การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. และ *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์กลาย

HYDROGEN PRODUCTION BY MUTANT STRAINS OF UNICELLULAR GREEN ALGAE *Chlorella* sp. AND *Chlamydomonas reinhardtii*

สวรส วรปัญญาภรณ์

สาวิตรี เรียบทวี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYDROGEN PRODUCTION BY MUTANT STRAINS OF UNICELLULAR GREEN ALGAE *Chlorella* sp. AND *Chlamydomonas reinhardtii*

SAWAROS WARAPANYAPORN
SAWITREE RIABTHAWEE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. และ *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์กลาย Hydrogen Production by Mutant Strains of Unicellular Green Algae *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสวรส วรปัญญาภรณ์ รหัสนักศึกษา 57050905 นางสาวสาวิตรี เรียบทวี รหัสนักศึกษา 57050906
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. และ *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์กลาย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสวรส วรปัญญาภรณ์ รหัสนักศึกษา 57050905 นางสาวสาวิตรี เรียบทวี รหัสนักศึกษา 57050906
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

ไฮโดรเจนที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวจัดเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. และ *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและมีแสง โครงงานพิเศษนี้ ได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ได้สาหร่ายสายพันธุ์กลายจำนวน 18 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ จากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงในสาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิดพบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 และ *C. reinhardtii* CC-124M4 ให้การผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ภายใต้สภาวะขาดแหล่งไนโตรเจนและแหล่งซัลเฟอร์ ตามลำดับ สาหร่ายสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 37.242 ± 0.347 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 446.919 ± 4.080 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนที่มีกรดอะซีติกความเข้มข้น 87 มิลลิโมลาร์ ส่วนสาหร่ายสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 62.376 ± 0.633 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 374.757 ± 3.198 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ที่มีกรดอะซีติกความเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์

คำสำคัญ : การกลายพันธุ์ รังสีอัลตราไวโอเลต การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Hydrogen production by mutant strains of unicellular green algae *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*
Students	Miss Sawaros Warapanyaporn Student ID 57050905
	Miss Sawitree Riabthawee Student ID 57050906
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunpruch

Abstract

Hydrogen produced by green algae is one of the alternative interesting energy carriers. The unicellular green algae *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii* are able to produce H_2 by hydrogenase activity via photosynthetic pathway under light anaerobic condition. In this special project, eighteen and four mutant strains of the unicellular green algae *Chlorella* sp. LSD-W2 and *C. reinhardtii* CC-124 were generated by an ultraviolet irradiation, respectively. The high H_2-producing mutant strains of each green algal type were selected. The result showed that *Chlorella* sp. LSD-W2M8 and *C. reinhardtii* CC-124M4 gave the highest H_2 production under nitrogen-deprived and sulfur-deprived conditions, respectively. The mutant strain *Chlorella* sp. LSD-W2M8 gave the highest H_2 production rate with 37.242 ± 0.347 mL L^{-1} h^{-1} and maximum H_2 production with 446.919 ± 4.080 mL L^{-1} when incubated cells in nitrogen-deprived TAP medium (TAP-N) containing 87 mM acetic acid whereas and the mutant strain *C. reinhardtii* CC-124M4 showed the highest H_2 production rate with 62.376 ± 0.633 mL L^{-1} h^{-1} and maximum H_2 production with 374.757 ± 3.198 mL L^{-1} when incubated cells in sulfur-deprived TAP medium (TAP-S) containing 17.4 mM acetic acid.

Keywords : Mutation, Ultraviolet, H_2 production, Green algae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษที่จัดทำขึ้นนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่มาโดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบและให้คำแนะนำ ให้โครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการอบรมให้ความรู้และทักษะการปฏิบัติงานต่างๆ ตลอดจนคำแนะนำด้านต่างๆ ตลอดเวลาของการศึกษาในสถาบันฯ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพี่นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ทำให้เกิดผลสำเร็จในงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในทุกเรื่อง

ประโยชน์และคุณค่าของโครงงานพิเศษฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้สั่งสอนอบรมมาจากอดีตจนถึงปัจจุบัน ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว

สวรส วรปัญญาภรณ์
สาวิตรี เรียบทวี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ซ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน.....4
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน.....4
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี.....4
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า.....5
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนทางชีวภาพ.....5
2.2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำ.....6
ด้วยแสงแบบทางตรง
2.2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำ.....6
ด้วยแสงแบบทางอ้อม
2.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง.....7
2.2.3.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง.....7
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว.....8
2.4 สาหร่ายสีเขียว.....9
2.4.1 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 10
2.4.2 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*.....11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่าย....12
2.5.1 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี....12
2.5.2 สิ่งก่อกลายพันทางกายภาพ....13
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย....15
3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง....15
3.2 สารเคมี....15
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย....15
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ....15
3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์....16
3.2.4 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน....16
3.3 อุปกรณ์....16
3.4 วิธีการทดลอง....18
3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124....18
3.4.2 วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124....18
3.4.3 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของสาหร่ายสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน....18
3.4.4 วิธีการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน....20
3.4.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์....20
3.4.6 วิธีการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์....21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล....22
4.1 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124....22
4.2 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน....24
4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลาย....30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....37
5.1 สรุปผลการวิจัย.....37
5.2 ข้อเสนอแนะ.....37
เอกสารอ้างอิง.....38
ภาคผนวก.....41
ภาคผนวก ก.....42
ภาคผนวก ข.....45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ.....19
เทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))

4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและ.....25
สายพันธุ์กลาย ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมและ.....26
สายพันธุ์กลาย ในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิม.....31
และสายพันธุ์กลาย LSD-W2M8, LSD-W2M11 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิม.....32
และสายพันธุ์กลาย CC-124M1, CC-124M4 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกภายใต้สภาวะปราศจากอากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม LSD-W2 36
และสายพันธุ์กลาย LSD-W2M8, LSD-W2M11 ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ความเข้มข้นกรดอะซีติก 87 มิลลิโมลาร์ ของหน่วยการวิเคราะห์ต่างๆ

4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิม CC-124 37
และสายพันธุ์กลาย CC-124M1, CC-124M4 ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ความเข้มข้นกรดอะซีติก 17.4 มิลลิโมลาร์ ของหน่วยการวิเคราะห์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง.....9
2.2 วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas*.....12
4.1 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิม.....23
เมื่อนำมาทดสอบทางกายภาพด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
ที่ช่วงเวลาต่างๆ ในอาหาร TAP
4.2 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิม.....23
เมื่อนำมาทดสอบทางกายภาพด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
ที่ช่วงเวลาต่างๆ ในอาหาร TAP
4.3 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2.....27
สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย จำนวน 18 ไอโซเลท ในอาหาร TAP ที่ปราศจาก
แหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที
4.4 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124.....28
สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย จำนวน 4 ไอโซเลท ในอาหาร TAP ที่ปราศจาก
แหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที
4.5 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2.....33
สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย LSD-W2M8, LSD-W2M11 ในอาหาร TAP และ
TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีกรดอะซีติกเข้มข้น 87 มิลลิโมลาร์
ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที
4.6 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124.....34
สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย CC-124M1, CC-124M4 ในอาหารTAP และ
TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่มีกรดอะซีติกเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์
ภายหลังการไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

ไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากให้พลังงานสูงและเป็นพลังงานที่สะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สัญลักษณ์ของธาตุไฮโดรเจนคือ H ซึ่งมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล และมีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและพบมากที่สุดในเอกภพ ก๊าซไฮโดรเจนประกอบด้วยธาตุไฮโดรเจน 2 อะตอมเชื่อมต่อกัน ในบรรยากาศโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟจากการเผาไหม้ การเผาไหม้ของไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและไม่ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานที่ได้จากการเผาไหม้ไฮโดรเจนจะสูงกว่าพลังงานจากเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอนถึง 2.5 เท่า นอกจากนี้ ไฮโดรเจนยังสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิงในการผลิตไฟฟ้าอีกด้วย (ธรรมนูญ, 2550)

การผลิตไฮโดรเจนมีหลายกระบวนการ ซึ่งการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการชีวภาพเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการชีวภาพเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยสิ่งมีชีวิต เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว เป็นต้น ข้อดีของการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย คือ การนำแสงอาทิตย์และน้ำซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจน โดยการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิดนี้จะเกิดควบคู่กับกระบวนการสังเคราะห์แสง (วิทวัส, 2553) ระบบการสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายกับในพืช การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจำแนกได้เป็น 2 วิธี ได้แก่ การผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงทางตรง และการผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงทางอ้อม การผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงทางตรงพบมากในสาหร่ายสีเขียว โดยแสงกระตุ้นการแตกตัวของน้ำให้เป็นโปรตอน ก๊าซออกซิเจน และอิเล็กตรอน จากนั้น เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนได้เป็นก๊าซไฮโดรเจน นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถใช้อินทรีย์คาร์บอนหรืออนินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจนได้อีกด้วย ทั้งนี้การผลิตไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไวต่อออกซิเจนมาก (Fay, 1992) ส่วนการผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงทางอ้อมจะเกิดจากการใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแป้งและแป้งจะเป็นแหล่งอิเล็กตรอนของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวสามารถทำได้หลายวิธี ในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากการกลายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว การกลายพันธุ์ (Mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรวมตัว (Recombination) หรือการแยกตัว (Segregation) ของสารพันธุกรรมตามปกติ และสามารถถ่ายทอดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนั้นจากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ วิธีที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายคือการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation breeding) โดยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) สิ่งก่อกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (Physical mutagen) ได้แก่ รังสีต่างๆ เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet radiation) ซึ่งเป็นรังสีที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีประสิทธิภาพสูง และสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (Chemical mutagen) เช่น เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate) ซึ่งไวต่อการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลดีเอ็นเอ (พีรนุช, 2553)

โครงงานพิเศษนี้มีความสนใจในการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายของ *Chlorella* sp. สายพันธุ์ LSD-W2 และ *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124 เพื่อเป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว
2) เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน
3) เพื่อศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สายพันธุ์ LSD-W2 และ *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124 ด้วยการฉายรังสีอัตราไวโอเลต จากนั้น นำสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายที่ได้มาทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในสภาวะการขาดธาตุอาหารต่างๆ และนำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกไปศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถชักนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สายพันธุ์ LSD-W2 และ *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124 ให้เกิดการกลายพันธุ์ และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายมีผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจนและคุณสมบัติของไฮโดรเจน

จากการที่ในปัจจุบันน้ำมันเชื้อเพลิงมีปริมาณลดลง ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงมีมูลค่าสูงขึ้นและส่งผลให้เกือบทุกประเทศทั่วโลกประสบกับวิกฤตการณ์ทางด้านพลังงาน ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจึงได้พยายามแสวงหาพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ โดยจะต้องเป็นพลังงานที่สะอาด ปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถให้พลังงานสูงและมีราคาไม่แพง แหล่งพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจชนิดหนึ่งคือพลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) เป็นพลังงานทางเลือกที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด ยั่งยืน สามารถหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เมื่อทำการเผาไหม้ด้วยออกซิเจนจะได้เพียงน้ำและออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจกหลักที่จะส่งผลให้เกิดภาวะโลกร้อน (Global warming) ก๊าซไฮโดรเจนเกิดจากการรวมตัวของไฮโดรเจนอะตอม 2 ตัว ไฮโดรเจนอะตอมเป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 และมีสัญลักษณ์ธาตุคือ H ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เล็กและเบาที่สุดโดยมีน้ำหนักเบากว่าอากาศถึง 14 เท่า ไฮโดรเจนอะตอมสามารถพบมากที่สุดบนโลกและเป็นองค์ประกอบของน้ำที่เป็นปัจจัยสำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิตบนโลก ก๊าซไฮโดรเจนประกอบด้วยไฮโดรเจนอะตอม 2 ตัวที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ มีคุณสมบัติคือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ก๊าซไฮโดรเจนยังมีค่าออกเทน (ค่าความต้านทานการน็อคของเครื่องยนต์: Antiknock quality) สูงถึง 120 โดยเชื้อเพลิงที่มีค่าออกเทนสูงจะทำให้เกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงที่สมบูรณ์ เครื่องยนต์เดินเรียบไม่สะดุด ทำให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อเทียบกับพลังงานอื่นๆ นอกจากนี้ พลังงานไฮโดรเจนยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนกับพลังงานดั้งเดิม เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับครัวเรือน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น เป็นต้น (Bak และคณะ, 2002)

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการ ดังนี้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี (Thermo chemical process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ โดยนำก๊าซธรรมชาติมาทำปฏิกิริยากับไอน้ำ กระบวนการนี้อาจเรียกว่า กระบวนการรีฟอร์มิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming) กระบวนการรีฟอร์มิงด้วยไอน้ำเป็นการใช้ความร้อนในการเปลี่ยนมวลชีวภาพ ก๊าซธรรมชาติ หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่านหิน ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซผสมที่ประกอบด้วยก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และมีเทน (CH_4) ฯลฯ จากนั้น จึงทำการแยกไฮโดรเจนออกมาจากก๊าซผสมอื่นๆ ในระดับอุตสาหกรรม มีการใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจน เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นหรือตัวเร่งปฏิกิริยาในอุตสาหกรรมต่างๆ แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียคือ สารตั้งต้นที่เป็นก๊าซธรรมชาติหรือถ่านหินที่กำลังจะหมดลงและการผลิตจะก่อให้เกิดมลพิษ เนื่องจากมีสารพิษตกค้างจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่สมบูรณ์ เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น (อิศกฤตา, 2557)

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Water electrolysis) เป็นวิธีการที่ใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง ทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม กระบวนการอาศัยอิเล็กโทรด (Electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (Anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (Cathode) วิธีการผลิตไฮโดรเจน คือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้มีความเป็นตัวนำมากขึ้นโดยการเติมสารพวกอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะเข้าไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวกผลิตโมเลกุลของไฮโดรเจนและออกซิเจน ตามลำดับ กระบวนการนี้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต แต่ต้องอาศัยกระแสไฟฟ้าสูงถึง 90 กิโลวัตต์ ข้อดีของวิธีการนี้คือ ไม่ผลิตก๊าซพิษและก๊าซเรือนกระจกระหว่างกระบวนการผลิต ส่วนข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนทางชีวภาพ

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนทางชีวภาพเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือจุลินทรีย์ ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตอาจเรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพจากจุลินทรีย์จะไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น เนื่องจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นผลผลิตทางชีวภาพที่ง่ายต่อการกำจัด นอกจากนี้ วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตยังใช้ได้หลากหลาย และมีราคาถูก จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการชีวภาพนั้นแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ 1) จุลินทรีย์สังเคราะห์แสง (Photosynthetic microorganism) เช่น สาหร่าย (Greenbaum, 1990) และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น *Rhodospirillum rubrum* (Zhu และคณะ, 1999) และกลุ่มที่ 2) จุลินทรีย์ผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก (Fermentative hydrogen-producing microorganism) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ประเภทที่เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศและมีอากาศ (Facultative anaerobe) (Tanisho และ Ishiwata, 1995) และ จุลินทรีย์ประเภทที่เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศ (Obligate anaerobe) (Dabrock และคณะ, 1992) เช่น *Clostridium* sp. และ *Enterobacter* sp. เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบัน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมยังนิยมใช้วิธีการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการรีฟอร์มิงด้วยไอน้ำ และวิธีการการแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า แต่ต้นทุนในการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการเหล่านี้ค่อนข้างสูงและต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิตสูงมาก ก่อให้เกิดปัญหาและอุปสรรคในการพัฒนานำเอาไฮโดรเจนมาใช้เป็นพลังงานทางเลือกใหม่ ดังนั้น นักวิจัยจึงได้หันมาพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือในจุลินทรีย์

โดยทั่วไป การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนทางชีวภาพสามารถแบ่งเป็น 4 กระบวนการหลักๆ ดังนี้

2.2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางตรง (Direct biophotolysis) เป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก เช่น สาหร่ายสีเขียว ในการแตกตัวของน้ำในระบบแสงสอง และมีการส่งต่ออิเล็กตรอนเป็นทอดๆ จนกระทั่ง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ดังสมการที่ 2.1 (Ni และคณะ, 2006)

$$2H_2O \xrightleftharpoons{\text{พลังงานแสง}} 2H_2 + O_2 \qquad \text{สมการที่ 2.1}$$

ในกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว เมื่อระบบแสงสอง (Photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน (O_2) โปรตอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) จากนั้น อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังระบบแสงหนึ่ง (Photosystem I, PSI) และส่งต่อไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป จนกระทั่งมาถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายคือ เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน

2.2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการแยกสลายโมเลกุลของน้ำด้วยแสงแบบทางอ้อม (Indirect biophotolysis) จะพบมากในสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย การผลิตไฮโดรเจนแบบนี้สามารถแก้ปัญหาการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากออกซิเจน เนื่องจากกระบวนการผลิตออกซิเจนและไฮโดรเจนเกิดแยกกัน ในขั้นตอนแรก สาหร่ายสีเขียวจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงหนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อสร้างคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ 2.2 และในขั้นตอนที่ 2 ชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจน ดังสมการที่ 2.3 (Levin และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$6H_2 + 6CO_2 \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} C_6H_{12}O_6 + 3O_2 \qquad \text{สมการที่ 2.2}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 12H_2 + 6CO_2 \qquad \text{สมการที่ 2.3}$$

2.2.3.3 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (Photo-fermentation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น แบคทีเรียสีม่วง (Purple bacteria) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงประกอบด้วยระบบการสังเคราะห์แสงระบบเดียว ซึ่งแตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวและพืชชั้นสูงที่มีการสังเคราะห์แสง 2 ระบบ . แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะที่มีแสง และผลิตไฮโดรเจนผ่านสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนหรือชีวมวลภายใต้สภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้กรดอินทรีย์อย่างง่ายเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยังเฟอร์รีดอกซินโดยอาศัยพลังงานในรูปของ ATP โดยอิเล็กตรอน 1 ตัวต้องการพลังงาน ATP 2 โมเลกุล จากนั้น เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเพื่อสร้างไฮโดรเจน การผลิตไฮโดรเจนจากกรดแลคติกแสดงดังสมการที่ 2.4

$$C_3H_6O_3 + 3H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 6H_2 + 3CO_2 \qquad \text{สมการที่ 2.4}$$

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสงสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ประเภทของเสียที่เป็นชีวมวล ไม่ว่าจะเป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือจากการเกษตรกรรม แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก ได้แก่ *Rhodobacter capsulatus* (Ooshima และคณะ, 1998) และ *Rhodopseudomonas capsulate* (Fang และคณะ, 2005) เป็นต้น

2.2.3.4 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง

การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง (Dark-fermentation) เกิดในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ โดยใช้สารตั้งต้นประเภทคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ชีวมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ของเสียจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอิเล็กตรอน แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้แสง และผลิตผลพลอยได้เป็นสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซีติก กรดบิวทีริก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์หลัก กล่าวคือ เมื่อใช้กลูโคส 1 โมล เป็นสารตั้งต้นและผลิตกรดอะซีติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล ดังแสดงในสมการที่ 2.5 หรือเมื่อใช้กลูโคส 1 โมลในการผลิตกรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จะได้ไฮโดรเจน 2 โมล ดังแสดงในสมการที่ 2.6 (Hawkes และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$ สมการที่ 2.5

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$ สมการที่ 2.6

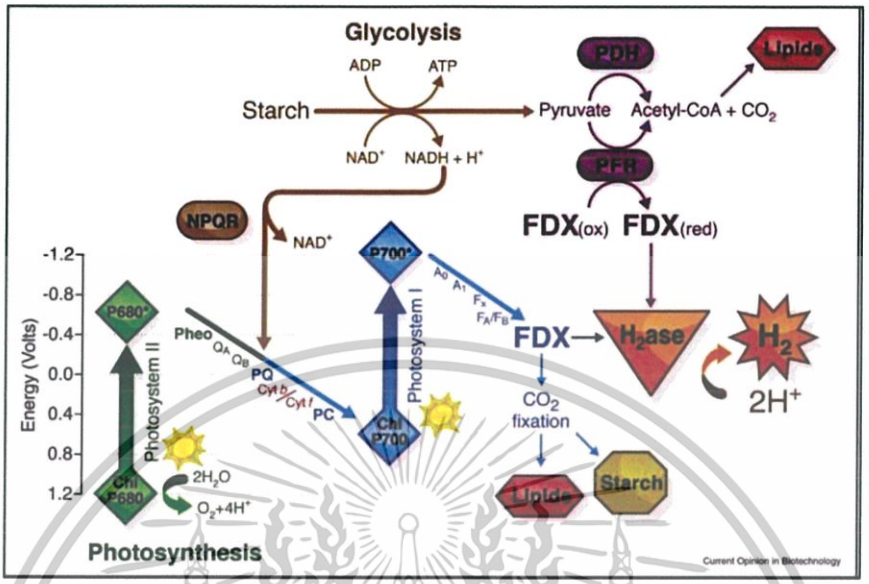
จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ Facultative anaerobe ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter* และ *Citrobacter* และ Strict anaerobe ได้แก่ *Closdridium* และ Rumen bacteria โดยสามารถใช้จุลินทรีย์ในรูปของสายพันธุ์เดี่ยวและกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อผลิตไฮโดรเจนได้ ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยวเป็นหัวเชื้อในการผลิตไฮโดรเจนคือสามารถผลิตไฮโดรเจนจากสารตั้งต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีข้อจำกัดคือการรักษาสภาวะปลอดเชื้อระหว่างการผลิต

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจนผ่านการสังเคราะห์ด้วยแสงที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้งคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอจะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PSII) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตรระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q: Primary electron acceptor of PSII) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ: Plastoquinone) ต่อมา เมื่อมีการแตกตัวของน้ำหรือที่เรียกว่า Water splitting จะได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรพิลล์สูญเสียไปในระบบ จากนั้น อิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครมบี 6 เอฟ ($Cytb_6f$: Cytochrome b_6f) พลาสโตไซยานิน (PC: Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PSI) ระบบแสงหนึ่งจะประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Primary electron acceptor of PSI) และส่งต่ออิลเกตรอนจนกระทั่งถึงเฟอร์รีดอกซิน(Fd: Ferredoxin) จะไปรวมตัวกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำโดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น (รูปที่ 2.1) (Posewitz, 2009) กระบวนการที่กล่าวมาข้างต้น คือ กระบวนการผลิตไฮโดรเจนผ่านทางระบบแสงสอง (PSII-dependent process) อย่างไรก็ตาม สาหร่ายสีเขียวยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยไม่ผ่านระบบแสงสองโดยอิเล็กตรอนที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้มาจากการย่อยสลายสารภายในเซลล์ เช่น แป้ง เป็นต้น



รูปที่ 2.1 กระบวนการการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

ที่มา : Posewitz และคณะ, 2009

2.4 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต ที่มีระบบออร์แกเนลล์ที่ซับซ้อน มีนิวเคลียสและมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่ชัดเจน สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง โดยมีการพัฒนากลุ่มของเซลล์จนกลายเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนทำหน้าที่คล้ายราก ลำต้น และใบ อย่างไรก็ตามโครงสร้างที่ปรากฏเหล่านั้นยังไม่ถือว่าเป็น ราก ลำต้น และใบที่แท้จริง เพราะขาดคุณสมบัติของการทำงานร่วมกันเป็นเนื้อเยื่อ สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ แคโรทีนอยด์ประกอบด้วย แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ ซึ่งเป็นรงควัตุชนิดเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง ผนังเซลล์ส่วนใหญ่มี 2 ชั้น (แต่บาง Class ก็ไม่มีผนังเซลล์) ผนังชั้นนอกประกอบด้วยสารจำพวกเพคติน ในขณะที่ผนังชั้นในเป็นสารจำพวกเซลลูโลส สาหร่ายสีเขียวบางชนิดที่เคลื่อนไหวได้จะมีหนวด (Flagella) หนวดมีลักษณะเรียบคล้ายเส้นหรือเป็นวง ถ้ามีหนวดมากกว่า 1 เส้น ความยาวของหนวดจะเท่ากันทุกเส้น สาหร่ายที่มีหนวดจะมีออร์แกเนลล์ที่มีสีเรียกว่าตา (Eye spot or Stigma) ซึ่งทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบทั้งเซลล์เดียว (Unicellular) อยู่รวมกลุ่มเป็นโคโลนี (Colony) และเป็นเส้นสาย (Filament) สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้ สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. และ *Chlamydomonas reinhardtii*

2.4.1 สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp.

สาหร่ายสีเขียวชนิดนี้จัดอยู่ใน

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Trebouxiophyceae

Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

Species *Chlorella* sp.

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว มีขนาดเล็กประมาณ 1-10 ไมครอน อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือรวมกันเป็นกลุ่มก้อน ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น ทรงกลม รูปไข่ และรูปรี เซลล์มีหลายขนาดในสภาพแวดล้อมเดียวกัน *Chlorella* sp. มีคลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างคล้ายถ้วยหรือระฆัง หรือเป็นแบบแถบข้าง อาจมีหรือไม่มีเม็ดแป้ง ไม่มีรยางค์และคอนแทรกไทล์แวคิวโอล (Contractile vacuole) มีผนังเซลล์หนาและแข็งจำนวน 3 ชั้น ผนังเซลล์ชั้นกลางหนาที่สุดประกอบด้วย เซลลูโลส (Cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับโลหะหนักหรือสารพิษในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และชั้นในสุดเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (วิสัย, 2534) การสืบพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโตสปอร์ (Autospore) ในเซลล์ที่เจริญเต็มวัย เซลล์ของ *Chlorella* sp. เติบโตได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารในช่วงกว้าง ในธรรมชาติสามารถพบ *Chlorella* sp. ได้ทั้งในสภาพน้ำจืด น้ำเค็มและน้ำเสีย (Richmond, 1986)

สำหรับสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* ที่สนใจศึกษาในครั้งนี้คือ *Chlorella* sp. LSD-W2 ที่แยกได้จากน้ำทะเล หาดแหลมเสด็จในจังหวัดจันทบุรี (Tinpranee และคณะ, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

สาหร่ายสีเขียวชนิดนี้จัดอยู่ใน

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlamydomonadales

Family Chlamydomonadaceae

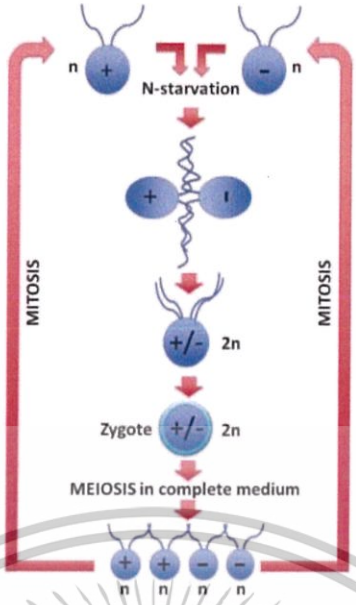
Genus *Chlamydomonas*

Species *C. reinhardtii*

สาหร่าย *C. reinhardtii* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่พบได้ในดินและน้ำ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร และสามารถเคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา 2 เส้น ผนังเซลล์ของ *C. reinhardtii* ประกอบไปด้วย ไฮดรอกซีโพรลีนไกลโคโปรตีน (Hydroxyproline glycoprotein) เป็นส่วนมาก มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย มีไพรีนอยด์ขนาดใหญ่ และมีอายสปอตทำหน้าที่ในการรับแสง ทำให้เซลล์รับรู้ว่าควรเคลื่อนที่ไปยังทิศทางใด

สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* มีวัฏจักรชีวิตดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยทั่วไป เซลล์จะอยู่ในรูปแฮพลอยด์ (n) แต่ละเซลล์จะมีรูปแบบของเพศเป็น Mating type + (mt +) หรือ Mating type - (mt -) อย่างใดอย่างหนึ่งตลอดชีวิต เซลล์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ระหว่าง Mating type คนละตัว เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Gametogenesis) แต่ละเซลล์จะมีการสร้าง Mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (Actin) อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้น เซลล์จะหลั่งแอกกลูตินิน (Agglutinin) ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีนเพื่อกระตุ้นการจับกันของแฟลกเจลลาระหว่างเซลล์ที่มี Mating type ตรงข้ามกัน จากนั้นเซลล์ทั้งสองจะรวมตัวกันกลายเป็นเซลล์เดียวที่มีแฟลกเจลลา 4 สาย เมื่อแฟลกเจลลาสลายไป เซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่มีความหนาเป็นพิเศษเพื่อปกป้องไซโกตซึ่งอยู่ในรูปดิพลอยด์ (2n) เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม ไซโกตจะแบ่งเซลล์ไมโอซิสเกิดเป็นเซลล์แฮพลอยด์ 4 เซลล์ ซึ่งแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสต่อไป (Harris, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 วัฏจักรชีวิตของ *Chlamydomonas*

ที่มา: อัญชลี, 2554

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่มี Mating type เป็น – และเป็นสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมที่แยกได้จากเมือง Amherst รัฐ Massachusetts ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1945 โดย G. M. Smith (Pröschold และคณะ, 2005)

2.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่าย

การกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิตอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหมายถึง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน รูปร่าง หรือจำนวนโครโมโซม การกลายพันธุ์จึงเป็นตัวกลางสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและมีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มความแปรปรวนของสาหร่าย เป็นการเพิ่มความสำเร็จในการคัดเลือกสาหร่ายให้ได้ลักษณะตามความต้องการ (นพพร, 2543) การชักนำหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถทำได้โดยอาศัยสิ่งก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.5.1 สารก่อกลายพันธุ์ทางเคมี

สารก่อกลายพันทางเคมี (Chemical mutagen) มีคุณสมบัติทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ สารเคมีที่ใช้ก่อกลายพันธุ์ที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ สารเคมี เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate) สารเคมีชนิดนี้ไวต่อการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่เบสพิวรีน (Purine) เบสไพริมิดีน (Pyrimidine) รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยานี้เรียกว่า อัลคิลเลชัน (Alkylation) หรือปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยหมู่อัลคิล ปฏิกิริยาอัลคิลเลชันเป็นปฏิกิริยาที่ไฮโดรเจนของเบนซีนถูกแทนที่ด้วยหมู่ของอัลคิลเฮไลด์ ปฏิกิริยาอัลคิลเลชันจะเกิดมากที่สุดที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน (Guanine) ทำให้ได้เป็น 7-alkyl guanine หรือ 7-alkylated guanine ปฏิกิริยาอัลคิลเลชันนี้จะเกิดขึ้นได้ต้องมีกรดลิวอิสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้ทำปฏิกิริยากับหมู่ของอัลคิลเฮไลด์ ทำให้ได้เป็นคาร์โบเนียมไอออน ทั้งนี้การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์จะมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดเองตามธรรมชาติและมีลักษณะแปลกใหม่ที่ไม่พบในธรรมชาติ แต่ข้อควรระวังคือสาร EMS ที่นอกจากจะเป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์แล้ว ยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย จึงควรต้องมีความระมัดระวังในการดำเนินการกลายพันธุ์และไม่สัมผัส EMS โดยตรง และไม่หายใจเอาสารนี้เข้าไป (พีรนุช, 2553)

2.5.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ

สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (Physical mutagen) ได้แก่ รังสีต่างๆ เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet radiation) รังสีแกมมา (Gamma radiation) เป็นต้น ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นรังสีที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นวิธีการกลายพันธุ์ที่ทำได้ง่าย สะดวก และมีประสิทธิภาพสูง การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวเกิดจากการที่ดีเอ็นเอของสาหร่ายดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ช่วงความยาวคลื่น 254-260 นาโนเมตร พลังงานที่ดูดซับไว้นี้ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเบสพิวรีนและไพริมิดีน แต่จะพบได้มากในเบสไพริมิดีน โดยเฉพาะไทมีน (Thymine) มีผลทำให้เบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันจับตัวกันเกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ ส่งผลให้เบสไทมีนไม่สามารถจับกับคู่เบสอะดีนีนบนสายพอลินิวคลีโอไทด์ได้ ด้วยเหตุนี้กระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอจึงถูกขัดขวาง และทำให้รหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ข้อเสียของการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตคือ สารพันธุกรรมสามารถทำให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ (มาลินี, 2551)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ponnikorn (2005) เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina platensis* ในอาหารเหลว Zarrouk's medium จนได้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้น นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเพาะเลี้ยงและนำไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นระยะเวลา 0, 5, 9, 12 และ 15 นาที โดยให้ระยะห่างระหว่างสารละลายเซลล์กับแหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตเท่ากับ 60 เซนติเมตร. จากนั้น นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร มา spread บนอาหารแข็ง ซึ่งแต่ละการทดลองมี 3 ซ้ำ นำสาหร่ายแต่ละชุดไปเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงและสภาวะที่ไม่ได้รับแสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสุ่มเลือกเส้นสาย (Filament) ในแต่ละชุดการทดลองไปเลี้ยงต่อในอาหารที่เติมสาร Ethionine ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีชุดทดลองชุดละ 6 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉพาะชุดการทดลองที่เลี้ยงภายใต้แสงสาหร่ายสามารถเจริญในอาหารดังกล่าว จำนวน 1, 3 และ 4 หลอด ภายหลังการรับแสงอัลตราไวเลตเป็นระยะเวลา 5, 12 และ 15 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในหลอดอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของ Ethionine เป็น 7, 9 และ 11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลตเป็นระยะเวลา 12 และ 15 นาที ยังเจริญในอาหารนี้ได้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาหร่ายสายพันธุ์กลายที่สามารถต้านทานต่อสาร Ethionine ได้

Tinpranee และคณะ (2016) ทำการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้จากอ่าวไทยและทะเลอันดามันที่ผลิตไฮโดรเจนได้สูงพบว่าสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในสภาวะที่มีแสงและสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เร็วในอาหาร Tris Acetate Phosphate (TAP) และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ที่บ่มในอาหาร TAP ปกติประมาณ 20 เท่า ในสภาวะที่เซลล์ขาดแหล่งไนโตรเจน เซลล์สามารถนำผลิตภัณฑ์และพลังงานจากการสังเคราะห์แสงมาทำการผลิตและสะสมสารประกอบประเภทคาร์โบไฮดรต เช่น แป้ง ฯลฯ ซึ่งเซลล์จะนำคาร์โบไฮเดรตที่สะสมมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

Tatyana และคณะ (2005) รายงานว่า การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหารที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตาม ความเข้มแสงที่สูงขึ้นมีผลทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง ปริมาตรสูงสุดของไฮโดรเจนที่ผลิตได้คือ 380 มิลลิลิตรไฮโดรเจน ในช่วง 23 วันและอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 45 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อวัน

Benoit และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในอาหาร Tris Acetate Phosphate (TAP) ที่มีอะซีเตทความเข้มข้น 17 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เซลล์สามารถดูดซึมสารอินทรีย์ หรืออะซีเตทไปใช้ในการเจริญและสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสารอนินทรีย์ เนื่องจากอะซีเตทเป็นสารที่สลายตัวและสามารถให้พลังงานสูงแก่เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในโครงงานพิเศษมีทั้งหมด 2 ชนิด ดังนี้

1) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สายพันธุ์ LSD-W2 โดยมีแหล่งที่มาจากน้ำทะเลหาดแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี (Tinpranee และคณะ, 2016)

2) สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ CC-124 โดยได้ซื้อมาจาก *Chlamydomonas* Resource Center ประเทศสหรัฐอเมริกา (Pröschold และคณะ, 2005)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

อาหารสูตร Tris acetate phosphate (TAP) (ภาคผนวก ก) (Harris, 2001)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) กรดบอริก (H_3BO_3) (Carlo Erba Reagents, Italy)
2) กลาเชียลอะซีติกแอซิด (Glacial acetic acid, $C_2H_4O_2$) (EDM Millipore, Germany)
3) โคบอลท์ (II) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka Chemical Corp., USA)
4) แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
5) คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (J.T.Baker, USA)
6) คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
7) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
8) ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka Chemical Corp., USA)
9) โซเดียมอะซีเตท ($C_2H_3O_2Na$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
10) โซเดียมโมลิปเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)
11) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax Finechem, New Zealand)
12) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)
13) ทริสเบส (Tris-base) (Vivantis Ltd., UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba Reagents, Italy)

15) แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

16) แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

17) แมงกานีส(II)คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

18) อะการ์ (Agar) (BD Difco™ Agar, USA)

19) เอทธิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (BDH Prolabo Chemicals, UK)

20) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) (Carlo Erba Reagents, Italy)

21) ไอออน (III) คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) (BDH Prolabo Chemicals, UK)

22) ไอออน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Carlo Erba Reagents, Italy)

23) ไฮโดรคลอริก (HCl) (Ajax Finechem, New Zealand)

3.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

1) อะซีโตน (CH_3COCH_3) (Analytical grade) (Fisher Scientific, UK)

2) เมทานอล (CH_3OH) (Analytical grade, Scharlau, Spain)

3.2.4 ก๊าซมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1) ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาร์กอน (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Praxair, Thailand)

2) ก๊าซอาร์กอนความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Thonburiwattana Ltd., Thailand)

3.3 อุปกรณ์

1) กระดาษกรองใยแก้ว GF/C (Glass microfiber filter Grade GF/C) (diameter 47 mm) (Whatman, USA)
2) กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
3) ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (Vial)
4) เข็มฉีดก๊าซ (Scientific Glass Engineering, Australia)
5) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)
7) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490811, UK)
8) เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
9) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
10) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z38K, Germany)
11) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries Inc, Genies2, USA)
12) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
13) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
14) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV 50, Japan)
15) คิวเวตต์ควอตซ์ (Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)
16) ชุดตู้มืดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV Viewing Cabinet)
17) ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) (Labnet, USA)
18) จานเพาะเลี้ยง (Plate) (Pyrex, USA)
19) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
20) ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
21) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
22) โถดูดความชื้น (Desiccator)
23) ปิเปตทิป (Pipette tip) ขนาดต่างๆ
24) พาราฟิล์มขนาด M (Parafilm) (Bemis company, USA)
25) ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
26) หลอดเซ็นตริฟิวจ์ (Centrifuge Tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
27) หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวบนจานอาหารแข็ง TAP นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อสาหร่ายจากอาหารแข็ง TAP ที่เลี้ยงไว้มากระจายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์หัวเชื้อเริ่มต้นสาหร่ายสีเขียวโดยการถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์จากฟลาสก์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ แล้วนำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ในอาหาร TAP และกระจายเซลล์ในอาหาร TAP โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 นำสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 มิลลิลิตรไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.4.2 วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124

นำสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง ไปปรับความหนาแน่นของเซลล์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่จานอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร วางจานเพาะเชื้อในชุดตู้มืด โดยมีระยะห่างจากหลอดอัลตราไวโอเลต 10 เซ็นติเมตร จากนั้น เปิดฝาจานอาหารและกวนผสมตลอดเวลา ให้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 75 นาที เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ที่ผ่านการทดลองภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตรทุกๆ 15 นาที ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างเซลล์ในที่มืดที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการแยกเซลล์สาหร่ายให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Spread plate technique

3.4.3 วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลาย แบ่งเป็น 2 ระยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะที่ 1: การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายเพื่อผลิตมวลชีวภาพและการชักนำให้สะสมแป้ง

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์หัวเชื้อเริ่มต้นสาหร่ายสีเขียวที่มีอายุ 36 ชั่วโมง โดยการถ่ายโอนสารแขวนลอยเซลล์จากฟลาสก์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP, อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยจะทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ระยะที่ 2: การผลิตไฮโดรเจน

การหาปริมาณไฮโดรเจนทำได้โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายสีเขียวภายหลังการบ่มในอาหาร TAP, อาหาร TAP ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้แน่น ทำการฉีดก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเซลล์สาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้น นำก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (Head space) มาทำการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนดังแสดงในตารางที่ 3.1 และทำการคัดเลือกเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลายที่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph Thermal Conductivity Detector (GC-TCD))

พารามิเตอร์	สภาวะ
Column	Packed Column 2m ; Molecular sieve 5 ^{0}A 60/80 mesh
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Column temperature: 50 °C Detector temperature: 100 °C
Carrier gas	Argon Flow rate 20 ml/min (99.999% purity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 วิธีการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

นำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกมาศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตมวลชีวภาพในอาหาร TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายมาล้างเซลล์และกระจายเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และล้างและกระจายเซลล์ของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) อาหารที่ใช้ทดสอบมีการขาดแหล่งคาร์บอนหรือปราศจากการเติมกรดอะซีติก นำเซลล์ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบเดิมที่การเติมกรดอะซีติกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1.74, 17.4, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น ทำการพ่นก๊าซอาร์กอนเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำขวดที่มีเซลล์สาหร่ายไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 2, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้น นำก๊าซด้านบนมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และน้ำหนักแห้ง

3.4.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

1) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์จากเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2

ปิเปตเซลล์สาหร่ายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมเมทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Lee และ Shen (2004) ดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(4.0 \times A_{665}) + (25.5 \times A_{650})$ สมการที่ 3.1

2) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์จากเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124

ปิเปตเซลล์สาหร่ายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมอะซีโตน90 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไป ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้น นำหลอดไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงในสภาวะเดิม นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร และนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่าในรูปแบบใดๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Jeffrey และ Humphery (1975) ดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $11.93A_{664}-1.93A_{647}$ สมการที่ 3.2

ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $20.36A_{647}-5.50A_{664}$ สมการที่ 3.3

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ + ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี

3.4.6 วิธีการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์

ทำการอบกระดาษกรองใยแก้ว GF/C ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บกระดาษในโถดูดความชื้น (Desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักของกระดาษกรองด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ นำไปกรองตัวอย่างเซลล์สาหร่ายสีเขียว จากนั้น นำกระดาษกรองที่มีเซลล์สาหร่ายสีเขียวไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักเซลล์คงที่ และนำกระดาษกรองมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งเทียบกับกระดาษกรองที่ปราศจากเซลล์สาหร่ายสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

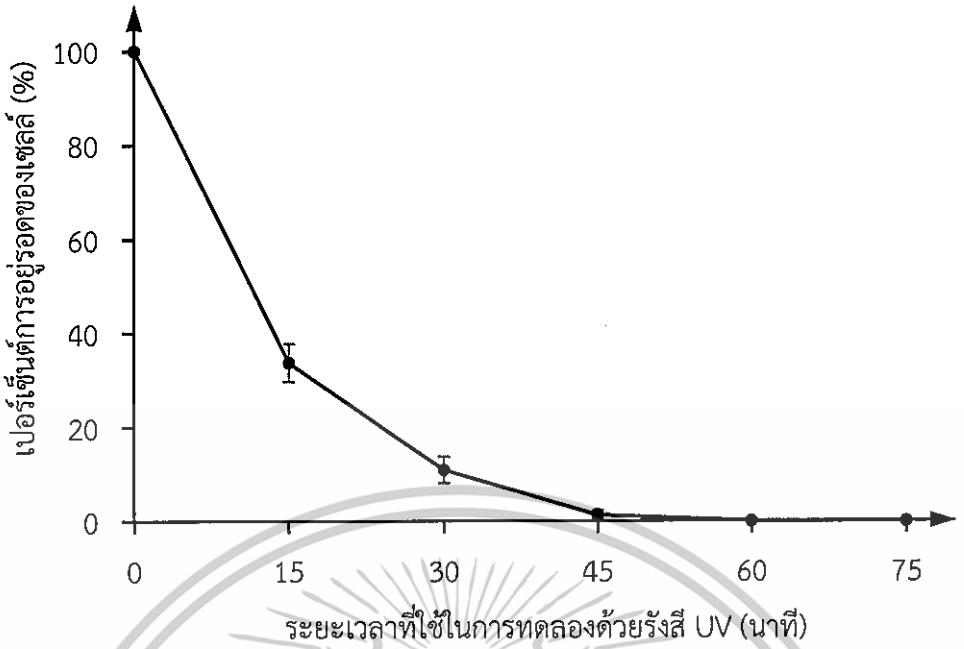
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124

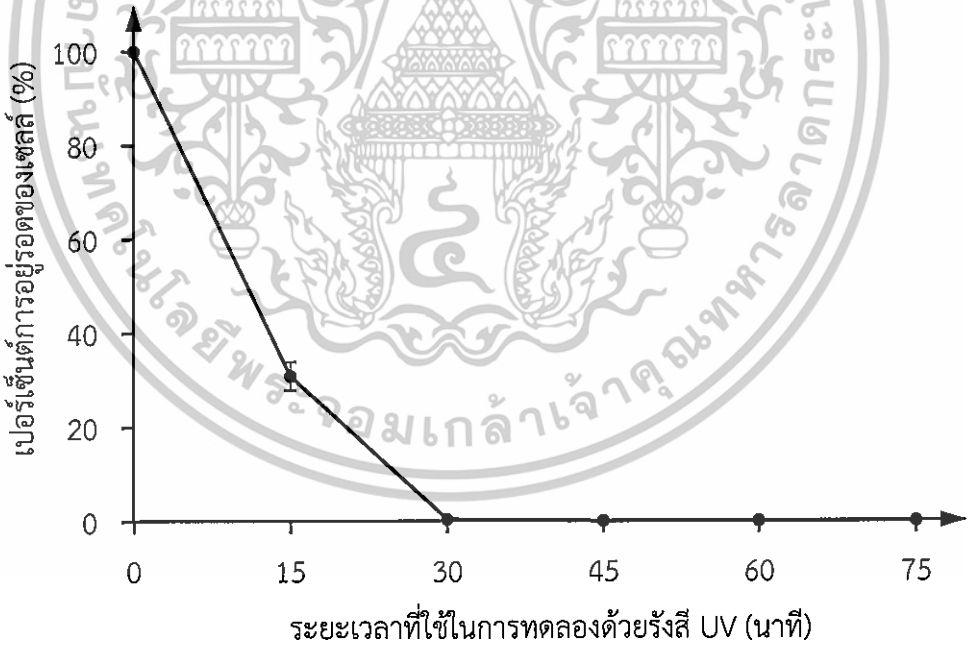
จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิมที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บหลอดในที่มืดที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Spread plate เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ให้อยู่ประมาณ 0.1-5.0 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตกับเซลล์สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิด เป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิด ลดลงอย่างเห็นได้ชัด จนกระทั่งได้ค่าเป็นศูนย์ จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 โดยพบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 38 นาที (รูปที่ 4.1) ในขณะที่สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 28 นาที (รูปที่ 4.2)

จากการทดลองพบว่า การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของบริเวณเบสในดีเอ็นเอของเซลล์ และส่งผลทำให้เกิดการตายได้ในเซลล์สาหร่าย โดยการฉายรังสีในระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้สาหร่ายสีเขียวทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการตายเพิ่มขึ้น และอัตราการอยู่รอดลดลง นอกจากนี้ ยังพบว่า สาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิดตอบสนองต่อรังสีอัลตราไวโอเลตแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ โดยสาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2 สามารถอยู่รอดและมีชีวิตภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตได้ดีกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 จากการนำเซลล์สาหร่ายมาทำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 จากการนำเซลล์สาหร่ายมาทำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นระยะเวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 มาทำการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 38 นาที และ 28 นาที ตามลำดับ (ทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์) พบว่า ได้เซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์กลาย จำนวน 18 ไอโซเลท และ *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลาย จำนวน 4 ไอโซเลท จากนั้น นำสาหร่ายสายพันธุ์กลายทั้งหมดมาศึกษาศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยบ่มเซลล์ในอาหาร TAP, อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ภายหลังการพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน 10 นาที และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงพบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2 ทุกไอโซเลท รวมทั้งสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิมที่บ่มในอาหาร TAP-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์ไอโซเลทเดียวกับที่บ่มในอาหาร TAP และ TAP-S (ตารางที่ 4.1) ในบรรดาสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์กลาย สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด เมื่อทำการบ่มเซลล์ในอาหารทั้ง 3 ชนิด (TAP, TAP-N และ TAP-S) (ตารางที่ 4.1) เมื่อพิจารณาชนิดของอาหารพบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 ที่บ่มในอาหาร TAP-N มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 19.825±1.346 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP และ TAP-S ถึง 5 และ 3 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากการขาดแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้กิจกรรมของระบบแสงสองลดลง ทำให้มีออกซิเจนลดลง เมื่อออกซิเจนลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้เต็มที่ และไปเพิ่มกิจกรรมของการผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (He และคณะ, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่บ่มในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายหลังการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจน (mL L^{-1} h^{-1})		
	TAP	TAP-N	TAP-S
สายพันธุ์ดั้งเดิม			
LSD-W2	3.135±0.227 ^{d}	7.535±0.635^{k}	1.237±1.031^{i}
สายพันธุ์กลาย			
LSD-W2M1	0.226±0.021^{m}	9.280±0.741^{h}	0.089±0.018^{p}
LSD-W2M2	0.113±0.019^{o}	8.680±0.834^{j}	0.419±0.020^{o}
LSD-W2M3	0.156±0.018^{n}	7.170±0.529^{l}	0.830±0.035^{k,l}
LSD-W2M4	0.303±0.035^{l}	12.966±1.045^{e}	0.787±0.007^{l,m}
LSD-W2M5	0.416±0.035^{k}	8.924±0.828^{i}	0.947±0.043^{j}
LSD-W2M6	0.417±0.022^{k}	6.466±0.646^{n}	0.554±0.011^{n}
LSD-W2M7	0.092±0.023^{o}	2.529±0.218^{q}	0.376±0.040^{o}
LSD-W2M8	3.786±0.318^{a}	19.825±1.346^{a}	6.654±0.646^{a}
LSD-W2M9	2.477±0.218 ^{f}	4.277±0.424^{o}	0.867±0.022^{k}
LSD-W2M10	2.652±0.214 ^{e}	3.940±0.311^{p}	0.740±0.075^{m}
LSD-W2M11	3.334±0.320^{b}	15.804±1.524^{b}	6.055±0.626^{b}
LSD-W2M12	1.922±0.128 ^{i}	4.263±0.413^{o}	1.699±1.028^{g}
LSD-W2M13	3.265±0.222^{c}	7.004±0.707^{m}	0.779±0.034^{l,m}
LSD-W2M14	1.858±0.137^{j}	13.407±1.338^{d}	4.664±0.434^{e}
LSD-W2M15	0.274±0.034^{l}	12.095±1.038^{f}	4.904±0.446^{d}
LSD-W2M16	0.281±0.037^{l}	13.938±1.242^{c}	5.065±0.532^{c}
LSD-W2M17	2.427±0.220 ^{g}	9.551±0.841^{g}	4.436±0.442^{f}
LSD-W2M18	2.299±0.225 ^{h}	6.476±0.727^{n}	1.556±0.118^{h}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 นั้น พบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ทุกสายพันธุ์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มในอาหาร TAP-S แต่มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง เมื่อบ่มในอาหาร TAP-N แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวแต่ละชนิดมีเมแทบอลิซึมของการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันในการตอบสนองต่อการขาดแหล่งอาหารต่างๆ ในบรรดาไอโซเลทของสายพันธุ์กลายทั้งหมดพบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124M4 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 17.120±1.630 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อบ่มในอาหาร TAP-S ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับอัตราการผลิตไฮโดรเจนเมื่อบ่มในอาหาร TAP ที่เซลล์มีอัตราการผลิต 17.053±1.635 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากการขาดแหล่งซัลเฟอร์ส่งผลให้ระบบแสงสองทำงานลดลง การแตกตัวของน้ำลดลง ออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการแตกตัวของน้ำถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจมากกว่า ทำให้สภาวะของระบบภายในเซลล์เข้าสู่สภาวะที่ปราศจากอากาศได้รวดเร็ว เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกมากขึ้น มีกิจกรรมสูงขึ้น สาหร่ายจึงผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Hidehiro และคณะ, 2013)

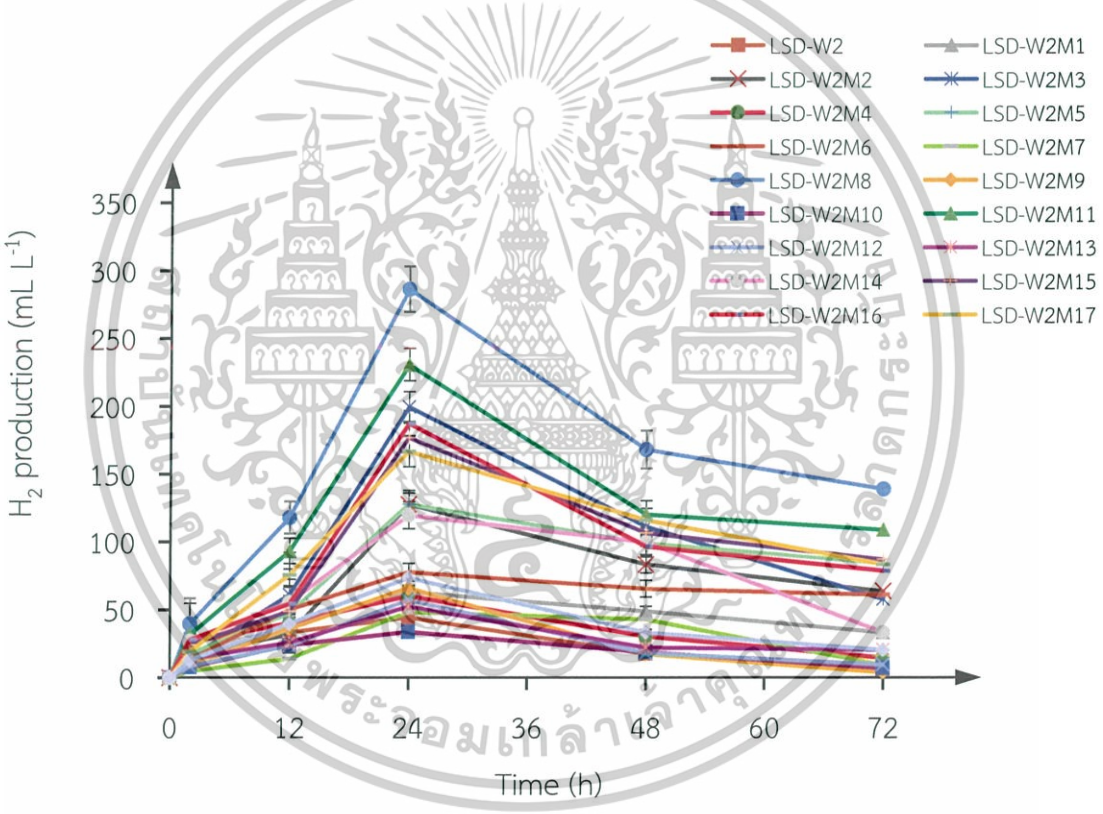
ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ที่บ่มในอาหาร TAP อาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายหลังการให้ก๊าซอาร์กอนและบ่มภายต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สายพันธุ์	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ($mL\ L^{-1}\ h^{-1}$)		
	TAP	TAP-N	TAP-S
สายพันธุ์ดั้งเดิม			
CC-124	11.104±1.041^{d}	5.720±0.533^{d}	12.071±1.141^{d}
สายพันธุ์กลาย			
CC-124M1	14.444±1.344^{b}	11.473±1.130^{b}	14.862±1.317^{b}
CC-124M2	8.217±0.831^{e}	4.958±0.430^{e}	10.563±1.041^{e}
CC-124M3	13.736±1.243^{c}	10.604±1.030^{c}	14.416±1.327^{c}
CC-124M4	17.053±1.635^{a}	11.695±1.141^{a}	17.120±1.630^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

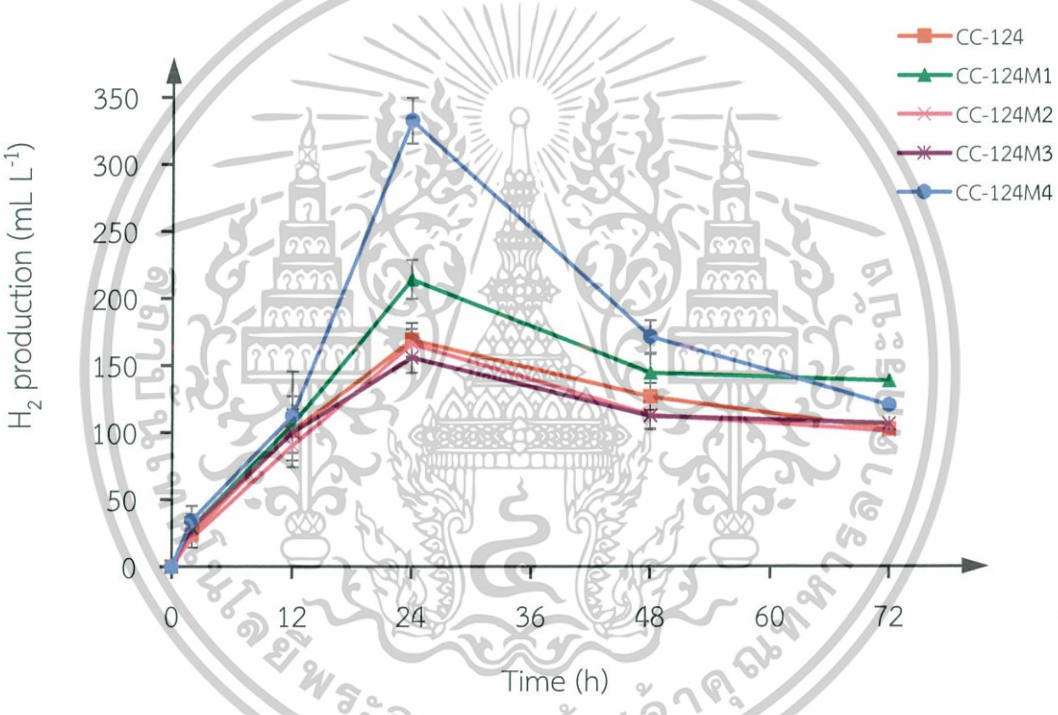
จากการนำสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจำนวน 18 ไอโซเลท ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนภายหลังการบ่มในสภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 โดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 286 มิลลิลิตรต่อลิตร รองลงมาคือสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M11 ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 230 มิลลิลิตรต่อลิตร ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิม *Chlorella* sp. LSD-W2 มีการผลิตไฮโดรเจนเพียง 44 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.3) ดังนั้น จึงคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. LSD-W2M8 และ *Chlorella* sp. LSD-W2M11 ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



รูปที่ 4.3 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของการบ่มสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจำนวน 18 ไอโซเลท ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจำนวน 4 ไอโซเลท ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) มาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนภายหลังการบ่มภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 โดยสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ 332 มิลลิลิตรต่อลิตร รองลงมาคือสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M1 ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 214 มิลลิลิตรต่อลิตร ในขณะที่สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ดั้งเดิม *C. reinhardtii* CC-124 มีการผลิตไฮโดรเจนเพียง 168 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.4) ดังนั้น จึงคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *C. reinhardtii* CC-124M4 และ *C. reinhardtii* CC-124M1 ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป



รูปที่ 4.4 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของการบ่มสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจำนวน 4 ไอโซเลท ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย จำนวน 18 ไอโซเลท ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย จำนวน 4 ไอโซเลท ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นภายใต้การขาดไนโตรเจน โดยมีรายงานพบว่า การขาดแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* เกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอน ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองลดลง ทำให้ออกซิเจนลดลง เมื่อออกซิเจนลดลงเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงสามารถทำงานได้เต็มที่ และทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (Ling และคณะ, 2015) และพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมมีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นภายใต้การขาดซัลเฟอร์ โดยมีรายงานพบว่า การขาดแหล่งซัลเฟอร์ส่งผลให้ระบบแสงสองของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพ และมีการแตกตัวของน้ำลดลง ซึ่งจะทำให้ออกซิเจนภายในเซลล์ลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น (Dennis D. Wykoff และคณะ, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลาย

จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์กลายที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. LSD-W2M8 และ *Chlorella* sp. LSD-W2M11 และสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลายที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *C. reinhardtii* CC-124M1 และ *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 0, 1.74, 17.4, 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ โดยมีอาหาร TAP ที่มีไนโตรเจนและซัลเฟอร์ปกติที่มีกรดอะซีติกเข้มข้น 17.4 มิลลิโมลาร์เป็นอาหารควบคุม ภายใต้สภาวะการบ่มเซลล์ที่ปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 21.855 ± 1.844 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-N ที่ความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ หรือ 5.0 เท่าของความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่ใช้ในสูตรอาหาร TAP ปกติ แต่การผลิตไฮโดรเจนจะลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติกเป็น 174 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 4.3) สำหรับสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4 มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 62.376 ± 2.533 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP-S ที่ความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ หรือ 1.0 เท่าของความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่ใช้ในสูตรอาหาร TAP ปกติ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติกเป็น 87 และ 174 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย LSD-W2M8 และ LSD-W2M11 ที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ชนิดอาหาร	ความเข้มข้นของกรดอะซีติก	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ($mLH_2\ L^{-1}{\cdot}h^{-1}$)
LSD-W2	TAP	17.4 mM	3.867 ± 0.312^{c}
	TAP-N	0 mM	2.658 ± 0.220^{e}
	TAP-N	1.74 mM	2.730 ± 0.414^{e}
	TAP-N	17.4 mM	3.330 ± 0.285^{d}
	TAP-N	87 mM	13.518 ± 1.225^{a}
	TAP-N	174 mM	8.562 ± 0.824^{b}
LSD-W2M8	TAP	17.4 mM	11.892 ± 1.114^{c}
	TAP-N	0 mM	4.710 ± 0.423^{e}
	TAP-N	1.74 mM	10.797 ± 0.797^{cd}
	TAP-N	17.4 mM	9.924 ± 0.883^{d}
	TAP-N	87 mM	21.855 ± 1.844^{a}
	TAP-N	174 mM	14.526 ± 1.351^{b}
LSD-W2M11	TAP	17.4 mM	4.872 ± 0.403^{d}
	TAP-N	0 mM	2.436 ± 0.254^{f}
	TAP-N	1.74 mM	3.960 ± 0.210^{e}
	TAP-N	17.4 mM	7.770 ± 0.770^{c}
	TAP-N	87 mM	21.597 ± 1.809^{a}
	TAP-N	174 mM	12.966 ± 1.178^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

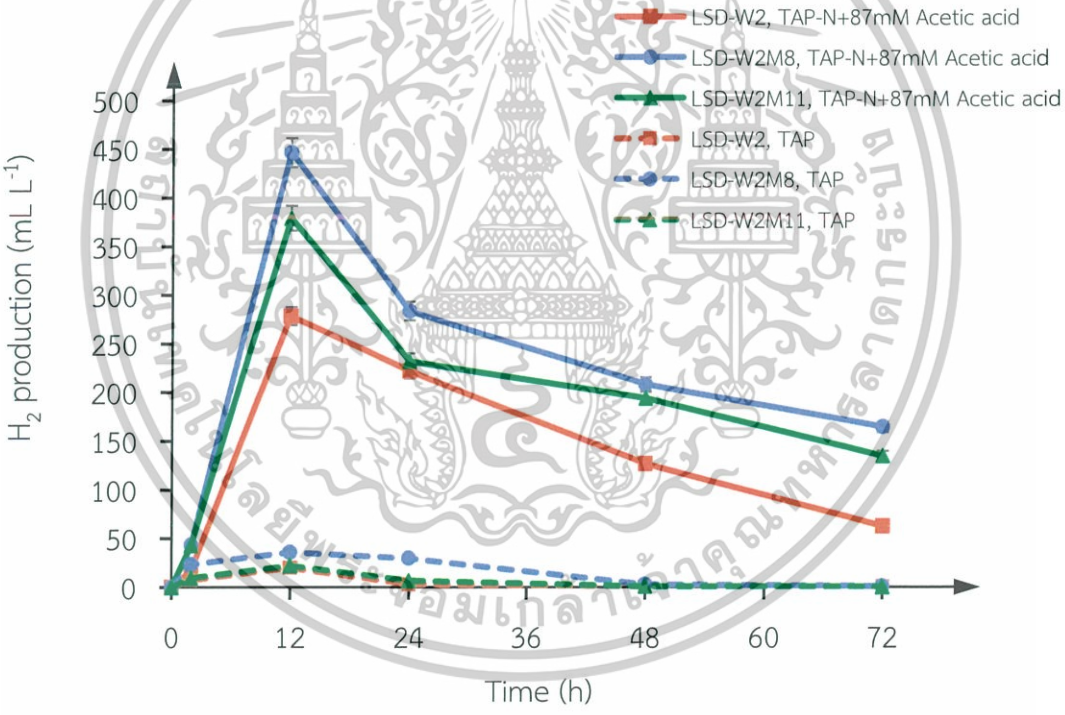
ตารางที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย CC-124M1 และ CC-124M4 ที่บ่มในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่แปรผันความเข้มข้นของกรดอะซีติก ภายใต้สภาวะปราศจากอากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ชนิดอาหาร	ความเข้มข้นของกรดอะซีติก	อัตราการผลิตไฮโดรเจน ($mLH_2\ L^{-1}{\cdot}h^{-1}$)
CC-124	TAP	17.4 mM	14.654 ± 1.244^{b}
	TAP-S	0 mM	4.182 ± 0.322^{e}
	TAP-S	1.74 mM	6.402 ± 0.636^{d}
	TAP-S	17.4 mM	23.424 ± 1.412^{a}
	TAP-S	87 mM	12.642 ± 1.009^{c}
	TAP-S	174 mM	2.313 ± 0.214^{f}
CC-124M1	TAP	17.4 mM	15.456 ± 1.414^{b}
	TAP-S	0 mM	10.332 ± 1.019^{e}
	TAP-S	1.74 mM	14.409 ± 1.236^{c}
	TAP-S	17.4 mM	32.151 ± 2.024^{a}
	TAP-S	87 mM	14.265 ± 1.037^{d}
	TAP-S	174 mM	2.760 ± 0.216^{f}
CC-124M4	TAP	17.4 mM	15.130 ± 1.320^{c}
	TAP-S	0 mM	14.721 ± 1.239^{e}
	TAP-S	1.74 mM	25.278 ± 2.036^{b}
	TAP-S	17.4 mM	62.376 ± 2.533^{a}
	TAP-S	87 mM	21.042 ± 2.041^{d}
	TAP-S	174 mM	4.017 ± 0.345^{f}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจน

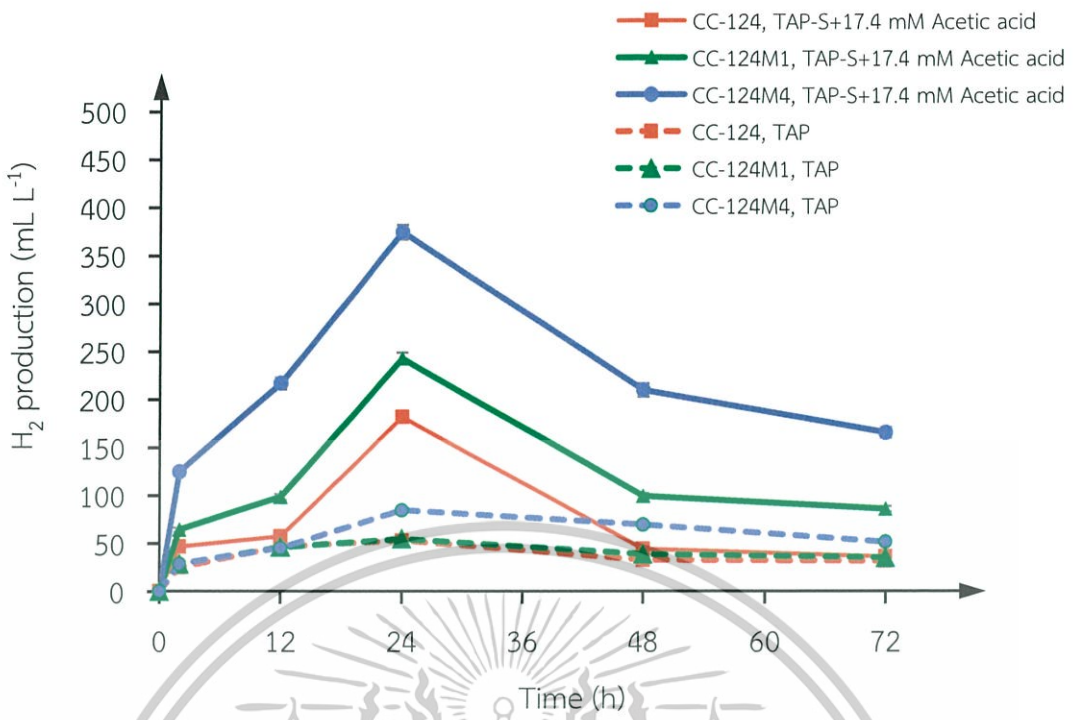
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย LSD-W2M8 และ LSD-W2M11 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ พบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp LSD-W2M8 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 446 มิลลิลิตรต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและการผลิตไฮโดรเจนจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (รูปที่ 4.5) และจากการวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย CC-124M1 และ CC-124M4 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ พบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 374 มิลลิลิตรต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการบ่มภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศและเมื่อเวลาผ่านไปการผลิตไฮโดรเจนจะลดลง (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย LSD-W2M8 และ LSD-W2M11 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การผลิตไฮโดรเจนที่ช่วงเวลาต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย CC-124M1 และ CC-124M4 ในอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ

จากการศึกษาผลผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายจำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Chlorella* sp. LSD-W2M8 และ *Chlorella* sp. LSD-W2M11 ที่บ่มในอาหาร TAP ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีความเข้มข้นกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในทุกหน่วยของการวิเคราะห์ (ตารางที่ 4.5) และผลผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M1 และ *C. reinhardtii* CC-124M4 ที่บ่มในอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่มีความเข้มข้นกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4 มีผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในทุกหน่วยการวิเคราะห์ (ตารางที่ 4.6)

การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซีติกทำให้สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2 และ *C. reinhardtii* CC-124 ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น เนื่องจากกรดอะซีติกมีผลต่อกิจกรรมของระบบแสงสองทำให้รับพลังงานแสงได้มากขึ้น เมื่อมีแหล่งอิเล็กตรอนมากขึ้นจะทำให้มีการผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น ดังนั้น ความเข้มข้นของกรดอะซีติกซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหรือสับสเตรทที่สำคัญมากต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว (Benoit และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยต่างๆ และเวลาที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม LSD-W2 และสายพันธุ์กลาย LSD-W2M8 และ LSD-W2M11 ที่บ่มในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์

สายพันธุ์	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด			อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	mL L^{-1}	μmolH_2 mg^{-1}chl	μmolH_2 mg^{-1}DW	mL L^{-1} h^{-1}	μmolH_2 mg^{-1}chl h^{-1}	μmolH_2 mg^{-1}DW h^{-1}
LSD-W2	278.529±2.780^{c} (12 h)	130.395±1.037^{c} (12 h)	5.181±0.201^{c} (12 h)	23.211±0.237^{c} (12 h)	10.866±0.086^{c} (12 h)	0.432±0.017^{c} (12 h)
LSD-W2M8	446.919±4.080^{a} (12 h)	251.820±2.345^{a} (12 h)	7.002±0.461^{a} (12 h)	37.242±0.347^{a} (12 h)	20.985±0.194^{a} (12 h)	0.582±0.038^{a} (12 h)
LSD-W2M11	379.446±3.035^{b} (12 h)	210.588±2.019^{b} (12 h)	6.642±0.311^{b} (12 h)	31.620±0.253^{b} (12 h)	17.550±0.168^{b} (12 h)	0.555±0.026^{b} (12 h)

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจนหรือผลผลิตไฮโดรเจน

ตารางที่ 4.6 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในหน่วยต่างๆ และเวลาที่ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดั้งเดิม CC-124 และสายพันธุ์กลาย CC-124M1 และ CC-124M4 ที่บ่มในอาหาร TAP ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) ที่มีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์

สายพันธุ์	การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด			อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด		
	mL L^{-1}	μmolH_2 mg^{-1}chl	μmolH_2 mg^{-1}DW	mL L^{-1} h^{-1}	μmolH_2 mg^{-1}chl h^{-1}	μmolH_2 mg^{-1}DW h^{-1}
CC-124	182.217±1.455^{c} (24 h)	63.561±0.619^{c} (24 h)	3.969±0.331^{c} (24 h)	14.654±0.144^{c} (2 h)	5.112±0.045^{c} (2 h)	0.320±0.006^{c} (2 h)
CC-124M1	243.174±2.599^{b} (24 h)	139.167±1.257^{b} (24 h)	5.049±0.452^{b} (24 h)	32.151±0.324^{b} (2 h)	18.399±0.114^{b} (2 h)	0.669±0.018^{b} (2 h)
CC-124M4	374.757±3.198^{a} (24 h)	401.064±4.105^{a} (24 h)	8.364±0.612^{a} (24 h)	62.376±0.633^{a} (2 h)	98.184±1.140^{a} (2 h)	1.392±0.150^{a} (2 h)

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตไฮโดรเจนหรือผลผลิตไฮโดรเจน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายสีเขียวพบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 มีอัตราการอยู่รอดของเซลล์สูงกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 โดยพบสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. LSD-W2 สายพันธุ์กลาย จำนวนทั้งหมด 18 ไอโซเลท และสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สายพันธุ์กลาย จำนวน 4 ไอโซเลท

2) จากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 และ *Chlorella* sp. LSD-W2M11 มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M1 และ *C. reinhardtii* CC-124M4 มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์

3) จากการศึกษาความเข้มข้นของกรดอะซีติกที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่า สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 และ *Chlorella* sp. LSD-W2M11 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (TAP-N) และมีความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 87 มิลลิโมลาร์ ส่วนสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M1 และ *C. reinhardtii* CC-124M4 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ในอาหาร TAP ที่ปราศจากแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S) และความเข้มข้นของกรดอะซีติกเท่ากับ 17.4 มิลลิโมลาร์

4) สาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด คือ 446.919 ± 4.080 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม 1.60 เท่า ส่วนสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *C. reinhardtii* CC-124M4 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด คือ 374.757 ± 3.198 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม 2.06 เท่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์กลาย *Chlorella* sp. LSD-W2M8 และ *C. reinhardtii* CC-124M4 เพิ่มเติม เช่น การผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะที่มีอากาศโดยไม่มีการพ่นไล่อากาศด้วยก๊าซอาร์กอน, พีเอชของอาหาร และอุณหภูมิของการบ่ม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธรรมนูญ ศรีทะวงศ์. 2550. **พลังงานไฮโดรเจน.** [Online]. Available: http://www.kmitnbxmie8.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=568260&Ntype=3. เข้าถึงเมื่อวันที่ 16 พ.ย. 2560.

นพพร สายมพล. 2543. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พีรนุช จอมพุก. 2553. **เทคโนโลยีนิวเคลียร์กับการเกษตร.** ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มาลินี สิงโตทอง. 2551. การกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 เพื่อเพิ่มการสร้างไนซิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิสัย วงศสายปน. 2534. สาหร่ายเซลล์เดียว สารอาหารจากแสงตะวัน. กรุงเทพฯ:รวมทรรศ. 137 หนา

วิทวัส แจ้งเอี่ยม. 2553. **กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย.** วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 13, ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน 2553.

อัญชลี ศิริขจรกิจ. 2554. **สาหร่ายสีเขียวแคลมิโดโมแนส (*Chlamydomonas reinhardtii*) กับงานวิจัยทางพันธุศาสตร์.** Thai Journal of Genetics. 4(1):9-21.

อิศกฤตา โลหพรหม. 2557. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

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

Benoit D., Jeremy P., Gwendoline C., Jean Francois C., Guillaume C., Jack L. 2010. "Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii.*" *International Journal of Hydrogen Energy.* 35:10741-10749.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dabrock B., Bahl H., Gottschalk G. 1992. "Parameter affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum.*" *Applied and Environmental Microbiology.* 54:1233-1239.

Dennis D. Wykoff, John P. Davies, Anastasios Melis, Arthur R. Grossman. 1998. "The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii.*" *Journal of Plant Physiology.* 117:129–139.

Fang, H.H.P., Liu, H., Zhang, T. 2005. "Phototropic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater." *International Journal of Hydrogen Energy.* 30:785-793.

Fay, P. 1992. "Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria." *Microbiological Reviews.* 56:340-373.

Greenbaum, E. 1990. "Hydrogen production by photosynthetic water splitting." In: Veziroglu TN, Takashashi PK, editors. Hydrogen energy progress VIII. Proceedings 8th WHEC. Hawaii, New York. 743-745.

Harris, E.H. 2001. "*Chlamydomonas* as a model organism." *Plant Physiology.* 52:363-406.

Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I. 2002. "Sustainable fermentative hydrogen production:challenges for process optimisation." *International Journal of Hydrogen Energy.* 27:1339-1347.

He, M.L., L. Li, L. Zhang, J.G. Liu. 2012. "The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy.* 37:4046-4056.

Hidehiro S., Hajime M., Masaharu K., Kazuhito I. 2013. "Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its peactical application." *Journal of Photochemistry and Photobiology.* C: Photochemistry Reviews. 17:1-25.

Jeffrey, S.W., Humphery, G.F. 1975. "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a1, b1, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton." *Biochemistry Physiology.* 167:191-194.

Lee YK, Shen H. (2004). "Basic culturing techniques." In : Richmond, A. [Eds], Handbook of microalgal culture. IS Press. p40-50

Levin, D.B., Pitt, L., Love, M. 2004. "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application." *International Journal of Hydrogen Energy.* 29:173-185.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ling Li, Litao Zhang, jianuo Liu. 2015. "The enhancement of hydrogen photoproduction in marine *Chlorella pyrenoidosa* under nitrogen deprivation." *International Journal of Hydrogen Energy.* 40:14784-14789.

Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., Sumathy, K. 2006. "An overview of hydrogen production from biomass." *Fuel Processing Technology*. 87:46-472.

Ooshima, H., Takakuwa, S., Katsuda, T., Okuda, M., Shirasawa, T., Azuma, A., Kato, J. 1998. "Production of hydrogen by a hydrogenase-deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85:470-475.

Ponnikorn S. 2005. "Induced mutation in *Spirulina platensis* resistance to ethionine by UV." Thesis of Chiang Mai University, Faculty of Science. Department of Biology.

Posewitz, M.C., Dubini, A., Meuser, J.E., Seibert, M., Ghirardi, ML. 2009. "Hydrogenases, hydrogen production and anoxia." In Organellarand Metabolic Processes, edn 2. Edited by Stern DB. In The *Chlamydomonas* Sourcebook, Vol. 2. Edited by Harris EE. The *Chlamydomonas* Sourcebook. Vol. 2Academic Press. 217-246.

Pröschold, T., Harris E.H., Coleman A.W. 2005. "Portrait of a Species: *Chlamydomonas reinhardtii*." *Genetics.* 170:1601-1610.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, 528 p.

Tanisho S., Ishiwata Y. 1995. "Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks." *International Journal of Hydrogen Energy*. 20:541-545

Tatyana V. Laurinavichene, Alexander S. Fedorov, Maria L. Ghirardi, Michael Seibert, Anatoly A. Tsygankov. 2005. "Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells." *International Journal of Hydrogen Energy*. 31(5):659-667.

Tinpranee, N., Incharoensakdi A., Phunpruch, S. 2016. "Hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand." *KKU Research Journal*. 22(1):256-266.

Zhu H., Suzuki T., Tsyganlov AA., Asada Y., Miyake J. 1999. "Hydrogen production from to wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels." *International Journal of Hydrogen Energy*. 24:305-310.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP) (Harris, 2001)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

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

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

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

ส่วนประกอบ Buffer

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

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

(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ขาดแหล่งไนโตรเจน (TAP-N medium)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	2	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

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

ส่วนประกอบ Buffer

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

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

(ปรับพีเอช 7.2)

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ TAP ขาดแหล่งซัลเฟอร์ (TAP-S medium)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)	1	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2{\cdot}6H_2O$)	1.642	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution (500 มิลลิลิตร)

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

เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.486	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	1.04	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2{\cdot}4H_2O$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2{\cdot}2H_2O$)	0.0126	กรัม
โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$)	0.073	กรัม
โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.016	กรัม

ส่วนประกอบ Buffer

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

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

(ปรับพีเอช 7.2)

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน

2) นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร

3) นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาณไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล

4) นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง

5) นำปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมงที่ได้มาหารปริมาณคลอโรฟิลล์จะได้หน่วยเป็น ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้