สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยการตรึงเซลล์

Increasing Hydrogen Production Efficiency of Cyanobacterium Anabaena siamensis by Cell Immobilization

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

QH
ส3ส๙๓
2556

เลขหมู่ 137285
เลขทะเบียน
วัน เดือน ปี 22 มิ.ย. 2558

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๖
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

.b 12620002
.i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยการตรึงเซลล์

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 393,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2556

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นโดยไซยาโนแบคทีเรียเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายและมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน โดยผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการตรึงไนโตรเจน งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนโดยการตรึงเซลล์ *A. siamensis* จากการทดลองพบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 หรือ Allen-Arnon เนื่องจากมีจำนวนเฮเทอโรซิสต์มากกว่า การขาดซัลเฟอร์ระหว่างกระบวนการบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนได้ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง คือ การตรึงเซลล์ในอัลจิเนตและจำนวนเม็ดเจล 150 เม็ดต่อขวดแก้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร การเติมกลูโคส *0.5* เปอร์เซ็นต์ ในเซลล์ตรึง ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น *2* เท่า นอกจากนี้ สารรีดิวซ์เบต้าเมอแคปโตเอทานอลและเมทธิลไวโอโลเจนสามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงอย่างเห็นได้ชัด โดยมีอัตราการผลิต 3.092 และ 2.426 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่สารรีดิวซ์นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ไดไทโอเทรอิทอล และโซเดียมไดไทโอไนท์ ไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน, อนาบีนา, การตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Increasing hydrogen production efficiency of cyanobacterium *Anabaena siamensis* by cell immobilization

Researcher: (1) Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch, Faculty of Science, King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang (2) Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Faculty of Science, Chulalongkorn University

ABSTRACT

H_2 produced by cyanobacteria is one of the interesting alternative energy carriers. The filamentous N_2-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*is is a potential microorganism for H_2 production. It can produce H_2 via both photosynthesis and nitrogen fixation processes. This study aimed to increase the effiency of H_2 production by immobilization of *A. siamensis* cells. The result showed that H_2 production rate by *A. siamensis* grown in $BG11_0$ was higher than that in BG11 and Allen-Arnon due to an increase of heterocyst cells. The sulfur deprivation during adaptation period for 24 hours increased its H_2 production rate. The optimal conditions for H_2 production by immobilized cells were immobilization with alginate and 150 gel beads in 20 mL glass vial. In immobilized cells, an addition of 0.5% fructose resulted in a 2-fold increase of H_2 production rate. Finally, the reducing agents β–mercaptoethanol and methylviologen enhanced H_2 production rate with 3.092 and 2.426 $\mu mol H_2$ mg chl a^{-1} h^{-1}, respectively, in *A. siamensis* immobilized cells whereas NADH, dithiothreitol and sodium dithionite were not capable of increasing H_2 production rate.

Key words: Hydrogen production, *Anabaena*, Cell immobilization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยการตรึงเซลล์ ดำเนินงานจนสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี ๒๕๕๖ คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญภาพ VIII

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน 4

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 5

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี 6

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า 7

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส 8

2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย 12

2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย 13

2.4.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase) 13

2.4.2 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase) 15

2.4.3 เอนไซม์ไบไดเรคชันนอลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) 15

2.5 การตรึงเซลล์ 16

2.5.1 ชนิดของการตรึงเซลล์ 16

2.5.2 วัสดุตรึง 19

2.6 สารรีดิวซ์ 20

2.6.1 สารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ 21

2.6.2 น้ำตาลรีดิวซ์และนอนรีดิวซ์ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* 23
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ 27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 27
3.3 สารเคมี 27
3.4 อุปกรณ์ 27
3.5 วิธีการทดลอง 28
3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* 28
3.5.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. Siamensis* 28
3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ 28
3.5.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน 29
3.5.5 วิธีการตรึงเซลล์ 29
3.5.6 วิธีการวัดปริมาณไฮโดรเจนในเซลล์ที่ถูกตรึง 30
3.5.7 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเซลล์ที่ถูกตรึง 30
บทที่ 4 ผลการวิจัย
4.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ก่อนการตรึงเซลล์ 31
4.1.1 ผลของชนิดของอาหารต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน 31
4.1.2 ผลของระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน 34
4.1.3 ผลของการขาดซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจน 35
4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ภายหลังการตรึงเซลล์ 36
4.2.1 ผลของชนิดของวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน 36
4.2.2 ปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 37
4.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงโดยการเติมน้ำตาล 38
4.3.2 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงโดยการเติมสารรีดิวซ์ 40
บทที่ 5 สรุปลการทดลอง 42
บรรณานุกรม 44
ภาคผนวก 47
ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC-TCD 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน	5
2.2	แหล่งพลังงานไฮโดรเจน	5
2.3	กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า	8
2.4	กลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอลตั้งแต่ระดับของห้องปฏิบัติการจนถึงกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม	9
2.5	กลไกของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง	10
2.6	กลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	11
2.7	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	12
2.8	การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้	14
2.9	การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ไบไดเรคชันนอลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย	16
2.10	การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน	20
2.11	โครงสร้างโมเลกุลของ Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)	21
2.12	โครงสร้างโมเลกุลของ Dithiothreitol (DTT)	21
2.13	โครงสร้างโมเลกุลของ β-Mercaptoethanol	22
2.14	โครงสร้างโมเลกุลของ Methylviologen	22
2.15	โครงสร้างโมเลกุลของ Sodium dithionite	22
2.16	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Anabaena siamensis*	24
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, $BG11_0$ และAllen-Arnon	32
4.2	จำนวนเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 $BG11_0$ และ Allen-Arnon	32
4.3	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, $BG11_0$ และ Allen-Arnon	33
4.4	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์	34
4.5	อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ภายหลังการปรับตัวในอาหาร $BG11_0$ และ $BG11_0$-S เป็นเวลา 1 วัน	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้น ในอาหารสูตร $BG11_0$-S 37

4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. siamensis* ด้วยอัลจิเนตในขวดที่มีปริมาณเซลล์ตรึง 50, 100 และ150 เม็ด 38

4.8 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. siamensis* ในอาหารสูตร $BG11_0$-S และ $BG11_0$-S ที่มีการเติมน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส แลกโตส และมอลโตส โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 39

4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง A. siamensis ในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลฟรุกโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์และมีการเติมสารรีดิวซ์ NADH, Dithiothreitol, Sodium dithionite, β-Mercaptoethanol และ Methyl viologen ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบัน โลกของเรากำลังเผชิญกับปัญหาสภาวะโลกร้อน ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในโลกเป็นอย่างมาก การเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศยังส่งผลให้เกิดภัยธรรมชาติต่างๆ อาทิ เช่น น้ำท่วม แผ่นดินไหว เป็นต้น ซึ่งนับวันภัยธรรมชาติต่างๆ เหล่านี้จะทวีความรุนแรงมากขึ้น และส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อชีวิตและทรัพย์สินของมนุษย์เป็นจำนวนมาก ผลกระทบเหล่านี้ล้วนมีสาเหตุมาจากการกระทำของมนุษย์ที่ดำรงชีวิตอยู่บนโลกทั้งสิ้น โดยเป็นผลพวงมาจากการพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ การใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่ระมัดระวัง และการทำลายสมดุลธรรมชาติต่างๆ ของโลก ไม่ว่าจะเป็นการตัดไม้ทำลายป่า การเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนจากยานพาหนะซึ่งถือเป็นการทำลายชั้นโอโซนที่มีความสำคัญในกระบวนการควบคุมอุณหภูมิและสมดุลการเปลี่ยนแปลงของโลก นอกจากนี้แล้ว การทำลายหรือการใช้ทรัพยากรที่กล่าวมาข้างต้นอย่างฟุ่มเฟือยก็อาจจะเป็นสาเหตุให้ทรัพยากรเหล่านี้ขาดแคลน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พลังงานจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปและไม่สามารถที่จะสร้างพลังงานชนิดนี้ขึ้นมาใหม่ได้ในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้น จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการค้นคว้าหาพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นพลังงานที่สะอาดปลอดภัยและสามารถนำมาใช้กับรถยนต์หรือยานพาหนะอื่นๆ ได้ โดยไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน พลังงานในรูปของก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานเชื้อเพลิงชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเผาไหม้สูง และเมื่อถูกนำไปเผาไหม้แล้วจะไม่ก่อให้เกิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่จะเกิดเป็นน้ำซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและยังเพิ่มปริมาณน้ำและความชื้นให้กับอากาศอีกด้วย ดังนั้น พลังงานไฮโดรเจนจึงถือเป็นพลังงานที่ได้รับการยอมรับและคาดว่าอาจจะเป็นแหล่งพลังงานแหล่งใหม่ของมนุษย์ในระยะเวลาอีกไม่นานนัก

พลังงานไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากกระบวนการกลั่นปิโตรเลียมจากซากฟอสซิล และกระบวนการแตกตัวของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งกระบวนการผลิตทั้งสองนี้ต้องใช้เทคโนโลยีและค่าใช้จ่ายสูง และยังเสี่ยงต่อการระเบิดที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ ในกระบวนการผลิตอีกด้วย นอกจากนี้ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนยังสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย ฯลฯ ในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น คือสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งใช้เพียงน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวยังสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศ ทำให้ประหยัดแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพในเซลล์ได้ 2 กระบวนการ คือ การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยอิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำจะไปรวมตัวกับโปรตอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดยเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสร้างไฮโดรเจนและการสลายไฮโดรเจน ส่วนกระบวนการที่ 2 คือกระบวนการตรึงไนโตรเจน ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย โดยจะผลิตไฮโดรเจนเป็นผลิตผลพลอยได้จากการตรึงไนโตรเจนซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส จากนั้น ไฮโดรเจนที่ผลิตได้จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสให้กลายเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนต่อไป

ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ถูกแยกมาจากดินนาในประเทศไทย ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีเอนไซม์ 2 ชนิดที่ใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน คือ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน และ เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* จึงมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่สร้างไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเพียงอย่างเดียว

กระบวนการตรึงเซลล์ (Cell immobilization) เป็นกระบวนการที่ใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1989 โดย Carturan ซึ่งได้ทำการทดลองตรึงเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ต่อมาได้มีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรึงเซลล์และสารทางชีวภาพต่างๆ มากมาย ได้แก่ โปรตีน เอนไซม์ แอนติบอดี เซลล์แบคทีเรีย เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เซลล์พืช และเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย ฯลฯ วัตถุประสงค์ของการตรึงเซลล์นั้น คือ เพื่อเพิ่มอายุของการพักตัวของเซลล์และป้องกันการปนเปื้อนจากพวกจุลินทรีย์ที่อาจจะมีอันตรายต่อเซลล์ที่เคลือบอยู่ นอกจากนี้ กระบวนการตรึงเซลล์นั้นยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิซึ่งก็คือไฮโดรเจนในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ มีขอบเขตการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ก่อนการตรึงเซลล์ โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ชนิดของอาหาร โดยแปรผันชนิดของอาหารดังนี้ อาหาร BG11 อาหาร $BG11_0$ และอาหาร Allen-Arnon อายุของเซลล์ โดยแปรผันอายุของเซลล์ตั้งแต่ 1 และ 2 สัปดาห์ และผลของการขาดซัลเฟอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ระหว่างการตรึงเซลล์ โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ชนิดของวัสดุตรึงคือ โซเดียมอัลจิเนต และ วุ้น และจำนวนเม็ดเจล

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงที่มีการเติมน้ำตาลและสารรีดิวซ์ต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ได้ รวมถึงทราบสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนใน *A. siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

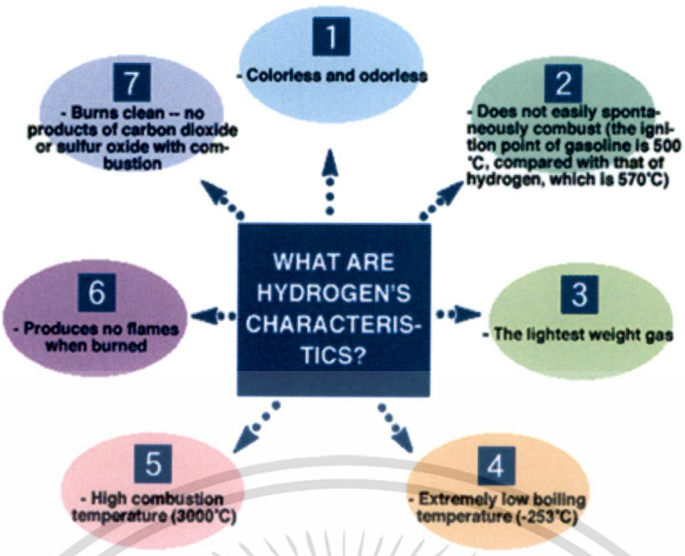
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน โลกของเรากำลังเผชิญกับปัญหาสภาวะโลกร้อน ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆ บนโลกเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นการเกิดภัยธรรมชาติต่างๆ ที่นับวันจะมีความรุนแรงมากขึ้น ภัยธรรมชาติเหล่านี้มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อทั้งชีวิตและทรัพย์สินของมนุษย์เป็นอย่างมาก สาเหตุของปัญหาสภาวะโลกร้อนนั้น มาจากการกระทำของมนุษย์ที่ดำรงชีวิตอยู่บนโลกที่มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาขึ้นอยู่ตลอดเวลาจากการพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ มนุษย์ได้นำเอาทรัพยากรธรรมชาติต่างๆ มาใช้ ทำลายสมดุลธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นการตัดไม้ทำลายป่า การเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนจากยานพาหนะ การทำลายสมดุลธรรมชาติเหล่านี้ นำไปสู่การทำลายชั้นโอโซนที่มีความสำคัญในกระบวนการควบคุมอุณหภูมิและสมดุลการเปลี่ยนแปลงของโลก นอกจากนี้ การทำลายหรือการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่ประหยัดและไม่ระมัดระวังมีผลทำให้เกิดการขาดแคลนทรัพยากรดังกล่าวยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งจัดเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป และไม่สามารถสร้างขึ้นมาใหม่ทดแทนได้ในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาและค้นหาพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานชนิดหนึ่งซึ่งเป็นพลังงานที่สะอาด ปลอดภัย และสามารถนำมาใช้กับรถยนต์ หรือยานพาหนะอื่นๆ ได้ โดยไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีสัญลักษณ์ธาตุ คือ H มีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นธาตุที่พบมากที่สุดในเอกภพ โดยในบรรยากาศโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟเวลาเผา การเผาไหม้สะอาด ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลเท่ากับ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิหรือใช้สารเร่งปฏิกิริยาเป็นต้น ไฮโดรเจนมีจุดเดือด -252.87 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว -259.14 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ไฮโดรเจนมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงถึง 3,000 องศาเซลเซียส ให้พลังงานความร้อน 2,870 กิโลแคลอรีต่อกิโลกรัม ซึ่งค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนและเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอล ถึง 2.5 และ 5 เท่า ตามลำดับ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจนสรุปได้ดังแสดงในรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

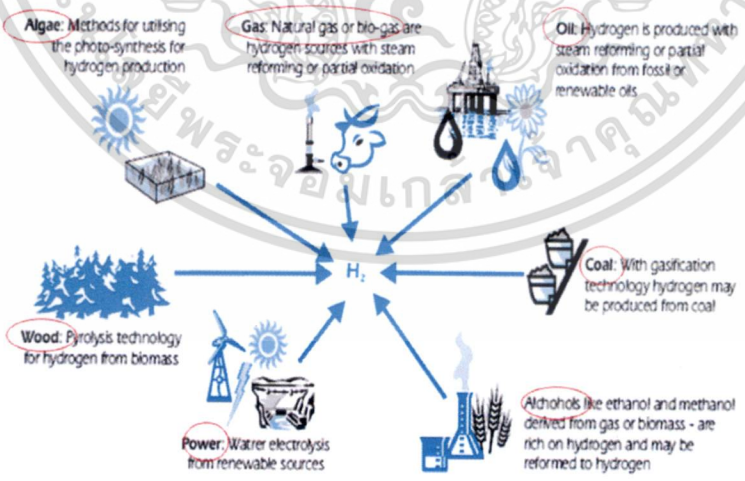


รูปที่ 2.1 คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน

ที่มา: http://www.enaa.or.jp/WE-NET/suiso/suiso1_e.html

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด โดยสามารถแบ่งแหล่งวัตถุดิบออกได้เป็น 3 แหล่ง คือ (1) เชื้อเพลิงฟอสซิล ได้แก่ ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันปิโตรเลียม ฯลฯ (2) แหล่งพลังงานหมุนเวียน เช่น ชีวมวล และ น้ำ เป็นต้น และ (3) พลังงานนิวเคลียร์ (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 แหล่งพลังงานไฮโดรเจน

ที่มา: http://www.iea.org/publications/freepublications/.../hydrogen.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการผลิตไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี (Thermo-chemical process) เป็นการใช้ความร้อนในการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ก๊าซธรรมชาติ หรือ ถ่านหิน ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซผสมที่ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และมีเทน (CH_4) จากนั้น จึงทำการแยกไฮโดรเจนออกมาโดยใช้รูปแบบของการเผาไหม้ การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมีมีหลายกระบวนการ ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming) กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) เป็นต้น (ประพันธ์ คูชลธารา, 2551) ในปัจจุบัน การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิงก๊าซธรรมชาติด้วยไอน้ำเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ใช้กันแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งในประเทศไทยก็มีการใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจน เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นหรือตัวเร่งปฏิกิริยาในอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากมีสารพิษตกค้างจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมีสามารถจำแนกตามสารตั้งต้นได้เป็น 5 รูปแบบ ดังนี้

1.) การเปลี่ยนแปลงของก๊าซธรรมชาติ

ในปัจจุบัน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติเป็นวิธีที่นิยมกันมาก โดยก๊าซธรรมชาติที่ใช้เป็นวัตถุดิบคือ มีเทน (Methane) ที่ได้มาจากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ กระบวนการรีฟอร์มมิงมีเทนด้วยไอน้ำ (Steam methane reforming) นั้นเกิดขึ้นโดยนำมีเทนมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง โดยใช้อุณหภูมิสูงถึง 700–1,000 องศาเซลเซียส และความดัน 2–25 บาร์ และได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์และคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนต่อไป กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำจัดเป็นปฏิกิริยาดูดความร้อน ดังนั้นจึงต้องใช้ความร้อนในการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการ

2.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากถ่านหิน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากถ่านหิน เป็นกระบวนการทางเคมีที่สามารถผลิตได้ทั้งพลังงาน น้ำมันเชื้อเพลิง สารเคมี และไฮโดรเจน โดยไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้นก่อนจากการทำปฏิกิริยาระหว่างถ่านหินกับออกซิเจนและไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดันและอุณหภูมิสูง ก๊าซที่สังเคราะห์ขึ้นจะเป็นก๊าซผสมของก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซึ่งคาร์บอนมอนอกไซด์จะเกิดการทำปฏิกิริยากับไอน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยก๊าซไฮโดรเจนจะถูกแยกออกจากระบบ ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกยึดจับและกำจัดออกไปในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากชีวมวล

สารชีวมวลเป็นวัสดุอินทรีย์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจได้จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าวสาลี วัสดุเศษเหลือจากโรงเลื่อยในอุตสาหกรรมป่าไม้ โดยเฉพาะพืชจำพวกหญ้าซึ่งจัดเป็นพวกวัชพืชทางการเกษตร เป็นต้น วิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลนั้นอาศัยกระบวนการ 2 กระบวนการ คือ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลโดยการใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดัน ซึ่งสารชีวมวลจะถูกแยกออกเป็นก๊าซไฮโดรเจน และ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสารชีวมวลด้วยวิธีไพโรไลซิสเป็นวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

4.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงเหลว

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงเหลว เป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงชีวมวลที่อยู่ในรูปของเหลว เช่น เอทานอล ฯลฯ โดยขั้นตอนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะคล้ายกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติซึ่งได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

5.) การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการแยกโมเลกุลของน้ำ

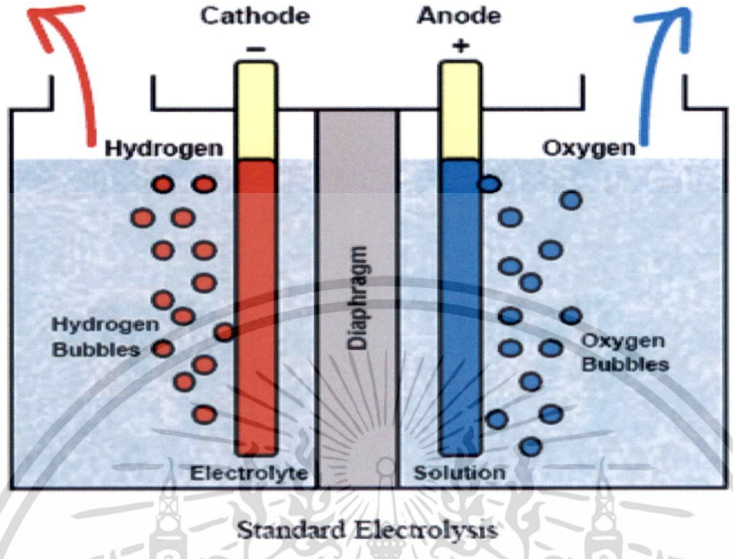
การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการแยกโมเลกุลของน้ำ เป็นวิธีการที่ใช้กันมาเป็นเวลานานแล้ว โดยการใช้อุณหภูมิสูงถึง 500–2,000 องศาเซลเซียส ในการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาเคมีสำหรับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เมื่อไม่นานมานี้ นักวิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีการผลิตไฮโดรเจนจากการแยกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานจากแสง โดยใช้เลนส์กระจกในการรวมแสงให้เกิดความเข้มสูง เพื่อกระตุ้นให้เกิดความร้อน และ พัฒนาวิธีการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแตกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานนิวเคลียร์

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า (Electro-chemical process) เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในส่วนที่เรียกว่าอิเล็กโทรไลเซอร์ (Electrolyzer) ซึ่งจะถูกประยุกต์ให้มีขนาดเล็กและมีหน้าที่ในการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิส โดยมีขั้วบวกและขั้วลบของไฟฟ้าแยกออกจากกัน ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่ขั้วลบและออกซิเจนจะไปเกาะที่ขั้วบวก (รูปที่ 2.3) วิธีการนี้ใช้กระแสไฟฟ้ามากถึง 90 กิโลวัตต์และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต โดยก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูง กระบวนการทำงานจะมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของอิเล็กโทรไลเซอร์ อิเล็กโทรไลเซอร์มีหลายชนิด ได้แก่ พอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรนอิเล็กโทรไลเซอร์ (PEM electrolyzer) แอลคาไลน์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Alkaline electrolyzer) และ โลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลเซอร์ (Solid oxide electrolyzer) ข้อดีของวิธีการนี้คือ ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อให้เกิดสภาวะก๊าซเรือนกระจกในระหว่างกระบวนการผลิต ส่วนข้อเสียของวิธีการนี้คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ



รูปที่ 2.3 กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า
ที่มา : http://www.greencarcongress.com/2004/11/milestone_for_h.html

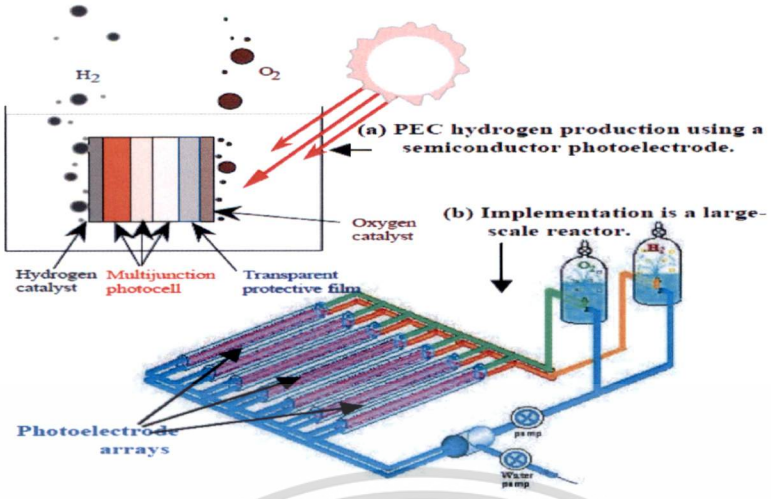
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส (Photobiological process) เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกโมเลกุลของน้ำโดยอาศัยพลังงานแสง ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเร็วมากและสามารถที่จะนำมาใช้ทำการผลิตในระยะยาวได้ นอกจากนี้ กระบวนการผลิตยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้สามารถที่จะแบ่งออกได้ 2 กระบวนการ ดังนี้

1.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล เกิดจากการแยกโมเลกุลของน้ำเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล ซึ่งจะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน แสงจะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกโมเลกุลของน้ำผ่านเซมิคอนดักเตอร์อิเล็กโทรด โดยที่แผ่นของคอนดักเตอร์จะเคลือบด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนที่บริเวณพื้นผิวของคอนดักเตอร์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

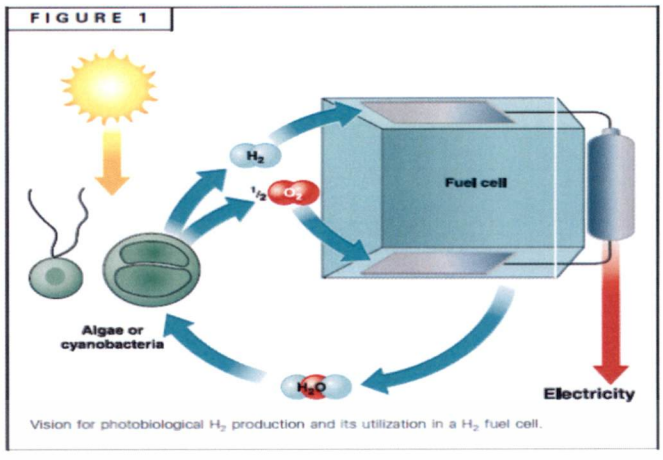


รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอลตั้งแต่ระดับของห้องปฏิบัติการจนถึงกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม
ที่มา : Eric and Richard, 2000

2.) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตไลซิสของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตไลซิสของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาการแตกโมเลกุลของน้ำด้วยวิธีการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายกับพืช เมื่อสังเคราะห์แสงแล้ว ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซออกซิเจน จุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้น้ำเป็นวัตถุดิบของกระบวนการสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยเอนไซม์ต่างๆ แต่กระบวนการผลิตนี้ใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้ระยะเวลาที่นานในการแตกโมเลกุลของน้ำจากกระบวนการสังเคราะห์แสง นักวิทยาศาสตร์ได้มีการพัฒนาคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูง เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับขนาดใหญ่และผลิตในรูปแบบที่ต่อเนื่องได้ ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาดและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (รูปที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



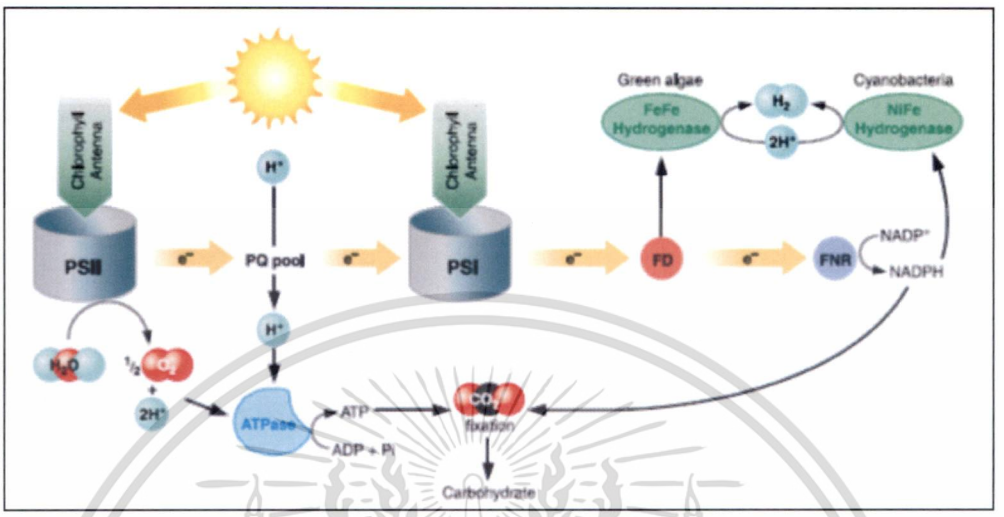
รูปที่ 2.5 กลไกของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง
ที่มา : Pin Ching et al., 2009

จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสาหร่ายสีเขียว และ ไซยาโนแบคทีเรีย กระบวนการสังเคราะห์แสงจะอาศัยรงควัตถุชนิดต่างๆ ในการดูดซับพลังงานแสง เช่น คลอโรฟิลล์ เอ และ คลอโรฟิลล์ บี กระบวนการสังเคราะห์แสงจะมีระบบแสงทั้งหมด 2 ระบบ คือ ระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I) และระบบแสงสอง (Photosystem II) ซึ่งระบบแสงทั้งสองจะทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อให้สามารถถ่ายทอดพลังงานแสงไปใช้ในการสร้าง ATP และ NADPH ซึ่งจุลินทรีย์จะนำสารทั้งสองนี้ไปถ่ายทอดพลังงาน เพื่อช่วยตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้แสงเกิดเป็นคาร์โบไฮเดรต ($C_m(H_2O)_n$) ต่อไป

ปฏิกิริยาแรกในกระบวนการที่ต้องใช้แสง คือ ระบบแสงสอง ซึ่งดูดซับพลังงานจากแสงที่ 680 นาโนเมตร โดยพลังงานจะถูกถ่ายทอดมาจากคลอโรฟิลล์ เอ ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ โดยอิเล็กตรอนนี้จะเคลื่อนไปตามระบบการขนส่งอิเล็กตรอน การที่อิเล็กตรอนของระบบแสงสองหลุดออกไป ทำให้เกิดการออกซิไดซ์น้ำไปเป็นออกซิเจน ไฮโดรเจน และอิเล็กตรอน ซึ่งออกซิเจนอะตอมจะรวมตัวกันเกิดเป็นโมเลกุลของออกซิเจน ส่วนอิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของน้ำจะเคลื่อนไปทดแทนอิเล็กตรอนที่หลุดออกไปจากคลอโรฟิลล์ และเคลื่อนที่ไปยังระบบแสงหนึ่งผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนที่มีระบบตัวนำอิเล็กตรอนชื่อ พลาสโตควิโนน (Plastoquinne) ซึ่งทำหน้าที่เป็นกระสวยรับส่งโปรตอน และอาศัยการสูบโปรตอนโดยระบบไซโตโครม พลาสโตไซยานิน โดยการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองไปตามระบบการขนส่งอิเล็กตรอนทำให้เกิดพลังงานอิสระสำหรับนำไปใช้ในการสร้าง ATP เมื่อระบบแสงหนึ่งได้รับพลังงานจากแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกและส่งผ่านไปยังตัวรับอิเล็กตรอน จนกระทั่งถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ จากนั้น เอนไซม์ $NADP^+$ reductase (FNR) ส่งอิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินไปให้ $NADP^+$ ร่วมกับ $2H^+$ กลายเป็น NADPH และได้ก๊าซไฮโดรเจนโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรจีเนส ซึ่งเฟอร์รีดอกซินจะมีความเกี่ยวข้องโดยตรงต่อกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 กลไกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

ที่มา : Pin Ching et al., 2009

การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ จะอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงในการแตกโมเลกุลของน้ำ จุลินทรีย์ที่มีกระบวนการเช่นนี้ ได้แก่

1.) แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้จัดเป็น Anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ

ก. แบคทีเรียสีม่วงไม่สะสมซัลเฟอร์ (Non-sulfur purple bacteria)

ข. แบคทีเรียสีม่วงสะสมซัลเฟอร์ (Purple sulfur bacteria)

ค. แบคทีเรียสีเขียวสะสมซัลเฟอร์ (Green sulfur bacteria)

การสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีสารสีเป็นชนิดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) ที่อยู่ในถุง ที่ไม่ใช่คลอโรพลาสต์ ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ แต่สามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ ไธโอซัลเฟตได้ และมีสารประกอบอินทรีย์เป็นสารให้อิเล็กตรอน

2.) สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ปราศจากออกซิเจนและมีแสง (รูปที่ 2.7) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวจึงจัดเป็น Photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Clamydomonas* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว
ที่มา : http://www.futurefarmers.com/survey/algae.php

3.) ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซออกซิเจน (Oxygenic phototrophic prokaryote) และได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ กระบวนการสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบเหมือนกับในสาหร่ายสีเขียว นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายบางชนิดยังมีความสามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) ภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ โดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนและเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียและได้ก๊าซไฮโดรเจนออกมาเป็นผลิตผลพลอยได้ ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp. และ *Mastigocladus* sp.

