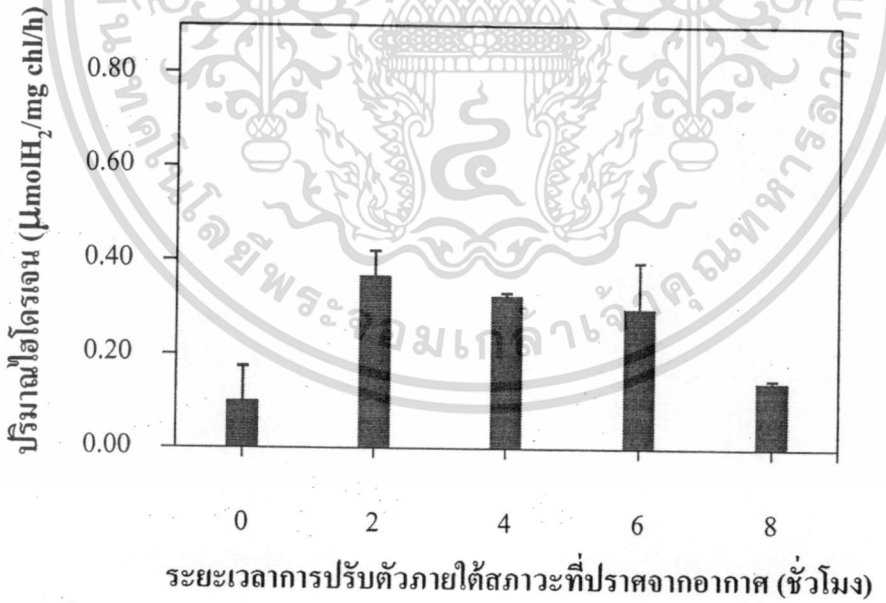
รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่มีอายุเซลล์ 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP

4.3 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้น เก็บเซลล์สาหร่ายและนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปิเปตลงในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรที่ห่อฟอยล์ ปิดฝาขวด พ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที และนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC ภายหลังการบ่มในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง คือผลิตได้ 0.368 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่ปรับตัวให้อยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ เป็นเวลา 0, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ซึ่งได้ปริมาณไฮโดรเจน 0.102, 0.327, 0.299 และ 0.143 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.5) จากการทดลองจะพบว่า สาหร่ายจะผลิตไฮโดรเจนอย่างมากในระยะแรกของการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ ทั้งนี้เนื่องมาจากการมีตัวให้อิเล็กตรอนในปริมาณสูง ภายหลังจากการใช้ตัวให้อิเล็กตรอนไปหมด อัตราการผลิตไฮโดรเจนจึงลดลง จากผลการทดลองนี้ จึงเลือกระยะเวลาในการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

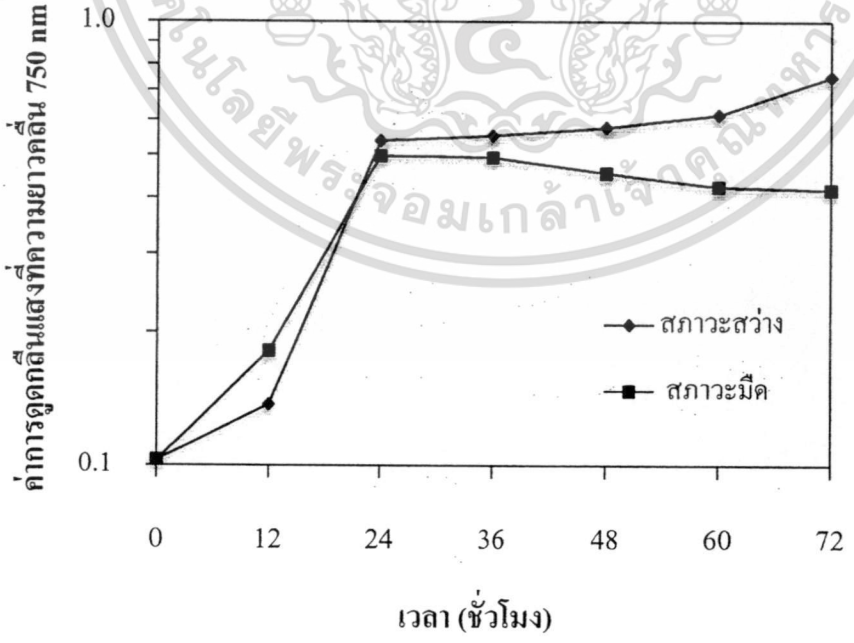


รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR โดยการแปรผันระยะเวลาการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะมืดและที่มีแสง

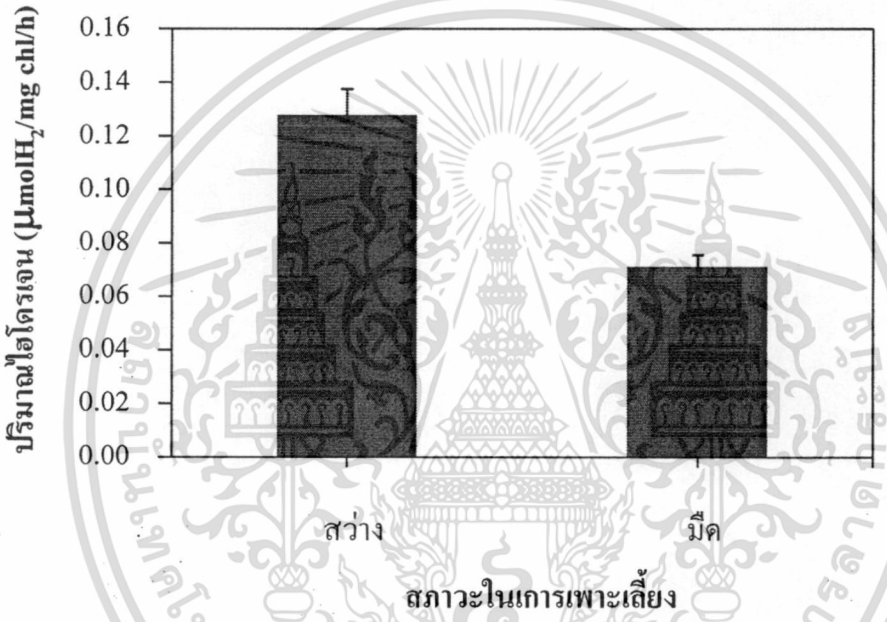
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องใน 2 สภาวะ คือภายใต้สภาวะที่มีแสง ให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ส่วนภายใต้สภาวะมืด ไม่ให้แสงสว่างตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* มีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงทั้งในสภาวะมืดและที่มีแสง (รูปที่ 4.6) หลังจากชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง สาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะมืดมีการเจริญลดลงเล็กน้อย ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในสภาวะที่มีแสงมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 4.6) ทั้งนี้เนื่องมาจากในสภาวะมืด เซลล์สาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ทำให้สามารถใช้กรดอะซีติกที่มีอยู่ในอาหาร TAP เป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น แต่ในสภาวะที่มีแสง เซลล์สาหร่ายสามารถสังเคราะห์แสงได้ ทำให้ได้น้ำตาลจากกระบวนการ Calvin cycle เพิ่มมากขึ้น การเจริญจึงสูงกว่าเล็กน้อย



