สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *ANABAENA SIAMENSIS* ที่ถูกตรึง

HYDROGEN PRODCUTION OF AN IMMOBILIZED CYANOBACTERIUM *ANABAENA SIAMENSIS*

T117171

ภานุพล บุตรงาม

โสธิยา นางแย้ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
เลขทะเบียน 117171
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYDROGEN PRODCUTION OF AN IMMOBILIZED CYANOBACTERIUM *ANABAENA SIAMENSIS*

PANUPOL BOOTNGAM

SOTIYA NANGYAEM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY FACULTY OF SCIENCE KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ถูกตรึง

ชื่อนักศึกษา นายภานุพล บุตรงาม รหัสประจำตัว 50050847

นางสาวโสธิยา นางแย้ม รหัสประจำตัว 50050883

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ถูกตรึง
ชื่อนักศึกษา	นายภานุพล บุตรงาม รหัสประจำตัว 50050847
	นางสาวโสธิยา นางแย้ม รหัสประจำตัว 50050883
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นโดยไซยาโนแบคทีเรียเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งสำหรับอนาคต ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายและมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ *Anabaena siamensis* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและกระบวนการตรึงไนโตรเจน โครงงานพิเศษนี้ได้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก *A. siamensis* ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตและวุ้น จากการทดลองพบว่าอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต การสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *A. siamensis* โดยเซลล์ที่ถูกตรึงในอัลจิเนตจะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 3.275 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นและเซลล์อิสระ นอกจากนี้ ทั้งเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนยังถูกเหนี่ยวนำให้มีการผลิตได้มากถึง 10 -20 เท่า เมื่อมีการเติมสารรีดักแทนท์เมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนท์

คำสำคัญ : ไฮโดรเจน, ไซยาโนแบคทีเรีย, การตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Hydrogen Production of an Immobilized Cyanobacterium *Anabaena siamensis*
Students	Panupol Bootngam Sotiya Nangyaem
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Advisor	Asst.Prof.Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

Hydrogen produced by cyanobacteria is one of an alternative energy for the next future. The filamentous N_2 - fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* is the potential microorganism for H_2 production . It can evolve H_2 from the photosynthesis and N_2 fixing process. This project aims to study H_2 production of *A. siamensis* immobilized with alginate and aga. It was found that $BG11_0$ medium is the optimal for growth, heterocyst cells formation and H_2 production of *A. siamensis*. The alginate immobilized cells could produce H_2 with 3.275 $\mu molH_2/mgchla/h$ higher than the agar immobilized cells and the free-living cells. In additioning H_2 was the highest produced in both immobilized and free–living cells when cultivated in medium for 1 week and H_2 production was 10-20 times induced when adding the reductants methylviologen and sodium dithionite

Keywords : Hydrogen, Cyanobacteria, Cell Immobilization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความร่วมมือและการให้ความช่วยเหลือจาก ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และ ที่เสียสละเวลาให้แนวทางและคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ และ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะแนวทางการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานทำให้โครงงานมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้คำแนะนำสั่งสอน ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษาตลอดจนการทำโครงงานพิเศษนี้ และคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาตรี โทและเอกทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่องคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ภานุพล บุตรงาม
โสธิยา นางแย้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ไฮโดรเจน	4
2.2 พลังก๊าซไฮโดรเจน	5
2.3 กระบวนการผลิตพลังงานก๊าซไฮโดรเจน	6
2.3.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีอิเล็กโทรไลซิส	7
2.3.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูง	10
2.3.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส	16
2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย	18
2.4.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยตรง	18
2.4.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยอ้อม	20
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	21
2.5.1เอนไซม์ไนโตรจีเนส	21
2.5.2 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส	22
2.5.3 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	22
2.6 กระบวนการตรึงเซลล์	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.6.1 การตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับทางกาย (Adsorption) 25

2.6.2 การยึดจับของวัสดุตรึงด้วยพันธะโคเวเลนต์ 26

2.6.3 การตรึงเซลล์โดยการยึดจับ (Entrapment) 26

2.6.4 การตรึงเซลล์โดยการห่อเซลล์ในวัสดุตรึงให้เป็นเม็ด (Encapsulation) 28

2.6.5 การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน (Crosslinking) 29

2.7 ไซยาโนแบคทีเรีย 29

2.7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 30

2.7.2 ผนังเซลล์ 30

2.7.3 พิไลและการเคลื่อนที่ 30

2.7.4 ชีทหรือโครงสร้างที่ห่อหุ้มเซลล์ 31

2.7.5 โครงสร้างของโปรโตพลาสซึม 31

2.7.6 แก๊สแวคิวโอลหรือถุงเก็บก๊าซ 32

2.7.7 รงควัตถุและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง 33

2.7.8 อะไคนีท (Akinetes) 34

2.7.9 เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst) 34

2.7.10 กระบวนการตรึงไนโตรเจน 34

2.7.11 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 35

2.7.12 การจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย 36

2.8 *Anabaena siammensis* 36

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 37

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 40

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ 40

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 40

3.3 สารเคมี 40

3.3.1 ก๊าซสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย 40

3.3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.4 อุปกรณ์ 41

3.5 วิธีการทดลอง 41

3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* 41

3.5.2 วีธีการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ 41

3.5.3 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Anabaena siamensis* 42

3.5.4 วิธีการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน 42

3.5.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอฟิลล์ 42

3.5.6 วิธีการตรึงเซลล์ 43

3.5.7 วิธี การวัดปริมาณไฮโดรเจนในเซลล์ที่ถูกตรึง 45

3.5.8 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเซลที่ถูกตรึง 45

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 46

4.1 ผลการแปรผันอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน ของเชื้อ Anabaena siamensis 46

4.2 ผลการศึกษาโครงสร้างภายในของเม็ดเจลของ ไซยาโนแบคทีเรียที่ถูกตรึงโดยโซเดียมอัลจิเนตและวุ้น 50

4.3 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ถูกตรึง กับเซลล์ปกติ 51

4.4 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ที่ถูกตรึงในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง 55

4.5 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยการเติมสารรีดักแทนท์ 56

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ 58

5.1 สรุปผลการทดลอง 58

5.2 ข้อเสนอแนะ 58

เอกสารอ้างอิง 60

ภาคผนวก ก 62

ภาคผนวก ข 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 3	สภาวะต่างๆ ที่แสดงถึงความเหมาะสมของเครื่อง GC ในการวัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	43
ตารางที่ ก	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ BG11 $BG11_0$และ Allen-Arnon	62
ตารางที่ ข-1	ข้อมูลการวัดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแปรผันอาหารสามชนิด(BG11 $BG11_0$ Allen-Arnon)	64
ตารางที่ ข-2	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากเซลล์อิสระเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุตรึงเซลล์ที่แตกต่างกันที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร $BG11_0$	65
ตารางที่ ข-3	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่ปราศจากการเติมสารเร่งปฏิกิริยาและเซลล์ที่มีการเติมสารเร่งปฏิกิริยา	65
ตารางที่ ข-4	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เซลล์ผลิตขึ้น ณ เวลา 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แหล่งของวัตถุดิบและวิธีการต่างๆ ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	7
2.2 เครื่องมือกระบวนการทำงานการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีอิเล็กโทรไลซ์	8
2.3 การทำงานของวิธีอิเล็กโทรไลซิสแบบพอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรน	10
2.4 กลไกการทำงานของอัลคาไลน์อิเล็กโทรไลซิส	10
2.5 กลไกลการทำงานของโลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลเซอร์	11
2.6 กลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดย วิธีโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอลตั้งแต่ระดับของห้องปฏิบัติการจนถึงกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม	17
2.7 การเลี้ยงเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ในถังหมัก โดยถังหมักจะต้องมีลักษณะโปร่งใสเพื่อให้เซลล์ที่อยู่ในถังหมักสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้	17
2.8 การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยออกซิเจนและไฮโดรเจนจะถูกนำมาใช้ในการแยกและเป็นแหล่งพลังงานของคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน	19
2.9 วิถีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักในสภาวะที่ปราศจากแสงของไซยาโนแบคทีเรีย	20
2.10 ลักษณะการตรึงเซลล์ในรูปแบต่างๆ	24
2.11 รูปแบบของทฤษฎีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ	27
2.12 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Anabaena siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 อาทิตย์	36
4.1 ก ปริมาณเซลล์ *Anabaena siamensis* ที่นับได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11, $BG11_0$ Allen-Arnon)	48
4.1 ข ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11, $BG11_0$ Allen-Arnon)	48
4.1 ค จำนวนเฮเทอโรซีสต์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11, $BG11_0$ Allen-Arnon)	49
4.1 ง ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11, $BG11_0$ Allen-Arnon)	49
4.2 ก ภาพของเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.2 ข ภาพของเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ถูกตรึงในวุ้น	52
4.3 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและที่ถูกตรึงด้วยวุ้น ในอาหารสูตร $BG11_0$	53
4.4 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ผลิตขึ้น ณ เวลา 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์ จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ $BG11_0$	56
4.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเซลล์อิสระและเซลล์ ที่ถูกตรึงกับสารรีดักแทนท์	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบัน ประเทศไทยซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนา มีความพยายามที่จะพัฒนาตัวเองให้มีความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีและมีการขยายตัวทางเศษกิจให้มากยิ่งขึ้น เพื่อที่จะทัดเทียมกับประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งการพัฒนาดังกล่าวจำเป็นต้องใช้พลังงานเป็นจำนวนมาก พลังงานที่เรานิยมใช้กันในปัจจุบันก็คือพลังงานในรูปของน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งเป็นพลังงานที่มีราคาผันผวนไม่คงที่และยังมีไม่มากพอกับความต้องการของประชากรที่เพิ่มสูงขึ้นอยู่ตลอดเวลาและพลังงานชนิดนี้ก็มีอยู่ในปริมาณที่จำกัดและกำลังจะหมดลงทุกวันในระยะเวลาไม่นานนัก นอกจากนี้การใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียมยังก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาและส่งผลให้เกิดสภาวะโลกร้อน (global warming) ซึ่งทวีความรุนแรงขึ้นทุกวัน ดังนั้น รัฐบาลและหน่วยงานต่างๆ ทั้งในประเทศไทยและทุกประเทศทั่วโลกได้มีความพยายามในการแสวงหาพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ที่มีอยู่อย่าง ไม่จำกัดและต้องไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานทดแทนที่มีการศึกษาในปัจจุบันคือ พลังงานลม พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงานก๊าซชีวภาพ พลังงานไฟฟ้า และพลังงานไฮโดรเจน

พลังงานในรูปของก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานเชื้อเพลิงชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเผาไหม้สูง เนื่องจากเมื่อถูกนำไปเผาไหม้แล้วจะไม่ก่อให้เกิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่จะเกิดเป็นน้ำซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและยังเพิ่มปริมาณน้ำและความชื้นให้กับอากาศอีก ดังนั้นพลังงานไฮโดรเจนจึงถือเป็นพลังงานที่ได้รับการยอมรับและคาดว่าอาจจะเป็นแหล่งพลังงานแหล่งใหม่ของมนุษย์ ในระยะเวลาอีกไม่นานนัก กระบวนการพลังงานไฮโดรเจนสามารถทำได้โดยผลิตจากซากฟอสซิลหรือการแตกตัวของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าซึ่งกระบวนการผลิตนั้นต้องใช้เทคโนโลยีและค่าใช้จ่ายสูงและยังเสี่ยงต่อการระเบิดที่อาจเกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ ในกระบวนการผลิต นอกจากนี้ กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนยังสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต อันได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย ในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งใช้น้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศได้ทำให้ประหยัดแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพในเซลล์ได้ 2 กระบวนการคือ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยอิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำจะไปรวมตัวกับโปรตอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดยเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนและปฏิกิริยาผันกลับคือการสลายไฮโดรเจน ส่วนกระบวนการที่ 2 คือกระบวนการตรึงไนโตรเจน ซึ่งในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดที่มีลักษณะเป็นเส้นสายสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศให้เป็นแอมโมเนียและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตผลพลอยได้ ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส จากนั้นไฮโดรเจนที่ผลิตได้จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสให้กลายเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนต่อไป

ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีเอนไซม์สองชนิดที่ใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนคือเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จึงน่าจะมีการผลิตไฮโดรเจนที่มากกว่าพวกไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่สร้างไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงเพียงอย่างเดียว

กระบวนการตรึงเซลล์ (cell immobilization) เป็นกระบวนการที่มีการใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1989 โดย Carturan ซึ่งได้ทำการทดลองตรึงเซลล์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ต่อมาก็ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้กับเซลล์และสารทางชีวภาพต่างๆ มากมาย ซึ่งได้แก่ โปรตีน เอนไซม์ แอนติบอดี เซลล์แบคทีเรีย เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เซลล์พืช และเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งวัตถุประสงค์ของการตรึงเซลล์นั้นเพื่อที่จะเพิ่มอายุการพักตัวของเซลล์และป้องกันการปนเปื้อนจากพวกจุลินทรีย์ที่อาจจะมีผลอันตรายต่อเซลล์ที่เคลือบอยู่ นอกจากนี้แล้วกระบวนการเคลือบเซลล์ยังนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิซึ่งก็คือไฮโดรเจนในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหาร BG11,$BG11_0$ และ Allen -Arnon เพื่อเปรียบเทียบหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรึงเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจน จากนั้น ทำการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในวัสดุตรึงได้แก่ โซเดียมอัลจิเนตและวุ้นซึ่งในวัสดุตรึงแต่ละชนิดก็จะมีส่วนผสมของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* นำเซลล์ที่ถูกตรึงมาทำการเลี้ยงลงในขวดรูปชมพู่โดยเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ศึกษาในช่วงแรก จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วทำการวัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทุกสัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ศึกษาปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ถูกตรึงที่มีการติมสารรีดักแทนท์ 2 ชนิด คือ เมธิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนท์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ถูกตรึงได้และทราบสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ในปัจจุบันโลกของเรากำลังเผชิญกับปัญหาสภาวะโลกร้อนซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อในโลกเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นภัยธรรมชาติต่างๆ ที่รุนแรงขึ้นทุกวัน โดยส่งผลต่อความเสียหายต่อชีวิตและทรัพย์สินของมนุษย์เป็นจำนวนมากมายมหาศาล ซึ่งผลกระทบเหล่านี้ล้วนมีสาเหตุมาจากการกระทำของมนุษย์ที่ดำรงชีวิตบนโลกที่มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาขึ้นอยู่ตลอดเวลาจากการพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ ได้มีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติและทำลายสมดุลต่างๆ ของโลก ไม่ว่าจะเป็นการตัดไม้ทำลายป่า การเผาไหม้เชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนจากยานพาหนะ ซึ่งถือเป็นการทำลายชั้นโอโซนที่มีความสำคัญในกระบวนการควบคุมอุณหภูมิและสมดุลการเปลี่ยนแปลงของโลก นอกจากนี้แล้วการทำลายหรือการใช้ทรัพยากรที่กล่าวมาข้างต้นอย่างไม่ระมัดระวังก็อาจจะทำให้เกิดการขาดแคลนทรัพยากรดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปและไม่สามารถที่จะสร้างพลังงานชนิดนี้ขึ้นมาใหม่ได้ในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการศึกษาหาพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานชนิดหนึ่งซึ่งเป็นพลังงานที่สะอาดปลอดภัยและสามารถนำมาใช้กับรถยนต์หรือยานพาหนะอื่นๆ ได้โดยไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน

ไฮโดรเจน (อังกฤษ : hydrogen ; ละติน hydrogenium) เป็นธาตุเคมี ซึ่งมีสัญลักษณ์ในตารางธาตุเป็น H และมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 ที่อุณหภูมิห้องและในสภาวะความดันบรรยากาศไฮโดรเจนจะอยู่ในสถานะเป็นก๊าซซึ่งมีโมเลกุล 2 อะตอม ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย เป็นอโลหะและมีเวเลนซ์อิเล็กตรอนชั้นนอกสุด (เวเลนซ์อิเล็กตรอน) เพียงตัวเดียว ไฮโดรเจนสามารถที่จะพบได้ทุกที่และเป็นธาตุที่พบได้มากที่สุดในจักรวาลซึ่งเป็นต้นกำเนิดของสารต่างๆ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของสารที่มีอยู่ทั้งหมดบนโลก และยังพบมากเป็นอันดับสามของสารที่อยู่บนผิวโลก นอกจากนี้ ยังสามารถพบได้ในน้ำ สารอินทรีย์และสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก โดยธรรมชาติไฮโดรเจนจะมีลักษณะเป็นก๊าซที่อุณหภูมิห้องและภายใต้ความดันบรรยากาศ ไฮโดรเจนจะมีลักษณะเป็นก๊าซสีขาว ใส ไม่มีกลิ่น และไม่มีพิษซึ่งถือว่าเป็นลักษณะสำคัญที่มีความแตกต่างจากเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน และเมื่อก๊าซไฮโดรเจนเกิดการเผาไหม้กับออกซิเจนก็จะมีการปล่อยพลังงานในรูปของความร้อนและน้ำออกมาหมด และเมื่อเกิดการเผาไหม้ในอากาศ โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปล่อยพลังงานในรูปของความร้อนและน้ำออกมาหมด และเมื่อเกิดการเผาไหม้ในอากาศ โดยส่วนใหญ่แล้วในอากาศจะมีไนโตรเจนอยู่ในปริมาณมากบางทีก็อาจจะเกิดออกไซด์ของไนโตรเจน (NO_x) โดยสารตัวนี้จะเป็นสาเหตุทำให้เกิดหมอกควันของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน แต่ในกระบวนการเผาไหม้ไฮโดรเจนนั้นไม่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจึงไม่เกิดหมอกควัน ดังนั้นการใช้เชื้อเพลิงไฮโดรเจนจึงเป็นการลดปริมาณ คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อน

2.2 พลังงานก๊าซไฮโดรเจน

พลังงานก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่ไม่ได้อยู่ในรูปปฐมภูมิที่สามารถนำไปใช้ได้เลย เหมือนกับพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลหรือพลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียม แต่จะต้องนำมาผ่านกระบวนการที่ก่อให้เกิดพลังงาน โดยเซลล์เชื้อเพลิงไฮโดรเจนได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพการให้พลังงานสูงกว่าพลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียม และไม่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ก๊าซไฮโดรเจนถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1766 โดย Henry Cavendish นักเคมีและฟิสิกส์ที่มีชื่อเสียงชาวอังกฤษ ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเป็นส่วนประกอบของน้ำโดยจะรวมกันอยู่ในรูปของไฮโดรเจนกับออกซิเจน และต่อมาในช่วงศตวรรษที่ 18 จนถึงกลางศตวรรษที่ 19 ได้มีการผลิตทาวน์ก๊าซซึ่งเป็นก๊าซที่ผลิตขึ้นจากถ่านซึ่งนำมาใช้ในการให้แสงสว่างและให้ความร้อน โดยจะนำมาใช้ตามบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมในยุโรปและอเมริกา ส่วนประกอบของทาวน์ก๊าซนั้นจะมีไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 50 เปอร์เซนต์ของส่วนผสมทั้งหมดโดยอยู่ในรูปของก๊าซมีเทนและมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลักด้วยนอกจากนี้ยังมีคาร์บอนมอนอกไซด์ 3 ถึง 6 เปอร์เซนต์ในองค์ประกอบของทาวน์ก๊าซ

ความจำเป็นที่ต้องมีการใช้พลังงานก๊าซไฮโดรเจนนั้นมาจากสาเหตุสำคัญดังต่อไปนี้คือ

1.) ความต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลลดจำนวนลงเรื่อยๆ ซึ่งไม่เพียงพอกับความต้องการที่เพิ่มมากขึ้นทุกวัน จึงจำเป็นที่จะต้องหาพลังงานในรูปอื่นขึ้นมาทดแทน

2.) พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้กันในปัจจุบันเกิดจากการสะสมเป็นระยะเวลายาวนานและมีอยู่อย่างจำกัด ทำให้เกิดปัญหาทางด้านราคาที่สูงขึ้น นอกจากนี้พลังงานชนิดนี้มีอย่างจำกัดซึ่งตรงข้ามกับความต้องการที่มีอย่างไม่จำกัดซึ่งส่งผลต่อเศรษฐกิจระดับประเทศได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.) ผลจากการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ใช้กันในปัจจุบันจะได้เป็นก๊าซออกไซด์ ซึ่งส่งผลต่อสภาวะอากาศทำให้อุณหภูมิของโลกเกิดการเปลี่ยนแปลงและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ที่ดำรงชีวิตอยู่บนโลก ซึ่งปัญหาเหล่านี้กำลังทวีความรุนแรงมากขึ้นทุกวัน

ประโยชน์ของพลังงานก๊าซไฮโดรเจนนั้นมี 4 ข้อดังต่อไปนี้

1.) การใช้พลังงานก๊าซไฮโดรเจนจะลดปริมาณมลพิษ เนื่องจากเมื่อเกิดการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนกับออกซิเจนในเซลล์เชื้อเพลิงจะทำให้เกิดเป็นพลังงานไฟฟ้าโดยสามารถที่จะนำไปใช้ในยานพาหนะและในรูปอื่นๆ โดยข้อดีของการใช้พลังงานก๊าซไฮโดรเจนคือ เมื่อเกิดการเผาไหม้กับออกซิเจนแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นน้ำและความร้อนซึ่งแตกต่างจากพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นก๊าซที่ทำให้เกิดสภาวะเรือนกระจก

2.) พลังงานก๊าซไฮโดรเจนสามารถที่จะผลิตขึ้นได้จากแหล่งต่างๆ มากมายทั้งกระบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์สิ่งมีชีวิตบางชนิดและทางกายภาพโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีของสารโดยตรง แหล่งวัตถุดิบที่ใช้ผลิตพลังงานก๊าซไฮโดรเจนได้แก่ ความร้อน แสงอาทิตย์ กระแสไฟฟ้า มีเทน ก๊าซโซลีน สารชีวมวล ถ่านหินและน้ำซึ่งวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งผลิตก๊าซไฮโดรเจนแต่ละชนิดจะให้ปริมาณความบริสุทธิ์ของก๊าซไฮโดรเจนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการผลิตและวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งานซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.1

3.) ถ้าการผลิตพลังงานก๊าซไฮโดรเจนใช้น้ำเป็นแหล่งวัตถุดิบ จะทำให้มีพลังงานก๊าซไฮโดรเจนใช้อย่างไม่จำกัด ซึ่งในกระบวนการผลิตจะใช้วิธีการอิเล็กโทรไลซิสในการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งการผลิตพลังงานก๊าซไฮโดรเจนในรูปแบบนี้ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่มีราคาสูงและส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม แต่จะใช้พลังงานไฟฟ้าที่ผลิตได้จาก กระแสลม กระแสน้ำ หรือแสงอาทิตย์ ซึ่งมีอยู่อย่างมากมายมหาศาลบนโลก

2.3 กระบวนการผลิตพลังงานก๊าซไฮโดรเจน

พลังงานก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกที่สามารถจะผลิตขึ้นได้จากกระบวนการแตกตัวโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ซึ่งในการที่จะทำการแตกโมเลกุลของน้ำนั้นจำเป็นที่จะต้องอาศัยพลังงานในรูปแบบอื่นหรืออาศัยกลไกเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตซึ่งวิธีการเพื่อให้ได้พลังงานไฮโดรเจนซึ่งได้มีการพัฒนาเทคนิคกระบวนการผลิตต่างๆ เพื่อจะใช้ในรูปแบบที่สามารถแข่งขันกับพลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่มีราคาสูงมากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบันกระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกาและห้องปฏิบัติการการผลิตพลังงานแห่งชาติสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

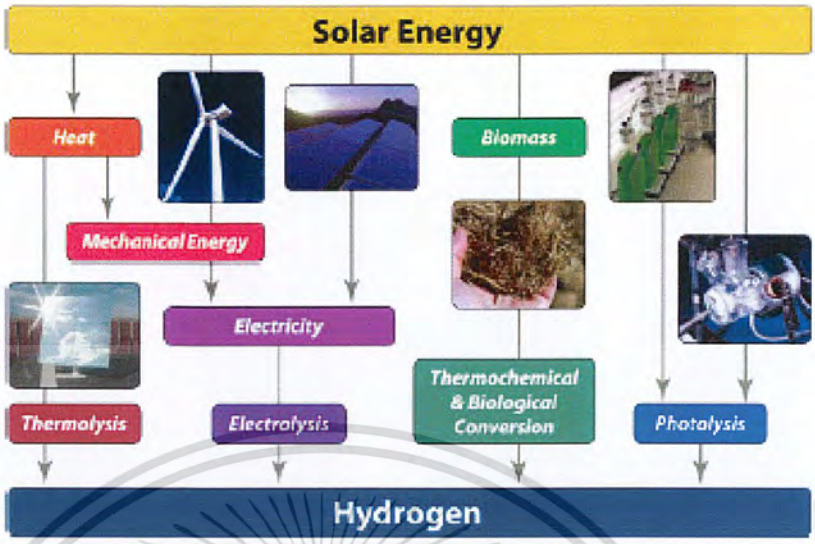


Figure 1. Renewable pathways for hydrogen production.

