

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต
ไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

Application of Seawater as a Culture Medium for Growth and Hydrogen
Production of the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*

ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พุกษ์
นายสามารถ ต่ายขาว
ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์
ผศ.ดร.สุวรรณณี จรรยาพูน

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....143536
วัน,เดือน,ปี..... 17 ต.ค. 2559

b. 1279536X
i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต

ไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทานเค็ม *Aphanothece halophytica*

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 250,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2553 ถึง 30 กันยายน 2554

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัดและเลขหมาย โทรศัพท์

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์ และนายสามารถ ต่ายขาว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.

ศ.ดร.อรรณู อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.ดร.สุวรรณณี จรรยาพูน สาขาวิชาเคมีและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ สจล.

บทคัดย่อ

ไบโไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวชอบเค็ม *Aphanothece halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนด้วยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีข้อได้เปรียบในการเพาะเลี้ยงที่สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและนำมาผลิตไฮโดรเจนจากการทดลองพบว่าการเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นอย่างน้อย 1.76 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งไนโตรเจนในน้ำทะเลจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ โดยมีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution นอกจากนี้การเติมแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ความเข้มข้นของสารอาหารและแร่ธาตุที่เหมาะสมในการเติมลงไป ในน้ำทะเลเพื่อการผลิตไฮโดรเจน คือ โซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต 30 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 0.75 โมลาร์ เหล็กไอออน 4 ไมโครโมลาร์ และนิกเกิลไอออน 5 ไมโครโมลาร์ สุดท้ายศึกษาการผลิตไฮโดรเจนอย่างยั่งยืนของ *A. halophytica* โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์ ล้างเซลล์ 2 ครั้ง กระจายเซลล์และบ่มในน้ำทะเลที่ปราศจากไนเตรท พบว่า *A. halophytica* ผลิตไฮโดรเจนตั้งแต่วันที่ 1 ของการบ่ม และผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในวันที่ 2 และยังพบการผลิตไฮโดรเจน หลังการบ่มเป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของเจ้าของลิขสิทธิ์เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Application of Seawater as a Culture Medium for Growth and Hydrogen

Production of the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*

Researcher: Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch and Mr.Samart Taikhao (Department of Biology, Faculty of Science, KMITL) Prof.Dr.Aran Incharoensakdi (Department of Biochemistry, Faculty of Science, CU) Asst.Prof.Dr.Suwannee Junyapoon (Department of Chemistry, Faculty of Science, KMITL)

ABSTRACT

Biohydrogen is an environmental friendly alternative energy carrier which can be produced by a number of different microorganisms. The halophilic unicellular cyanobacterium *Aphanothece halophytica* is capable of producing hydrogen using reversible hydrogenase activity via the photobiological-H₂ production process. The advantage of cultivation this cyanobacterium is that it can grow under high NaCl concentration. Therefore this work aims to grow *A. halophytica* in the seawater supplemented with the essential nutrients and followed by producing hydrogen. It was found that the addition of at least 1.76 mM NaNO₃ as a nitrogen source in seawater was required for the cell growth. Its growth rate and chlorophyll content were similar to the cells cultivated in normal BG11 supplemented with Turk Island salt solution. Moreover, neither an addition of carbon sources nor types of carbon sources showed any significant effect on growth and hydrogen production by *A. halophytica*. From our results, the optimum nutrient and mineral concentrations added to seawater for high hydrogen production were 1.76 mM NaNO₃, 30 mM MgSO₄, 0.75 M NaCl, 4 μM Fe³⁺ and 5 μM Ni²⁺. Finally, the sustainable hydrogen production by *A. halophytica* was investigated. The cells were grown in seawater supplemented with 1.76 mM NaNO₃ for 7 days and subsequently harvested, washed twice, resuspended and incubated in seawater without NaNO₃. The result showed that hydrogen production by *A. halophytica* was found starting from the day 1st, was maximized at the day 2nd and it was still found after 10 days.

Keywords : Cyanobacteria, Hydrogen production, Seawater

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากทุนงบประมาณแผ่นดินของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณ นักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยทุกคนที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษ์
 นายสามารถ ต่ายขาว
 ศ.ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์
 ผศ.ดร. สุวรรณิ จรรยาพูน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน	5
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน	6
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	8
2.4 ไชยาโนแบคทีเรีย	12
2.5 น้ำทะเลและการใช้ประโยชน์จากน้ำทะเล	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	16
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	16
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	16
3.3 อุปกรณ์	16
3.4 วิธีการดำเนินการ	17
3.4.1 การเจริญและเพาะเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรีย	17
3.4.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไชยาโนแบคทีเรีย	17
3.4.3 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของไชยาโนแบคทีเรีย	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph	18
3.4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ชอบเค็ม <i>A. halophytica</i> เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ ในน้ำทะเล	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
4.1 ผลการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม <i>A. halophytica</i> เมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล	22
4.2 ผลของไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	24
4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	26
4.4 ผลของซัลเฟอไรต์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	28
4.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	30
4.6 ผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	30
4.7 ผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	33
4.8 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบขังยีนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage	33
บทที่ 5 วิจัยผลการทดลอง	36
5.1 การศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม <i>A. halophytica</i> เมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล	36
5.2 การศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน ของ <i>A. halophytica</i>	37
5.3 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจน ของ <i>A. halophytica</i>	38
5.4 การศึกษาผลของซัลเฟอไรต์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	38
5.5 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	39
5.6 การศึกษาผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรรมใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.7 การศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i>	41
5.8 การศึกษาผลการผลิตไฮโดรเจนแบบยั้งขึ้นภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage	42
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	49



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย	11
2.2	ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำทะเล	13
3.1	สถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้วงค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph Thermal conductivity Detector (GC-TCD)	18



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน	6
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	7
2.3 วิธีของการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายและ ไซยาโนแบคทีเรีย	9
2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ในไซยาโนแบคทีเรีย	10
4.1 การเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเล และในอาหารที่เสริมด้วย Turk Island salt solution	23
4.2 การเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์ และการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตต่างๆ	25
4.3 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริม ด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ	27
4.4 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริม ด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของ แมกนีเซียมซัลเฟต	29
4.5 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริม ด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของ โซเดียมคลอไรด์	31
4.6 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริม ด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของเหล็กไอออน	32
4.7 การเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริม ด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของนิกเกิลไอออน	34
4.8 การผลิตไฮโดรเจนของ <i>A. halophytica</i> ภายหลังจากเหนี่ยวนำเซลล์ในน้ำทะเลที่ ปราศจากโซเดียมไนเตรต เป็นเวลา 1, 2, 8 และ 10 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ เหนี่ยวนำในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีถึงวิกฤตการณ์น้ำมันที่มีราคาแพง สืบเนื่องมาจากการใช้น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้แล้ว ยังมีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงานอื่นๆ อาทิเช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ เป็นต้น ซึ่งพลังงานเหล่านี้ล้วนแต่เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัดและกำลังจะหมดไปในอนาคต หากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือยและไม่ผลิตพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทน นอกจากนี้ การใช้พลังงานเหล่านี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อันได้แก่ ปัญหามลพิษอากาศ ความร้อน ภาวะเรือนกระจก และฝนกรด ฯลฯ จากความเป็นมาดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีหน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกหันมาให้ความสนใจในการค้นคว้าวิจัย พัฒนา และผลิตพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในหลายประเทศมีการรณรงค์ให้ลดการใช้และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ สำหรับประเทศไทยได้มีการคิดค้นพลังงานทางเลือกใหม่ขึ้นมาใช้แทนน้ำมัน เช่น พลังงานโซลาร์เซลล์จากแสงอาทิตย์ ไบโอดีเซลหรือแอลกอฮอล์จากพืช เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานสำหรับลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาผลาญไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศจะเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ในปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรมในต่างประเทศ ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและขับเคลื่อนยานอวกาศ มีการประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจนในการขับเคลื่อนแต่ยังไม่มีการผลิตในเชิงการค้า ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการสร้างโรงงานผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งในการผลิตต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและเสียต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) โดยสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ได้แก่ แบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียว สำหรับการผลิต

ไฮโดรเจนจากแบคทีเรียนั้นมีข้อดีคือเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่จำเป็นต้องได้รับแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากอาหารที่เค็มลงไป สำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงนั้น มีข้อดีคือได้ผลผลิตสูง แต่จำเป็นต้องได้รับแหล่งคาร์บอนจากอาหารที่เค็มลงไปเช่นกันและการเพาะเลี้ยงทำได้ยากกว่า สำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย มีข้อดีคือสามารถใช้พลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศมาผลิตเป็นชีวมวล และได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการ นอกจากนี้ ยังลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอยู่ในบรรยากาศอีกด้วย โดยไซยาโนแบคทีเรียมียังมีข้อได้เปรียบกว่าสาหร่ายสีเขียว คือ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียมีความไวต่อออกซิเจนน้อยกว่าของสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ในการเร่งปฏิกิริยา โดยสามารถแบ่งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้เป็น 2 ชนิด ตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่ 1 คือ “unidirectional” หรือ “uptake” hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่ 2 คือ “bidirectional” หรือ “reversible” hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจน เอนไซม์ uptake hydrogenase สามารถพบได้เฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายตรงในโตรเจนหรือที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรงในโตรเจน *Anacystis nidulans* เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณเร่ง เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้มาจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ในโตรจีเนส ปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ uptake hydrogenase หน่วยย่อยใหญ่หรือ *hupL* และหน่วยย่อยเล็กหรือ *hupS* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 (www.kazusa.or.jp), *Nostoc* sp. PCC 73102 และ *Anabaena variabilis* เอนไซม์ชนิดที่ 2 reversible hydrogenase พบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป จัดเป็นชนิดที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบเช่นกัน แอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับสถานะในการเจริญเติบโต โดยสามารถวัดแอคติวิตีได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Aphanocapsa* sp., *Synechococcus* sp. และ *Synechocystis* sp. ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดเป็นเส้นสาย ได้แก่ *Spirulina* sp. และ *Oscillatoria* sp. และในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. ปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างเอนไซม์นี้ทั้งหน่วยย่อยใหญ่และหน่วยย่อยเล็ก (*hoxH* และ *hoxY*) ใน *Anabaena cylindrica*, *Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC7942, *Prochlorothrix hollandica* และ *Arthrospira* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aphanothece halophytica เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดียว มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเยื่อหุ้มเซลล์หนา ลักษณะที่สำคัญของ *A. halophytica* คือ เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ถึง 4.0 โมลาร์ จากการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลระหว่างความเข้มข้นของเกลือที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ซึ่งทำให้เซลล์เหี่ยวและทำให้ขบวนการเมแทบอลิซึมหยุดชะงัก ปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้ศึกษาทดลองและรายงานการผลิตไฮโดรเจนจาก *A. halophytica* เป็นครั้งแรก โดยพบว่าเซลล์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution โดยผลิตได้สูงกว่าไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ถึง 16 เท่า ในโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้มีความมุ่งหวังในการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากเดิมเป็นอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุและเกลือในปริมาณสูงมาเป็นน้ำทะเลที่มีแร่ธาตุและเกลือในปริมาณสูงเช่นกันมาใช้ทดแทน เนื่องจาก *A. halophytica* เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มและสามารถเจริญในอาหารที่มีความเค็มสูง อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้จำเป็นต้องมีการปรับสูตรอาหารน้ำทะเลเพื่อให้ *A. halophytica* เจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาสูตรอาหารน้ำทะเลที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* ในระดับเขย่า

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาสูตรอาหารน้ำทะเลที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* ในระดับเขย่า โดยนำน้ำทะเลมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน ในโตรเจน ความเค็ม และแร่ธาตุนิตต่างๆ เช่น เหล็ก นิกเกิล กำมะถัน ฯลฯ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเอาน้ำทะเลที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดในธรรมชาติมาใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* เพื่อผลิตไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

- 1). ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island salt solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์และล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้น นำเซลล์ที่ได้มากระจายในพลาสติกที่มีน้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 และนำพลาสติกไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที โดยให้แสงความเข้ม 30 ไมโครโมลไอน์สไต้น์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน
- 2). ศึกษาการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ในวันที่ 7 โดยบ่มเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 3). ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่แปรผันไนเตรท แมกนีเซียมซัลเฟต แหล่งคาร์บอน โซเดียมคลอไรด์ เหล็ก และนิกเกิล
- 4). ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* แบบยั่งยืนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage

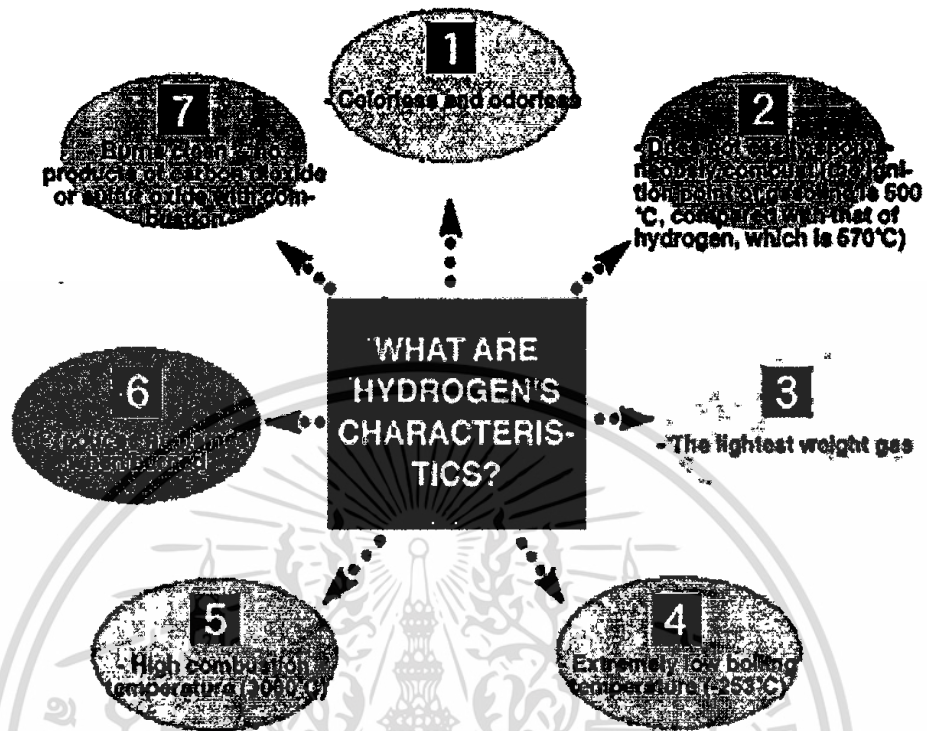
บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน

พลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก นอกจากจะใช้เพื่อให้เกิดความสะดวกสบายในชีวิตประจำวันแล้ว พลังงานส่วนใหญ่ยังถูกนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมและการผลิตกระแสไฟฟ้า ไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และคาดว่ากำลังจะหมดไปในไม่ช้า นอกจากนี้ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานเหล่านี้ยังก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจก ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เถ้าและฝุ่นละออง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีปริมาณพลังงานสำรองทรัพยากรเชื้อเพลิงภายในประเทศ โดยแบ่งเป็นปริมาณน้ำมัน 0.714 พันล้านบาร์เรลซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี ปริมาณก๊าซธรรมชาติ 33 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุตซึ่งสามารถใช้ได้อีกประมาณ 30 ปี และปริมาณถ่านหิน 0.984 พันล้านตันซึ่งใช้ได้ประมาณ 60 ปี ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการนำเข้าสินค้าทั้งหมด โดยพลังงานที่นำเข้าส่วนใหญ่คือน้ำมันเชื้อเพลิง ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เนื่องจากพลังงานที่มีอยู่กำลังจะหมดไปและจะต้องเป็นพลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย พลังงานทดแทนในปัจจุบัน ได้แก่ พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ น้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน (ชัยชาญ, 2547)

ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรส ให้พลังงาน 52,000 บีทียูต่อปอนด์ มีคุณสมบัติดังอธิบายในรูปที่ 2.1 เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาผลาญในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ และที่สำคัญที่สุด ไฮโดรเจนให้พลังงานต่อหน่วยสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน

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

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีได้หลายวิธี ทั้งการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ดังต่อไปนี้

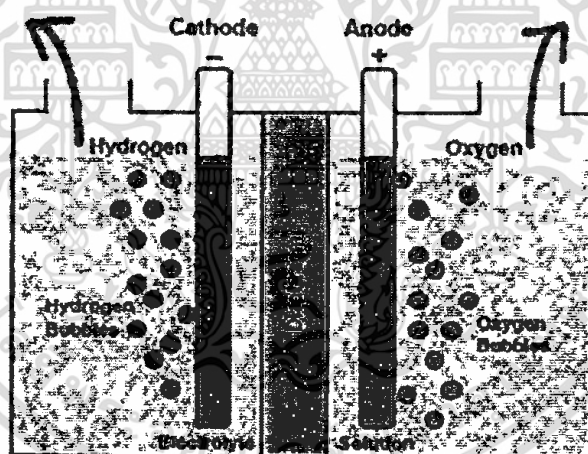
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

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



รูปที่ 2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

ที่มา : <http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php>

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี (thermochemistry)

การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีเทอร์โมเคมีสทรี เป็นกระบวนการที่พัฒนาการผลิตไฮโดรเจนโดยการใช้สารประกอบปรอทโบรไมด์และแคลเซียมในกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถนำความร้อนของกังปฏิกิริยานิวเคลียร์มาผลิตไฮโดรเจนได้ โดยพลังงานเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาติเห็นาเปไซประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมดจึงจะถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่ข้อเสีย คือ ปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนัก อัน ได้แก่ โปรท และ โบรไมด์

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen)

การผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงแบบที่เรียบบางชนิดผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก สาหร่ายสีเขียวใช้แสงและน้ำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดผลิตไฮโดรเจนได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Kosaric and Lyng, 1988)

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

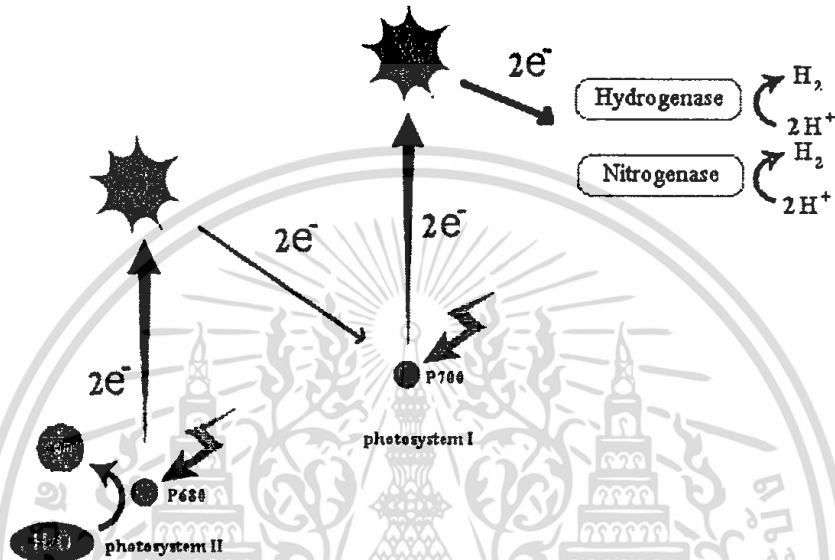
2.3.1 กลุ่มโฟโตโทรฟิเคยูคาริโอต (Phototrophic eukaryote)

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ สาหร่าย (Algae) สาหร่ายบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายเกิดขึ้นเมื่อมีการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งระยะเวลาในการปรับตัวนั้นจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 30 นาทีจนถึง 4 ชั่วโมง ในระหว่างกระบวนการปรับตัวนั้น เซลล์จะมีการกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) ให้ผลิตไฮโดรเจนจากอิเล็กตรอนที่ถูกส่งผ่านมาจากเฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) และโปรตอนจาก NADPH หรือ NADH

ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ เซลล์จะมีการกระตุ้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ทำให้ไม่เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจน สำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย อิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านระบบแสง (Photosystem) 2 ระบบ คือ ระบบแสงที่ 1 (Photosystem I : PS I) ที่ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (P700) และระบบแสงที่ 2 (Photosystem II : PSII) ที่ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (P680) ไปยังตัวพา

อิเล็กตรอน (Electron carrier) ารใช้ ตัวพาอิเล็กตรอนจะถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับเฟอร์รีดอกซิน แม้ว่ากรรมวิธีทั้งสี่นี้ อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

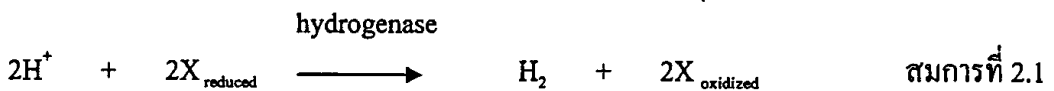
จากนั้นจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเตส (ferredoxin oxidoreductase) (รูปที่ 2.3) อิเล็กตรอนที่ถูกใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นได้มาจากกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำในระบบแสงที่ 2 และการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์โดยอิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงที่ 1 (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย (ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส)

ที่มา : <http://www.mmi.org/sitepages/pid557.php>

จากรายงานของ Gaffron และ Rubin (1942) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ไม่เพียงแต่สามารถผลิตโมเลกุลของไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีแสงเท่านั้น แต่ยังสามารถผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจนด้วย เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนของสาหร่ายคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนดังแสดงในสมการที่ 2.1



ตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่เพียงได้มาจากอิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำเท่านั้น แต่ยังสามารถได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่สะสมในเซลล์ เช่น แป้งที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

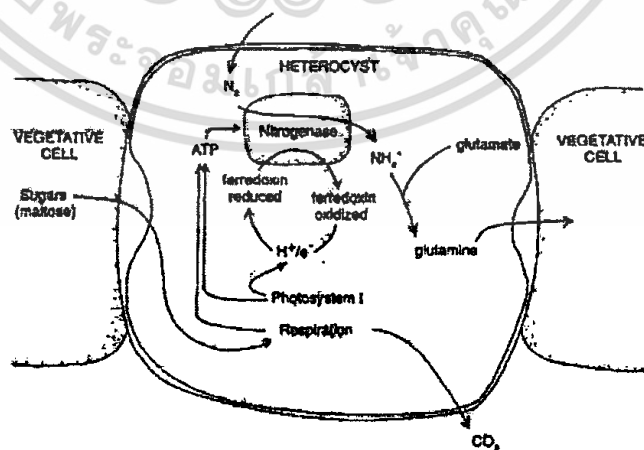
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 กลุ่มโฟโตโทรฟิคโพรคาริโอต (phototrophic prokaryote)

2.3.2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบมีออกซิเจน

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไชยาโนแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green bacteria) ไชยาโนแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต สามารถสังเคราะห์แสงและได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) ระบบการสังเคราะห์แสงประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบและมีชนิดของคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายสีเขียวและพืช

ไชยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไชยาโนแบคทีเรียคล้ายกับในสาหร่าย แต่ไชยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านทางกระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen fixation) ไชยาโนแบคทีเรียชนิดที่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst cell) นั้น ไม่มีระบบแสงสองและสามารถตรึงไนโตรเจนผ่านทางเอนไซม์ไนโตรจิเนสและผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะมีการตรึงโมเลกุลไนโตรเจนพร้อมกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการผลิตกลูตามีน โดยกลูตามีนที่ผลิตได้จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเซลล์ปกติ (Vegetative cells) (รูปที่ 2.4) เนื่องจากเฮเทอโรซิสต์นั้นไม่มีระบบแสงสอง จึงไม่มีกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำ ดังนั้น จึงไม่มีการสร้างก๊าซออกซิเจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจิเนส เซลล์เฮเทอโรซิสต์จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์อะพแทคไฮโดรจิเนสหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Membrane-Bound hydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสซึมเมมเบรน (Cytoplasmic membrane) หรือไทลาคอยด์เมมเบรน (Thylakoid membrane) ของเฮเทอโรซิสต์ซึ่งจะช่วยรีดิวซ์โมเลกุลของไฮโดรเจนที่มากเกินไปให้เป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน



รูปที่ 2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในไชยาโนแบคทีเรีย

เอกสารที่มา : <http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%20hydrogenproduction> ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง โดยภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการผลิตก๊าซออกซิเจนและมีการสะสมพอลิแซคคาไรด์ แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีก๊าซออกซิเจน เอนไซม์ในโตรจินเนสจะถูกสร้างขึ้นและกระตุ้นให้ทำงาน และมีการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย

สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้
Heterocystous nitrogen fixing	
<i>Nostoc linkia</i>	22 ml / mg dry weight / h
<i>Anabaena cylindrica</i>	1.91 ml / mg dry weight / h
Non-heterocystous nitrogen fixing	
<i>Oscillatoria</i> sp.	260 μ mol / mg dry weight / h
<i>Oscillatoria</i> sp.	5-6 μ mol / mg dry weight / h
Non-nitrogen fixing	
<i>Synechococcus</i> sp.	0.05-1.38 μ mol / mg dry weight / h
<i>Microcystis</i> sp.	11.3 nmol μ mol / mg dry weight / h
<i>Gloeobacter</i> sp.	1.38 μ mol / mg dry weight / h
<i>Synechocystis</i> sp.	0.07 μ mol / mg dry weight / h
<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.40 μ mol / mg dry weight / h

ที่มา : Fernando *et. al.* (2002)

2.3.2.2 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

1) Non-sulfur purple bacteria ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. 2) Sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. และ 3) Green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเหล่านี้มี

รงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชสีเขียว คือมีรงควัตถุเป็นแบคทีเรียโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟิลล์ (Bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ใช้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้น้ำกำมะถัน (Sulfide) ซัลเฟอร์ (Sulfur) ไทโอซัลเฟต (Thiosulfate) สารประกอบอินทรีย์ (Organic compound) หรือโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเล็กตรอนได้

2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา, 2542)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโพรคาริโอต (Prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญของไซยาโนแบคทีเรียคือ มีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป

ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ 5 ประการ คือ

1. มีสารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic pigment) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน
2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram negative) ที่เรียกว่ามิวโคเปปไทด์ (Mucopolysaccharide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่าชีท (Sheath) หุ้มอยู่ ซึ่งชีทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีหรือไม่มีหรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ
3. ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา ไซยาโนแบคทีเรียทั่วไปมีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (Gliding movement)
4. ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารประเภทแป้งชนิดหนึ่งคือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (Cyanophycan starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปเรียกว่าไซยาโนไฟซิน แกรนูล (Cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน
5. จัดเป็นโพรคาริโอต ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต คือสารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติคแต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

2.5 น้ำทะเลและการใช้ประโยชน์จากน้ำทะเล

โดยทั่วไปแล้ว น้ำทะเลในมหาสมุทรมีค่าความเค็ม (Salinity) ประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉลี่ยแล้ว ทุกๆ 1 กิโลกรัมจะมีเกลือละลายอยู่ประมาณ 35 กิโลกรัม (โดยส่วนมากเป็นไอออนของโซเดียมคลอไรด์ : Na^+ , Cl^-) นอกจากนี้ ยังพบว่าค่าความถ่วงจำเพาะของน้ำทะเลที่บริเวณผิวน้ำมหาสมุทรมีค่าเท่ากับ 1.025 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้ำทะเลมีค่าความถ่วงจำเพาะสูงกว่าน้ำจืด (น้ำจืดมีค่า

ต่ำกว่าน้ำจืดทุกสิ่ง อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.00 กรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เนื่องจากมีมวลของเกลือผสมอยู่และยังพบว่าจุดเยือกแข็งของน้ำทะเลจะลดลงเมื่อมีค่าความเค็มสูงขึ้น โดยมี

ค่าประมาณ -2 องศาเซลเซียส (28.4 ฟาเรนไฮต์) ที่ 35 กรัมต่อลิตร (U.S Office of Naval Research)

น้ำทะเลมีไอออนที่ละลายอยู่มากซึ่งไม่เหมือนกับน้ำจืด (Thomson, 2006) แต่อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนของสารละลายก็ยังคงมีความแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น น้ำทะเลมีค่าของไบคาร์บอเนตมากกว่าน้ำจืดถึง 2.8 เท่าในหน่วยความของเข้มข้นที่เป็นโมลาริตี แต่เปอร์เซ็นต์ของไบคาร์บอเนตในน้ำทะเลต่อไอออนที่ละลายอยู่ทั้งหมดจะมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับในน้ำจืด ซึ่งพบว่าไอออนของไบคาร์บอเนตมี 48 เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลายในน้ำจืด แต่ในน้ำทะเลมีเพียง 0.41 เปอร์เซ็นต์ของไอออนทั้งหมดในน้ำทะเล (Pinet, 1996; Thomson, 2006) องค์ประกอบของทางเคมีของน้ำทะเลแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำทะเล

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (โมลต่อกิโลกรัม)
H ₂ O	53.6
Cl ⁻	0.546
Na ⁺	0.469
Mg ²⁺	0.0528
SO ₄ ²⁻	0.0282
Ca ²⁺	0.0103
K ⁺	0.0102
Cr ⁻	0.0206
Br ⁻	0.000844
B _T	0.000416
Sr ²⁺	0.000091
F ⁻	0.000068

ที่มา: DOE, 1994

ในปี ค.ศ. 1910 Allen และ Nelson ได้คิดค้นสูตรอาหารที่ใช้ น้ำทะเลและเติมสารประกอบต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของแร่ธาตุที่พืชต้องใช้เป็นอาหารลงในน้ำทะเลเพื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย และในปี ค.ศ. 1914 Allen ได้ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอม *Thalassiosira gravida* เป็นผลสำเร็จ โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ artificial seawater และต่อมาในปี ค.ศ. 1949 Ketchum และ Redfield ได้ปรับปรุงส่วนผสมอีก โดยเพิ่มแมกนีเซียมซัลเฟตเข้าไปในส่วนผสมของ Allen และ Nelson ซึ่งก็ได้ผลดีเช่นเดียวกัน ต่อมาในปีเดียวกัน ได้มีการศึกษาการเติมสารคีเลเตอร์ลงในน้ำทะเลธรรมชาติเพื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลโดย Mary Parke ในอาหาร Erdschreiber พบว่าการเติมน้ำสกัดจากดินในน้ำทะเลทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตดีขึ้น แต่มีข้อเสีย คือ น้ำที่เตรียมได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอเนื่องจากน้ำทะเลและดินที่ใช้มีส่วนประกอบไม่เหมือนกันทุกครั้ง ต่อมาในปี ค.ศ. 1954 Sweeney ได้เพิ่มสารคีเลเตอร์อีดีทีเอ (EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) และใช้วิตามินบี 12 แทนสารสกัดจากดิน หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1961 Iwasaki ได้ใช้สูตรอาหาร SWII ซึ่งคล้ายกับสูตร Sweeney แต่ใช้ฟอสฟอรัสและคาร์บอนในรูปของกลีเซอโรฟอสเฟต ซึ่งมีข้อดีคือทำให้สารละลายที่เตรียมได้ไม่มีตะกอน จากการค้นคว้าและพัฒนาส่วนผสมที่เติมลงในน้ำทะเลพบว่า มีสารหรือแร่ธาตุบางอย่างที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่าย และการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย สารที่เติมลงไป ได้แก่ สารประกอบของธาตุ Mn, Cu, Zn, Co และ Mo สูตรที่นิยมใช้ได้แก่สูตรของ Ryther และ Kramer (1961)

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1979 Faucher และคณะได้ทำการศึกษาการใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina maxima* โดยพบว่าน้ำทะเลประกอบไปด้วยยูเรียจำนวนมาก และในการทดลองต้องมีการใช้ NaHCO_3 หรือ Na_2CO_3 ในการตกตะกอน Ca^+ และ Mg^{2+} ออกจากน้ำทะเลก่อนที่จะใช้เพาะเลี้ยง *Spirulina maxima* โดยพบว่าน้ำทะเลดังกล่าวสามารถเพาะเลี้ยง *Spirulina maxima* ได้ดีเท่ากับอาหารสังเคราะห์ที่ได้มีในรายงาน

จากการทดลองที่ผ่านมามองเห็นได้ว่าการนำน้ำทะเลมาใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายได้จริง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำสิ่งมีชีวิตดังกล่าวมาปรับประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต เช่น นำสาหร่ายมาผลิตเป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ โดยได้มีรายงานการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายทะเลสีเขียวโดย Guan และคณะในปี 2004 ในสาหร่ายทะเลสีเขียว *Platymonas subcordiformis* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลธรรมชาติที่เสริมด้วยด้วยธาตุอาหารต่างๆ เช่น FeCl_3 , MnCl_2 , H_3BO_3 , EDTA, NaH_2PO_4 , NaNO_3 , ZnCl_2 , CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, CuSO_4 , VitB12 และ VitB1 เปรียบเทียบกับน้ำทะเลที่ปราศจากซัลเฟอร์พบว่า การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *Platymonas subcordiformis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เป็นน้ำทะเลที่ปราศจากซัลเฟอร์จะให้ค่าการผลิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เป็นน้ำทะเลเติมซัลเฟอร์ถึง 13 เท่า

นอกจากสาหร่ายสีเขียวจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้แล้ว ไซยาโนแบคทีเรียก็สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงเช่นกัน ข้อได้เปรียบของไซยาโนแบคทีเรียคือไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตเช่นเดียวกับแบคทีเรีย ดังนั้นการคัดแปลงตัดแต่งพันธุกรรมก็ทำได้ง่ายกว่า โอกาสในการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปใช้งานจึงเปิดกว้างกว่า และในปัจจุบันนี้การศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลมีอยู่ปริมาณน้อย เพราะฉะนั้นการศึกษาถึงการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียโดยเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากในน้ำทะเลมีแร่ธาตุที่สำคัญที่ไซยาโนแบคทีเรียทะเลหรือไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มและ/หรือไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็มสามารถนำแร่ธาตุดังกล่าวไปใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนต่อไปได้ ซึ่งถือว่าเป็นการนำทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปในอนาคตได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

ไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อรุณ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.2 อาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution (ภาคผนวก ข)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV- 50, Japan)

3.3.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)

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

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

3.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory 1375FX, Thailand)

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

3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion Sartorius BP2215, Thailand)

3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.3.9 เครื่องผสมสาร (vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.10 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.11 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)

3.3.12 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.3.13 แท่งแม่เหล็กคนสาร (magnetic bar)

3.3.14 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA) ระบุชื่อสินค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย มุกดาหาร
ไม่ว่ากรรมใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.15 เข็มฉีดยา (Scientific Glass Engineering, Australia)

3.3.16 เครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu) (GC-15A, Japan)

3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1 การเจริญและการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 (Rippka *et. al.*, 1979) ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution (Garlick *et. al.*, 1977) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเล โดยนำน้ำทะเลมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้น นำไปปรับ pH ให้ได้ 7.6 ด้วย HCl และนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution และน้ำทะเล โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที โดยให้ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน

3.4.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

วัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียโดยนำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเติมเมทานอลปริมาตร 900 มิลลิลิตร vortex เป็นเวลา 45 วินาที ห่อฟอยล์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คัดสารละลายใส่หลอดใหม่แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการที่ 3.1 ตามวิธีของ MacKinney (1941)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ = $12.7 \times$ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร $\times 10$ สมการที่ 3.1 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph

นำไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร มาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ซึ่งสารละลาย จากนั้น กระจายเซลล์ในอาหารใหม่ 10 มิลลิลิตร แล้วบีบเปิดใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด ห่อฟอยล์ แล้วใช้เข็มฉีดยาเข็มที่ 1 ฉีดทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซ ฟันก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นคว่ำขวด นำก๊าซในขวดไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph โดยฉีดก๊าซปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่เวลา 2 ชั่วโมงของการบ่ม สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph–Thermal conductivity Detector (GC-TCD)

พารามิเตอร์	สถานะในการเดินระบบ
Gas Chromatograph	
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Column	Pack column 2 m.; Molecular sieve 5A mesh 60/80 (Varian, USA)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Oven temperature : 50 °C (initial temperature), holding at 50 °C for 5 min, to 100 °C at 4 °C/min, holding at 100 °C for 2 min Detector temperature : 100 °C
Ar Carrier gas	Flow rate 20 ml/min (99.999 % purity) (Praxair, Korea, Co., Ltd.)