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืดและที่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืดและที่มีแสง มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืด คือผลิตไฮโดรเจนได้ 0.128 และ 0.071 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) เนื่องมาจากผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงคือ ไฮโดรเจนและตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งมีบทบาทในการเพิ่มปริมาณการผลิตไฮโดรเจนทั้งทางตรงและทางอ้อม



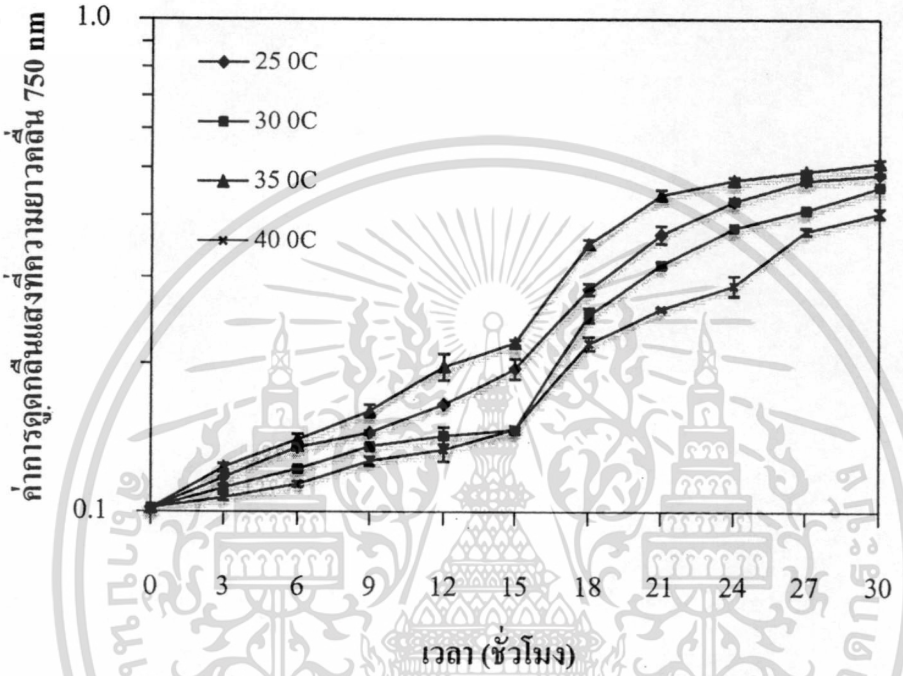
รูปที่ 4.7 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืดและที่มีแสง

4.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ โดยนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

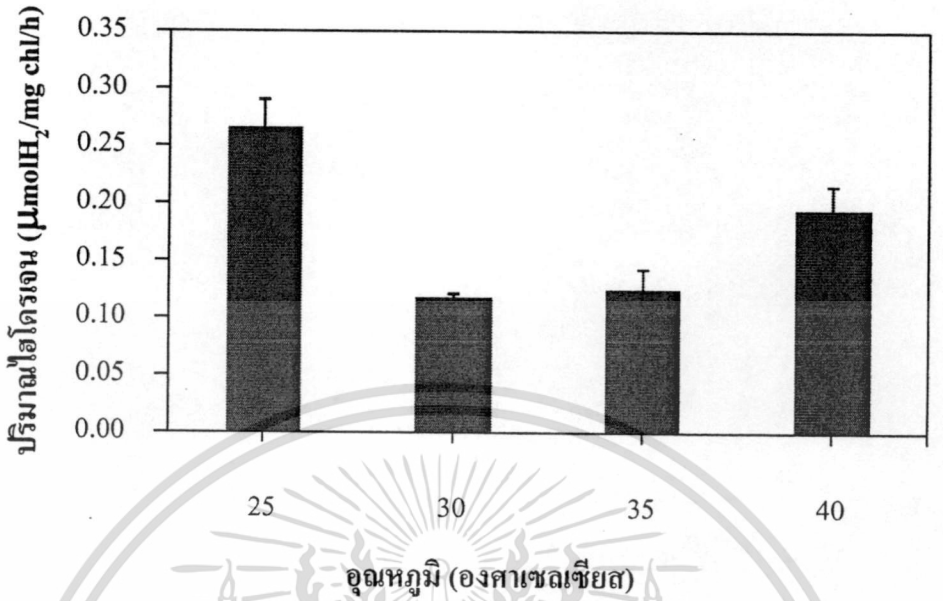
พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สาหร่ายมีการเจริญสูงที่สุด ในขณะที่ สาหร่ายมีการเจริญต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.266 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตได้ 0.188, 0.125 และ 0.195 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

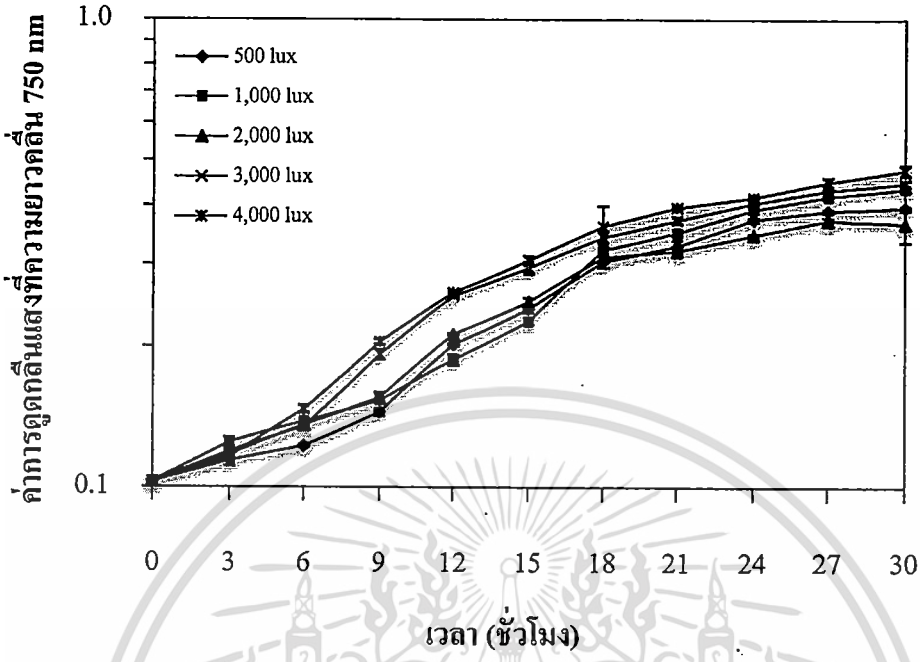


รูปที่ 4.9 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

4.6 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 3,000 และ 4,000 ลักซ์ มีการเจริญเติบโตในระยะ log phase สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ถึง ชั่วโมงที่ 18 ในขณะที่เซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 500, 1,000 และ 2,000 ลักซ์ มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน และภายหลังจากชั่วโมงที่ 18 ของการเพาะเลี้ยงภายใต้ทุกความเข้มแสง สาหร่ายมีการเจริญไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.10)