2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส ไซยาโนแบคทีเรียสามารถแบ่งตามความสามารถในการตรึงไนโตรเจนออกเป็น 2 ชนิด คือ ไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้ และไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่จำเพาะที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่มีผนังหนาเพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนเข้ามาภายในเซลล์ นอกจากนี้ ภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์จะมีเพียงระบบแสงหนึ่งเท่านั้น ไม่มีระบบแสงสอง จึงปราศจากออกซิเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนนี้จึงได้ผลผลิตสูง เนื่องจากออกซิเจนเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้น เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรจีเนสจะทำการรีดิวซ์ไนโตรเจนจากบรรยากาศไปเป็นแอมโมเนียและไฮโดรเจน ในสภาวะที่มีไนโตรเจนอยู่ในอากาศมากจะเกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนได้ดี ซึ่งในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะได้ไฮโดรเจนออกมาเป็นผลผลิตพลอยได้ การรีดิวซ์พลังงานในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนจะได้มาจากการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ถูกเก็บสะสมไว้ในเฮเทอโรซิสต์ ซึ่งจะถูกส่งออกมาใช้ยังเซลล์ข้างเคียง เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนพลังงานแสงเพื่อผลิตไฮโดรเจนต้องการพลังงานที่สูงแต่เอนไซม์ไนโตรจีเนสนั้นมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่ค่อนข้างต่ำ

ส่วนในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เช่น *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 เอนไซม์รีเวอรสซิเบิลไฮโดรจีเนสมีกิจกรรมการทำงานสูงในสภาวะที่ปราศจากแสงและในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัด ซึ่งจะพบการเกิดการสะสมของไกลโคเจนในเซลล์ โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.02 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ซึ่งเท่ากับปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่มีปริมาณที่สูงกว่ากระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยตรง

เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีรายงานผลการวิจัยของ Antal และ Landblad (2005) ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Gloecapsa alpicola* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 ในสภาวะที่มีการลดปริมาณของซัลเฟอร์ เซลล์จะมีการสะสมของไกลโคเจนและการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ทำการเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณของซัลเฟอร์ในระดับปกติ โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากออกซิเจนเป็นเวลา 8 ถึง 12 ชั่วโมง ในปี ค.ศ. 2002 Zhang และคณะ จากมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย พบว่าการเลี้ยงเซลล์ *Chlamydomonas reinhardtii* ในสภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์จะช่วยให้เซลล์สามารถที่จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้นานขึ้น วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ได้รับประสบความสำเร็จอย่างมากในการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยวิธีนี้จะลดปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่เซลล์ใช้ในกระบวนการหายใจ สภาวะเช่นนี้จะทำให้เกิดสภาวะปราศจากออกซิเจน (Melis และคณะ 2000)

2.4 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

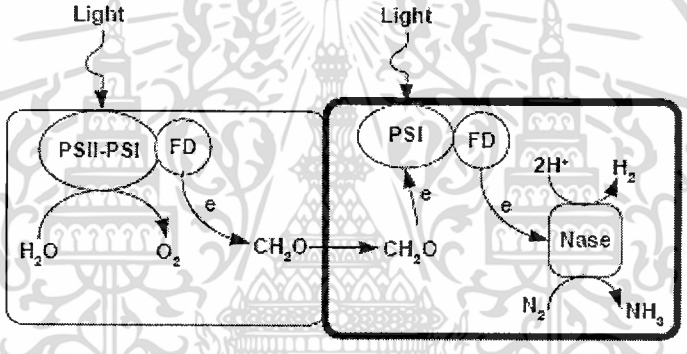
ไซยาโนแบคทีเรียมีเอนไซม์หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดนั้นจะมีกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียมีทั้งหมด 3 ชนิด ดังนี้

2.4.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ โดยการเปลี่ยนไนโตรเจนให้กลายเป็นแอมโมเนียและได้ผลิตผลพลอยได้ออกมาเป็นก๊าซไฮโดรเจน เอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วน ส่วนแรก คือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (Dinitrogenase) เป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protien) มีมวลโมเลกุล 60–70 กิโลดาลตัน ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่อยย่อย คือ α และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

β ที่ถอดแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* ตามลำดับ ซึ่งทำหน้าที่ในการแตกตัวของโมเลกุลของไฮโดรเจน ส่วนที่สอง คือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (Dinitrogenase reductase) เป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดินัมเป็นองค์ประกอบ (MoFe-protein) มีมวลโมเลกุล 220–240 กิโลดาลตัน ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* เอนไซม์นี้จะมีหน่วยย่อยทั้งหมด 4 หน่วยย่อย ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนและสลาย ATP เพื่อผลักดันอิเล็กตรอนให้แก่ส่วนที่ 2 โดยที่อิเล็กตรอน 2 ตัวจะสามารถรีดิวซ์ให้ได้ไฮโดรเจนไอออน 2 ตัวเช่นกัน ซึ่งเป็นตัวที่ทำหน้าที่ในการรีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นไดเอมีน (HN=NH) จากนั้น จะเกิดกลไกซ้ำกับขั้นตอนแรก โดยรับอิเล็กตรอนมาจากเฟอร์รีดอกซิน จนกระทั่งเกิดการรีดิวซ์ไดเอมีนไปเป็นไฮดราซีน (H_2N-NH_2) กระบวนการก็จะเกิดวนซ้ำ จนกระทั่ง รีดิวซ์ไฮดราซีนไปเป็นแอมโมเนีย 2 โมเลกุล รวมแล้วกระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียใช้อิเล็กตรอนทั้งหมด 8 ตัว โดยใช้อิเล็กตรอน 6 ตัวในกระบวนการรีดักชันจากไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และใช้อิเล็กตรอนอีก 2 ตัวในการรีดิวซ์ไฮโดรเจน แอมโมเนียที่สังเคราะห์ได้จะเข้าสู่เมตาบอลิซึมของกรดนิวคลีอิกเป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยเริ่มจากกระบวนสังเคราะห์แสงของระบบแสงหนึ่งและระบบแสสองจะใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและแตกตัวออกมาเป็นก๊าซออกซิเจนและก๊าซไฮโดรเจน อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งไปที่เฟอร์รีดอกซินและเป็นแหล่งพลังงานของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในสภาวะที่ไม่มีแสง โดยไฮโดรจีเนสจะทำการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียและได้ผลพลอยได้ออกมาเป็นไฮโดรเจนในที่สุด
ที่มา : Yu and Takahashi, 2007

เอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถที่จะพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนในอาหารจำกัด กระบวนการตรึงไนโตรเจนนั้นมีการใช้พลังงานจาก ATP ในการเร่งปฏิกิริยาอย่างน้อย 16 โมเลกุล เพื่อทำการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลผลิต (Rao and Hall, 1996) ดังสมการต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

$$8H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 4H_2 + 16ADP + 16Pi$$

$$16ATP + 16H_2O + N_2 + 10H^+ + 8e^- \xrightarrow{\text{nitrogenase}} 16ADP + 16Pi + 2NH_4^+ + H_2$$

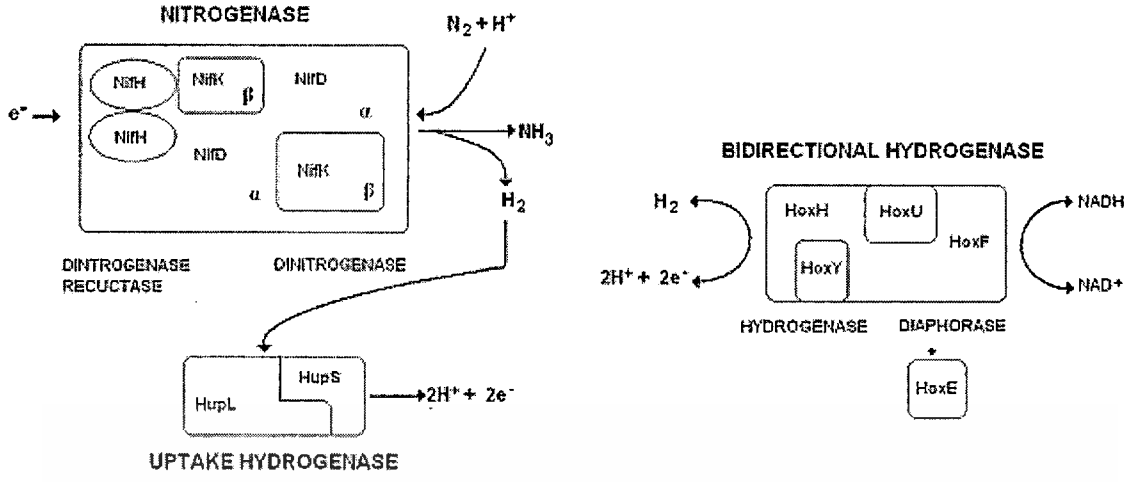
2.4.2 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (Uptake hydrogenase)

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสทำหน้าที่ในการสลายไฮโดรเจนที่ได้จากการตรึงไนโตรเจน สามารถพบได้เฉพาะในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (HupL) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนให้กลายเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน และโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (HupS) ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งเสริมการทำงานของโปรตีน HupL โดยโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกออกซิไดซ์ทันทีด้วยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Knallgas reaction ดังนั้น จึงไม่มีการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการทำงานของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้สมบูรณ์ (Tamagnini และคณะ, 2002)

2.4.3 เอนไซม์ไบไดเรคชันนอลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase)

เอนไซม์ไบไดเรคชันนอลไฮโดรจีเนส (Bidirectional hydrogenase) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Reversible hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. และในพวกไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น *Spirulina maxima* รวมไปถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ด้วย เอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการสร้างและสลายไฮโดรเจน โดยประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (Heterotetrameric enzyme) โดย 2 หน่วยย่อยแรกรวมกันเป็นไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) โดยหน่วยย่อยซิกมาและเบต้าถูกถอดรหัสและแปลมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ตามลำดับ ส่วน 2 หน่วยย่อยที่เหลือเรียกว่า ไดอะฟอเรส (Diaphorase) โดยหน่วยย่อยไดอะฟอเรสแอลฟาและแกมมาถูกแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* ตามลำดับ ทั้งสองส่วนนี้จะทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+หรือ NADH (รูปที่ 2.9) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่สามารถตรึงไนโตรเจน ได้มีการรายงานการศึกษาพบว่า เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า แต่สามารถทนความร้อนได้น้อยกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ไบไดเรคชันนอลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย
ที่มา : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319911022130

2.5 การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ คือ การจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยที่เซลล์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน (Karel และคณะ, 1985) และสามารถนำเซลล์กลับมาเวียนใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง เทคนิคการตรึงเซลล์เป็นเทคนิคที่ถูกคิดค้นขึ้นมาในปี ค.ศ. 1989 โดย Curturan ซึ่งได้ทำการทดสอบกับเซลล์ของยีสต์เป็นครั้งแรก (Curturan และคณะ, 1989) และต่อมาได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางชีวภาพมากมาย เช่น ใช้ตรึงแอนติบอดี เซลล์ของแบคทีเรีย สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น วัตถุประสงค์ของการตรึงเซลล์ คือ การยืดอายุของเซลล์ในระยะที่มีการพักตัวให้นานขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีต่อกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์และการนำเซลล์กลับมาใช้งานใหม่

2.5.1 ชนิดของการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีหลายรูปแบบ ดังนี้

1.) การตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ (Adsorption)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมีราคาถูก เนื่องจากจุลินทรีย์อยู่ในสภาพธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่ได้อยู่ในสภาพอิสระ มักจะเจริญอยู่บนผิวของของแข็ง เช่น จุลินทรีย์ที่อยู่บนดิน จุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ และ *Rhizobium* ที่จับกันรากของพืชตระกูลถั่ว เป็นต้น วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยการดูดซับนี้ เป็นการนำจุลินทรีย์หรือสปอร์มาตรึงบนผิวของวัสดุตรึง โดยการบรรจุวัสดุตรึงเข้าไปในคอลัมน์ แล้วปล่อยให้สารแขวนลอยของเซลล์ไหลผ่าน จนกระทั่งจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารที่ไหลออกมามีค่าคงที่ หรืออาจทำโดยการผสมสารตรึงเซลล์เข้ากับเซลล์ แล้วเขย่าจนกระทั่งจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรในของเหลวมีค่าคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กระบวนการตรึงเซลล์วิธีนี้ จะเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์กับสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้สามารถผันกลับได้โดยพันธะที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็นพันธะที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายขนถ่ายอิเล็กตรอน เช่น แรงแวนเดอร์วาลล์ (Vanderwaal force) แรงไอออนิก (Ionic force) และแรงของพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen) นอกจากนี้ ยังอาจพบแรงที่เกิดจากพันธะแบบไม่มีขั้ว ซึ่งแรงของพันธะเหล่านี้เป็นแรงที่อ่อนมาก จึงสามารถทำให้ปฏิกิริยาของวัสดุตรึงกับโครงสร้างของเยื่อหุ้มหรือผนังเซลล์หลุดออกจากกันได้ แต่ถ้าทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวอย่างรุนแรงก็อาจจะป้องกันสภาวะนี้ได้ ตัวอย่าง เช่น เซลล์ยีสต์ซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นประจุลบ จึงควรใช้วัสดุตรึงที่มีประจุเป็นบวกในการตรึงเซลล์ยีสต์

2.) การยึดจับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการทำให้เซลล์จับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยจะเกิดพันธะขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชันของสารเคมีของวัสดุที่ใช้ตรึงกับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งพันธะที่เกิดขึ้นจะเป็นพันธะที่เกิดขึ้นอย่างคงที่และเหมาะสม พันธะโคเวเลนต์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นระหว่างพื้นที่ผิวด้านนอกของเซลล์ ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนหรืออนุพันธ์ของโปรตีน ได้แก่ หมู่อะมิโน (NH_2) ของกรดอะมิโนไลซีนหรืออาร์จินีน หมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) ของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกหรือกลูตามิก หมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของกรดอะมิโนเซอรีนหรือทรีโอนีน และหมู่ซัลไฮดริล (SH) ของกรดอะมิโนซีสเทอีน ส่วนสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึงนั้นส่วนใหญ่แล้วจะเป็นสารสังเคราะห์ หลักการเลือกวัสดุตรึงโดยการยึดจับด้วยพันธะโคเวเลนต์นั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการตรึงเซลล์ ส่วนรูปแบบการเชื่อมโยงพันธะของวัสดุตรึงกับพื้นผิวด้านนอกของเซลล์จะเกิดเป็นพันธะโคเวเลนต์ชนิดต่างๆ ได้แก่ การเชื่อมกันแบบไอโซยูเรีย (Isourea linkage) การเชื่อมกันแบบไดอะโซ (Diaso linkage) การเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide linkage) และการเชื่อมกันโดยการเกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน (Alkylation reaction) ซึ่งการจับกันโดยพันธะโควาเลนต์นี้จะทำให้เซลล์เจริญได้ในอัตราที่ช้าและตายในที่สุด

3.) การตรึงเซลล์โดยการยึดจับ (Entrapment)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ แตกต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพและการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับด้วยพันธะโคเวเลนต์ตรงที่เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความเป็นอิสระจากสารละลาย แต่จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โครงสร้างมีลักษณะเป็นตาข่ายเจล ซึ่งช่องว่างของร่างตาข่ายเจลที่เกิดขึ้นจะถูกควบคุมโดยโครงสร้างของเจลที่ยึดจับกับเซลล์อย่างแน่นหนาเพื่อป้องกันการรั่วหลุดของเซลล์ที่ถูกตรึง และรูที่เกิดขึ้นก็ยังจะช่วยให้อาหารและผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่เข้าออกจากเซลล์ได้อย่างอิสระ ส่วนตัววัสดุที่ใช้ตรึงนั้นสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับสารที่เคลื่อนที่ไปมาระหว่างเซลล์ ซึ่งบางทีอาจจะมีผลกระทบอย่างมากต่อค่ากลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ แต่บางทีสภาวะเช่นนี้ก็อาจจะเป็นผลดีต่อเซลล์ที่ถูกตรึง เนื่องจากวัสดุที่ตรึงสามารถที่จะป้องกันสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์

สำหรับวิธีการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะมีขั้นตอนและทฤษฎีการตรึงเซลล์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์ เช่น อัลจิเนตมีการก่อตัวเป็นเจลโดยการทำปฏิกิริยากันระหว่างประจุบวกและประจุลบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

137286

สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ อะกาโรสและเจลาตินมีการใช้อุณหภูมิในการเหนี่ยวนำให้เกิดเจล โดยสารที่เป็นวัสดุตรึง เมื่อเย็นตัวลงแล้วจะเกิดเป็นเม็ดเจล การเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของสารอินทรีย์หรือปฏิกิริยาโฟโตเคมิคอลของพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) และการเกิดการตกตะกอนในสารละลายที่ทำให้ตัวถูกละลายตกตะกอนของพอลิสไตรีน (Polystyrene)

4.) การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน (Crosslinking)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้ วัสดุตรึงจะเป็นอิสระและจะมีการเชื่อมต่อของเซลล์แต่ละเซลล์กับวัสดุตรึงที่ยึดจับกับเซลล์อีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งจะยึดจับกันเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ในลักษณะที่เป็นการเชื่อมพันธะไขว้กันโดยจะมีโครงสร้างเป็นลักษณะสามมิติเชิงซ้อน และสามารถเชื่อมกันได้ทั้งแบบกายภาพและเคมี โดยทฤษฎีทางเคมีนั้นจะเป็นการเชื่อมไขว้กันโดยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเซลล์ ซึ่งจะเชื่อมกับสารที่มีหมู่ฟังก์ชันสองตำแหน่งหรือมากกว่า เช่น กลูตารัลดีไฮด์ และ ทูลูอีนไดไอโซไซยาเนต แต่เนื่องจากสารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูง จึงไม่นิยมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์

ส่วนกระบวนการเชื่อมไขว้ทางกายภาพนั้น จะเชื่อมไขว้เซลล์จนเกิดเป็นโครงสร้างที่เกาะกลุ่มกัน จึงเป็นวิธีการที่ดีสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ และยังเป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูง การทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มกัน (Flocculation) นั้น จะต้องเติมสารเพื่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการจับเกาะกลุ่มกันของเซลล์ สารเหล่านั้น ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ พอลิเอทิลีนเอไมด์ พอลิสไตรีนซัลฟอเนต และสารฟอสเฟต กระบวนการเชื่อมไขว้ถือเป็นกระบวนการตรึงเซลล์เนื่องจากเป็นกระบวนการจำกัดการเคลื่อนที่ของเซลล์และเป็นการเพิ่มความอยู่ตัวของเซลล์ นอกจากนี้ กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการตรึงเซลล์วิธีอื่นคือ สามารถที่จะลดการรั่วของเซลล์ได้ เนื่องจากเซลล์เกิดการยึดเกาะกันอย่างเหนียวแน่น

5.) การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึง (Encapsulation)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้เป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ โดยอาศัยการล้อมรอบเซลล์จุลินทรีย์ไว้ภายในโครงสร้างตาข่ายของเจล สามารถทำได้โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึงที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่านคล้ายๆ กับการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับเซลล์กับวัสดุตรึง ซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงจะเป็นอิสระจากสารละลาย (Entrapment) แต่จะแตกต่างกันตรงที่เซลล์ที่ตรึงโดยวิธีนี้จะไม่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ การที่เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในลักษณะที่เป็นเม็ดนั้น จะทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านแผ่นเยื่อเลือกผ่านของวัสดุตรึงได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กนั้นสามารถเคลื่อนที่เข้าออกจากเม็ดเจลได้อย่างอิสระ ซึ่งมีการนำวัสดุจำนวนมากมาใช้เพื่อให้เกิดการก่อตัวขึ้นเป็นเม็ดเจล โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10 ถึง 100 ไมโครเมตร สารที่ใช้ ได้แก่ ไนลอน เซลลูโลสไนเตรท

กระบวนการตรึงเซลล์เป็นการเพิ่มการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเซลล์และยังเพิ่มคุณสมบัติในการดูดซับสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของประจุ ช่วงระยะเวลาที่ทำการบ่ม และ วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ฯลฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 วัสดุตรึง

วัสดุที่สามารถใช้ในการตรึงเซลล์ ได้แก่

ก. พอลิอะคริลาไมด์เจล เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ แต่เป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ เนื่องจากปฏิกิริยาการพอลิเมอไรเซชันเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน อาจทำให้จุลินทรีย์บางชนิดตายได้ โดยทั่วไป จะป้องกันด้วยการทำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณภูมิต่ำ (แช่สารละลายในน้ำแข็ง)

ข. คอลลาเจน เป็นโปรตีนเส้นใย กระจายได้ดีเมื่ออยู่สารละลายที่มีพีเอช 2.5-4.5 คอลลเจนจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะอิออนิค

ค. เจลาติน เป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์คอลลาเจน ถูกนำมาใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

ง. อะการ์หรืออะกาโรส อะการ์เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria* หรือ *Gelidium* ส่วนอะกาโรสนั้น คือ อะการ์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้สารละลายเกลือ เช่น Cetylpyridinium chloride ทำให้อะกาโรเพคตินที่มีซัลเฟต ไพรูเวต ในโครงสร้างของโมเลกุลตกตะกอนและกรองแยกในขณะที่ยังร้อน โดยอะกาโรสจะมีความแข็งแรงมากกว่าอะการ์

จ. เคปปา-คาร์ราจีแนน เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดงสกุล *Eucheuma* มีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วย 3,6-anhydro-D-galactose เชื่อมต่อกับ D-galactose-4-sulfate ด้วยพันธะ1,4 แบบไกลโคซิดิก

ฉ. ไคโตแซน คือ อนุพันธ์ของไคตินที่มีหมู่อะซิติลบางส่วนถูกขจัดออกไปด้วยการไฮโดรไลซ์ด้วยด่างเข้มข้น ละลายได้ในกรดอินทรีย์เจือจางที่มีพีเอชต่ำกว่า 6 เกิดจากการจับอิออนตรงข้ามเป็นเจล

ช. แคลเซียมอัลจิเนต กรดอัลจินิกเป็นโคพอลิเมอร์ของกรดแมนูโรนิคที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-ดี (1,4) ไกลโคซิดิค ถูกสกัดออกมาจากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Laminaria* ด้วยน้ำร้อนที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์เล็กน้อย

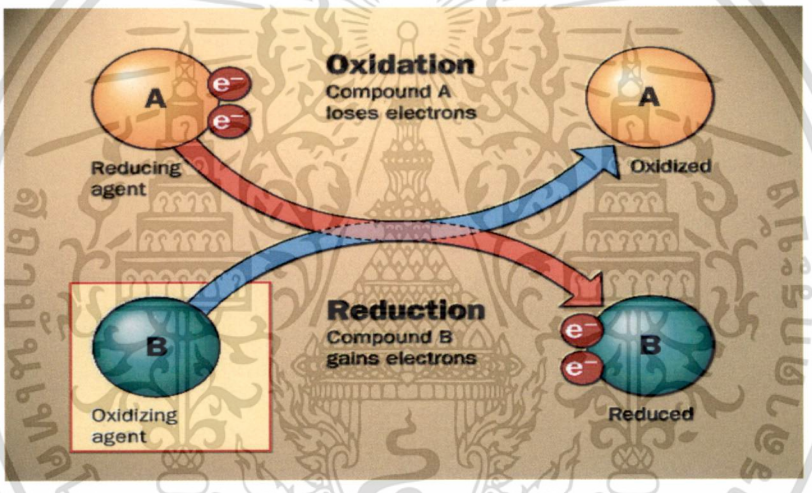
การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยอัลจิเนตนั้น ทำได้โดยการดูดสารผสมของเซลล์ (1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเซลล์เปียก) กับโซเดียมอัลจิเนต (1-7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ผ่านกระบอกฉีดยาแล้วปล่อยให้หยดลงสู่ลายละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05-0.5 โมลาร์ที่เย็นปล่อยให้เม็ดเจลอยู่ในสารละลายนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้แคลเซียมไอออนเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออน ความแข็งของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของโซเดียมอัลจิเนต ซึ่งถ้าใช้ชนิดที่มีอัตราส่วนของกรดกลูโรนิคต่อแมนูโรนิคสูง ก็จะกลายเป็นเม็ดเจลที่มีความเสถียรสูง จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตในเม็ดเจลได้ เนื่องจากโครงสร้างของเม็ดเจลที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตเป็นโครงสร้างร่างตาข่ายที่เกิดจากการจับตัวกันในไอออนของตัววัสดุตรึงกับสารที่ช่วยก่อตัวเป็นเม็ดเจลของอัลจิเนต ($CaCl_2$) และยังมีไอออนสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วย จึงทำให้เซลล์ที่อยู่ในเม็ดเจลจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบและเกิดเป็นช่องเล็กทำให้โมเลกุลของสารอาหาร อากาศ และผลิตภัณฑ์ที่เซลล์ผลิตขึ้นเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกจากเม็ดเจลได้ทำให้เซลล์ได้รับสารอาหารและปล่อยผลิตภัณฑ์ที่เซลล์ผลิตขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 สารรีดิวซ์

สารรีดิวซ์ (Reducing agent) เป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยอะตอมที่ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ได้ดีเป็นอะตอมที่มีขนาดใหญ่ จึงควรมีระยะห่างระหว่างนิวเคลียสกับอิเล็กตรอนวงนอกสุดมาก และมีแรงดึงดูดอิเล็กตรอน (Electronegativity) ในระดับต่ำ ทำให้สูญเสียอิเล็กตรอนง่าย ไฮโดรเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์เพราะไฮโดรเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากสารรีดิวซ์ การรับอิเล็ก ตรอนทำให้ตัวนำอิเล็กตรอนถูกรีดิวซ์ (รูปที่ 2.10) เช่น สารที่เป็นตัวนำอิเล็กตรอน ชื่อ นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)) ที่มีประจุบวกอยู่ด้วย จึงมักเขียนย่อว่า NAD^+ ดังนั้น เมื่อ NAD^+ 1 โมเลกุลได้รับไฮโดรเจน 2 อะตอม จึงถูกรีดิวซ์เป็น $NADH + H^+$ ดังสมการ

$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH + H^+$$



รูปที่ 2.10 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน
ที่มา : http://members.chello.nl/r.kuijt/en_oxidation_reduction.htm

$NADH + H^+$ เป็นสารถูกรีดิวซ์ เพราะได้รับอิเล็กตรอนพร้อมด้วยโปรตอน ถ้า $NADH + H^+$ สูญเสียไฮโดรเจน 2 อะตอมก็จะกลายเป็น NAD^+ การถ่ายทอดอิเล็กตรอนเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน กล่าวคือ มีการให้และการรับอิเล็กตรอนเกิดขึ้น โดยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงที่ปล่อยออกมาจากสารรีดิวซ์จะถูกนำไปผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรตีเนสที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และเอมไซม์ไนโตรจีเนสที่ใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ระบบแสงสองจะใช้พลังงานแสงดึงอิเล็กตรอนออกจากน้ำได้โปรตอนกับออกซิเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ ดังสมการ

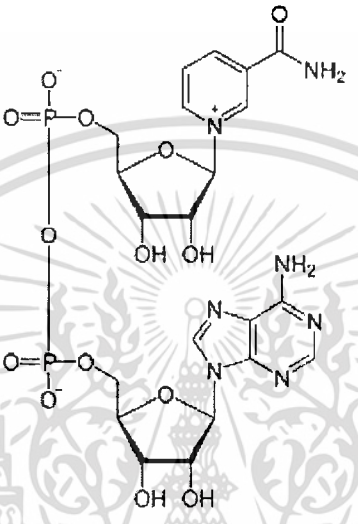
$$H_2O \longrightarrow \frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 สารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์

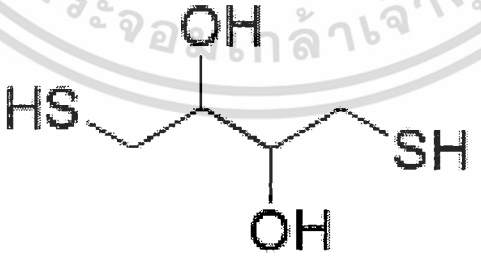
สารเคมีที่นำมาใช้ในการทดลองในการเป็นสาร ได้แก่

ก. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (รูปที่ 2.11) เป็นสารรีดิวซ์ที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นได้ โดยหน้าที่สำคัญของ NADH คือ ส่งต่ออิเล็กตรอนนั้นให้กับสารตัวอื่น หรือ ส่งเข้าระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transport system) เพื่อนำไปสร้าง ATP



รูปที่ 2.11 โครงสร้างโมเลกุลของ Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)
ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide_adenine_dinucleotide

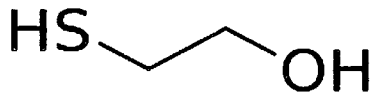
ข. Dithiothreitol (DTT) (รูปที่ 2.12) เป็นสารรีดิวซ์ที่แข็งแรง เนื่องจากเป็นโมเลกุลหกเหลี่ยมเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์



รูปที่ 2.12 โครงสร้างโมเลกุลของ Dithiothreitol (DTT)
ที่มา : http://www.proteochem.com/dtt1gram-p-143.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. β-Mercaptoethanol (รูปที่ 2.13) เป็นสารรีดิวซ์ที่มักถูกเพิ่มในปฏิกิริยาเอนไซม์ เพื่อไปยับยั้งการออกซิเดชันและใช้เพื่อลดพันธะไดซัลไฟด์



รูปที่ 2.13 โครงสร้างโมเลกุลของ β-Mercaptoethanol

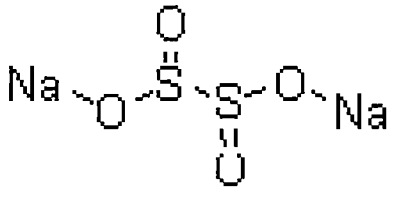
ที่มา : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-Mercaptoethanol.svg

ง. Methylviologen (รูปที่ 2.14) เป็นสารรีดิวซ์ที่จะถูกออกซิไดส์โดยไฮโดรจีเนส และเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาย้อนกลับของไฮโดรจีเนส

รูปที่ 2.14 โครงสร้างโมเลกุลของ Methylviologen

ที่มา : http://www.brendaenzymes.org/Mol/Mol.php4?n=16156&compound=reduced&s_type =5&back=1&limit_start=10

จ. Sodium dithionite (รูปที่ 2.15) เป็นสารรีดิวซ์ในอุตสาหกรรมสารละลาย



รูปที่ 2.15 โครงสร้างโมเลกุลของ Sodium dithionite

ที่มา : http://www.guidechem.com/reference/dic-15512.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 น้ำตาลรีดิวซ์และนอนรีดิวซ์

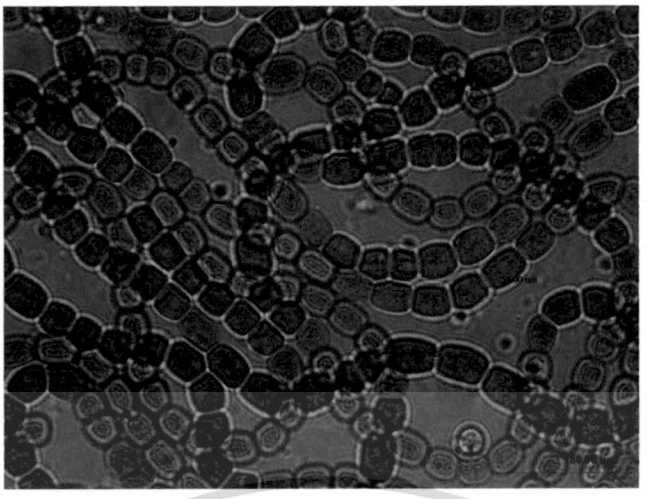
น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducting sugar) คือ น้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (Aldehyde) หรือคีโตน (Ketone) ที่เป็นอิสระในโครงสร้างของน้ำตาล หมู่เหล่านี้จะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) อย่างอ่อน ตัวอย่างของน้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทุกชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) และ น้ำตาลโมเลกุลคู่บางชนิด เช่น น้ำตาลแลกโทส (Lactose) และน้ำตาลมอลโทส (Maltose)

น้ำตาลนอนรีดิวซ์ (Non-reducing sugar) เช่น น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก

2.7 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

A. siamensis เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทย มีลักษณะเป็นเส้นสาย โดยจะมีเซลล์ต่อกันเป็นข้อๆ คล้ายสร้อยสังวาล มีเฮเทอโรซิสต์ที่มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ใน *A. siamensis* เซลล์เฮเทอโรซิสต์จะพบบริเวณปลายสุดของเส้นสาย ซึ่งจะพบเพียง 2 เฮเทอโรซิสต์ต่อเส้นสาย นอกจากนี้ *A. siamensis* ยังสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน โดยเมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจนจะไปกระตุ้นการสร้างเฮเทอโรซิสต์ เพื่อทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในอากาศมาทดแทนอาหารที่ขาดไนโตรเจน สำหรับประโยชน์ของเชื้อ *Anabaena* สายพันธุ์นี้จะนำมาใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพให้พืชทางการเกษตรและช่วยฟื้นฟูสภาพโครงสร้างดินให้รองรับ น้ำ อากาศ และธาตุอาหารได้ดีขึ้น นอกจากนี้ ยังนำมาใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และที่สำคัญในงานวิจัยนี้ ได้สนใจนำมาไซยาโนแบคทีเรียนี้ใช้ในการผลิตพลังงานก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกชนิดใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน โดยเชื้อตัวนี้จะมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง เนื่องจากสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและการตรึงไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.16 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Anabaena siamensis*

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Brouers และ Hall (1986) ศึกษาเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena azollae* และ *Mastigocladus laminosus* โดยทำการตรึงเซลล์โดยใช้พอลิไวนิลและอัลจิเนตเป็นวัสดุตัวตรึง พบว่า การตรึงเซลล์มีผลทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากการทดลองพบว่า การตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. azollae* และ *M. laminosus* โดยใช้พอลิไวนิลเป็นวัสดุตรึง ภายใน 24 ชั่วโมง สามารถผลิตแอมโมเนียได้ 400 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์และ 100 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระของไซยาโนแบคทีเรีย *A. azollae* และ *M. laminosus* มีการผลิตแอมโมเนียได้น้อยกว่า 10 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ภายใต้สภาวะเดียวกัน

Laurinavichene และคณะ (2006) ศึกษากระบวนการตรึงเซลล์สาหร่าย *Chlamyodomonas reinhardtii* โดยใช้อาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์และเพาะเลี้ยงในถังหมัก จากการทดลองพบว่า สภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์จะช่วยส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ปริมาณสูงสุดของไฮโดรเจนที่ผลิตได้ภายในระยะเวลา 23 วัน เท่ากับ 380 มิลลิลิตร และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 45 มิลลิลิตรต่อวัน

Rashid และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* โดยใช้อะการ์เป็นวัสดุตรึงผ่านกระบวนการ two-stage cyclic ในช่วงแรกเซลล์ตรึงจะอยู่ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์และมีแสงเพื่อทำการปรับสภาพเซลล์ เมื่อเข้าสู่ช่วงที่สองเซลล์จะเข้าสู่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไม่มีแสง และปราศจากซัลเฟอร์ เพื่อเริ่มการผลิตไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า การตรึงเซลล์ช่วยรักษาเสถียรภาพของการผลิตไฮโดรเจนได้ดี นอกจากนั้น เมื่อเซลล์เข้าสู่กระบวนการ two-stage cyclic เซลล์ตรึงของ *M. aeruginosa* ยังสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสจากภายนอกเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน โดยการเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์จากภายนอกเข้าไป จะมีส่วนช่วยในการปรับปรุงอัตราการผลิตไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจน โดยจะมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนให้อยู่ที่ 37 ถึง 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงกว่า 42 องศาเซลเซียสจะมีผลทำให้เซลล์ตาย

Wang และคณะ (2010) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สับสเตรทที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงของเชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* CQK 01 โดยใช้ โซเดียมอัลจิเนต พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ และ คาราจีแนน เป็นวัตถุตรึง และทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ Photobioreactor พบว่าการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลและอัตราการไหลของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับความเข้มข้น 60 มิลลิโมลต่อลิตร จะมีผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น และในสภาวะที่มีการให้แสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ความเข้มของแสง 6ม000 ลักซ์ จะทำให้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดอยู่ที่ 2.61 มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมง

Khetkorn และคณะ (2010) ศึกษาการควบคุมปัจจัยภายนอกที่ชักนำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR8012 โดยมีการควบคุมปัจจัยภายนอกดังนี้ อายุของเซลล์ ความเข้มของแสง เวลาที่ใช้ในการบ่ม และแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน จากการทดลองพบว่าเซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนได้ดีเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ log phase ภายใต้สภาวะเมื่อมีการใช้น้ำตาลฟรุกโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและมีการให้ความเข้มแสง เท่ากับ 200 ไมโครโมลไอน์สไตน์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

Naim และคณะ (2009) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการเวียนรอบการผลิตในเซลล์ตรึง *Microcystis aeruginosa* โดยใช้สองสภาวะ ช่วงแรกเป็นสภาวะที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์และสารต่างๆ ที่จำเป็นใช้เวลา 3 วัน และช่วงที่สอง สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ไม่มีแสง เป็นช่วงที่เซลล์จะผลิตไฮโดรเจน ใช้เวลา 40 ชั่วโมง โดยในการทดลองนี้จะมีการศึกษาปัจจัยในเรื่องแสงและที่มืด ระยะเวลาในการบ่ม และผลของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตส และสารสกัดจากมอลต์ จากผลทดลองพบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงฟื้นฟูเซลล์ในสภาวะที่มีแสงตลอดเวลา จะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าสภาวะที่มืดตลอดเวลา และสภาวะที่มีแสงในบางเวลา ช่วงระยะเวลาในการฟื้นฟูเซลล์ที่เหมาะสมพบว่า เซลล์สาหร่ายควรมีการฟื้นฟูเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน และผลของน้ำตาลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนพบว่าสารสกัดจากมอลต์ส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาล กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

Chen และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย *Anabaena* sp. โดยมีการเติมน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต จากทดลองพบว่าการเติมน้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลกลูโคส 1,000 พีพีเอ็ม (ppm) จะช่วยส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด โดยผลิตได้ 0.6 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้ามีการเติมน้ำตาลลงไปมากกว่า 2,000 พีพีเอ็ม จะไม่ช่วยส่งเสริมในการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wuttinun และคณะ (2012) ศึกษาสารที่สามารถส่งเสริมกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสาหร่าย *Arthrospira* sp. PCC 8005 โดยมีการใช้สารรีดิวซ์ พบว่าสารเบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) สามารถส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เป็นอย่างดี ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากสารไนโตรเจนและซัลเฟอร์ โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 5.91±0.14 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.3 สารเคมี

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

1. ก๊าซอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co.,Ltd.,Thailand)
2. ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co.,Ltd.,Thailand)

สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์

1. อัลจิเนต (Analytical grade, Sigma, USA)
2. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analytical grade, Analar®, England)
3. Glucose (Analytical grade, BioMark™, India)
4. Lactose (Analytical grade, Sigma, USA)
5. Maltose(Analytical grade, Merck, Germany)
6. Fructose(Analytical grade, Merck, Germany)
7. Sucrose (Analytical grade, Fisher Scientific, Germany)
8. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Analytical grade, Sigma, USA)
9. Dithiothreitol (DTT) (Analytical grade, Sigma, USA)
10. β-mercaptoethanol (Analytical grade, Pharmacia Biotech, Sweden)
11. Methyl viologen (Analytical grade, Sigma, USA)
12. Sodium dithionite (Analytical grade, Sigma, USA)

3.4 อุปกรณ์

1. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Tomy koqyo Co., Ltd., Japan)
2. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)
3. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Lab Focus Contherm Thermotec 200, Thailand)
5. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
6. เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heat block)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
8. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion Co., Ltd., Thailand)
9. เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc, USA)
10. เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ (Gas chromatrograph) (Perichrom, French)
11. ไมโครปิเปต (Micropipette)
12. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
13. กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus, CH30, Japan)
14. เข็มฉีดก๊าซ (Syringe) (Scientific Glass Engineering Syringe Corperation, Australia)
15. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Thermo Electron Corporation, Helios Gamma, USA)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BG11 และ $BG11_0$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยเพาะเลี้ยงประมาณ 1-2 สัปดาห์

3.5.2 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. siamensis*

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. siamensis* โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร นับจำนวนเฮเทอโรซิสต์เซลล์ภายใต้ Haemacytometer

3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ

นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก เติมเมทานอลบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมงและนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

นำสารละลายเซลล์ *A. siamensis* ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการกระจายเซลล์ ปิเปตสารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ขวดแก้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแก้ว จากนั้นไล่อากาศในขวดแก้วออกโดยพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที ดูดก๊าซปริมาตร 500 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) โดยการทดลองนี้จะใช้ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐานซึ่งมีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง 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)

3.5.5 วิธีการตรึงเซลล์

3.5.5.1 ขั้นตอนการเตรียมแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 1.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.5.2 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุตรึง

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งโซเดียมอัลจิเนต 1.5 กรัม เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทำการละลายโซเดียมอัลจิเนตโดยต้มให้โซเดียมอัลจิเนตละลายจนหมดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.3 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยอาหารทดสอบ 3 ครั้ง

3.5.5.4 ขั้นตอนการหยดเจล

นำเซลล์ที่ผ่านการล้างจากข้อ 3.5.5.3 มาผสมกับเจลที่เป็นวัสดุตรึงคือโซเดียมอัลจิเนตจากข้อ 3.5.5.2 โดยจะต้องทำการผสมสารละลายเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับโซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมไว้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้มือเขย่าเบาๆ นำหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรดูดเจลที่เตรียมไว้หยอดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ หนึ่งหยดเจลเท่ากับ 1 เม็ดเจลของเซลล์ที่ถูกตรึง หลังจากนั้น ทำการล้างเจลที่ตรึงได้ในอาหาร และทำการตักใส่ขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด นำไปวัดปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

3.5.5.5 การเตรียมเจลวุ้น

เตรียมเจลวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งวุ้น 1.5 กรัม ใส่ลงในอาหารทดสอบ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.5.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึง

นำเซลล์ที่ถูกตรึงมาทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง

3.5.6 วิธีการวัดปริมาณไฮโดรเจนในเซลล์ที่ถูกตรึง

นำเซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและวุ้นมาไล่อากาศ โดยพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ดูดก๊าซปริมาตร 400 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector

3.5.7 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเซลล์ที่ถูกตรึง

นำเม็ดเจลที่ตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและวุ้นมาแช่ไนเมทานอลบริสุทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรและบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไป vortex และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

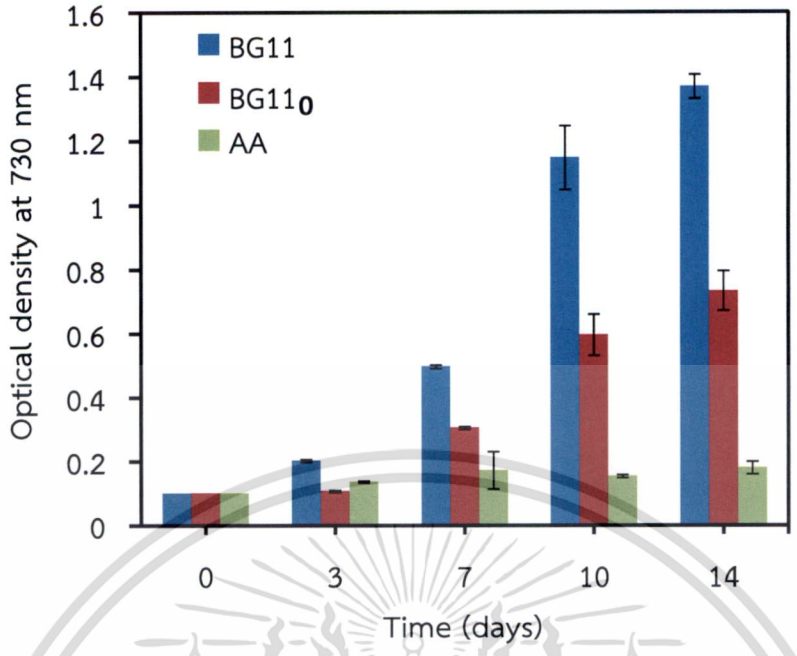
ในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีการตรึงเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* นี้ ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ตอนใหญ่ ดังนี้ ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนก่อนการตรึงเซลล์ โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ชนิดของอาหาร ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง และ ผลของการขาดซัลเฟอร์ ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนภายหลังการตรึงเซลล์ โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ชนิดของเซลล์ตรึง และ จำนวนเม็ดเจล ตอนที่ 3 การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนโดยการเติมแหล่งคาร์บอนและสารรีดักแทนท์

4.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ก่อนการตรึงเซลล์

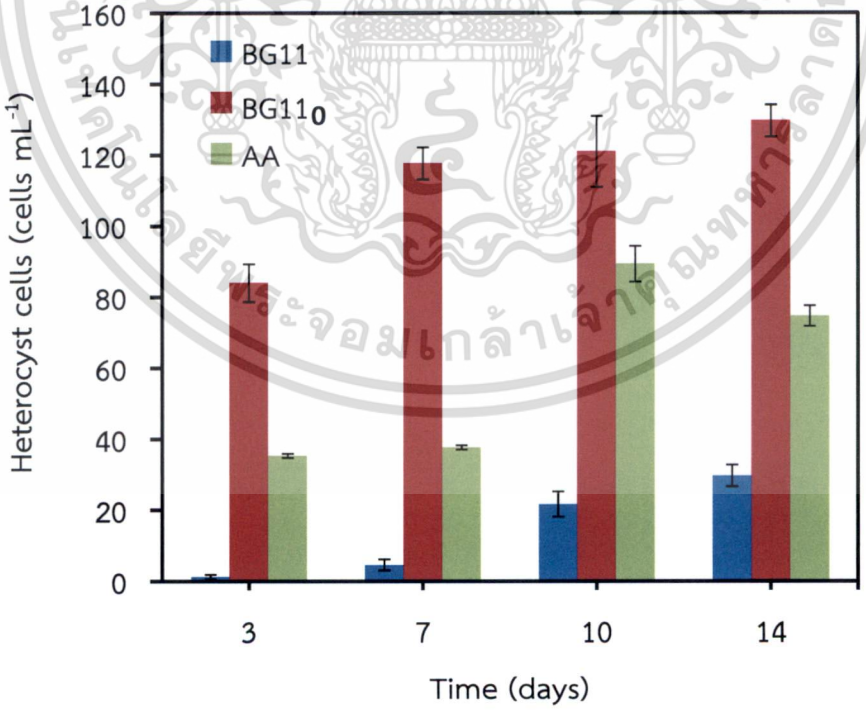
4.1.1 ผลของชนิดของอาหารต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตร BG11, $BG11_0$ (อาหารสูตร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน) และอาหารสูตร Allen–Arnon เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการวัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร BG11 และมีการเจริญลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตร Allen–Arnon (รูปที่ 4.1) เมื่อทำการตรวจนับจำนวนของเซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่อยู่ในเส้นสายของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์พบว่า เซลล์ที่เพาะลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ มีจำนวนเซลล์เฮเทอโรซิสต์สูงที่สุด โดยพบตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีจำนวนเซลล์เฮเทอโรซิสต์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.2) ส่วนเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 มีจำนวนของเฮเทอโรซิสต์น้อยที่สุด และจะเริ่มพบเซลล์เฮเทอโรซิสต์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10 วัน (รูปที่ 4.2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อาหารสูตร BG11 เป็นอาหารสูตรสมบูรณ์ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดรวมถึง *A. siamensis* เนื่องจากอาหาร BG11 มีสารอาหารและแร่ธาตุในปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม *A. siamensis* ยังสามารถเจริญได้ในอาหาร $BG11_0$ ซึ่งปราศจากแหล่งไนโตรเจน เนื่องจาก *A. siamensis* เป็นไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศจากเซลล์เฮเทอโรซิสต์ได้ ดังนั้น ในสภาวะที่อาหารขาดแหล่งไนโตรเจน (อาหาร $BG11_0$) เซลล์จึงเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์ออกมาจำนวนมากเพื่อทำการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศและเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



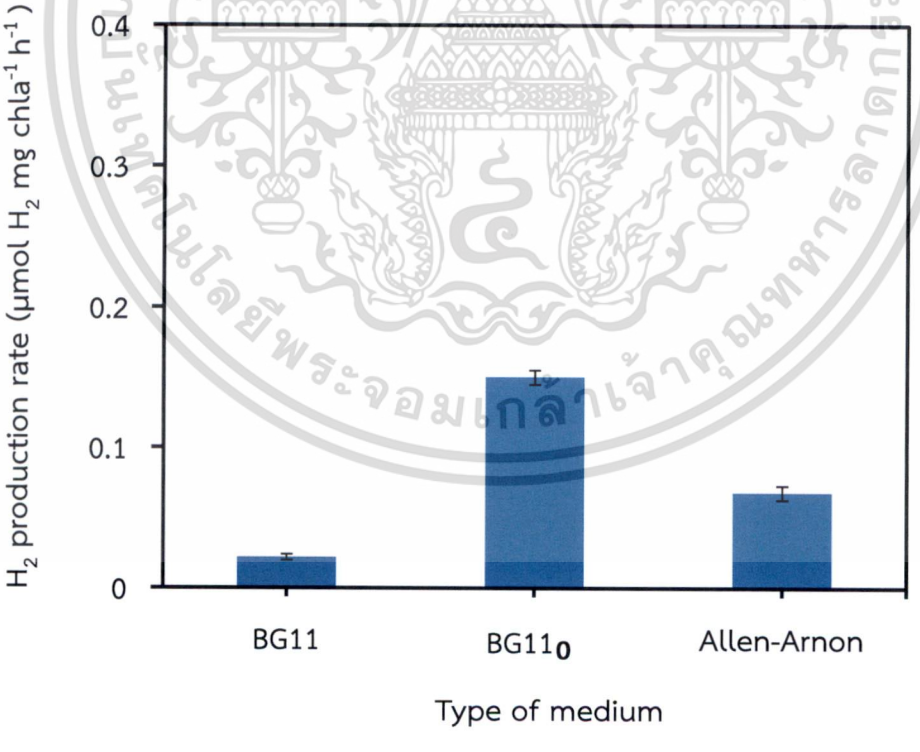
รูปที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, $BG11_0$ และAllen-Arnon



รูปที่ 4.2 จำนวนเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 $BG11_0$ และ Allen-Arnon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้น นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ทำการปิเปตสารละลายเซลล์ลงในขวด GC–vial ทึบแสง ฉีดพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มในสภาวะที่ไร้อากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำส่วน head space ปริมาตร 400 ไมโครลิตร มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC–TCD พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดคือ 0.150 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง รองลงมาคือเซลล์ที่ทำการเลี้ยงในอาหารสูตร Allen–Arnon ซึ่งมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน 0.068 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 จะมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนน้อยที่สุดคือ 0.022 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.3) ผลการผลิตไฮโดรเจนสอดคล้องกับจำนวนเฮเทอโรซิสต์ นั่นคือ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ ที่ปราศจากไนโตรเจน เซลล์ปกติจะเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์เพื่อตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ จึงทำให้มีจำนวนเซลล์เฮเทอโรซิสต์เพิ่มมากขึ้น การตรึงไนโตรเจนนี้จะใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนสในการเร่งปฏิกิริยาและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตผลพลอยได้ ดังนั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ จึงทำให้ *A. siamensis* มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ในการทดลองต่อไป จึงได้ทำการเลือกอาหาร $BG11_0$ เป็นอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* เพื่อผลิตไฮโดรเจน

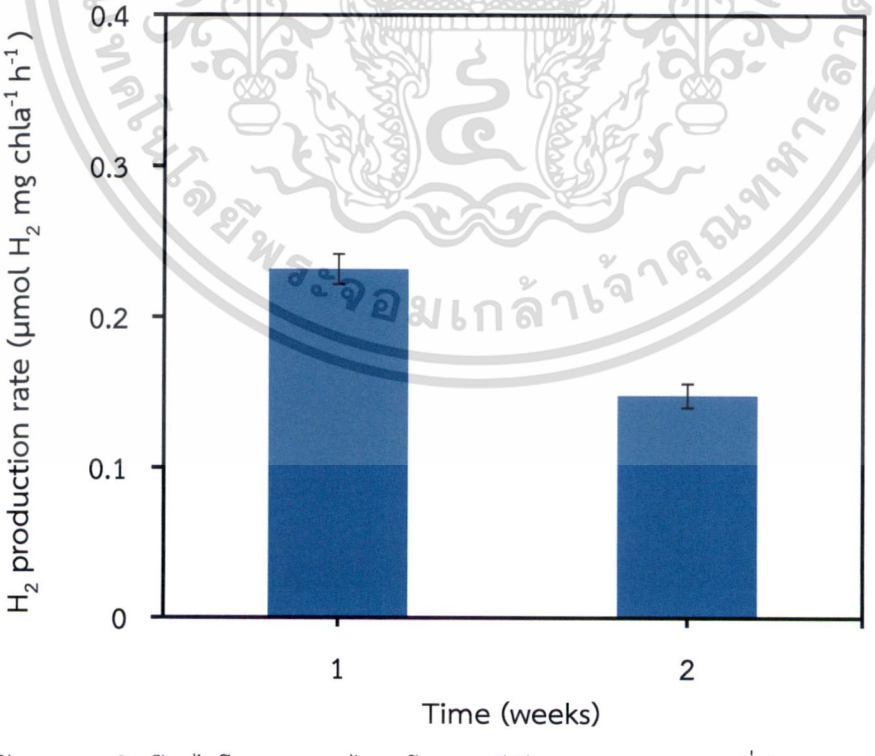


รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11, $BG11_0$ และ Allen-Arnon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลของระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์มากระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ทำการปิเปตสารละลายเซลล์ลงในขวด GC–vial ทึบแสง ฉีดพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนและบ่มในสภาวะที่ไร้อากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำส่วน head space ปริมาตร 400 ไมโครลิตร มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC–TCD พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยผลิตได้ 0.232 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำกว่า โดยผลิตได้ 0.148 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.4) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่มีอายุ 1 สัปดาห์จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากระยะ 1 สัปดาห์เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (อยู่ในระยะ Log phase) เกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการสร้างและสลายสารต่างๆ ภายในเซลล์ รวมไปถึงกระบวนการตรึงไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ อีกทั้งสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานยังถูกใช้ไม่หมดทำให้เซลล์ได้นำมาใช้อย่างเต็มที่ ส่วนในเซลล์ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ความสมบูรณ์ของอาหารและปริมาณสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่เซลล์สะสมไว้ลดน้อยลง เป็นผลทำให้เซลล์มีพลังงานและสารรีดิวซ์ในการผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น การทดลองต่อไปจึงเลือกเซลล์ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนและการตรึงเซลล์ต่อไป

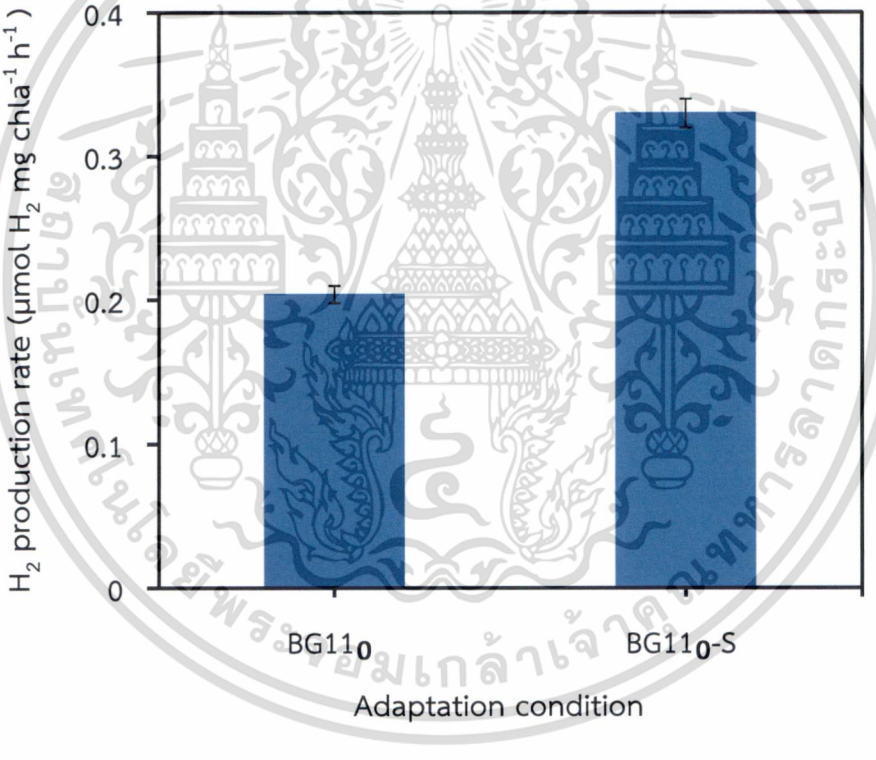


รูปที่ 4.4 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลของการขาดซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการศึกษาผลของการขาดซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยนำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายในอาหาร $BG11_0$ และ $BG11_0$-S (อาหาร $BG11_0$-S คือ อาหาร BG11 ที่ปราศจากไนโตรเจนและซัลเฟอร์) และทำการปรับสภาพเซลล์ในอาหาร $BG11_0$ และ $BG11_0$-S เป็นเวลา 1 วัน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และนำสารละลายเซลล์ไปวัดอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนพบว่า เซลล์ที่ปรับตัวในอาหาร $BG11_0$-S มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด คือ 0.330 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ปรับตัวในอาหาร $BG11_0$ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนน้อยกว่า โดยผลิตได้ 0.204 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ภายหลังการปรับตัวในอาหาร $BG11_0$ และ $BG11_0$-S เป็นเวลา 1 วัน

ในสภาวะการปรับตัวของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว และในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ พบว่า เซลล์ที่ปรับตัวในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟอร์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่า เนื่องจาก ในสภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์ เซลล์จะเกิดการยับยั้งการสร้างกรดอะมิโนซีสเทอีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนในระบบแสงสอง (Photosystem II) ของกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่งผลทำให้การสังเคราะห์แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยระบบแสงสองหยุดลง เมื่อการสังเคราะห์แสงด้วยระบบแสงสองหยุดลง การผลิตก๊าซออกซิเจนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จึงลดลงไปด้วย ส่งผลให้ไม่มีก๊าซออกซิเจนไปยับยั้งกระบวนการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนส ดังนั้น อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจึงสูงที่สุดในเซลล์ที่ปรับสภาวะในอาหาร $BG11_0$-S ด้วยเหตุนี้ จึงเลือกสูตรอาหาร $BG11_0$-S เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการปรับสภาพเซลล์ก่อนการตรึงเซลล์

4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ภายหลังการตรึงเซลล์

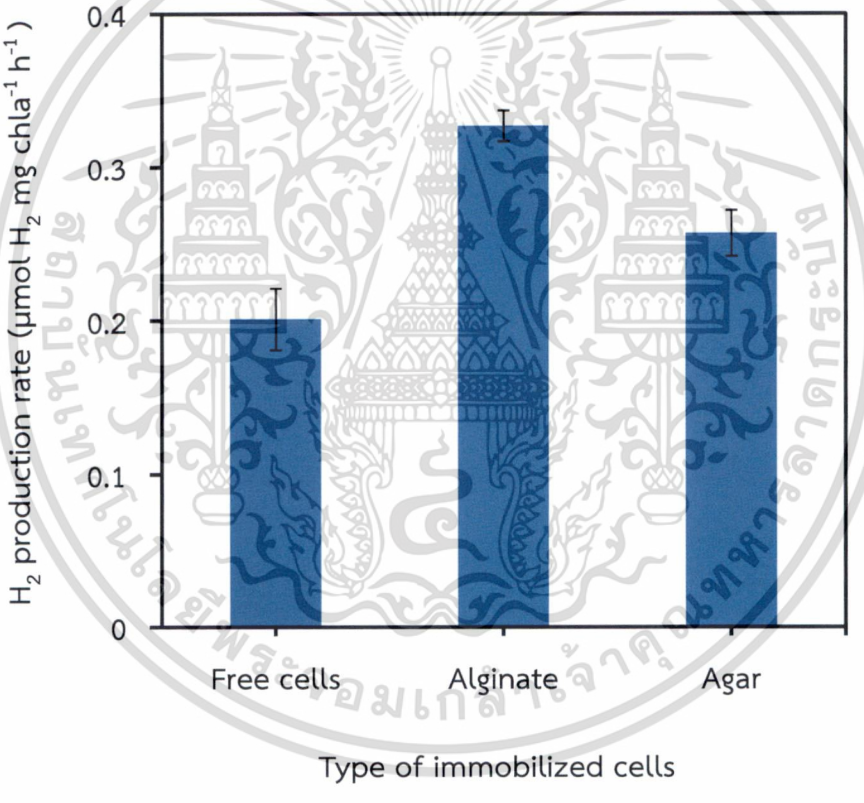
4.2.1 ผลของชนิดของวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาทำการปรับสภาวะในอาหาร $BG11_0$-S เป็นเวลา 1 วัน และนำเซลล์มาตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและวุ้น จากนั้น นำเม็ดเจล 100 เม็ดที่ผ่านการตรึงและเซลล์อิสระมาใส่ลงในขวด GC–vial ที่ทึบแสง พ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที บ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและทำการวัดปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่เซลล์ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC–TCD พบว่า เซลล์ตรึงมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์อิสระ โดยเฉพาะเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.327 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นจะมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำกว่า โดยมีอัตราเท่ากับ 0.257 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.6) ดังนั้น ในการตรึงเซลล์ จึงเลือกวัสดุตรึงชนิดอัลจิเนตเพื่อให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง

จากการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์อิสระ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงและปรับสภาวะในอาหารเดียวกัน โดยในการทดลองนี้ ได้ทำการตรึงเซลล์ด้วยวัสดุตรึง 2 ชนิดที่มีหลักการในการตรึงเซลล์ที่แตกต่างกัน การตรึงเซลล์ในโซเดียมอัลจิเนตเป็นการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้มเซลล์ไว้ในเม็ดเจลของวัสดุตรึงหรือเรียกว่า Encapsulation เซลล์ที่ถูกตรึงจึงมีลักษณะเป็นเม็ดเจลเม็ดเล็กๆ ซึ่งการตรึงเซลล์แบบนี้ เซลล์จะรวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับวัสดุตรึง โดยจะมีอาหารผสมอยู่ และเมื่อนำมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์จะเกิดการก่อตัวเป็นเม็ดเจลไมโครแคปซูล (Microcapsule) ซึ่งเกิดจากการแลกเปลี่ยนประจุกันระหว่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์กับวัสดุตรึงโซเดียมอัลจิเนต โซเดียมในเจลของโซเดียมอัลจิเนตจะเกิดการแตกตัวเป็นโซเดียมไอออนซึ่งมีประจุบวก (Na^+) และอัลจิเนตเมื่อจับกับเซลล์ก็จะมีประจุลบในรูปของสารละลาย ส่วนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายก็จะเกิดการแตกตัวเป็นแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ซึ่งมีประจุบวกและจะจับกับอัลจิเนตที่จับกับผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียซึ่งมีประจุเป็นลบ ส่วนคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ซึ่งมีประจุเป็นลบจะจับกับโซเดียมไอออน (Na^+) ที่แตกตัวมาจากโซเดียมอัลจิเนตกลายเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) การยึดจับกันของประจุแคลเซียมไอออนกับอัลจิเนตและผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจะเป็นในลักษณะของร่างปกคลุมเซลล์ในลักษณะของไมโครแคปซูล โดยจะมีช่องเล็กๆ ให้สารโมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านเข้าออกได้ สภาวะการตรึงเซลล์แบบนี้ เซลล์จะดูด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึมและแลกเปลี่ยนสารอาหารได้ดี นอกจากนี้ สภาวะที่เซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ในโครงร่างแหของเม็ดเจลยังเป็นการบดบังการเคลื่อนที่ของแสงและก๊าซออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสและเอนไซม์ไนโตรจีเนสอีกด้วย ส่วนการตรึงเซลล์โดยใช้วัสดุตรึงที่เป็นวุ้นนั้น ใช้หลักการยึดเซลล์ให้อยู่กับวัสดุตรึงหรือ Entrapment การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้อาศัยคุณสมบัติการจับตัวกันเป็นของแข็งของวัสดุตรึงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง ไม่ได้อาศัยพันธะทางเคมีใดๆ จึงเปรียบเสมือนการเลี้ยงเซลล์ในอาหารแข็งแล้วตัดนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวอีกที การตรึงเซลล์ในวุ้น เซลล์ *A. siamensis* สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีเช่นกัน แต่ต่ำกว่าการตรึงเซลล์ในอัลจิเนต เหตุผลที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากวุ้นไม่ใช่โครงร่างตาข่ายที่มีรูพรุนเหมือนกับอัลจิเนต ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จึงเคลื่อนที่ออกจากเม็ดเจลได้น้อย



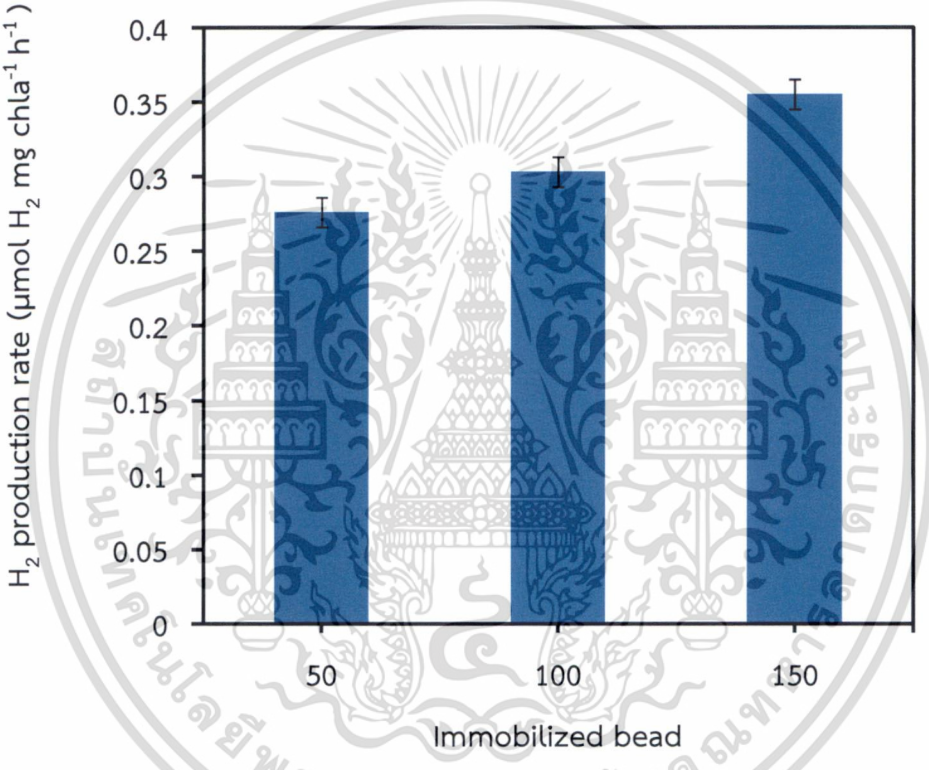
รูปที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้น ในอาหารสูตร $BG11_0$-S

4.2.2 ปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จากการนำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้เซลล์เจริญอยู่ในช่วงที่มีอัตราการเจริญสูงสุด (Log phase) มาเก็บเกี่ยว และกระจายลงในอาหาร $BG11_0$-S และทำการปรับสภาวะเซลล์เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์แล้วนำเซลล์ไปตรึงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมอัลจิเนต นำเม็ดเจลตักใส่ขวดแก้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็น 50, 100 และ 150 เม็ดต่อขวด ปรับปริมาตรให้เป็น 15 มิลลิลิตรด้วยอาหาร $BG11_0$-S จากนั้น ปิดฝาขวด พ่นอาร์กอนและนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดปริมาณไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า ในขวดที่มีปริมาณเซลล์ตรึง 150 เม็ด มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยผลิตได้ 0.355 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง รองลงมาคือขวดที่มีปริมาณเซลล์ตรึง 100 และ 50 เม็ด ตามลำดับ โดยผลิตได้ 0.303 และ 0.276 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.7) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าปริมาณเซลล์ตรึงที่มากขึ้นไซยาโนแบคทีเรียจะช่วยกันส่งเสริมการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้สูงขึ้น



รูปที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. siamensis* ด้วยอัลจิเนตในขวดที่มีปริมาณเซลล์ตรึง 50, 100 และ150 เม็ด

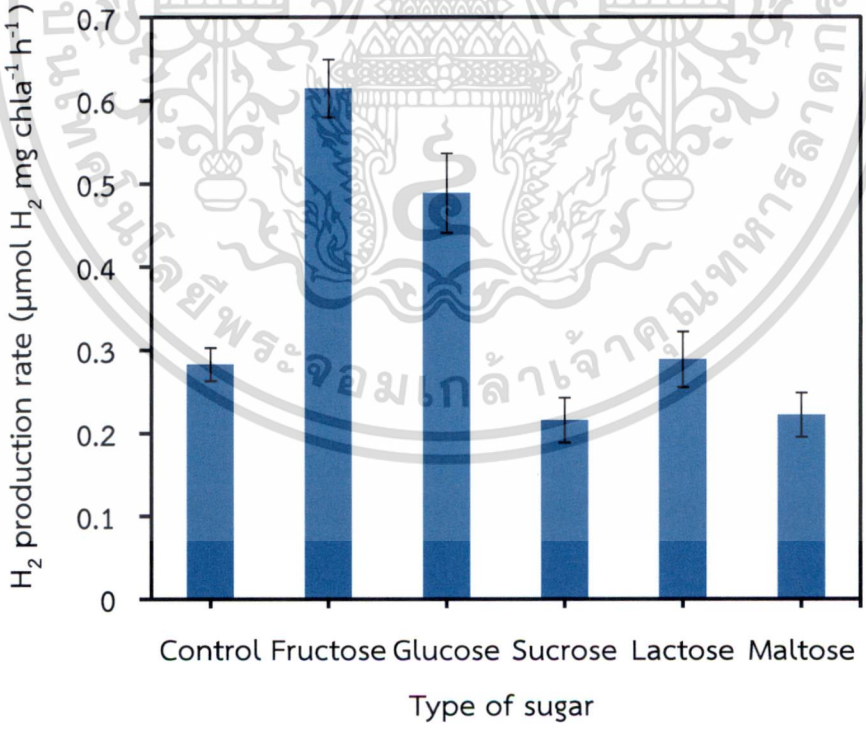
4.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

4.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงโดยการเติมน้ำตาล

จากการเก็บเกี่ยวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาถ่ายลงในอาหาร $BG11_0$-S และอาหาร $BG11_0$-S ที่มีการเติมน้ำตาลชนิดต่างๆ คือ ฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส แลกโตส และมอลโตส โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการปรับสภาวะเป็นเวลา 1 วัน จากนั้น เก็บเกี่ยวแล้วนำเซลล์ไปตรึงในโซเดียมอัลจิเนต นำเม็ดเจลตักใส่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร ขวดละ 150 เม็ด ปรับปริมาตรให้เป็น 15 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรเดียวกับที่ใช้ในการปรับสภาวะเซลล์ จากนั้น ปิดฝาขวด บ่มในสภาวะที่ไม่มีแสงและนำไปวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลฟรุกโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยผลิตได้ 0.615 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ลำดับถัดมาคือ เซลล์ตรึงในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจน 0.489 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.8) ในขณะที่เซลล์ตรึงในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลซูโครส แลกโตส และมอลโตส ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกับเซลล์ตรึงในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่ปราศจากการเติมน้ำตาล (รูปที่ 4.8) จากผลการทดลองอธิบายได้ว่า เซลล์ตรึง *A. siamensis* ในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูง เนื่องจากน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสจัดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่โปรตอน ดังนั้น จึงจัดน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสเป็นแหล่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหรือสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจน เซลล์ตรึง *A. siamensis* ในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลฟรุกโตสมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่เติมน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลฟรุกโตสเป็นน้ำตาลที่เหมาะในการให้อิเล็กตรอนแก่ไซยาโนแบคทีเรียเส้นสาย (Khetkorn และคณะ, 2010) ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลที่เหมาะในการให้อิเล็กตรอนแก่ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว (Taikhao และคณะ, 2013)



รูปที่ 4.8 อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง *A. siamensis* ในอาหารสูตร $BG11_0$-S และ $BG11_0$-S ที่มีการเติมน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส แลกโตส และมอลโตส โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์

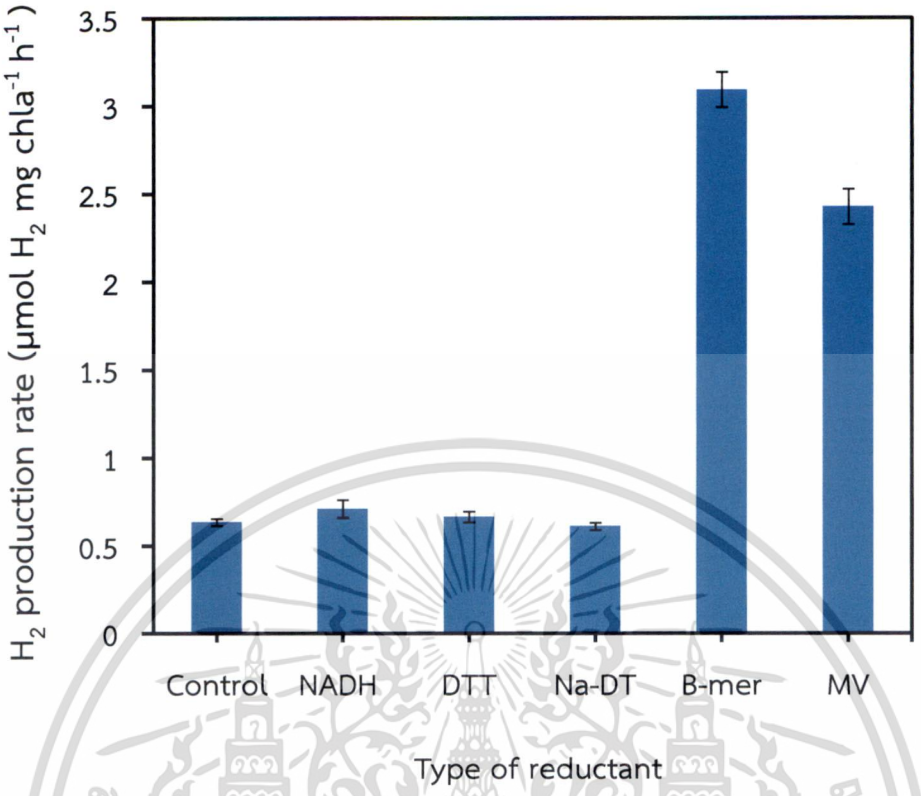
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงโดยการเติมสารรีดิวซ์

จากการเก็บเกี่ยวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาถ่ายลงในอาหาร $BG11_0$-S ทำการปรับสภาวะเป็นเวลา 1 วัน จากนั้น เก็บเกี่ยวแล้วนำเซลล์ไปตรึงในโซเดียมอัลจิเนต นำเม็ดเจลตักใส่ขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร ขวดละ 150 เม็ด ปรับปริมาตรให้เป็น 15 มิลลิลิตร ด้วยอาหารสูตรเดียวกับที่ใช้ในการปรับสภาวะเซลล์ จากนั้น ปิดฝาขวดแล้วจึงทำการฉีดสารรีดิวซ์ ได้แก่ NADH, Dithiothreitol, Sodium dithionite, β–Mercaptoethanol และ Methylviologen ลงในเซลล์ตรึง โดยกำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารรีดิวซ์เท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ ทำการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยเครื่อง GC-TCD จากการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลฟรุกโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารรีดิวซ์ β–Mercaptoethanol มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 3.092 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.9) รองลงมาคือเซลล์ตรึงในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลฟรุกโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารรีดิวซ์ Methylviologen ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 2.426 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.9) ในขณะที่เซลล์ตรึงในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่มีการเติมน้ำตาลฟรุกโตสและสารรีดิวซ์ NADH, Dithiothreitol และ Sodium dithionite ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับเซลล์ตรึงที่ปราศจากการเติมสารรีดิวซ์ จึงสรุปได้ว่าสารรีดิวซ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. Siamensis*

จากผลการทดลองพบว่า สารรีดิวซ์ β–Mercaptoethanol ส่งเสริมให้เซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารรีดิวซ์ชนิดอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก β–Mercaptoethanol นอกจากจะเป็นสารรีดิวซ์ที่แรงแล้ว ยังสามารถรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ของเอนไซม์บางตัว ซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wuttinun และคณะ (2012) ที่พบว่า β–Mercaptoethanol เป็นสารรีดิวซ์ที่สามารถส่งเสริมกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira* sp. PCC 8005 โดยในสภาวะการบ่มที่ปราศจากสารไนโตรเจนและซัลเฟอร์ *Arthrospira* sp. PCC 8005 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เท่ากับ 5.91±0.14 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึง A. siamensis ในอาหารสูตร $BG11_0$-S ที่เติมน้ำตาลฟรุกโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์และมีการเติมสารรีดิวซ์ NADH, Dithiothreitol, Sodium dithionite, β-Mercaptoethanol และ Methyl viologen ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ก่อนการตรึงเซลล์

1. อาหาร BG11 เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรสูงสุด ในขณะที่อาหาร $BG11_0$ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากมีจำนวนเซลล์เฮเทอโรซิสต์และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด

2. ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3. การขาดซัลเฟอร์จะส่งเสริมอัตราการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

5.2 สรุปปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ภายหลังการตรึงเซลล์

1. เซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์อิสระ โดยเฉพาะเซลล์ที่ถูกตรึงในอัลจิเนตมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.327 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นจะมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่ำกว่า โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.257 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง

2. ปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* คือ 150 เม็ดต่อขวดแก้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร

5.3 สรุปการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

1. การเติมน้ำตาลฟรุกโตส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร สามารถทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 เท่า โดยผลิตได้ 0.615 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง

2. การเติมสารรีดิวซ์ β–Mercaptoethanol และ Methylviologen ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* อย่างเห็นได้ชัด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 3.092 และ 2.426 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่การเติมสารรีดิวซ์ NADH, Dithiothreitol และ Sodium dithionite ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ประพันธ์ คูชลธารา . การลดปริมาณทาร์ ในกระบวนการแกซิฟิเคชันของชีวมวล โดยตัวเร่งปฏิกิริยา $K_2CO_3/NiO/Al_2O_3$ ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551

Antal TK, Lindblad P 2005. Production of H_2 by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. J Appl Microbiol 98:114–120

Brouers M, Hall DO 1986. Ammonia and hydrogen production by immobilized cyanobacteria. J Biotech 3:307-321

Chen PC, Fan SH, Chiang CL, Lee CM 2008. Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CH3. Int J Hydrogen Energy 33:1460–1464

Carturan G, Campostrini R, Dire S, Scardi V, De Alteriis E 1989. Inorganic gels for immobilization of bilcatalsts: inclusion of invertase-active whole ccells of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO2 gel deposited on glass sheets. J Mol Catal 57:13-16

Eric M, Richard R 2000. Photoelectrochemical hydrogen production: Proceeding the 2000 Hydrogen Program Review.1, 1 – 14

Karel SF, Kibicki SB, Robertson CR 1985. Immobilization of whole cells: engineering principles. Chem Eng Sci 40:1321-1354

Khetkorn W, Lindblad P, Incharoensakdi A 2010. Enhanced biohydrogen production by the N_2-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. Int J Hydrogen Energy 35:12767–12776

Melis A, Zhang LP, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 122:127–135

Naim R, Wei S, Jongmin P, Hai –Feng J, Kisay L 2010. Characteristic of hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Micricystis aeruginosa* through of photosynthesisand anaerobic incubation. J Ind Eng Chem 15:498–503

Pin CM, Jlanping Y, Carrle E, Maria LG 2009. Photobiological hydrogen production – Prospects and challenge: Microbe. 4:275 – 280

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rao KK, Hall DO 1996. Hydrogen production by cyanobacteria: pontential, problems and prospects. Journal of Marine Biotechnology. 4:10 –15

Raksajit W, Satchasataporn K, Lehto K, Mäenpää P, Incharoensakdi A 2012. Enhancement of hydrogen production by the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. Int J Hydrogen Energy 37:18791-18797

Rashid N, Song W, Park J, Jin H-F, Lee K. 2009. Characteristics of hydrogen production by immobilized cyanobactrium *Microcystis aeruginosa* through cycles of photosynthesis and anaerobic incubation. J Ind Eng Chem 15:498–503.

Taikhao S, Junyapoon S, Incharoensakdi A, Phunpruch S. 2013. Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. J. Appl. Phycol 25:575-585.

Tamagnini P, Axelsson R, Lindblad P, Oxelfelt F, Wonschiers R 2002. Hydrogenase and hydrogenase metabolism of cyanobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:1–20.

Wang YZ, Liao Q, Zhu X, Tian X, Zhang C 2010. Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodopseudomonas palustris* CQK 01 in an immobilized-cell photobioreactor. Bioresour. Technol. 101:4034-4041

Yu J, Takahashi P 2007. Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. 79–89. in Mendez-Vilas, A. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Spain:Formatex.

Zhang L, Happe T, Melis A 2002. Biochemical and morphological characterization of sulphur-deprived and H_2-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). Planta. 214:552–561

คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน. วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มา http://www.enaa.or.jp/WE-lNET/suiso/suiso1_e.html.

แหล่งพลังงานไฮโดรเจน. วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มา ที่มา: http://www.iea.org/publications/freepublications/.../hydrogen.pdf

กระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า. วันที่สืบค้น 4เมษายน 2556. ที่มา http://www.greencarcongress.com/2004/11/milestone_for_h.html.

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว . วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มา http://www.future farmers.com/survey/algae.php.

การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสและเอนไซม์ไบไดเรคชันนอลไฮโดจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย.วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มาhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319911022130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรีดักชัน. วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มา http://members.chello.nl/r.kuijt/en_oxidation_reduction.html.

โครงสร้างโมเลกุลของ Nicotinamide adenine dinucleotide(NADH). วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide_adenine_dinucleotide.

โครงสร้างโมเลกุลของ Dithiothreitol (DTT).วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มาhttp://www.proteochem.com/dtt1gram-p-143.html.

โครงสร้างโมเลกุลของ β-Mercaptoethanol.วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มา https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-Mercaptoethanol.svg.

โครงสร้างโมเลกุลของ Methyl viologen.วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มาhttp://www.brendaenzymes.org/Mol/Mol.php4?n=16156&compound=reduced&s_type=5&back=1&limit_start=10.

โครงสร้างโมเลกุลของ Sodium dithionite.วันที่สืบค้น 4 เมษายน 2556. ที่มา http://www.guidechem.com/reference/dic-15512.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของอาหาร

ตารางที่ ก1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11, $BG11_0$ และ Allen-Arnon

สารอาหาร	ความเข้มข้นในอาหาร (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	BG11	$BG11_0$	Allen-Arnon
K_2HPO_4	29.6	29.6	268
$MgSo_4 .7H_2O$	72.7	72.7	250
$CaCl_2.2H_2O$	34.9	34.9	75
NaCl	0	0	250
KOH	0	0	7.56
Ferric ammonium citrate	5.82	5.82	0
Citric acid.H_2O	5.82	5.82	0
$NaNO_3$	255	0	0
$FeSO_4.7H_2O$	0	0	19.9
$Na_2EDTA.2H_2O$	0.970	0.970	29.7
$MnCl_2.4H_2O$	1.76	1.76	1.80
MoO_3	0.017	0.017	0.180
$ZnSO_4.7H_2O$	0.215	0.215	0.220
$CuSO_4.5H_2O$	0.077	0.077	0.079
H_3BO_3	2.77	2.77	2.86
NH_4VO_3	0	0	0.023
$CoCl_2.6H_2O$	0.048	0.048	0.040

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางสรัญญา พันธุ์พฤกษ์

เพศ ☐ ชาย ☑ หญิง วันเดือนปีเกิด 21 พฤศจิกายน 2512 อายุ 43 ปี

สถานภาพ ☐ โสด ☑ สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2534
วท.ม.	เทคโนโลยีทางชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
Dr. rer. nat	Biology/Botany	Philipps University, Marburg Germany	2542

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ชีววิทยาระดับโมเลกุลของมัยโคแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

เทคโนโลยีชีวภาพของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2537	รางวัลเรียนดี	มูลนิธิแถบนีลนิธิ

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2535-36	ทุนผลิตและพัฒนาอาจารย์	ทบวงมหาวิทยาลัย
2538-42	Deutscher Academischer Austausch-Dienst (DAAD) Scholarship	DAAD, Germany
2544-45	Sustainable Use of Marine Microorganisms and Marine Natural Chemicals	JICA, Japan
2543-45	การศึกษายีน *betB* ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica*	สวทช
2544-45	การค้นหายีนที่ผลิตไฮโดรจีเนสและการจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	คณะวิทย์ สจล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) และ Southern blot	
2545-46	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hup* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*	คณะวิทย์ สจล.
2546-47	การตัดส่วนของยีน *hup* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน	คณะวิทย์ สจล.
2547-48	การศึกษาการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงจากแบคทีเรียในทะเล	คณะวิทย์ สจล.
2548-49	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย Anabaena siamensis	ส่งเสริมนักวิจัย คณะวิทย์ สจล.
2547-48	Cloning and functional characterization of squalene-hopene cyclase (SHC) from *M. tuberculosis*	Biotec
2549-50	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม Aphanothece halophytica	คณะวิทย์ สจล.
2549-50	การศึกษารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตเนสของ *Agrobacterium tumefaciens* เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณในแบคทีเรียแกรมลบ	บัณฑิตวิทยาลัย สจล.
2548-50	Molecular characterization of genes associated with resistant phenotype of Thai MDR-TB isolates	Drug resistant tuberculosis research fund, Siriraj Foundation
2550-51	การผลิตไบโอไฮโดรเจนพลังงานทดแทนแหล่งใหม่จากจุลสาหร่าย	คณะวิทย์ สจล.
2552-53	การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ	คณะวิทย์ สจล.
2553-54	สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อผลิตไฮโดรเจน	คณะวิทย์ สจล.
2554-55	การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและ การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*	คณะวิทย์ สจล.
2554-56	การตรวจหากลไกการดื้อยากลุ่ม Aminoglycoside ที่ยังไม่เคยมีรายงานในเชื้อวัณโรค	งบรายได้ คณะวิทย์ สจล.
2555-56	การผลิตพลาสติกชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย	วช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2555-56	การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยการตรึงเซลล์	คณะวิทย์ สจล.
2556-57	การผลิตไบโอไฮโดรเจนของจุลสาหร่ายที่แยกได้จากนาข้าวของประเทสไทย	คณะวิทย์ สจล.

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

Taikhao, S., Incharoensakdi A. and **Phunpruch, S.** 2014 Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in seawater. Journal of Applied Phycology DOI 10.1007/s10811-014-0292-8

Phunpruch S, Warit S, Suksamran R, Billamas P, Jaitrong S, Palittapongarnpim P, Prammananan T. 2013 A role for 16S rRNA dimethyltransferase (ksgA) in intrinsic clarithromycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Antimicrob Agents 41: 548-551.

Taikhao, S., Junyapoon S, Incharoensakdi A. and **Phunpruch, S.** 2013 Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. Journal of Applied Phycology 25(2):575-585.

Prammananan T, **Phunpruch S**, Jaitrong S, Palittapongarnpim P. *Mycobacterium tuberculosis uvrC* essentiality in response to UV-induced cell damage. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 2012; 43: 370-375.

Nanasombat, S., **Phunpruch, S.** and Jaichalad, T. 2012 Screening and identification of lactic acid bacteria from raw seafoods and Thai fermented seafood products for their potential use as starter cultures. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 34(3): 255-262.

Junyapoon, S., Buala, W. and **Phunpruch, S.** 2011 Hydrogen production with *Escherichia coli* isolated from municipal sewage sludge. Thammasat International Journal of Science and Technology. 16(1): 9-15.

Nanasombat, S., **Phunpruch, S.**, Sriwong, N., Jaichalad, T., Onnom, W. and Odthon, S. 2008 Characterization of the antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from raw fish and nham-plaa. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 42: 747-757.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prammananan, T., Cheunoy, W., Taechamahapun, D., Yorsangsukkamol, J., **Phunpruch, S.**, Phdarat, P., Leechawengwong, M. and Chaiprasert, A. 2008 "Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid methof for mutation detection." Clin. Microbiol. Infect. 14: 446-453.

Phunpruch, S., Baebprasert, W., Thongpeng, C. and Incharoensakdi, A. 2006 "Nucleotide sequencing and transcriptional analysis of uptake hydrogenase genes in the filamentous N_2-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" Journal of Applied Phycology 18: 713-722.

Pramananan, T., **Phunpruch, S.**, Tingtoy, N., Srimuang, S. and Chaiprasert, A. 2006 "Distribution of *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis patters among *Mycobacterium avium* complex isolates in Thailand." J. Clin. Microbiol. 44(10): 3819-3821.

Gutekunst, K., **Phunpruch, S.**, Schwarz, C., Schuchart, S., Schulz-Friedrich, R. And Appel, J. 2005 "LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator." Mol. Microbiol. 58(3): 810-823.

Papsing, C. and **Phunpruch, S.** 2005 "Molecular cloning of the dinitrogenase genes in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" In : AgBiotech Graduate Conference II 16-17 May, 2005 Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand. p.131.

Phunpruch, S., Thongpeng, C., Baebprasert, W. and Incharoensakdi, A. 2005 "Cloning, sequencing and expression of the uptake hydrogenase genes in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" In : 2nd National conference on algae and plankton, 23-25 March 2005, Holiday Garden hotel, Chaingmai, Thailand. p. OP1-12.

Baebprasert, W. and **Phunpruch, S.** 2004 "The degradation of acyl homoserine lactone signal molecule of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27823 by the recombinant acyl homoserine lactonase enzyme." Journal of Science Ladkrabang. 13(2):22-37. (in Thai)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phunpruch, S. and Kamino, K. 2004 "Study on the acyl-homoserine lactone production of a gram-negative bacterium *Sphingomonas xenophaga* by co-cultivation with *Variovorax paradoxus*." Kasetsart Journal (Nat. Sci.) 38:21-28.

Kutako, M., Powthongsook, S., and **Phunpruch, S.** 2004 "Batch and continuous cultivation of a marine diatom *Amphora delicatissima* AM9901 under heterotrophic condition." Journal of Scientific Research Chulalongkorn University (Section T) 3:309-321. (in Thai)

Phunpruch, S., and Baebprasert, W. 2003 "Isolation of quorum sensing-signal producing bacteria from seawater and artificial sponges collected at Laem Taen." Suranaree J. Sci. Technol. 10(4):307-316.

Phunpruch, S. 2003 "Signaling and Communication of Bacterial Cells." Journal of Science Ladkrabang 12(1):36-43. (in Thai)

Phunpruch, S. 2002 "Osmoprotective Substances in Cyanobacteria." King Mongkut's Agricultural Journal 20(2): 73-79. (in Thai)

Phunpruch, S., Yagop, B., Poempoonpattana, P., Rodbamreo, P., and Incharoensakdi, A. 2002 "Screening of hydrogenase gene in cyanobacteria by polymerase chain reaction." Journal of Science Ladkrabang 11(1):22-34. (in Thai)

Phunpruch, S. 2001 "Hydrogen from Cyanobacteria : A New Alternative Energy Source." Suranaree J. Sci. Technol. 8(4):247-252. (in Thai)

Appel, J., **Phunpruch, S.**, Steinmueller, K., and Schulz, R. 2000 "The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC6803 works as an electron valve during photosynthesis." Arch. Microbiol. 173(5-6):333-338.

การเสนอผลงานวิชาการ

Rattana, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 under heterotrophic conditions. In: The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 4-6 October, 2010. Pattaya, Thailand. p.114-120.

Ongmali, R., Thawornchaisit, U. and **Phunpruch, S.** Lipid-accumulating capacity of bacteria isolated from a poultry processing wastewater. In: The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 4-6 October, 2010. Pattaya, Thailand. p.121-126.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Taikhao, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Effect of sulphate and nitrate limitations on hydrogen production of a unicellular halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: Commission on Higher Education Congress III-University Staff Development Consortium. 9-11 September, 2010. Royal Cliff Grand Hotel and Spa, Pattaya, Thailand. p.364.PD-27

Phunpruch, S., Taikhao, S. and Incharoensakdi, A. Hydrogen production of a halophilic unicellular cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: Cyanobacteria&Algae Biotechnology Symposium. 31 March, 2010. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. p.13

Suksamran, R., Prammananan, T., Warit, S. and **Phunpruch, S.** Study of transposon localization on genome of macrolide-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mutants. In: The 11th Graduate Research Conference. 12 February 2010. Khon Kaen, Thailand. 907-915.

Taikhao, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of a unicellular halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT Asian Core Program & The 7th Conference on Lactic Acid Bacteria in Thai Food and Feed Industries and The 2009 Asian Bio-Hydrogen Symposium. 26-28 August, 2009 Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. p.47.Hy3O1

Rattana, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of a unicellular green alga *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR8261. In: The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT Asian Core Program & The 7th Conference on Lactic Acid Bacteria in Thai Food and Feed Industries and The 2009 Asian Bio-Hydrogen Symposium. 26-28 August, 2009 Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. p.146.Hy3P1

Phunpruch, S., Baebprasert, W., Ratanajaraya, C. and Thongpeng, C. 2004 "Use of the expression recombinant enzyme lactonase from *Agrobacterium tumefaciens* for the study of growth and signaling in gram-negative bacteria." In : "The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference", Kasetsart University, Bangkok, 3-6 February 2004, p.143-151. (in Thai)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phunpruch, S. and Kamino, K. 2004 "Study on the acyl-homoserine lactone production of a gram-negative bacterium *Sphingomonas xenophaga* by co-cultivation with *Variovorax paradoxus*." In : "The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference", Kasetsart University, Bangkok, 3-6 February 2004, p.332-341.

Baebprasert, W., Thongpeng, C., and **Phunpruch, S.** 2003 "Quorum sensing signal producing bacteria isolated from seawater and artificial sponges collected in Thailand." In : "BioThailand2003", PEACH, Pattaya, 17-20 July 2003, p.244.

Phunpruch, S. and Kamino, K. 2003 "Utilization of quorum sensing signal degrading enzyme from *Variovorax paradoxus* in the gram-negative bacterial population control." In : "BioThailand2003", PEACH, Pattaya, 17-20 July 2003, p.212.

Kutako, M., Powtongsook, S., **Phunpruch, S.** and Tantiwaranurak, C. 2002 "Heterotrophic Growth of a Marine Diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in Batch Cultivations." In : The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology 12-15 November, 2002 Hotel Sofitel Orchid, Khon Kaen, Thailand. p.42. (in Thai)

Kutako, M., Powtongsook, S., and **Phunpruch, S.** 2002 "Effects of organic nutrient sources, glucose and aeration on heterotrophic growth of a marine diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in dark cultivation" In : 28th Congress on Science and Technology of Thailand 24-26 October 2002, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. p.13-36-O (in Thai)

Appel, J., **Phunpruch, S.**, Steinmueller, K., and Schulz, R. 1999 "The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC6803 is functioning as an electron valve during photosynthesis." In : "IV European workshop on the molecular biology of cyanobacteria", Humbolt-University, Berlin, 15-17 September 1999

Appel, J., **Phunpruch, S.**, and Schulz, R. 1998 "Hydrogenase(s) in *Synechocystis*: Tools for photohydrogen production?" In : "BioHydrogen Proceedings of the International Conference on Biological Hydrogen Production", Kona, Hawaii, USA, 23-26 July 1997, Zaborsky, O.R. (ed.), Plenum Press, New York, London, p.189-196.

Schulz, R., Appel, J., **Phunpruch, S.**, Stangier, K., and Wuenschiers, R. 1998 "Biotechnological approach for future use of solar energy: Photohydrogen production by the green *alga Scenedesmus obliquus* and the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." In : "Hydrogen Energy Progress XII Proceeding of the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12th World Hydrogen Energy Conference", Buenos Aires, Argentina, 21-26 July 1998, Vol. III, Bolcich, J.C., and Veziroglu, T.N. (eds.), p.2069-2078.

Wuenschiers, R., Appel, J., Stangier, K., **Phunpruch, S.**, and Schulz, R. 1996 "Investigations to apply biologically produced photohydrogen as a future energy source." In : "Biomass for energy and the environment Proceedings of the 9th European bioenergy conference", Vol. III, Chartier, P., Ferrero, G.L., Henius, U.M.m Hultberg, S., Sachau, J., and Winblad, M (eds), Pergamon, Elsevier Science, Oxford, New York, Tokyo, p.1668-1673.

Incharoensakdi, A., and **Phunpruch, S.** 1996 "Environmental factors affecting the beta-carotene content in *Spirulina platensis*." In : "Proceedings of the 3rd Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology : Issues and Choices", Melia Hotel, Prachuabkhirikhan, 10-15 November 1996, p.587-592.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้