รูปที่ 2.1 แหล่งของวัตถุดิบและวิธีการต่างๆ ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
ที่มา : John Turner และคณะ, 2007.

ได้พัฒนาเทคนิคการผลิตไฮโดรเจนจากพลังงานที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งถือเป็นแหล่งพลังงานทดแทน โดยตั้งเป้าให้มีราคา 2 – 3 เหรียญดอลลาร์ต่อกิโลกรัม เพื่อให้สามารถที่จะแข่งขันกับก๊าซโซลีนที่ใช้กับยานพาหนะ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีหลายวิธีดังต่อไปนี้

2.3.1 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีอิเล็กโทรไลซิส

เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำออกเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในส่วนที่เรียกว่าอิเล็กโทรไลต์เซอร์ซึ่งจะถูกประยุกต์ให้มีขนาดที่เล็ก เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณมาก ซึ่งไฮโดรเจนจะไม่ก่อให้เกิดสภาวะก๊าซเรือนกระจกในระหว่างกระบวนการผลิต เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนแปลงพลังงานกลหรือพลังงานไฟฟ้าจากรูปแบบอื่นๆ เช่น พลังงานจากกังหันลมมาเป็นพลังงานไฟฟ้าเพื่อที่จะนำมาทำการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการอิเล็กโทรไลซิส (รูปที่ 2.2)

ส่วนพลังงานก๊าซไฮโดรเจนที่สร้างจากกระบวนการอิเล็กโทรไลซิสก็ไม่ทำให้เกิดสภาวะก๊าซเรือนกระจกเช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับแหล่งของพลังงานไฟฟ้าที่นำมาทำการผลิตด้วย ซึ่งจะต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพการทำงาน รวมทั้งราคาของต้นทุนแหล่งพลังงานไฟฟ้าด้วย ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการอิเล็กโทรไลซิสถูกพิจารณาถึงประโยชน์ที่จะนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.2 เครื่องมือกระบวนการทำงานการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีอิเล็กโทรไลซ์
ที่มา : https://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/production/electro_processes.html

ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการอิเล็กโทรไลซิสถูกพิจารณาถึงประโยชน์ที่จะนำไปใช้โดยในปัจจุบัน กระบวนการดังกล่าวนี้ไม่ใช่เป็นแค่เพียงแนวคิดเท่านั้น แต่มีหลายๆประเทศทั่วโลกนำไปใช้ เนื่องจากไม่ก่อปัญหาด้านมลภาวะทางอากาศและสภาวะเรือนกระจก

การทำงานของการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้เหมือนกับเซลล์พลังงานเชื้อเพลิงทั่วไป โดยจะมีอิเล็กโทรไลต์เซอร์ซึ่งจะทำหน้าที่ในการเกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทรไลซิสซึ่งจะมีขั้วบวกและขั้วลบของไฟฟ้าแยกออกจากกัน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดอิเล็กโทรไลต์เซอร์ดังต่อไปนี้

1. พอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรน (PEM electrolyzer)

เป็นเยื่อพอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์ที่เป็นของแข็งชนิดพลาสติก ซึ่งมีหลักการทำงานคือน้ำจะทำปฏิกิริยากับขั้วลบแล้วได้เป็นออกซิเจนและประจุบวกของไฮโดรเจน ส่วนอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไหลไปสู่ด้านนอกของวงจรและต่อมาไฮโดรเจนไอออนก็จะเคลื่อนที่ผ่านเยื่ออิเล็กโทรไลต์เซอร์ PEM ไปยังขั้วลบและต่อมาอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่อยู่นอกวงจรจะมารวมตัวกับไฮโดรเจนไอออนที่ขั้วลบได้เป็นก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.3) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้วแสดงดังต่อไปนี้

$$\text{Anode} : 2H_2O \longrightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^- \quad (1)$$

$$\text{Cathode} : 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2 \quad (2)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แอลคาไลน์อิเล็กโทรไลต์เซอร์หรืออิเล็กโทรไลต์เซอร์โลหะ

เป็นวิธีที่ทำกันมานานซึ่งมีความคล้ายกันกับพอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรน แต่ใช้สารละลายที่เป็นโลหะอัลคาไลน์ เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยจะทำปฏิกิริยากับอิเล็กโทรไลต์เมื่ออยู่ในสารละลายโลหะอัลคาไลน์แล้วจะแสดงคุณสมบัติเป็นขั้วบวกหรือขั้วลบซึ่งสภาวะเช่นนี้ จะทำให้เกิดการแยกโมเลกุลของน้ำออก โดยออกซิเจนจะถูกแยกออกมาจากขั้วลบ ส่วนไฮโดรเจนจะถูกแยกออกมาที่ขั้วบวก (รูปที่ 2.4)

3. โลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลท์เซอร์ (Solid Oxide Electrolyzer)

เป็นอิเล็กโทรไลท์เซอร์ที่มีโลหะออกไซด์หรือกระเบื้องเป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะใช้เป็นตัวอิเล็กโทรไลท์ให้ประจุลบของออกซิเจนเคลื่อนที่ผ่าน ปฏิกิริยาจะต้องใช้อุณหภูมิสูงและได้

4. โลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลท์เซอร์ (Solid Oxide Electrolyzer)

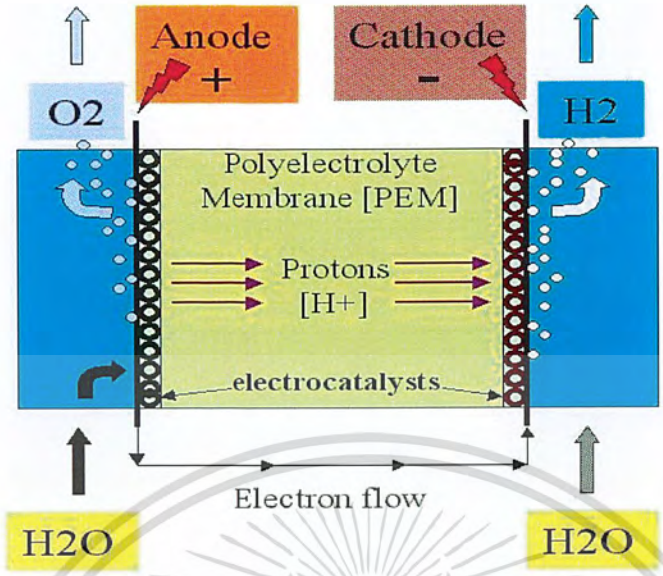
เป็นอิเล็กโทรไลท์เซอร์ที่มีโลหะออกไซด์หรือกระเบื้องเป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะใช้เป็นตัวอิเล็กโทรไลท์ให้ประจุลบของออกซิเจนเคลื่อนที่ผ่าน ปฏิกิริยาจะต้องใช้อุณหภูมิสูงและได้ไฮโดรเจนน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีการนี้ทำได้โดยให้น้ำเกิดการจับตัวที่ขั้วลบและอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ออกนอกวงจรของอิเล็กโทรไลท์ เพื่อที่จะสร้างเป็นก๊าซไฮโดรเจนและประจุลบของออกซิเจนไอออน ต่อมาประจุลบของออกซิเจนไอออนจะเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนไปทำปฏิกิริยาที่ขั้วบวกและเกิดเป็นก๊าซออกซิเจนกับอิเล็กตรอนซึ่งจะเคลื่อนที่ออกนอกวงจรเพื่อที่จะไปรวมตัวกับไฮโดรเจนไอออนที่ขั้วลบแล้วเกิดเป็นก๊าซไฮโดรเจน(รูปที่ 2.5) ตัวอย่างปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้โลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลท์เซอร์แสดงดังนี้

$$Si(OH)_4\,(g) \longrightarrow SiO2\,(l) + H_2O(g) \qquad (3)$$

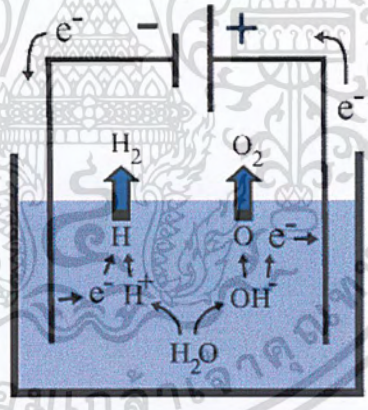
$$H_2O + 2e^- \longrightarrow H_2 + O^{2-} \qquad (4)$$

ในกระบวนการนี้จะต้องใช้อุณหภูมิที่สูงมากถึง 500 องศาเซลเซียส ถึง 800 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าสองวิธีที่กล่าวมาข้างต้นดังนั้น วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากเป็นกระบวนการที่สิ้นเปลืองพลังงานและมีการปลดปล่อยความร้อนทิ้งออกมาสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การทำงานของวิธีอิเล็กโทรไลซิสแบบพอลิเมอร์อิเล็กโทรไลต์เมมเบรน
ที่มา : http://www.ic.gc.ca/eic/site/wei-iee.nsf/eng/00177.html



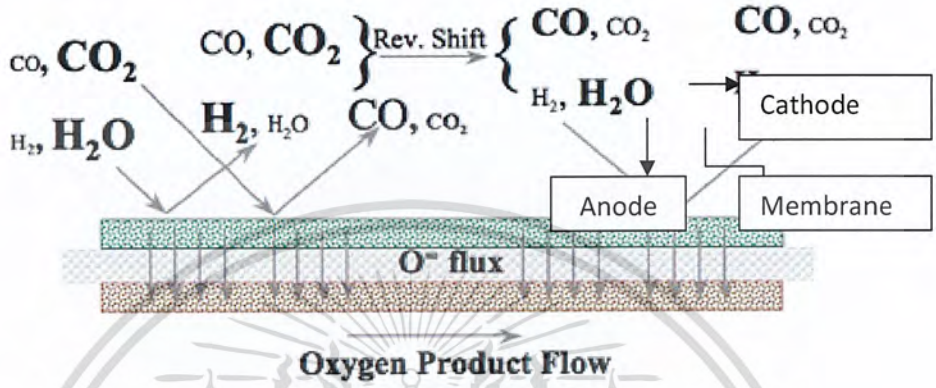
รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานของอัลคาไลน์อิเล็กโทรไลซิส
ที่มา : http://www.nmsea.org/Curriculum/7_12/electrolysis/electrolysis.htm

2.3.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูง

เป็นกระบวนการสร้างไฮโดรเจนจากพลังงานแหล่งต่างๆ มากมายเช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และสารชีวมวล ซึ่งไฮโดรเจนจะเป็นโครงสร้างของโมเลกุลเหล่านี้ โดยใช้รูปแบบของการเผาไหม้ การใช้ความร้อนซึ่งเกี่ยวข้องกับวัฏจักรทางเคมีในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบ เช่น น้ำ เรียกกระบวนการนี้ว่า เทอร์โมเคมิคอล กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงนี้สามารถแบ่งออกเป็นหลายวิธี ดังต่อไปนี้



รูปที่ 2.5 กลไกลการทำงานของโลหะออกไซด์อิเล็กโทรไลเซอร์

ที่มา : http://www.transportation.anl.gov/fuel_cells/solid_oxide.html

1. กระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปของก๊าซธรรมชาติ

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปัจจุบันนิยมใช้วิธีนี้กันมาก โดยจะใช้แหล่งพลังงานเชื้อเพลิงคือซากฟอสซิล ซึ่งก็คือก๊าซธรรมชาติได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้สามารถที่จะแบ่งออกเป็น 2 วิธีดังนี้

1.1 การเปลี่ยนแปลงรูปของไอมีเทน (Stream Methane Reforming)

กระบวนการนี้จะใช้อุณหภูมิสูงในรูปของไอน้ำให้กับมีเทนซึ่งเป็นก๊าซธรรมชาติ โดยอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง 700–1,000 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตไฮโดรเจน ในกระบวนการนี้มีเทนจะทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่อุณหภูมิสูงที่ความดัน 2–25 บาร์ (1 บาร์เท่ากับ 14.5 ความดันบรรยากาศ) โดยถ้ามีคาร์บอนมอนอกไซด์และคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณน้อย ก็จะเป็นกระบวนการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปโครงสร้างของสารโดยใช้ไอน้ำนี้จะเป็นปฏิกิริยาดูดความร้อน ดังนั้น จึงต้องใช้ความร้อนในปฏิกิริยาของกระบวนการ ในขั้นตอนต่อมาก็จะเกิดปฏิกิริยาการเคลื่อนที่ของไอน้ำ (Water Gas Shift Reaction) โดยคาร์บอนมอนอกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไอน้ำเกิดการเร่งปฏิกิริยาสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนออกมาโดยจะมีไฮโดรเจนออกมาในปริมาณที่มากกว่า ต่อมากระบวนการสุดท้าย เป็นกระบวนการดูดซับภายใต้ความดัน (Pressure Swing Adsorbtion) โดยคาร์บอนไดออกไซด์และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก๊าซอื่นๆ จะเกิดการเคลื่อนที่ไปเป็นไอก๊าซและมีการปลดปล่อยก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์ออกมา นอกจากนี้กระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปของพลังงานเชื้อเพลิงให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนนี้ก็สามารถที่จะนำมาใช้กับวัตถุดิบในรูปอื่นๆ ได้ เช่น เอทานอล โพรเพน หรือแม้กระทั่งก๊าซโซลีน เช่น ออกเทน และโทลูอีน ซึ่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนแสดงดังต่อไปนี้

ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงรูปโดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิสูง (Stream Reforming Reaction)

$$\text{Methane} : CH_4 + H_2O + (\text{heat}) \longrightarrow CO + 3H_2 \quad (5)$$

$$\text{Propane} : C_3H_8 + 3H_2O + (\text{heat}) \longrightarrow 3CO + 7H_2 \quad (6)$$

$$\text{Ethanol} : C_2H_5OH + H_2O + (\text{heat}) \longrightarrow 2CO + 4H_2 \quad (7)$$

$$\text{Octane} : C_8H_{18} + 8H_2O + (\text{heat}) \longrightarrow 8CO + 17H_2 \quad (8)$$

$$\text{Toluene} : C_7H_8 + 7H_2O + (\text{heat}) \longrightarrow 7CO + 11H_2 \quad (9)$$

ปฏิกิริยาการจับตัวกับไอน้ำ (Water - Gas Shift Reaction)

$$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + H_2 + (\text{heat}) \quad (10)$$

1.2 กระบวนการออกซิเดชันเพียงบางส่วนของมีเทน (Partial Oxidation)

มีเทนและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจากก๊าซธรรมชาติจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในปริมาณที่จำกัด โดยใช้ออกซิเจนซึ่งโดยทั่วไปจะมาจากอากาศภายนอก ที่มีปริมาณที่ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถที่จะออกซิไดซ์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำปริมาณของออกซิเจนที่น้อยนี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในปฏิกิริยา เริ่มต้นจะมีการสร้างไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ (หรือในบางทีอาจมีไนโตรเจนด้วยเนื่องจากไม่ได้ใช้ออกซิเจนบริสุทธิ์แต่จะใช้อากาศแทน) และอาจมีคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณน้อย นอกจากนี้ ยังอาจมีสารประกอบชนิดอื่นๆ ด้วย ต่อมา จะเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวกับไอน้ำ (water – Gas Shift Reaction) โดยคาร์บอนมอนอกไซด์จะเกิดการรวมตัวกับไอน้ำกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนโดยจะมีปริมาณที่มากกว่าคาร์บอนไดออกไซด์ กระบวนการออกซิเดชันเพียงบางส่วนนี้จะเป็นปฏิกิริยาการคายความร้อน ซึ่งจะมีการปล่อยความร้อนออกมาหลังจากที่มีการเกิดปฏิกิริยา กระบวนการโดยทั่วไปนั้นจะเกิดขึ้นเร็วกว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยไอน้ำ จึงต้องทำในถังหมักที่เป็นหลอดขนาดเล็ก กระบวนการออกซิเดชันเพียงบางส่วนสามารถแสดงดังปฏิกิริยาเคมีข้างล่างนี้ ซึ่งจากปฏิกิริยาจะได้ผลิตภัณฑ์ก๊าซไฮโดรเจนน้อยกว่ากระบวนการใช้ไอน้ำเปลี่ยนแปลงรูปปฏิกิริยาการออกซิเดชันเพียงบางส่วนของโครงสร้าง (Partial – Oxidation Reaction)

$$\text{Methane} : CH_4 + 1/_2O_2 \longrightarrow CO + 2H_2 + (\text{heat}) \quad (11)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{Propane} : C_3H_8 + 1/_2O_2 \longrightarrow 3CO + 4H_2 + (\text{heat}) \quad (12)$$

$$\text{Ethanol} : C_2H_5OH + 1/_2O_2 \longrightarrow 2CO + 3H_2 + (\text{heat}) \quad (13)$$

$$\text{Octane} : C_8H_{18} + 4O_2 \longrightarrow 8CO + 9H_2 + (\text{heat}) \quad (14)$$

$$\text{Toluene} : C_7H_8 + 3/2O_2 \longrightarrow 7CO + 4H_2 + (\text{heat}) \quad (15)$$

ปฏิกิริยาการรวมตัวกับไอน้ำ (Water – Gas Shift Reaction)

$$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + H_2 + (\text{heat}) \quad (16)$$

2. กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากถ่านหิน

เป็นกระบวนการทางเคมีซึ่งมีความซับซ้อนและมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่ค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยกระบวนการผลิตก๊าซโดยใช้ถ่านหินเป็นกระบวนการที่สามารถผลิตได้ทั้งพลังงาน น้ำมันเชื้อเพลิง สารเคมี และไฮโดรเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนซึ่งจะถูกสร้างขึ้นก่อน จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการทำปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นระหว่างถ่านหินกับออกซิเจนและไอน้ำภายใต้สภาวะความดันและอุณหภูมิสูง ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ก๊าซขึ้นโดยจะเป็นก๊าซที่ผสมกันระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ ปฏิกิริยาแสดงดังนี้

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปในกระบวนการผลิตก๊าซจากถ่านหิน (ซึ่งปฏิกิริยานี้ยังไม่ดุลสมการ)

$$CH_{0.8} + O_2 + H_2O \longrightarrow CO + CO_2 + H_2 + \text{สารชนิดอื่นๆ} \quad (17)$$

หลังจากเกิดการทำปฏิกิริยากันแล้ว ก๊าซที่ปนเปื้อนจะถูกกำจัดออกไป ส่วนคาร์บอนมอนอกไซด์จะเกิดการทำปฏิกิริยากับไอน้ำแล้วได้เป็นก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนจะถูกแยกออกจากระบบ ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ยึดจับและกำจัดออกไป

3. กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวล

สารชีวมวลเป็นวัสดุอินทรีย์ที่สามารถนำกลับมาใช้ ซึ่งอาจได้จาก เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าวสาลี วัสดุเศษเหลือจากโรงเลื่อยในอุตสาหกรรมป่าไม้ โดยเฉพาะพืชจำพวกหญ้า ซึ่งจัดเป็นพวกวัชพืชทางการเกษตร พืชเหล่านี้จะใช้พลังงานจากเศษสิ่งปฏิกูลที่ทิ้งจากชุมชนและสิ่งปฏิกูลจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน ดังนั้นพืชจำพวกนี้ถือว่าเป็นแหล่งสารชีวมวลที่สำคัญ

วิธีการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลนั้นบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการคือ

3.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลโดยการใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดัน

สารชีวมวลจะถูกแยกออกเป็นก๊าซไฮโดรเจนที่ไม่บริสุทธิ์ ซึ่งจะถูกผสมรวมอยู่กับคาร์บอนมอนอกไซด์และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งต่อมาจะทำการแยกก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์ออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากก๊าซผสมด้วยการทำปฏิกิริยาด้วยไอน้ำ (Water – Gas Shift Reaction) ซึ่งปฏิกิริยาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสารชีวมวลด้วยวิธีนี้แสดงดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 + H_2O \longrightarrow CO + CO_2 + H_2 + \text{สารชนิดอื่นๆ} \quad (18)$$

ปฏิกิริยารวมตัวกับไอน้ำ (Water – Gas Shift Reaction)

$$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + H_2 \text{ (heat)} \quad (19)$$

3.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสารชีวมวลด้วยวิธีไพโรไลซิส

เป็นวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลในสภาวะที่ปราศจากอากาศ โดยปกติทั่วไปแล้ว สารชีวมวลไม่สามารถที่จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยตรงเหมือนกับในถ่านหิน แต่จะมีการผลิตในรูปของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีแก๊สผสมอยู่ และในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนนี้จะเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจน คาร์บอนมอนอกไซด์ และคาร์บอนไดออกไซด์ผสมกันอยู่ การแยกก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์ออกจากไฮโดรเจนทำโดยการนำมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำ (Water – Gas Shift Reaction) ซึ่งผลผลิตที่ได้ก็จะเป็นก๊าซไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์

3.3 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชื้อเพลิงที่อยู่ในรูปของเหลว

เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเชื้อเพลิงชีวมวลที่อยู่ในรูปของเหลว ซึ่งได้แก่ เอทานอล น้ำมันที่ได้จากกระบวนการหมัก ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจะมีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น โดยขั้นตอนวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะคล้ายกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติซึ่งได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยสามารถสรุปเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นได้ดัง 2 ปฏิกิริยาดังนี้

Steam Reforming Reaction (Ethanol) :

$$C_2H_5OH + H_2O \text{ (+heat)} \longrightarrow 2CO + 4H_2 \quad (20)$$

Water-GasShift Reaction

$$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + H_2 \text{ (heat)} \quad (21)$$

4. กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิที่สูงในการแยกโมเลกุลของน้ำหรือวิธีเทอร์โมเคมิสทรี

เป็นวิธีการที่ใช้กันมาเป็นเวลานานและเมื่อเร็วๆนี้และได้มีกระบวนการพัฒนาให้ดีขึ้น วิธีการนี้จะใช้ความร้อนอุณหภูมิสูงถึง 500 – 2,000 องศาเซลเซียสในการกระตุ้นปฏิกิริยาเคมีเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเพื่อผลิตไฮโดรเจน ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการนี้ก็สามารถที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และเมื่อไม่นานมานี้ นักวิจัยทั่วโลกได้ทำการพัฒนาวิธีการต่างๆ ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยการแยกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงซึ่งได้แก่

4.1กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากแตกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานจากความเข้มของแสง

โดยการใช้เลนส์กระจกในการจับแสงให้เกิดความเข้มแสงสูงๆ เพื่อกระตุ้นให้เกิดอุณหภูมิที่สูงขึ้น ซึ่งมีอุณหภูมิที่สูงถึง 2,000 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่สูงขนาดนี้จะทำให้โมเลกุลของน้ำเกิดการแตกตัวแล้วได้ก๊าซไฮโดรเจนออกมา วิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในทางเคมีตัวอย่าง เช่น การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยวัฏจักรทางเคมีของสังกะสีและสังกะสีออกไซด์ ซึ่งจะเริ่มจากการใช้ผงสังกะสีออกไซด์ทำปฏิกิริยากับความร้อนที่มาจากกระบวนการเหนี่ยวนำโดยความเข้มแสง อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาประมาณ 1,900 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้สารประกอบออกไซด์ของสังกะสีจะเกิดการแตกตัวเป็นก๊าซออกซิเจนเจนและสังกะสีโดยสังกะสีจะถูกทำให้เย็นและถูกแยกออกมาทำปฏิกิริยากับน้ำ ซึ่งจะได้เป็นก๊าซไฮโดรเจนและสังกะสีออกไซด์ในลักษณะที่เป็นของแข็ง โดยในก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จะยังไม่บริสุทธิ์ ซึ่งจะอยู่รวมกับออกซิเจนซึ่งได้มาจากโมเลกุลของน้ำที่ทำปฏิกิริยาโดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงด้านล่างนี้

$$2ZnO + heat \longrightarrow 2Zn + O_2 \quad (22)$$

$$2Zn + 2H_2O \longrightarrow 2ZnO + 2H_2 \quad (23)$$

4.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการแตกโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิสูงโดยใช้พลังงานนิวเคลียร์

วิธีการเหมือนกับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้พลังงานความเข้มแสงสูงเพื่อทำให้เกิดความร้อน แต่วิธีการนี้จะอาศัยปฏิกิริยาทางนิวเคลียร์ในการที่จะสร้างเป็นพลังงานความร้อนเพื่อใช้ในปฏิกิริยา โดยอุณหภูมิที่ใช้จะต่ำกว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยพลังงานจากแสง ตัวอย่างการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการนี้ คือ วงจรทางเคมีของซัลเฟอร์ไอโอดีน โดยการทำปฏิกิริยาของกรดซัลฟูริกกับความร้อนที่อุณหภูมิ 830 องศาเซลเซียสซึ่งจะได้เป็นโมเลกุลของน้ำออกซิเจน และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ออกซิเจนจะถูกกำจัดออกไป ส่วนซัลเฟอร์ไดออกไซด์และน้ำจะถูกทำให้เย็น และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทำปฏิกิริยากับน้ำและไอโอดีนเพื่อที่จะสร้างเป็นกรดซัลฟูริกและไฮโดรเจนไอโอไดด์ ซึ่งกรดซัลฟูริกจะถูกแยกออกไป ส่วนไฮโดรเจนไอโอไดด์จะทำปฏิกิริยากับความร้อนที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียสจะได้เป็นก๊าซไฮโดรเจนและไอโอไดด์ ซึ่งไฮโดรเจนและออกซิเจนที่ได้จากปฏิกิริยาทั้งหมดนั้นมาจากโมเลกุลของน้ำ ไฮโดรเจนที่ได้นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะถูกทำให้บริสุทธิ์ ส่วนกรดซัลฟูริกและไอโอไดด์จะถูกนำกลับไปใช้ในปฏิกิริยาใหม่อีก ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทั้งหมดจะแสดงดังนี้

$$2H_2SO_4 + \text{heat at } 850°C \longrightarrow 2H_2O + 2SO_2 + O_2 \quad (24)$$

$$4H_2O + 2SO_2 + 2I_2 \longrightarrow 2H_2SO_4 + 4HI \quad (25)$$

$$4HI + \text{heat at } 300°C \longrightarrow 2I_2 + 2H_2 \quad (26)$$

2.3.3 กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตไลซิส

เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกโมเลกุลของน้ำโดยอาศัยพลังงานแสง ซึ่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นเร็วมากและสามารถที่จะนำมาใช้ทำการผลิตในระยะยาวได้ นอกจากนี้กระบวนการผลิตยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้สามารถที่จะแบ่งออกได้ 2 กระบวนการดังต่อไปนี้

1. กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล

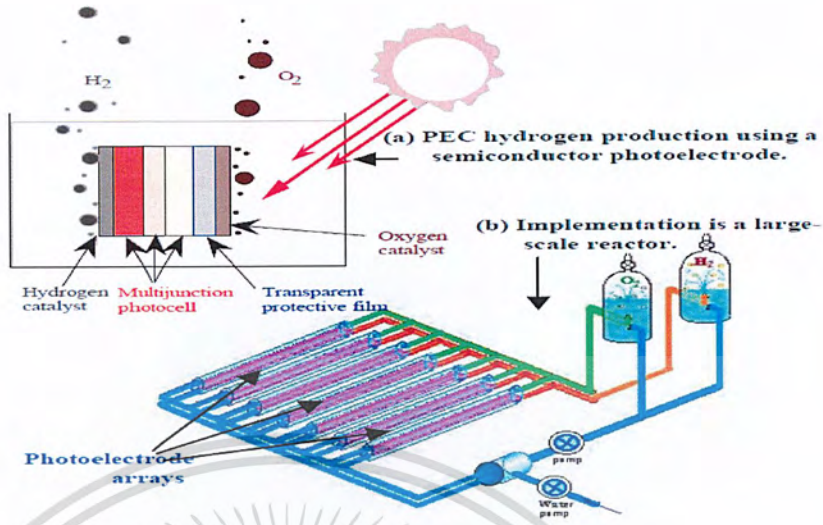
เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลของน้ำเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล ซึ่งจะใช้พลังงานแสงเป็นแหล่งพลังงาน โดยแสงจะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกโมเลกุลของน้ำผ่าน เซมิคอนดักเตอร์อิเล็กโทรด โดยที่แผ่นของคอนดักเตอร์จะเคลือบด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนที่บริเวณพื้นผิวของคอนดักเตอร์ ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะแสดงดังรูปที่ 2.6

2. กระบวนการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีโฟโตไลซิสของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้

กระบวนการนี้เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาการแตกโมเลกุลของน้ำด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ เช่น สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายกับพืช โดยสามารถที่จะสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ก๊าซออกซิเจนในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จุลินทรีย์เหล่าจะใช้น้ำเป็นวัตถุดิบของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งกระบวนการผลิตนั้นจะใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากจุลินทรีย์จะทำการแตกโมเลกุลของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์แสงต้องใช้ระยะเวลาที่นานมาก ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ช้าลงด้วย นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูงเพื่อผลิตไฮโดรเจนในระดับขนาดใหญ่และผลิตในรูปแบบที่ต่อเนื่องได้ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.6 กลไกการทำงานในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีโฟโตอิเล็กโทรเคมิคอล ตั้งแต่ระดับของห้องปฏิบัติการจนถึงกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ที่มา : Eric and Richard , 2000.

รูปที่ 2.7 การเลี้ยงเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ในถังหมัก โดยถังหมักจะต้องมีลักษณะโปร่งใสเพื่อให้เซลล์ที่อยู่ในถังหมักสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้

ที่มา : https://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/production/photobiological.html

117171

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งอาศัยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส นอกจากนี้เชื้อไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้และผลิตผลพลอยได้เป็นไฮโดรเจนจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส กระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 แบบดังนี้

2.4.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยตรง

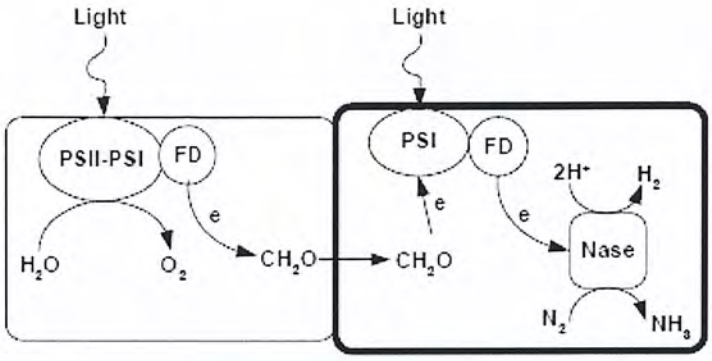
กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยตรงมีความสำคัญในการจัดแบ่งทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยตรงซึ่งใช้เอนไซม์ ไนโตรจีเนส หรือ ไบไดเร็คชันนอลไฮโดรจีเนสหรือใช้การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยตรง ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 พวกคือพวกที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้และพวกเซลล์เดียวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถที่จะผลิตไฮโดรเจนออกมาได้ภายใต้สภาวะมีความเหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ตัวอย่าง เช่นเชื้อไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena* มีความสามารถในการที่จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยกระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงแสดงดังรูปที่ 2.8 เฮเทอโรซิสต์ที่อยู่ในเซลล์จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนเพื่อให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสไม่ถูกยับยั้งและสามารถจะทำงานในการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียและได้ไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ การรีดิวซ์พลังงานในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนจะได้มาจากการย่อยคาร์โบไฮเดตรที่ถูกเก็บสะสมไว้

$$N2 + 8H^{+} + 8e^{-} + 16ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi \quad (27)$$

$$8H^{+} + 8e^{-} + 16ATP \longrightarrow 4H_2 + 16ADP + 16Pi \quad (28)$$

นอกจากนี้อากาศก็มีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียเช่นเดียวกันและถ้าเป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับที่ขนาดใหญ่ด้วยแล้วยิ่งต้องคำนึงถึงสภาพของอากาศเป็นสำคัญ ในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจนแต่มีการเติมก๊าซอาร์กอนที่ผสมกับคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ค่อนข้างสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 การทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยออกซิเจนและไฮโดรเจนจะถูกนำมาใช้ในการแยกและเป็นแหล่งพลังงานของคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะถูกใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน

ที่มา : Miller และคณะ, 2000.

สภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากในสภาวะที่มีไนโตรเจน เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะนำพลังงานไปใช้ในการรีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียและได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลผลิตพลอยได้ ซึ่งจะพบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไปที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่น เชื้อ *Anabaena* sp. PCC 7120 มีเอนไซม์สามตัวในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคือ โมลิเดียม – ไนโตรจีเนส ไบไดเร็คชันนอลไฮโดรจีเนส และ อัพเทคไฮโดรจีเนส และยังพบอีกว่าในเชื้อบางสายพันธุ์เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะทำงานผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากแสง ส่วนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะทำงานในสภาวะที่มีแสง โดยทั่วไปแล้วอัตราส่วนของพลังงานที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียจะค่อนข้างต่ำโดยจะมีค่าประมาณ 0.02 กิโลจูลต่อลิตรต่อชั่วโมงในสภาวะที่มีอากาศ และ 0.22 กิโลจูลต่อลิตรต่อชั่วโมงในสภาวะที่มีอาร์กอน

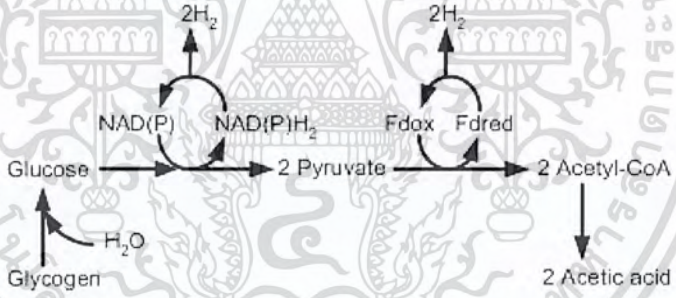
ส่วนในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดียวไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่น *Gloebacter* sp. PCC7421 *Synechococcus* sp. PCC 602 และ *Aphanocapsa montana* จะเกิดการรีดิวซ์อากาศที่ประกอบด้วย คาร์บอนมอนอกไซด์และอะซีทิลีน (C_2H_2) ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของแสงต่ำ ในสภาวะที่ปราศจากเอนไซม์ไนโตรจีเนส ไบไดเร็คชันนอลไฮโดรจีเนสจะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนออกมา เมื่อทำการเปรียบเทียบกับพวกไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้กับไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพวกเซลล์เดียวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้พบว่าพวกเซลล์เดียวที่ไม่สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรึงไนโตรเจนได้จะมีกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปริมาณที่ต่ำและต้องพลังงานในการรีดิวซ์ก๊าซที่สูงเพื่อป้องกันเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากการถูกยับยั้งโดยก๊าซออกซิเจน

2.4.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยอ้อม

ได้มีการเปรียบเทียบกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยอ้อมของเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่นเชื้อ *Spirulina platensis* เป็นเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายซึ่งเพาะเลี้ยงในระดับที่ขนาดใหญ่เพื่อผลิตในเชิงการค้าในรูปของอาหารเสริมซึ่งมีโปรตีน สารต้านอนุมูลอิสระสูงและสารอาหารชนิดอื่นๆ โดยเชื้อ *S. platensis* NIES- 46 ซึ่งมีปริมาณของไกลโคเจนสะสมสูงเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากแสงและมีไนโตรเจนซึ่งจะมีอัตราการสร้างก๊าซไฮโดรเจนเป็น 0.11 มิลลิโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้งต่อชั่วโมง ซึ่งจากปฏิกิริยาจะได้ไฮโดรเจน 1 โมล และผลิตผลพลอยได้ของเซลล์อื่นๆ ได้แก่ แอซิเตต 1.4 โมล เอทานอล 0.65 โมล ฟอร์เมต 0.4 โมล และ แลคเตต 0.1 โมลซึ่งจะใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนโดยแสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 วิถีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักในสภาวะที่ปราศจากแสงของเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : Yu and Takahashi, 2007

ส่วนในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ตัวอย่างเช่นเชื้อ *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 มีการทำงานของเอนไซม์รีเวอรสซิเบิลไฮโดรจีเนสสูงในสภาวะที่ปราศจากแสงและเพาะเลี้ยงในอาหารอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดจะเกิดการสะสมของไกลโคเจนซึ่งจะมีปริมาณของกลูโคส 1.12 กรัมต่อกรัมของโปรตีนเซลล์ นอกจากนี้ จะมีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อปริมาตรของถังหมักปั่น 1.6 มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมงโดยจะเกิดขึ้นติดต่อกันเป็นเวลานานถึง 8 ชั่วโมง จึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเป็น 1.02 มิลลิโมลต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักแห้งต่อชั่วโมงซึ่งเท่ากับปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้แต่มีปริมาณที่สูงกว่ากระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยตรงในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เมื่อมีการหมักกลูโคสในสภาวะที่ปราศจากแสง กลูโคส 1 โมลจะถูกสร้างเป็นก๊าซไนโตรเจน 3.92 โมล คาร์บอนไดออกไซด์ 1.82 โมล แอซิเตต 1.97 โมล และมีปริมาณของแลกเตทกับเอทานอลในปริมาณเล็กน้อย

ได้มีการรายงานของ Antal และ Lanblandในปี 2005 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Gloecapsa alpicola* และ *Synechocystis* sp. PCC 6803ในสภาวะที่มีแหล่งซัลเฟอร์จำกัดซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้จะทำให้เซลล์มีการสร้างไกลโคเจนมากขึ้นโดยมีปริมาณเท่ากับ 0.4 กรัมไฮโดรเจนต่อกรัมเซลล์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่สูงขึ้น โดยกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะมีค่าสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 8 ถึง 12 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน สภาวะเช่นนี้จะทำให้เกิดการเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก

2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

2.5.1 เอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอนไซม์ชนิดนี้สามารถที่จะพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่ตรึงไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ของเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายหรือในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด ซึ่งในกระบวนการตรึงไนโตรเจนนั้นมีการใช้พลังงาน ATP ในการเกิดปฏิกิริยาอย่างน้อย 16 โมเลกุลเพื่อทำการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย และได้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลผลิตดังสมการต่อไปนี้ (Rao and Hall,1996)

$$16\ ATP + 16\ H_2O + N_2 + 10\ H^+ + 8e^- \xrightarrow{\text{nitrogenase}} 16\ ADP + 16\ Pi + 2NH_4^+ + H_2 \qquad (29)$$

โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสประกอบด้วย 2 ส่วนที่ทำหน้าที่ต่างกัน ส่วนแรกคือเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) หรือ heterotetramer MoFe protein ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 220 – 240 กิโลดาลตัน (kDa) และประกอบด้วยแอลฟา 2 หน่วยย่อย (subunit) ที่ถอดแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และมีบีต้า 2 หน่วยย่อย (subunit) ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifK* ที่ทำหน้าที่แตกตัวโมเลกุลของไฮโดรเจน และส่วนที่สองคือเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (dinitrogenase reductase) หรือ homodimer Fe protein มีมวลโมเลกุล 60 – 70 กิโลดาลตัน ซึ่งถอดและแปลรหัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาจากยีน *nifH* โดยจะทำหน้าที่ในการเป็นตัวกลางในการขนส่งอิเล็กตรอนจากภายนอกที่ได้จากเฟอร์รีดอกซินหรือฟลาโวดอกซิน (flavodoxine) จากกระบวนการสลาย ATP อย่างน้อย 16 โมเลกุลแล้วส่งต่อให้กับเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสเพื่อทำการรีดิวซ์ไนโตรเจนและโปรตอนไปเป็นแอมโมเนีย

2.5.2 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

พบเอนไซม์ชนิดได้ในบริเวณไทลาคอยด์เมมเบรน (thylacoid membrane) ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณเฮเทอโรซิสต์ ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยส่วนประกอบสองหน่วยคือ โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ที่ถอดรหัสมาจากยีน *hupL* ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนให้กลายเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน และโปรตีนหน่วยย่อยเล็กที่ถอดรหัสมาจากยีน *hupS* ซึ่งทำหน้าทีในการส่งเสริมการทำงานของโปรตีน HupL โดยโมเลกุลของไฮโดรเจนที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกออกซิไดซ์ทันทีด้วยเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Knallgas reaction ดังนั้นจึงไม่มีการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการทำงานของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้สมบูรณ์(Tamagnini *et al* ., 2002)

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดได้แก่ *Azotobacter* sp. และ *Rhizobium* sp.

2.5.3 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส หรือเอนไซม์ไบไดเรคชันนอลไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) ทำหน้าที่ในการควบคุมระดับของไอออนภายในเซลล์ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากทั้ง NADH และโมเลกุลของไฮโดรเจน ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถพบได้ทั้งไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์และพวกไม่มีเฮเทอโรซิสต์ ซึ่งอาศัยหน่วยย่อยของโปรตีน 4 หน่วยที่แตกต่างกัน (heterotetrameric enzyme) โดยสองหน่วยย่อยรวมกันเป็นไฮโดรจีเนส (hydrogenase) โดยหน่วยย่อยซิกมาและบีต้าถูกถอดรหัสและแปลมาจากยีน *hoxY* และ hoxH ตามลำดับ และอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือเรียกว่าไดอะฟอเรส (diaphorase) หน่วยย่อยอะโฟเรสแอฟาและแกรมมาถูกแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* ตามลำดับ โดยทั้งสองส่วนนี้จะทำหน้าที่ในการขอส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ NADH ซึ่งได้มีการศึกษายีนที่พบในไซยาโนแบคทีเรียต่างสายพันธุ์โดยอาศัยเป็นสี่หรือห้าหน่วยย่อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Boison et al .,1999) ซึ่งในขั้นตอนการดัดแปลงเอนไซม์ให้ทำหน้าที่อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีน Hyp ที่ทำการถอดและแปรรหัสมาจากยีนหลายชนิดได้แก่ *hypF, hypC, hype, hypA* และ *hypD* (Wunschiers et al., 2003)

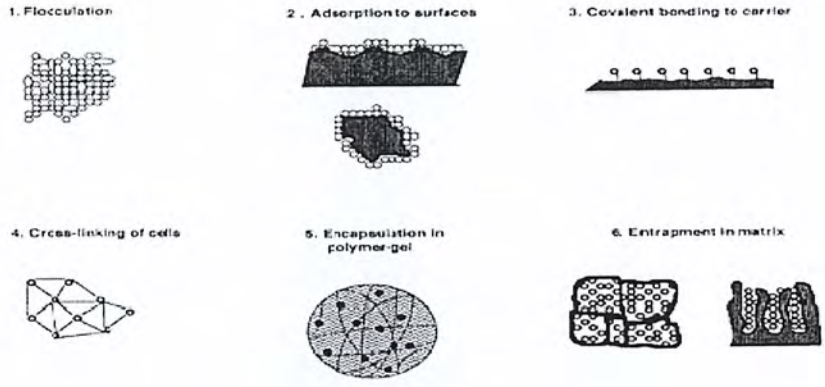
เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้และไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยก่อนหน้านี้ได้มีการรายงานการศึกษาพบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวเช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. และยังสามารถพบได้ในพวกไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายเช่น *Spirulina maxima* รวมไปถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ด้วย ซึ่งเมื่อเราทำการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสจะมีความไวต่อออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าแต่ทนความร้อนได้น้อยกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

2.6 กระบวนการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์เป็นเทคนิควิธีที่ถูกคิดค้นขึ้นมาในปี ค.ศ. 1989 โดย Curturan (รูปที่ 2.10) ซึ่งได้ทำการทดสอบกับเซลล์ของยีสต์เป็นครั้งแรกและต่อมาก็ได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางชีวภาพมากมายไม่ว่าจะเป็น โปรตีน เอนไซม์ แอนติบอดี สารประกอบในระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เซลล์ของพืช เซลล์ของแบคทีเรีย รา ยีสต์ และไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งกระบวนการตรึงเซลล์นี้จะใช้สารประกอบที่มีลักษณะเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นน้ำเช่นสารประกอบพวก อาจิเนต (arginate) เจลาติน (gelatin) ไคโตซาน (chaitosan) และสารประกอบจำพวกโพลิเมอร์เช่นไซเลนชนิดต่างๆ(silane) โดยสารประกอบที่เรานำมาใช้ในการตรึงเซลล์นั้นเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และไม่มีผลต่อกระบวนการต่างๆของเซลล์ สำหรับวัตถุประสงค์ของกระบวนการตรึงเซลล์นั้นก็เพื่อยืดอายุของเซลล์ในระยะที่มีการพักตัวให้นานขึ้นและยังเป็นผลดีต่อกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์ด้วย (Fujimula et al.1984, Bailliez et al.1991)

เทคโนโลยีการตรึงเซลล์มีขึ้นมาเป็นเวลานานกว่า 25 ปีแล้วแต่เพิ่งจะมีการนำมาใช้แค่ไม่กี่ปีมานี้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทคโนโลยีชีวภาพที่กำลังได้รับความแพร่หลายและคาดว่าจะมีการพัฒนาให้สูงขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์ซึ่งทำให้กระบวนการตรึงเซลล์กลับมาได้รับความนิยมอีกครั้ง โดยมีงานวิจัยและพัฒนาเพื่อจะหาวัสดุตรึงและทฤษฎีการตรึงเซลล์เพื่อที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.10 แต่มีการศึกษาข้อมูลเหล่านี้กันค่อนข้างน้อยจึงไม่ค่อยพบข้อมูลที่จะนำมาใช้เป็นมาตรฐานในกระบวนการตรึงเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการตรึงเซลล์ก็จะคำนึงการนำไปใช้ประโยชน์เป็นหลักซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่จะบ่งบอกถึงการเลือกวัสดุตรึงและวิธีการตรึงเซลล์ที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 ลักษณะการตรึงเซลล์ในรูปบแบต่างๆดังนี้ (1) การตรึงเซลล์แบบเกาะกลุ่มกันหรือ flocculation (2) การตรึงเซลล์แบบมีการดูดซับที่บริเวณพื้นผิวหรือ adsorption to surface (3) การตรึงเซลล์แบบเชื่อมพันธะโคเวเลนต์กับตัวพยุงหรือ covalent bonding to carier (4) การตรึงเซลล์แบบโครงร่างเชื่อมต่อกันหรือ Cross link of cell (5) การตรึงเซลล์แบบเป็นเม็ดเจลเคลือบเซลล์หรือ encapsulation (6) การตรึงเซลล์แบบเซลล์ยึดจับกับสารเมตริกซ์หรือ entrapment in matrix

ที่มา: Cassidy ., Lee and Trevors, 1996.

หลักในการพิจารณาเลือกวัสดุและวิธีการตรึงเซลล์ที่มีความเหมาะสม

1. ด้านรูปร่างลักษณะภายนอก เซลล์ที่ถูกตรึงจะต้องมีความแข็งแรงไม่เกิดการบีบอัดอนุภาคของเซลล์ที่ถูกตรึงลักษณะพื้นผิวของเซลล์ที่ตรึงต้องดีซึ่งอาจจะมีรูปร่างหรือโครงสร้างเป็นเม็ดเจล เส้นใย หรือว่าเป็นแผ่นและจะต้องคำนึงถึงขนาดของความพรุน ปริมาตรของช่องว่างของเซลล์ที่ถูกตรึง การเป็นเยื่อเลือกผ่าน ความหนาแน่น ช่องว่างที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ถูกตรึง อัตราการไหลและแรงดันในการหยดเม็ดเจล

2. ด้านเคมีจะต้องคำนึงถึงความสามารถในการละลายน้ำ (การจับตัวของโมเลกุลของน้ำกับวัสดุตรึง) การยึดจับกันของเซลล์กับวัสดุตรึง การเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสารประกอบที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่ผ่านการตรึง การเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์เมื่อนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำอีกครั้ง

3. ด้านความคงตัวจะต้องมีความคงตัวสามารถเก็บเซลล์ที่เราตรึงเอาไว้โดยที่ประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ยังมีอยู่ สามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ทำงานได้อีกโดยที่ประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ก็ยังเหลืออยู่ และเก็บรักษาเซลล์ให้ยังมีชีวิตอยู่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ด้านการต้านทานป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์จากเชื้อโรคที่มีผลอันตรายต่อเซลล์และป้องกันสารเคมีต่างๆที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์โดยจะไปมีผลต่อกลไกการทำงานของเซลล์

5. ด้านความปลอดภัยจะต้องเป็นมิตรต่อสิ่งมีชีวิตไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยสารที่นำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์และผลจากปฏิกิริยาที่เกิดจากการตรึงเซลล์จะต้องไม่เกิดเป็นสารพิษ โดยเฉพาะกระบวนการตรึงเซลล์ที่ใช้เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ อาหาร และยาจะต้องปราศจากการปนเปื้อนของสารพิษ

6. ด้านค่าใช้จ่ายราคาของวัสดุที่เราจะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์จะต้องเป็นวัสดุที่มีราคาถูก นอกจากนี้วิธีในการเตรียมสารที่จะใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์จะต้องไม่ยุ่งยากหรือเสียเวลามาก และที่สำคัญนอกจากสารที่เราใช้จะต้องมีราคาที่ถูกแล้วยังจะต้องมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

7. ด้านผลกระทบจากการเกิดปฏิกิริยาอัตราการไหลในขั้นตอนการโหลดเจลในกระบวนการตรึงเซลล์การเกิดปฏิกิริยาของเซลล์ในการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาทางกลศาสตร์ ปฏิกิริยาข้างเคียงที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตล้วนมีผลมาจากวัสดุตรึงและวิธีการตรึงเซลล์แทบทั้งสิ้น

กระบวนการตรึงเซลล์นั้นสามารถแบ่งออกได้หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีจะขึ้นรูปแบบการยึดจับกันของเซลล์กับวัสดุตรึงซึ่งแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

2.6.1 การตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับทางกาย (Adsorption)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้เป็นกระบวนการตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุดและจะเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์กับสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นสามารถที่จะผันกลับได้ โดยพันธะที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็นพันธะที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายขนถ่ายอิเล็กตรอน เช่น แรงแวนเดอร์วาลล์ (van der Waal force) แรงไอออนิก (Ionic force) และแรงของพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังอาจพบแรงที่เกิดจากพันธะแบบไม่มีขั้ว ซึ่งแรงของพันธะเหล่านี้เป็นแรงที่อ่อนมากจึงสามารถทำให้ปฏิกิริยาของวัสดุตรึงกับโครงสร้างของเยื่อหุ้มหรือผนังเซลล์หลุดออกจากกันได้ แต่ถ้าให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวในรุนแรงก็อาจจะป้องกันสภาวะนี้ได้ ตัวอย่าง เช่น เซลล์ของยีสต์ซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นประจุลบ ดังนั้นเราจึงควรใช้วัสดุตรึงที่มีประจุเป็นบวกในการตรึงเซลล์ของยีสต์ ซึ่งการทำปฏิกิริยาระหว่างโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์กับวัสดุตรึงจะไม่มีผลต่อกลไกการทำงานของเซลล์หรือบางทีอาจเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ ในกระบวนการตรึงเซลล์จะช่วยเพิ่มการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเซลล์และยังเพิ่มคุณสมบัติในการดูดซับสารอาหารเข้าสู่เซลล์เมื่อเราทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของประจุ และช่วงระยะเวลาที่ทำการบ่มซึ่งเป็นผลมาจากวัสดุที่เราใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์และการชะล้างเซลล์หลายๆครั้งจะไม่มีผลต่อพันธะของสารประกอบทางชีวภาพ ข้อดีของกระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้คือ มีการทำลายเซลล์น้อย สามารถทำง่ายราคาถูกและกระบวนการตรึงเซลล์ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของวัสดุตรึงกับเซลล์ สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ แต่มีข้อเสียคือ เกิดการรั่วของเซลล์ของวัสดุตรึงกับเซลล์ที่ถูกตรึงจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดการปนเปื้อน การจับกันของหมู่เคมีของเซลล์กับวัสดุตรึง ปริมาณของวัสดุตรึงที่ห่อหุ้มเจลมีมากเกินไปจึงทำให้เกิดการกีดขวางการดูดซับสารอาหารของเซลล์ การตรึงเซลล์ในลักษณะแสดงดังรูปที่ 2.11

2.6.2 การยึดจับของวัสดุตรึงด้วยพันธะโคเวเลนต์

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะโคเวเลนต์ของวัสดุตรึงกับเซลล์โดยพันธะโคเวเลนต์จะเกิดขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชั่นของสารเคมีของวัสดุที่เราใช้ตรึงกับหมู่ฟังก์ชั่นทางเคมีของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ โดยพันธะที่เกิดขึ้นจะเป็นพันธะที่เกิดขึ้นอย่างคงที่และเหมาะสม ส่วนใหญ่แล้วพันธะโคเวเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่างพื้นที่ผิวด้านนอกของเซลล์ซึ่งอาจจะเป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนหรืออนุพันธ์ของโปรตีนซึ่งได้แก่ หมู่แอมโมเนีย (NH_2) ของกรดอะมิโนไลซีนหรืออาร์จินีน หมู่คาร์บอกซิล (CO_2H) ของกรดอะมิโนแอสพาติกหรือกลูตามิก หมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของกรดอะมิโนเซอร์รีนหรือทรีโอนีน และหมู่ซัลไฟดริล (SH) ของกรดอะมิโนซีสเทอีน ส่วนสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึงนั้นส่วนใหญ่แล้วจะเป็นสารสังเคราะห์ ซึ่งหลักในการเลือกวัสดุตรึงในวิธีการตรึงเซลล์โดยการยึดจับด้วยพันธะโคเวเลนต์นั้นจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่เราตรึงเซลล์ การตรึงเซลล์ในลักษณะแสดงดังรูปที่ 2.11 (B)

ส่วนรูปแบบการเชื่อมโยงพันธะของวัสดุตรึงกับพื้นผิวด้านนอกของเซลล์จะเกิดเป็นพันธะโคเวเลนต์ชนิดต่างๆ ได้แก่ การเชื่อมกันแบบไอโซยูเรีย (Isourea linkage) การเชื่อมกันแบบไดอะโซ (Diaso linkage) การเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide linkage) และการเชื่อมกันโดยการเกิดปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน (Alkylation reaction)

2.6.3 การตรึงเซลล์โดยการยึดจับ (Entrapment)

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพและการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับด้วยพันธะโคเวเลนต์ตรงที่เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความเป็นอิสระจากสารละลายแต่ไม่มีการเคลื่อนที่โดยมีโครงสร้างในลักษณะที่เป็นตาข่ายเจล ซึ่งช่องว่างของร่างตาข่ายเจลที่เกิดขึ้นจะถูกควบคุมโครงสร้างของเจลที่ยึดจับกับเซลล์อย่างแน่น เพื่อป้องกันการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

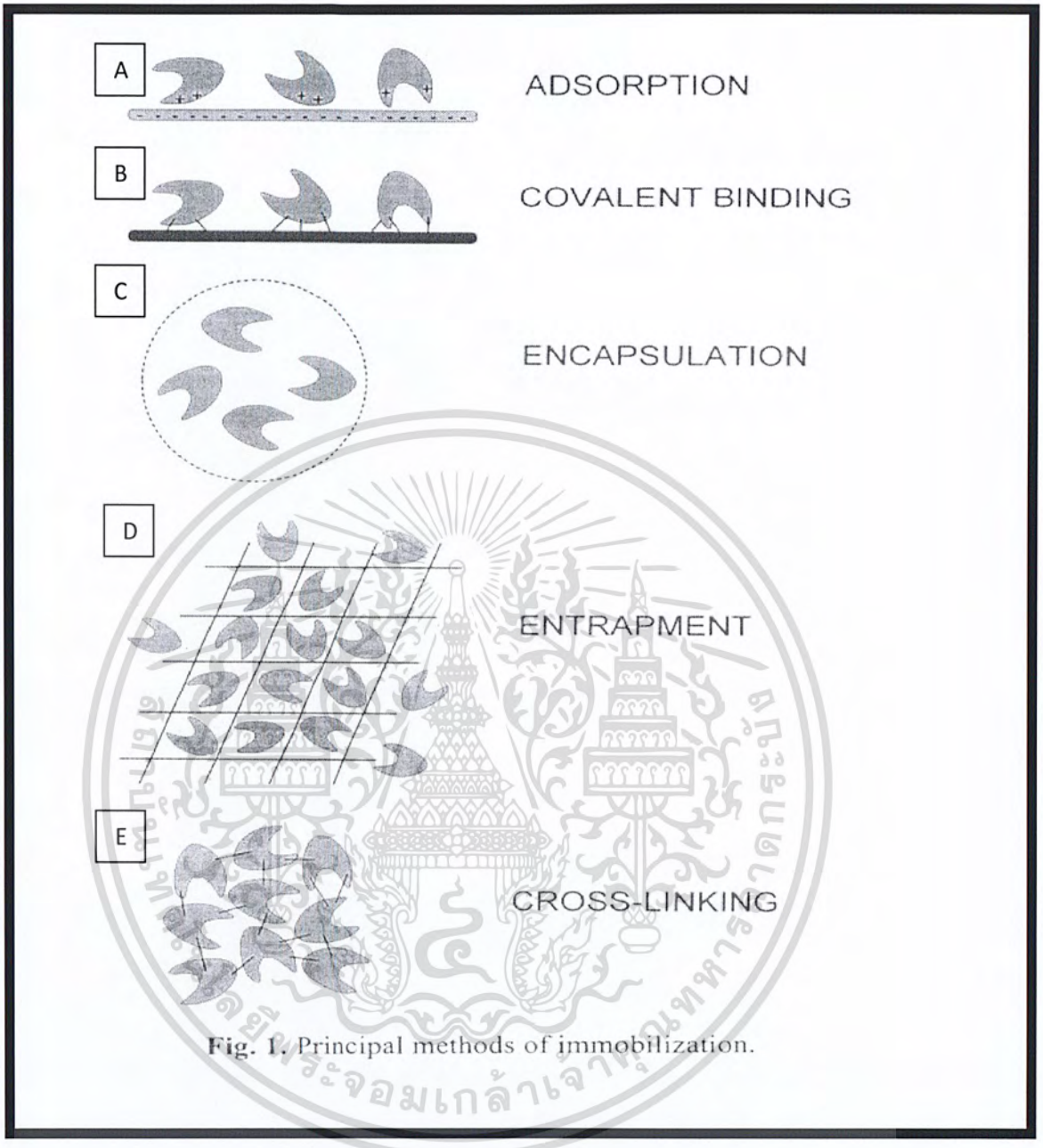


Fig. 1. Principal methods of immobilization.

รูปที่ 2.11 รูปแบบของทฤษฎีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ ซึ่งได้แก่ (A) คือ การตรึงเซลล์โดยอาศัยการดูดซับทางกายภาพ (Adsorption) (B) คือ การตรึงเซลล์โดยการยึดจับด้วยพันธะโคเวเลนต์(Covalent bonding) (C) คือ การตรึงเซลล์โดยการเก็บเซลล์ไว้ในเม็ดของวัสดุตรึง(Encapsulation) (D) คือ การตรึงเซลล์โดยการห่อเชื่อมเซลล์กับวัสดุตรึง (Entrapment) (E) คือการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้ (Cross – linking)

ที่มา : Gordon and Bickerstaff, 1997.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รั่วหลุดของเซลล์ที่ถูกตรึง และรูที่เกิดขึ้นก็ยังจะช่วยให้อาหารและผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่เข้าออกจากเซลล์ได้อย่างอิสระ ส่วนตัววัสดุที่เราใช้ตรึงนั้นสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับสารที่เคลื่อนที่ไปมาระหว่างเซลล์ซึ่งบางทีอาจจะมีผลกระทบอย่างมากต่อค่ากลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ แต่บางทีสภาวะเช่นนี้ ก็อาจจะเป็นผลดีต่อเซลล์ที่ถูกตรึง เนื่องวัสดุที่ตรึงสามรถที่จะป้องกันสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การตรึงเซลล์ในลักษณะแสดงดังรูปที่ 2.11 (C)

สำหรับวิธีการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้นั้นจะมีขั้นตอนและทฤษฎีการตรึงเซลล์ต่างๆ กันซึ่งแต่ละวิธีวัสดุที่ใช้ตรึงก็มีผลด้วย ซึ่งได้แก่ การก่อตัวเป็นเจลโดยการทำปฏิกิริยากันระหว่างประจุบวกและประจุลบของสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อัลจิเนต การใช้อุณหภูมิในการเหนี่ยวนำให้เกิดเจล สารที่เป็นวัสดุตรึงเมื่อเย็นตัวลงแล้วจะเกิดเป็นเม็ดเจลเช่น อะกาโรสและเจลาติน การเกิดปฏิกิริยาพอลีเมอร์ไรเซชันของสารอินทรีย์หรือปฏิกิริยาโฟโตเคมิคอล เช่น พอลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) การเกิดการตกตะกอนในสารละลายที่ทำให้ตัวถูกละลายตกตะกอน เช่น พอลีสไตรีน (polystyrene)

2.6.4 การตรึงเซลล์โดยการห่อเซลล์ในวัสดุตรึงให้เป็นเม็ด (Encapsulation)

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้สามารถทำได้โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึงที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่านคล้ายๆกับการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับเซลล์กับวัสดุตรึงซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงจะเป็นอิสระจาสารละลาย (Entrapment) แต่จะแตกต่างกันตรงที่เซลล์ที่ตรึงโดยวิธีนี้จะไม่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ ซึ่งการที่เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในลักษณะที่เป็นเม็ดนั้นจะทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านแผ่นเยื่อเลือกผ่านของวัสดุตรึงได้ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กนั้นสามารถที่จะเคลื่อนที่เข้าออกจากเม็ดเจลได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์ในลักษณะแสดงดังรูปที่ 2.11 (D)

มีการใช้วัสดุจำนวนมากมาใช้เพื่อให้เกิดการก่อตัวขึ้นเป็นเม็ดเจลซึ่งมีขนาดของส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10 – 100 ไมโครเมตร สารที่ใช้ได้แก่ ไนลอน เซลลูโลสไนเตรท ซึ่งใช้กันเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้แล้วการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการแพร่ของสาร การรวมตัวของผลิตภัณฑ์ และการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะมีสภาวะความหนาแน่นคลายๆกับสารละลาย ซึ่งจะมีผลต่อสภาวะภายนอกของถังหมัก กลศาสตร์การไหลและสภาวะอื่นๆที่เกี่ยวข้องอีกมากมาย กระบวนการตรึงเซลล์ในลักษณะนี้มีความคล้ายกับทฤษฎีการแพร่แบบออสโมซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.5 การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน (Crosslinking)

ในกระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้วัสดุตรึงจะเป็นอิสระและจะมีการเชื่อมต่อของเซลล์แต่ละเซลล์กับวัสดุตรึงที่ยึดจับกับเซลล์อีกเซลล์หนึ่งซึ่งจะยึดจับกันเป็นโครงร่างขนาดใหญ่ในลักษณะที่เป็นการเชื่อมพันธะไขว้กันซึ่งจะมีโครงสร่างเป็นลักษณะสามมิติเชิงซ้อนและสามารถที่จะเชื่อมกันได้ทั้งแบบกายภาพและเคมีโดยทฤษฎีทางเคมีนั้นการเชื่อมไขว้จะเชื่อมกันโดยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเซลล์โดยจะเชื่อมกับสารที่มีหมู่ฟังก์ชันสองตำแหน่งหรือมากกว่า เช่น กลูตารอลดีไฮด์ และทูลูอีนไดไอโซไซยาเนตแต่สารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูงจึงไม่นิยมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์

ส่วนกระบวนการเชื่อมไขว้ทางกายภาพนั้นจะเชื่อมไขว้เซลล์เกิดเป็นโครงสร้างที่เกาะกลุ่มกันจึงเป็นวิธีการที่ดีสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ และยังเป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูง ซึ่งการทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มกัน (flocculation) นั้นจะต้องเติมสารเพื่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการจับเกาะกลุ่มกันของเซลล์ซึ่งสารเหล่านั้นได้แก่ พอลีอะครีลาไมด์ พอลีเอทิลีนอิไมด์ พอลีสไตรีนซัลฟอเนต และสารฟอสเฟต กระบวนการเชื่อมไขว้ถือเป็นกระบวนการตรึงเซลล์เนื่องจากเป็นกระบวนการจำกัดการเคลื่อนที่ของเซลล์และเป็นการเพิ่มความอยู่ตัวของเซลล์นอกจากนี้กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการตรึงเซลล์วิธีอื่นคือสามารถที่ละลดการรั่วของเซลล์ได้เนื่องจากเซลล์เกิดการยึดเกาะกันอย่างเหนียวแน่น การตรึงเซลล์ในลักษณะแสดงดังรูปที่ 2.11 (E)

2.7 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหรือเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แต่ในปัจจุบันนิยมเรียกว่าไซยาโนแบคทีเรีย เหตุผลที่เรียกเช่นนี้ก็เนื่องจากว่าสิ่งมีชีวิตชนิดนี้เป็นสาหร่ายโปรคาริโอตที่มีลักษณะเซลล์ที่คล้ายพวกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นพวกโปรคาริโอติกเซลล์มากกว่ายูคาริโอติกเซลล์ ซึ่งในเวลา 25 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาว่าไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นมาแล้วกว่า 3.5 พันล้านปีจากหลักฐานซากดึกดำบรรพ์ของเชื้อจุลินทรีย์โบราณ และในปัจจุบันได้มีศึกษาหาวิวัฒนาการที่แท้จริงของเชื้อไซยาโนแบคทีเรียโดยนักสรีระวิทยาพบว่า เซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้เกิดขึ้นมาแล้วกว่า 2.7 พันล้านปี

รงควัตถุที่ใช้ในกระบานการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่คือคลอโรฟิลล์ชนิด เอ บางครั้งไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดพบคลอฟิลล์ชนิด บี ซึ่งสามารถใช้สภาวะนี้ในการจัดจำแนกกลุ่มเป็นกลุ่ม โปรคลอโรไฟตา (Prochlorophyta) และรงควัตถุชนิดอื่นๆได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฟโคบิลิโปรตีน และไกลโคเจน ส่วนผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจะประกอบด้วยน้ำตาลและกรดอะมิโน

2.7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถสังเกตได้ของไซยาโนแบคทีเรียคือมีลักษณะเป็นเซลล์เซลล์เดี่ยวหรือยึดจับกันเป็นเส้นสาย โดยลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ต่อกันเป็นแถวเรียกว่า ไตรโครม (trichome) และไตรโครม (trichome) ถูกห่อหุ้มด้วยชีทเรียกว่า ฟิลาเมนต์ (filament) หรือโครงสร้างที่เป็นเส้นสาย และบางทีอาจจะพบหลายไตรโครมใน 1 ฟิลาเมนต์ (filament) โครงสร้างเชิงซ้อนที่เป็นหน่อ (thallus) จะเป็นต้นกำเนิดในการเกิดเป็นฟิลาเมนต์ (filament) โดยการแตกกิ่งของฟิลาเมนต์ (filament) สามารถที่จะแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือการแตกกิ่งเป็นเส้นสายเดียวซึ่งเรียกว่า ยูนิเซอริเอต (uniseriate) และแตกกิ่งหลายๆเส้นสายซึ่งเรียกว่า มัลติซิลิเอต (multiseriate)

2.7.2 ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียนั้นเหมือนกับผนังเซลล์ของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งจะมีชั้นของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) อยู่บริเวณด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โดยโครงสร้างของเปปติโดไกลแคนเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยสารหลายชนิดได้แก่ อนุพันธ์ของน้ำตาล 2 ชนิดคือ N – อะซิติลกลูโคซามีน (N – acetylglucosamine) กับ N – อะซีติลมิวรามิกแอซิด (N – acetylmuramic acid) และกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ โดยด้านนอกของชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) จะมีส่วนที่เรียกว่าพื้นที่ช่องว่างระหว่างเซลล์ (periplasmic space) ซึ่งบางทีบริเวณนี้อาจจะมีการยึดจับกันของเส้นใยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) อย่างหลวมๆ โดยเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์จะถูกล้อมรอบด้วยชั้นที่เป็นพื้นที่ว่างระหว่างเซลล์ ของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถเคลื่อนที่แบบกลิ้งตัวได้แบบช้าๆ (60 ไมโครเมตรต่อวินาที) ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่บนของแข็ง เช่น *Phormidium* sp. *Oscillatoria* sp. ซึ่งจะเคลื่อนที่แบบกลิ้งหมุนแต่สำหรับเชื้อ *Anabaena* sp. นั้นจะเคลื่อนที่แบบคืบคลาน

2.7.3 พิไลและการเคลื่อนที่

พิไลเป็นเส้นใยของโปรตีนที่ยื่นออกมาจากพื้นผิวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย พิไลสามารถแบ่งออกได้ 2 แบบคือ แบบแรกจะพบในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว เช่น *Synechocystis* sp. โดยจะปกคลุมเซลล์เสมือนเป็นเนื้อเยื่อ 1 ชั้นที่มีลักษณะคล้ายกับแปลง พิไล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ละเส้นจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 3 – 4 นาโนเมตร และมีความยาว 1 ไมโครเมตร ส่วนพิไลในแบบที่สองนั้นจับเกาะอยู่กับที่ซึ่งจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6–8 นาโนเมตร และมีความยาว 4–5 ไมโครเมตร พิไลนี้จะทำหน้าที่ในการเชื่อมจับกับเซลล์อีกเซลล์หนึ่ง และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดอาจมีพิไลนี้ช่วยในการคลื่อนที่ด้วย โครงสร้างของพิไลนั้นประกอบไปด้วยโปรตีนที่ชื่อว่า พิลินโดยพิไล 1 เส้นจะประกอบด้วยโปรตีนพิลินระหว่าง 500–1000 หน่วยและในโปรตีนพิลินแต่ละหน่วยจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 145 – 170 หน่วย โดยโมเลกุลของโปรตีนพิลินจะมีลักษณะที่คล้ายกับโมเลกุลของออสซิลาโทลิน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่แบบคืบคลานของ

2.7.4 ชีทหรือโครงสร้างที่ห่อหุ้มเซลล์

ชีท (sheath) หรือที่เราเรียกกันทั่วไปว่า แคปซูล (capsule) เป็นสารเมือกที่เซลล์สร้างออกมาเคลือบเซลล์ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก นอกจากนี้ ชีทยังช่วยป้องกันไม่ให้พื้นที่ผิวด้านนอกของเซลล์แห้ง การสร้างชีทจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์เช่น สภาวะที่มีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำจะทำให้การสร้างชีทหยุดชะงัก เนื่องจากการตรึงคาร์บอนของเซลล์มีผลต่อการสร้างชีท

2.7.5 โครงสร้างของโปรโตพลาสซึม

ลักษณะของไซโตพลาสซึมในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจะมีลักษณะที่คล้ายกับเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป โดยบริเวณตรงกลางของไซโตพลาสซึมจะมีสารพันธุกรรมดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงแหวนและจะไม่มีโปรตีนฮิสโตนเหมือนกับที่พบในเซลล์ของพวกยูคาริโอต ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวจะมีปริมาณของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1.6×10^{9} - 8.6×10^{9} ดาลตัน ซึ่งบริเวณใต้พื้นผิวของโพรโตพลาสซึมนั้นจะประกอบด้วยไทลาคอยด์ (thylakoid) ซึ่งบนผิวของไทลาคอยด์ (thylakoid) จะประกอบด้วยไฟโคบิลิโซม (phycobiblisome) ภายในไฟโคบิลิโซมจะมีไฟโคบิลิโปรตีน(phycobibliprotein) บรรจุรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงบรรจุอยู่ เม็ดไกลโคเจน (glycogen granules) ซึ่งได้จากการสะสมคาร์โบไฮเดตรจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และไรโบโซมขนาด 70S จะกระจายอยู่ภายในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้แล้วยังพบว่ามีไซยาโนไฟซิน (cyanophycin) เป็นโปรตีนที่ไม่ได้ผลิตขึ้นมาจากไรโบโซมจะมีลักษณะเป็นเม็ดและไม่มีเยื่อหุ้มอยู่ในไซโตพลาสซึมอีกด้วย โครงสร้างของไซยาโนไฟซินนั้นจะประกอบด้วยสาร 2 โมเลกุลจับตัวกัน มีสายที่เป็นพอลีเมอร์ของแอสพาติกแอซิดเป็นแกน และมีกรดอะมิโนอาร์จินีนเป็นกิ่งไซยาโนไฟซินที่ทำหน้าที่เป็นตัวกักเก็บไนโตรเจนชั่วคราวจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยจะพบไซยาโนไฟซินในระยะช่วงเริ่มต้นของการเจริญเติบโตเท่านั้น เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นโครงสร้างนี้ก็จะหายไป แต่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจนนั้นจะเก็บไนโตรเจนไว้ในไฟโคบิลิโซม ส่วนคาร์บอกซิโซม (carboxysome) มีลักษณะเหมือนกับคาร์บอกซิโซมของแบคทีเรียทั่วไปมีเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ที่ชื่อว่า ไรโบส – 1,5 – บิสฟอสเฟตคาร์บอกซีเลส (ribose – 1,5 – bisphosphate decarboxylase) หรือเอนไซม์ออกซิเจนเนส(oxygenase) โดยคาร์บอกซิโซมนั้นสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ แอลฟาคาร์บอกซิโซมและ บีตาคาร์บอกซิโซมซึ่งจะมีความแตกต่างกันที่องค์ประกอบของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง แอลฟาคาร์บอกซิโซมจะพบในไซยาโนแบคทีเรียโดยทั่วไปที่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอ ในขณะที่บีตาคาร์บอกซิโซมจะพบในไซยาโนแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณของคาร์บอนจำกัด ภายในคาร์บอกซิโซมจะบรรจุเอนไซม์คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนไบคาร์บอเนตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ในคาร์บอกซิโซมจากนั้นคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้ก็จะถูกตรึงโดย rubisco กลายเป็นคาร์โบไฮเดรต ปริมาณคาร์บอกซิโซมจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์น้อย ในเซลล์ที่เป็นเฮเทอโรซิสต์นั้นจะไม่มีเอนไซม์คาร์บอกซิโซม พอลิฟอสเฟตบอดี้ (polyphosphate body) หรือเมตาโครมาติก (metachromatic) หรือเม็ดโวลูติน (volutin granule) ซึ่งจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ คล้ายเม็ดไขมันของพวกยูคาริโอต ภายในเม็ดโวลูตินนี้จะบรรจุฟอสเฟต เม็ดโวลูตินนี้จะไม่พบในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตหรือในเซลล์ที่เจริญในสภาวะที่ปราศจากแหล่งของฟอสเฟต

2.7.6 แก๊สแวคิวโอลหรือถุงเก็บแก๊ส

แก๊สแวคิวโอลจะมีผลต่อการจมตัวและการลอยตัวของไซยาโนแบคทีเรีย โดยภายในแก๊สแวคิวโอลจะประกอบด้วยถุงแก๊สที่มีลักษณะเป็นหลอดรูปทรงกระบอกที่มีปลายกรวย พบอยู่ในไซโตพลาสซึมไซยาโนแบคทีเรีย ถุงแก๊สนี้จะมีเยื่อหุ้มที่ไม่เป็นลิปิดโปรตีนที่แท้จริง มีลักษณะการจัดเรียงตัวเป็นแถบของโปรตีนโครงสร้างของถุงแก๊สจะถูกทำลายโดยความดันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ การพังทลายแตกออกของถุงแก๊สนี้จะเกิดการแบ่งครึ่งออกเป็น 2 ส่วน ภายในถุงแก๊สจะมีความดัน 1 บรรยากาศ โดยแก๊สจะเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกทางด้านแผ่นเยื่อหุ้มเพื่อที่จะให้แก๊สอยู่ในสภาวะที่สมดุลระหว่างแก๊สภายในและภายนอกถุงแก๊ส เยื่อหุ้มด้านในของถุงแก๊สจะเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำซึ่งจะป้องกันการรวมตัวกับน้ำและยังยับยั้งไม่ให้เกิดแรงตึงผิวที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดจากการแทรกซึมของน้ำเข้าไปในถุงแก๊ส ส่วนพื้นผิวทางด้านนอกของถุงแก๊สนั้นจะเป็นส่วนที่ชอบน้ำซึ่งจะมีผลต่อการเต่งของถุงแก๊สและการแตกออกของถุงแก๊ส

2.7.7 รงควัตถุและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

รงควัตถุสำคัญที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียคือ คลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งจะอยู่บนเยื่อหุ้มของไทลาคอยด์ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดอาจจะมีคลอโรฟิลล์ บี เช่น ไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มโปรคลอโรไฟตา (Prochlorophyte) นอกจากนี้ยังพบไซยาโนแบคทีเรียชนิด ดี เช่น *Acaryochoris marina* แคโรทีนอยด์ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียนั้นจะมีความแตกต่างจากแคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายพวกยูคาริโอตคือจะพบ อีชิเนโอน (echineone) และมิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) ในไซยาโนแบคทีเรีย แต่จะไม่พบสาร 2 ชนิดนี้ในสาหร่ายพวกยูคาริโอต นอกจากนี้ยังสามารถพบไฟโคบิลิโปรตีนในไซยาโนแบคทีเรียซึ่งจะแบ่งออกเป็น 4 ชนิดคือ ซี – ไฟโคไซยานิน (C- phycocyanin) ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่คงามยาวคลื่น 620 นาโนเมตร แอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซี – ไฟโคเออริทิน (C- phycoerythrin) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร และไฟเออริโทไซยานิน(phycoerythrocyanin) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 568 นาโนเมตร โดยไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะพบซี – ไฟโคไซยานินและแอลโลไฟโคไซยานินเท่านั้น แต่ในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดจะมีซี – ไฟโคเอริทรินและไฟโคเออริโทไซยานินด้วย ปริมาณของไฟโคบิลิโปรตีนจะขึ้นอยู่กับปริมาณแสงที่ได้รับและการเจริญของเซลล์ ไซยาโนแบคทีเรียจะผลิตรงควัตถุสีแดงของไฟโคเออริทินจะถูกยับยั้งสังเคราะห์เมื่ออยู่ในแสงสีแดง และรงควัตถุสีน้ำเงินของไฟโคไซยานิน ซึ่งจะถูกยับยั้งการผลิตเมื่ออยู่ในแสงสีเขียว

สำหรับวิวัฒนาการของไซยาโนแบคทีเรียนั้น จากการศึกษาว่าไทลาคอยด์ก็อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นพลาสมาเลมมา (plasmalemma) แต่ในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดในปัจจุบันจะยังคงมีไทลาคอยด์อยู่ร่วมกับพลาสมาเลมมา ตัวอย่างของสภาวะพื้นฐานที่อาจจะอยู่ในเชื้อ *Gloeobacter violaceus* ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวซึ่งไม่มีไทลาคอยด์แต่จะมีคลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิโปรตีนซึ่งรงควัตถุของสาหร่ายเหล่านี้จะมีการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นโดยมีพลาสมาเลมมาเป็นตัวช่วย นอกจากนี้ยังเมีเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่สามารถสังเคราะด้วยแสงทั้งในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนและในสภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน โดยภายใต้กระบวนการสังเคราะหด้วยแสงในสภาวะที่มีอากาศอิเล็กตรอนในระบบแสง 1 จะถูกแยกออกจากระบบแสง และภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนอิเล็กตรอนจะถูกแยกโดยกระบวนการรีดักชันของซัลเฟอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.8 อะไคนีท (Akinetes)

อะไคนีทเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่เจริญเต็มที่ โดยภายในจะมีเม็ดของไกลโคเจนและไซยาโนไฟซินอยู่ในปริมาณมาก และมีชั้นหุ้มที่หนา 2 – 3 ชั้นเพื่อเก็บสารอาหารที่จำเป็นในการพักตัวของเซลล์เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความรุนแรง เมื่อเปรียบเทียบอะไคนีทกับเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะพบว่า อะไคนีทจะไม่มีกระบวนการเมตาบอลิซึมเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการพักตัวของเซลล์ อะไคนีทนั้นสามารถพบได้ในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮทเทอโรซีสต์เท่านั้น โดยเมื่ออะไคนีทมีการเจริญเต็มที่นั้นจะมีขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นมากจึงเกิดการจมตัวลงและจะเกิดการงอกเป็นเซลล์ปกติเมื่อได้รับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นการเกิดอะไคนีทในเซลล์นั้น จากการศึกษาจะพบว่าเซลล์จะมีการสร้างอะไคนีทขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะต่างๆ เช่น สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ อุณหภูมิต่ำ การมีแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอ พลังงานแสงมีปริมาณน้อยเป็นต้น ซึ่งสภาวะเหล่านี้ล้วนเป็นสภาวะที่มีความรุนแรงต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียแทบทั้งสิ้น

2.7.9 เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst)

เฮเทอโรซีสต์จะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ โดยเฮเทอโรซิสต์นั้นจะไม่มีระบบแสง 2 ของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมันจึงไม่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน และผนังเซลล์ของเฮเทอโรซิสต์นั้นจะถูกห่อหุ้มเป็นชั้นหนาเพื่อป้องกันการแพร่ของก๊าซเข้าไปภายใน ทำให้บริเวณด้านในของเฮทเทอโรซิสต์นั้นจะเป็นสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน จากสภาวะเช่นนี้ทำให้สามารถตั้งสมมติฐานได้ว่าการที่ภายในเฮเทอโรซิต์มีสภาวะเช่นนี้ก็เพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเฮเทอโรซิสต์ถูกทำลายโดยออกซิเจน เฮเทอโรซิสต์นั้นจะสร้างขึ้นโดยเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่เกิดการเก็บรวบรวมเม็ดของแกรนูลที่ไม่ละลายน้ำชนิดต่างๆ แล้วเกิดการห่อหุ้มด้วยผนังเซลล์หลายชั้น หน้าที่สำคัญของเฮเทโรซิสต์คือทำหน้าที่ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนในอากาศเพื่อมาเป็นแหล่งอาหารของเซลล์

2.7.10 กระบวนการตรึงไนโตรเจน

กระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการตรึงไนรโตรเจนอิสระที่อยู่ในอากาศให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย และมีไฮโดรเจนเป็นผลผลิตพลอยได้ โดยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งในกระบวนการตรึงไนโตรเจนนี้จะต้องใช้พลังงานถึง 16 ATP เอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยส่วนประกอบ 2 ส่วนคือ ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส(dinitrogenase reductase) ซึ่งเป็นโครงสร้างโปรตีนที่มีเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ และส่วนที่สองจะเรียกว่า ไดไนโตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จีเนส (dinitrogenase) ซึ่งจะมีธาตุโมลิบิเดียมเป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งส่วนประกอบทั้งสองส่วนนี้จะถูกควบคุมด้วยยีน *nif HDK*

กระบวนการตรึงไนโตรเจนสามารถที่จะพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ซึ่งภายในจะมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจนและไม่มีระบบแสง 2 ทำให้ไม่มีออกซิเจนมายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้กระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจนยังพบในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์ โดยกระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจนในสิ่งมีชีวิตชนิดนี้จะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีแสง ซึ่งในสภาวะนี้จะไม่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้น เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจนซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และนอกจากนี้จากการศึกษาเรายังพบอีกว่าไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดได้แก่ *Trichodesmium* และ *Katagnymeme* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและไม่มีเฮเทอโรซิสต์แต่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนในสภาวะที่มีแสงได้ โดยไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จะเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการบรูมมิงในทะเลและเป็นตัวการสำคัญในการเพิ่มปริมาณก๊าซไนโตรเจนในน้ำทะเลได้ถึงหนึ่งในสี่ของปริมาณก๊าซไนโตรเจนที่มีอยู่ในทะเล

2.7.11 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ไซยาโนแบคทีเรียจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดไซยาโนแบคทีเรียซึ่งได้แก่ ฮอร์โมโกเนีย (Hormogonia) ซึ่งจะพบในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย โดยจะมีลักษณะเป็นไตรโคมชิ้นสั้นๆ ซึ่งเป็นส่วนที่แยกออกมาจากเส้นสายของเซลล์แม่ โดยจะเคลื่อนที่โดยการคืบคลานออกไปเจริญเป็นเส้นสายใหม่ โฮโมโกเนียนี้จะไม่มีเฮทเทอโรซิสต์ และในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดอาจจะมีแก๊สแวคิวโอลในโฮโมโกเนียจะทำหน้าที่ควบคุมการลอยตัว ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายบางชนิดเช่น *Oscillatoria* และ *Cylindrosoermum* เส้นสายทั้งหมดจะแตกออกจากกัน ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดจะสร้างปลายที่เป็นลักษณะที่เป็นกิ่งก้านพิเศษ และในบางชนิดจะมีการแยกออกเป็นแผ่น ทั้งหมดที่กล่าวมาเป็นการแตกออกของโฮโมโกเนียแทบทั้งสิ้น โดยปกติแล้วปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโฮโมโกเนียจะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของเซลล์เช่น การเพิ่มหรือการลดของปริมาณสารอาหาร การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแสง

บีโอไซท์ (Baeocytes) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เอนโดสปอร์ (endospore) สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ซึ่งจะเกิดขึ้นจากการที่โพรโตพลาสซึมแบ่งตัวกันเป็นหลายๆ ส่วน โดยส่วนต่างๆ ที่เกิดการแบ่งจะปราศจากการเจริญเติบโตระหว่างที่มีการ

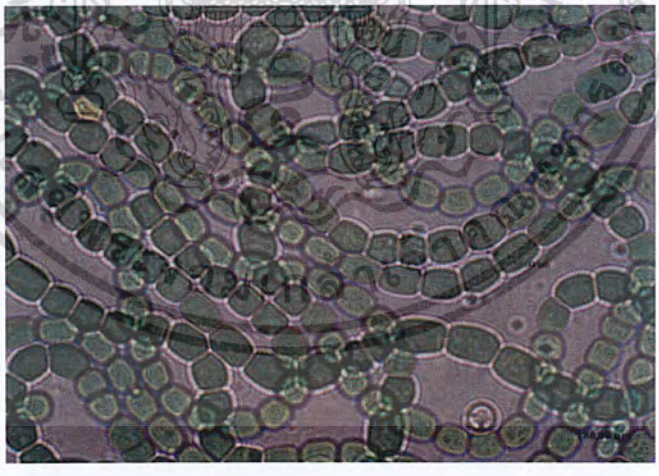
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่ง ลักษณะของบีโอไฟตาจะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่เป็นต้นกำเนิดและเมื่อเกิดการหลุดออกจากเซลล์ต้นกำเนิดก็จะเกิดการขยายขนาดและเจริญเป็นเซลล์ปกติต่อไป

2.7.12 การจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย

การจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียจะใช้ลำดับความสัมพันธ์ของการจัดเรียงตัวของกรดนิวคลีอิกในการจัดลำดับวิวัฒนาการของไซยาโนแบคทีเรีย โดยสามารถที่จะจำแนกไซยาโนแบคทีเรียออกเป็นลำดับ (Order) ได้ดังนี้ 1.) Chrooccales ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เซลล์เดียว โดยจะจับกันแบบหลวมในเมือกและจะจับกลุ่มกันเป็นโคโลนี ได้แก่ *Gloeothece Microcystis Synechococcs* และ *Synechocystis* 2.) Oscillatoeiales เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายไม่มีเฮเทอโรซิสต์ ได้แก่ *Oscillatoria, Trichodesmium, Phormidium, Lyngbya, Hydrocoleus* และ *Spirulina* 3.) Nostocales เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายโดยจะมีเฮเทอโรซิสต์และอะไคนีทในเส้นสายมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยโฮโมโกเนียไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Nostoc, Anabaena* และ *Aulosira*

2.8 Anabaena siammensis



รูปที่ 2.12 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของ *A. siamensis* ที่ถูกเลี้ยงในอาหารBG 11 เป็นเวลา 2 อาทิตย์
ที่มา : Molecular biology of laboratory Biology Science KMITL Thailand

Anabaena siamensis เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่พบตามดินในทุ่งนาของประเทศไทยมีลักษณะเป็นเส้นสาย โดยจะมีเซลล์ต่อกันเป็นข้อๆ คล้ายสร้อยสังวาลซึ่งสามารถตรึงก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนที่อยู่ในบรรยากาศได้เนื่องจากมีเฮทเทอโรซิสต์เซลล์ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยเชื้อ *A. siamensis* จะพบเฮเทอโรซิสต์อยู่บริเวณส่วนหัวและส่วนปลายสุดของเส้นสาย ซึ่งจะพบเพียงเส้นสายละสองเฮเทอโรซิสต์ (รูปที่ 2.12) โดยเมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจนจะมีการกระตุ้นให้สร้างเฮเทอโรซิสต์เพื่อทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในอากาศมาทดแทนอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน เช่น เมื่อเราทำการเลี้ยงเชื้อ *A. siamensis* ในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ อาหาร $BG11_0$ หรืออาหารสูตร Allen - Arnon พบว่าไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลและเมื่อทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่า มีการสร้างเฮเทอโรซิสขึ้นเป็นจำนวนมากและเมื่อทำการเปรียบเทียบการสร้าเฮเทอโร-ซิสต์ในอาหาร $BG11_0$ และ Allen-Arnon จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดAllen- Arnon จะมีการสร้างเฮเทอโรซิสมากกว่าอาหารชนิด $BG11_0$ (Halil และคณะ, 2008)

สำหรับประโยชน์ของเชื้อ *A. siamensis* นี้จะนำมาใช้ในการทำปุ๋ยเนื่องจากเชื้อ *A. siamensis* มีประสิทธิภาพในกระบวนการตรึงไนโตรเจนสูง นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อีกด้วย และที่สำคัญคือนำมาใช้ในการผลิตพลังงานก๊าซไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกชนิดใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน โดยไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนที่สูงเนื่องจากสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและกระบวนการตรึงไนโตรเจน

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Selwin และคณะ (1991)ได้ทำการศึกษาการตรึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่แยกได้จากดินในทุ่งนาของประเทศไทยเพื่อศึกษากิจจกรรมการตรึงไนโตรเจนและการผลิตสารชนิดอื่นๆ โดยใช้สารโซเดียมอัลจิเนตเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์ซึ่งจพบว่า เซลล์ *Anabaena siamensis* ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตมีปริมาณการแสดงกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนและปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมสูงสุด

จากการศึกษาของ Yoshinori และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาผลของเกลือที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp.ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตซึ่งพบว่าเกลือมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ โดยเซลล์จะเจริญเติบโตได้น้อยลงเมื่อปริมาณความเข้มข้นของเกลือสูง จากสาเหตุนี้จึงเป็นผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ ลดลงด้วย แต่เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีเกลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 10 วันพบว่าเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงจะมีอัตราการเจริญที่ต่ำเนื่องจากไม่สามารเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นสามารถที่จะอยู่ในสภาวะที่มีเกลือสูงๆได้นาน โดยที่เซลล์ไม่ถูกทำลาย และจากการทดลองยังพบความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการสร้างไฮโดรเจนโดยเซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความเข้มข้นของเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์เซลล์สามารถที่จะผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดส่วนเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงจะสร้างไฮโดรเจนได้สูงสุดเมื่อความเข้มข้นของเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แล้วเกลือยังมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์

Gardea–Torresdey และคณะ(1998) โดยได้ทำการตรึงเซลล์ของเชื้อ ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 7942 ในสารพอลิเมอร์เจลของซิลิกาเจล เพื่อทดสอบการจับกับไอออนของโลหะหนักที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมโดยทำการทดสอบการดูดซับโลหะหนัก 4 ชนิดคือ คอปเปอร์ (II) ไอออน ปรอท (II) ไอออน นิกเกิล (II)ไอออน และแคดเมียม (II) ไอออน โดยไอออนของโลหะหนักเหล่านี้จะถูกดูดซับเก็บไว้ที่บริเวณผิวของเจลและสามารถที่จะนำกลับมาทำการดูดซับใหม่ในหลายๆ ครั้ง โดยนำไปเอาไอออนของโลหะออกโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและจากผลการทดลองเราจะพบว่า เซลล์ *Synechocystis* sp. PCC 7942 ที่ถูกตรึงสามารถที่จะดูดซับไอออนของโลหะหนักชนิดปรอทได้มากที่สุดรองลงมาคือ แคดเมียม นิกเกิล และคอปเปอร์ตามลำดับ

Halil Berberoglu และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* ATCC 29413 สามชนิดคือ Allen – Arnon BG11 และ $BG11_0$ เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยทำการบ่มใน 2 สภาวะคือ สภาวะที่มีการใช้แสงโดยมีการเติมคาร์บอนไดออกไซด์ผสมกับอากาศต่อมาจึงกระตุ้นสภาวะการผลิตไฮโดรเจนโดยการพ่นก๊าซอาร์กอนและเพิ่มความเข้มของแสงขึ้น ซึ่งพบว่าอาหารแต่ละชนิดจะทำให้เซลล์ของเชื้อสร้างเฮเทอโรซิสต์ในปริมาณที่แตกต่างกันโดยอาหาร Allen - Arnon เซลล์จะมีการสร้างเฮทเทอโรซิสต์มากที่สุดรองลงมาคือ $BG11_0$ และ BG11 ตามลำดับ การมีเฮเทอโรซิสต์แสดงถึงการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไนโตรจีเนส(เนื่องจากเฮเทอโรซิสต์ จะทำหน้าที่ใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนสในกระบวนการตรึงไนโตรเจน) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์แล้วจะให้ผลตรงกันข้ามคืออาหารชนิด Allen Arnon จะให้ปริมาณเซลล์ต่ำสุดรองจากอาหารชนิด BG11 และ $BG\ 11_0$ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามอาหารชนิด Allen Arnon ก็มีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนมากกว่าอาหาร BG11 และ $BG\ 11_0$ ถึง 5.5 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณของเฮทเทอโรซิสต์ที่มีอยู่มากนั่นเอง

David และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาหาสูตรเจลที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อ *Synechocystis* sp.PCC 6803 โดยสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ เตตระเอทอกซีไซเลน เตตระเมทอกซีไซเลน และเมทิลไตรเอทอกซีไซเลน และมีการเติมสารเติมแต่งที่เป็นพอลีเอทิลีนไกลคอล และกลีเซอรอลผสมกับสารไซเลนเป็นสูตรเจลสูตรต่างๆ ซึ่งจะพบว่าสูตรเจลที่เป็นสารเตตระเอทอกซีไซเลนที่มีการเติมพอลีเอทิลีนไกลคอลจะมีการผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด เนื่องจากสูตรเจลมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าสูตรเจลชนิดอื่นๆ โดยทั้งนี้จะใช้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนที่ได้โดยวิธี High throughput screening assay ซึ่งปริมาณของไฮโดรเจนที่จะขึ้นอยู่กับค่าการดูดกลืนแสงของอินดิเคเตอร์ที่ทำปฏิกิริยากับก๊าซไฮโดรเจนแล้วเกิดการเปลี่ยนสี

Naim และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* ที่ถูกตรึงในวุ้นที่นำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงและสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนและไม่มีแสง โดยใช้สองสภาวะดังกล่าวนี้ในการกระตุ้นสภาวะการผลิตไฮโดรเจนที่เหมาะสม ซึ่งปริมาณของไฮโดรเจนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงทั้งสองสภาวะจะพบว่า สภาวะแรกจะเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์และสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์โดยจะใช้เวลา 3 วันส่วนสภาวะที่สองจะเป็นการกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตไฮโดรเจนซึ่งจะใช้เวลา 40 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อนำเจลตัวเดิมมาทำการเลี้ยงในวงจรแบบเดิมซ้ำๆกันจะให้ผลผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างกันแต่เมื่อนำเซลล์ที่ถูกตรึงมาทำการเลี้ยงในสภาวะแรกเป็นเวลา 2 วันแล้วนำมาบ่มในสภาวะที่ 2 ตามปกติก็จะพบว่าปริมาณของไฮโดรเจนที่ได้ก็ยังมีปริมาณที่เท่ากับเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในสภาวะแรกสามวัน แต่เมื่อนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงซ้ำอีกสามรอบผลของไฮโดรเจนที่ได้จะไม่เท่ากับการเลี้ยงในวงจรแรกแต่จะลดลงเมื่อวงจรการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงที่ได้รับการบ่มในสภาวะแรกเพียงสองวันจะสร้างเซลล์และสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการผลิตไฮโดรเจนไม่เพียงพอกับการนำมาเลี้ยงในหลายๆ วงจร นอกจากนี้ยังพบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสในการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากแสงของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ ทำให้ยืดระยะเวลาในการบ่มในระยะที่สอง ทำให้มีการสร้างไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น แต่ทั้งนี้ก็ต้องขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์และสารต่างๆที่สร้างจากวงจรที่หนึ่งว่ามีปริมาณเพียงพอหรือไม่ และยังพบอีกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเมตาบอลิซึมเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะอยู่ในช่วง 37 – 40 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิที่สูงขึ้นกว่านี้ทำให้เซลล์ตายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* (ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG 11ชนิดแข็ง (ภาคผนวก ก)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG 11_0 (ภาคผนวก ก)

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Allen-Arnon (ภาคผนวก ก)

3.3 สารเคมี

3.3.1 ก๊าซสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

3.3.1.1 ก๊าซอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co.,Ltd.,Thailand)

3.3.1.2 ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (Thailand Industrial Gas Co., Ltd.,Thailand)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์

3.3.2.1 อัลจิเนต (SIGMA Aldrich Co., USA)

3.3.2.2 วุ้น (Bio Whittaker Molecular Application,USA)

3.3.2.3 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analar, English)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (Tommy Koqyo Co., Ltd., Japan)

3.4.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (Gallenkamp T490188,UK)

3.4.3 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) (International scientific supply HS123, Thailand)

3.4.4 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Lab focus Contherm Thermotec 200, Thailand)

3.4.5 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientific Promotion Co., Ltd, Thailand)

3.4.6 เครื่องผสมสาร (vortex) (Sientific Industries Inc Geniesz, USA)

3.4.7 เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ (Gas chromatrograph) (Shimadzu 15-A, Kyoto, Japan)

3.4.8 ไมโครปิเปต (micropipette) (Gypthai Co., Thailand)

3.4.9 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (glasswares) (National Scientific, USA)

3.4.10 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (bright field microscope) (Olympus, CH30, Japan)

3.4.11 เข็มฉีดก๊าซ (syringe) (Therumo Corperation, Philippines)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ซึ่งนำมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในอาหาร BG11และ $BG11_0$ และอาหาร Allen-Arnon ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่มีอุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ 18 ชั่วโมงต่อวัน จนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระยะlog phase ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อสามารถเจริญได้มากที่สุด ประมาณ 1- 2 สัปดาห์ วัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรและทำการนับจำนวนของเฮเทอโรซิสต์ ของเชื้อ *Anabaena siamensis* ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5.2 วิธีการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด ได้แก่ BG11 $BG11_0$ และ Allen-Arnon ตามภาคผนวก ก ทำการการถ่ายเชื้อ *Anabaena siamensis* ลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้ง 3 ชนิดฟลาส์กละ 100 มิลลิลิตร โดยใส่กล้าเชื้อบริสุทธิ์ฟลาส์กละ 300 ไมโครลิตร นำฟลาส์กที่ทำการถ่ายเชื้อแล้ว มาบ่มที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ 18 ชั่วโมงต่อวัน บนเครื่องเขย่า โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 2 สัปดาห์

3.5.3 วิธีการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Anabaena siamensis*

การศึกษาการเจริญเติบโตสามารถทำได้โดยการนับเซลล์ภายใต้ Hemacytometer กล้องจุลทรรศน์ และวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

3.5.4 วิธีการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

นำสารละลายเชื้อ *Anabaena siamensis* ที่เพาะเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย และทำการกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ทำการเพาะเลี้ยงปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด จากนั้นไล่อากาศในขวดออกโดยใช้เข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซอาร์กอน พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นดูดก๊าซปริมาตร 400 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 3.1 โดยการทดลองนี้จะใช้ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน

3.5.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

นำสารละลายเซลล์ 100 ไมโครลิตร มาเติมเมทานอลปริมาตร 900 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ผสมให้เข้ากัน หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายใส่หลอดใหม่แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการต่อไปนี้

ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ $12.7 \times A_{665} \times 10$

A_{665} คือ ค่าการวัดการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอที่สกัดได้โดยเมทานอลที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3. สภาวะต่างๆ ที่แสดงถึงความเหมาะสมของเครื่องGC ในการวัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Column Pack	2 m.
Molecular sieve	5 A°
Mesh	60/8
Detector	TCD
Detector block temp	100 °C
Injector and Detector temp	10 °C
Column temp	50 °C
Carrier gas	Argon gas
Flow rate of carrier gas	20 ml/min

3.5.6 วิธีการตรึงเซลล์

3.5.6.1 ขั้นตอนการเตรียมเจลที่ใช้เป็นวัสดุตรึง

3.5.6.1.1 ขั้นตอนการเตรียมเจลโซเดียมอัลจิเนต

ทำการเตรียมแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ในอาหารทั้ง 2 ชนิด (BG11 และ $BG11_0$) ปริมาตรชนิดละ100 มิลลิลิตร โดยการชั่งแคลเซียมคลอไรด์มา 1.1 กรัมใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (BG11 และ $BG11_0$) ชนิดละ100 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันสูงความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและทำการเตรียมอาหารทั้ง 2 ชนิด (BG11 และ $BG11_0$) ผสมกับโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำได้โดยการชั่งโซเดียมอัลจิเนตมา 1.5 กรัมมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (BG11 และ$BG11_0$) ชนิดละ 50 มิลลิลิตร ทำการละลายโซเดียมอัลจิเนตโดยต้มให้อัลจิเนตละลายจนหมดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันสูงความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6.1.2 การเตรียมเจลวุ้น

เตรียมเจลวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งวุ้น 1.5 กรัมใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด (BG11 และ $BG11_0$) ชนิดละ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดันสูงความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.6.2 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ในอาหาร 2 ชนิด (BG11 และ $BG11_0$) มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วยอาหารทั้ง 2 ชนิด (BG11 และ $BG11_0$) จำนวน 3 ครั้ง

3.5.6.3 ขั้นตอนการหยดเจล

นำเซลล์ที่ผ่านการล้าง (ในข้อ 3.5.6.2) มาผสมกับเจลที่เป็นวัสดุตรึง ซึ่งได้แก่โซเดียมอัลจิเนตและวุ้น โดยเซลล์ที่จะต้องนำมาทำการตรึงในเจลโซเดียมอัลจิเนตจะต้องทำการผสมสารละลายเซลล์จากข้อที่ 3.5.6.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับเจลโซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมไว้ 50 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้มือเขย่าเบาๆ หลังจากนั้น นำเจลที่มีเจลผสมอยู่มาทำการหยอดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในอาหาร BG 11 และ BG 11_0 โดยใช้หลอดฉีดยาบีบเจลลงในสารละลายซึ่งหนึ่งหยดจะได้เจล 1 เม็ด ภายในมีเซลล์ที่ถูกตรึง โดยเจล 1 เม็ดจะมีขนาดประมาณ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้น ทำการล้างเม็ดเจลที่ตรึงได้ในอาหาร BG11 และ $BG11_0$ ตามชนิดของเม็ดเจลที่มีอาหารอยู่ (BG11 และ $BG11_0$) จากนั้นทำการตักใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรขวดละ 200 เม็ด

ส่วนการตรึงเซลล์โดยใช้วัสดุตรึงเป็นวุ้นนั้นสามารทำได้โดย นำเซลล์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาผสมกับวุ้นที่เราได้เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.5.6.1.2 โดยใช้สารละลายเซลล์ 10 มิลลิลิตรต่อเจลวุ้น 50 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (ในการผสมเซลล์กับเจลวุ้นนั้นไม่ควรทำการผสมในขณะที่เจลวุ้นร้อนอยู่ควรทำการผสมที่เจลวุ้นมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส) เมื่อผสมเจลวุ้นกับเซลล์จนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทันทีโดยทำการเทให้วุ้นมีความหนา 1 มิลลิเมตร หลังจากนั้นทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วทำการตัดวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกเต๋าให้มีปริมาตรเท่ากับ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วตักเม็ดวุ้นลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 เม็ด ตามอาหารแต่ละชนิดที่ผสมอยู่ในเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึง

นำเซลล์ที่ถูกตรึงมาทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ แล้วนำไปวัดปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทุก 1สัปดาห์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

3.5.7 วิธี การวัดปริมาณไฮโดรเจนในเซลล์ที่ถูกตรึง

นำเซลล์ที่ถูกตรึงทั้งในวุ้นและอัลจิเนตมาใส่ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 30 เม็ดเจล ปิดฝาขวด จากนั้นไล่อากาศในขวดออกโดยใช้เข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวดส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นบ่มในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วจึงทำการวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยทำการดูดก๊าซปริมาตร 400 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) โดยการทดลองนี้จะใช้ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ และสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงดังตารางที่ 3.1 ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน

3.5.8 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเซลที่ถูกตรึง

นำเม็ดเจลที่ตรึงในอัลจิเนตและในวุ้นจำนวน 1 เม็ดไปแช่ในเมทานอลบริสุทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ มีอุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1000 ไมโครลิตรและบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไปผสมให้เท่ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการแปรผันอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *Anabeana siamensis*

จากการการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหาร 3 ชนิดซึ่งได้แก่ อาหารสูตรBG11, $BG11_0$ (อาหารสูตร BG11 ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน) และอาหารสูตร Allen – Arnon เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการวัดการเจริญเติบโตโดยตรวจจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร พบว่าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีจำนวนเซลล์สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร BG11 ชนิดนี้เป็นเวลา 13 วัน รองลงมาคือเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ แต่ในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Allen – Arnon นั้นจำนวนเซลล์ที่นับได้กลับลดลงเรื่อยๆ และลดลงต่ำสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน (รูปที่ 4.1 ก) ผลการทดลองวัดจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์สอดคล้องกับผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ซึ่งพบว่า เซลล์ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด รองลงมาคือ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ (รูปที่ 4.1 ข) และไม่พบการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Allen – Arnon จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า อาหารสูตร BG11 เป็นสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดรวมทั้ง *A. siamensis* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายและสามารถตรึงไนโตรเจนได้ เนื่องจากอาหารสูตร BG11 มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์ *A. siamensis* ก็สามารถเจริญได้เช่นกันแต่มีการเจริญต่ำกว่าเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 เนื่องจากเซลล์ต้องตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ เพื่อผลิตเป็นแอมโมเนียที่เซลล์จะเอาไปใช้ได้ จึงทำให้ต้องเสียพลังงานและเวลาไปใช้เวลาในการตรึงไนโตรเจน สำหรับอาหารสูตร Allen – Arnon เป็นอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจนเช่นกันแต่มีปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในปริมาณสูง ซึ่งมีปริมาณมากเกินไปสำหรับการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้แต่ยังคงสามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$

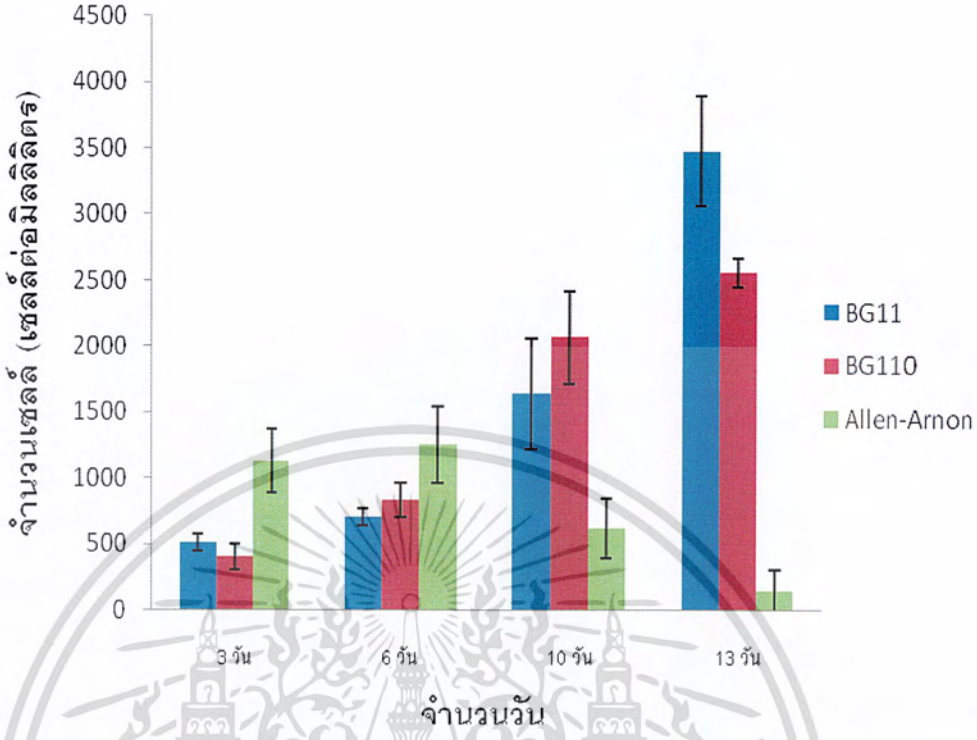
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้น ทำการตรวจนับจำนวนของเซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่อยู่ในเส้นสายของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ พบว่าเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ จะมีจำนวนเฮเทอโรซิสต์สูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 13 วัน (รูปที่ 4.1 ค) ส่วนเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 จะมีจำนวนของเฮเทอโรซิสต์น้อยที่สุด และจะเริ่มพบเฮเทอโรซิสต์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10 วัน (รูปที่ 4.1 ค) ส่วนเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Allen – Arnon มีจำนวนเซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่นับได้จะมีจำนวนคงที่เป็นระยะเวลา 6 วัน และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 10 แต่ยังคงน้อยกว่าจำนวนของเฮเทอโรซิสต์ที่พบในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (BG110 และ Allen-Arnon) มีจำนวนเซลล์เฮเทอโรซิสต์สูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากเมื่ออาหารขาดธาตุไนโตเจนซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์ปกติสร้างผนังหนาและพัฒนามาเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์เพื่อใช้ในการตรึงไนโตรเจน

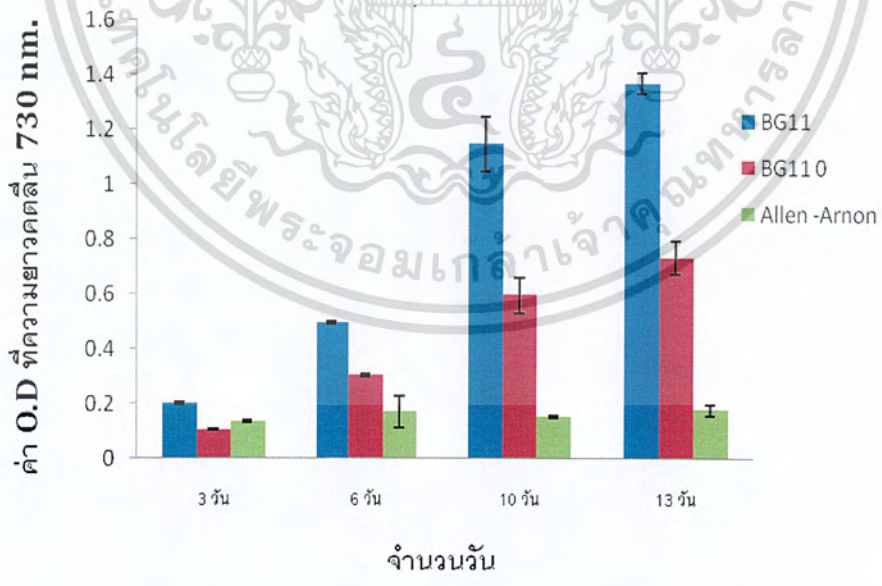
หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์มากระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการปิเปตสารละลายเซลล์ลงในขวด GC – vial ทึบแสง ฉีดพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที ทำการบ่มในสภาวะที่ไร้อากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำส่วน head space ปริมาตร 400ไมโครลิตรมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง GC –TCD พบว่าก๊าซไฮโดรเจนเคลื่อนที่ออกมาเป็นอันดับแรกที่ retention time ประมาณ 0.935 นาที เมื่อทำการเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานของก๊าซไฮโดรเจน พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร$BG11_0$ มีปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงสุดคือ 0.205 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง รองลงมาคือเซลล์ที่ทำการเลี้ยงในอาหารสูตร Allen – Arnon ซึ่งปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.085 ไมโครโมลไฮโรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 จะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนน้อยที่สุดคือประมาณ 0.0095 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.1 ง)

จากผลการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่มีแหล่งธาตุอาหารครบถ้วนสมบูรณ์จะทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโต และปริมาณของเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีผลต่อการสร้างเฮเทอโรซิสต์ ซึ่งมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการออกซิเดชันของ NADH โดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของเอนไซม์ไบไดเร็คชันนาลไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) หรือรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) เพียงอย่างเดียวทำให้ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้ค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

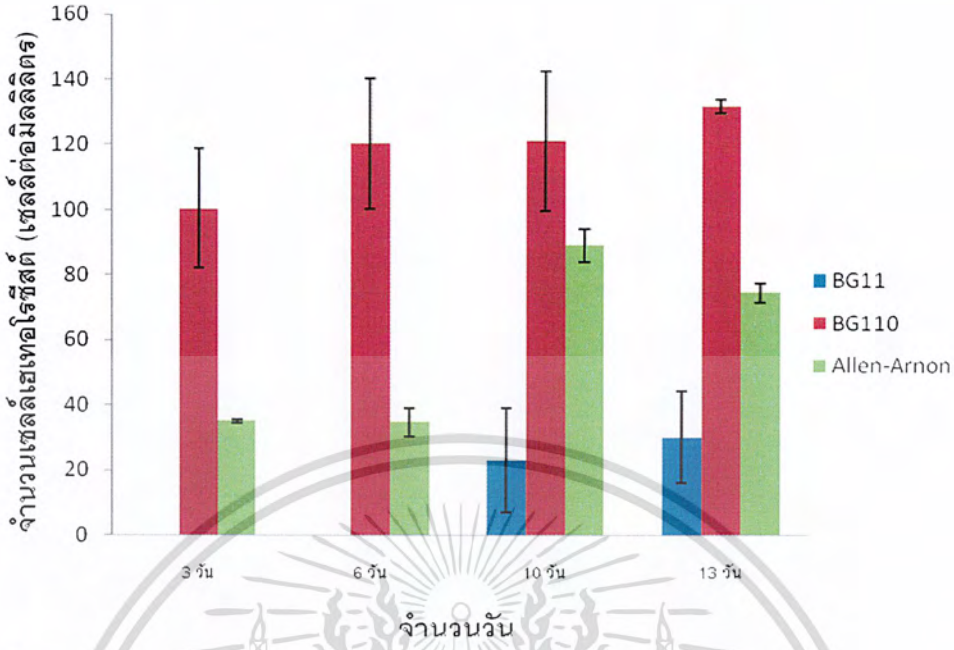


รูปที่ 4.1 ก จำนวนเซลล์ *A. siamensis* ที่นับได้จากฮีมาไซโตมิเตอร์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11, $BG11_0$ Allen-Arnon) ณ เวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง

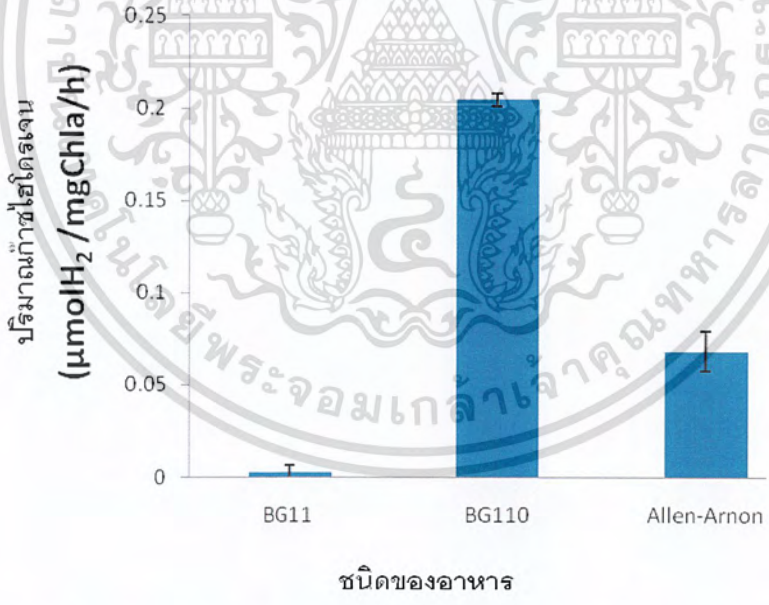


รูปที่ 4.1 ข ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11, $BG11_0$ และAllen-Arnon)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ค จำนวนเฮเทอโรซิสต์ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11 $BG11_0$ และ Allen-Arnon)



รูปที่ 4.1 ง ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด (BG11 $BG11_0$ และ Allen-Arnon)

เลี้ยงในอาหารสูตรที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นการกระตุ้นการสร้างเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย โดยธรรมชาติแล้วไซยาโนแบคทีเรีย *A. Siamensis* จะทำการสร้างเฮเทอโรซิสต์เซลล์ในสภาวะที่เซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ขาดแหล่งไนโตรเจนเพื่อทำการตรึงไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากบรรยากาศมาใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งจะทำให้เซลล์มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพิ่มขึ้นแต่ในการทดลอง จะพบว่าเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ก็มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์เซลล์ขึ้นมาบ้างเช่นกัน แต่จะสร้างขึ้นช้ากว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ปราศจากแหล่งของไนโตรเจน (รูปที่ 4.1 ค) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่งเซลล์จะมีการใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารจนหมด เซลล์จึงอยู่ในสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์จึงมีการสร้างเฮเทอโรซิสต์เซลล์ขึ้นมาเพื่อตรึงไนโตรเจนจากชั้นบรรยากาศมาเป็นแหล่งอาหารแทนแหล่งของธาตุไนโตรเจนในสูตรอาหารที่ถูกใช้หมดไป ดังนั้นจากการทดลองจะพบว่าสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A.siamensis* ควรเป็นสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มทั้งปริมาณเซลล์และจำนวนของเฮเทอโรซิสต์เซลล์คืออาหารสูตร $BG11_0$ ซึ่งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้เซลล์จะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากที่สุด ส่วนในอาหารสูตร BG11 นั้นเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากขึ้นเท่านั้น แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่สำหรับอาหารสูตร Allen – Arnon นั้นเป็นสูตรอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจนเช่นเดียวกับอาหารสูตร $BG11_0$ แต่มีการเติมเกลือแอมโมเนียมวานาเดต (NH_4VO_3) ลงไปปริมาณ 0.023 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) ซึ่งจากรูปที่ 4.1ก ผลของอาหารสูตรนี้ทำให้เซลล์ตายลงเรื่อยๆ เนื่องมาจากสารบางตัวในอาหารชนิดนี้เกิดปฏิกิริยากันแล้วเกิดเป็นแผ่นตะกอนขนาดใหญ่มากจนเซลล์ไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ หรืออาจจะมาจากสารที่เราใช้ในการเตรียมอาหารสูตรนี้เสื่อมคุณภาพหรือหมดอายุ

4.2 ผลการศึกษาโครงสร้างภายในของเม็ดเจลของไซยาโนแบคทีเรียที่ถูกตรึงโดยโซเดียมอัลจิเนตและวุ้น

จากการเก็บเกี่ยวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ (ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*) เป็นเวลา 2 สัปดาห์เพื่อให้เซลล์เจริญอยู่ในช่วงที่มีการเจริญสูงสุด (log phase) จากนั้นทำการตรึงเซลล์โดยใช้วัสดุตรึง 2 ชนิด คือโซเดียมอัลจิเนตและวุ้น

จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาศึกษาโครงสร้างลักษณะเซลล์ภายนอก พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตมีเม็ดเจลที่มีลักษณะกลมคล้ายเม็ดสาคูสีเขียวอ่อนและเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนานขึ้นเม็ดเจลจะมีสีเขียวเข้มและมีเส้นสายของไซยาโนแบคทีเรียแทงทะลุออกมาจากเม็ดเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

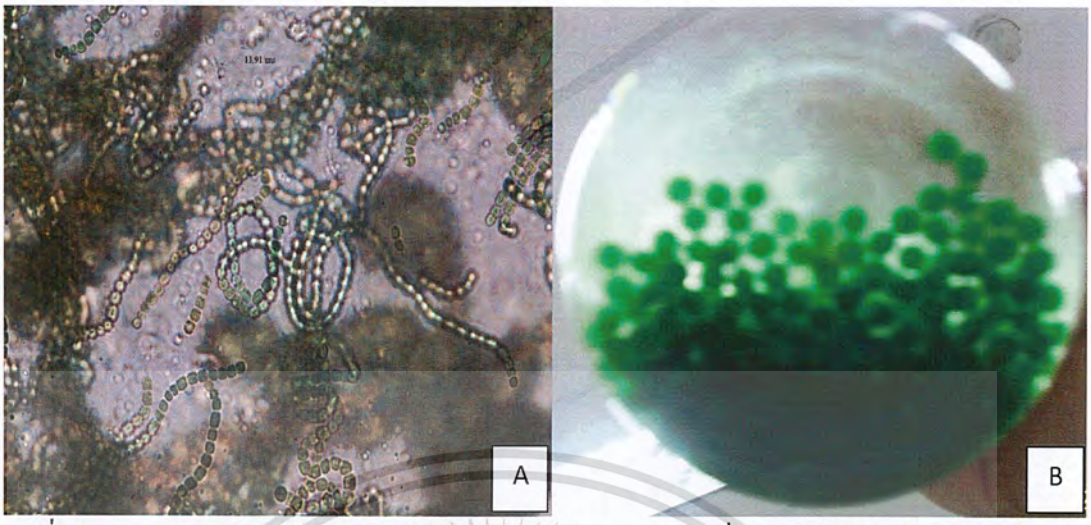
(รูปที่ 4.2 ก) ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นจะทำการตัดเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าโดยด้านทั้ง 6 ด้านมีขนาดเท่ากัน ซึ่งจะมีสีเขียวอ่อนออกเหลืองมองเห็นเป็นเส้นสายของไซยาโนแบคทีเรียเป็นวุ้นชัดเจนและเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นเม็ดเจลจะมีสีเข้มขึ้นโดยเฉพาะที่พื้นผิวทั้ง 6 ด้านของเม็ดเจลและมีเซลล์หลุดออกมาในสารละลายอาหารในฟลาสก์ซึ่งทำให้สารละลายอาหารในฟลาสก์มีสีเขียว (รูปที่ 4.2 ข) หลังจากนั้นทำการศึกษาลักษณะภายในเม็ดเจลของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยใช้วัสดุตรึงทั้ง 2 ชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต ภายในเม็ดเจลจะมีสีเขียวอ่อนและขาวแซมบ้างโดยจะจับตัวกันอย่างสม่ำเสมอเป็นระเบียบกระจายทั่วทั้งเม็ดเจลและเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจะเห็นเฮเทอโรซิสต์เซลล์เส้นสายละ 2 เซลล์ (รูปที่ 4.2 ก) ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นนั้น เซลล์เซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลจะมีสีเขียวอมเหลืองในปริมาณน้อยแต่จะพบเซลล์ที่มีสีขาวมากกว่า โดยเซลล์ที่มีอยู่ในเม็ดเจลจะมีในปริมาณที่ค่อนข้างเบาบางอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ไม่สม่ำเสมอกัน มีเฮเทอโรซิสต์เส้นสายละ 2 เซลล์เหมือนกับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต (รูปที่ 4.2 ข)

จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตมีการเจริญเติบโตของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ในเม็ดเจลได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้น เนื่องจากโครงสร้างของเม็ดเจลของเซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตเป็นโครงสร้างร่างตาข่ายที่เกิดจากการจับกันของไอออนในวัสดุตรึงกับสารที่ช่วยก่อตัวให้อัลจิเนตเป็นเม็ดเจล ($CaCl_2$) และยังมีไอออนของสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รวมอยู่ด้วยด้วย จึงทำให้เซลล์ที่อยู่ในเม็ดเจลมีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบและเกิดเป็นช่องเล็กๆ ซึ่งจะช่วยให้โมเลกุลของสารอาหาร อากาศ และผลิตภัณฑ์ที่เซลล์ผลิตขึ้นสามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกจากเม็ดเจลได้ ทำให้เซลล์ได้รับสารอาหารได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้น ซึ่งไม่มีช่องว่างให้สารผ่านเข้าออกเม็ดเจล เซลล์จึงมากระจุกกันอยู่ที่บริเวณพื้นที่ผิวทั้ง 6 ด้านของเม็ดเจลและเมื่อเวลานานขึ้นสารอาหารที่มีอยู่ในวุ้นไม่เพียงพอ (ในวัสดุตรึงแต่ละชนิดจะมีอาหารที่เราใช้เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียผสมอยู่) เซลล์ก็จะหลุดออกจากเม็ดเจลมาเจริญในอาหารด้านนอกเม็ดเจล จึงทำให้สารละลายอาหารมีสีเขียวของเซลล์

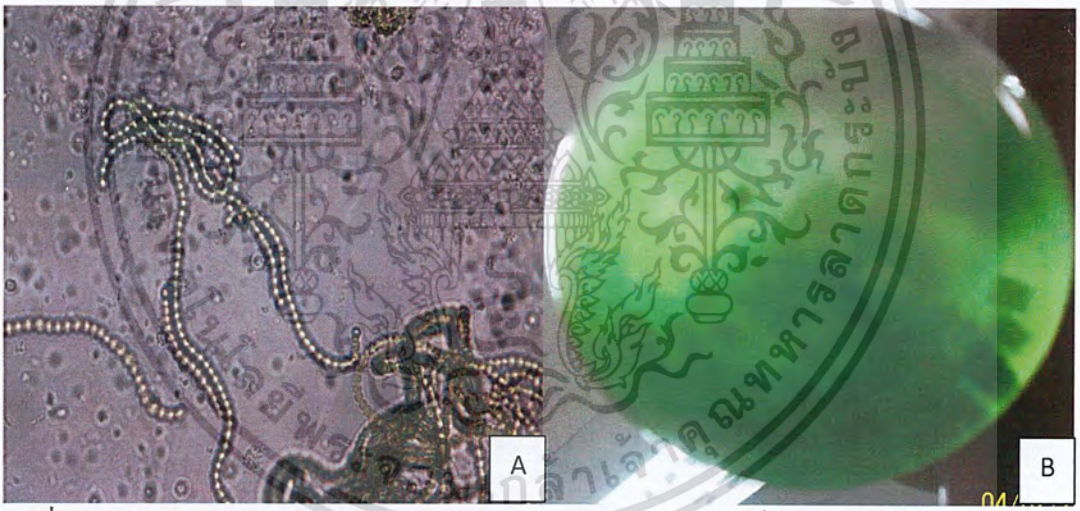
4.3 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตและวุ้นเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ

จากการเพาะเลี้ยงนำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์มาทำการตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตและวุ้น จากนั้นนำเม็ดเจล 200 เม็ดที่ผ่านการตรึงมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $BG11_0$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยทำการเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ก ภาพของเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต คือ จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (A) และเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต (B) ในอาหารสูตร $BG11_0$

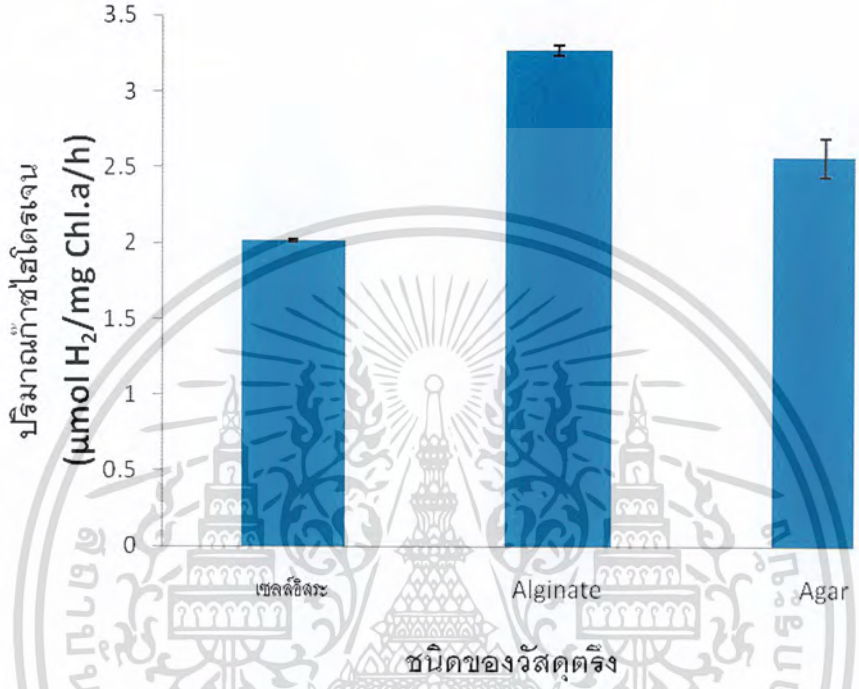


รูปที่ 4.2 ข ภาพของเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ถูกตรึงในวุ้นภาพจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X (A) และไซยาโนแบคทีเรียที่ถูกตรึงด้วยวุ้นในอาหาร $BG11_0$ (B)

เลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำแม็ดเจลที่ถูกตรึงใส่ลงในขวด GC – vial ที่ทึบแสงขวดละ 30 เม็ดในอาหารสูตร $BG11_0$ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและทำการวัดปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่เซลล์ผลิตได้ด้วยเครื่อง GC –TCD พบว่า เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์อิสระถึงประมาณ 2 เท่า โดยเฉพาะเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากที่สุดถึง 3.275 ไมโครโมลไฮโดรเจน ต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นจะมีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนรองลงมาคือ 2.017 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในเซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและที่ถูกตรึงด้วยวุ้นในอาหารสูตร $BG11_0$

จากการทดลองพบว่าเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ทำการตรึงมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์อิสระเมื่อเลี้ยงในสภาวะเดียวกันเกือบ 2 เท่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และในการทดลองได้ทำการตรึงเซลล์โดยใช้วัสดุตรึง 2 ชนิดที่มีหลักการในการตรึงเซลล์ที่แตกต่างกัน

โดยแบบแรกเป็นการตรึงเซลล์ในโซเดียมอัลจิเนต ซึ่งเป็นหลักการตรึงเซลล์แบบการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในเม็ดเจลของวัสดุตรึงหรือ encapsulation เซลล์ที่ถูกตรึงจึงมีลักษณะเป็นเม็ดเจลเม็ดเล็กๆ ซึ่งการตรึงเซลล์แบบนี้ เซลล์จะรวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับวัสดุตรึงโดยจะมีอาหารสูต $BG11_0$ผสมอยู่และเมื่อนำมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จะเกิดการก่อตัวเป็นเม็ดเจลไมโครแคปซูล (microcapsule) ซึ่งเกิดจากการแลกเปลี่ยนประจุกันระหว่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์กับวัสดุตรึงโซเดียมอัลจิเนตโดยโซเดียมในเจลของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมอัลจิเนตจะเกิดการแตกตัวเป็นโซเดียมไอออนซึ่งมีประจุบวก (Na^+) และอัลจิเนตเมื่อจับกับเซลล์ก็จะมีประจุลบในรูปของสารละลาย ส่วนในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายก็จะเกิดการแตกตัวเป็นแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ซึ่งมีประจุบวกและจะจับกับแอลจิเนตที่ที่จับกับผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียซึ่งมีประจุเป็นลบ ส่วนคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ซึ่งมีประจุเป็นลบก็จะจับกับโซเดียมไอออน (Na^+) ที่แตกตัวมาจากโซเดียมอัลจิเนตกลายเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ซึ่งการยึดจับกันของประจุแคลเซียมไอออนกับอัลจิเนตและผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจะเป็นในลักษณะของร่างปกคลุมเซลล์ในลักษณะของไมโครแคปซูลโดยจะมีช่องเล็กๆ ให้สารโมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านเข้าออกได้ สภาวะการตรึงเซลล์แบบนี้นอกจากเซลล์จะดูดซึมสารอาหารและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในเม็ดเจลอย่างรวดเร็ว การที่เซลล์ได้รับอาหารสูตร $BG11_0$ ที่ถูกผสมอยู่ในและนอกเม็ดเจลยังเป็นการเพิ่มการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์อีกด้วย นอกจากนี้ สภาวะที่เซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ในโครงร่างแหของเม็ดเจลยังเป็นการบดบังการเคลื่อนที่ของแสงและก๊าซออกซิเจนที่จะเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส โดยจะทำงานได้เมื่อเกิดกระบวนการหมักจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photofermentation) ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และสภาวะดังกล่าวยังเอื้ออำนวยต่อการทำงานของเอนไซม์ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชนิดต่างๆ ที่อยู่ในเฮเทอโรซิสต์เซลล์ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ไนโตรจีเนสและอัพเทคไฮโดรจีเนส

ส่วนแบบที่สองนั้นเป็นการตรึงเซลล์โดยใช้วัสดุตรึงที่เป็นวุ้นโดยการตรึงเซลล์ ซึ่งใช้หลักการการยึดเซลล์ให้อยู่กับวัสดุตรึงหรือ entrapment การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะอาศัยคุณสมบัติการจับตัวกันเป็นของแข็งของวัสดุตรึงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง ไม่ได้อาศัยพันธะทางเคมีใดๆ จึงเปรียบเสมือนการเลี้ยงเซลล์ในอาหารแข็งแล้วตัดนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวอีกที แต่การตรึงเซลล์ในลักษณะนี้ เซลล์สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีเช่นกัน แต่ต่ำกว่าแบบแรก เหตุผลที่เป็นเช่นนี้ก็เนื่องจากเซลล์ที่ตรึงด้วยวัสดุตรึงนี้จะอาศัยการคุณสมบัติการจับตัวของวัสดุตรึงซึ่งก็คือวุ้นที่ถูกผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับเซลล์ เมื่อตัดให้ได้เป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ก็จะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมสารอาหารได้ แต่สารอาหารไม่สามารถที่จะซึมผ่านเข้าไปยังเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลได้ จึงทำให้เซลล์บริเวณพื้นผิวของเม็ดเจลเจริญได้ดีและเกิดการขัดขวางการสังเคราะห์ด้วยแสงของเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจล เซลล์ภายในเม็ดเจลจึงเกิดกระบวนการหมักในสภาวะไม่มีแสง (Photofermentation) โดยใช้พลังงานจากสารอาหารที่อยู่ในเม็ดเจลซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสและยังกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่อยู่ภายในเฮเทอโรซิสต์เซลล์ (เฮเทอโรซิสต์จะถูกกระตุ้นการผลิตโดยอาหารสูตร $BG11_0$ ที่ผสมอยู่ในวัสดุตรึง) แต่เนื่องจากวุ้นไม่ใช่โครง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

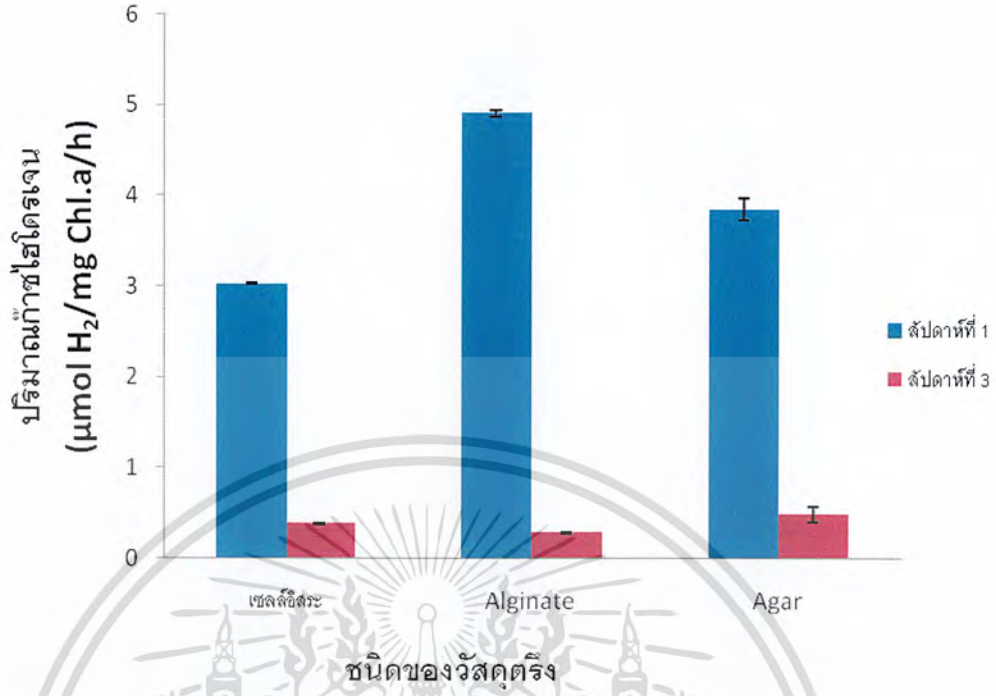
ร่างตาข่ายที่มีรูพรุนเหมือนกับอัลจิเนต ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จึงเคลื่อนที่ออกจากเม็ดเจลได้น้อย ดังนั้นในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้น ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้ส่วนใหญ่จึงมาจากการผลิตของเซลล์ที่อยู่บริเวณผิวเม็ดเจลทั้ง 6 ด้านเท่านั้น แต่ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทีผลิตได้ก็ไม่ถือว่าแตกต่างจากเซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตมากนักซึ่งถ้าหากตัดเม็ดเจลของวุ้นให้เป็นรูปทรงกลมเหมือนกับโซเดียมอัลจิเนตปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตจากเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวัสดุตรึงนี้ก็อาจเพิ่มขึ้นได้

4.4 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ที่ถูกตรึงในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตและวุ้น ในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์ พบว่า เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะมีสีเขียวของเม็ดเจลอ่อนกว่าสีของเซลล์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยเม็ดเจลที่ถูกตรึงในอัลจิเนตจะมีสีเขียวเข้มกว่าเม็ดเจลที่ถูกตรึงในวุ้น จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ถูกตรึงชนิดละ 30 เม็ด ลงในขวด GC Vial ที่ทึบแสงพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที และบ่มในสภาพไร้อากาศเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-TCD พบว่าเซลล์ตรึงในอัลจิเนตที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูงกว่าเซลล์ตรึงที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ประมาณ 16 เท่า (รูปที่ 4.4) ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงในวุ้นและในเซลล์อิสระก็ให้ผลคล้ายๆกันแต่ปริมาณไฮโดรเจนน้อยกว่าเซลล์ที่ตรึงในอัลจิเนต (รูปที่ 4.4)

จากผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ($BG11_0$) ที่เวลา 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง เนื่องจาก เซลล์ที่เลี้ยงในระยะเวลามากขึ้นทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงขึ้นเป็นผลมาจากการสังเคราะห์แสงที่สูงขึ้น ซึ่งสภาวะเช่นนี้จะมีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน นอกจากนี้เซลล์ยังต้องสูญเสียพลังงานไปกับการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์และกระบวนการต่างๆเพื่อให้วิถีเมตาบอลิซึม ซึ่งเป็นผลให้ตัวรีดิวซ์ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

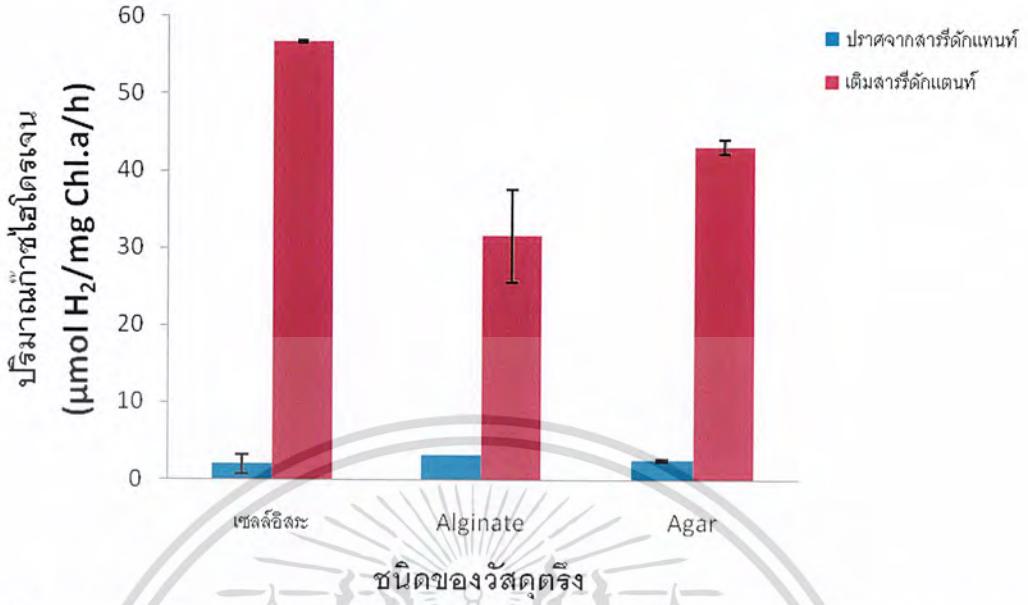


รูปที่ 4.4 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ผลิตขึ้น ณ เวลา 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ $BG11_0$

4.5 ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยการเติมสารรีดักแทนท์

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตและวุ้นในอาหารสูตร $BG11_0$ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้น นำเซลล์ที่ถูกตรึงชนิดละ 30 เม็ด ถ่ายลงในขวด GC – vial ที่ทึบแสงเติมอาหารสูตร $BG11_0$ ลงไปพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที พ่นก๊าซอาร์กอนและทำการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาทำปฏิกิริยากับสารรีดักแทนท์ทั้ง 2 ชนิดคือ เมทธิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนท์อย่างละ 0.5 มิลลิลิตรและวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเครื่อง GC –TCD พบว่า เซลล์ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่เติมสารรีดักแทนท์ (รูปที่ 4.5) และเมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ที่มีการเติมสารรีดักแทนท์ พบว่า เซลล์อิสระจะมีปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวัสดุตรึงทั้งสอง (รูปที่ 4.5) โดยในเซลล์ที่ถูกตรึงพบว่า เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นจะมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนต (รูปที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงกับสารรีดักแทนท์

จากผลการทดลองพบว่าสารรีดักแทนท์เมทธิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนท์มีผลในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเซลล์ที่ถูกตรึงน้อยกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากการตรึงเซลล์เป็นการยึดเซลล์ให้อยู่กับที่ทำให้เซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ เซลล์จึงไม่สามารถรับประจุไอออนของสารรีดักแทนท์ได้อย่างทั่วถึง ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากการเติมสารเร่งปฏิกิริยาในเซลล์ที่ถูกตรึงจึงน้อยกว่าเซลล์อิสระ และจากรูปที่ 4.5 พบว่า การเร่งปฏิกิริยาของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวัสดุตรึงที่แตกต่างกันจะให้ผลการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน โดยเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นจะให้ผลผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงในอัลจิเนต เนื่องจากโครงสร้างของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้นพื้นผิวเจลมีลักษณะที่บาง ไอออนของสารรีดักแทนท์จึงซึมผ่านได้ดีกว่าโครงสร้างของเจลที่เป็น อัลจิเนตซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดการการยึดจับกันระหว่างไอออนของวัสดุตรึงกับประจุไอออนในโครงสร้างผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ซึ่งจะมีผลต่อการขัดขวางการทำงานของสารรีดักแทนท์ เพราะจะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างไอออนที่อยู่ในโครงสร้างของเจล กับไอออนของสารรีดักแทนท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. อาหารสูตร $BG11_0$ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต การสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* โดยให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.205 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ ต่อชั่วโมง ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง

2. จากการศึกษาโครงสร้างภายในเม็ดเจลของเซลล์ที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตและวุ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ สรุปได้ว่าเม็ดเจลที่มีเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะมีจำนวนเซลล์และเซลล์เฮเทอโรซิสต์มากกว่าเม็ดเจลที่มีเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้น เนื่องจากโครงสร้างของเม็ดเจลโซเดียมอัลจิเนตเป็นโครงสร้างที่มีการดูดซึมและปลดปล่อยสารออกมาได้ดีกว่า

3. เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวุ้น และเซลล์อิสระ โดยมีค่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 3.275 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอต่อชั่วโมง

4. เซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระจะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

5. เซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระ สามารถถูกกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าเดิม 10 – 20 เท่าได้ เมื่อเติมสารรีดักแทนท์ เมธิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนท์ โดยให้ผลกับเซลล์อิสระมากกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวัสดุตรึงชนิดต่างๆ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าในเซลล์อิสระ ซึ่งนอกจากวัสดุตรึงที่เราใช้ในการทดลองแล้วอาจจะพิจารณาใช้วัสดุตรึงชนิดอื่นๆ เช่น เจลลาติน คาราจีแนน แป้งมัน กัม เป็นต้น โดยเฉพาะแป้งมันที่ผลิตจากสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีมากในประเทศและในการทดลองครั้งต่อไป ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ที่ถูกตรึงโดยการนำเม็ดเจลกลับมาใช้ใหม่ โดยการเปลี่ยนอาหารว่าสามารถใช้ได้กี่ครั้ง นอกจากนี้อาจศึกษาปัจจัยความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นไปได้อื่นๆ ในการสร้างสภาวะที่เหมาสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ที่ถูกตรึง เช่น สภาวะการให้แสง การศึกษาสารเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เป็นต้น เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตและเพื่อยกระดับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อสร้างพลังงานชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติดีกว่าพลังงานที่เราใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัมปนาท มหิพันธ์, ธีราภรณ์ มะลิวัลย์. การศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเล. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง.

Cassidy, M.B., Lee, H. and Trevors J.T. 1996. Review :Environment application of immobilized microbial cells: *Journal of Industrial Microbiology*. 16, 79 – 101.

Dickson, D.J., Page, C.J. and Ely, R.L. 2009.Photobiological hydrogen production from Synechocystis sp. PCC 6803 encapsulation sol – gel: *International Journal of Hydrogen Energy*.34,204 – 215.

Miller, E. and Rocheleau,R. 2000. Photoelectrochemical hydrogen production. Proceeding of the 2000 Hydrogen Program Review.1, 1 – 14.

Gardea – Torresdey, J.L., Arenas, J.L., Fracisco, N.M.C.,Tiemann, K.J. and Webb, R.1998. Ability of immobilized cyanobacteria to remove metal ions from solution and demonstration of the present of metallonein genes various strains: *Journal of Hazardous Substance Research*. 1, 2 – 18.

Berberoglu, H., Jay, J. and Pilon, L. 2008. Effectof nutrient media on photobiological hydrogen production by Anabaena variabilis ATCC 29413: *International Journal of Hydrogen Energy* .33,1172 – 1184.

Jen, A. and Rudiger, S.1998. Hydrogen metabolism in organism with oxygenic photosynthesis: hydrogenase as important regulation devices for a paper redox poising?: *Journal Photochemistry Photobiol.B: Biol*.47,1 -11.

Turner, J., Sverdrup, G., Mann, M.K.,Maness, P.C., Kroposki, B., Ghirardi, M., Evans, R.J. and Blake D. 2007.Renewable hydrogen production: *International Journal of Energy Research*. 32, 379 – 407.

Mareno-Garrido, I. 2008. Review Microalgae immobilization : Current techniques and use: Bioresource Technology. 99, 3949 – 3964.

Rashid, N., Song, W., Park, J.,Jin, H.F. and Lee, K. 2009. Characteristic of hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Micricystis aeruginosa* through of photosynthesisand anaerobic incubation: *Journal of Industrail and Engrineering Chemistry*. 15, 498 – 503.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Maness, P.C., Yu, J., Eckert, C. and Ghirardi, M.L. 2009. Photobiological hydrogen production – prospects and challenge: *Microbe*. 4,275 – 280.

Thomus, S.P., Zaritsky,A. and Boussiba, S. 1991. Ammonium excretion by mutant the nitrogen – fixing cyanobacteria *Anabaena siamensis: Bioresource technology*. 38, 161 – 166.

Kuwada, Y. and Ohta, Y. 1991. Effect of salinity on hydrogen production and growth of *Lyngbya* sp.: Journal Fac. Appl.Biol.Sci. 30, 13 – 17.

Yu, J. and Takahashi, P. 2007. Biohydrolysis base hydrogen production by cyanobacteria and green algae: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 79 -89.

Fuel cell technology program. 2010. Hydrogen production. [online]:https://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/production/current_technology.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ BG11, $BG11_0$ และ Allen-Arnon

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ BG11, $BG11_0$ และ Allen-Arnon (ต่อ)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นในอาหาร (มิลลิกรัม/ลิตร)		
	BG11	BG110	Allen-Arnon
H_3BO_3	2.77	2.77	2.86
NH_4VO_3	0	0	0.023
$CoCl_2.6H_2O$	0.048	0.048	0.040

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การคำนวณหาปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

1.สูตรคำนวณประมาณคลอโรฟิลล์สำหรับกสรวิเคาระห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

$$12.7 \text{ xAxB xO.D.}_{665}$$

เมื่อ12.7 คือค่าน้ำหนักมาตรฐานของคลอโรฟิลล์มาตรฐาน

A คือค่าความเจือจางที่ทำการสกัดคลอโรฟิลล์

B คือปริมาตรเซลล์ที่อยู่ในขวด GC ที่นำไปวัดปริมาณไฮโดรเจน

2. การคำนวณปริมาณไฮโดรเจน สามารถหาได้จากสูตรด้านล่าง

พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างที่วัดได้จากเครื่อง$GC x$เปอร์เซ็นต์ของก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากเครื่องGC

พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐานจากเครื่องGC

2.ค่าที่ได้นำมาเทียบกับพื้นที่ว่างภายในขวดGC

3.แล้วนำค่าที่ได้มาเปลี่ยนหน่วยจาก มิลลิลิตร เป็นหน่วย mMol

4.แล้วนำค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วัดได้มาหารค่าในข้อ 3

ตารางที่ ข-1 แสดงข้อมูลการวัดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแปรผันอาหารสามชนิด (BG11, $BG11_0$ และ Allen-Arnon)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (μMol H_2/mg Chl. a/h)			
	1	2	3	เฉลี่ย
BG11	0.0000	0.0023	0.0055	0.0026
$BG11_0$	0.022	0.017	0.575	0.205
Allen - Arnon	0.0655	0.0895	0.05	0.06833

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2 ตารางแสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุตรึงเซลล์ที่แตกต่างกันที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร $BG11_0$

วัสดุที่ใช้ในการตรึง	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (μMol H_2/mg Chl. a/h)		
	1	2	เฉลี่ย
เซลล์อิสระ	3.0306	3.0217	2.0174
Alginate	4.8895	4.936	3.2752
Agar	3.7624	3.9431	2.5685

ตารางที่ ข-3 แสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับสารรีดักแทนท์

ชนิดของเซลล์		ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน(μMol H_2/mg Chl. a/h)		
		1	2	ค่าเฉลี่ย
$BG11_0$ (ไม่เติมสารรีดักแทนท์)	เซลล์อิสระ	3.9306	2.1271	2.0192
	อัลจิเนต	4.8895	4.936	3.2752
	วุ้น	3.7629	3.9341	2.5657
$BG11_0$ (เติมสารรีดักแทนท์)	เซลล์อิสระ	85.3167	85.0684	56.7950
	อัลจิเนต	43.3129	51.7117	31.6749
	วุ้น	64.1376	65.4647	43.2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-4 แสดงปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เซลล์ผลิตขึ้น ณ เวลา 1 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์

ชนิดของเซลล์	ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน(μMol H_2/mg Chl. a/h)		
		1	2	ค่าเฉลี่ย
เซลล์อิสระ	1	3.0306	3.0271	3.02885
	3	0.5809	0.5807	0.5808
Alginate	1	4.8895	4.936	4.91274
	3	0.4863	0.42725	0.4568
Agar	1	3.7629	3.9341	3.8485
	3	0.70455	0.77445	0.7395

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้