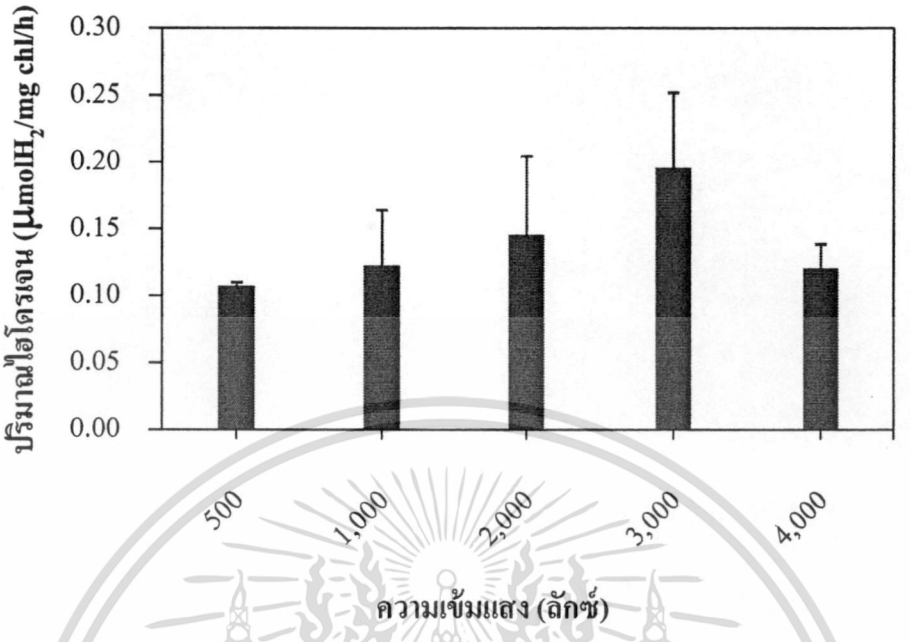
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงเท่ากับ 3,000 ลักซ์ ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.196 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมากกว่าเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ลักซ์ ซึ่งมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.107, 0.123, 0.146 และ 0.121 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.11) แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน นั่นคือเมื่อความเข้มแสงมากขึ้น เซลล์จะผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น จนกระทั่งถึงความเข้มแสงที่ 4,000 ลักซ์ แสงจะมีผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นจากการแตกตัวของน้ำในระบบแสงที่สองจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



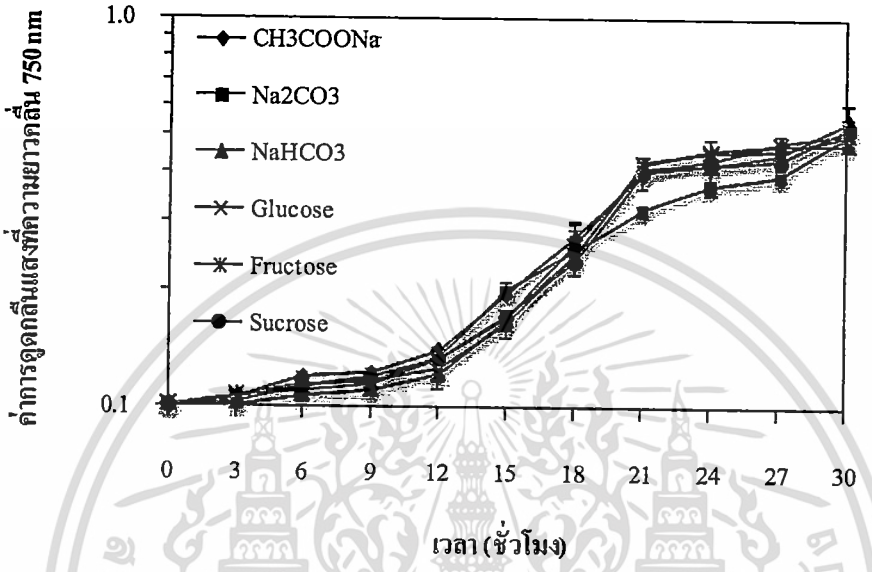
รูปที่ 4.11 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

4.7 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันแหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการแปรผันแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ กรดอะซีติก (CH_3COOH) กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ซูโครส ($C_{12}H_{24}O_{11}$) ฟรุกโทส ($C_6H_{12}O_6$) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และโซเดียมอะซีเตท (CH_3COONa) โดยให้มีปริมาณโมลคาร์บอนอะตอมเท่ากัน คือ 34.8 โมลคาร์บอนอะตอมต่อลิตร ซึ่งนำค่านี้มาจากปริมาณโมลคาร์บอนอะตอมของสูตรอาหาร TAP นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในลักษณะที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าในชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 21 เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและอยู่ในช่วง log phase (รูปที่ 4.12) หลังจากชั่วโมงที่ 21 เซลล์จะเข้าสู่ stationary phase จากผลการทดลองพบว่าสาหร่าย *C.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

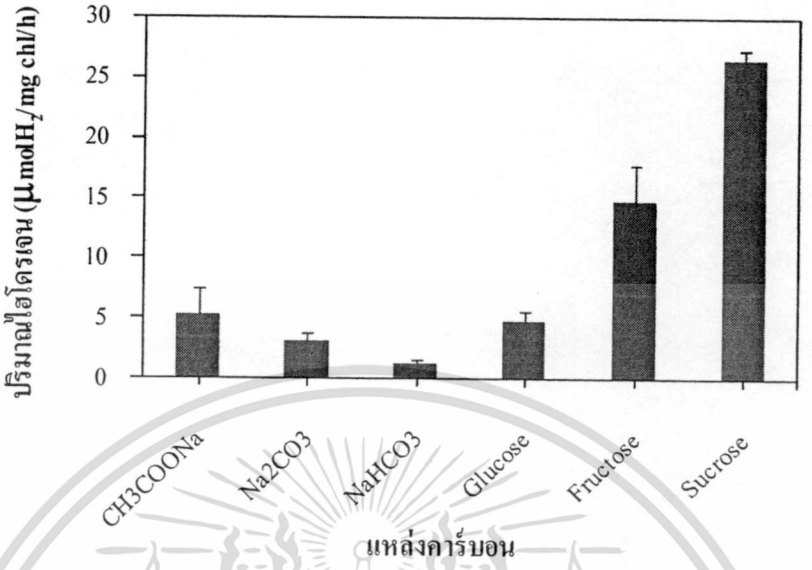
vulgaris สามารถใช้คาร์บอเนต อะซีเตท น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยให้ผลการเจริญที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.12 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากกรดอะซีติก แต่ให้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 26.518 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยมีค่ามากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากกรดอะซีติก แต่ให้ฟรุกโทส โซเดียมอะซีเตท กลูโคส โซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ซึ่งมีปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 14.731, 5.618, 4.744, 3.066 และ 1.170 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.13) จากการทดลองจะพบว่า ซูโครสมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. vulgaris* สูงที่สุด ซึ่งให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าฟรุกโตสและกลูโคสประมาณ 2 และ 5 เท่า ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการที่ซูโครสมีความสามารถในการเป็นแหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่ดีในการสร้างไกลโคเจน ซึ่งจะใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการสร้างไฮโดรเจนเมื่อมีโปรตอนและอิเล็กตรอนมากเกินไปในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

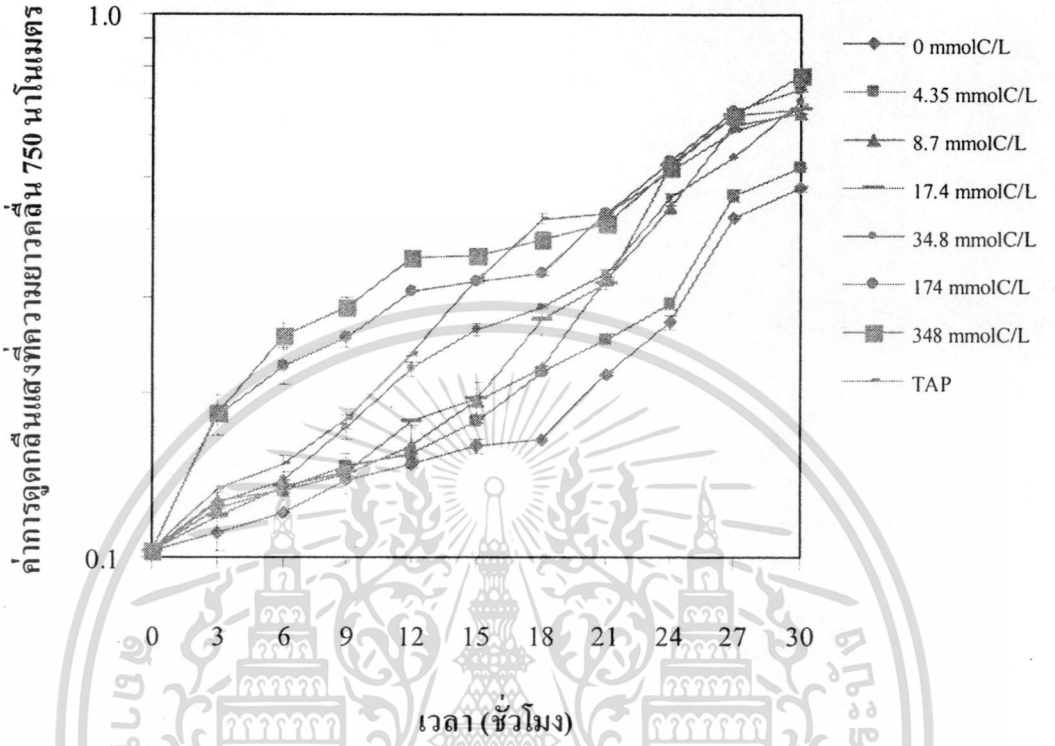


รูปที่ 4.13 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.8 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มข้นของซูโครส

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปราศจากการเติมกรดอะซีติกแต่มีการเติมน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 4.35, 8.7, 17.4, 34.8, 174 และ 345 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 174 และ 345 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยเข้าสู่ระยะ log phase ใน 3 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนก็สามารถเจริญได้เช่นกัน แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายคลอเรลลาสามารถเจริญภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป โดยสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเองได้ (รูปที่ 4.14)

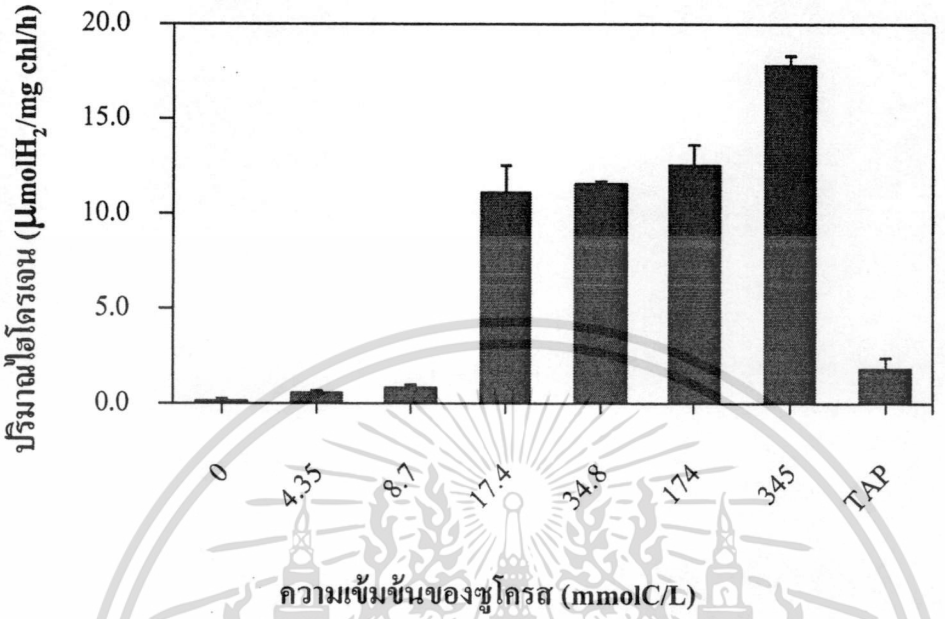
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของซูโครส

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซูโครส และมีความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 4.35 และ 8.7 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตรมีการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณน้อย (รูปที่ 4.15) ส่วนเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 17.4, 34.8, 174 และ 345 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ผลิตไฮโดรเจนได้มาก โดยผลิตในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 11.112, 11.570, 12.561 และ 17.811 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.15) และเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติที่มีกรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าผลิตไฮโดรเจนได้เพียง 1.844 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.15) ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงและมากกว่าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปกติประมาณ 6 เท่า โดยไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาณซูโครสที่มากเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

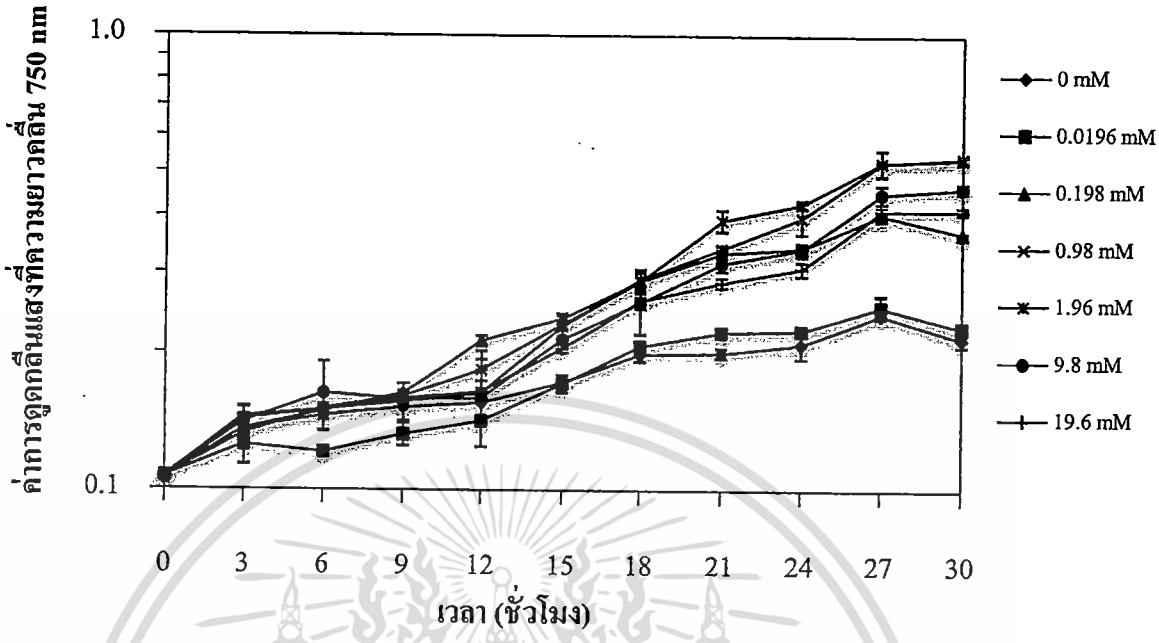


รูปที่ 4.15 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.9 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 0.0196, 0.198, 0.98, 1.96, 9.8 และ 19.6 มิลลิโมลาร์ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ยกเว้นเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่ปราศจากการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ หรือมีแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.0196 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายจะมีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะอื่นอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.16)

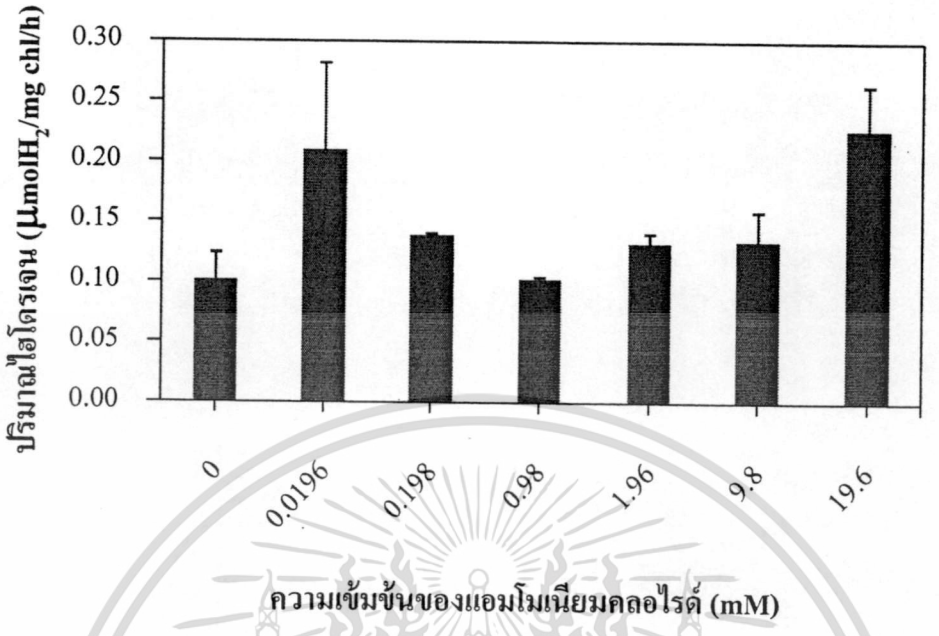
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันปริมาณของแอมโมเนียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.0196 และ 19.6 มิลลิโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 0.210 และ 0.227 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.17) ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.0196 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่า 19.6 มิลลิโมลาร์ ถึง 1,000 เท่า แต่ให้การผลิตไฮโดรเจนที่ใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

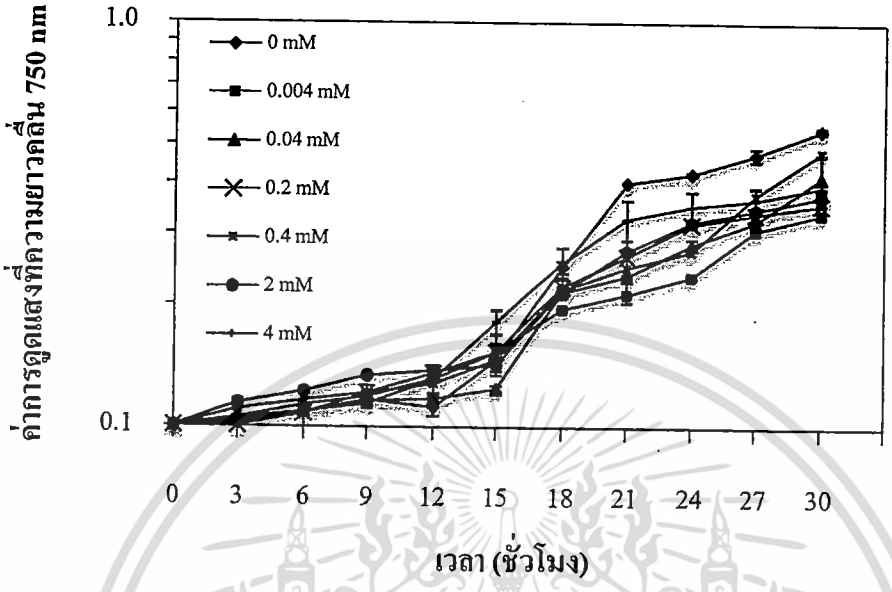


รูปที่ 4.17 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

4.10 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เท่ากับ 0, 0.004, 0.04, 0.2, 0.4, 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.18) จากผลการทดลอง แมกนีเซียมซัลเฟตไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายมากนัก ทั้งนี้ อาจเนื่องจากสาหร่ายต้องการในปริมาณน้อย และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมงไม่เพียงพอให้เห็นผล อย่างไรก็ตาม แมกนีเซียมมีผลต่อระบบเมตาบอลิซึมของเอนไซม์ในเซลล์สาหร่าย และเป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ นอกจากนี้ ซัลเฟตก็มีความสำคัญในการเป็นแหล่งซัลเฟอร์สำหรับการสร้างโปรตีนในเซลล์ ซึ่งน่าจะมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายในระยะยาว

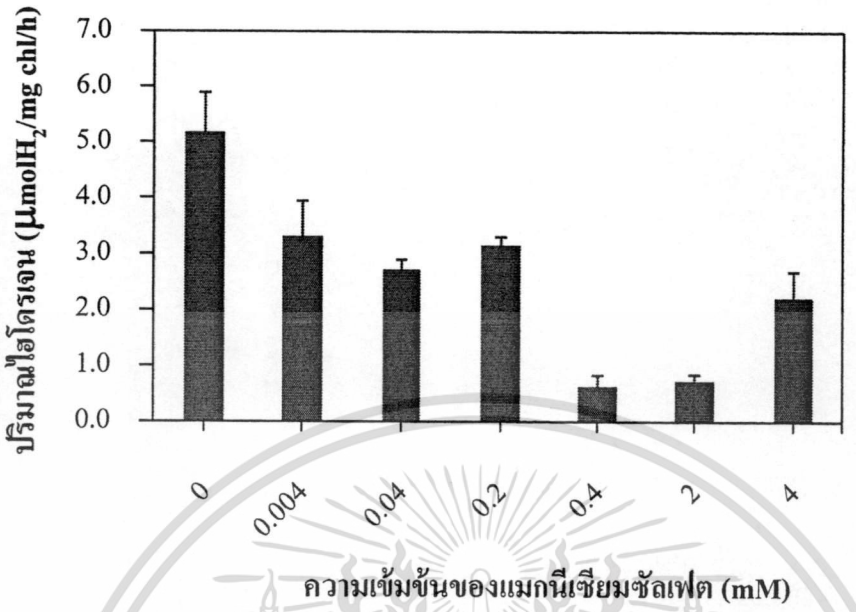
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่ปราศจากการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเท่ากับ 5.183 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.19) ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0.4 มิลลิโมลาร์ คือผลิตไฮโดรเจนได้ 0.630 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ดังนั้น จากผลการทดลองนี้ จึงเลือกการไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปกติถึงประมาณ 8 เท่า อีกทั้งยังไม่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

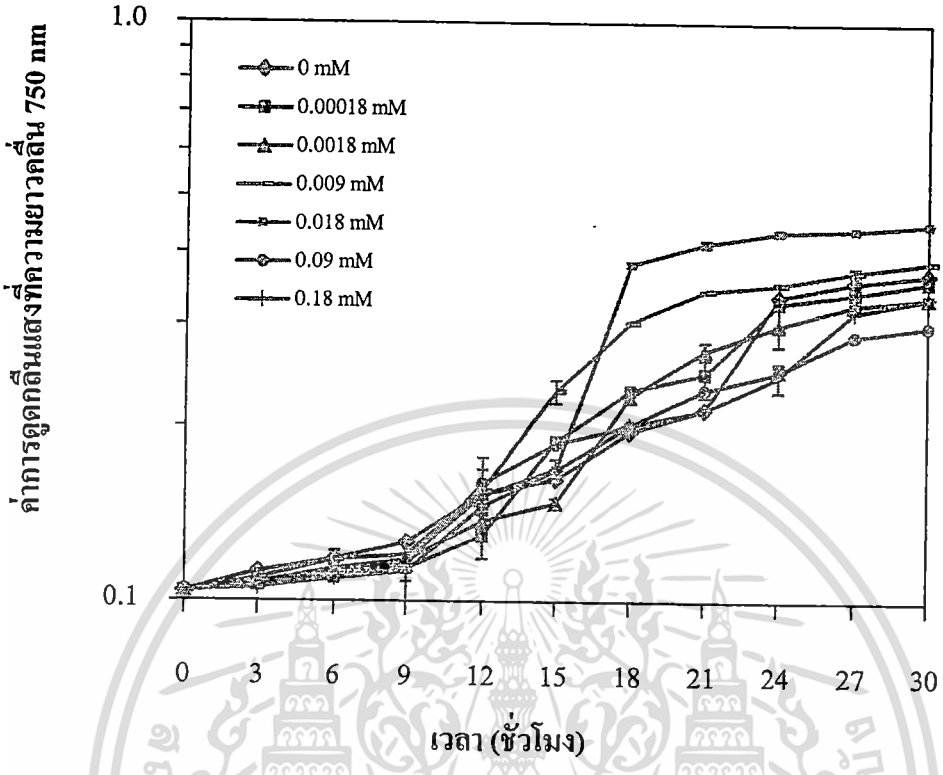


รูปที่ 4.19 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต

4.11 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันปริมาณของเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 0.00018, 0.0018, 0.009, 0.018, 0.09 และ 0.18 มิลลิโมลาร์ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของเฟอร์รัสซัลเฟตเท่ากับ 0.009 และ 0.018 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญเติบโตสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตอื่นๆ (รูปที่ 4.20)

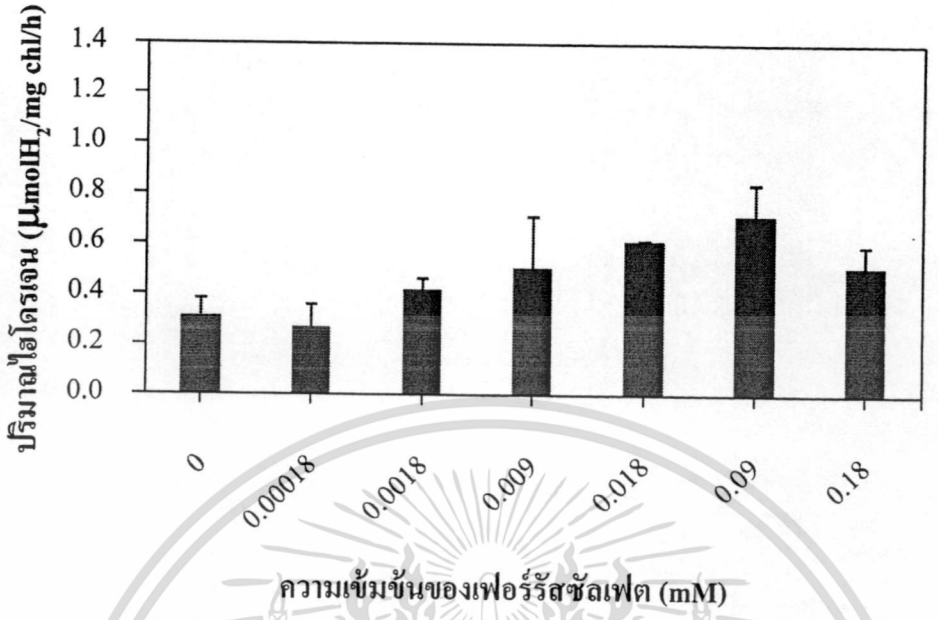
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ที่มีความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.09 มิลลิโมลาร์ ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด 0.717 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.21) จากผลการทดลอง จึงเลือกความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.09 มิลลิโมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากเหล็กถือเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้น การเติมเหล็กในปริมาณสูงน่าจะช่วยส่งเสริมให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

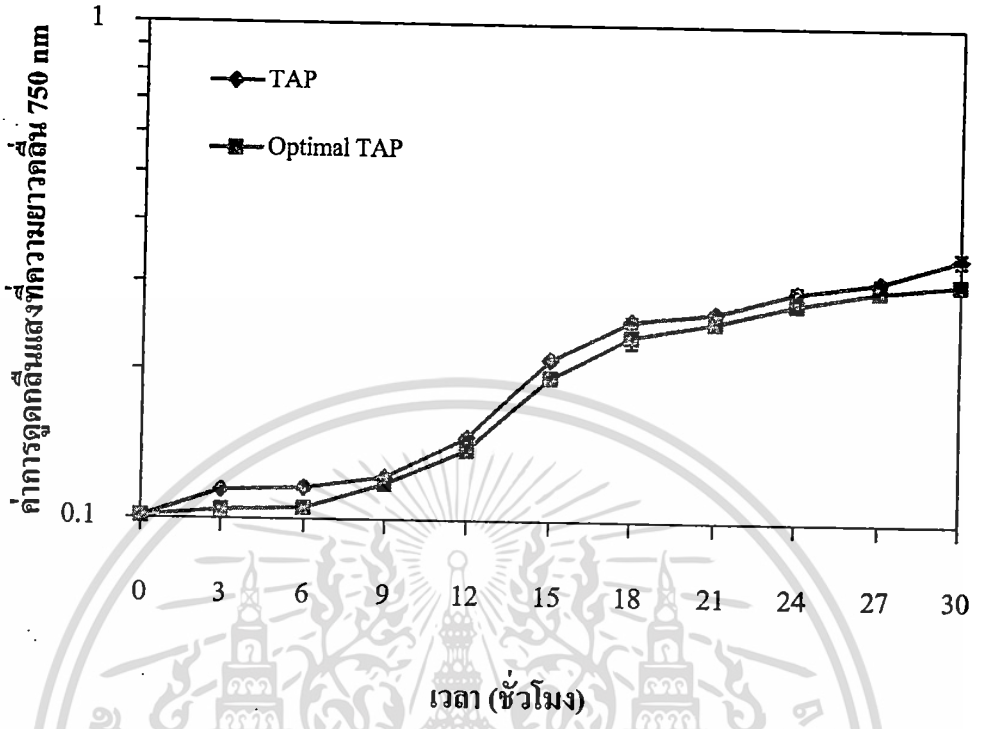


รูปที่ 4.21 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ที่แปรผันความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต

4.12 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิม

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตรเดิม (TAP) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับที่เลี้ยงในสูตรอาหารสูตรที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยอาหารสูตรที่เหมาะสมมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและปริมาณสารแตกต่างไปจากสูตรอาหาร TAP คือ ปราศจากการเติมกรดอะซีติก และใส่ซูโครสแทนโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ใส่แอมโมนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.0196 มิลลิโมลาร์ ใส่เฟอร์รัสซัลเฟตเท่ากับ 0.09 มิลลิโมลาร์ และไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.22)

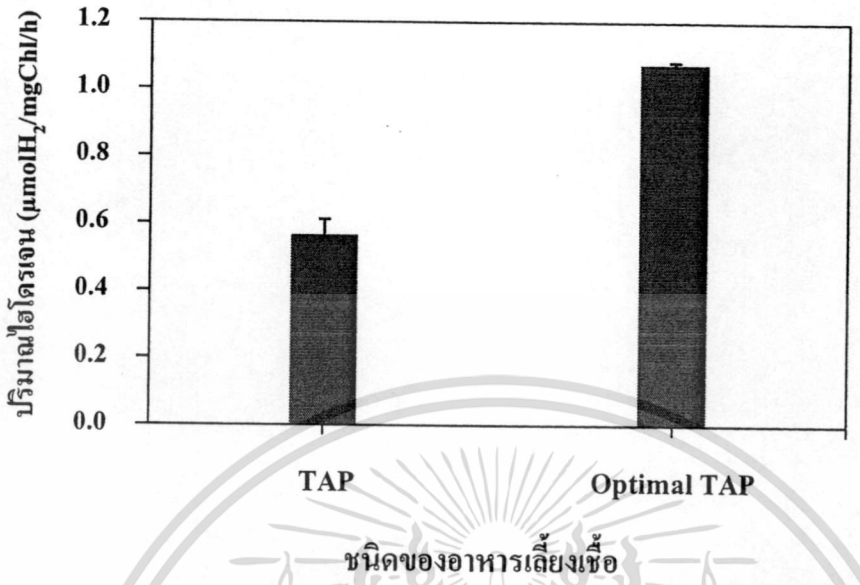
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสม (optimal TAP) เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิม (TAP)

จากนั้น นำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสม (optimal TAP) และที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (TAP) มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC พบว่าเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสม (optimal TAP) ให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 4.23) โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต จึงจัดได้ว่าเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสม (optimal TAP) เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิม (TAP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 สรุปได้ดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP เป็นอาหารที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris var. vulgaris* TISTR 8261 เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ BBM, BG11 และ N8 เนื่องจากทำให้เซลล์สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดคือ ผลิตได้ 0.021 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

2. อายุของเชื้อมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* โดยพบว่าสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คือ ผลิตได้ 1.152 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

3. สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด ภายหลังการปรับตัวให้อยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง คือ ผลิตได้ 0.368 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

4. สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสงผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมืด

5. สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด คือ ผลิตได้ 0.266 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

6. สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด คือ ผลิตได้ 0.196 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

7. จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* โดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อให้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเมื่อให้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือผลิตไฮโดรเจนได้ 26.518 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นสุดท้ายของซูโครสที่เหมาะสม คือ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งจะให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP สูตรปกติถึง 6 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* โดยการแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.0196 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คือ 0.210 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

9. การขาดแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหาร ไม่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *C. vulgaris* แต่ทำให้สาหร่ายมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดคือ 5.813 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง และสูงกว่าประมาณ 8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ

10. จากการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* โดยการแปรผันปริมาณของเฟอร์รัสซัลเฟต สรุปว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเฟอร์รัสซัลเฟตเท่ากับ 0.09 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด คือผลิตได้ 0.717 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

11. อาหารสูตรที่เหมาะสมที่ปราศจากการเติมกรดอะซีติก โดยใส่ซูโครสที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตรแทน เติมแอมโมนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.0196 มิลลิโมลาร์ เฟอร์รัสซัลเฟตเท่ากับ 0.09 มิลลิโมลาร์ และไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *C. vulgaris*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชัชวาลย์ ชัยชนะ. 2547. การพัฒนาพลังงานทดแทนและความเป็นไปได้ในประเทศไทย. **โลกพลังงาน.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 10. ฉบับที่ 34. หน้า 29-34.

ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร. 2547. รายงานพิเศษ: เรื่องสถานการณ์พลังงาน. **โลกพลังงาน.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 7. ฉบับที่ 22. หน้า 22-29.

ภาณุทัศน์ อินใจมา. 2550. ก๊าซไฮโดรเจนแหล่งพลังงานทดแทนที่ไม่มีวันสูญสิ้น. **โลกพลังงาน.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 10. ฉบับที่ 34. หน้า 44-45.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. **สาหร่ายวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 155 – 122.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. **แพลงก์ตอนพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 774-785.

สิริชนก จันทร์ใบ "รายงานการใช้พลังงานทดแทน Hydrogen Technology ตอนที่ 1." [online]. Available: http://www.thailandindustry.com/home/FeatureStory_preview.php?id=9641&section=9. 2008.

ศิริจันทร์ ทองประเสริฐ และ มานิจ ทองประเสริฐ. "ไฮโดรเจน: เชื้อเพลิงสำหรับอนาคต." [online]. Available: http://www.navy22.com/th/index.php?option=com_smf&Itemid=0&topic=14691.0. 13 ก.ค. 2008.

Abeliovich, A. and Weisman, D. 1978. "Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *Scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds." **Appl. Environ. Microbiol.** 35 : 32-37.

Bak, T., Nowotny, J., Rekas, M. and Sorrell, C. C. 2002. "Photo-electrochemical hydrogen generation from water using solar energy. Materials-related aspects." **Int. J. Hydrogen Energy** 27 : 991-1022.

Bold, H. C. and Wynne, M. J. 1971. "Cultivation of algae in the laboratory." In : Mc Elroy W. D., Swan C. P. [Eds], Prentice Hall, Engwood cliffs. pp. 571.

Desikachary, T. V. 1959. Cyanophyta. Botany Department University of Madras, Indian Council of Agariculture Research. NewDelhi. pp. 686.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gaffron, H. 1939. "Reduction of carbon dioxide with hydrogen in green plant." **Nature** 143 : 204–205.

Gaffron, H. and Rubin, J. 1942. "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." **J. Gen. Physiol.** 26 : 219–240.

Greenbaum, E. and Lee, J. 1998. "Photosynthetic hydrogen and oxygen production by green algae." In : Zaborsky et. al. [Eds], Biohydrogen. Plenum press. New York. pp. 235-241.

Guan, Y., Deng, M., Yu, X. and Zhang, W. 2004. "Two-stage photobiological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*." **J. Biochem. Bioeng.** 19 : 69-73.

Harris, E. H. 1989. The *Chlamydomonas* source book : a comprehensive guide to biology and laboratory use. San Diego : Academic.

Kosaric, N. and Lyng, R.P. 1988. "Microbial production of hydrogen." In : Rehm, H. J. [Eds], Biotechnology vol. 6b (special microbial procrsses). VCH. pp. 101-134.

Kruse, O., Pupprecht, J., Mussgnug, J. H., Dismukes, G. C. and Hankamer, B. 2005. "Photosynthesis : a blueprint of solar energy capture and biohydrogen production technologies." **Photochem. Photobiol. Sci.** 4 : 957-969.

Lee, Y. K. and Shen, H. 2004. "Basic culturing techniques." In : Richmond, A. [Eds], Handbook of microalgal culture .IS Press. pp. 40-50.

Maness, P. C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M. L. 2009. "Photobiological hydrogen production prospects and challenges : Efforts to scale up the capacity of green algae and cyanobacteria to use sunlight to convert water into hydrogen gas for energy use." **Microbe** 6(4) : 275-280.

Melis, A. 2002. "Green alga hydrogen production : progress, challenges and prospects." **Int. J. Hydrogen Energy.** 27 : 1217-1228.

Melis, A. and Happe, T. 2001. "Hydrogen production : green algae as a source of energy." **Plant Physiol.** 3 : 740-748.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." **J. Gen. Microbiol.** 11 : 1–61.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schulz, R., Schnackenberg, J., Stangier, K., Wünschiers, R., Zinn, T. and Senger, H. 1998. "Light- dependent hydrogen production of the green algae." In : Zaborsky et al. [Eds], BioHydrogen. Plenum Press, New York.

Schnackenberg, J., Schulz, R. and Senger, H. 1993. "Characterization and purification of hydrogenase from the eukaryotic green glga *Scenedesmus obliquus*." **FEBS.** 327 : 21-24.

Stephenson, M. and Stickland, L. H. 1931. "Hydrogenase : A bacterial enzyme activating molecular hydrogen I. The properties of the enzyme." **J. Biochem.** 25 : 205-214.

Vonshak, A. 1986. "Laboratory techniques for the cultivation of microalgae." In : Richmond A. [Eds], Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 117-145

Winkler, M., Heil, B., Heil, B. and Happe, T. 2002. "Isolation and molecular characterization of the [Fe] hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*." **Biochim. Biopht. Acta.** 1576 : 330-334.

[online]. Available : http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent. html

[online]. Available : http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Bold's Basal medium (BBM)

สารเคมี	**ส่วนประกอบสารละลาย**	**มิลลิลิตร/ลิตร**
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	8.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	1.25 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	3.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	12.5 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
ไดโพแทสซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	3.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.25 กรัม/500 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิด ไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)	10 กรัม/ลิตร	1 มิลลิลิตร
โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	6.2กรัม/ลิตร	1 มิลลิลิตร
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	4.98 กรัมลิตร	1 มิลลิลิตร
กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4 (conc.))	1 มิลลิลิตร/ลิตร	
Trace Metal Solution	See below*	1 มิลลิลิตร
กรดบอลิก (H_3BO_3)	5.75 กรัม/500 มิลลิลิตร	0.7 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ Trace Metal Solution*:

ส่วนประกอบ		
กรดบอลิก (H_3BO_3)	2.86	กรัม/ลิตร
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	1.81	กรัม/ลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.222	กรัม/ลิตร
โซเดียมโมลิเบดเพนตะไฮเดรต ($NaMoO_4.5H_2O$)	0.390	กรัม/ลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.079	กรัม/ลิตร
โคบอลไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)	0.0494	กรัม/ลิตร

ละลายสารละลายแต่ละส่วนแล้ว นำมาผสมกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	2.86	กรัม/ลิตร
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	1.81	กรัม/ลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.22	กรัม/ลิตร
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.39	กรัม/ลิตร
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.079	กรัม/ลิตร
โคบอลต์ (II) ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.049	กรัม/ลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	149.6	กรัม/ลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	6.94	กรัม/ลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	3.6	กรัม/ลิตร
กรดซิตริก (Citric Acid)	0.6	กรัม/ลิตร
ไดโซเดียมอีทีดีเอ (Na_2EDTA)	0.1	กรัม/ลิตร
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริคแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4 \cdot$Citrate) (0.60 กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ N8 medium

ส่วนประกอบ

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4.2H_20$)	260	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	740	มิลลิกรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิกรัม
ไดอะมิโนอีเทนเตตระอะซีติกแอซิดไอรอนซอลท์ (Fe.EDTA)	10	มิลลิกรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	50	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	1000	มิลลิกรัม
Trace element mixture	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.8

ส่วนประกอบของ Trace element mixture

อะลูมิเนียมซัลเฟตออกตะเดคะไฮเดรต ($Al_2(SO_4)_3.18H_2O$)	3.58	กรัม/ลิตร
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	12.98	กรัม/ลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	1.83	กรัม/ลิตร
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	3.20	กรัม/ลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tris acetate phosphate medium (TAP)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะมีสีเหลืองเขียว เปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้น เติมสารตามด้านล่างตามลำดับ

20 ml 1M stock โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (1M stock: 6.8 กรัม /50มิลลิลิตร)

30 ml 1M stock ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (1M stock: 8.7 กรัม /50 มิลลิลิตร)

(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้