3.4.5 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม

A. *halophytica* เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ ในน้ำทะเล

3.4.5.1 การศึกษาผลของไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเล 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้

เอกลำไปกระจายในน้ำทะเลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของไนเตรต ดังนี้ 0, 0.176, 1.76, 17.6 ร้อยละ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 176 มิลลิโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ

A. halophytica

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (C-deprivation เป็น control, Na_2CO_3 , glucose, fructose, sucrose, maltose และ lactose) โดยมีจำนวนโมลของคาร์บอนเท่ากันคือ 0.189 ไมโครคาร์บอนต่อลิตร ซึ่งตรงกับจำนวนโมลคาร์บอนใน อาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution สูตรปกติ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.3 การศึกษาผลของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0, 1.5, 15, 30 และ 150 มิลลิโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.4 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A.*

halophytica

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และเติมโซเดียมคลอไรด์จากความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (เป็นความเข้มข้นโดยประมาณของน้ำทะเล) จนได้ความเข้มข้น 0.75, 1, 2 และ 3 โมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.5 การศึกษาผลของหลักต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีเหล็กไอออนความเข้มข้น 0, 0.4, 4, 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.6 การศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีนิกเกิลไอออนความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 5, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ วัดการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และนำเซลล์ที่เลี้ยง 7 วันไปวัดการผลิตไฮโดรเจน

3.4.5.7 การผลิตไฮโดรเจนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage

การเพาะเลี้ยงแบบ two-stage เป็นการเพาะเลี้ยงที่มี 2 ชั้น ชั้นแรกเป็นการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต โดยเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ ชั้นที่ 1 เป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจน ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้ นำไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution เป็นเวลา 7 วันมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียม

ในเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมในเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 7 วัน หลังจากนั้น นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากในเตรท 2 ครั้ง และกระจายเซลล์ในน้ำทะเลที่ปราศจากในเตรท จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 1, 2, 4, 8 และ 10 วัน และนำเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ ไปวัดการผลิตไฮโดรเจน



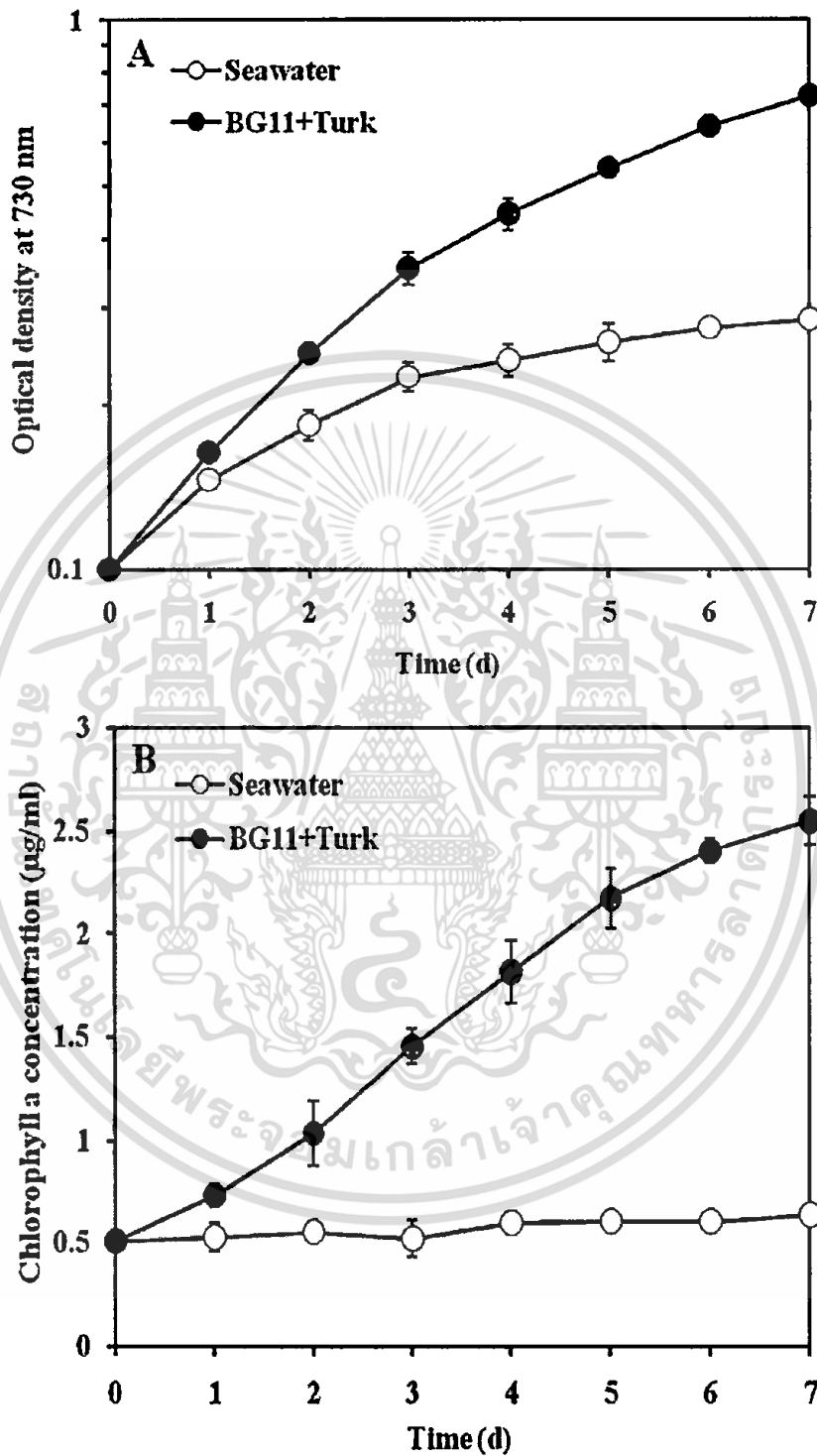
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* เมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution และในน้ำทะเล ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที โดยให้ความเข้มข้นแสง 30 ไมโครโมลไอน์สไคน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน วัดการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรและวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.1A) ซึ่งการเจริญของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution มากกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลประมาณ 2.5 เท่า ณ วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ จากการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของเซลล์ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูงขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น (รูปที่ 4.1B) ซึ่งรูปแบบของการเพิ่มขึ้นจะสอดคล้องกับรูปแบบของค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 4.1A) ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลจะมีสีเหลืองและไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์ (รูปที่ 4.1B) แสดงให้เห็นว่า *A. halophytica* ไม่สามารถเจริญในน้ำทะเลได้ จำเป็นต้องทำการเติมธาตุอาหารที่ทำให้ *A. halophytica* เจริญเติบโตได้ดี การทดลองถัดไป จึงทำการแปรผันปริมาณโซเดียมในเตรซิ่งจัดเป็นธาตุอาหารหลักที่สหายและพืชต้องการในการเจริญเติบโต

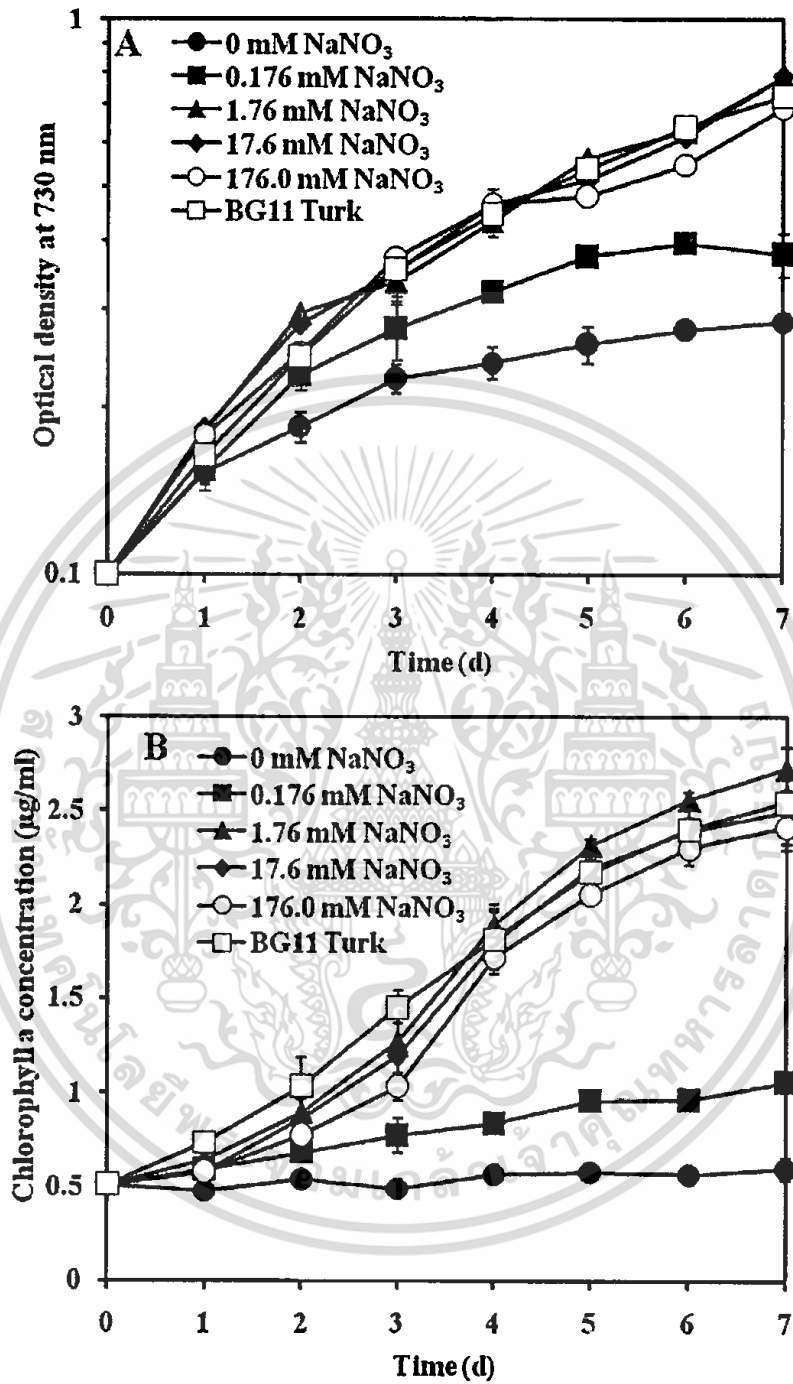


รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโต (A) และปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลและในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

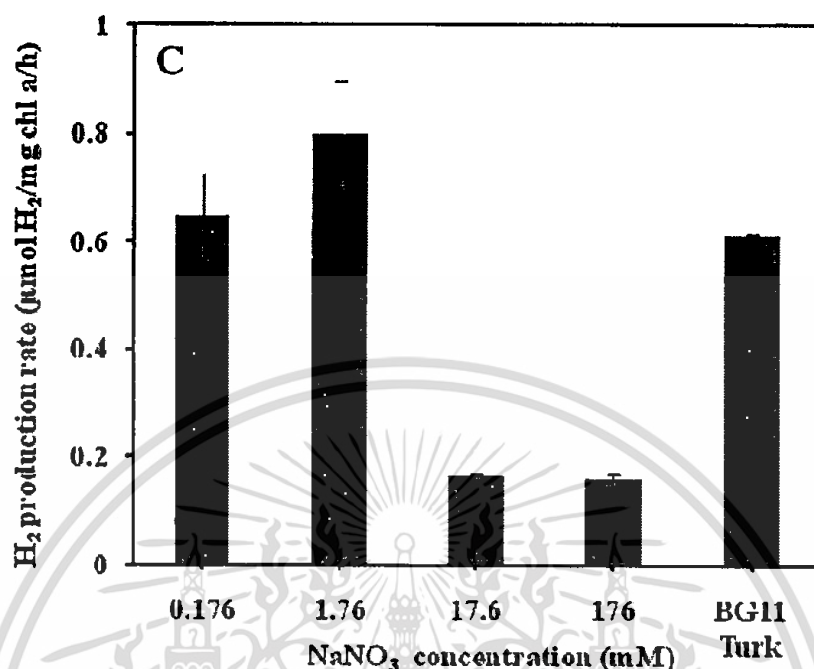
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตของ 0, 0.176, 1.76, 17.6 และ 176 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วันและนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในวันที่ 7 ไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตตั้งแต่ 1.76 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป (รูปที่ 4.2A,B) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์กับที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution พบว่ามีการเจริญเติบโตและปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.2A,B) และยังพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรต 1.76 มิลลิโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.80 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.6C) โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรต 17.6 และ 176 มิลลิโมลาร์และในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island salt solution ถึง 4.7, 5 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนจะลดลงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรตเพิ่มมากขึ้น ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรต 0.176 มิลลิโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำกว่าในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรต 1.76 มิลลิโมลาร์เพียงเล็กน้อยซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่การเจริญเติบโตต่ำกว่าประมาณ 2 เท่า ดังนั้น ในการทดลองขั้นถัดไปจึงเลือกเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมไนเตรต 1.76 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดและแปรผันสภาวะอื่นๆ ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

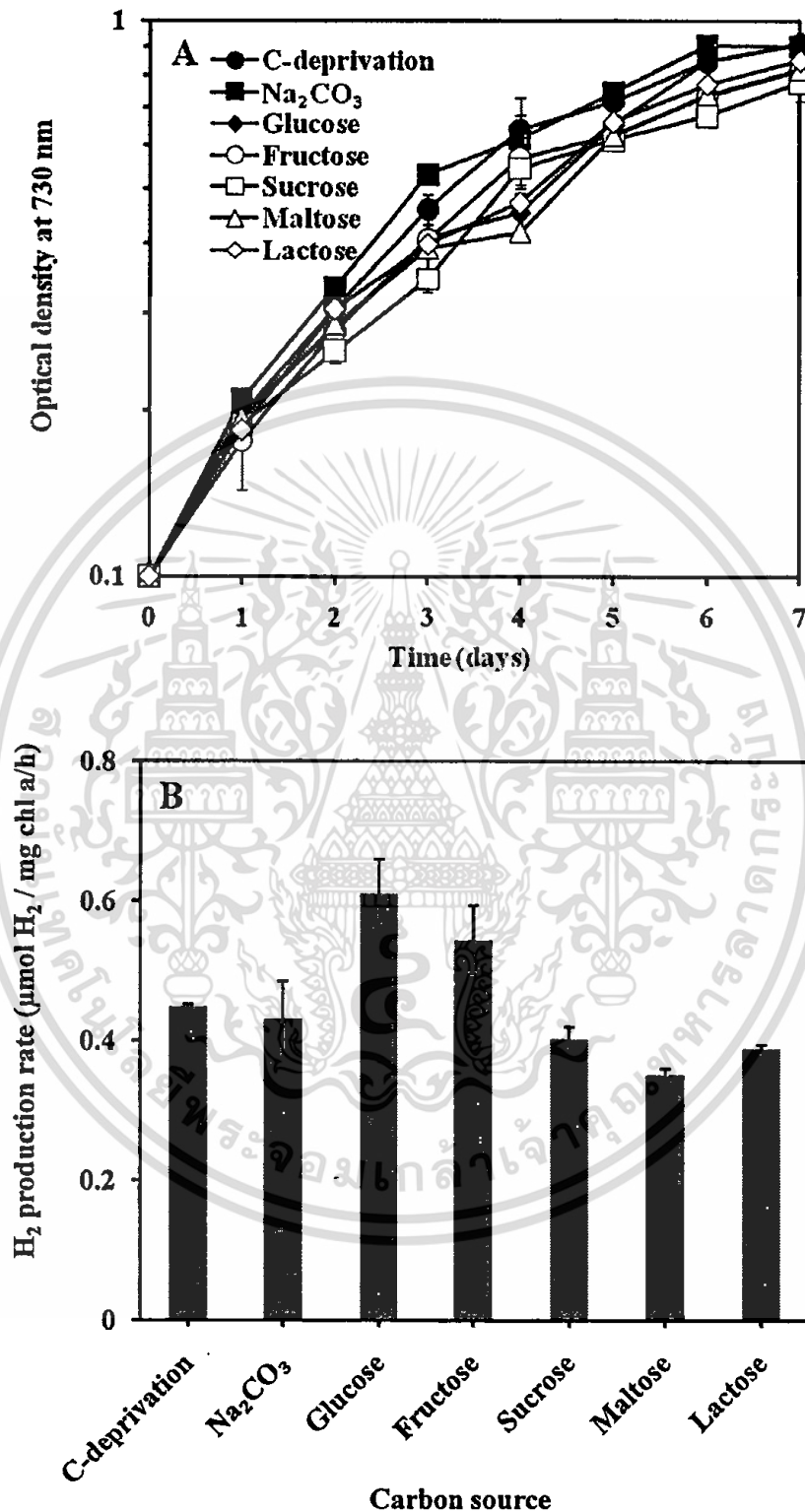


รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโต (A) ปริมาณคลอโรฟิลล์ (B) และการผลิตไฮโดรเจน (C) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0, 0.176, 1.76, 17.6 และ 176 มิลลิโมลาร์เปรียบเทียบกับในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ Na₂CO₃, Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose และ Lactose โดยมีน้ำทะเลที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน (C-deprivation) เป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยแหล่งคาร์บอนดังกล่าวมีจำนวนโมลคาร์บอนเท่ากับ Na₂CO₃ ที่มีในอาหาร BG11 สูตรปกติ คือ 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วันและนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในวันที่ 7 ไปวัดปริมาณไฮโดรเจน พบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.61 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.3B) และสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนประมาณ 1.4 เท่า ซึ่งค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 95 นอกจากนี้ ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่แปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ (รูปที่ 4.3A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



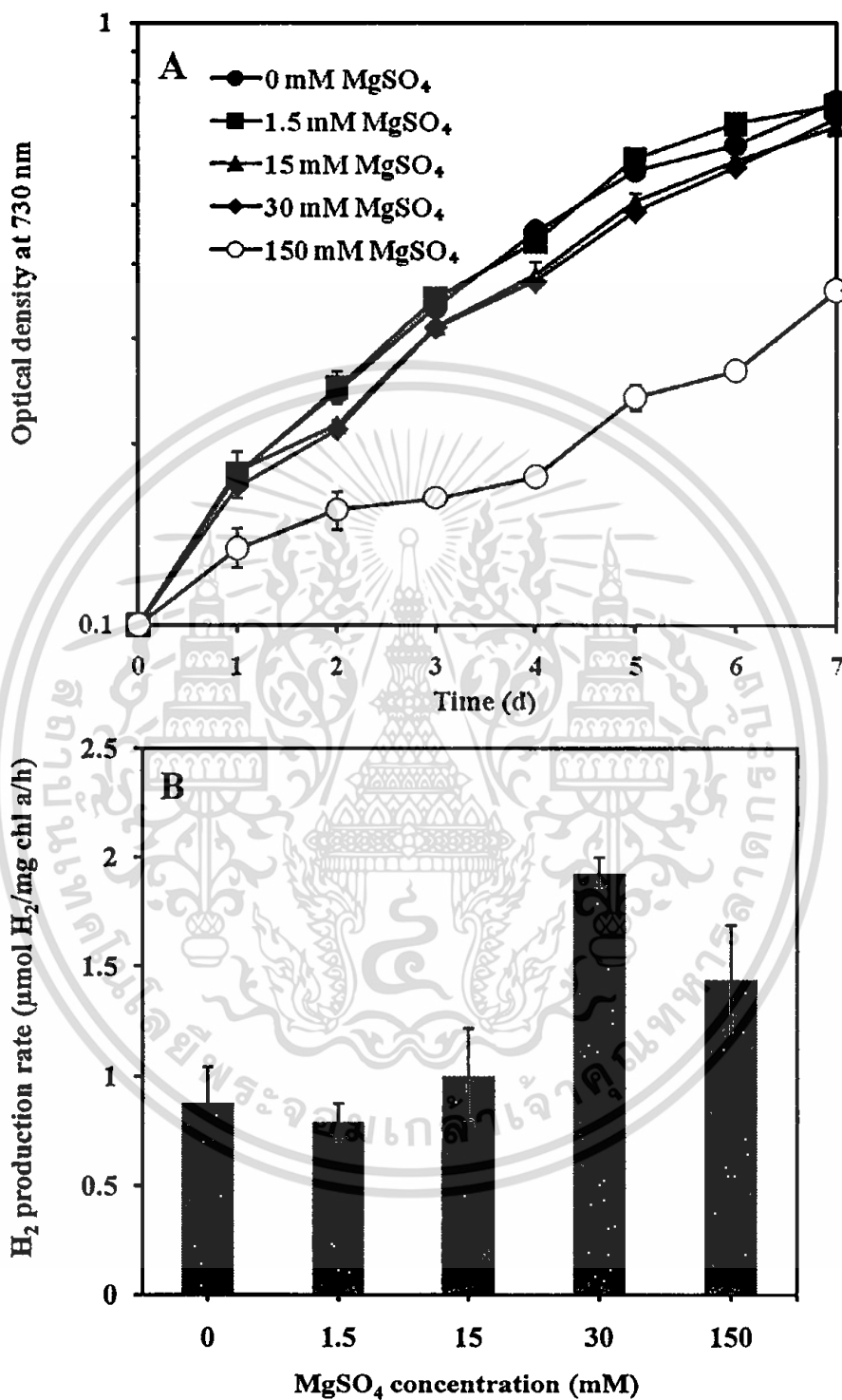
รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันแหล่งคาร์บอนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น จึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ ในน้ำทะเล เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนให้ค่าไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ เซลล์ของ *A. halophytica* ยังสามารถเจริญได้ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนอีกด้วย (รูปที่ 4.3A) ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไป จึงไม่ต้องเติมแหล่งคาร์บอนในน้ำทะเล เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตไฮโดรเจนในระดับขยายขนาดการผลิตต่อไป

4.4 ผลของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0, 1.5, 15, 30 และ 150 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.92 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูป 4.4B) และมีค่าสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตประมาณ 2.2 เท่า นอกจากนี้ ยังพบว่า *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟต และมีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.5, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์มีการเจริญเติบโตสูงและให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.4A) แต่เซลล์จะมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.4A) โดยเซลล์จะอยู่ในระยะ lag ที่ยาวนานประมาณ 4 วัน ก่อนเข้าสู่ระยะ log



รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต

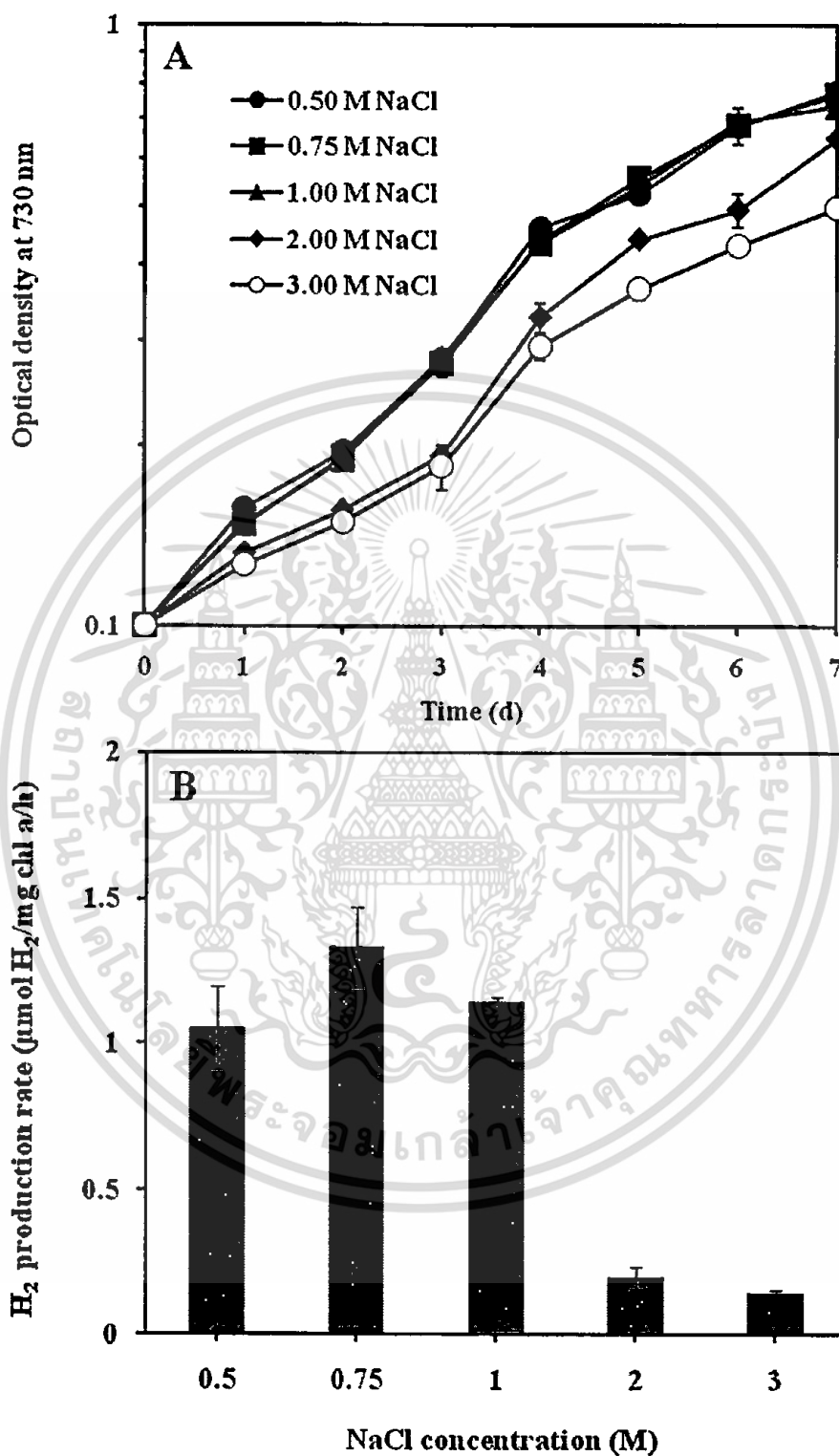
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

โดยปกติ น้ำทะเลมีโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือประมาณ 0.5 โมลาร์ ในการทดลองนี้ ได้ทำการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 และ 3.0 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* มีการเจริญเติบโตดีเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.5-1.0 โมลาร์ (รูปที่ 4.5A) ในขณะที่ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2-3 โมลาร์ เซลล์จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่า โดยมีช่วงระยะ lag ประมาณ 3 วัน ก่อนจะสู่ระยะ log นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.33 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.5B) ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลปกติ (มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์) และน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 โมลาร์ประมาณ 1.3 และ 9.5 เท่า ตามลำดับ

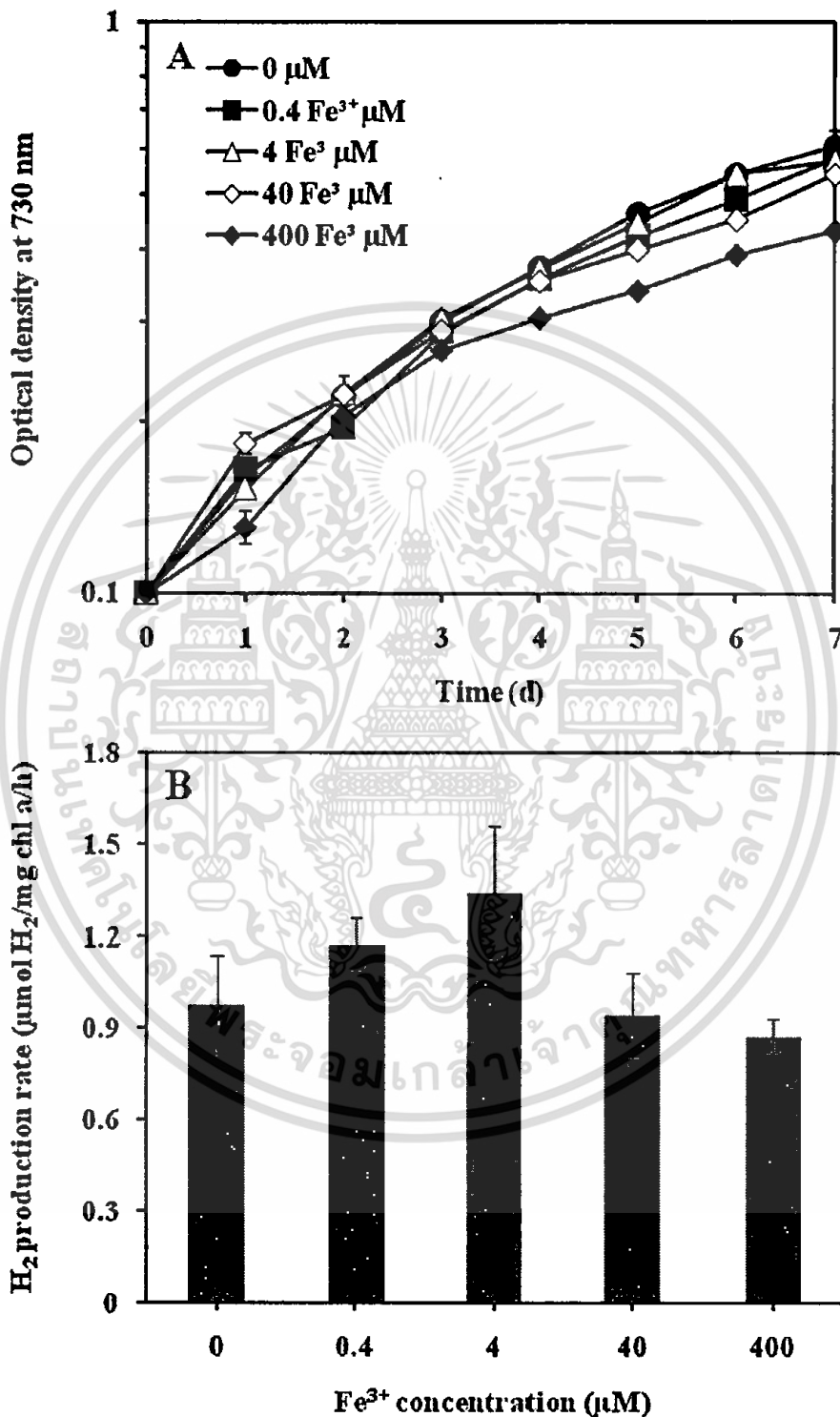
4.6 ผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของเหล็กไอออน 0, 0.4, 4, 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของเหล็ก 0-40 ไมโครโมลาร์ แต่มีการเจริญเติบโตลดลงเล็กน้อยในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของเหล็ก 400 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.6A) และยังพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของเหล็ก 4 ไมโครโมลาร์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.34 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.6B) ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากเหล็กไอออนประมาณ 1.7 เท่า



รูปที่ 4.5 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของโซเดียม

คลอไรด์ เอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



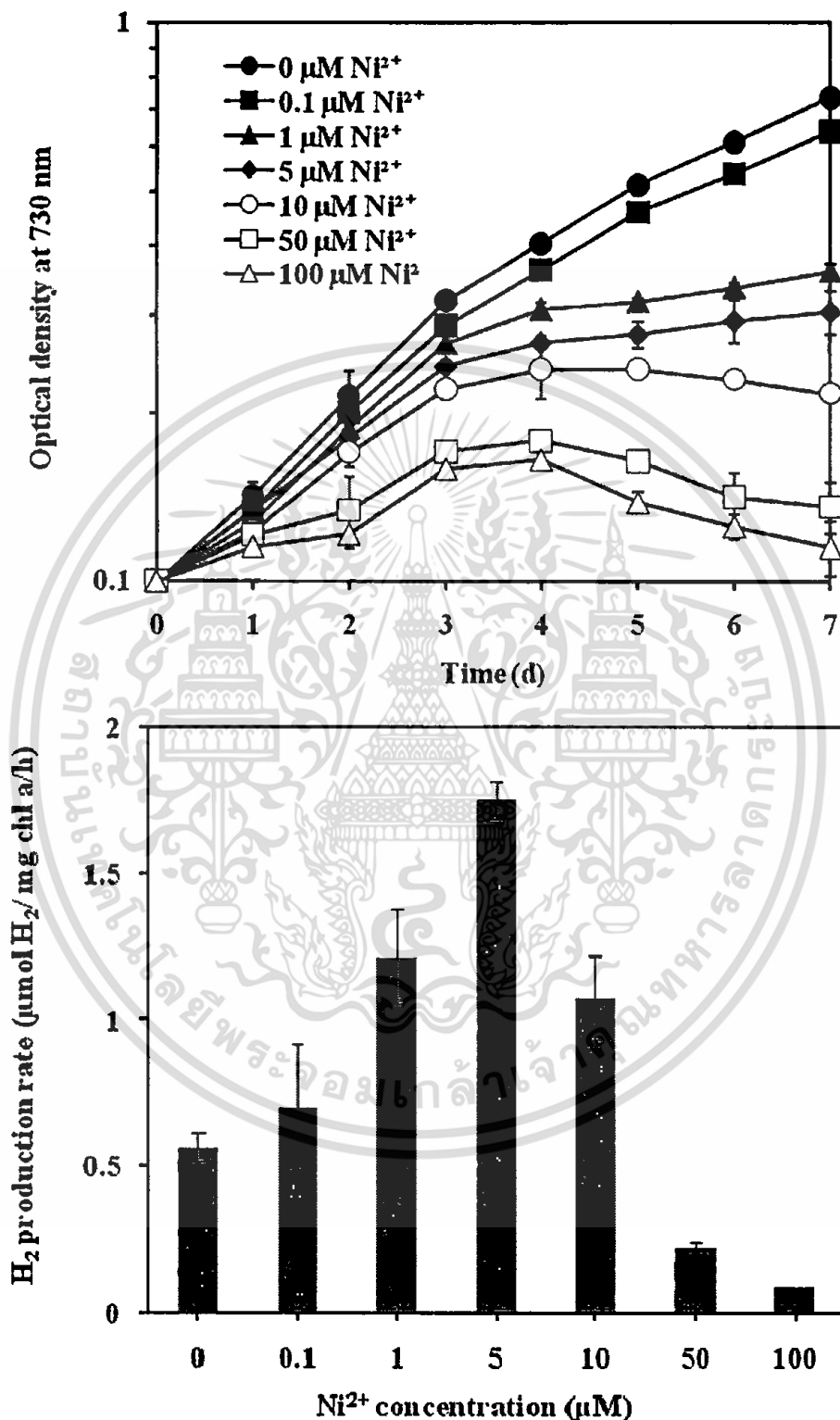
รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของเหล็กออกไซด์ออกไซด์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นของนิกเกิลไอออน 0, 0.1, 1, 5, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำเซลล์ไปวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า เมื่อความเข้มข้นของนิกเกิลในน้ำทะเลสูงขึ้น การเจริญเติบโตของ *A. halophytica* จะลดลง โดยเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยมากอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของนิกเกิลไอออนสูงคือ 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ส่วนใหญ่จะตายภายหลัง 7 วันของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7A) ซึ่งเป็นผลมาจากความเป็นพิษของนิกเกิลต่อเซลล์ ในการวัดการผลิตไฮโดรเจนพบว่า *A. halophytica* ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.75 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีนิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.7B) และมีค่ามากกว่าการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากนิกเกิลถึง 3.1 เท่า

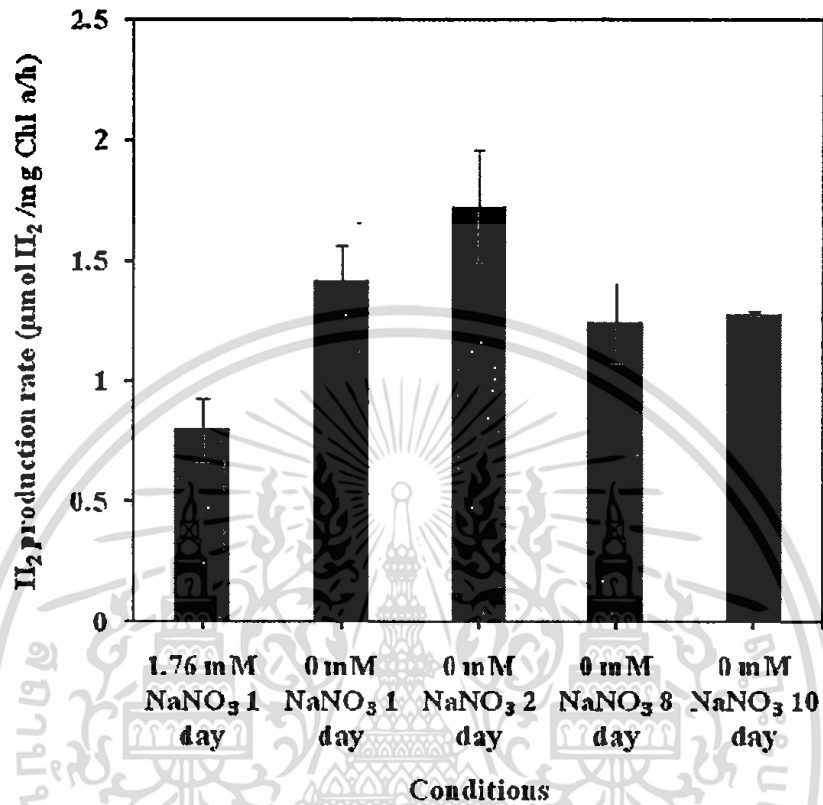
4.8 ผลการผลิตไฮโดรเจนแบบยั่งยืนภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage

การเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในระบบ two-stage กระทำโดย ขั้นแรกทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นั่นคือ เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น ขั้นที่สอง นำสารละลายเซลล์มาเหนี่ยวนำให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยนำเซลล์มาเก็บเกี่ยวโดยการปั่นเหวี่ยง และล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทจำนวน 2 ครั้ง และนำเซลล์ที่ได้มากระจายในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทและบ่มต่อเป็นระยะเวลา 1, 2, 8 และ 10 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน จากการทดลองพบว่า การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* เพิ่มสูงขึ้น เมื่อบ่มในสภาวะที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทและมีค่าการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 1.72 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในน้ำทะเลปราศจากโซเดียมไนเตรท เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้น อัตราการผลิตจะลดลงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน โดยผลิตได้เป็นเวลาถึง 10 วัน (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโต (A) และการผลิตไฮโดรเจน (B) ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และแปรผันปริมาณของนิกเกิลไอออน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ภายหลังจากเหนี่ยวนำเซลล์ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรท เป็นเวลา 1, 2, 8 และ 10 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เหนี่ยวนำในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เปรียบเทียบกับน้ำทะเล

โดยทั่วไปแล้ว น้ำทะเลในธรรมชาติประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ ประมาณ 50 ชนิด และมีส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์อีกมากมาย อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในน้ำทะเลโดยตรงนั้นส่วนใหญ่ไม่ค่อยได้รับความนิยมมากนัก เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตช้า ได้มวลชีวภาพน้อย อย่างไรก็ตาม หากมีการเติมสารอาหารและธาตุอาหารต่างๆ ที่ไซยาโนแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโตลงในน้ำทะเล จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่คึกคักขึ้น (Harrison, 2004) ในการทดลองนี้ ได้ทำการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลธรรมชาติเทียบกับในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution ที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม และศึกษาการเจริญของเซลล์จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลมีการเจริญเติบโตและมีปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ (รูปที่ 4.1A,B) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ของ *A. halophytica* ต้องการสารอาหารบางอย่างเพิ่มเติมเพื่อให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและต่อเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ จากรายงานการเพาะเลี้ยงและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทะเลสีเขียว *Platymonas subcordiformis* (Guan et al., 2004) พบว่าเซลล์สาหร่ายทะเลสีเขียวชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อมีการเติมสารต่างๆ ลงไปในน้ำทะเล เช่น FeCl_3 , MnCl_2 , H_3BO_3 , EDTA, NaH_2PO_4 , NaNO_3 , ZnCl_2 , CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, CuSO_4 , VitB_{12} และ VitB_1 นอกจากนี้ ได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Oscillatoria* sp. Miami BG 7 ในน้ำทะเลแบบระบบเปิดปริมาณ 10 ลิตร โดยใช้น้ำทะเลที่เสริมด้วยธาตุอาหารต่างๆ ที่สมบูรณ์ พบว่าได้มวลชีวภาพในปริมาณ 180 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตรต่อวัน (Guillard et al., 1962) อย่างไรก็ตาม หากใช้สารเคมีจำนวนมากก็จะทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงได้สนใจศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไนเตรท ชนิดของแหล่งคาร์บอน ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ เหล็กและนิกเกิลไอออนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

5.2 การศึกษาผลของปริมาณโซเดียมไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองเติมโซเดียมไนเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 176 มิลลิโมลาร์ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต จากการทดลองพบว่า เมื่อเติมโซเดียมไนเตรตความเข้มข้นเพียง 1.76 มิลลิโมลาร์ก็สามารถทำให้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตจะใกล้เคียงกับที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution สูตรปกติ (รูปที่ 4.2A) นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์มีปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution เช่นกัน (รูปที่ 4.2B) แสดงให้เห็นว่าไนเตรตมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต รวมถึงเป็นธาตุที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารโมเลกุลต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การสร้างคลอโรฟิลล์ รวมถึงเมตาบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Synechococcus* sp. เพื่อการเจริญเติบโต (Glibert *et. al.*, 1986; Paerl 1991; Lindell *et. al.*, 1995; Collier *et. al.*, 1999) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Synechococcus* strain DC-2 ในสภาวะที่ปราศจากไนโตรเจน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง และมีการสลายไฟโคไซยานินที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (Wyman *et. al.*, 1985) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองนี้คือ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่ปราศจากการเติมโซเดียมไนเตรต เซลล์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (รูปที่ 4.2A, B) จากการวัดอัตราการผลิตไฮโดรเจน พบว่า *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรตจำกัด คือ 1.76 มิลลิโมลาร์ (อาหาร BG11 สูตรปกติ มีความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 17.6 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.2C) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองในไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Phormidium valderianum* BDU 20041 (Phababharan and Subramanian 1996) ที่พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เช่น ไนเตรต ไนไตรท์ และแอมโมเนีย มีผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง เช่นเดียวกับในไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะส่งผลทำให้กิจกรรมของ PSII ลดลง ทำให้มีออกซิเจนที่เป็นผลิตภัณฑ์ของ PSII น้อย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึง active และมีกิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังสามารถอธิบายการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนจากการเพิ่มขึ้นของไกลโคเจนภายในเซลล์ โดยไกลโคเจนภายในเซลล์นี้จะกลายเป็นสารตั้งต้นทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีแสง (Kumazawa and Mitsui 1981; Mitsui *et. al.*, 1983) ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงเลือกความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต 1.76 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของศูนย์วิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนชีวมวลและพลังงานสะอาด
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สำหรับการทดลองต่อไป จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์

5.3 การศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

โดยปกติแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียทั่วไปมีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ โดยสามารถลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของภาวะเรือนกระจกได้ การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ดังกล่าวนี้จะเกิดร่วมกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อให้ไซยาโนแบคทีเรียสร้างมวลชีวภาพได้ ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* โดยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ใช้มีโมลคาร์บอนเท่ากัน จากการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.3A) แสดงให้เห็นว่า คาร์บอนไม่ใช่ปัจจัยหรือธาตุอาหารหลักสำหรับการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย และแม้จะไม่มีคาร์บอนใดๆ ในน้ำทะเล เซลล์ของ *A. halophytica* ก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ ซึ่งผลดังกล่าวอาจสืบเนื่องมาจากเซลล์สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศได้เพื่อการเจริญและการสะสมมวลชีวภาพ อย่างไรก็ตาม การผลิตไฮโดรเจนมีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่เติมกลูโคส (รูปที่ 4.3B) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองในรายงานที่ผ่านมาในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Microcystis aeruginosa*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 และไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Nostoc muscorum* ที่สามารถใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮโดรเจนได้ (Rashid *et. al.*, 2009; Baebprasert *et. al.*, 2010; Shah *et. al.*, 2003)

5.4 การศึกษาผลของซัลเฟอร์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

จากการรายงานที่ผ่านมาในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* และในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Gloeocapsa alpicola* และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Antal and Lindblad 2005) พบว่า การผลิตไฮโดรเจนจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อบ่มในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ในสภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์ เซลล์กิจกรรมของ PSII ลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการลดลงของออกซิเจน ซึ่งโดยปกติ ออกซิเจนไปจะยังยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ในกรณีที่มีออกซิเจนลดลง ทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น (Melis *et. al.*, 2000; Zhang *et. al.*, 2002) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในรายงานที่ผ่านมาไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ *A. halophytica* ในน้ำทะเลที่เสริมด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์และเติมเมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยให้ค่าสูงกว่าในน้ำทะเลที่ปราศจากซัลเฟอร์ถึง 2.4 เท่า (รูปที่ 4.4B) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่เซลล์ต้องการซัลเฟอร์ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่จำเป็นต่อกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์แสงและเมตาบอลิซึมสำหรับการดำรงชีพของเซลล์ตลอดระยะเวลา 7 วันของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของเมกนีเซียมซัลเฟตจะต้องไม่มากเกินไป เนื่องจากจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงมากและนำไปสู่การยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน

5.5 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A.*

halophytica

การทดลองนี้ เป็นการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* ที่เป็นไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม โดยในปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ ปกติแล้ว น้ำทะเลที่อยู่ในมหาสมุทรมีโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่ายทะเลส่วนใหญ่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเค็มต่ำ คือประมาณ 3 ถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ แต่บางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถทนต่อความเค็มได้ (Harrison, 2004) มีรายงานพบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 3 โมลาร์หรือ 17.5 เปอร์เซ็นต์ได้ แต่เซลล์จะเจริญเติบโตดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 0.5-1 โมลาร์หรือ 2.93-5.85 เปอร์เซ็นต์ (Takabe *et. al.*, 1988) ในการทดลองครั้งนี้พบว่า *A. halophytica* มีรูปแบบการเจริญที่ปกติเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้น 0.5-1 โมลาร์ แต่ถ้าเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 โมลาร์พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้เช่นเดียวกัน แต่มีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด (รูป 4.5A) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในน้ำทะเลธรรมชาติที่มีโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.5 โมลาร์เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ได้มีรายงานพบว่าไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Nodularia spumigena* มีการเก็บสะสมมวลชีวภาพได้สูงกว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหารที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์หรือมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง (30 เปอร์เซ็นต์) (Lehtimäki *et. al.*, 1997) นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียทะเลส่วนใหญ่ไม่

สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ (ปกติมีความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์) และไซยาโนแบคทีเรียประเภทนี้จำเป็นต้องได้รับไอออนของโซเดียม คลอไรด์ แมกนีเซียม และ แคลเซียมอีกด้วย (Stanier and Cohen-Bazire, 1977) ในการทดลองนี้ การผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้น 0.75 โมลาร์หรือ 4.4 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5B) ในขณะที่ไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Lyngbya* sp. strain 108 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในอาหารที่มีปราศจากโซเดียมคลอไรด์ แต่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (Kuwada and Ohta, 1989) และไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Phormidium valderianum* BDU 20041 ที่มีอยู่ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง (2.5 กรัมต่อลิตร หรือ 2.5 เปอร์เซ็นต์) มีการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Prabaharan and Subramaina, 1996) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจสืบเนื่องมาจากการใช้พลังงานและรีดักแทนท์เพื่อที่จะทำให้เซลล์ทนต่อความเค็มได้ จากรายงานการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทะเล *Lyngbya* sp. strain 108 พบว่ามีการเก็บสะสมสารพวกคาร์โบไฮเดรตเพื่อเป็นตัวให้โปรตอนและอิเล็กตรอน เพื่อใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งการเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตดังกล่าว มีผลมาจากความเค็มในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Pringsheim and Wiessner, 1960) ในการทดลองนี้ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.75 โมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นความเข้มข้นปานกลางที่ไม่มากและน้อยเกินไป เซลล์มีการเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้เป็นแหล่งสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนได้ดีและไม่ใช้พลังงานกับทำให้เซลล์ทนต่อความเค็มมากเกินไป

5.6 การศึกษาผลของเหล็กต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

เหล็กมีความสำคัญสำหรับปฏิกิริยารีดอกซ์ที่หลากหลายในไซยาโนแบคทีเรีย โดยเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการหายใจ (Raven, 1999) นอกจากนี้ เหล็กยังเป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์ในโตรจีนเนสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย (Dean *et. al.*, 1993; Geider and La Roche, 1994; Lin and Stewart, 1997) ยิ่งไปกว่านั้น เหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ในศูนย์กลางบริเวณของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทุกชนิดในไซยาโนแบคทีเรียสำหรับการผลิตไฮโดรเจน (Vignais *et. al.*, 2001) มีรายงานพบว่าการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* เมื่ออยู่ในสถานะที่มีเหล็กในปริมาณมาก ซึ่งอธิบายได้ว่าเหล็กเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนโตรจีเนสหรือเฟอร์ริดอกซินในการขนส่งอิเล็กตรอน (Jeffries *et. al.*, 1978) ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำทะเลที่มีเหล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอออนความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ และให้ค่ามากกว่าน้ำทะเลที่ปราศจากเหล็กไอออนถึง 1.48 เท่า (รูปที่ 4.6B) แสดงให้เห็นว่าเหล็กมีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการเป็นโคแฟกเตอร์ในการขนส่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจน ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการเติมเหล็กไอออนความเข้มข้นสูงถึง 40 และ 400 ไมโครโมลาร์ การผลิตไฮโดรเจนจะลดลง (รูปที่ 4.6B) อาจเนื่องมาจากไอออนของเหล็กในปริมาณมากดังกล่าวเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์พยายามใช้พลังงานในการผลักดันให้นำเหล็กออกจากเซลล์

5.7 การศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica*

ในการศึกษาผลของนิกเกิลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* พบว่าระดับของนิกเกิลมีความสำคัญต่อการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารที่มีนิกเกิลไอออนความเข้มข้นสูงถึง 50-100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้และนำไปสู่การตายของเซลล์ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7A) นอกจากนี้ ยังพบว่า *A. halophytica* มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีนิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์และมีค่าสูงกว่า 2.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่ปราศจากนิกเกิล (รูปที่ 4.7B) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของนิกเกิลต่อการผลิตไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบว่าความเข้มข้นของนิกเกิลที่เหมาะสมส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0.5 ถึง 5 ไมโครโมลาร์ (Rai *et. al.*, 1986; Serebryakova *et. al.*, 1999; Axelsson and Lindblad, 2002; Gutekunst *et. al.*, 2006) จากการรายงานของ Carrieri และคณะ (2008) พบว่านิกเกิลในปริมาณที่จำกัดมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira maxima* การอธิบายผลของนิกเกิลต่อการผลิตไฮโดรเจนอาจจะเป็นไปได้ด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ ประการแรกเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากนิกเกิลที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงจะเป็นแหล่งของโคแฟกเตอร์ที่อยู่บริเวณศูนย์กลางการเร่งของปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าว และประการที่สอง นิกเกิลที่เติมเข้าไปในอาหารอาจไปมีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hox* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ จากการศึกษากการแสดงออกของยีนไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* พบว่าเมื่อมีการเติมนิกเกิลในอาหารส่งผลให้มีการกระตุ้นการถอดรหัสของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ในไซยาโนแบคทีเรีย *N. muscorum* และเอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ใน *N. muscorum* และ *Nostoc* sp. strain PCC 73102 (Axelsson and Lindblad, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.8 การศึกษาผลการผลิตไฮโดรเจนแบบยั้งยั้งภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage

จากการทดลองที่ 4.2 ซึ่งพบว่าไนเตรทเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของ *A. halophytica* ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในระบบ two-stage เพื่อผลิตไฮโดรเจนอย่างยั้งยั้ง (ผลิตเป็นระยะเวลาอย่างต่อเนื่อง) มี 2 ขั้นตอน ขั้นแรก เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นั่นคือ เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น ขั้นที่สอง นำสารละลายเซลล์มาเหนี่ยวนำให้อยู่ในน้ำทะเลที่ปราศจากโซเดียมไนเตรทและสารอื่นๆ เนื่องจากหากสามารถผลิตไฮโดรเจนได้จะเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการเติมสารต่างๆ และสามารถนำน้ำทะเลมาใช้ได้จริง จากการทดลองพบว่า *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเหนี่ยวนำและสูงสุดในวันที่ 2 โดยผลิตได้ 1.72 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมกลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง หลังจากนั้น อัตราการผลิตจะลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 10 จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. halophytica* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั้งยั้งในน้ำทะเล โดยผลิตได้เป็นเวลาถึงอย่างน้อย 10 วัน (รูปที่ 4.8)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการนำน้ำทะเลมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงและผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* สรุปได้ว่า

1. การเติมโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 1.76 มิลลิโมลาร์ในน้ำทะเลสามารถทำให้ไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica* เจริญเติบโตได้ดีและมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง ใกล้เคียงกับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island salt solution
2. ชนิดของแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *A. halophytica*
3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของ *A. halophytica* คือ โซเดียมไนเตรท 1.76 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต 30 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 0.75 โมลาร์ เหล็กไอออน 4 ไมโครโมลาร์และนิกเกิลไอออน 5 ไมโครโมลาร์
4. ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืนในน้ำทะเล โดยผลิตได้เป็นเวลาถึงอย่างน้อย 10 วัน

เอกสารอ้างอิง

- ชัยชาญ อุทธีกริกไกร 2547 ผลงานวิจัยมวลกับศักยภาพในประเทศไทย โลกพลังงาน 7: 22-29.
- ถัดดา วงศ์รัตน์ 2542 แพลงก์ตอนพืช พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Allen, E. J. 1914 On the culture of the plankton diatom *Thalassiosira gravida* Cleve in artificial seawater. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 10: 417-439.
- Allen, E. J. and Nelson, E. W. 1910 On the artificial culture of marine plankton organisms. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 8: 421-474.
- Antal, T. K. and Lindblad, P. 2005 Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. J. Appl. Microbiol. 98: 114-120.
- Axelsson, R. and Lindblad, P. 2002 Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases: effects of oxygen, hydrogen, and nickel. Applied and Environmental Microbiology 68: 444-447.
- Baebprasert, W., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. 2010 Response of H₂ production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Int. J. Hyd. En. 35: 6611-6116.
- Carrieri, D., Ananyeva, G., Costas, A.M., Bryant, D.A. and Dismukes, G.C. 2008 Renewable hydrogen production by cyanobacteria : nickel requirements for optimal hydrogenase activity. International Journal of Hydrogen Energy 33: 2014-2022.
- Collier, J. L., Brahmsha, B. and Palenik, B. 1999 The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: Molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. Microbiology-UK 145: 447-459.
- Dean, D. R., Bolin, J. T. and Zheng, L. 1993 Nitrogen metalloclusters: structure, organization, and synthesis. Journal of Bacteriology 175: 6737-6744.
- DOE. 1994 Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water (Version 2). A.G. Dickson & C. Goyet, eds., ORNL/CDIAC-74. (Chapter 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Faucher, O., Coupal, J. B. and Leduy, A. 1997 Utilization of sea water-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. Microbiol. 25(6): 752–759.
- Fernando, J., Hundeshagen, B. and Bothe, H. 2002 Evidence for the occurrence of the alternative vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. FEMS Microbiol. Lett. 51: 19-24.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942 Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. J. Gen. Physiol. 26: 219–240.
- Garlick, S., Oren, A. and Padan, E. 1977 Occurrence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular cyanobacteria. J. Bacteriol. 129: 623-629.
- Geider, R. J. and La Roche, J. 1994 The role of iron in phytoplankton photosynthesis, and the potential for iron limitation of primary productivity in the sea. Photosyn Res.39: 275-301.
- Glibert, P. M., Kana, T. M., Oloson, R. J., Kirchman, D.L. and Alberte, R.S. 1986 Clonal comparison of growth and photosynthetic responses to nitrogen availability in marine *Synechococcus* spp. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 101: 199–208.
- Guan, Y., Denga, M., Yu, X. and Zhang, W. 2004 Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*. Biochem. Eng. J. 19: 69–73.
- Guillard, R. R. L., and Ryther, J. H. 1962 Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229–239.
- Gutekunst, K., Hoffmann, D., Lommer, M., Egert, M., Suzuki, I., Schulz-Friedrich R., et. al. 2006 Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. International Journal of Hydrogen Energy 31: 1452–1459.
- Harrison, P.K. and John A. B. 2004 Marine culture media. Algal culturing techniques 21-34.
- Iwasaki, H. 1961 The life-cycle of *Porphyra tenera* *in vitro*. Biol. Bull. 121: 173-187.
- Jeffries, T.W., Timourien, H. and Ward, R.L. 1978 Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: Effect of varying ammonium and ferric ions, pH and light. Applied and Environmental Microbiology 35: 704-710.
- Ketchum, B. H. and Redfield, A. C. 1949 Some physical and chemical characteristics of algae growth in mass culture. J. Cell Physiol. 33: 281–299.
- Kosaric และ Lyng, 1988)

- Kumazawa, S. and Mitsui, A. 1981 Characterization and optimization of hydrogen photo production by saltwater blue-green algae, *Oscillatoria* sp. Miami BG7. I. Enhancement through limiting the supply of nitrogen nutrients. *Int. J. Hyd. En.* 6: 339-348.
- Kuwada, Y. and Ohta, Y. 1989 Hydrogen production and carbohydrate consumption by *Lyngbya* sp. (no. 108). *Agriculture and Biological Chemistry* 53: 2847-2851.
- Lehtimäki, P., Moisander, K., Sivonen and Kononen, K. 1997 Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1647-1656.
- Lin, J.T. and Stewart, V. 1997 Nitrate assimilation by bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 39: 379.
- Lindell, D. and Post, A. F. 1995 Ultraphytoplankton succession is triggered by deep winter mixing in the Gulf of Aqaba (Eilat), Red Sea. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1130-1141.
- Paerl, H. W. 1991 Ecophysiological and trophic implications of light-stimulated amino acid utilization in marine picoplankton. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 473-479.
- Prabaharan, D. and Subramanian, G. 1996 Oxygen free hydrogen production by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 20041. *Bioresource Technology* 57: 111-116.
- Pinet, P. R. 1996 *Invitation to Oceanography*. St. Paul: West Publishing Company, ISBN 9780314063397 pp.126, 134-135.
- Mackinney G. 1941 Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
- Melis, A., Zhang, L. P., For estier, M., Ghirardi, M. L. And Seibert, M. 2000 Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 122(1): 127-135.
- Mitsui, A., Philipse, J., Kumazawa, S., Reddyk, J., Ramachandran, S., Matsunaga, T., Haynes, L. and Ikemoto, H. 1983 Progress in research toward outdoor biological hydrogen production using solar energy, sea water, and marine photosynthetic microorganisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 413: 514-530.
- Pringsheim, E. A. and Wiessner, W. 1960 Photoassimilation of acetate by green organism, *Nature* 188: 919-921.

- Rai, L.C. and Raizada, M. 1986 Nickel induced stimulation of growth, heterocyst differentiation, CO₂-C14 uptake and nitrogenase activity in *Nostoc muscorum*. *New Phytologist* 104: 111–114.
- Rashid, N., Song, W., Park, J., Jin, H. and Lee, K. 2009 Characteristics of hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* through cycles of photosynthesis and anaerobic incubation. *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 498-503.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B, Herdman M. and Stanier, R.Y. 1979 Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 11: 1–61.
- Ryther, J. H. and Kramer, D. D. 1961 Relative iron requirement of some coastal and offshore plankton algae. *Ecology* 42: 444-446.
- Serebryakova, L.T., Sheremetieva, M. And Lindblad, P. 1999 Hydrogenase activity of the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU743 under conditions of nitrogen limitation. *Microbiology Russian* 68: 249-253.
- Shah, V., Garg, N. and Madamwar, D. 2003 Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production. *Folia Microbiologica (Praha)* 48: 65-70.
- Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G. 1977 Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* 31: 225-274.
- Sweeney, B. M. 1954 *Gymnodinium splendens*, a marine dinoflagellate requiring vitamin B12. *Am. J. Bot.* 41: 821–824.
- Takabe, T., Incharoensakdi, A., Arakawa, K. and Yokota, S. 1988 CO₂ fixation rate and RuBisCO content increase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in high salinities. *Plant Physiology* 88: 1120-1124.
- Thomson, G. 2006 "Ocean Chemical Processes." Retrieved 12/2/06.
- Wyman, M., Gregory, R. P. F. and Carr, N. G. 1985 Novel role for phycoerythrin in a marine cyanobacterium *Synechococcus* strain DC-2. *Science* 230: 818–820.
- Vignais, P., Billound, B. and Meyer, J. 2001 Classification and phylogeny of hydrogenase. *FEMS Microbiology* 25: 455-501.

Zhang, L., Happe, T. and Melis, A. 2002 Biochemical and morphological characterization of sulphur deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* green alga. *Planta* 214: 552–556.

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

<http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%20hydrogenproduction>

<http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Rippka *et. al.*, 1979)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียม โมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ (II) ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมอีทีดีเอ (Na_2EDTA)	279	ไมโครโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	1	มิลลิลิตร
(2 กรัม/100 มิลลิลิตร)		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	มิลลิลิตร
(3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)		
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4 \cdot Citrate$)	1	มิลลิลิตร
(0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)		
ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Turk Island Salt Solution

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
-------------------------------	----	-----------

ส่วนประกอบอาหารสต็อก A

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	89.40	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	27.05	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	99.73	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหารสต็อก B

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	30.37	มิลลิโมลาร์
--	-------	-------------

ส่วนประกอบอาหารโซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	43.01	มิลลิโมลาร์
-----------------------	-------	-------------

ปรับความเป็นกรดค่าเป็น 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตรโดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร Turk Island Salt Solution ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร