

รายงานการงานวิจัย

การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงด้วยสับสเตรทพอลิแซคคาไรด์
และการประยุกต์ใช้ในน้ำเสีย

The hydrogen production by photosynthetic bacterial with
polysaccharide as substrate and its' application to waste water

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

และ

ผศ. นิสิตา ไกรรักษ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา

RCH

TP

249

.H9

ศ 239ก

ค.1

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....120237

วัน, เดือน, ปี.....10.07.2555

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 120237404
i.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงด้วยสับสเตรทพอลิแซคคาไรด์ และการประยุกต์ใช้น้ำเสียนี้ ดำเนินงานไปได้ด้วยดีโดยได้รับความสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ยังขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัย และในทุกๆ ด้านงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

ผศ. นิสา ไกรรักษ์

(คณะผู้วิจัย)

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน.....	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	4
2.1 เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง.....	6
2.2 เมแทบอลิซึมทางเลือกอื่น (Alternative modes of metabolism).....	7
2.3 การเจริญแบบต่างๆ ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง <i>R. sphaeroides</i>	8
2.4 เอนไซม์ hydrogenase.....	9
2.5 สับสเตรท และการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอน (Substrates and carbon flow).....	11
2.6 รางค์วัตถุดิบสังเคราะห์แสง และสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแสง (The photosynthetic apparatus and light conversion efficiency).....	18
2.7 แบบแผนการผลิตไฮโดรเจน.....	21
2.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และการปรับปรุงกระบวนการ.....	23
2.9 การขยายกำลังการผลิตไฮโดรเจน.....	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	26
3.1 ตัวอย่างน้ำทิ้ง และการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์.....	26
3.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	26
3.3 อุปกรณ์ และการวิเคราะห์.....	26
3.4 วิธีการทดลอง.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	31

4.1 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจากน้ำทิ้ง.....	31
4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดลองทางชีวเคมีของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง...32	
4.3 ศึกษาองค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง	33
4.4 ศึกษาสัดส่วนระหว่างแป้งมันสำปะหลังและโซเดียมกลูตาเมต ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง.....	36
4.5 ศึกษาสัดส่วนระหว่างข้าวหอมมะลิและโซเดียมกลูตาเมต ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง.....	38
4.6 ศึกษารูปทรงขวดเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง	40
4.7 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	42
4.8 ศึกษาการวัดกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase.....	44
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	46
5.1 สรุปผลการทดลอง	46
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	48
เอกสารอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก ก.....	59
ภาคผนวก ข.....	61

สารบัญตาราง

<u>ตารางที่ 2.1</u>	การเจริญแบบต่างๆ ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง <i>R. sphaeroides</i>	7
<u>ตารางที่ 2.2</u>	แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ nitrogenase และ hydrogenase	11
<u>ตารางที่ 2.3</u>	แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ.....	14
<u>ตารางที่ 2.4</u>	รายงานการวิจัยใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตไฮโดรเจน	18
<u>ตารางที่ 2.5</u>	รายงานแสดงสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแสงเป็นไฮโดรเจน ของเชื้อ <i>R. sphaeroides</i>	21
<u>ตารางที่ 4.1</u>	แสดงบริเวณใสรอบๆ โคลอनीของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้	31
<u>ตารางที่ 4.2</u>	ลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12.....	32

สารบัญภาพ

<u>ภาพที่ 2.1</u>	กลไกการสร้างไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง.....	6
<u>ภาพที่ 2.2</u>	รูปแบบเมแทบอลิซึมคาร์บอนต่างๆ ที่พบในจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง กลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ [13, 34, 45].....	12
<u>ภาพที่ 2.3</u>	แบบแผนการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง ไม่สะสมซัลเฟอร์.....	22
<u>ภาพที่ 4.1</u>	การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารเหลว Ormerod's medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 (A) และ 14 วัน (B) วัดเซลล์ที่ OD600 วัดแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ ที่ OD770 นาโนเมตร (ตามลำดับ).....	33
<u>ภาพที่ 4.2</u>	การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารเหลวสูตร Modified medium โดยใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทดแทนในอาหารสูตร Ormerod's medium เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 14 วัน) วัดเซลล์ที่ OD600 วัดแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ที่ OD770 นาโนเมตร (ตามลำดับ).....	35
<u>ภาพที่ 4.3</u>	การเจริญ (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารเหลว Modified medium ที่สภาวะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส.....	37
<u>ภาพที่ 4.4</u>	การเจริญ (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารเหลว Modified medium ที่สภาวะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส.....	39
<u>ภาพที่ 4.5</u>	การเจริญ (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหาร Modified medium บรรจุในขวดกลมทรงกระบอก และขวดแบน ทรงสี่เหลี่ยม ภายใต้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส.....	41
<u>ภาพที่ 4.6</u>	การเจริญ (A) และการผลิตก๊าซ (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ใน อาหารข้าวหอมมะลิสุกและสารละลาย Modified medium (สี่เหลี่ยม) อาหารข้าวหอมมะลิสุกและน้ำกลั่น (สามเหลี่ยม) และอาหารข้าวหอมมะลิ	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

การพัฒนาของโลกอุตสาหกรรมในช่วงหลายร้อยปีที่ผ่านมาได้มีผลทำให้คุณภาพชีวิตมีการพัฒนามากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ก็มีผลทำให้เกิดปัญหาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เช่น การขาดแคลนพลังงาน และมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม ความต้องการพลังงาน และปริมาณพลังงานสำรองจึงเป็นยุทธศาสตร์ที่มีความสำคัญเร่งด่วนทั้งในปัจจุบัน และอนาคต การมองหาพลังงานทดแทนรูปแบบต่างๆ ทั้งประเภทที่ใช้แล้วหมดไป หรือนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จึงได้รับความสนใจ และพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ เพื่อสอดคล้องกับความต้องการที่เพิ่มมากขึ้น พลังงานทดแทนที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้จัดเป็นการแก้ปัญหาพลังงานที่เหมาะสม และยั่งยืนที่สุด ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ และพลังงานไฮโดรเจน ไฮโดรเจนได้รับความสนใจ และมีการศึกษาวิจัยเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเป็นพลังงานทดแทนที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างไม่มีวันหมดสิ้น งานวิจัยต่างๆ มุ่งไปที่กระบวนการผลิตที่ใช้ต้นทุนทางเศรษฐกิจ ง่าย ปลอดภัย ง่ายไปใช้ และเก็บรักษา แนวโน้มการพัฒนากระบวนการผลิตมุ่งไปยังเทคโนโลยีต่างๆ ได้แก่

1. Thermochemical processes ซึ่งใช้ความร้อนในการเปลี่ยน มวลชีวภาพให้กลายเป็นก๊าซผสม สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ แต่อาจก่อให้เกิดปัญหาปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกในผู้ตั้งแวดล้อม

2. Photoelectrochemical processes ใช้ เทคโนโลยีของ semiconductor เพื่อแยกน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนโดยใช้แสงแดด เช่น ใช้ไฟฟ้าจากเซลล์แสงอาทิตย์ (solar cell) แต่ใช้ต้นทุนสูง อาจมีความเสี่ยงในเชิงเศรษฐกิจ

3. Photobiological processes โดยใช้แสงแดด และกระบวนการทางชีวภาพ ของสาหร่ายเซลล์เดียว และจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง เพื่อการแยกน้ำ หรือเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ให้กลายเป็นไฮโดรเจน แม้ว่าจะเป็นเทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อน ต้นทุนต่ำ แต่ปริมาณการผลิตยังไม่คุ้มค่าในเชิงพาณิชย์

การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพมีการวิจัยพัฒนาอย่างมาก โดยมุ่งไปในด้านพัฒนาศักยภาพการผลิตที่รวดเร็วขึ้น และเพิ่มผลได้มากขึ้น และประยุกต์ใช้แหล่งวัตถุดิบราคาถูกเพื่อกระบวนการผลิต ซึ่งเน้นไปใช้ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และการหมักทาง

ชีวภาพ (biofermentation) น้ำเสียส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง ซึ่งมีค่า COD เฉลี่ย 2,000 มก.ต่อมล. นับว่าสูงมาก การแก้ปัญหาดังกล่าวต้องใช้เงินลงทุนสูงเพื่อบำบัดและกำจัดน้ำเสียเหล่านั้น ขณะเดียวกันก็สูญเสียมวลชีวะจำนวนมากที่มีอยู่ในน้ำเสียเหล่านั้นไปอย่างน่าเสียดาย จึงพัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อเพื่อบำบัดน้ำเสียในสภาพไร้อากาศและไร้แสง (dark anaerobic fermentation) เพื่อผลิตไฮโดรเจน ทำให้ได้ประโยชน์ทั้งในแง่การผลิตพลังงานสะอาด และบำบัดน้ำเสียไปพร้อมๆ กัน แต่อย่างไรก็ตามระหว่างการผลิตแบบไร้อากาศในที่มีดพบว่ามีกรสร้างกรดอินทรีย์ควบคู่ไปด้วย ซึ่งจุลินทรีย์ไร้อากาศส่วนใหญ่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ จึงเกิดการสะสมกรดอินทรีย์ประมาณมาก ทำให้การบำบัดขั้นต่อมาต้องหาทางใช้ประโยชน์จากกรดอินทรีย์เหล่านี้เพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจน ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ (purple non-sulfur photosynthetic bacteria) สามารถใช้กรดอินทรีย์เพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะได้รับแสง ซึ่งให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ไร้อากาศในสภาวะมืดเพื่อบำบัดน้ำเสีย จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อการเจริญ แต่มีเพียงแหล่งคาร์บอนบางชนิดเท่านั้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากน้ำเสีย (ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบ ด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดที่หลากหลายความเข้มข้น) ต้องอาศัยจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถใช้สับสเตรทเหล่านี้ได้ในวงกว้าง เพื่อนำไปผลิตไฮโดรเจน งานวิจัยนี้คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ เช่น glucose และ acetic acid ซึ่งมีแนวโน้มสามารถนำไปประยุกต์ใช้บำบัดน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์ แต่จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เพื่อประโยชน์สูงสุดทั้งในด้านการผลิตไฮโดรเจน และการบำบัดน้ำเสีย

1.2 วัตถุประสงค์

คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์พอลิเมอร์แป้งมันสำปะหลัง และข้าว

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจนของที่คัดแยกได้จากธรรมชาติที่สามารถใช้สับสเตรทแป้งมันสำปะหลัง และข้าว

ศึกษาการความสัมพันธ์ของเอนไซม์ hydrogenase ต่อการผลิตไฮโดรเจน

ศึกษาการใช้น้ำเสียจากแหล่งชุมชนเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกและศึกษาจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจากน้ำทิ้งบ้านเรือน และโรงงานบำบัดน้ำเสีย ที่มีความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์พอลิเมอร์ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง และข้าว ที่พบทั่วไปในน้ำเสียจากบ้านเรือน เพื่อหาแนวทางเปลี่ยนของเหลือทิ้งที่ไร้ประโยชน์ และก่อให้เกิดมลพิษ ไปเป็นแหล่งพลังงานทดแทนไฮโดรเจน การทดลองศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนสัดส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน พื้นที่การรับแสง และกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ต่อการผลิตไฮโดรเจน จากนั้นจึงนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในน้ำเสียจากบ้านเรือน (น้ำเสียที่จัดเตรียมในห้องปฏิบัติการ) เพื่อแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย จนสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนเป็นประชากรส่วนใหญ่ในระบบ เนื่องจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงสามารถสร้างสารขี้ผึ้งจุลินทรีย์ได้ดี แล้วดูศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้ง

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่คัดเลือกจากธรรมชาติซึ่งมีคุณสมบัติใช้น้ำตาลกลูโคส มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ความเข้มแสง อุณหภูมิ ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 300 มล. จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาศึกษารูปทรงขวดเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาให้แสง ทดสอบการใช้น้ำเสียจากชุมชนเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่คัดเลือกได้ ทั้งในสภาวะปลอดเชื้อ และสภาวะไม่ปลอดเชื้อ เพื่อประเมินผลการใช้งานจริง

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจากน้ำทิ้งบ้านเรือน และโรงงานบำบัดน้ำเสีย เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์พอลิเมอร์ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง และข้าว ซึ่งสามารถเปลี่ยนของเหลือทิ้งเหล่านี้ไปเป็นพลังงานไฮโดรเจน ทำให้สามารถแก้ปัญหาหมลพิษจากของเสีย และนำกลับมาใช้ผลิตพลังงานได้ไปพร้อมๆ กัน

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจัดเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ เนื่องจากมีสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์ (conversion efficiency) สูง และสามารถปรับตัวเพื่อใช้สับสเตรทที่หลากหลาย การผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องใช้ความรู้ต่างๆ เกี่ยวกับเมแทบอลิซึมทั้งหมดที่จำเป็นต่อการแปรผลอย่างเหมาะสมและออกแบบการทดลองที่เป็นประโยชน์สำหรับการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในกลุ่มไมโครสไปรูลิน่า การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในเชิงปฏิบัติแล้วสามารถเกิดขึ้นในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีเมแทบอลิซึมแบบใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (photoheterotrophic metabolism) ซึ่งรายงานต่างๆ ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับสภาวะการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่ไม่สามารถใช้แสง จึงนำมาใช้พิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการออกแบบกระบวนการทดลอง

ความโดดเด่นในแง่การปรับตัวของวิถีเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง จึงทำให้สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีหรือไม่มีออกซิเจน ผ่านไปตามเมแทบอลิซึมแบบใช้อากาศหรือไม่ใช้อากาศ ในกระบวนการหายใจ หรือการสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นผลดีต่อการปรับเปลี่ยนและการใช้ประโยชน์สูงสุดของแหล่งอาหารในขณะนั้น โดยจุลินทรีย์ต้องปรับตัวอย่างรวดเร็วและตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม การบังคับควบคุมนี้เกิดขึ้นเพราะความแตกต่าง 2 ระดับ จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงมักนิยมใช้กระบวนการสร้างพลังงานในสภาวะมีแสง ขณะเดียวกันแสงมีผลอย่างมากต่อการยับยั้งกิจกรรมการหายใจโดยอาศัย 2 กลไก ได้แก่ 1) ปังจัยโดยอ้อม ซึ่งแสงไปกระตุ้นแรงเคลื่อนโปรตอน (proton motive force) ของสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมการหายใจ โดยเฉพาะในระดับ complex I และ 2) ปังจัยโดยตรง เกี่ยวข้องกับการแข่งขันของตัวส่งผ่านอิเล็กตรอนที่อยู่ในกลไกการสังเคราะห์แสง หรือการหายใจ ได้แก่ ubiquinone สารประกอบ cytochrome bc1 หรือ cytochrome c2 เอนไซม์ 2 ชนิด ที่มีความเกี่ยวข้องอย่างมากต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ เอนไซม์ Nitrogenase ซึ่งใช้ในการสร้างไฮโดรเจน และเอนไซม์ Uptake hydrogenase ซึ่งเป็นเกี่ยวข้องกับการนำไฮโดรเจนไปใช้ สับสเตรทชนิดต่างๆ สามารถนำมาใช้เพื่อการเจริญ แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งประสิทธิภาพของการใช้สับสเตรทเหล่านี้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ กิจกรรมของวัฏจักร TCA สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) สถานะรีดักชันของสับสเตรท (reduction state) และ

ศักยภาพการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นสารต่างๆ ด้วยเมแทบอลิซึมทางเลือกอื่น ได้แก่ poly- β -hydroxybutyrate งานวิจัยนี้มุ่งใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่คัดเลือกได้ ซึ่งพบว่าสามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด และเมื่อทดสอบสมบัติบางประการพบว่าสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด จากข้อมูลเบื้องต้นนี้จึงมีแนวความคิดที่จะนำเชื้อมาทดสอบการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำเสีย ทั้งในสภาวะปลอดเชื้อ และไม่ปลอดเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิ สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ระยะเวลาการรับแสง และสารกระตุ้น/ยับยั้ง เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นก่อนนำไปทดสอบในน้ำเสีย ผลที่ได้รับนอกจากผลิตไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนแล้ว ยังสามารถเพิ่มศักยภาพ และลดต้นทุนการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งผู้วิจัยมุ่งหวังนำไปประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียด้วยตัวเอง (self-cleaning system)

ไฮโดรเจนถือเป็นพลังงานที่สะอาด และมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งให้การยอมรับถึงศักยภาพในระดับเดียวกับพลังงานจากฟอสซิล แต่อย่างไรก็ตามการนำไฮโดรเจนมาใช้ทดแทนพลังงานจากฟอสซิลในอนาคต จำเป็นต้องคำนึงถึงการผลิตแบบหมุนเวียน และสามารถทำได้ในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้กระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพมีความโดดเด่นในเรื่องของกระบวนการที่ไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งใช้สภาวะการดำเนินการในสภาพปกติ และสามารถใช้วัตถุดิบหมุนเวียน จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ จุลินทรีย์สังเคราะห์แสง สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (cyanobacteria) สาหร่าย (algae) และจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาพไร้อากาศ สามารถนำมาใช้ผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ [1, 2] โดยที่จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนสับสเตรทมีค่าสูง และความสามารถใช้สับสเตรทที่หลากหลายทั้งเพื่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน

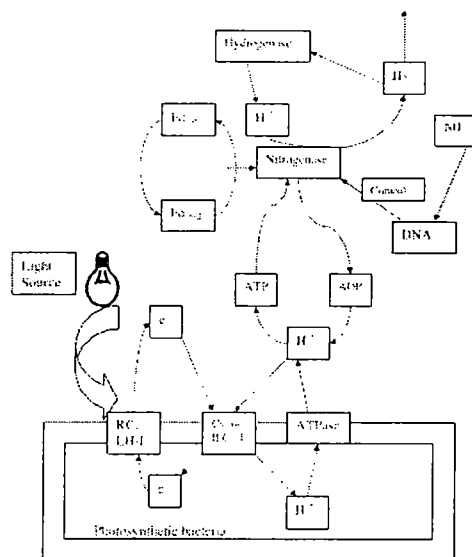
งานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับการออกแบบถังหมักที่เหมาะสม และอยู่บนพื้นฐานสำหรับการศึกษาในอนาคต [3-7] โดยนำความรู้ต่างๆ ที่จำเป็นเพื่อใช้ร่วมกันศึกษามาเมแทบอลิซึมการผลิตไฮโดรเจนทั้งหมด ทำให้การแปลผลลัพท์ที่ได้เหมาะสม และสอดคล้องต่อการออกแบบกระบวนการทดลอง งานวิจัยต่างๆ กล่าวถึงเมแทบอลิซึมการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไมโครสปิไรลเฟอรัสชนิด *Rhodobacter sphaeroides* และแนวทางที่เป็นไปได้สำหรับการปรับปรุง และแก้ปัญหาที่เกี่ยวกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

2.1 เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง *R. sphaeroides* และสายพันธุ์ต่างๆ เกิดขึ้นในสภาวะได้รับแสง และไร้อากาศ (ไม่มีออกซิเจน) ทำให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ไปเป็น malate และ lactate อาหารเลี้ยงเชื้อต้องควบคุมและจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน (ได้แก่การใช้สัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ในระดับสูง) ซึ่งเป็นการบังคับให้จุลินทรีย์นำพลังงานและสารพลังงานสูง ที่สร้างได้ในปริมาณมาก ไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจน ปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อระบบการผลิตไฮโดรเจนทั้งหมด สามารถจัดแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ (ภาพที่ 2.1)

- 1.) ระบบเอนไซม์
- 2.) การเปลี่ยนแปลงของคาร์บอน (carbon flow) โดยเฉพาะวัฏจักร TCA
- 3.) รงควัตถุ (photosynthetic apparatus) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง

ระบบต่างๆ ทำงานสัมพันธ์กันต่อการผลิตไฮโดรเจน ในรูปแบบของการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน โปรตอน และ ATP [8]



ภาพที่ 2.1 กลไกการสร้างไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

ที่มา : Basak และ Das (2007)

2.2 เมแทบอลิซึมทางเลือกอื่น (Alternative modes of metabolism)

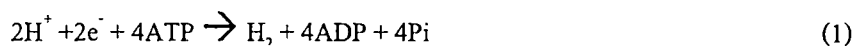
ดังที่กล่าวมาแล้วเกี่ยวกับจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ ซึ่งสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะการเจริญแบบใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน จึงนิยมเลี้ยงเชื้อในสภาวะนี้ จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถเจริญได้ในสภาวะต่างๆ ที่แตกต่างกัน ได้แก่ การหายใจแบบใช้ หรือ ไม่ใช้ออกซิเจน การหมัก (fermentation) และการใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานและใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (photoautotrophy) โดยทั่วไปแล้วสภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักให้แสง (photobioreactor) ต้องได้รับการควบคุมอย่างเหมาะสม และใช้ปัจจัยต่างๆ เพื่อให้การเจริญในสภาวะใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ประสบความสำเร็จ แต่บางกรณีของสภาวะการเลี้ยงเชื้ออาจทำให้ได้การเจริญที่ต่างออกไปอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ตัวอย่างเช่น การได้รับแสงในบริเวณที่ลึกเข้าไปในถังหมัก อาจไม่เพียงพอ [9-11] หรือการทดลองเลี้ยงเชื้อจากแสงอาทิตย์ อาจพบจุลินทรีย์ใช้เมแทบอลิซึมการหมัก [12] การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง *R. sphaeroides* ในสภาวะต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2.1 สภาวะเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องควบคุมการทดลองให้การเจริญในลักษณะอื่นๆ มีความเป็นไปได้น้อยที่สุด อีกทั้งต้องคำนึงถึงผลลัพธ์ที่ได้จากการทดลองในกรณีที่มีการเจริญเกิดการใช้เมแทบอลิซึมต่างๆ นอกเหนือไปจากการผลิตไฮโดรเจน

ตารางที่ 2.1 การเจริญแบบต่างๆ ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง *R. sphaeroides*

Mode of growth	Carbon source	Energy source	Notes and relation to hydrogen production	Example strains	Ref.
Photoheterotrophy	Organic carbon	Light	Preferred growth mode by PNS bacteria. Only mode resulting in hydrogen production.	O.U. 001	[4]
Photoautotrophy	Inorganic carbon (CO ₂)	Light	In the absence of organic carbon. Results in consumption of hydrogen.	2.4.1	[12]
Aerobic respiration (chemoheterotrophy)	Organic carbon	Organic carbon	In the presence of oxygen. Stops hydrogen production.	O.U. 001	[4]
Anaerobic respiration (chemoheterotrophy)	Organic carbon	Organic carbon	Under anaerobic, low light availability conditions. (Requires terminal electron acceptor other than O ₂ , such as nitrate). No hydrogen production. Marginal growth.	sp. denitrificans	[13]
Fermentation	Organic carbon	Organic carbon	Under anaerobic-dark conditions. No hydrogen production. Allows marginal growth.	ATCC 17023	[14]

2.3 การเจริญแบบต่างๆ ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง *R. sphaeroides*

การผลิตไฮโดรเจนสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase อย่างมาก ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นการสร้างไฮโดรเจนในสภาวะไม่มีโมเลกุลของไนโตรเจน แสดงในสมการที่ 1



ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase ขึ้นกับความต้องการพลังงาน ATP และสารพลังงานสูง ในปริมาณมาก ด้วยเหตุนี้การสังเคราะห์ และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จึงต้องได้รับการควบคุมบังคับอย่างยั้งขาด

สารยับยั้ง หรือสารกีดขวางการสร้าง ที่สำคัญได้แก่ ออกซิเจน ซึ่งสามารถทำลายเอนไซม์แบบแปรผันกลับไม่ได้ (เสียสภาพโดยสมบูรณ์) แอมโมเนียมและเกลือแอมโมเนียม มักนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ พบว่ามีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งที่สำคัญรองลงมา ทำให้เกิดการสร้าง และยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase [15, 16] เพียงความเข้มข้นระดับ 20 ไมโครโมลาร์ ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase ของเชื้อ *R. sphaeroides* ได้อย่างรวดเร็ว แต่การยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถแปรผันกลับได้ เนื่องจากจุลินทรีย์นำแอมโมเนียมไปใช้ หรือกำจัดออกไปจากระบบ ผลการยับยั้งอันเนื่องมาจากแอมโมเนียมมีระยะเวลายาวนานกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอมโมเนีย บางรายงานพบว่าการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* ในอาหารที่มี lactate และ glutamate เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน (ตามลำดับ) อาจเกิดการสร้างแอมโมเนียจาก glutamate ได้ เพราะมีการใช้ lactate หมดไปอย่างรวดเร็วขณะที่ยังคงเหลือ glutamate ในระบบ จึงทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase [3] ผลยับยั้งที่เกิดขึ้นสามารถนำมาใช้ปรับปรุงการเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมสัดส่วน malate ต่อ glutamate ให้มีค่าสูงกว่า 1.0 โดย Eroglu และคณะ [7] ใช้สัดส่วน 15 ต่อ 2 และ Sasikala และคณะ [5] ใช้สัดส่วน 30 ต่อ 2 ถึง 30 ต่อ 4 ในการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* สายพันธุ์ O.U. 001

โมเลกุลไนโตรเจน (ซึ่งนำมาใช้สังเคราะห์เอนไซม์ nitrogenase) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase ที่ใช้สร้างไฮโดรเจน การเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีก๊าซไนโตรเจน อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการตรึงก๊าซไนโตรเจน (N_2 -fixation) เพิ่มขึ้นอย่างมาก จึงไปลดการสร้างไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญ [18] แสงมีผลกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ nitrogenase อย่างมาก ซึ่ง

สอดคล้องกับการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* แบบต่อเนื่อง (continuous culture) โดยพบกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase เพิ่มขึ้น [19] นอกจากนี้การเปลี่ยนรูปแบบเวลาการให้แสง (ระยะมืดและสว่าง) ก็มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase มีความเสถียรมากขึ้น [20]

เอนไซม์ nitrogenase ในจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ ประกอบด้วยโมลิบดีนัม (molybdenum) ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อจึงต้องมีปริมาณสารโมลิบดีนัมที่เพียงพอต่อการนำไปใช้สังเคราะห์เอนไซม์ของเชื้อ *R. sphaeroides* [21] แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ก็สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ nitrogenase ชนิดอื่นๆ (ประกอบด้วยเหล็ก แทนที่จะเป็นโมลิบดีนัม) ที่ปราศจากโมลิบดีนัม ซึ่งอาจส่งผลให้คงตัวมากขึ้น

2.4 เอนไซม์ hydrogenase

เอนไซม์ hydrogenase พบได้ทั่วไปในกลุ่มจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง [22-24] ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ hydrogenase ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงมีความสามารถทั้งการผลิต และการนำไฮโดรเจน ไปใช้ ไฮโดรเจนที่จุลินทรีย์ผลิตได้มักมาจากการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase เป็นหลัก ขณะที่การทำงานของเอนไซม์ hydrogenase มีค่าน้อยมาก (ไม่นำมาพิจารณา) รายงานวิจัยประเมินค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase ของเชื้อ *R. capsulatus* [24, 25] ให้การผลิตไฮโดรเจนเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ของไฮโดรเจนทั้งหมดที่ถูกนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ hydrogenase เกิดขึ้นในสภาวะก่อนไปทางการนำไฮโดรเจนไปใช้เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase เป็นเมแทบอลิซึมตรงข้ามกับการทำงานของเอนไซม์ nitrogenase ซึ่งหน้าที่การนำไฮโดรเจนไปใช้ให้ความหมายตรงกับเอนไซม์ hydrogenase หรือ uptake hydrogenase [26] ยกเว้นจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ ได้แก่ *R. rubrum* ซึ่งมีรายงานค้นพบเอนไซม์ hydrogenase 3 ประเภท เช่น 1.) uptake hydrogenase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้ไฮโดรเจนระหว่างการเจริญในสภาวะให้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน 2.) formate linked hydrogenase ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นระหว่างการเจริญในสภาวะมีแสงน้อย และเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชัน formate เพื่อผลิตไฮโดรเจน และ 3.) carbon monoxide linked hydrogenase ซึ่งสังเคราะห์ในสภาพที่มีก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และควบคุมไปกับการออกซิเดชันคาร์บอนมอนอกไซด์เพื่อสร้างไฮโดรเจน [27]

นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมการใช้ไฮโดรเจนของเอนไซม์ hydrogenase ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์เมื่อเจริญในสภาวะให้แสงเป็นแหล่ง

พลังงาน และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน บางงานวิจัยพยายามสร้างจุลินทรีย์กลายพันธุ์ เพื่อกำจัดการสังเคราะห์เอนไซม์ hydrogenase ซึ่งมีผลทำให้การสร้างไฮโดรเจนมีประสิทธิภาพสูงขึ้น Ooshima และคณะ [28] ศึกษาจุลินทรีย์กลายพันธุ์ *R. capsulatus* ที่ขาดความสามารถในการสร้างเอนไซม์ hydrogenase (hup) ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ (wild type) ซึ่งเจริญในอาหารประกอบด้วย malate และ glutamate ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ และ 7 มิลลิโมลาร์ (ตามลำดับ) ทำให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์กลายพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ของสายพันธุ์พ่อแม่มีค่าเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ (การคำนวณประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์แสดงในสมการที่ 3 (หัวข้อ 2.5.2) Jahn และคณะ [29] พบจุลินทรีย์กลายพันธุ์ของ *R. capsulatus* ที่ให้ค่าประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งมีค่าเพียง 54 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเจริญในอาหารที่ประกอบด้วย malate และ glutamate เช่นกัน ส่วน Kern และคณะ [30] คัดแยกจุลินทรีย์กลายพันธุ์ (hup) จากเชื้อ *R. rubrum* ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์ จากเดิม 52 เปอร์เซ็นต์ เป็น 82 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารประกอบ lactate และ glutamate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ 7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ CO_2 และ O_2 ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ hydrogenase อย่างรุนแรง แต่เอนไซม์ hydrogenase มีความทนทานต่อออกซิเจนได้ดีกว่าเอนไซม์ nitrogenase เอนไซม์ hydrogenase มีนิกเกิล (nickel) เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นอาหารที่จำกัดปริมาณนิกเกิลอาจส่งผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เช่นกัน [31] ในสภาวะที่มีสาร ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA) มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase [30, 31]

การลดกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ hydrogenase ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง *R. rubrum* และ *R. capsulatus* พบเมื่ออยู่ในสภาพมีสารประกอบอินทรีย์ความเข้มข้นสูง ขณะที่การสังเคราะห์เอนไซม์ hydrogenase ของเชื้อ *R. sphaeroides* 2R พบในสภาพมีก๊าซไฮโดรเจน และอาจมีหรือไม่มี สารประกอบอินทรีย์ก็ตาม [24] ซึ่งเป็นไปได้ว่าการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 อาจถูกยับยั้งเพียงบางส่วนเมื่ออยู่ในบรรยากาศที่มีแต่ก๊าซไฮโดรเจน แต่กลับไม่พบการยับยั้งในเชื้อ *R. capsulatus* [32] และ *R. rubrum* [33] เมื่ออยู่ในสภาพเดียวกัน การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ nitrogenase และ hydrogenase แสดงในตารางที่ 2.2

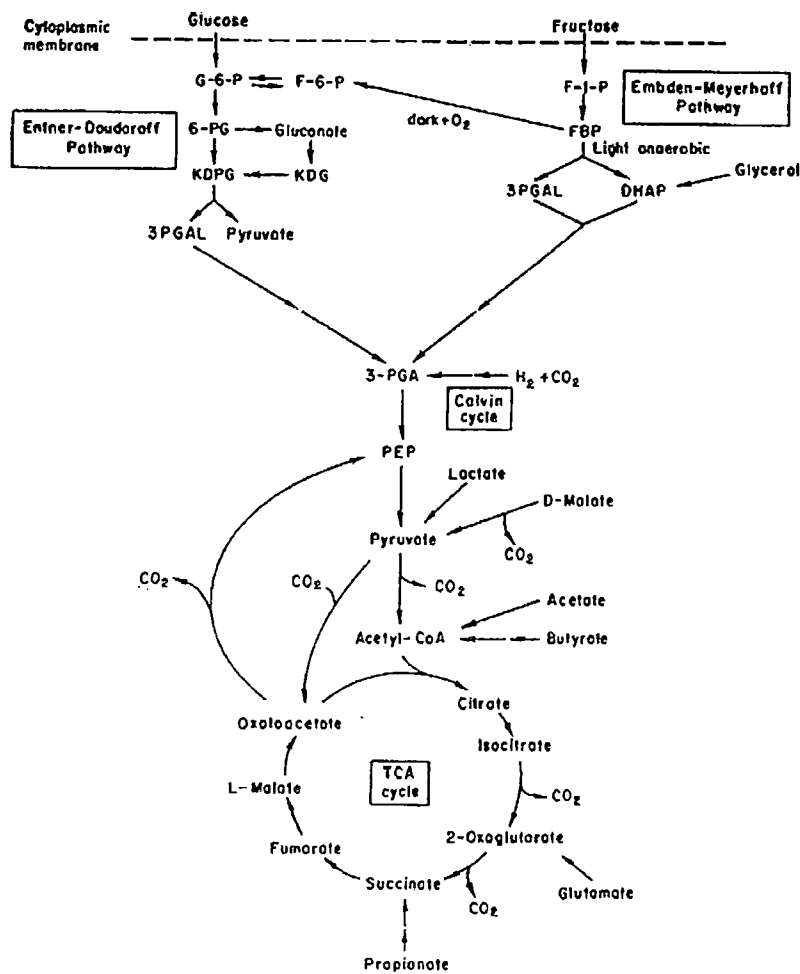
ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ nitrogenase และ hydrogenase

Property	Nitrogenase	Hydrogenase
Substrates	ATP, H ⁺ or N ₂ , electrons	H ₂
Products	H ₂ or NH ₄ ⁺	ATP, H ⁺ , electrons
Number of proteins	Two (Mo-Fe and Fe)	One
Metal components	Mo, Fe	Ni, Fe, S
Optimum temperature	30°C (<i>A. vinelandii</i>)	55°C (<i>R. rubrum</i>) 70°C (<i>R. capsulatus</i>)
Optimum pH	7.1-7.3 (<i>A. vinelandii</i>)	6.5-7.5 (<i>R. sphaeroides</i>)
Inhibitors, repressors	N ₂ (of H ₂ production only), NH ₄ ⁺ , O ₂ , High N to C ratio	CO, EDTA, O ₂ , presence of organic compounds
Stimulators	Light	H ₂ (<i>R. sphaeroides</i>) Absence of organic compounds (<i>R. rubrum</i> , <i>R. capsulatus</i>)

2.5 ลับสเตรท และการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอน (Substrates and carbon flow)

5.1. รูปแบบการเจริญ

จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์มีความสามารถที่ใช้ลัษสเตรทชนิดต่างๆ ทั้งแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ได้หลากหลาย วิธีการใช้สารอาหารมีช่วงกว้าง และอาจแตกต่างกันไปในสายพันธุ์เดียวกัน และ/หรือ แต่ละสายพันธุ์ ภาพที่ 2.2 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนในจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงไม่สะสมซัลเฟอร์สายพันธุ์ *R. sphaeroides* ซึ่งคัดแปลจากรายงานวิจัยต่างๆ [13, 34, 35] ดังนั้นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจสามารถนำมาเปรียบเทียบได้จากรูปแบบการใช้คาร์บอนนี้ ตัวอย่างเช่น D-malate และ L-glutamate มีแนวทางการใช้แตกต่างกัน glutamate ถือเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีมากต่อการผลิตไฮโดรเจน แต่ก็สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน ผลทดลองการใช้ glutamate เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เทียบกับการใช้ NH₄Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน ในเชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เมื่อเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน และใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน พบว่าเชื้อ *R. sphaeroides* สามารถใช้ glutamate เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างดี [12] ซึ่งเรียกกลไกนี้ว่าเมแทบอลิซึมภายใน endogenous metabolism และพบได้ทั้ง *R. rubrum* [36] และ *R. sphaeroides* [18] ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวส่งผลต่อปริมาณการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจน



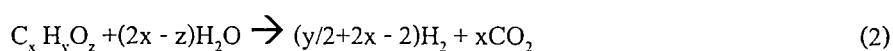
ภาพที่ 2.2 รูปแบบเมแทบอลิซึมคาร์บอนต่างๆ ที่พบในจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ [13, 34, 45]

ในสถานะที่สับสเตรมหมีคาร์ดิวิซมากกว่าสารภายในเซลล์ เช่น กรณิของ butyrate และ glycerol จึงจำเป็นต้องกำจัดอิเล็กตรอนที่มีปริมาณมากนี้ออกไปจากระบบ ซึ่งทำได้โดยอาศัยสภาพรีดักชันด้วยแสง (photoreduction) ของคาร์บอนไดออกไซด์ ดังการทดลองเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* เมื่อใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไม่มีการนำ glycerol ไปใช้ แต่เมื่อเติม malate ร่วมในอาหาร กลับพบการใช้ glycerol ในอัตราสูง [12] ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า malate เป็นแหล่งของคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลให้เกิดการใช้ glycerol [37]

การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ fixation) พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเมแทบอลิซึมทั้งหมดของเซลล์ในสภาพการเจริญแบบสังเคราะห์แสง แม้การเจริญนั้นจะเป็นแบบใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการศึกษาเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase และ oxygenase ซึ่งมีความสำคัญต่อการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นเมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์ *R. sphaeroides* [38] ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ทั้ง 2 ได้ พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ไม่สามารถเจริญทั้งในสภาพใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และใช้สารอินทรีย์ หรือสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อใช้สับสเตรทเป็น malate แต่เมื่อเติมตัวรับอิเล็กตรอน (dimethyl sulfoxide) ในอาหาร พบว่าเชื้อกลายพันธุ์กลับมาเจริญในสภาพใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน

2.5.2. สับสเตรทสำหรับการผลิตไฮโดรเจน

สับสเตรทชนิดต่างๆ สามารถนำมาใช้เพื่อการเจริญ แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสามารถทำได้ 2 แนวทางเพื่อการใช้สับสเตรทจำเพาะ ได้แก่ แนวทางที่ 1. อัตราการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเป็นการวัดความเร็วการผลิตไฮโดรเจนต่อหนึ่งหน่วยเวลา เมื่อเทียบกับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ส่วนแนวทางที่ 2. สัมประสิทธิ์การเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งวัดปริมาณสับสเตรทที่ถูกนำไปใช้เพื่อผลิตไฮโดรเจน (ไม่ใช่เพื่อการเจริญ หรือสังเคราะห์สารอื่น) แสดงเป็นสัดส่วนโมลไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นจริง เทียบกับปริมาณที่ได้ทางทฤษฎี ที่ใช้สับสเตรททั้งหมดไปเพื่อสร้างไฮโดรเจน (และคาร์บอนไดออกไซด์) ดังแสดงในสมการที่ 2 [39]



โดยแสดงออกในรูปของเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์การเปลี่ยนสับสเตรท แสดงในสมการที่ 3

$$\% \text{Substrate conversion efficiency} = 100 (\text{actual hydrogen/theoretical hydrogen}) \quad (3)$$

ตารางที่ 3 แสดงอัตรา และเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์การเปลี่ยนสับสเตรท จากงานวิจัยศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสับสเตรทชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจากธรรมชาติ เทียบกับเชื้อ *R. sphaeroides* (40) นอกจากนี้ตารางที่ 2.3 ยังแสดงพารามิเตอร์ที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ อายุเชื้อ การเจริญที่ผ่านมา องค์กรประกอบอาหารพื้นฐาน (basal medium) และรูปร่างถังหมัก

ตารางที่ 2.3 แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ

Organism	Carbon source	C/N source* (mM/mM)	Gas production parameters				Photobiosensor parameters				Ref.
			Conv. eff. ^b (%)	Max. rate (ml/g _{dw} /h)	Max. rate (l/h)	Duration (h)	Temp (°C)	Light source & intensity	Culture volume (l)	Operation/ cell state	
Rhodospirillum rubrum 8604	Butyrate	24:10	44	70 ^c	n/a	n/a	30	Tungsten	0.012	Batch/	[40]
	Lactate	40:10	66	89			10 klux	0.012 (gel)	immobil.		
	Acetate	60:10	93	11							
<i>R. monas</i> 2613	Butyrate	24:10	65	43							
	Lactate	40:10	72	59							
	Acetate	60:10	67	69							
<i>R. capsulatus</i> Z1	Glucose	30:7	32	88	n/a	n/a	35	Lumiline	0.060	Batch/	[3]
	Fructose		27	100			10.8 klux		growing		
	Sucrose		06	60							
	Lactate		72	130							
	Pyruvate		68	130							
	Malate		56	96							
	Succinate		72	100							
	Propionate		—	40							
	Butyrate		—	20							
<i>R. sphaeroides</i> (Berkeley collection)	Glucose	20:13 ^d	24	5.5 ^e	0.0126 ^f	115	27	Incand. 8 klux	0.025	Batch/	[41]
<i>R. sphaeroides</i> B5	Lactate	50:5	55	138	0.0183 ^g	242	30	n/a 10 klux	0.70	Batch/	[42]
<i>R. monas</i> sp. HCC 2037	Acetate	22:0.8	73	43 ^e	0.025	200	30	Tungsten/ halogen ^h	0.150	Batch/	[6]
			15	14 ^e	0.002		145 W/m ²		growing		
<i>R. sphaeroides</i> RV	Acetate	16.3:10	40	37	117 ^f	285	30	Tungsten	0.010	Batch/	[43]
	Lactate	52.5:10	46	145	251 ^f		10 klux	0.010 (gel)	immobil.		
	Butyrate	46.2:10	75	265	604 ^g						
<i>R. sphaeroides</i> RV	Lactate	50–100/ ^h 4.7 ^b	50–80	75	0.0366 ^e	n/a	30	Tungsten 10 klux	1	Cont. (2 stages)/	[44]
<i>R. sphaeroides</i> RV	Lactate	50:10	42	0.0422 ^e	n/a	100	30	Tungsten 107 W/m ²	11	Batch	[45]

หมายเหตุ n/a = ไม่แสดง; % conv. eff. = สัมประสิทธิ์การเปลี่ยนสับสเตรท; Max. = อุณหภูมิสูงสุด; Flu. = fluorescent

a สัดส่วนโมลแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนกลูตามต (นอกจากกำหนดเป็นแหล่งไนโตรเจนอื่น)

b อธิบายตามสมการที่ (3)

c จำนวนตามข้อมูลที่แสดงในเอกสารอ้างอิง โดยกำหนดให้ความดัน = 1 atm

d รวม 0.2% (w/v) ซีตัสสาคัดเป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าเท่ากับ 13 mM ของธาตุไนโตรเจน [12]

e กำหนดต่อกรัมโปรตีนของเอกสารอ้างอิง

f ค่าเริ่มต้น 680 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ เท่ากับ W/m^2 โดยใช้สัดส่วน $1 \text{ W/m}^2 = 4.7 \text{ mol photons/m}^2/\text{s}$ อ้างอิงตาม Rocha et al. [40]

g กำหนดหน่วยของ $\mu\text{M/h}/\text{cm}^2$ พื้นที่ที่ได้รับแสง

h ประมาณค่า 0.5 g/l ซีตัสสาคัด เท่ากับ 3.2 mM ธาตุไนโตรเจน

ผลจากตารางที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่าสับสเตรทที่เหมาะสม ได้แก่ กรดอินทรีย์ที่แสดง ประจุลบ เช่น malate และ lactate ส่วนน้ำตาล เช่น glucose และ sucrose ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนนัก แต่ความเหมาะสมของสารอาหารอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามสายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น Macler และคณะ [42] คัดแยกเชื้อกลายพันธุ์ *R. sphaeroides* ที่

สามารถเปลี่ยนน้ำตาล glucose ไปเป็นไฮโดรเจนได้ใกล้เคียงตามทฤษฎี โดยให้อัตราเร็วการสร้างไฮโดรเจนใกล้เคียงกับการใช้ malate หรือ lactate Kim และคณะ [43] คัดเลือกเชื้อ *R. sphaeroides* K7 จากธรรมชาติ (สายพันธุ์พ่อแม่) ที่สามารถสร้างไฮโดรเจนจาก glucose และให้อัตราการผลิตเช่นเดียวกับการใช้ malate หรือ lactate การผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์เป็นผลจากการทำงานเกี่ยวข้องกับวัฏจักร TCA ในสภาพไม่มีออกซิเจน และได้รับแสง ซึ่งค้นพบครั้งแรกโดย Gest และคณะ [29] ในเชื้อ *R. rubrum* เมื่อเอนไซม์ nitrogenase ถูกยับยั้งหรือลดการสร้าง ทำให้กิจกรรมของวัฏจักร TCA ถูกจำกัดอย่างรุนแรง จึงเปลี่ยนไปใช้วิธีอื่น ได้แก่ การสังเคราะห์น้ำตาลพอลิเมอร์ (polysaccharide) ซึ่งผลกระทบบ่อยๆ กันนี้อาจเกิดขึ้นเมื่อสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน มีค่าต่ำ จึงเกิดการสะสมแอมโมเนียและนำไปสู่การยับยั้งเอนไซม์ nitrogenase

อายุของเชื้อ และการเจริญที่ผ่านมา มีผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจน Koku และคณะ [12] พบว่าการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อเริ่มต้น (inoculum) ที่อยู่ในระยะ stationary phase ให้ผลผลิตน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการใช้เชื้อเริ่มต้นที่อยู่ในระยะ exponential phase โดยใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อเดียวกัน Sasikala และคณะ [47] รายงานผลคล้ายกันเมื่อใช้เชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 ที่อยู่ในระยะพักตัว (resting cell) Hillmer และ Gest [32] ใช้เซลล์ระยะพักตัวของเชื้อ *R. capsulatus* ที่ได้จากการเจริญในอาหาร malate fumarate และ succinate เพื่อนำมาใช้ผลิตไฮโดรเจนจากอาหารที่มีสับสเตรทองค์ประกอบเต็ม หรือจาก lactate หรือ pyruvate ได้เป็นอย่างดี แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าเซลล์ระยะพักตัวที่ได้จากการเจริญในอาหาร lactate pyruvate หรือ glycerol เพื่อมาใช้ผลิตไฮโดรเจนในอาหารที่มีสับสเตรทเป็น malate fumarate หรือ succinate กลับไม่ผลิตไฮโดรเจน สามารถอธิบายได้ว่าการใช้สับสเตรทที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (ได้แก่ malate) สัมพันธ์กับการสร้างระบบกระตุ้นการนำไปใช้ แต่การเจริญด้วยสับสเตรทที่มีคาร์บอน 3 อะตอม (ได้แก่ lactate หรือ pyruvate) กลับไม่พบระบบการส่งผ่านดังกล่าว

2.5.3. ความสัมพันธ์ของการผลิตไฮโดรเจนและการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate

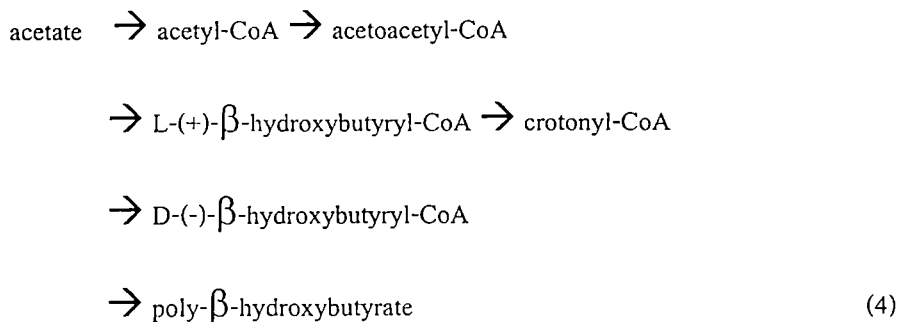
เมแทบอลิซึมทางเลือกอื่นๆ นอกเหนือจากการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ การผลิต poly- β -hydroxybutyrate เพื่อเก็บสะสมอาหาร จัดว่ามีความสำคัญต่อบทบาททางสรีรวิทยาใกล้เคียงกับการผลิตไฮโดรเจน ในเชิงการกำจัดพลังงาน และสารพลังงานสูง ที่มีมากเกินไปความต้องการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate มีความสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการ เนื่องจาก poly- β -hydroxybutyrate มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพราะเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายทางชีวภาพ อีกทั้งยัง

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ (by-product) ในระหว่างการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 [47]

การแบ่งสรรปันส่วนเมแทบอลิซึมระหว่างการผลิตไฮโดรเจน และการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate สัมพันธ์กับชนิดของสับสเตรท Hustede และคณะ [50] ทดลองเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* กลายพันธุ์ ที่ขาดความสามารถสร้าง poly- β -hydroxybutyrate พบว่าการสร้างไฮโดรเจนไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสับสเตรท malate lactate และ succinate ซึ่งเป็นแหล่งผลิตไฮโดรเจนคุณภาพสูง ในทางตรงกันข้ามพบว่าการใช้ acetate เป็นสับสเตรท ให้ผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะ acetate มีประสิทธิภาพสูงต่อการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate แต่เป็นสับสเตรทที่ไม่ดีต่อการผลิตไฮโดรเจน ทำให้เชื้อกลายพันธุ์มีค่าสัมประสิทธิ์การเปลี่ยน acetate ไปเป็นไฮโดรเจน เพียงแค่ 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่จึงพบการใช้ acetate เพิ่มขึ้น 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปสะสมเป็น poly- β -hydroxybutyrate ภายในเซลล์ แต่ไม่พบการสร้างไฮโดรเจน

พีเอชเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate เชื้อ *R. sphaeroides* ที่คัดแยกจากธรรมชาติ เมื่อนำมาเลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อป้องกันสภาวะเป็นด่าง พบว่าให้การผลิตไฮโดรเจนมากกว่าการสร้าง poly- β -hydroxybutyrate [49] Khatipov และคณะ [51] พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอชเริ่มต้นจาก 6.8 เป็น 7.5 ทำให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 7 เท่า ขณะที่การสะสม poly- β -hydroxybutyrate เพิ่มขึ้นเพียง 3 เท่า

การสังเคราะห์ poly- β -hydroxybutyrate จาก acetate อธิบายได้โดยอาศัยวิถีที่พบในเชื้อ *R. rubrum* [52] ดังสมการที่ 4 แบบแผนดังกล่าวใกล้เคียงกับการใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ แสดงให้เห็นว่าสับสเตรททั่วไปสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารกลุ่ม acetyl โดยไม่สร้าง pyruvate เช่น acetate และ butyrate ให้ผลิตภัณฑ์หลักคือ poly- β -hydroxybutyrate [53]



2.5.4. การใช้สับสเตรทเชิงซ้อนเพื่อผลิตไฮโดรเจน

การใช้สับสเตรทเชิงซ้อนชนิดต่างๆ นำไปสู่ความเป็นไปได้ต่อการประยุกต์ใช้น้ำเสีย (waste water) เป็นแหล่งอาหาร และใช้พิจารณาถึงความสำคัญของการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ ในระดับอุตสาหกรรม ความรู้เกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของสับสเตรทเชิงซ้อนยังมีรายงานเพียงเล็กน้อย แต่งานวิจัยศึกษาผลิตไฮโดรเจนจากน้ำเสียมียังมีจำนวนมาก

Turkarlan และคณะ [54] เลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 ในน้ำเสียจากโรงงานนม ซึ่งไม่พบการเจริญเมื่อนำน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อนำมาใช้ร่วมกับ malate พบการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นอย่างมาก อีกทั้งระยะ lag phase ของการผลิตไฮโดรเจนมีเวลาสั้นลง

Yetis และคณะ [55] ใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตไฮโดรเจน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ Turkarlan และคณะ [53] โดยไม่พบการเจริญ และการผลิตไฮโดรเจนมีค่าน้อยมาก แม้ใช้น้ำเสียที่ความเข้มข้นลดลง แต่เมื่อนำน้ำเสียมาเจือจางเหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วผสมร่วมกับ malate พบว่าการผลิตไฮโดรเจนมีอัตราเท่ากับการใช้ malate เพียงชนิดเดียว อีกทั้งระยะ lag phase ของการผลิตไฮโดรเจนมีเวลาสั้นลงเช่นกัน ขณะที่การเจริญมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล sucrose ในอาหารชุดควบคุม พบว่าให้การผลิตไฮโดรเจนน้อยกว่าการใช้น้ำตาล sucrose ผสมกับน้ำเสีย อาจเป็นไปได้ว่าสับสเตรทชนิดอื่นนอกเหนือจาก sucrose (ซึ่งอยู่ในน้ำเสียจากโรงงาน) สามารถเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว

Zhu และคณะ [56] ใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตเด้าหู้เลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* RV ที่ตรึงเซลล์ในวุ้น พบการสร้างไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น และสามารถกำจัดอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมดได้ถึง 41 เปอร์เซ็นต์

Sasikala และคณะ [57] ใช้น้ำเสียกรด lactic acid จากโรงหมัก เพื่อผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 ซึ่งให้การผลิตไฮโดรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ของน้ำเสียจากโรงงานที่นำมาเจือจางด้วยน้ำประปา

Eroglu และคณะ (58) นำน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมัน olive มาเจือจาง เพื่อใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากเชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 พบอัตราการเจริญของเชื้อที่

ความเจือจางต่างๆ ตั้งแต่ 1-20 เปอร์เซ็นต์ แต่การผลิตไฮโดรเจนพบเมื่อใช้ความเจือจางต่ำกว่า 4 เปอร์เซ็นต์

แนวทางเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรมสามารถทำได้ โดยนำน้ำเสียมากระทำการบางอย่างก่อนนำไปใช้ (pretreatment) เช่น การหมักเพื่อให้ความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้สับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน (ได้แก่ lactic acid) Fascetti และคณะ [59] นำมาใช้ในงานวิจัยจนประสบความสำเร็จ เริ่มจากนำน้ำเสียมาหมักให้เป็นกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ของแข็งในน้ำเสียจากบ้านเรือนถูกย่อยสลาย (ผัก-ผลไม้จากตลาดสด) ไปเป็นกรดอินทรีย์ เมื่อผ่านการย่อยสลายทำให้ได้สารละลายผสมที่มี lactic acid ปริมาณมาก และมี acetic acid เพียงเล็กน้อย จากนั้นจึงนำมาเจือจางเพื่อใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตไฮโดรเจนที่อัตราสูงด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 1 ลิตร ผลการวิจัยต่างๆ นำมาสรุป และแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 รายงานการวิจัยใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตไฮโดรเจน

Waste water source+ additives	Strain	Gas prod. rate (ml/ml.h)	Gas prod. rate (ml/gcell/h)	Yield (ml gas/mlWW)	Wastewater %	Ref.
Dairy plant +malate	O.U. 091	0.0055	5.9	2	30	[53]
Sugar refinery +malate	O.U. 001	0.0043	5.0	8.6	20	[54]
Tofu factory Lactate	RV O.U.	0.059	91	1.9	100	[55]
ferment. plant	O.U. 001	0.0050	1.5	4.5	5-100	[56]
Olive mill	O.U.	0.0035	7.5	13.9	2	[57]
WW	001	0.0095	26	9.8	1	
Municipal solid waste	RV	n/a	100	n/a	10	[58]

2.6 รังควัตถุสังเคราะห์แสง และสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแสง (The photosynthetic apparatus and light conversion efficiency)

2.6.1. รังควัตถุสังเคราะห์แสง

พลังงานมีความจำเป็นสำหรับกิจกรรมการเจริญเช่นไร ก็จำเป็นต่อกิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนเช่นกัน ซึ่งได้รับมาจากรงควัตถุสังเคราะห์แสง โดยทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานแสงให้อยู่ในรูปพลังงานพันธะเคมี (ATP) รังควัตถุสังเคราะห์แสงประกอบด้วยโปรตีนเชิงซ้อนเรียงตัว

ตามแนวเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane protein complexes) และเอนไซม์ ATPase เชิงซ้อน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP จากความต่างศักย์โปรตอน (proton gradient) สารประกอบดูดซับพลังงานแสง (light harvesting complex) ได้แก่ LH1 และ LH2 ทำหน้าที่รับพลังงานแสง แล้วส่งไปยังบริเวณเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อน (reaction complex) ซึ่งเป็นจุดเริ่มการเคลื่อนไหลของอิเล็กตรอนไปยังตัวรับ (carrier) ชนิดต่างๆ ส่งผลให้เกิดการสร้างความต่างศักย์โปรตอนขึ้นตอนสุดท้ายเอนไซม์ ATPase อาศัยความต่างศักย์โปรตอนนี้มาสร้างพลังงานในรูปของ ATP [60, 61]

ออกซิเจนเป็นตัวบังคับหลักในการสังเคราะห์รงควัตถุสังเคราะห์แสง สภาวะที่มีโมเลกุลออกซิเจนจะไปกีดการสังเคราะห์โมเลกุล bacteriochlorophyll อย่างรวดเร็ว ผลกระทบนี้สามารถผันกลับได้เมื่อความเข้มข้นออกซิเจนลดลง ทำให้กระบวนการสังเคราะห์เริ่มต้นอีกครั้ง

แสงก็มีส่วนในการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์โมเลกุลรงควัตถุเช่นกัน แต่มีผลกระทบน้อยกว่าออกซิเจน เมื่ออยู่ในสภาวะไร้อากาศพบว่าปริมาณเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์มีการผลิตซึ่งแปรผกผันกับปริมาณความเข้มแสง [60] การสังเคราะห์ยังคงดำเนินต่อไปเมื่ออยู่ในที่มืด แต่ถ้านำไปเลี้ยงเชื้อใหม่ พบว่าการสังเคราะห์ bacteriochlorophyll 1 หดไป [62]

จากมุมมองการผลิตไฮโดรเจน แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการรักษาระดับการเปลี่ยนแปลง ATP (ATP flux) ภายในเซลล์ให้มีความต้องการของเซลล์เพื่อใช้สำหรับการเจริญ และทำให้การทำงานของเอนไซม์ nitrogenase อยู่ในระดับสูงพอ ความเข้มแสงมีความสำคัญต่อการรักษากิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase ให้สูงสุด จึงจำเป็นควรพิจารณาให้มีค่าสูงกว่าความต้องการเพื่อการเจริญ ตัวอย่างเช่น Sasikala และคณะ [47] พบว่าผลได้มวลชีวของเชื้อ *R. sphaeroides* O.U.001 มีค่าคงที่ในอาหาร malate เมื่อเจริญภายใต้แสงความเข้ม 3000 ลักซ์ แต่ตรงข้ามกับการผลิตไฮโดรเจนจะมีค่าคงที่เมื่อเจริญภายใต้ความเข้มแสงสูงกว่า 5000 ลักซ์

ปัญหาการให้ปริมาณความเข้มแสงที่เพียงพอต่อความต้องการ ถือเป็นอุปสรรคสำคัญสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพราะการบังแสงกันเองของเซลล์จุลินทรีย์ (self-shading effect) ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ มีค่ามากขึ้นเมื่อขยายขนาดถังหมักเพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้น แม้ว่าการผลิตไฮโดรเจนมีค่าคงที่ที่ระดับความเข้มแสงต่ำถึงปานกลาง [45, 47] แต่ถ้าใช้ความเข้มแสงสูงมากๆ ก็ส่งผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนเช่นกัน Macler และคณะ [42]

พบว่าการผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อใช้แสงความเข้มสูงกว่า 40 กิโลลักซ์ สอดคล้องกับการทดลองเลี้ยงเชื้อภายใต้แสงอาทิตย์ [63]

2.6.2. สัมประสิทธิ์การเปลี่ยนพลังงานแสง (Light conversion efficiency)

สัมประสิทธิ์การเปลี่ยนพลังงานแสง จัดเป็นพารามิเตอร์สำหรับบ่งชี้ประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นที่ยอมรับในวงกว้างเพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบกระบวนการ คำนวณจากสัดส่วนพลังงานทั้งหมด (ความร้อนจากการเผาไหม้) ของไฮโดรเจนที่ได้รับ ต่อพลังงานทั้งหมด (ในรูปของแสง) ที่ใช้ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแสง คำนวณได้ดังสมการที่ 5 [64]

$$\eta (\%) = [33.61 \times \rho_{H_2} \times V_{H_2}] / [I \times A \times t] \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ V_{H_2} คือปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (ลิตร) ρ_{H_2} คือความหนาแน่นของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร) I คือความเข้มแสง (วัตต์ต่อตารางเมตร) A คือพื้นที่ที่ได้รับแสง (ตารางเมตร) และ t คือระยะเวลาการผลิตไฮโดรเจน (ชั่วโมง)

ตารางที่ 2.5 แสดงสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแสงเป็นไฮโดรเจนที่นำมาจากรายงานวิจัยต่างๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยของสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแสงอยู่ในช่วง 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่ารังควัดดูสังเคราะห์แสง และโปรตีนที่เหมาะสมต่อกระบวนการเปลี่ยนพลังงานที่อยู่ในรูปของแสง อาจทำให้ประสิทธิภาพการนำแสงไปใช้ มีค่าสูงขึ้น [64]

ตารางที่ 2.5 รายงานแสดงสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแสงเป็นไฮโดรเจนของเชื้อ *R. sphaeroides*

R. sphaeroides strain	Carbon source	Light source	Light intensity (W/m ²)	Light conversion efficiency ^a (%)	Ref.
RV	Lactate	Solar simulator (filtered tungsten)	107 62	3.9 4.2	[45]
8703	Lactate	Solar simulator (filtered Xenon)	75 1000	6.2 1.9	[63]
		Xenon	50 1000	7.9 2.1	
RV	Lactate	Halogen	300	9.23	[65]
RV	Lactate	Sunlight	1000 (Max.)	2.2	[66]
RV	Lactate	Sunlight	490 ^c (Average)	1.5	[62]
O.U. 001	Malate	Tungsten	200	0.76 ^b	[4]
O.U. 001	Malate	Tungsten	200	0.72 ^b	[7]
O.U. 001	SRWW+ malate	Tungsten	200	0.36 ^b	[54]
O.U. 001	Malate	Tungsten cont. illumination light/dark cycles (L:D = 14 h/10 h)	200	0.21 ^b 0.62 ^b	[11]
O.U. 001	Olive Mill wastewater	Tungsten	200	0.70 ^b	[57]
O.U. 001	Malate	Sunlight	470 ^c (Average)	0.45 ^b	[10]
O.U. 001 ^d	Malate	Tungsten	200	4.08 ^b	[64]

^a คำนวณด้วยสมการที่ 5

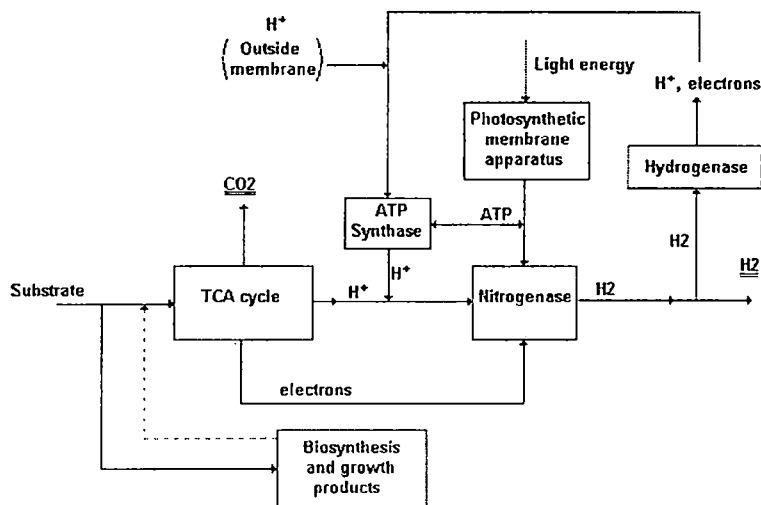
^b คำนวณด้วยสมการ [63]

^c ควบคุมกับ Bacteriorhodopsin

SRWW หมายถึงน้ำเสียจากโรงงานน้ำตาล

2.7 แบบแผนการผลิตไฮโดรเจน

รูปแบบต่างๆ ของการผลิตไฮโดรเจนแสดงในภาพที่ 2.3 สับสเตรคคาร์บอนส่งเข้าไปยังวัฏจักร TCA ซึ่งถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และอิเล็กตรอน โดยการทำงานจะเกิดขึ้นไปพร้อมๆ กับรงควัตถุสังเคราะห์แสงที่เชื่อมเซลล์รับและเปลี่ยนพลังงานแสงไปเป็น ATP ATP ที่ได้รับจะส่งต่อไปยังเอนไซม์ nitrogenase พร้อมกับโปรตอนและอิเล็กตรอน ขณะเดียวกันก็ได้รับโปรตอนบางส่วนจากวัฏจักร TCA ด้วยเช่นกัน สำหรับส่วนที่เหลือก็นำไปใช้เพื่อผลิตพลังงานด้วยเอนไซม์ ATP-synthase ซึ่งพบในรงควัตถุที่มีกิจกรรมสังเคราะห์แสง ขั้นตอนสุดท้ายพบว่าเอนไซม์ nitrogenase จะรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์ hydrogenase ทำหน้าที่หลักเกี่ยวกับการใช้ไฮโดรเจน ผลิต ATP โปรตอน และอิเล็กตรอน ปริมาณสุทธิของไฮโดรเจนที่ผลิตได้มาจากผลต่างของการผลิตจากกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase ลบด้วยการใช้จากกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase



ภาพที่ 2.3 แบบแผนการผลิตไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงไม่สะสมซัลเฟอร์

การส่งอิเล็กตรอนจากวัฏจักร TCA ไปยังเอนไซม์ nitrogenase ปฏิกริยาออกซิเดชัน และรีดักชันของตัวรับ-ส่งอิเล็กตรอน (electron carrier) ได้แก่ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) และ ferredoxin (Fd) ซึ่งสมมุติฐานการส่งผ่านอาจเป็นดังนี้ [22]

Substrate \rightarrow TCA-cycle \rightarrow NAD / NADH

\rightarrow (Fd)_{ox} / (Fd)_{red} \rightarrow Nitrogenase (6)

วิธีการใช้สับสเตรทจะใช้เส้นทางอื่น เพื่อสังเคราะห์ต่างๆ สำหรับการเจริญ ซึ่งอาจร่วมไปถึงวิธีการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์อื่นๆ (ได้แก่ poly- β -hydroxybutyrate เพื่อสะสมอาหาร) ที่สามารถนำมาใช้ในการย่อยสลายด้วยเมแทบอลิซึมภายในต่อไป เอนไซม์ ATP-synthase อาจเป็นส่วนหนึ่งที่พบในรงควัตถุสังเคราะห์แสง ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยาระหว่างการสร้าง ATP จากศักย์โปรตอน หรือสร้างศักย์โปรตอนจากการใช้ ATP

2.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และการปรับปรุงกระบวนการ

2.8.1. สภาวะที่ต้องการเพื่อผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

จากความรู้พื้นฐานที่แสดงรูปแบบการผลิตไฮโดรเจนในภาพที่ 2 สามารถสร้างสภาวะที่ต้องการเพื่อผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ได้ดังนี้

1.) กิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase มีค่าสูงสุด และจำกัดกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ให้มีค่าต่ำสุด

2.) การใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน หรือผลิตภัณฑ์อื่น (ได้แก่ poly- β -hydroxybutyrate สับสเตรทในกลุ่มนี้ได้แก่ lactate หรือสารตัวกลางที่พบในวัฏจักร TCA เช่น malate และ succinate

3.) สัดส่วนโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่เหมาะสม

4.) ความต้องการแสง ทั้งในด้าน การกระจาย ความเข้มแสงที่คงที่ระหว่าง การเลี้ยงเชื้อ และปริมาณเชื้อหุ้มเซลล์ของส่วนสังเคราะห์แสงที่เพียงพอและพอเหมาะต่อการเปลี่ยนพลังงานแสงเป็น ATP สำหรับความต้องการในกิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase

5.) บังคับควบคุมการเจริญให้เป็นรูปแบบที่ต้องการ ไม่เปลี่ยนเป็นการเจริญทางเลือกอื่น ได้แก่ การหมัก หรือการหายใจแบบไร้อากาศ

6.) ควบคุมปัจจัยให้เหมาะสม ได้แก่ อายุเชื้อ เป็นต้น

2.8.2. การปรับปรุงพันธุกรรม (Improvement through genetic manipulation)

การเพิ่มศักยภาพการผลิตไฮโดรเจน สามารถทำได้ทั้งแนวทางการศึกษา และปรับปรุงสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญทางสรีรวิทยาไปแล้ว และแนวทางการตัดแปรสายพันธุ์ ด้วยการปรับแต่งพันธุกรรม เช่น กระบวนการพันธุวิศวกรรม

การปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงเพื่อให้ขาดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase (ดังแสดงในภาพที่ 2) ซึ่งแนวทางนี้สามารถเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน แต่การกำจัดกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase สามารถทำได้ง่ายๆ โดยการใช้สารเคมีบางชนิด เพื่อ

ประเมินผลได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น Fissler และคณะ [31] พบว่าการผลิตไฮโดรเจนยังคงเท่าเดิม หลังจากใช้สารเคมีเพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase ลงจากเดิม 15 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกัน Kern และคณะ [30] ทดสอบการเลี้ยงจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจากธรรมชาติ พบว่าการใช้สารเคมียับยั้งหรือลดกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ทำให้สัมประสิทธิ์การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นไฮโดรเจนมีค่าเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการศึกษาขั้นต่อไปเกี่ยวกับการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ hup- ถือเป็นสิ่งที่สมควรกระทำต่อไป

การลดกระบวนการสังเคราะห์ poly- β -hydroxybutyrate อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งเพื่อเพิ่มสัดส่วนสับสเตรทไปใช้ในขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจน ถ้าทำให้การสังเคราะห์ poly- β -hydroxybutyrate เกิดขึ้นแค่เพียงพอ หรือไม่เกิดขึ้น (ภาพที่ 2.3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้สับสเตรทชนิดเดียวกับที่สามารถนำไปใช้ผลิต poly- β -hydroxybutyrate (เช่น acetate) จึงจำเป็นต้องลดกระบวนการสังเคราะห์ poly- β -hydroxybutyrate เพื่อนำไปเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจน [50]

การตัดแปลงรงควัตถุสังเคราะห์แสงเพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดซับ หรือรับพลังงานแสง สามารถทำได้ด้วยการปรับปรุงพันธุกรรม Kondo และคณะ [68] คัดแยกเชื้อ *R. sphaeroides* กลายพันธุ์ที่มีปริมาณรงควัตถุสังเคราะห์แสงเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธุ์พ่อแม่ ทำให้การรับพลังงานแสงลดลงในทุกความยาวคลื่นแสงระหว่าง 350 – 1000 นาโนเมตร แต่กลับให้การผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Melis และคณะ [69] ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นอย่างมากของเม็ดสี (pigment) ในสาหร่ายสีเขียว ทำให้ปริมาณและขนาดของคลอโรพิลลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาถึงการสร้างจุลินทรีย์กลายพันธุ์เพื่อมุ่งลดปริมาณเม็ดสี จำเป็นต้องให้ความสำคัญและประเมินถึงการเกิด และช่วงระยะเวลาของการยับยั้งด้วยแสง (photoinhibition) ระหว่างการผลิตไฮโดรเจนในขณะที่ได้รับแสงความเข้มสูง เม็ดสีโดยเฉพาะ carotenoid ที่พบในจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไมโซแซลเฟอร์ ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันผลกระทบที่รุนแรงของแสง และป้องกันเซลล์ให้ทนต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของแสง (photo-oxidation)

ก่อนตัดแปลง หรือปรับปรุงพันธุ์ จำเป็นต้องตระหนักถึงข้อเท็จจริงที่เชื่อถือได้ และทราบถึงขั้นตอนจำกัด (limiting step) หรือสภาวะคอขวด (bottleneck) จากนั้นจึงเพิ่มโอกาส หรือลดข้อผิดพลาดในด้านเมแทบอลิซึมทางสรีรวิทยาทั้งหมด

ตัวอย่างการบ่งชี้ถึงขั้นตอนจำกัดในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแสดงในรายงานของ Klemme [26] ซึ่งศึกษาอัตราสูงสุดภายในเซลล์ (maximum cellular rate) ของการผลิต ATP ระหว่างที่ได้รับแสงเต็มที่ เทียบกับความต้องการ ATP ต่ำสุดสำหรับการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงกลุ่มไม้อะสมซัลเฟอร์ (*R. rubrum*, *R. capsulatus* และ *R. sphaeroides*) ผลการคำนวณพบว่าเอนไซม์ nitrogenase ของเชื้อ *R. rubrum* มีความต้องการ ATP ใกล้เคียงปริมาณ ATP ที่เซลล์ผลิตได้สูงสุด แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงพันธุ์ควรกระทำในส่วนการสร้าง ATP อย่างเหมาะสม และให้การไหลของอิเล็กตรอนมุ่งไปยังเอนไซม์ nitrogenase ขณะที่เอนไซม์ของเชื้อ *R. sphaeroides* และ *R. capsulatus* มีความต้องการ ATP ต่ำกว่าปริมาณ ATP ที่เซลล์ผลิตได้ทั้งหมด แสดงว่าการผลิตไฮโดรเจนไม่ได้รับผลกระทบจากข้อจำกัดของพลังงาน ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์จึงควรเน้นไปที่ปรับปรุงกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase

2.9 การขยายกำลังการผลิตไฮโดรเจน

วัตถุประสงค์สุดท้ายของการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงอยู่ที่การดำเนินการในระดับอุตสาหกรรมภายใต้แสงธรรมชาติ มีเพียงงานวิจัยส่วนน้อยที่ประสบความสำเร็จต่อการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง [11, 46, 70] ปัญหาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินการของดังหมักใช้แสงในระดับอุตสาหกรรม หรือแม้แต่สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักขนาดเล็ก และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อที่ใช้ในระบบ ได้แก่ ความต้องการแสง การบ่งแสง ระยะเวลาได้รับและไม่ได้รับแสง ปริมาณและความต้องการสัณสเตรท และการผสมผสานในถังหมัก เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างน้ำทิ้ง และการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากแหล่งที่อยู่อาศัย พื้นที่เพาะปลูกข้าว เพาะเลี้ยงกุ้ง ในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร และตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ้านเรือน และโรงบำบัดน้ำเสียในเขตอำเภอบางแสน และศรีราชา จ.ชลบุรี นำตัวอย่างน้ำทิ้งมาเทปิดทับผิวหน้าด้วยพาราฟินเหลว (liquid paraffin) ปิดอดเชื้อ แล้วจึงบ่มในสภาพมีแสง 1000- 1500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-14 วัน จากนั้นนำไปคัดแยกเชื้อในอาหารแข็ง และอาหารเหลว Ormerod's medium ที่ใช้โซเดียมอะซิเตท กลูโคส และแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ โดยเลี้ยงเชื้อในสภาพมีแสง ไร่้อากาศ (แทนที่ด้วยก๊าซไนโตรเจน) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตและเลือกลักษณะโคโลนีสีแดง-น้ำตาล เพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะได้ก๊อจจุลทรรศน์ และเก็บในอาหาร Ormerod's medium เพื่อใช้ตลอดการทดลอง

3.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

p-aminobenzoic acid, Thiamine HCl, Biotin, Nicotinic acid, Carboxymethyl cellulose, Glucose, Acetic acid, Peptone, Monosodium glutamate, Paraffin oil, แป้งมันสำปะหลัง และ แป้งข้าวเจ้า (ตราปลามังกร) Ormerod's medium (ภาคผนวก ก. [71])

3.3 อุปกรณ์ และการวิเคราะห์

ปริมาณเซลล์ใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec 34300 UV/vis spectrophotometer) และวัดปริมาณเซลล์ด้วยการสกัดและวัด bacteriochlorophyll ใช้วิธีการสกัดแบบเทอร์โมคลอโรฟิลล์ด้วยสารละลายผสมระหว่างอะซิโตน ต่อ เมทานอล อัตราส่วน 7 ต่อ 2 แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 775 นาโนเมตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Cohen-Bazire และคณะ [72])

การวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC (Shizumasu) ต่อกับตัวตรวจวัดชนิด thermal conductivity detector และคอลัมน์ 5A° molecular sieve และควบคุมอุณหภูมิ injection port

column oven และ detector เป็น 100, 60 และ 105 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ฮีเลียมเป็น carrier gas ที่อัตราการไหล 70 มล.ต่อนาที (ดัดแปลงจากวิธีของ Liu และคณะ [73])

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสวัดโดยนำตัวอย่างสารละลายมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่ได้ด้วยวิธี HPLC โดยนำส่วนใส 3 ส่วน มาผสมกับ acetonitrile 7 ส่วน เข้าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วจึงนำมาผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Water 2414) ต่อกับคอลัมน์ Asahipac Shodex NH2P-50 4E (ขนาด 20 ซม.) และตัวตรวจวัด RI ใช้สารละลาย acetonitrile ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 1.0 มล.ต่อนาที โดยใช้กลูโคส มอลโตส และ มอลโตไตรโอส เป็นสารละลายมาตรฐาน (ดัดแปลงจากวิธีของ Goh และคณะ [74])

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ด้วยวิธี methylene blue method โดยใช้หลอดแก้ว 2 หลอดต่อกันที่บริเวณปากหลอดด้วยจุกยางซิลิโคน หลอดแรกบรรจุสารละลายเซลล์ที่อิมด้วยก๊าซไฮโดรเจน ส่วนหลอดที่สอง บรรจุสารละลายปริมาตร 5 มล. ของ methylene blue ความเข้มข้น 80 μM ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 20 mM (พีเอช 8.0) ในบรรยากาศไฮโดรเจน จากนั้นผสมสารละลายทั้ง 2 หลอดเข้าด้วยกัน แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วจึงวัดการค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Takakuwa และคณะ [75])

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่คัดแยกและทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Ormerod's medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วจึงบ่มในสภาพมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ ในบรรยากาศไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน นำงานเพาะเชื้อมาทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน วัดขนาดโคโลนี และวงใสรอบๆ โคโลนี เปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างค่าทั้งสอง

3.4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดลองทางชีวเคมีของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้ ซึ่งมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ การย้อมสีเซลล์ แพกเจลลา และการใช้สารประกอบซัลเฟอร์ พร้อมศึกษาลักษณะได้กล้องจุลทรรศน์

3.4.3 ศึกษาองค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

3.4.3.1 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 โดยเลี้ยงในอาหารเหลว Ormerod's medium ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ อะซิเตท กลูโคส แป้งมันสำปะหลัง ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้องหอมมะลิ ตามลำดับ

3.4.3.2 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 ในอาหารสูตรดัดแปลง Modified medium ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ Na_2HPO_4 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นสูตรอาหารพื้นฐาน เพื่อทดสอบการเจริญของเชื้อ

3.4.4 ศึกษาสัดส่วนระหว่างแป้งมันสำปะหลังและโซเดียมกลูตาเมต ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มาเลี้ยงในอาหาร Modified medium ที่แปรผันสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 (แป้งมันสำปะหลัง และโซเดียมกลูตาเมต ตามลำดับ) โดยเชื้อเริ่มต้นเตรียมได้โดยนำเชื้อ S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Ormerod's medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายได้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ในอาหารทดสอบปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.4.5 ศึกษาสัดส่วนระหว่างข้าวหอมมะลิและโซเดียมกลูตาเมต ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มาเลี้ยงในอาหาร Modified medium ที่แปรผันสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 (ข้าวหอมมะลิ และ โซเดียมกลูตาเมต ตามลำดับ) โดยเชื้อเริ่มต้นเตรียมได้โดยนำเชื้อ S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Ormerod's medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ในอาหารทดสอบปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

3.4.6 ศึกษารูปทรงขวดเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มาทดสอบการเจริญในอาหารเหลว Modified medium ที่บรรจุในขวดแบนทรงสี่เหลี่ยม (ปริมาตร 250 มล.) และขวดกลมทรงกระบอก (ปริมาตร 350 มล.) บรรจุอาหาร 200 มล. โดยเชื้อเริ่มต้นเตรียมได้โดยนำเชื้อ S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Modified medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ในอาหารทดสอบปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดค่าปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์

3.4.7 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยข้าวหอมมะลิในสารละลาย Modified medium น้ำกลั่น และน้ำประปา ปริมาตร 200 มล. ซึ่งไม่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ หลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงใส่เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 ปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อเริ่มต้นเตรียมได้โดยนำเชื้อ S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Modified medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงความเข้ม 1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ในอาหารทดสอบปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์

3.4.8 ศึกษาองค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

คัดเลือกผลการทดลองที่ตรวจพบการสร้างก๊าซไฮโดรเจน (อาหารเหลว Modified medium ที่ใช้สัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 20 ต่อ 1) และไม่ให้ก๊าซไฮโดรเจน (อาหารเหลว Modified medium ที่ใช้สัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1) มาศึกษากิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase โดยนำสารละลายเซลล์แต่ละช่วงเวลามาตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจากน้ำทิ้ง

นำตัวอย่างน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสียในบริเวณอำเภอศรีราชา และภายในมหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี และตัวอย่างน้ำทิ้งบริเวณลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร มาเทใส่ในอาหารเหลว Ormerod's medium ที่ใช้อะซิเตท กลูโคส และแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วปิดทับผิวหน้าอาหารเหลวด้วย paraffin oil จากนั้นนำไปบ่มภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ จนกระทั่งสังเกตอาหารเหลวเปลี่ยนเป็นสีแดง น้ำตาล-แดง หรือส้ม จากนั้นจึงนำไปคัดแยกบนอาหารแข็ง Ormerod's medium เลี้ยงเชื้อในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจน จนกระทั่งสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อสีแดง น้ำตาล-แดง หรือส้ม จึงคัดแยกโคโลนีดังกล่าวเพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ ได้ทั้งหมด 78 ไอโซเลท จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง Ormerod's medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อคัดแยกสายพันธุ์ที่ย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดี ผลการทดลองพบว่า 32 ไอโซเลท สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังได้ โดยไอโซเลท S9 – S15 และ OS30 – OS 34 ให้วงใสรอบโคโลนีขนาดใหญ่ (ดังแสดงในตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้

โคโลนี	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร) บนอาหารแข็ง	
	โคโลนี	วงใส
S9	0.4	0.6
S10	0.2	0.5
S11	0.6	0.9
S12	0.3	1.0
S13	0.5	0.8
S14	0.3	0.6
S15	0.2	0.3
OS30	0.6	0.9
OS31	0.6	0.8
OS32	0.4	0.8
OS33	0.7	1.3
OS34	0.5	0.6

จากการทดลองสามารถคัดแยกจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่เจริญและย่อยสลายแป้งได้ดีถึง 12 ไอโซเลท ซึ่งในได้คัดเลือกไอโซเลท S12 ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุดสำหรับการทดลองต่อไป

4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดลองทางชีวเคมีของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงไอโซเลท S12 ที่คัดแยกได้ ซึ่งให้ขนาดวงใสใหญ่ที่สุดในอาหารแข็ง Ormerod's medium (ใช้แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน) มาจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

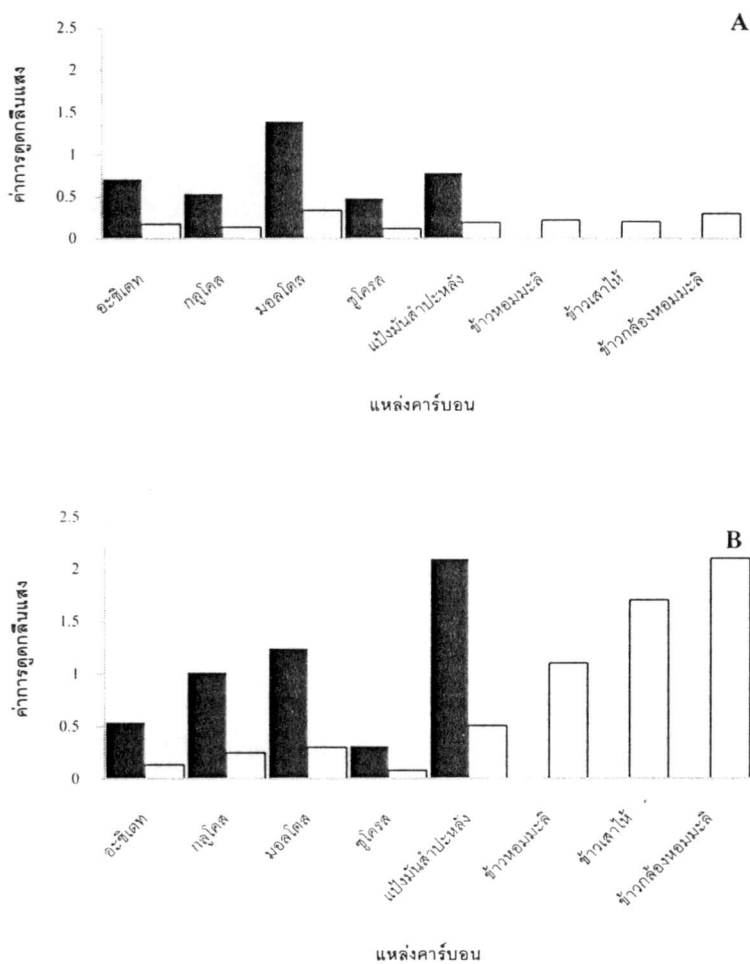
ตารางที่ 4.2 ลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12

การทดสอบ	คุณสมบัติที่ทดสอบได้
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีกลม โค้งนูน ขอบเรียบ สีแดง-ส้ม
G-stain	แกรมลบ
Figure	ท่อนสั้น
Size	0.2*0.8 ไมครอน
Flagella stain	monotrichous (เส้นเดี่ยวที่ขั้วเซลล์)
Acetate	+ (positive)
Benzoate	+ (positive)
Formate	+ (positive)
Glucose	+/- (positive / negative)
Tartate	+ (negative)
Thiosulphate	- (negative)
Sulphide	+ (positive)

จากตารางที่ 4.2 พบว่าให้ผลการใช้แหล่งคาร์บอนคล้ายกับจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในกลุ่ม purple non-sulphur photosynthetic bacteria ซึ่งไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีกำมะถันความเข้มข้นสูงเป็นองค์ประกอบ โดยเปรียบเทียบตาม Bergey's manual of Systematic Bacteriology (2nd) น่าจะเป็นจุลินทรีย์ในสกุล *Rhodospseudomonas*

4.3 ศึกษาองค์ประกอบสารอาหารต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

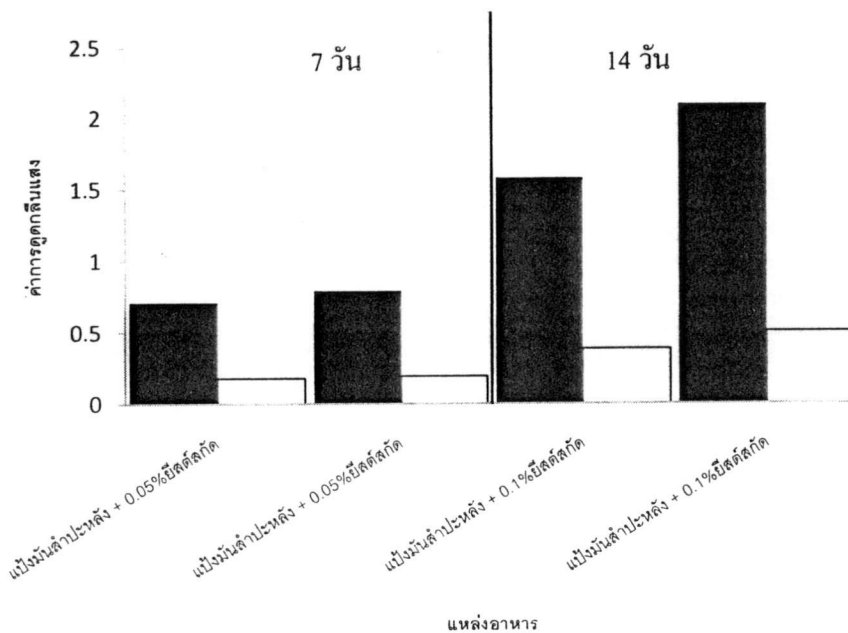
นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มาทดสอบการเจริญในอาหารเหลว Ormerod's medium ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ อะซิเตท กลูโคส มอลโตส แป้งมันสำปะหลัง ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้องหอมมะลิ ตามลำดับ โดยเลี้ยงเชื้อภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารเหลว Ormerod's medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 (A) และ 14 วัน (B) ■ วัดเซลล์ที่ OD600 □ วัดแบคทีเรียกลอโรฟิลล์ที่ OD770 นาโนเมตร (ตามลำดับ)

จากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์ S12 ให้การเจริญอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีอะซิเตท แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ และข้าวหอมมะลิกล้อง พบว่ามีการเจริญช้าในระยะแรก เนื่องจากต้องปรับตัวเพื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นพอลิเมอร์สายยาว หลังจากนั้นก็เจริญอย่างรวดเร็ว และให้ความเข้มข้นเซลล์สูงในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าการเจริญในแหล่งคาร์บอนเป็นข้าวกล้องหอมมะลิให้การเจริญสูงสุด อาจเป็นเพราะข้าวกล้องหอมมะลิมีปริมาณโปรตีน และวิตามินสูง ทำให้เชื้อเจริญได้ดี แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนพอลิเมอร์สายยาวได้อย่างดี

องค์ประกอบในสูตรอาหาร Ormerod's medium ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และเกลือแร่และวิตามิน จึงสนใจที่แทนที่ส่วนของเกลือแร่และวิตามินด้วยสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เพื่อให้ง่ายต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนในการทดลองต่อไป การทดลองใช้อาหารสูตร Modified medium ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน Na_2HPO_4 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งฟอสเฟต และใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งเกลือแร่และวิตามิน โดยเลี้ยงจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 เทียบกับอาหารสูตร Ormerod's medium ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.2



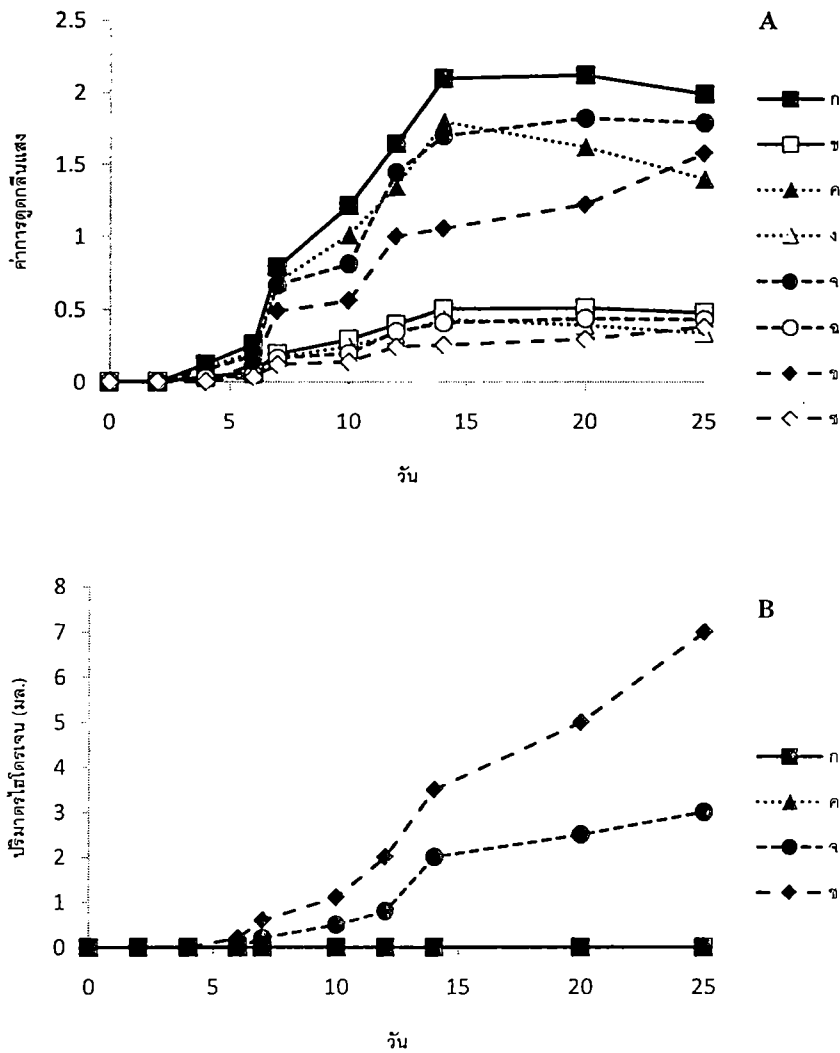
ภาพที่ 4.2 การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารเหลวสูตร Modified medium โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทดแทนในอาหารสูตร Ormerod's medium เมื่อเลี้ยงเชื้อในสถานะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 และ 14 วัน) ■ วัดเซลล์ที่ OD600 □ วัดแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ที่ OD770 นาโนเมตร (ตามลำดับ)

ผลการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 สามารถเจริญในอาหาร Modified medium ได้ดีพอกับการเจริญในอาหาร Ormerod's medium ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้สูตรอาหาร Modified medium เป็นอาหารพื้นฐาน แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ สังเกตพบว่ามีโครงสร้างฟองก๊าซ (ในหลอดดักก๊าซที่ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อ) อาจเป็นไปได้ที่การใช้สารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โครงสร้างห่อหุ้มเซลล์มีความซับซ้อนและแข็งแรง ดังนั้นก๊าซที่เกิดขึ้นภายในเซลล์อาจปล่อยออกมาภายนอกได้ไม่ดี หรือองค์ประกอบในสารสกัดยีสต์ส่งผลให้มีกิจกรรมการเปลี่ยน H^+ ไปเป็นสารตั้งต้นอื่น (โดยเอนไซม์ Nitrogenase หรือ Hydrogenase) แทนการเปลี่ยนไปเป็นก๊าซ

4.4 ศึกษาสัดส่วนระหว่างแป้งมันสำปะหลังและโซเดียมกลูตาเมต ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มาเลี้ยงในอาหาร Modified medium ที่แปรผันสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 (แป้งมันสำปะหลัง และโซเดียมกลูตาเมต ตามลำดับ) โดยเชื้อเริ่มต้นเตรียมได้โดยนำเชื้อ S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Ormerod's medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงความเข้ม 1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ในอาหารทดสอบปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปบ่มในสถานะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (แสดงในภาพที่ 4.3)

ผลการทดลองพบว่าอาหาร Modified medium ที่แปรผันสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจาก 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 (แป้งมันสำปะหลัง และโซเดียมกลูตาเมต ตามลำดับ) ความหนืดของอาหารเหลวมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่สัดส่วน 20 ต่อ 1 ทำให้ต้องลดปริมาณแป้งมันสำปะหลังลง แต่ยังคงสัดส่วนให้เป็น 20 ต่อ 1 จึงจะสามารถนำอาหารเหลวไปใช้ในการทดลองได้ โดยพบว่าอาหารที่สัดส่วน 1 ต่อ 1 ให้การเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะที่สัดส่วน 20 ต่อ 1 ให้การเจริญช้าที่สุด ส่วนการสร้างก๊าซไฮโดรเจนพบเพียงเล็กน้อยในอาหารสัดส่วน 10 ต่อ 1 (3.1 มล. ในวันที่ 25 ของการเลี้ยงเชื้อ) และเพิ่มขึ้นอย่างมากเชื้อใช้อาหารสัดส่วน 20 ต่อ 1 (7.3 มล. ในวันที่ 25 ของการเลี้ยงเชื้อ) ปริมาณก๊าซที่พบเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย GC พบว่าเป็นก๊าซไฮโดรเจน แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนพอลิเมอร์เป็นแป้งมันสำปะหลัง และให้ไฮโดรเจนเป็นผลผลิต



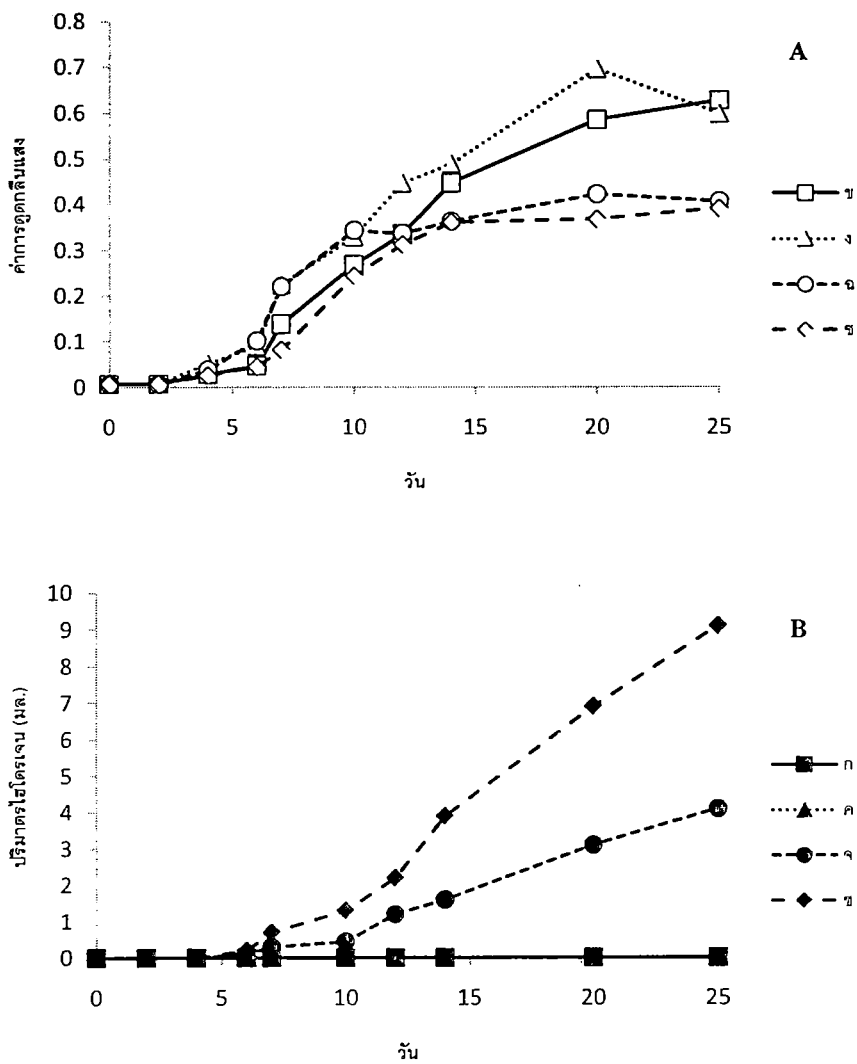
ภาพที่ 4.3 การเจริญ (A) และการผลิตฮอร์โมน (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารเหลว Modified medium ที่สถานะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส

- ภาพ 4.3A สัตถุาลักษณ์ที่บ่งชี้แสง หมายถึงวัดเซลล์ที่ OD 600 นาโนเมตร
 สัตถุาลักษณ์ที่โปร่งใส หมายถึงวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ที่ OD 770 นาโนเมตร
 ก และ ข หมายถึงสัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1
 ค และ ง หมายถึงสัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 5 ต่อ 1
 จ และ ฉ หมายถึงสัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 10 ต่อ 1
 ช และ ซ หมายถึงสัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 20 ต่อ 1
- ภาพ 4.3B ก, ค, จ และ ช หมายถึงสัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 ตามลำดับ

4.5 ศึกษาสัดส่วนระหว่างข้าวหอมมะลิและโซเดียมกลูตาเมต ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูง ก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับความหนืดของอาหารเหลว ดังนั้นจึงหันมาใช้แหล่งคาร์บอนพอลิเมอร์ที่มีการจับรวมตัวเป็นโครงสร้างผลึกที่พันธะไฮโดรเจนแข็งแรงกว่าแป้งมันสำปะหลัง เช่น ข้าวชนิดต่างๆ และเซลลูโลส ซึ่งแก้ปัญหาเรื่องความหนืดอาหารเหลว แต่ก็ทำให้การวัดจำนวนเซลล์ที่เจริญได้มีปัญหาเนื่องจากความขุ่น ดังนั้นจึงใช้การวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) ที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร แทนการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร การทดลองนี้ใช้จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มาเลี้ยงในอาหาร Modified medium ที่แปรผันสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 (ข้าวหอมมะลิ และโซเดียมกลูตาเมต ตามลำดับ) โดยเชื้อเริ่มต้นเตรียมได้โดยนำเชื้อ S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Modified medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงความเข้ม 1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ในอาหารทดสอบปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร (แสดงในภาพที่ 4.4)

ผลการทดลองพบว่าอาหาร Modified medium ที่แปรผันสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจาก 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 (ข้าวหอมมะลิ และโซเดียมกลูตาเมต ตามลำดับ) ไม่มีผลทำให้ความหนืดของอาหารเหลวมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของเหลวมีค่าลดลงเนื่องจากการดูดซับน้ำของเมล็ดข้าว ดังนั้นการเตรียมอาหารที่สัดส่วนระหว่างข้าวหอมมะลิต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตต้องลดปริมาณลง แต่ยังคงสัดส่วนไว้ที่ 20 ต่อ 1 เช่นเดิม โดยพบว่าอาหารที่สัดส่วน 1 ต่อ 1 ให้การเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะที่สัดส่วน 20 ต่อ 1 ให้การเจริญช้าที่สุด เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ต้องย่อยสลายเมล็ดข้าวจากพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ให้เล็กลง ก่อนที่จะย่อยสลายเป็นกลูโคสเพื่อใช้ในการเจริญต่อไป อีกทั้งการดูดซับน้ำทำให้ปริมาณน้ำที่เป็นประโยชน์ลดน้อยลงด้วยเช่นกัน แม้ว่าวิธีวัดการเจริญจะใช้ปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ แต่การยึดเกาะเซลล์กับเมล็ดข้าว และการกระจายตัว อาจมีผลให้การวัดค่าไม่ถูกต้อง ส่วนการสร้างก๊าซไฮโดรเจน พบว่าในอาหารสัดส่วน 1 ต่อ 1 ไม่พบการสร้างก๊าซ ขณะที่สัดส่วน 5 ต่อ 1 พบฟองก๊าซเพียงเล็กน้อยในวัดที่ 25 ของการเจริญ



ภาพที่ 4.4 การเจริญ (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหาร

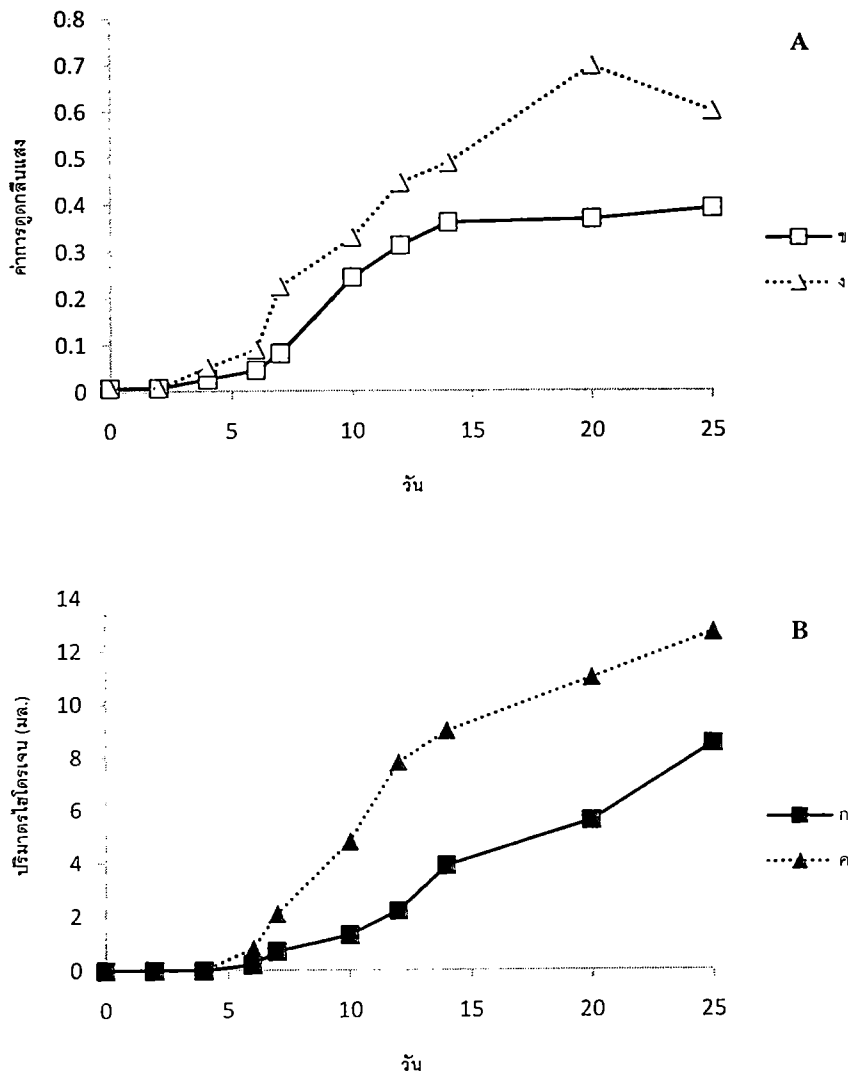
เหลว Modified medium ที่สภาวะมีแสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส

- ภาพ 4.4A สันญาณักษณ์โปรงใส หมายถึงวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ที่ OD 770 นาโนเมตร
- ข หมายถึงสัดส่วนข้าวหอมมะลิต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1
- ง หมายถึงสัดส่วนข้าวหอมมะลิต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 5 ต่อ 1
- ค หมายถึงสัดส่วนข้าวหอมมะลิต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 10 ต่อ 1
- ช หมายถึงสัดส่วนข้าวหอมมะลิต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 20 ต่อ 1
- ภาพ 4.4B ก, ข, จ และ ช หมายถึงสัดส่วนข้าวหอมมะลิต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1, 5 ต่อ 1, 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 ตามลำดับ

การผลิตไฮโดรเจนพบในอาหารสัดส่วน 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 โดยอาหาร สัดส่วน 10 ต่อ 1 ให้การสร้างก๊าซไฮโดรเจนสูงสุด 4.1 มล. ในวันที่ 25 ของการเจริญ ส่วน อาหาร สัดส่วน 20 ต่อ 1 ให้ก๊าซสูงสุด 9.1 มล. แต่อย่างไรก็ตามพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมล็ด ข้าวจากขนาดใหญ่เต็มเมล็ด เป็นเล็กละเอียดในวันสุดท้าย ซึ่งสัดส่วนอาหาร 10 ต่อ 1 และ 20 ต่อ 1 พบเศษเมล็ดข้าวยังคงเหลืออยู่มาก ขณะที่อาหารสัดส่วน 1 ต่อ 1 พบเศษเมล็ดข้าวเพียงเล็กน้อย

4.6 ศึกษารูปทรงขวดเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

การสังเคราะห์แสงโดยจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงมีส่วนสำคัญมาก ต่อการนำพลังงาน แสงมาใช้เพื่อให้เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนในแบคทีเรียคลอโรฟิล ซึ่งส่งผลให้เกิดการแตกตัวของ สารอินทรีย์ที่เป็นตัวให้โปรตอน (proton donor) ดังนั้นการทดลองนี้จึงทดสอบรูปร่างของ ขวดเลี้ยงเชื้อขวดกลมทรงกระบอก (ขวดเตรียมอาหาร) และขวดแบนทรงสี่เหลี่ยม (ขวดเหล้าแบน) การทดลองนี้ใช้จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 มาเลี้ยงในอาหาร Modified medium ที่ใช้สัดส่วน ข้าวหอมมะลิต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่ระดับ 20 ต่อ 1 บรรจุในขวดอาหารทรงกลม (ขนาด 250 มล.) และทรงสี่เหลี่ยม (ขนาด 350 มล.) ปริมาตรอาหาร 200 มล. โดยเชื้อเริ่มต้นเตรียมได้โดยนำ เชื้อ S12 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Modified medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงความเข้ม 1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10 วัน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ในอาหารทดสอบ แล้วนำไปบ่มใน สภาวะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิล ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 770 นาโนเมตร (ดังแสดงในภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 การเจริญ (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหาร Modified medium บรรจุในขวดกลมทรงกระบอก และขวดแบนทรงสี่เหลี่ยม ภายใต้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส

สัญลักษณ์โปร่งใส หมายถึง วัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ที่ OD 770 นาโนเมตร

สัญลักษณ์ทึบแสง หมายถึง การผลิตไฮโดรเจน

สัญลักษณ์สี่เหลี่ยม หมายถึง การทดลองในขวดกลมทรงกระบอก

สัญลักษณ์สามเหลี่ยม หมายถึง การทดลองในขวดแบนทรงสี่เหลี่ยม

ก หมายถึง การผลิตไฮโดรเจนโดยเลี้ยงในขวดกลมทรงกระบอก

ข หมายถึง การเจริญโดยเลี้ยงในขวดกลมทรงกระบอก

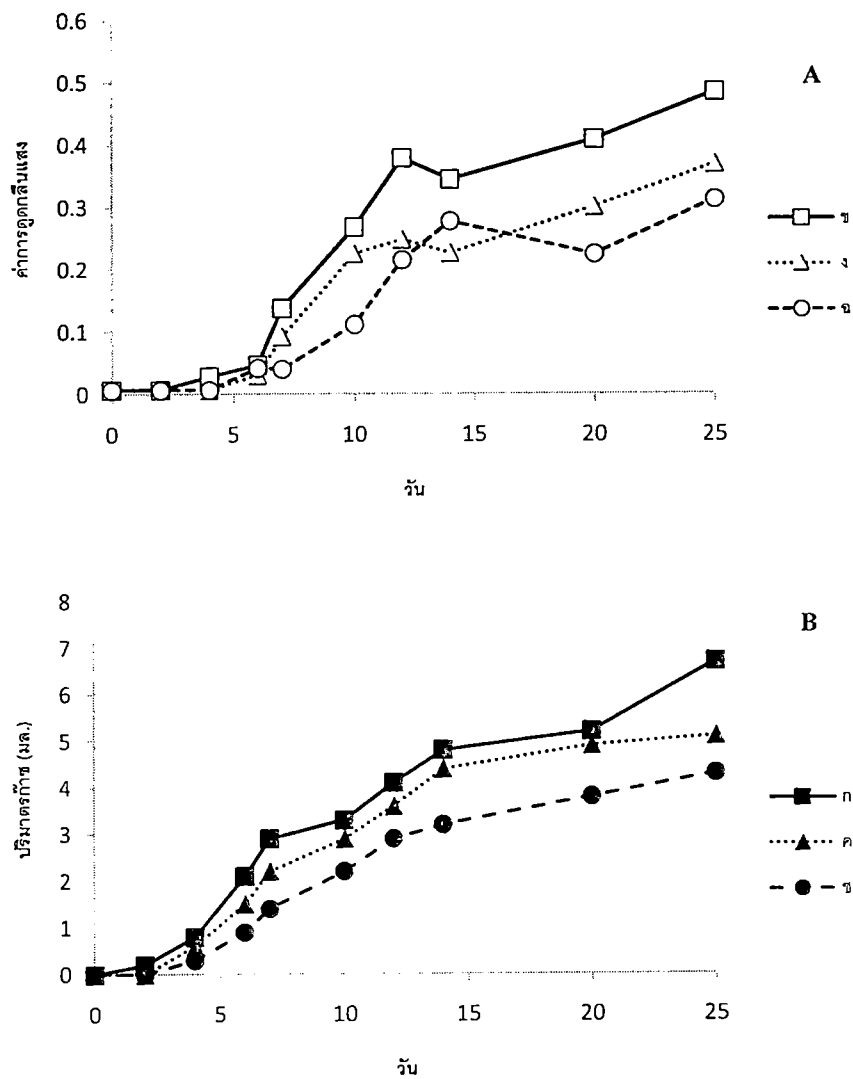
ค หมายถึง การผลิตไฮโดรเจนโดยเลี้ยงในขวดแบนทรงสี่เหลี่ยม

ง หมายถึง การเจริญโดยเลี้ยงในขวดแบนทรงสี่เหลี่ยม

ผลการทดลองพบว่าการเจริญในขวดเลี้ยงเชื้อแบบทรงสี่เหลี่ยมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดทรงกลม เนื่องจากการได้รับแสงทั่วถึงกว่า ขณะเดียวกันเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในขวดทรงกลมอาจบังแสงซึ่งกันและกัน ทำให้การเจริญของเซลล์ที่บริเวณกลางขวดได้รับแสงไม่ทั่วถึง สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนพบว่าการได้รับแสงมีผลอย่างมาก ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบทรงสี่เหลี่ยม เซลล์ได้รับแสงอย่างทั่วถึงจึงสามารถสร้างก๊าซได้อย่างดี ขณะที่การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในขวดกลมทรงกระบอก พบการบังแสงอย่างรุนแรง ทำให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงอย่างมาก แม้ว่าปริมาณเซลล์ในขวดแบบทรงสี่เหลี่ยมจะมีมากกว่าในขวดกลมทรงกระบอกประมาณ 1 ใน 3 เท่านั้น

4.7 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงในอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากบ้านเรือน ซึ่งเป็นแหล่งที่มีสารประกอบอินทรีย์ปริมาณสูง มาเปลี่ยนเป็นพลังงาน ซึ่งเป็นผลพลอยได้พร้อมกับการกำจัดของเสียและบำบัดน้ำทิ้ง ให้มีคุณภาพดีขึ้น การนำน้ำเสียมาใช้ประโยชน์ถ้ามีต้นทุนในด้านการฆ่าเชื้อ หรือทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งลดลง อาจส่งผลให้ความคุ้มค่าลดลง หรือไม่ได้เปรียบในเชิงเศรษฐศาสตร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งไปที่การนำน้ำเสียจากบ้านเรือนมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง โดยไม่จำเป็นต้องนำน้ำทิ้งมาผ่านการฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้งาน จึงจำเป็นต้องอาศัยความได้เปรียบของเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง และสารต่อต้านจุลินทรีย์บางอย่างออกมา จึงนำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 ที่นำมาทดสอบ โดยใช้ข้าวหอมมะลิที่หุงสุกแล้ว (น้ำหนักสด 50 กรัม) ใส่ในสารละลาย Modified medium น้ำกลั่น และน้ำประปา ปริมาตร 200 มล. (ตามลำดับ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแบบทรงสี่เหลี่ยมขนาด 350 มล. หลังจากผสมข้าวสุกลงในสารละลายทั้ง 3 ชนิดแล้ว จึงนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 3 วัน (สังเกตความขุ่นของจุลินทรีย์ที่เจริญขึ้นมา) จากนั้นจึงนำเชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Modified medium โดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้แสงความเข้ม 1000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน) ปริมาตรสารละลายเซลล์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดอาหารทดสอบทั้ง 3 ชนิด แล้วนำไปบ่มในสภาวะเดิม บันทึกการเจริญโดยการวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิล ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร (ดังแสดงในภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 การเจริญ (A) และการผลิตก๊าซ (B) ของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง S12 ในอาหารข้าวหอมมะลิสุกและสารละลาย Modified medium (สี่เหลี่ยม) อาหารข้าวหอมมะลิสุกและน้ำกั้น (สามเหลี่ยม) และอาหารข้าวหอมมะลิสุกและน้ำประปา (วงกลม) โดยไม่ทำให้อาหารเหลวปอดเชื้อ

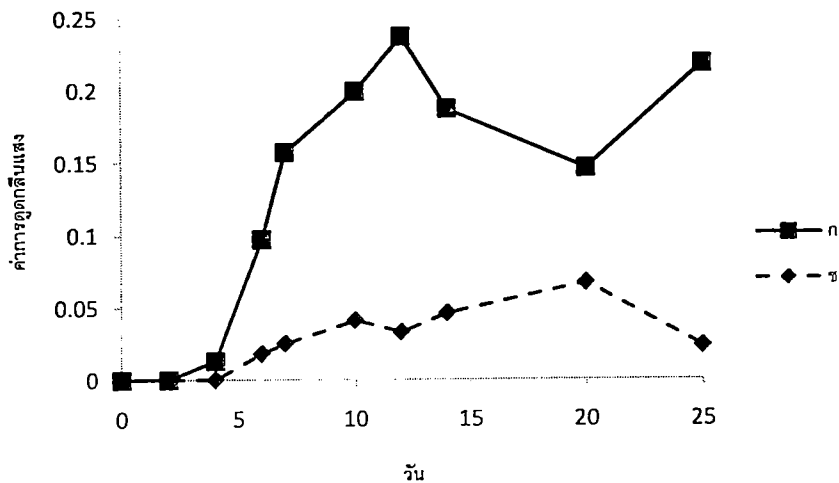
สัญลักษณ์โปร่งใส หมายถึงวัดปริมาณแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ที่ OD 770 นาโนเมตร

สัญลักษณ์ทึบแสง หมายถึงการผลิตก๊าซ

ผลการทดลองพบว่าขบวนการข้าวหอมมะลิสุกในสารละลาย Modified medium น้ำกลั่น และน้ำประปา เมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ทำให้อาหารเหลวมีความขุ่นทั่วทั้งขวด และที่ผิวหน้าอาหารเหลวมีแผ่นฟิล์มของเชื้อเจริญปิดผิวหน้าอาหารเหลว และมีความหนาแน่นจากมากไปน้อย (ตามลำดับ) หลังจากใส่จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเลี้ยงเชื้อต่อไป พบการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงโดยสังเกตลักษณะสีของอาหารเหลวเป็นสีแดงอ่อน (เนื่องจากความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ซึ่งขัดขวางการได้รับแสงของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง) เมื่อนำสารละลายเซลล์มาสกัดแบคทีเรียคลอโรฟิลล์ (ซึ่งมาจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง) ก็สามารถวัดปริมาณได้ โดยพบการเจริญน้อยกว่าการทดลองที่ 4.5 แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบเวลา 45 วัน สังเกตพบว่าอาหารเหลวทุกขวดเป็นสีแดงของเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงอย่างชัดเจน ขณะที่การวัดปริมาณก๊าซที่ได้พบว่ามีทั้งก๊าซไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีใช้น้ำทิ้งจากครัวเรือนที่ไม่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ อาจส่งผลกระทบต่อชนิดของก๊าซที่ผลิตได้

4.8 ศึกษาการวัดกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase

คัดเลือกผลการทดลองที่ตรวจพบการสร้างฟองก๊าซไฮโดรเจน (อาหารเหลว Modified medium ที่ใช้สัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 20 ต่อ 1) และไม่ให้ฟองก๊าซไฮโดรเจน (อาหารเหลว Modified medium ที่ใช้สัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1) มาศึกษากิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase โดยนำสารละลายเซลล์แต่ละช่วงเวลามาตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ในการทดลองที่ไม่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน (อาหารเหลว Modified medium ที่ใช้สัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1) (ก) และการทดลองที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน (อาหารเหลว Modified medium ที่ใช้สัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 20 ต่อ 1) (ข) โดยวัดการเปลี่ยนแปลง methylene blue ที่ OD 570 นาโนเมตร

กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ที่วัดจากการเปลี่ยนแปลงสีของ methylene blue ที่ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสง 570 นาโนเมตร ในระหว่างการทดลองที่ผลิต และไม่ผลิตไฮโดรเจน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสัดส่วนแป้งมันสำปะหลังต่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ระดับ 1 ต่อ 1 มีค่าสูงตั้งแต่วันที่ 5 ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่การเลี้ยงเชื้อในอาหารสัดส่วน 20 ต่อ 1 พบกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ในปริมาณต่ำ ซึ่งพบการสร้างก๊าซไฮโดรเจน แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ hydrogenase มีผลให้ก๊าซไฮโดรเจนเปลี่ยนแปลงไปเป็น H^+ เพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ และการสร้างพลังงานต่อไป

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำทิ้ง บ่อบำบัดน้ำเสียในบริเวณอำเภอศรีราชา และภายในมหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี และตัวอย่างน้ำทิ้งบริเวณลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ด้วยอาหารเหลว Ormerod's medium ที่ใช้อะซิเตท กลูโคส และแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ ได้ทั้งหมด 78 ไอโซเลต และเมื่อนำมาคัดแยกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีถึง 32 ไอโซเลต ที่ให้บริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งในจำนวนนี้มีอยู่ 12 ไอโซเลตที่ให้วงใสเป็นบริเวณกว้าง โดยพบว่าไอโซเลต 12 ให้การสร้างวงใสสูงที่สุด และเมื่อนำไปจัดจำแนกสายพันธุ์ตามวิธี Bergey's manual of Systematic Bacteriology (2nd) พบว่าอยู่ในสกุล *Rhodospseudomonas*

จุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส S12 เจริญอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนขนาดเล็ก เช่น อะซิเตท แต่ก็สามารถใช้แหล่งคาร์บอนพอลิเมอร์เป็นแป้งมันสำปะหลัง ข้าวหอมมะลิ ข้าวเสาไห้ และข้าวหอมมะลิกล้อง แม้ให้การเจริญช้าในระยะแรก เนื่องจากต้องสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสเตรท หลังจากนั้นก็เจริญอย่างรวดเร็ว และให้ความเข้มข้นเซลล์สูงในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยการเจริญในแหล่งคาร์บอนเป็นข้าวกล้องหอมมะลิมีค่าสูงสุด เนื่องจากองค์ประกอบของสับสเตรทมีความอุดมสมบูรณ์มาก เมื่อเปลี่ยนมาใช้สูตรอาหาร Modified medium ที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1.0 เปอร์เซ็นต์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ Na_2HPO_4 1.0 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.05 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญเทียบเท่ากับการใช้อาหารเหลว Ormerod's medium ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้สูตรอาหาร Modified medium เป็นอาหารพื้นฐาน การเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงรหัส 12 พบว่าให้ค่าสูงในอาหารที่มีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 1 ต่อ 1 และ 5 ต่อ 1 ซึ่งไม่พบการสร้างไฮโดรเจนขณะเดียวกันการผลิตก๊าซไฮโดรเจนพบได้ในอาหารที่มีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20 ต่อ 1 ซึ่งมีค่าสูงที่สุด แต่การเตรียมอาหารพบปัญหาเรื่องความหนืดและการดูดซับน้ำที่เป็นประโยชน์ การได้รับแสงมีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน โดยพบว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดแบนทรงสี่เหลี่ยมให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดกลมทรงกระบอก เนื่องจากเซลล์ได้รับแสงอย่างทั่วถึง และลดปัญหาเรื่องการบดบังแสงซึ่งกันและกัน

การเจริญและผลิตไฮโดรเจนในน้ำเสีย โดยทดลองใช้อาหารที่เป็นข้าวหอมมะลิสุกในสารละลาย Modified medium น้ำกลั่น และน้ำประปา ซึ่งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งเกิดการเน่าเสีย (น้ำเสียส่งเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ) แล้วจึงใส่จุลินทรีย์สังเคราะห์แสง ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงเลี้ยงเชื่อมต่อไป พบการเจริญของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงโดยสังเกตลักษณะสีของอาหารเหลวเป็นสีแดงอ่อน (เนื่องจากความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ซึ่งส่งผลไปขัดขวางการได้รับแสงของจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง) เมื่อน้ำหมักมาสกัดเบคทีเรียคลอโรฟิลล์ (เพื่อติดตามปริมาณเซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์แสง) ก็สามารถวัดปริมาณได้ โดยพบการเจริญน้อยกว่าการทดลองในสภาพปลอดเชื้อ แต่ถ้าเลี้ยงเชื่อมต่อไปจนครบเวลา 45 วัน สังเกตพบว่าอาหารเหลวทุกขวดเป็นสีแดงของเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงอย่างชัดเจน การผลิตไฮโดรเจนในน้ำเสีย พบว่าปริมาณก๊าซที่ได้มีทั้งก๊าซไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีใช้น้ำทิ้งจากครัวเรือนที่ไม่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้ออาจส่งผลกระทบต่อชนิดของก๊าซที่ผลิตได้

กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase มีผลอย่างมากต่อปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ โดยพบวกิจกรรมเอนไซม์อย่างมากในอาหารที่มีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 1 ต่อ 1 แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนเป็น 20 ต่อ 1 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลง ดังนั้นการผลิตไฮโดรเจนจำเป็นต้องคัดเลือกสภาวะที่ลดการทำงานของเอนไซม์ hydrogenase หรือพัฒนาสายพันธุ์กลายที่ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์นี้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้สับสเตรทโมเลกุลเล็กที่สัมพันธ์กับการผลิตไฮโดรเจน รวมถึงปริมาณอนุภาพแสงต่อการผลิตไฮโดรเจน
2. ไฮโดรเจนที่ผลิตได้อาจก่อให้เกิดปัญหาเรื่องการเก็บรักษา และการจุดระเบิด ดังนั้นควรศึกษาผลิตพลังงานในรูปของไฮโดรเจน ไปเป็นพลังงานในรูปของไฟฟ้า โดยใช้เซลล์ไฟฟ้าจากจุลินทรีย์สังเคราะห์ (microbial fuel cell) โดยเปลี่ยนเมแทบอลิซึมของการรวมโปรตอนและอิเล็กตรอน (ไปเป็นไฮโดรเจน) ไปเป็นการสร้างไฟฟ้าแทน
3. ควรศึกษากิจกรรมเอนไซม์ nitrogenase และ hydrogenase เพื่อเปลี่ยนไฮโดรเจนหรือโปรตอนไปเป็นกระแสไฟฟ้าในระบบเซลล์ไฟฟ้าจากจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง

เอกสารอ้างอิง

- [1] Nandi R. and Sengupta S. Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical Rev. Microbiol.* 1998. 24 (1): 61–84.
- [2] Das D. and Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2001. 26: 29–37.
- [3] Hillmer P. and Gest H. H₂ metabolism in photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures. *J. Bacteriol.* 1977. 129 (2): 724–31.
- [4] Ark T, Gunduz U, Yucel M, Turker L, Sediroglu V. and Eroglu I. Photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. In: Veziroglu TN, Winter CJ, Basselt JP, Kreysa G. editors. *Hydrogen Energy Progress XI. Proceedings of the 11th WHEC, Stuttgart, Germany, vol. 3, 1996. p. 2417–24.*
- [5] Sasikala C, Ramana CV, Rao PR. Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int. J. Hydrogen Energy*, 1995. 20 (2): 123–6.
- [6] Barbosa MJ, Rocha JMS, Tramper J. and Wijels RH. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *J. Biotechnol.* 2001. 85: 25–33.
- [7] Eroglu I, Aslan K, Gunduz U, Yucel M, Turker L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J Biotechnol.* 1999. 70: 103–113.
- [8] Basak N. and Das D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007. 23; 31–42.

- [9] Biebl H, Pfennig N. Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A, Schlegel HG. editors. The prokaryotes, vol. 1. New York: Springer-Verlag, 1981.
- [10] Kitajima Y, El-Shishtawy RMA, Ueno Y, Otsuki S, Miyake J, Morimoto M. Analysis of compensation point of light using plane-type photosynthetic bioreactor. In: Zaborsky O, editor. Biohydrogen. New York: Plenum Press, 1998. p. 359–68.
- [11] Tabanoglu A, Eroglu I, Gunduz U, Yucel M, Turker L. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a solar bioreactor. M.Sc. thesis in Biotechnology, Middle East Technical University, 2002.
- [12] Koku H, Eroglu I, Gunduz U, Yucel M, Turker L. Kinetics of biological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. Int J Hydrogen Energy, 2003 ; 28(4): 381-388.
- [13] Tabita FR. The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO₂ fixation in purple bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE, editors. Anoxygenic photosynthetic bacteria. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 885–914.
- [14] Satoh T, Hoshino Y, Kitamura H. *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Arch Microbiol. 1976. 108: 265–269.
- [15] Gurgun V, Kirschner G, Pfennig N. Fermentation of pyruvate by 7 species of phototrophic purple bacteria. Z Allg Mikrobiol. 1976. 16 (8): 573–576.
- [16] Jones BL, Monty KJ. Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodopseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. J. Bacteriol. 1979. 139 (3): 1007–1013.

- [17] Gest H, Kamen MD, Bregó. Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. V. Photoproduction of hydrogen and nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum*. J. Biol. Chem. 1950. 182: 153–170.
- [18] Sasikala K, Ramana CV, Rao PR, Subrahmanyam M. Effect of gas phase on the photoproduction of hydrogen and substrate conversion efficiency in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. Int. J. Hydrogen Energy. 1990. 15 (11): 795–797.
- [19] Jouanneau Y, Wong B, Vignais PM. Stimulation by light of nitrogenase synthesis in cells of *Rhodopseudomonas capsulata* growing in N-limited continuous cultures. Biochim. Biophys. Acta. 1985. 808: 149–155.
- [20] Meyer J, Kelley BC, Vignais PM. Effect of light on nitrogenase function and synthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 1978. 136 (1): 201–208.
- [21] Yakunin AF, Tsygankov AA, Troshina OY, Gogotov IN. Growth and nitrogenase activity of continuous cultures of the purple bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides* depending on the presence of Mo, V, and W in the medium. Mikrobiyologiya. 1991. 60: 41–46.
- [22] Vignais PM, Colbeau A, Willison JC, Jouanneau Y. Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. Adv. Microb. Physiol. 1985. 26: 154 – 234.
- [23] Turkarslan S, Yucel M, Gunduz U, Turker L, Eroglu I. Identification of hydrogenase from *Rhodobacter* species and hydrogen gas production in photobioreactors. In: Abstract Book, BioHydrogen 2002 Conference, Ede, The Netherlands, April 21–24, 2002.
- [24] Gogotov IN. Hydrogenases of phototrophic microorganisms. Biochimie. 1986. 68: 181–187.

- [25] Zorin NA. Redox properties and active center of phototrophic bacteria hydrogenases. *Biochimie*. 1986. 68: 97–101.
- [26] Klemme JH. Photoproduction of hydrogen by purple bacteria: a critical evaluation of the rate limiting steps. *Z Naturf* 1993;48c:482–7.
- [27] Maness PC, Weaver PF. Evidence for three distinct hydrogenase activities for *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;57:751–6.
- [28] Ooshima H, Takakuwa S, Katsuda T, Okuda M, Shirasawa T, Azuma M, Kato J. Production of hydrogen by a hydrogenase-deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *J Ferment Bioeng* 1998;85(5):470–5.
- [29] Jahn A, Keuntje B, Dorer M, Klipp W, Oelze J. Optimizing photoheterotrophic H₂ production by *Rhodobacter capsulatus* upon interposon mutagenesis in the *hupL* gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;40(5):687–90.
- [30] Kern M, Klipp W, Klemme JH. Increased nitrogenase-dependent H₂ photoproduction by *hup* mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Env Microbiol* 1994;60(6):1768–74.
- [31] Fissler J, Schirra C, Kohring GW, Gihorn F. Hydrogen production from aromatic acids by *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;41:395–9.
- [32] Hillmer P, Gest H. H₂ Metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: production and utilization of H₂ by resting cells. *J Bacteriol* 1977b;129(2): 732–9.
- [33] Gest H, Kamen MD. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science* 1949;109:558–9.
- [34] Conrad R, Schlegel HG. Influence of aerobic and phototrophic growth conditions on the distribution of glucose and fructose carbon into the Entner-Doudoroff and

- Embden-Meyerhoff pathways in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. J Gen Microbiol 1977;101:277–90.
- [35] Willison JC. Pyruvate and acetate metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. J Gen Microbiol 1988;134:2429–39.
- [36] Gest H, Ormerod JG, Ormerod KS. Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum*: light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle. Arch Biochem Biophys 1962;97:21–33.
- [37] Pike L, Sojka GA. Glycerol dissimilation in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. J Bacteriol 1975;124(3): 1101–5.
- [38] Wang X, Falcone DL, Tabita FR. Reductive pentose phosphate-independent CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence that ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activity serves to maintain the redox balance of the cell. J Bacteriol 1993;175(11):3372–9.
- [39] Sasikala K, Ramana CV, Rao PR, Kovacs KL. Anoxygenic phototrophic bacteria: physiology and advances in hydrogen production technology. Adv Appl Microbiol 1993;38:211–95.
- [40] Rocha JS, Barbosa MJ, Wijels RH. Hydrogen production by photosynthetic bacteria: culture media, yields and efficiencies. In: Miyake J, Matsunaga T, San Pietro A, editors. Biohydrogen II an approach to environmentally acceptable technology. UK: Elsevier Science Ltd, 2001.
- [41] Mao XY, Miyake J, Kawamura S. Screening photosynthetic bacteria for hydrogen production from organic acids. J Ferment Technol 1986;64(3):245–9.
- [42] Macler BA, Pelroy RA, Bassham JA. Hydrogen formation in nearly stoichiometric amounts by a *Rhodopseudomonas sphaeroides* mutant. J Bacteriol 1978;138(2):446–52.

- [43] Kim JS, Yamauchi H, Ito K, Takahashi H. Selection of a photosynthetic bacterium suitable for hydrogen production in outdoor cultures among strains isolated in the Seoul, Taegu, Sendai and Bangkok areas. *AgricBiol Chem* 1982;46(6):1460–74.
- [44] Miyake J, Mao XY, Kawamura S. Photoproduction of hydrogen by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. *J Ferment Technol* 1984;62(6):531–5.
- [45] Fascetti E, Todini O. *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one-and two-stage chemostat. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;44:300–5.
- [46] Nakada E, Nishikata S, Asada Y, Miyake J. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell. *Int J Hydrogen Energy* 1999;24:1053–1057.
- [47] Sasikala K, Ramana CV, Rao PR. Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int J Hydrogen Energy* 1991a;16(9):597–601.
- [48] Kim MS, Moon KW, Lee SK, Kim SC, Kim MS. Production of hydrogen from glucose by *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 1998;26(2):89–95.
- [49] Yigit DO, Gunduz U, Turker L, Yucel M, Eroglu I. Identification of by-products in hydrogen producing bacteria: *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 grown in the wastewater of a sugar refinery. *J Biotechnol* 1999;70:125–31.
- [50] Hustede E, Steinbuechel A, Schlegel HG. Relationship between photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993;39:87–93.

- [51] Khatipov E, Miyake M, Miyake J, Asada Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate by *Rhodobacter sphaeroides* on various carbon and nitrogen substrates. FEMS Microbiol Lett 1998;162:39–45.
- [52] Steinbuchel A, Fuchtenbusch B. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech 1998;16:419–27.
- [53] Doelle HW. Bacterial metabolism. London: Academic Press, Inc., 1969.
- [54] Turkarslan S, Yigit DO, Aslan K, Eroglu I, Gunduz U. Photobiological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 by utilization of waste water from milk industry. In: Zaborsku OR, editor. Biohydrogen. New York: Plenum Press, 1998.
- [55] Yetis M, Gunduz U, Eroglu I, Yucel M, Turker L. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. Int J Hydrogen Energy 2000;25:1035–41.
- [56] Zhu H, Suzuki T, Tsygankov AA, Asada Y, Miyake J. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. Int J Hydrogen Energy 1999;24:305–10.
- [57] Sasikala K, Ramana CV. Photoproduction of hydrogen from waste water of a lactic acid fermentation plant by a purple non-sulfur photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. Indian J Experimental Biol 1991b;29:74–75.
- [58] Eroglu E, Eroglu I, Gunduz U, Yucel M, Turker L. Biological Hydrogen production from olive mill wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. In: Gokcekus H, editor. International Conference on Environmental Problems of Mediterranean Region (EPMR-2002) in Near East University, Nicosia-Northern Cyprus, Book of Abstracts, 2002. p. 62.

- [59] Fascetti E, D'Addario E, Todini O, Robertiello A. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *Int. J Hydrogen Energy* 1998;23(9):753–60.
- [60] Kiley PJ, Kaplan S. Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol. Rev.* 1988;52(1):50–69.
- [61] Vermeglio A, Joliot P. The photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends Microbiol* 1999;47(11): 435–40.
- [62] Madigan MT, Cox JC, Gest H. Photopigments in *Rhodospseudomonas capsulata* cells grown anaerobically in darkness. *J Bacteriol.* 1982;1422–9.
- [63] Miyake J, Tatsuki W, Schnackenberg J, Arai T, Asada Y. Simulation of the daily sunlight illumination pattern for bacterial photo-hydrogen production. *J Biosci. Bioeng.* 1999;88(6):659–63.
- [64] Miyake J, Mao XY, Kawamura S. Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J Hydrogen Energy* 1987;12:1147–9.
- [65] El-Kahlout K, Yucel M, Zabut B, Turker L, GuzundU, Eroglu I. Effect of bacteriorhodopsin on hydrogen gas production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 in a Photobioreactor. M.Sc. thesis in Biotechnology, Middle East Technical University, 2002.
- [66] El-Shistawy RMA, Kawasaki S, Morimoto M. Cylindrical type induced and diffused photobioreactors: a novel photoreactor for large-scale H₂ production. In: Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. New York: Plenum Press, 1998.
- [67] Wakayama T, Toriyama A, Kawasugi T, Arai T, Asada Y, Miyake J. Photohydrogen production using photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* RV: simulation

- of the light cycle of natural sunlight using an artificial source. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. New York: Plenum Press, 1998.
- [68] Kondo T, Arakawa M, Hirai T, Wakayama T, Hara M, Miyake J. Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. *J Biosci Bioeng* 2002;93(2):145–50.
- [69] Melis A, Neidhardt J, Baroli I, Benemann JB. Maximizing photosynthetic productivity and light utilization by microalgae by minimizing the light-harvesting chlorophyll antenna size of the photosystems. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. London, New York: Plenum Press, 1998.
- [70] Otsuki T, Uchiyama S, Fujiki K, Fukunaga S. Hydrogen production by a floating type bioreactor. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. New York: Plenum Press, 1998.
- [71] Ormerod, J.C., K.S. Ormerod and H. Gest. Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: relationship with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. 94: 449-463.
- [72] Cohen-Bazire, G., W. R. Sistrom, and R. Y. Stanier. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 1957. 49: 25 – 68.
- [73] Liu, B.F., N.Q. Ren, J. Ding, G.J. Xie, and Guo W.Q. The effect of Ni²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. *Int. Hydrogen energy.* 2009. 34; 721 – 726.
- [74] Goh, K.M., N.M. Mahadi, O. Hassan, Rahman, R.N. Zaliha, RA Hahman and Illias, R.M. The effects of reaction conditions on the production of γ -cyclodextrin from tapioca starch by using a novel recombinant engineered CGTase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2007 49: 118-126.

- [75] Takakuwa. S., Odom. J. M., and Wall J. D. Hydrogen uptake deficient mutant of *Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbial. 1983. 136, 20-25.

ภาคผนวก ก

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium of Ormerod

Ormerod และคณะ [71] ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนเป็นโมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

ประกอบด้วย

K_2HPO_4	0.9	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.6	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	75.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	11.8	มิลลิกรัมต่อลิตร
EDTA. 2Na	20.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
<i>p</i> -aminobenzoic acid	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Thiamine HCl	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Biotin	15.0	ไมโครกรัมต่อลิตร
Nicotinic acid	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Trace element	1.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

Trace element ประกอบด้วย

H_3BO_3	280.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	210.0	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	75.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	24.0	มิลลิกรัม
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	4.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8-7.0 ต้มเป้งมันสำปะหลังให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วย

ภาคผนวก ข

1. การวัดความขุ่นของเซลล์

นำสารละลายตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออก นำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดแป้งมันสำปะหลัง ที่ติดมากับตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำให้เช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดแป้งมันสำปะหลัง จากนั้นนำเซลล์ไปละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่าเดิม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) (ดัดแปลงจากวิธีของ Cohen-Bazire และคณะ [72])

2.1 นำจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง ที่มีคลอโรสเป็นแหล่งคาร์บอนและโมโนโซเดียมกลูตามेटเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เจริญในอาหารเหลวสูตร A อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 1 ต่อ 1 มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น $\times 2x$ $4x$ $8x$ $16x$ $32x$ $64x$ $128x$ $256x$ ตามลำดับ

2.2 แบ่งแต่ละความเจือจางออกเป็นสองส่วน โดยแต่ละส่วนนำไปบรรจุในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยส่วนแรกนำไปสกัดแบคทีเรียโคลอโรฟิลล์ในที่มีด โดยใช้สารละลายผสมระหว่างอะซิโตน ต่อ เมทานอล อัตราส่วน 7 ต่อ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 150 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 770 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง

2. การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจน (ดัดแปลงจากวิธีของ Liu และคณะ [73])

การวัดปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC (Shizumasu) คู่กับตัวตรวจวัดชนิด thermal conductivity detector และคอลัมน์ $5A^\circ$ molecular sieve และควบคุมอุณหภูมิ injection port column oven และ detector เป็น 100, 60 และ 105 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ฮีเลียมเป็น carrier gas ที่อัตราการไหล 70 มล.ต่อนาที

3. การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรส (ดัดแปลงจากวิธีของ Goh และคณะ [74])

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสวัดโดยนำตัวอย่างสารละลายมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่ได้ด้วยวิธี

HPLC โดยนำส่วนใส 3 ส่วน มาผสมกับ acetonitrile 7 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วจึงนำมาผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Water 2414) ต่อกับคอลัมน์ Asahipac Shodex NH2P-50 4E (ขนาด 20 ซม.) และตัวตรวจวัด RI ใช้สารละลาย acetonitrile ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 1.0 มล.ต่อนาที โดยใช้กลูโคส มอลโตส และ มอลโตไตรโอส เป็นสารละลายมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase (ดัดแปลงจากวิธีของ Takakuwa และคณะ [75])

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ hydrogenase ด้วยวิธี methylene blue method โดยใช้หลอดแก้ว 2 หลอดต่อกันที่บริเวณปากหลอดด้วยจุกยางซิลิโคน หลอดแรกบรรจุสารละลาย เซลล์ที่อิมมูบิลไลซ์ด้วยก๊าซไฮโดรเจน ส่วนหลอดที่สอง บรรจุสารละลายปริมาตร 5 มล. ของ methylene blue ความเข้มข้น 80 M ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 20 mM (พีเอช 8.0) ในบรรยากาศไฮโดรเจน จากนั้นผสมสารละลายทั้ง 2 หลอดเข้าด้วยกัน แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วจึงวัดการค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร