

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว
เซลล์ตรึง *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

OPTIMUM CONDITION FOR HYDROGEN PRODUCTION
BY IMMOBILIZED GREEN ALGA
Chlamydomonas reinhardtii CC-124



ชลิตา ศรีเกตุสุข
นันทิชา เอกมณี
ปรีศนียา เรืองนุช

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMUM CONDITION FOR HYDROGEN PRODUCTION
BY IMMOBILIZED GREEN ALGA
Chlamydomonas reinhardtii CC-124



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2016

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์ตรึง
Chlamydomonas reinhardtii CC-124
Optimum condition for hydrogen production by immobilized
green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

ชื่อนักศึกษา

นางสาวชลิตา ศรีเกตสุข รหัสนักศึกษา 56050826
นางสาวนันธิชา เอกมณี รหัสนักศึกษา 56050851
นางสาวปรีศนียา เรืองนุช รหัสนักศึกษา 56050859

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

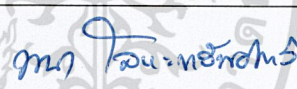
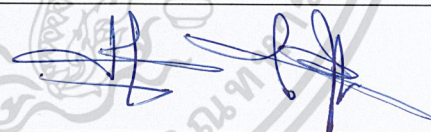

ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้สิทธิ์คณะวิทยาศาสตร์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเห็นโทษในเชิงนโยบายและต้องยึดถือของเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์ตรึง <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชลิตา	ศรีเกตุสุข	รหัสนักศึกษา 56050826
	นางสาวนันธิชา	เอกมณี	รหัสนักศึกษา 56050851
	นางสาวปรีศนียา	เรืองนุช	รหัสนักศึกษา 56050859
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์ฤกษ์		

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน ไฮโดรเจนจัดว่าเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจแห่งหนึ่ง ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากวิธีหมักแบบอลิซิมต่างๆ ในสาหร่ายสีเขียว การตรึงเซลล์ถือเป็นอีกเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 จากการทดลองพบว่า เซลล์ตรึงผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าเซลล์อิสระ โดยเซลล์สาหร่ายสีเขียวที่ตรึงในอะการภายใต้สภาวะการขาดซัลเฟอร์จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 70.02 ± 1.98 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงในวัสดุอื่นๆ การตรึงเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียวที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงในอะการสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด และความเข้มข้นของอะการที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตไฮโดรเจนคือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสุดท้ายขนาดของวัสดุตรึงไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงในอะการ

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน, การตรึงเซลล์, *Chlamydomonas reinhardtii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimum condition for hydrogen production by immobilized green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124		
Students	Miss Chalita	Sriketsuk	Student ID 56050826
	Miss Nanticha	Agmanee	Student ID 56050851
	Miss Pratsaneeya	Rueangnuch	Student ID 56050826
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Assist.Prof.Dr. Saranya Phunpruch		

Abstract

Nowadays, H₂ is one of interesting alternative energy carriers. H₂ can be produced by various metabolic pathways in green algae. The efficiency of H₂ production by green algae is increased by using cell immobilization technique. This work aimed to investigate optimum conditions for H₂ production by immobilized green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124. The result showed that the immobilized cells produced higher H₂ than the free cells. The agar-immobilized cells under sulfur deprivation produced the highest H₂ production rate with 70.02 ± 1.98 μmolH₂/mgchl/h compared to other types of immobilized cells. The agar-immobilized cells with 36 h ages produced the highest H₂ production. The optimum agar concentration for H₂ production by immobilized cells is 1.5 % (w/v). Finally, size of material support did not show any significant difference to H₂ production in agar-immobilized cells.

Keywords: Hydrogen production, Cell immobilization, *Chlamydomonas reinhardtii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงการพิเศษนี้ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้คำแนะนำ แนวคิด ตลอดจนการแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่างๆ และช่วยเหลือให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี พร้อมทั้งขอขอบคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการโครงการพิเศษและผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการโครงการพิเศษ ที่กรุณาสละเวลา ตรวจสอบและให้คำแนะนำต่างๆ แก่โครงการพิเศษนี้ จนสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ พี่นุ้ย พี่มิม ที่ปรึกษาของกลุ่มและรุ่นพี่ปริญญาโท-เอกที่ห้อง Molecular 407 ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำความรู้ในงานวิจัย ให้การช่วยเหลือดูแล และสอนเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองในโครงการพิเศษนี้ ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดี ให้เสมอมา ขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยให้ความร่วมมือและให้การช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ ทางคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ที่มีความสนใจศึกษาเรื่องการผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียว หรือนำไปประยุกต์ใช้ในด้านพลังงานทดแทน เพื่อให้ผู้ที่มีความสนใจนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไป

หากโครงการพิเศษฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำ ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ชลิตา	ศรีเกตุสุข
นันธิชา	เอกมณี
ปรัศนียา	เรืองนุช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ไฮโดรเจน	4
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	7
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมี	7
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการไฟฟ้าเคมี	11
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต	13
2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว	13
2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว	15
2.5 สาหร่ายสีเขียว	17
2.5.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียว	17
2.6 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	20
2.7 การตรึงเซลล์	22
2.7.1 ชนิดของการตรึงเซลล์	24
2.7.2 วัสดุตรึง	28
2.7.3 วิธีการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น	28
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น

ไม่ว่ากรณีใด 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำ

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	31
3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในโครงการพิเศษ	31
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	31
3.3 สารเคมี	31
3.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	31
3.3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์	32
3.3.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์	32
3.3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	32
3.4 อุปกรณ์	32
3.5 วิธีการทดลอง	33
3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124	33
3.5.2 วิธีการตรึงเซลล์	34
3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	35
3.5.4 วิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง	36
3.5.5 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด	36
3.5.6 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน	37
3.5.7 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน	37
3.5.8 วิธีการศึกษาผลของขนาดวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน	37
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	39
4.1 ผลของชนิดวัสดุตรึงและชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	39
4.2 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย สีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	42
4.3 ผลของความเข้มข้นวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย สีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ผลของขนาดวัสดุตั้งต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	47
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	55



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์หองค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์	36
4.1	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ และอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S)	41
4.2	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ที่มีอายุเซลล์ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร TAP-S	44
4.3	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นอะการ์ 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในอาหารเหลว TAP-S	46
4.4	ไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงที่มีขนาดวุ้นปริมาตร 0.016, 0.125, 0.422 และ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในอาหารเหลว TAP-S	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน	5
2.2 การปลดปล่อยคาร์บอนของการเผาไหม้ต่างๆ จากยานพาหนะที่ใช้การสันดาปภายในด้วยน้ำมันเบนซินเปรียบเทียบกับยานพาหนะที่ใช้เซลล์เชื้อเพลิงเป็นแหล่งของพลังงาน	6
2.3 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam Reforming)	9
2.4 กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันจากชีวมวล	11
2.5 กระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า	12
2.6 กลไกของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง	13
2.7 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	15
2.8 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น (Fe-hydrogenase) ในสาหร่ายสีเขียว	16
2.9 สาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21
2.10 ลักษณะและวงจรชีวิตของสาหร่ายสีเขียว <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	22
2.11 รูปแบบของทฤษฎีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ	27
4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ที่ชั่วโมง 24 ในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ และอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) เทียบกับเซลล์อิสระ	40
4.2 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่เวลาชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ (A) และอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) (B)	40
4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ที่มีอายุเซลล์ต่างๆ เมื่อป้อนในอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	43
4.4 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเวลาชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ที่มีอายุเซลล์ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ในอาหาร TAP-S	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารของ CC-124 ที่มีอายุเซลล์ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ในอาหาร TAP-S นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.5	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในวุ้นที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่ชั่วโมง 24 ในอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S)	45
4.6	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่เวลาชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงที่ ความเข้มข้นอะการ์ 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในอาหาร TAP-S	46
4.7	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงที่มีขนาดวุ้นปริมาตรต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ที่ชั่วโมง 24 ในอาหาร TAP-S	48
4.8	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงที่มีขนาดวุ้นปริมาตร 0.016, 0.125, 0.422 และ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรของสาหร่ายสีเขียว <i>C. reinhardtii</i> CC-124 ในอาหารเหลว TAP-S	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน ความต้องการพลังงานเพื่อใช้ในการชีวิตประจำวันเพิ่มขึ้นตลอดเวลา ตามจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น แต่พลังงานหลักที่ได้จากฟอสซิลกำลังจะหมดไปในอนาคต หากไม่สามารถหาพลังงานจากแหล่งพลังงานอื่นที่ยั่งยืนมาทดแทนได้ นอกจากนี้ การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลยังปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกและเป็นสาเหตุทำให้โลกร้อนขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในปัจจุบันและอนาคต ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงมีการหาพลังงานทางเลือกในรูปแบบอื่นๆ ที่เป็นพลังงานสะอาดมาทดแทน โดยพลังงานทางเลือกหนึ่งที่เป็นที่น่าสนใจ คือ พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน (Hydrogen, H_2) เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพและให้พลังงานสูง สะอาดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นความร้อนและไอน้ำเป็นผลพลอยได้เท่านั้น โดยความร้อนที่ได้สามารถนำไปใช้งานหรือแปรรูปเป็นพลังงานรูปแบบอื่นๆ เช่น พลังงานกล และพลังงานไฟฟ้า เพื่อใช้งานต่อไป การเผาไหม้ไฮโดรเจนแตกต่างกับการเผาไหม้เชื้อเพลิงอื่นๆ คือ การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลจะปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซหลักที่ก่อให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกและส่งผลกระทบต่อตรงทำให้เกิดภาวะโลกร้อน พลังงานไฮโดรเจนจึงถือเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากในอนาคต กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมจะนิยมใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ โดยผ่านกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming) กระบวนการออกซิเดชันบางส่วน (Partial oxidation) และกระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) ส่วนวิธีการผลิตไฮโดรเจนทางเคมีทำได้โดย การแยกสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis) แต่วิธีการดังกล่าวมีต้นทุนในการผลิตสูงและต้องใช้พลังงานมาก ดังนั้น การผลิตไฮโดรเจนโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะเป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยเมแทบอลิซึมในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

ไฮโดรเจนที่ผลิตจากวิธีทางชีวภาพ (Biohydrogen) อาจได้มาจากจุลินทรีย์โดยกระบวนการใช้แสง (Light-driven process) และกระบวนการแบบไม่ใช้แสง (Non light-driven process) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แบคทีเรีย ซึ่งจะมีทั้งพวกผลิตไฮโดรเจนทั้งแบบใช้แสงและไม่ใช้แสง เช่น *Rhodobacter sphaeroides*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Rhodospseudomonas sphaeroides* และ *Escherichia coli* เป็นต้น ไชยาโนแบคทีเรีย เช่น *Nostoc* sp., *Anabaena siamensis* และ *Synechocystis* sp. เป็นต้น และสาหร่ายสีเขียว เช่น *Scenedesmus* sp., *Codium* sp., *Chlorella* sp. และ *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นต้น สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสหรือไนโตรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจน ในบรรดาสิ่งมีชีวิตดังกล่าว สาหร่ายสีเขียวจะมีข้อได้เปรียบในแง่ของการเพาะเลี้ยงคือสามารถเลี้ยงได้ในสภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรฟิก (Photoheterotrophic condition) และโฟโตออโตโทรฟิก (Photoautotrophic condition) โดยสามารถเลือกคาร์บอนไดออกไซด์หรือสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส และกรดอะซิติก เป็นแหล่งคาร์บอน (วิทวัส, 2553) นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังสามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว การผลิตไฮโดรเจนโดยวิธีทางชีวภาพจะมีข้อได้เปรียบในแง่ของต้นทุนการผลิต แต่ข้อเสียคือผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จะต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางกายภาพและเคมี ดังนั้น จึงมีการพัฒนาวิธีเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนในกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิคการตรึงเซลล์ในการรักษาสภาพของเซลล์เพื่อการผลิตไฮโดรเจนได้ยาวนานยิ่งขึ้น

กระบวนการตรึงเซลล์ (Cell immobilization) เป็นกระบวนการจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ เพื่อให้สามารถยึดเกาะได้ในบริเวณที่จำกัด เพื่อไม่ให้เซลล์เคลื่อนที่หรือลอยตัวอิสระ โดยจุลินทรีย์ต้องไม่สูญเสียคุณสมบัติในการทำงาน และสามารถนำเซลล์กลับมาเวียนใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง เซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ในระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว ด้วยเหตุนี้ โครงการพิเศษนี้จึงสนใจนำกระบวนการตรึงเซลล์มาใช้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณที่มากขึ้นและยาวนานขึ้น

โครงการพิเศษนี้มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 โดยศึกษาการคัดเลือกชนิดของวัสดุตรึง 3 ชนิด คือ อะการ์ (Agar) อะกาโรส (Agarose) และอัลจิเนต (Alginate) จากนั้น ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึง โดยการแปรผันอายุของเซลล์ ความเข้มข้น วัสดุตรึง และขนาดของวัสดุตรึง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกชนิดของวัสดุตั้งที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

C. reinhardtii CC-124

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตั้งสาหร่ายสีเขียว

C. reinhardtii CC-124

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหารเหลว TAP (Tris acetate phosphate) นำเซลล์ไปฉายที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครฟotonต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้น นำเซลล์มาตั้งในวัสดุ 3 ชนิด คือ อะการ์ (Agar) อะกาโรส (Agarose) และอัลจินต (Alginate) เพื่อหาชนิดของวัสดุตั้งที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว โดยเลี้ยงในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์เปรียบเทียบกับสภาวะปกติ จากนั้น ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว โดยการแปรผันระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นวัสดุตั้ง และขนาดของวัสดุตั้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวัสดุตั้งที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตั้งสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตั้งสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124
3. นำไปใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน จากการผลิตสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

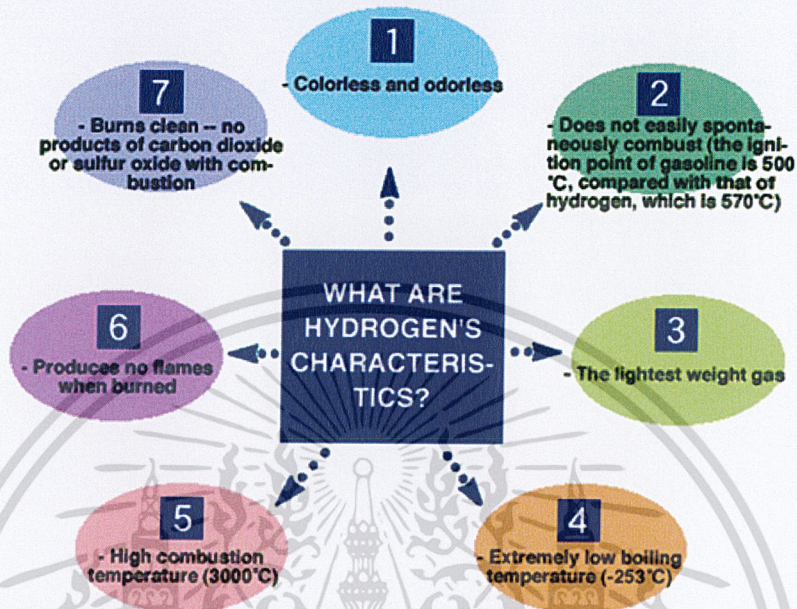
2.1 ไฮโดรเจน

พลังงานเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาประเทศ ทำให้มีความต้องการในการใช้พลังงานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แหล่งพลังงานที่มนุษย์ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล เช่น ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติและน้ำมันดิบ ฯลฯ ซึ่งเชื้อเพลิงฟอสซิลเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณจำกัดและคาดว่าจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นาน นอกจากนี้ การเผาไหม้เชื้อเพลิงเหล่านี้ยังก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน เนื่องจากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกออกมา (นิสิต, 2553) ดังนั้น นักวิจัยจึงได้ศึกษาและแสวงหาพลังงานทางเลือกใหม่ที่เป็นพลังงานหมุนเวียนศักยภาพสูงและเป็นพลังงานสะอาดมาใช้ทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจ เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด เมื่อเผาไหม้จะได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์โดยไม่ปลดปล่อยก๊าซพิษซึ่งทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ (ชนิษฐา, 2553)

ไฮโดรเจน (ภาษาอังกฤษ : Hydrogen; ภาษาละติน : hydrogenium) เป็นธาตุเคมีในตารางธาตุ มีสัญลักษณ์ทางเคมี คือ H และมีเลขอะตอมเท่ากับ 1 มีมวลอะตอมเท่ากับ 1.00794 กรัมต่อโมล มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.08988 กรัมต่อลิตร เป็นอโลหะ มีอยู่ในโมเลกุลของน้ำและสารประกอบอินทรีย์ทุกตัว และสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นธาตุที่พบมากที่สุดในการเอกภพ ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศมาตรฐาน ไฮโดรเจนจะอยู่ในสถานะเป็นก๊าซโดยประกอบด้วยธาตุไฮโดรเจน 2 อะตอม ในบรรยากาศโลก มีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ส่วนในล้านส่วน คุณสมบัติทั่วไปของก๊าซไฮโดรเจน (H_2) คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย ไม่มีเปลวไฟเวลาเผาไหม้ การเผาไหม้สะอาด ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไฮโดรเจนมีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลเท่ากับ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิหรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนมีจุดเดือด -252.87 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลว -259.14 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ไฮโดรเจนมีอุณหภูมิการเผาไหม้สูงถึง 3,000 องศาเซลเซียส ให้พลังงานความร้อน 122 กิโลจูลต่อกรัม ซึ่งค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน (Madawar และคณะ, 2000) ไฮโดรเจนมีคุณสมบัติเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในเชิงวิชาการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโมเนีย ใช้เป็นก๊าซสำหรับการยกของ ใช้เป็นเชื้อเพลิงของจรวดสำรวจอวกาศ และใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ (อิศกฤตา, 2557) คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน

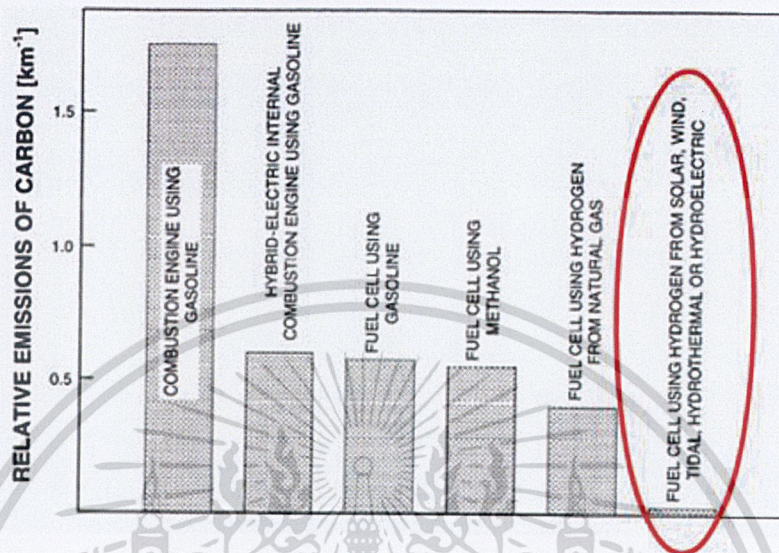
ที่มา : http://www.ena.or.jp/WE-NET/suiso/suiso1_e.html

พลังงานก๊าซไฮโดรเจนถือได้ว่าเป็นเชื้อเพลิงอนาคต ทั้งนี้เนื่องจากไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเกิดการเผาไหม้กับก๊าซออกซิเจน โดยจะมีเพียงไอน้ำเป็นผลพลอยได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงอื่นๆ ที่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้จัดเป็นก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) ที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการทำให้โลกร้อนขึ้น (Global warming) (กฤษณา, 2554) นอกจากนี้ ก๊าซไฮโดรเจนยังสามารถนำไปผลิตกระแสไฟฟ้าโดยป้อนเข้าเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ซึ่งขณะนี้นักวิจัยทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เนื่องจากเซลล์เชื้อเพลิงมีประสิทธิภาพสูงกว่าอุปกรณ์ผลิตไฟฟ้าแบบอื่นๆ มาก ดังนั้น พลังงานไฮโดรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานดั้งเดิมได้ เนื่องจากคุณสมบัติในด้านต่างๆ โดยสรุปดังนี้ (ธรรมบุญ, 2551)

1) แหล่งพลังงานดั้งเดิมก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งก๊าซชนิดนี้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลกโดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซึ่งเกิดจากการสันดาปแบบ

ไม่สมบูรณ์ (Partial oxidation) ของสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำมัน เป็นต้น แต่พลังงานไฮโดรเจน
ไม่ เป็นพลังงานที่สะอาดถึง ไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ดังนั้น จึงไม่ส่งผลกระทบให้เกิดภาวะโลกร้อน

รูปที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก (แสดงในรูปของคาร์บอน) ระหว่างการใช้พลังงานไฮโดรเจนกับแหล่งพลังงานชนิดอื่นๆ



รูปที่ 2.2 การปลดปล่อยคาร์บอนของการเผาไหม้ต่างๆ จากยานพาหนะที่ใช้การสันดาปภายในด้วยน้ำมันเบนซินเปรียบเทียบกับยานพาหนะที่ใช้เซลล์เชื้อเพลิงเป็นแหล่งของพลังงาน
ที่มา : Bak และคณะ, 2002

- 2) การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงดั้งเดิม ไม่ว่าจะมาจากยานพาหนะหรือแหล่งอุตสาหกรรมต่างๆ ก่อให้เกิดกลุ่มควันและฝุ่นละออง แต่พลังงานไฮโดรเจนไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศเหล่านี้
- 3) พลังงานไฮโดรเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิมได้ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับคริวเรือน เครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น เป็นต้น
- 4) ค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากการเผาไหม้ไฮโดรเจน มีค่ามากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากการเผาไหม้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนและจากการเผาไหม้แอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอล ถึง 2.5 และ 5 เท่า ตามลำดับ
- 5) ก๊าซไฮโดรเจนสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้า ซึ่งอยู่ระหว่างการพัฒนาและคาดว่าจะนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีได้หลายวิธี โดยอาจผลิตขึ้นได้จากการแตกตัวโมเลกุลของน้ำไปเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ซึ่งการแตกโมเลกุลของน้ำนั้น จำเป็นต้องอาศัยพลังงานในรูปแบบอื่นหรืออาศัยกลไกเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในอุตสาหกรรมเพื่อแข่งขันกับพลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่มีราคาสูงในปัจจุบัน ในปัจจุบันกระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกเป็น 3 กระบวนการหลักคือ

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมี (Thermo-chemical process)

ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีโดยใช้ความร้อน โดยมีวัตถุดิบหลักคือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหินชีวมวล เป็นต้น ผลลัพธ์ที่ได้ คือ ก๊าซสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยไฮโดรเจน (H_2) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และมีเทน (CH_4) จากนั้น ก๊าซผสมจะผ่านกระบวนการอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนที่บริสุทธิ์ขึ้น การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมีมีหลายกระบวนการย่อย ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming) กระบวนการออกซิเดชันบางส่วน (Partial oxidation) และกระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) เป็นต้น

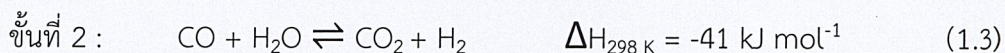
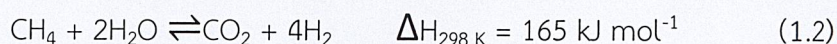
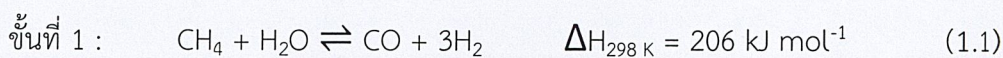
2.2.1.1 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ

กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam Reforming) เป็นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้มีเทน (Methane) ที่ได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบเป็นวัตถุดิบ กระบวนการนี้อาจเรียกว่า กระบวนการรีฟอร์มมิงมีเทนด้วยไอน้ำ (Steam methane reformation) เนื่องจากมีเทนเป็นส่วนประกอบหลักของการเกิดปฏิกิริยา กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำประกอบด้วย 2 ขั้นตอนย่อย ดังนี้

ขั้นที่ 1 นำก๊าซธรรมชาติทำปฏิกิริยากับไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงๆ (อาจจะมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งร่วมด้วย) เพื่อให้ได้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน (ดังสมการที่ 1.1 และ 1.2 ในขั้นที่ 1) ขั้นตอนที่ 2) จะมีการนำไอน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยา

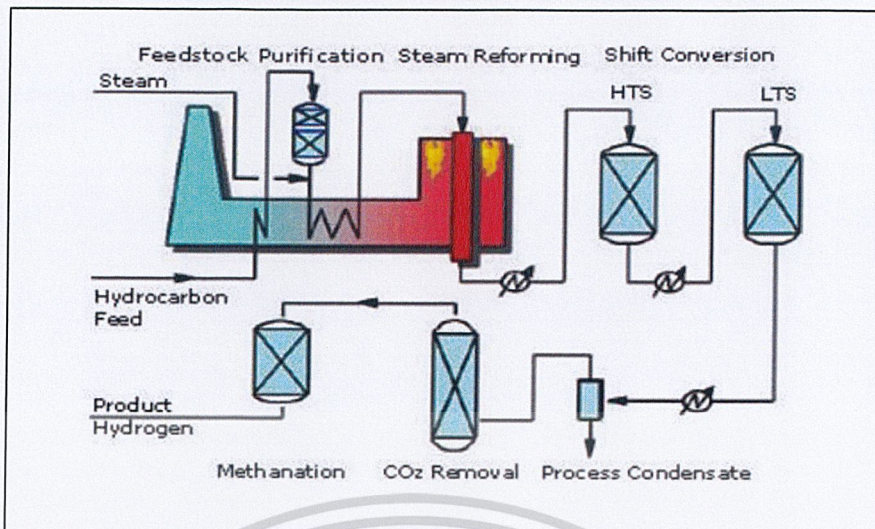
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ อีกครั้งเพื่อให้ได้ก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ดังแสดงในขั้นที่ 2 ปฏิกริยานี้ เรียกว่า Water-gas shift reaction (WGS) ดังสมการ 1.3



ก๊าซไฮโดรเจนที่ใช้ในปัจจุบันนี้ทั่วโลกได้มาจากการผลิตโดยวิธีดังกล่าวเป็นหลักปฏิกริยาทั้งหมดในกระบวนการรีฟอร์มมิงเป็นปฏิกริยาที่ย้อนกลับได้ และจำเป็นอย่างยี่งที่ต้องใช้ตัวเร่งปฏิกริยาร่วมด้วย จากสมการเคมี แสดงให้เห็นว่าปฏิกริยาในขั้นตอนที่ 1 เป็นปฏิกริยาแบบดูดความร้อน (endothermic) และความสามารถในการเกิดปฏิกริยาถูกควบคุมด้วยอิทธิพลทางเทอร์โมไดนามิกส์เพื่อให้ได้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสูงๆ ซึ่งจำเป็นต้องทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิสูงจากเหตุผลข้อนี้ ทำให้ต้นทุนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงตามไปด้วย และเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่สังเคราะห์ได้ สามารถทำได้โดยทำการคัดแยกก๊าซไฮโดรเจน หรือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ออกระหว่างปฏิกริยาดำเนินไป เพื่อเป็นการรบกวนสมดุลของปฏิกริยาและใช้ตัวเร่งปฏิกริยาที่เหมาะสม อิทธิพลของชนิดของตัวเร่งปฏิกริยาก็เป็นอีกตัวแปรที่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ดังนั้น งานวิจัยด้านการศึกษาและพัฒนาตัวเร่งปฏิกริยาสำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบ Steam reforming reaction จึงกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้การใช้สารตั้งต้นเป็นแอลกอฮอล์ชนิดอื่น เช่น เอทานอล เมทานอล เป็นต้น ก็ได้รับความสนใจจากนักวิจัย เนื่องจากได้จากการหมักวัสดุจากธรรมชาติหรือวัสดุเหลือใช้จากเกษตรกรรม อย่างไรก็ตาม แอลกอฮอล์มีข้อดีต่อกว่าก๊าซมีเทน คือ เกิดสารผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นปะปนออกมากับก๊าซไฮโดรเจนที่สังเคราะห์ได้ ทำให้ต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนการทำให้ก๊าซไฮโดรเจนบริสุทธิ์ ค่าใช้จ่ายก็สูงตามมาด้วย และตัวเร่งปฏิกริยาที่ใช้นักเกิดการเสื่อมสภาพ (Deactivation) ในระหว่างปฏิกริยาได้ง่าย (รัชนิกร, 2554) กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำสามารถสรุปขั้นตอนได้ดังแสดงในรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

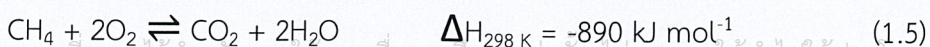
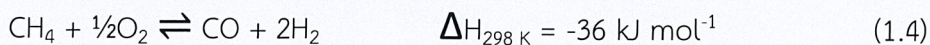


รูปที่ 2.3 กระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (Steam reforming)

ที่มา : <http://www.making-hydrogen.com/steam-reforming-hydrogen.html>

2.2.1.2 กระบวนการออกซิเดชันบางส่วน

กระบวนการออกซิเดชันบางส่วน (Partial oxidation) เป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยอาศัยความร้อนและตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทั่วไปแล้ว สารตั้งต้นที่นิยมใช้ในกระบวนการนี้มักเป็น สารประกอบทางอินทรีย์ เช่น ก๊าซมีเทน หรือเอทานอล เป็นต้น ปฏิกิริยานี้เกิดที่อุณหภูมิสูงกว่า 700 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาออกซิเดชันบางส่วนของก๊าซมีเทนทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซ คาร์บอนมอนอกไซด์ ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาแบบคายความร้อนปานกลางและให้อัตราส่วนของ ไฮโดรเจนต่อคาร์บอนมอนอกไซด์ประมาณ 2 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Fischer-Tropsch synthesis หรือ กระบวนการ Syn gas แต่ประสิทธิภาพของกระบวนการออกซิเดชัน บางส่วน ไม่สามารถเทียบเคียงกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ สมการการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แบบบางส่วนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์และไฮโดรเจน ดังสมการที่ 1.4 และสมการ การปฏิกิริยาออกซิเดชันสมบูรณ์ (Full combustion) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และ น้ำ ดังสมการที่ 1.5 ตัวแปรที่ควบคุมว่าปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นแบบออกซิเดชันบางส่วนหรือออกซิเดชัน สมบูรณ์ คือ ปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่เข้าทำปฏิกิริยา



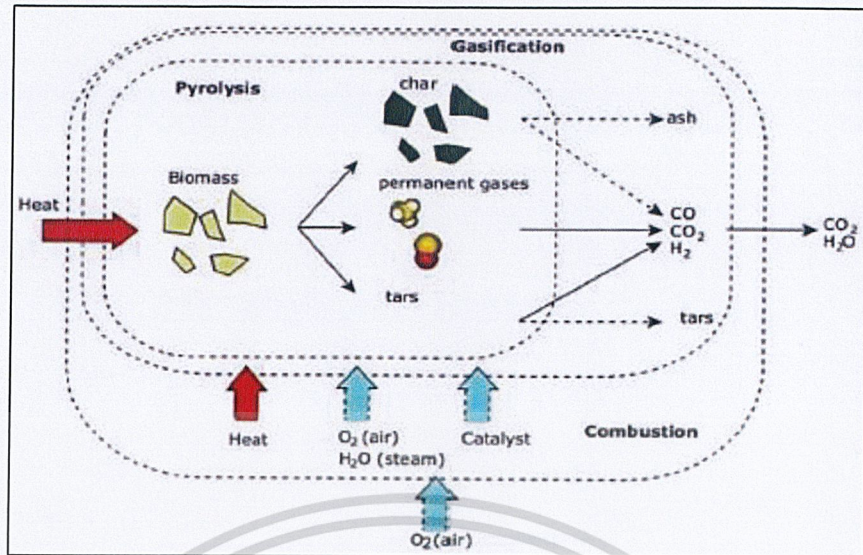
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.3 กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน

กระบวนการแก๊สซิฟิเคชัน (Gasification) เป็นเทคโนโลยีการแปรรูปชีวมวลให้เป็นพลังงานในรูปก๊าซเชื้อเพลิง (Fuel gases) โดยอาศัยกระบวนการทางเคมีความร้อนจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงในสภาวะจำกัดปริมาณอากาศ เมื่อให้ความร้อนแก่ชีวมวลร่วมกับเทคนิคการจำกัดปริมาณอากาศ (Air) หรือออกซิเจน (O₂) หรือไอน้ำ (Steam) เพื่อให้เกิดสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในสัดส่วนที่ต่ำกว่าปริมาณที่ทำให้เกิดการเผาไหม้เชื้อเพลิงอย่างสมบูรณ์ ทำให้ชีวมวลเกิดการแตกตัวเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) ในรูปของแข็งและก๊าซ ซึ่งประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ก๊าซไฮโดรเจน (H₂) ก๊าซมีเทน (CH₄) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ก๊าซไนโตรเจน (N₂) และก๊าซอื่นๆ ที่รวม เรียกว่า โพรดิวเซอร์ก๊าซ (Producer gas)

กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันจากชีวมวลเป็นกระบวนการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ ดังนั้นปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นจะมีความซับซ้อนและสามารถเกิดผลิตภัณฑ์หรือก๊าซหลายชนิด ขึ้นอยู่กับลักษณะของชีวมวลและเทคนิคในการจำกัดปัจจัยต่างๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้ไม่ได้มีเพียงแต่ก๊าซเชื้อเพลิงเท่านั้น ยังมีของแข็งและสิ่งเจือปนที่ไม่สามารถเผาไหม้ได้หมด ได้แก่ ถ่านชาร์ (Char) เถ้า (Ash) น้ำมันดิน (Tar) และไอน้ำ เป็นต้น ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากชีวมวล จะใช้สารชีวมวลเป็นวัตถุดิบหรือที่สามารถนำกลับมาใช้ ซึ่งอาจได้จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด ฟางข้าวสาลี วัสดุเศษเหลือจากโรงเลื่อยในอุตสาหกรรมป่าไม้ โดยเฉพาะพืชจำพวกหญ้าซึ่งจัดเป็นพวงวัชพืชทางการเกษตร พืชเหล่านี้จะใช้พลังงานจากเศษสิ่งปฏิกูลที่ทิ้งจากชุมชนและสิ่งปฏิกูลจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เพื่อให้พืชจำพวกนี้เจริญเติบโตเพิ่มจำนวน ดังนั้น พืชจำพวกนี้ถือว่าเป็นแหล่งสารชีวมวลที่สำคัญ วิธีการในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลนั้นอาศัยกระบวนการ 2 กระบวนการ คือ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลโดยการใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำภายใต้สภาวะที่มีความดัน ซึ่งสารชีวมวลจะถูกแยกออกเป็นก๊าซไฮโดรเจน และกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากสารชีวมวลด้วยวิธีไพโรไลซิสซึ่งเป็นวิธีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสารชีวมวลในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันจากชีวมวล

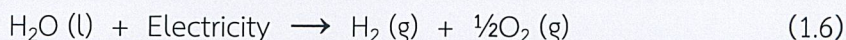
ที่มา : http://rubber.oie.go.th/file/8_เทคโนโลยีแก๊สซิฟิเคชันเศษไม้.pdf

จากกระบวนการที่กล่าวมาข้างต้น การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ โดยคิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทั้งหมด เนื่องจากกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำมีประสิทธิภาพสูงสุดและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ยังมีข้อด้อยคือ วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ซึ่งรวมถึงวิธีแก๊สซิฟิเคชัน และวิธีออกซิเดชันบางส่วน) มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นในขั้นตอนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ก่อให้เกิดมลพิษ เนื่องจากมีสารพิษตกค้างจากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และซัลเฟอร์ เป็นต้น

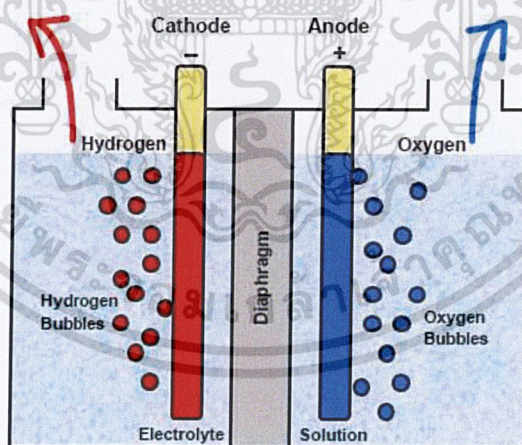
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการไฟฟ้าเคมี

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการไฟฟ้าเคมี (Electrolytic process) เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกโมเลกุลของน้ำเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ตัวอย่างของแหล่งในการให้กระแสไฟฟ้า ได้แก่ พลังงานทดแทนหรือพลังงานหมุนเวียน (Renewable source) รวมทั้งพลังงานนิวเคลียร์ กระบวนการทางไฟฟ้าเคมีโดยผ่านกระแสไฟฟ้าลงในน้ำ หรือที่รู้จักกันในชื่อ ปฏิกิริยาการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า (Electrolysis reaction) ใช้กระแสไฟฟ้าในการแตกตัวของไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมออกจากกัน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วอะตอมชนิดที่เหมือนกันจะเกิดการรวมตัวกันให้ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจนดังแสดงในสมการที่ 1.6 (รูปที่ 2.5)



เมื่อพิจารณาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีนี้ กระแสไฟฟ้าที่ใช้ในปฏิกริยานี้ส่วนใหญ่จะได้อมาจากแหล่งพลังงานตั้งต้นอื่น ถ้านำก๊าซไฮโดรเจนนี้มาเป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยใช้เซลล์เชื้อเพลิง พบว่าค่าพลังงานไฟฟ้าที่ได้นั้นยังไม่คุ้มค่ากับต้นทุนในการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้าดังกล่าว เพราะราคาต้นทุนเกือบทั้งหมดของกระบวนการนี้ขึ้นกับมูลค่าของพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกสลายน้ำ ถึงแม้ว่าแหล่งให้ก๊าซไฮโดรเจนนี้จะใช้เพียงน้ำซึ่งมีมากในโลกก็ตาม กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแตกตัวของน้ำนี้จึงจำเป็นต้องได้รับการวิจัยและพัฒนาต่อไป เพื่อลดมูลค่าและต้นทุนในระหว่างการผลิต นอกจากนี้ ต้องพิจารณาถึงแหล่งให้พลังงานไฟฟ้าเบื้องต้นด้วย ถ้ามาจากแหล่งที่ใช้แล้วหมดไป เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน หรือน้ำมันปิโตรเลียม อาจจะไม่เหมาะสม ควรจะเป็นแหล่งที่สามารถเกิดมาทดแทนใหม่ได้เร็ว เช่น พลังงานไฟฟ้าจากลม แสงอาทิตย์ หรือพลังน้ำ เป็นต้น จึงจะทำให้กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม



Standard Electrolysis

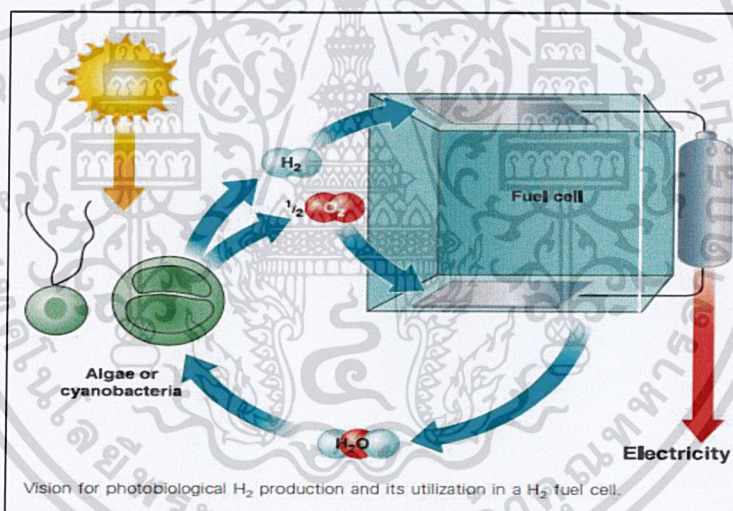
รูปที่ 2.5 กระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า

ที่มา : <http://www.thaiseboard.com/index.php/topic302500.0.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพของจุลินทรีย์โดยใช้แสง (Photobiological system) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาการแตกโมเลกุลของน้ำโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้มีหลายชนิดที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ เช่น แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย ฯลฯ จุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้น้ำเป็นวัตถุดิบของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยอาศัยเอนไซม์ต่างๆ แต่กระบวนการผลิตนี้ใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้ระยะเวลาที่นาน ในการแตกโมเลกุลของน้ำจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง นักวิทยาศาสตร์จึงได้พัฒนาคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในอัตราที่สูงเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนระดับขนาดใหญ่และผลิตในรูปแบบที่ต่อเนื่องได้ ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาดและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (สร้อยญา และอรัญ, 2556) (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 กลไกของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสง
ที่มา : Maness และคณะ, 2009

2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว

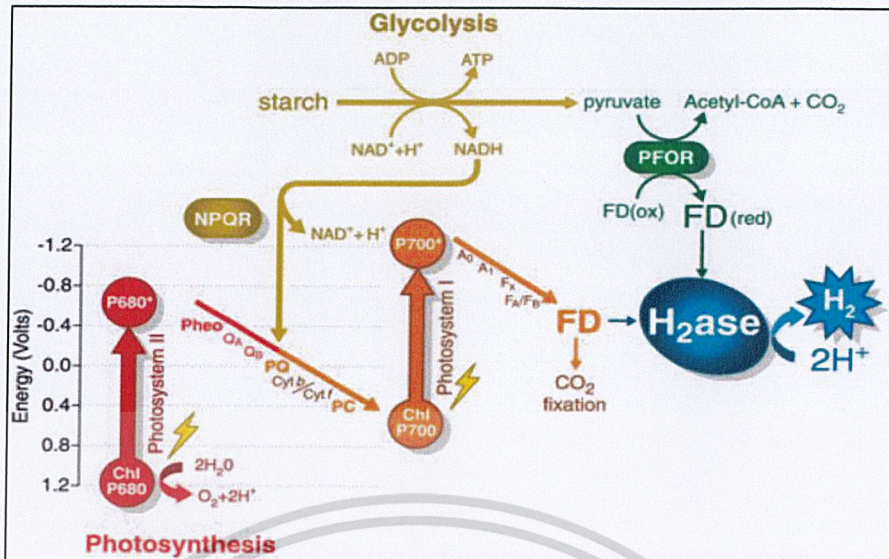
สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะการบ่มในที่
ไม่มีออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่

Chlamydomonas sp., *Chlorella sp.*, *Codium sp.*, *Scenedesmus sp.* เป็นต้น ภายใต้สภาวะ
เอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ที่มีความเข้มแสงต่ำ สาหร่ายสีเขียวจะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้ม
ไม่สว่างจนใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากนำไปใช้

แสงเพิ่มขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการพัฒนาและนำมาผลิตก๊าซไฮโดรเจนเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวสามารถเพาะเลี้ยงง่ายโดยสามารถเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรปและโฟโตเฮเทอโรโทรป นอกจากนี้ การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวจะใช้เพียงน้ำและแสงที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้งแคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในระบบแสงสอง (PS II) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : Primary electron acceptor of PS II) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : Plastoquinone) ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวออกหรือที่เรียกว่า Water splitting ได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ จากนั้น อิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PS I) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาเป็นทอดๆ จนถึงตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเฟอรัรีดอกซิน (Ferredoxin : Fd) อิเล็กตรอนจากเฟอรัรีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น (รูปที่ 2.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง
ที่มา : <http://photobiology.info/Seibert.html>

2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว

การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Gaffron ในปี ค.ศ. 1939 จากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase : oxidoreductase, EC1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99.1) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 1.7



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

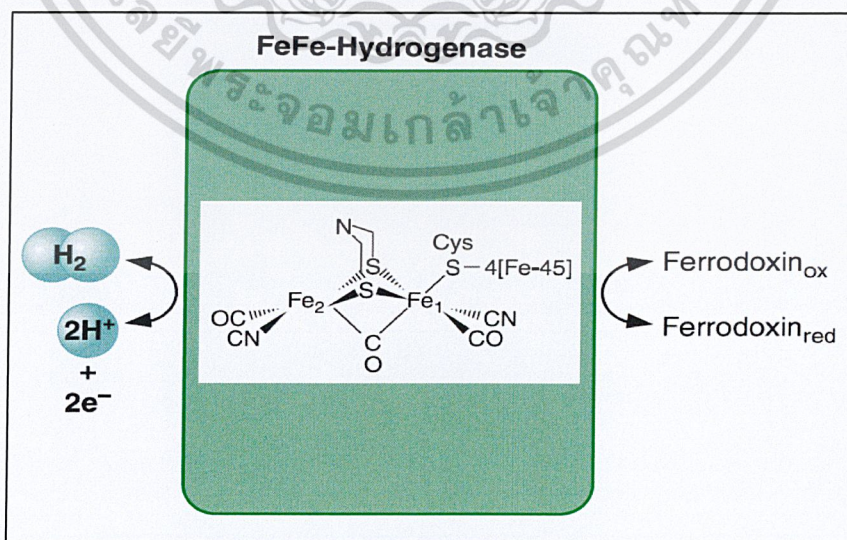
1. Unidirectional หรือ Uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. Bidirectional หรือ Reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถแบ่งตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น 3 ชนิด (Schulz และคณะ, 1998) ดังนี้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ขอสงวนสิทธิ์ในเนื้อหาและต้องขออนุญาตเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (NiFe-hydrogenase)
2. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยเหล็กในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์เท่านั้น (Fe-hydrogenase)
3. ไฮโดรจีเนสที่ไม่พบโลหะใดเป็นองค์ประกอบในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ (Metal-free hydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวเป็นเอนไซม์ชนิดที่กระตุ้นประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็กเท่านั้น (Fe-hydrogenase) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Gaffron และ Rubin, 1942), *Chlamydomonas reinhardtii* (Hartman และ Krasna, 1963), *Chlorella fusca* (Kessler, 1974) และ *Chlamydomonas moewusii* (Healey, 1970) และพบยีนไฮโดรจีเนสที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน (kDa) โดยมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้ที่พบในสาหร่ายสีเขียวประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสประกอบด้วยโปรตีน 1 หน่วยย่อย และมีบริเวณกระตุ้นหรือบริเวณ H-cluster ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของเหล็ก 2 อะตอม เหล็กจะจับเข้ากับซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และทำหน้าที่เป็น Fe-S cluster นอกจากนี้จากอะตอมของเหล็กที่อยู่ตรงกลางของบริเวณนี้จะจับกับซิสเทอีนแล้ว ยังจับกับอะตอมของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไซยาไนด์ (CN) อีกด้วย (Maness และคณะ, 2009) (รูปที่ 2.8)



เอกสารรูปที่ 2.8 บริเวณกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในบริเวณกระตุ้น ในสาหร่ายสีเขียว
ที่มา: Maness และคณะ, 2009 ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (Green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (Eukaryote) จัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) มีทั้งหมดประมาณ 450 จินัส และ 7,500 สปีชีส์ ซึ่งประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมดจะเป็นสาหร่ายน้ำจืดหรือสาหร่ายที่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เป็นอากาศ สาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดอาจจะเจริญอยู่ในน้ำตื้นๆ หรือน้ำลึกที่แสงสว่างส่องถึง และหลายชนิดเป็นแพลงก์ตอนพืช บางชนิดก็ขึ้นอยู่กับก้อนหิน หวาย โคลน เปลือกหอย บนพืชหรือสัตว์อื่น สาหร่ายสีเขียวประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายทั้งหมดจะเป็นสาหร่ายทะเล ซึ่งจะเจริญแตกต่างกันตามสภาพอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสง และความสมบูรณ์ของสารอาหาร (ยวดี, 2549)

2.5.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะทั่วไป คือ

1. เยื่อหุ้มเซลล์ ของสาหร่ายสีเขียวจะมีผนังเซลล์ที่สมบูรณ์หุ้มอยู่ภายนอก ผนังเซลล์จะคล้ายพืชชั้นสูง คือ ประกอบไปด้วยสารพวกเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นไมโครไฟบริลประสานกันไปมา ครอบคลุมเซลล์ นอกจากนั้น ยังมีสารพวกที่ไม่เป็นรูปร่าง (Amorphous material) หลายชนิด ซึ่งทำหน้าที่เป็นเมทริกซ์ (Matrix) หรือสารที่เป็นพื้นปะปนอยู่ อาจจะมีสปอโรพอลเลนิน (Sporopollenin) ซึ่งเป็นรงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์ ปะปนอยู่มากน้อยต่างกัน

2. คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ลักษณะทั่วไปของคลอโรพลาสต์ในสาหร่ายสีเขียวคล้ายพืชชั้นสูง คือ มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ชั้นนอกและชั้นใน เยื่อหุ้มชั้นในมีการม้วนตัว ทำให้เกิดระบบเยื่อที่ซับซ้อนอยู่ภายใน โดยจะมีเยื่อที่มีลักษณะเป็นถุงกลมๆ และแบนเรียกว่า ไทลาคอยด์ (Thylakoid) ที่เรียงซ้อนกันอยู่เป็นตั่งๆ แต่ละตั่งเรียก กรานา (grana) กรานาจะเรียงกันเป็นชั้นๆ เรียกว่า ลามลลา (Lamellae) สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีลามลลาที่มีไทลาคอยด์เป็นตั่งๆ คล้ายพืชชั้นสูง มีจำนวนไทลาคอยด์ตั้งแต่ 2-6 อัน ใน *Chlamydomonas* แต่ลักษณะของไทลาคอยด์ที่เรียงกันเป็นตั่งไม่สม่ำเสมอเหมือนในพืชชั้นสูง คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างลักษณะต่างกัน เช่น เป็นเกลียว (Helical or spiral chloroplast) พบใน *Spirogyra* เป็นรูปดาว (Stellate chloroplast) พบใน *Zygnema* เป็นร่างแห (Reticulate chloroplast) พบใน *Oedogonium* เป็นรูปถ้วย (Cup shaped chloroplast) พบใน *Chlamydomonas* เป็นต้น

3. ไพรินอยด์ (Pyrenoid) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ควบคู่กับคลอโรพลาสต์ มีลักษณะกลมใส ไม่มีสี สาหร่ายส่วนใหญ่จะมีไพรินอยด์ ไพรินอยด์ประกอบด้วยแกนกลางซึ่งเป็นโปรตีน (Protein) ไม่ว่องไวใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเม็ดคดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

core) ที่มีชั้นของแป้ง (Starch sheath) เป็นเยื่อหุ้มอยู่ และชั้นนอกสุดเป็นแผ่นแป้ง (Starch plate) หุ้มอีกชั้นหนึ่ง ไพรินอยด์ในสาหร่ายสีเขียวทำหน้าที่สร้างแป้ง โดยส่วนนอกของโปรตีนจะเปลี่ยนเป็นชั้นของแป้งหุ้มโปรตีน ต่อมาจะหลุดออกเป็นแผ่นแป้ง ทำให้ขนาดไพรินอยด์ใหญ่ขึ้นหรือหลุดออกมาเป็นเม็ดแป้ง (Starch grain) และจะมีเอนไซม์สร้างแป้ง (Amylose synthetase) ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแป้ง

4. อายสปอตหรือสติกมา (Eyespot or stigma) เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่รับแสงและนำไปสู่การเคลื่อนไหวของแฟลกเจลลา อายสปอตพบในเซลล์ที่เคลื่อนไหวได้ ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ปกติหรือเซลล์สืบพันธุ์ อายสปอตมีลักษณะเป็นรูปกลมรี ยาว อาจอยู่เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีสีแดง รงควัตถุในอายสปอตเป็นพวกลูทีน (Lutein) คริปโตแซนทิน (Cryptoxanthin) เบต้าแคโรทีน (β -carotene) และแอสต้าแซนทิน (Astaxanthin) ซึ่งเป็นสารไวต่อแสง อายสปอตมีรูปร่างคล้ายถ้วย สีแดง ด้านบนมีเลนส์ปิดไว้ ตำแหน่งของอายสปอตมักอยู่ด้านหน้าของเซลล์

5. แวกิวโอล (Vacuole) สาหร่ายส่วนใหญ่จะมีแวกิวโอล ซึ่งมีขนาดต่างๆ กัน สาหร่ายสีเขียวใน Family Bryopsidophyceae จะมีเส้นแคลโลส (Callose) และเพคติน (Pectin) พาดผ่านส่วนสาหร่ายสีเขียวใน Order Volvocales ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้ จะมีคอนแทร็กไทล์แวกิวโอล (Contractile vacuole) ซึ่งมีจำนวน 1 หรือ 2 หรือมากกว่า สามารถยืดหดตัวได้ ทำหน้าที่ขับน้ำและของเสียออกจากเซลล์คล้ายในโปรโตซัว

6. แฟลกเจลลัม (Flagellum) เป็นโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนไหวของเซลล์ และเป็นลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกสาหร่ายได้อีกด้วย แฟลกเจลลัมจะพบได้ในทั้งเซลล์ปกติ (Vegetative cell) หรือเซลล์สืบพันธุ์ (Reproductive cell) จำนวนแฟลกเจลลัมในแต่ละเซลล์จะมี 1-2-4 หรือมากกว่านี้ เซลล์ปกติส่วนใหญ่ และเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือแกมีท มักมีแฟลกเจลลัม 2 เส้น โครงสร้างภายนอกของแฟลกเจลลัมจะมีหลายแบบ เช่น แฟลกเจลลัมที่มีผิวเรียบ (Smooth flagellum) แบบนี้คล้ายกับว่าไม่มีโครงสร้างใดๆ ยื่นออกมา แต่แท้จริงแล้วมีขนเล็กๆ ยื่นออกมาตามความยาวของแฟลกเจลลัม พบใน *Chlamydomonas* เป็นต้น

7. รงควัตถุ (Pigment) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง ในสาหร่ายสีเขียวจะพบคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) เอและบี ซึ่งคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุหลักในคลอโรพลาสต์ มีคุณสมบัติในการดูดแสงสีแดงและน้ำเงินมาก และสะท้อนสีเขียว คลอโรฟิลล์ เอ นั้นเป็นรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงขั้นต้น สามารถดูดซับแสงด้วยตนเอง ส่วนคลอโรฟิลล์ชนิดอื่นๆ จัดเป็นรงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสงขั้นที่สอง คือจะทำหน้าที่ดูดพลังงานแสงแล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ อีกครั้งหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ร้อนหรือเอทานอลนำไปใช้

(Acetone) บีโตรเลียมสปิริต (Petroleum spirit) หรือส่วนผสมของเมทานอล (Methanol) และ บีโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether) ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร นอกจากคลอโรฟิลล์ ยังมี แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ที่พบในเซลล์ที่มีการสังเคราะห์แสงทุกชนิด และอยู่ในเยื่อของ คลอโรพลาสต์ติดกับคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ประกอบด้วย แคโรทีนอยด์ชนิดแอลฟา แกมมา และ เบต้า-แคโรทีน ซึ่งจะพบในสาหร่ายทุกชนิด และแซนโทฟิลล์มีหลายชนิด ชนิดที่มีมากคือ ลูทีน (Lutein) ซีแซนทิน (Zeaxanthin) ไวโอลแซนทิน (Violoxanthin) และนีโอแซนทิน (Neoxanthin)

8. รูปร่าง (Shape) สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างทั้งหมด 5 แบบ ได้แก่ 1) เซลล์เดี่ยว (Unicellular form) ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว อาจจะมีแฟลกเจลลัมหรือไม่มีก็ได้ เช่น แบบโปรโตคอคคอยดัล (Protococcal type) จะเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างหลายแบบ อาจจะเป็นทรงกลม สามเหลี่ยม สี่เหลี่ยม รูปมน หรือหยักโค้งมีลวดลายต่างๆ เป็นเซลล์ที่ไม่มีแฟลกเจลลัม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ พบในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* เป็นต้น หรือแบบแฟลกเจลเลตที่อยู่เดี่ยวๆ (Flagellated) จะมีเพียงเซลล์เดียว แต่ละเซลล์มีแฟลกเจลลัมจึงสามารถเคลื่อนที่ได้ พบในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* เป็นต้น 2) โคลนิน (Colonial หรือ colony) ประกอบด้วยเซลล์หลายๆ เซลล์มาอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์ดังกล่าวมีรูปร่างเหมือนกันทำหน้าที่อย่างเดียวกัน การมาอยู่กันเป็นโคลนินมีรูปร่างหลายแบบ เช่น แบบซินเนียม (Coenobium) จะเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีจำนวนแน่นอนและเซลล์เรียงกันเป็นระเบียบ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดเคลื่อนไหวได้เพราะมีแฟลกเจลเลตเรียกว่า เซลล์แบบโคลนินที่มีแฟลกเจลลัม ซึ่งพบในสาหร่ายสีเขียว *Gonium*, *Volvox* และ *Chlorodesmus* เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวบางชนิดก็ไม่มีแฟลกเจลเลต จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เรียกว่า เซลล์แบบโคลนินไม่มีแฟลกเจลลัม ซึ่งพบใน สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus*, *Pediastrum* และ *Hydrodictyon* เป็นต้น 3) เส้นสาย (Filamentous form หรือ filament) รูปร่างของสาหร่ายชนิดนี้เกิดจากเซลล์ต่อเซลล์ มาต่อกันเป็นเส้น เช่น แบบเส้นสายไม่แตกแขนง (Unbranched filament) เกิดจากเซลล์เรียงต่อกัน เป็นสาย อาจยาวหรือสั้นก็ได้ ไม่มีการแตกแขนง พบในสาหร่ายสีเขียว *Spirogyra*, *Oedogonium* และ *Ulothrix* เป็นต้น 4) หลอดหรือท่อติดต่อกันตลอด (Siphonaceous form) เป็น เซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส รูปร่างเป็นหลอด หรือเป็นท่อติดกันตลอด ไม่มีผนังกัน นอกจากในระยะ สืบพันธุ์จะมีผนังมากขึ้นเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ พบในสาหร่ายสีเขียว *Bryopsis*, *Codium* และ *Halimeda* เป็นต้น 5) เนื้อเยื่อพาราเรโนไมมา (Parenchymatous form) ประกอบด้วยเซลล์ พาราเรโนไมมาที่สามารถทำการแบ่งเซลล์ได้หลายทิศทาง ทำให้สาหร่ายพวกนี้มีลักษณะเป็นทลัสส์

ถ้าเป็นเซลล์พาราเรโนไมมาทำการแบ่งแบบ 2 ทิศทาง จะทำให้ทลัสส์มีลักษณะแบน พบในสาหร่าย
 เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อแจกจ่ายให้แก่นักศึกษาและบุคลากรของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีเขียว *Monostroma* บางชนิดเซลล์พาราเรโนไมมาทำการแบ่งมากกว่า 2 ทิศทาง จะทำให้ทลล์มีลักษณะเป็นท่อ พบในสาหร่ายสีเขียว *Enteromorpha* และ *Ulva* เป็นต้น

9. อาหารสะสม (Storage product) ของสาหร่ายได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะได้น้ำตาลที่นำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหายใจในกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) นอกจากนี้ยังสะสมไว้ในรูปต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะสะสมอยู่บริเวณผนังเซลล์ หรือแวคิวโอลของสาหร่าย อาหารสะสมในสาหร่ายสีเขียว เช่น แป้ง (Starch) จัดอยู่ในรูปอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ฟรุคโตแซน (Fructosan) เป็นสารพอกน้ำตาลฟรุคโตสพบในสาหร่ายสีเขียวพวก *Acetabularia* และ *Cladophora* น้ำตาล (sugars) พบในรูปของน้ำตาลซูโครส โพลีออล (Polyols) และไขมัน (Lipid)

10. การสืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการรวมกันของแกมีทซึ่งมีทั้งแบบ Isogamy, Anisogamy และ Oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์และการสร้าง Akinete

2.6 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* จัดอยู่ในอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Plantae

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Volvocales

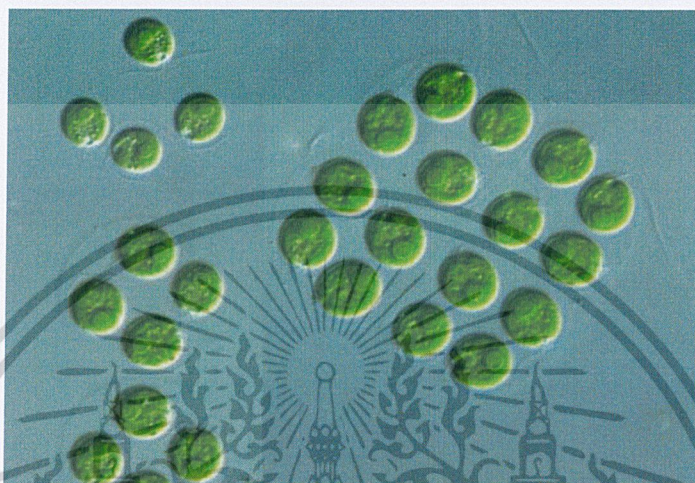
Family Chlamydomonadaceae

Genus *Chlamydomonas*

สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว รูปร่างกลม (รูปที่ 2.9) มีขนาดยาวประมาณ 10 ไมครอน และกว้างประมาณ 3 ไมครอน มีแฟลกเจลลา 2 เส้นทางด้านหน้าสำหรับเคลื่อนที่ มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่ 1 อันซึ่งกินเนื้อที่ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ และมีอวัยวะอยู่ที่ขอบด้านหนึ่งของคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ช่วยรับแสงและทำให้เซลล์รับรู้ว่าจะควรเคลื่อนที่ไปยังทิศทางใด สาหร่ายชนิดนี้สามารถเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ ทั้งใน

อาหารเหลวและอาหารวุ้น โดยสามารถเจริญเติบโตโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว (Photoautotrophic) หรือใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในรูปของอะซิเตทในอาหารเลี้ยง โดยมีแสง

(Mixotrophic) หรือไม่ต้องมีแสง (Heterotrophic) ก็ได้ เซลล์โดยทั่วไปอยู่ในสภาพแฮพลอยด์ ซึ่งทำให้สามารถศึกษาฟีโนไทป์ได้ง่ายเมื่อเกิดการกลายพันธุ์แต่ละเซลล์จะมีแบบ การผสมพันธุ์เป็น Mating type+ หรือ Mating type- อย่างใดอย่างหนึ่งตลอดชีวิต ซึ่งจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพื่อติดตามการถ่ายทอดลักษณะในรุ่นลูกได้ (อัญชลี, 2554)



รูปที่ 2.9 สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

ที่มา : http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Chlamydomonas/Euchlamydomonas/reinhardtii/sp_02.html

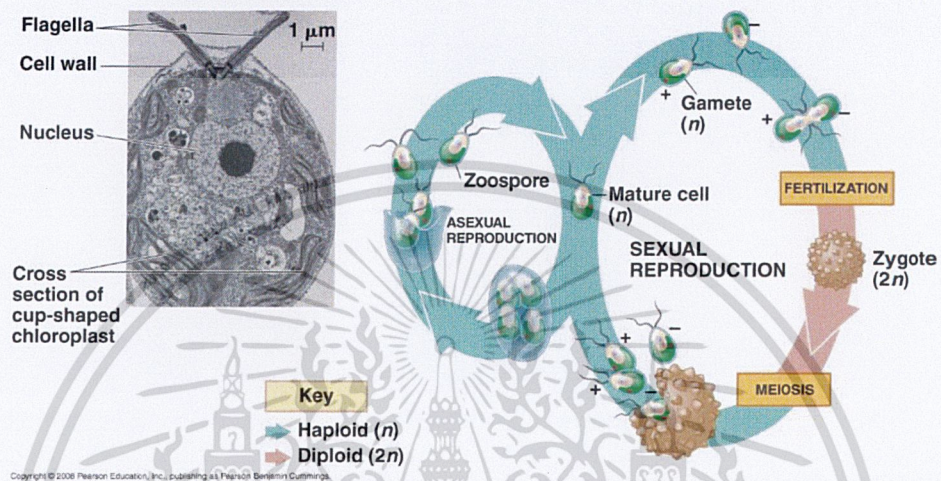
วัฏจักรชีวิตของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* แสดงในรูปที่ 2.10 โดยเริ่มจากเซลล์ในสภาพแฮพลอยด์ ซึ่งจะแบ่งเซลล์ไมโทซิสทุกๆ 8 ชั่วโมง ถ้ามีอะซิเตทในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือประมาณ 10-12 ชั่วโมง ในอาหารที่ไม่มีคาร์บอน แต่เมื่อสภาวะการเจริญไม่เหมาะสม เช่น เมื่อมีการขาดธาตุไนโตรเจน เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Gametogenesis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนให้เซลล์กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Gamete) โดยแต่ละเซลล์จะมีการสร้าง Mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (Actin) อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นจะหลั่ง Agglutinin ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีน เพื่อกระตุ้นการจับกันของแฟลกเจลลาระหว่างเซลล์ที่มี Mating type ตรงข้ามกัน โดยเริ่มจากการใช้ปลายของแฟลกเจลลามาแตะกัน จนกระทั่งแฟลกเจลลาของทั้งสองเซลล์ผสมเข้าด้วยกันทั้งสอง ทำให้เซลล์ทั้งสองเข้ามาอยู่ชิดกันและหลั่งเอนไซม์ Autolysin เพื่อย่อยผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ทั้งสองสามารถรวมตัวกันกลายเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีแฟลกเจลลา 4 สาย เมื่อแฟลกเจลลา

สลายไป เซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่มีความหนาเป็นพิเศษเพื่อปกป้องไซโกตซึ่งอยู่ในรูปดิพลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุให้แบล็กเนต และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งหากนำไปใช้

เซลล์ไมโทซิสต่อไป การที่มีวัฏจักรชีวิตคล้ายคลึงกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้ง่ายต่อการศึกษาและติดตามผล จากการกลายพันธุ์จากชั่วรุ่นหนึ่งไปอีกชั่วรุ่นหนึ่ง ทำให้สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* ได้รับชื่ออย่างไม่เป็นทางการอีกชื่อหนึ่งว่า “ยีสต์สีเขียว” (The green yeast) หรือ “ยีสต์สังเคราะห์แสง”



รูปที่ 2.10 ลักษณะและวงจรชีวิตของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*
ที่มา : <https://s-media-cacheak0.pinimg.com/originals1f.jpg>

2.7 การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ คือการจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยที่เซลล์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน (Karel และคณะ, 1985) และสามารถนำเซลล์กลับมาเวียนใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง การตรึงเซลล์เป็นเทคนิควิธีที่ถูกคิดค้นขึ้นมาในปี ค.ศ. 1989 โดย Curturan ซึ่งได้ทำการทดสอบกับเซลล์ของยีสต์เป็นครั้งแรกและต่อมาก็ได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางชีวภาพมากมายไม่ว่าจะเป็น โปรตีน เอนไซม์ แอนติบอดี สารประกอบในระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เซลล์ของพืช เซลล์ของแบคทีเรีย รา ยีสต์ และไฮยาโนแบคทีเรีย กระบวนการตรึงเซลล์นี้จะใช้สารประกอบที่มีลักษณะเป็นเจล เช่น สารประกอบพวกอัลจินเนต (Alginate) เจลาติน (Gelatin) ไคโตซาน (Chitosan) และสารประกอบจำพวกพอลิเมอร์ เช่น ไฮเลนซินิดต่างๆ (Silane) โดยสารประกอบที่เรานำมาใช้ในการตรึงเซลล์นั้นเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และไม่มีผลต่อกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ วัตถุประสงค์ของกระบวนการ

ไม่ใช่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรึงเซลล์นั้นคือเพื่อยืดอายุของเซลล์ในระยะที่มีการพักตัวให้นานขึ้นและยังเป็นผลดีต่อกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิของเซลล์และการนำเซลล์กลับมาใช้งานใหม่ (Fujimura และคณะ, 1984, Bailliez และคณะ, 1986)

หลักในการพิจารณาเลือกวัสดุและวิธีการตรึงเซลล์ที่มีความเหมาะสม

- 1) ด้านรูปร่างลักษณะภายนอก เซลล์ที่ถูกตรึงจะต้องมีความแข็งแรง ไม่เกิดการบีบอัดอนุภาคของเซลล์ที่ถูกตรึง ลักษณะพื้นผิวของเซลล์ที่ถูกตรึงต้องดี ซึ่งอาจจะมีรูปร่างหรือโครงสร้างเป็นเม็ดเจล เส้นใย หรือเป็นแผ่น และจะต้องคำนึงถึงขนาดของความพรุน ปริมาตรของช่องว่างของเซลล์ที่ถูกตรึง การเป็นเยื่อเลือกผ่าน ความหนาแน่น ช่องว่างที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ถูกตรึง อัตราการไหลและแรงดันในการหยดเม็ดเจล
- 2) ด้านเคมี จะต้องคำนึงถึงความสามารถในการละลายน้ำ (การจับตัวของโมเลกุลของน้ำกับวัสดุตรึง) การยึดจับกันของเซลล์กับวัสดุตรึง การเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสารประกอบที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่ผ่านการตรึง การเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์เมื่อนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ซ้ำอีกครั้ง
- 3) ด้านความคงตัว จะต้องมีความคงตัว สามารถเก็บเซลล์ที่เราตรึงเอาไว้โดยที่ประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ยังมีอยู่ สามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้งานได้อีกโดยที่ประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ก็ยังเหลืออยู่ และเก็บรักษาเซลล์ให้ยังมีชีวิตอยู่ได้
- 4) ด้านการต้านทาน ป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์จากเชื้อโรคที่มีอันตรายต่อเซลล์และป้องกันสารเคมีต่างๆ ที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์โดยจะไปมีผลต่อกลไกการทำงานของเซลล์
- 5) ด้านความปลอดภัย จะต้องเป็นมิตรต่อสิ่งมีชีวิต ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยสารที่นำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์และผลจากปฏิกิริยาที่เกิดจากการตรึงเซลล์จะต้องไม่เกิดเป็นสารพิษ โดยเฉพาะกระบวนการตรึงเซลล์ที่ใช้เพื่อในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ อาหาร และยา จะต้องปราศจากการปนเปื้อนของสารพิษ
- 6) ด้านค่าใช้จ่าย ราคาของวัสดุที่เราจะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์จะเป็นวัสดุที่มีราคาถูก นอกจากนี้ วิธีในการเตรียมสารที่จะใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์จะต้องไม่ยุ่งยากหรือเสียเวลามาก และที่สำคัญนอกจากสารที่เราใช้จะต้องมีราคาถูกแล้ว ยังจะต้องมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7) ด้านผลกระทบจากการเกิดปฏิกิริยาอัตรากาโรไลในขั้นตอนการโพลีเมอไรเซชัน การตรึงเซลล์ การเกิดปฏิกิริยาของเซลล์ในการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาทางกลศาสตร์ ปฏิกิริยาข้างเคียงที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิต ล้วนมีผลมาจากวัสดุตรึงและวิธีการตรึงแทบทั้งสิ้น

2.7.1 ชนิดของการตรึงเซลล์

กระบวนการตรึงเซลล์นั้นสามารถแบ่งออกได้หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีจะขึ้นรูปแบบการยึดจับกันของเซลล์กับวัสดุตรึงซึ่งแบ่งออกได้ ดังต่อไปนี้

1) การตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ

กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ (Adsorption) วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและมีราคาถูก เนื่องจากจุลินทรีย์อยู่ในสภาพธรรมชาติ ส่วนใหญ่ไม่ได้อยู่ในสภาพอิสระ มักจะเจริญอยู่บนผิวของของแข็ง เช่น จุลินทรีย์ที่อยู่บนดิน จุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ และ *Rhizobium* ที่จับกันที่รากของพืชตระกูลถั่ว เป็นต้น วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยการดูดซับนี้ เป็นการนำจุลินทรีย์หรือสปอร์มาตรึงบนผิวของวัสดุตรึง โดยการบรรจุวัสดุตรึงเข้าไปในคอลัมน์ แล้วปล่อยให้สารแขวนลอยของเซลล์ไหลผ่านจนกระทั่งจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรของสารที่ไหลออกมามีค่าคงที่ หรืออาจทำโดยการผสมสารตรึงเซลล์เข้ากับเซลล์ แล้วเขย่าจนกระทั่งจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรในของเหลวมีค่าคงที่

กระบวนการตรึงเซลล์วิธีนี้ จะเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์กับสารที่ใช้เป็นวัสดุตรึง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้สามารถผันกลับได้โดยพันธะที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็นพันธะที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายขนถ่ายอิเล็กตรอน เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ (Vanderwaal force) แรงไอออนิก (Ionic force) และแรงของพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen) นอกจากนี้ ยังอาจพบแรงที่เกิดจากพันธะแบบไม่มีขั้ว ซึ่งแรงของพันธะเหล่านี้เป็นแรงที่อ่อนมาก จึงสามารถทำให้ปฏิกิริยาของวัสดุตรึงกับโครงสร้างของเยื่อหุ้มหรือผนังเซลล์หลุดออกจากกันได้ แต่ถ้าทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวอย่างรุนแรงก็อาจจะป้องกันสภาวะนี้ได้ ตัวอย่างเช่น เซลล์ยีสต์ซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นประจุลบ จึงควรใช้วัสดุตรึงที่มีประจุเป็นบวกในการตรึงเซลล์ยีสต์ การตรึงเซลล์ในลักษณะนี้แสดงดังรูปที่ 2.11 (A)

2) การยึดจับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์

กระบวนการตรึงเซลล์ด้วยการยึดจับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding) วิธีนี้เป็นการทำให้เซลล์จับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยจะเกิดพันธะขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชัน

ไม่ว่าการณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสารเคมีของวัสดุที่ใช้ตรงกับหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งพันธะที่เกิดขึ้นจะเป็นพันธะที่เกิดขึ้นอย่างคงที่และเหมาะสม พันธะโควาเลนต์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นระหว่างพื้นผิวด้านนอกของเซลล์ ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกโปรตีนหรืออนุพันธ์ของโปรตีน ได้แก่ หมู่อะมิโน (NH_2) ของกรดอะมิโนไลซีนหรืออาร์จินีน หมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) ของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกหรือกลูตามิก หมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของกรดอะมิโนเซอรีนหรือทรีโอนีน และหมู่อัลไธริล (SH) ของกรดอะมิโนซิสเทอีน ส่วนสารที่ใช้เป็นวัสดุตรงนั้นส่วนใหญ่แล้วจะเป็นสารสังเคราะห์ หลักการเลือกวัสดุตรงโดยการยึดจับด้วยพันธะโควาเลนต์นั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการตรึงเซลล์ ส่วนรูปแบบการเชื่อมโยงพันธะของวัสดุตรงกับพื้นผิวด้านนอกของเซลล์จะเกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ชนิดต่างๆ ได้แก่ การเชื่อมกันแบบไอโซยูเรีย (Isourea linkage) การเชื่อมกันแบบไดอะโซ (Diaso linkage) การเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide linkage) และการเชื่อมกันโดยการเกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน (Alkylation reaction) ซึ่งการจับกันโดยพันธะโควาเลนต์นี้จะทำให้เซลล์เจริญได้ในอัตราที่ช้าและตายในที่สุด การตรึงเซลล์ในลักษณะนี้แสดงดังรูปที่ 2.11 (B)

3) การตรึงเซลล์โดยการยึดจับ

กระบวนการตรึงเซลล์โดยการยึดจับ (Entrapment) วิธีนี้จะแตกต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพและการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับด้วยพันธะโควาเลนต์ตรงที่เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความเป็นอิสระจากสารละลาย แต่จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โครงสร้างมีลักษณะเป็นตาข่ายเจล ซึ่งช่องว่างของร่างตาข่ายเจลที่เกิดขึ้นจะถูกควบคุมโดยโครงสร้างของเจลที่ยึดจับกับเซลล์อย่างแน่นหนาเพื่อป้องกันการรั่วหลุดของเซลล์ที่ถูกตรึง และรูที่เกิดขึ้นก็ยังคงช่วยให้อาหารและผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่เข้าออกจากเซลล์ได้อย่างอิสระ ส่วนตัววัสดุที่ใช้ตรงนั้นสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับสารที่เคลื่อนที่ไปมาระหว่างเซลล์ ซึ่งบางที่อาจจะมีผลกระทบอย่างมากต่อค่ากลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์ แต่บางที่สภาวะเช่นนี้ก็อาจจะเป็นผลดีต่อเซลล์ที่ถูกตรึง เนื่องจากวัสดุที่ตรงสามารถที่จะป้องกันสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การตรึงเซลล์ในลักษณะนี้แสดงดังรูปที่ 2.11 (C)

สำหรับวิธีการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะมีขั้นตอนและทฤษฎีการตรึงเซลล์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์ เช่น อัลจินเตมีการก่อตัวเป็นเจลโดยการทำปฏิกิริยากันระหว่างประจุบวกและประจุลบของสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ อะกาโรสและเจลาตินมีการใช้อุณหภูมิในการเหนี่ยวนำให้เกิดเจล โดยสารที่เป็นวัสดุตรง เมื่อเย็นตัวลงแล้วจะเกิดเป็นเม็ดเจล การเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของสารอินทรีย์หรือปฏิกิริยาโฟโตเคมีคอลของพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) และเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เฉพาะในโครงการวิจัยเท่านั้น การค้า
ไม่ว่า การตักตะกอนในสารละลายที่ทำให้ตัวถูกละลายตกตะกอนของพอลิสไตรีน (Polystyrene) การนำไปใช้

4) การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน

กระบวนการตรึงเซลล์โดยการเชื่อมไขว้กัน (Crosslinking) วิธีนี้วัสดุตรึงจะเป็นอิสระและจะมีการเชื่อมต่อกันของเซลล์แต่ละเซลล์กับวัสดุตรึงที่ยึดจับกับเซลล์อีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งจะยึดจับกันเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ในลักษณะที่เป็นการเชื่อมพันธะไขว้กันโดยจะมีโครงสร้างเป็นลักษณะสามมิติเชิงซ้อน และสามารถเชื่อมกันได้ทั้งแบบกายภาพและเคมี โดยทฤษฎีทางเคมีนั้นจะเป็นการเชื่อมไขว้กันโดยพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์ ซึ่งจะเชื่อมกับสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 ตำแหน่งหรือมากกว่า เช่น กลูตาราลดีไฮด์ และทูลูอินไดไฮโดรไซยาเนต แต่เนื่องจากสารเหล่านี้มีความเป็นพิษสูงจึงไม่นิยมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการตรึง

ส่วนกระบวนการเชื่อมไขว้ทางกายภาพนั้น จะเชื่อมไขว้เซลล์จนเกิดเป็นโครงสร้างที่เกาะกลุ่มกัน จึงเป็นวิธีการที่ดีสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ และยังเป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูง การทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มกัน (Flocculation) นั้นจะต้องเติมสารเพื่อให้เกิดการเหนี่ยวนำการจับเกาะกลุ่มกันของเซลล์ ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ พอลิเอทิลีนเอไมด์ พอลิไดรีนซิลฟอเนต และสารฟอสเฟต ฯลฯ กระบวนการเชื่อมไขว้ถือเป็นกระบวนการตรึงเซลล์เนื่องจากเป็นกระบวนการจำกัดการเคลื่อนที่ของเซลล์และเป็นการเพิ่มความอยู่ตัวของเซลล์ นอกจากนี้ กระบวนการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการตรึงเซลล์วิธีอื่น คือ สามารถที่จะลดการรั่วของเซลล์ได้ เนื่องจากเซลล์เกิดการยึดเกาะกันอย่างเหนียวแน่น การตรึงเซลล์ในลักษณะนี้แสดงดังรูปที่ 2.11 (D)

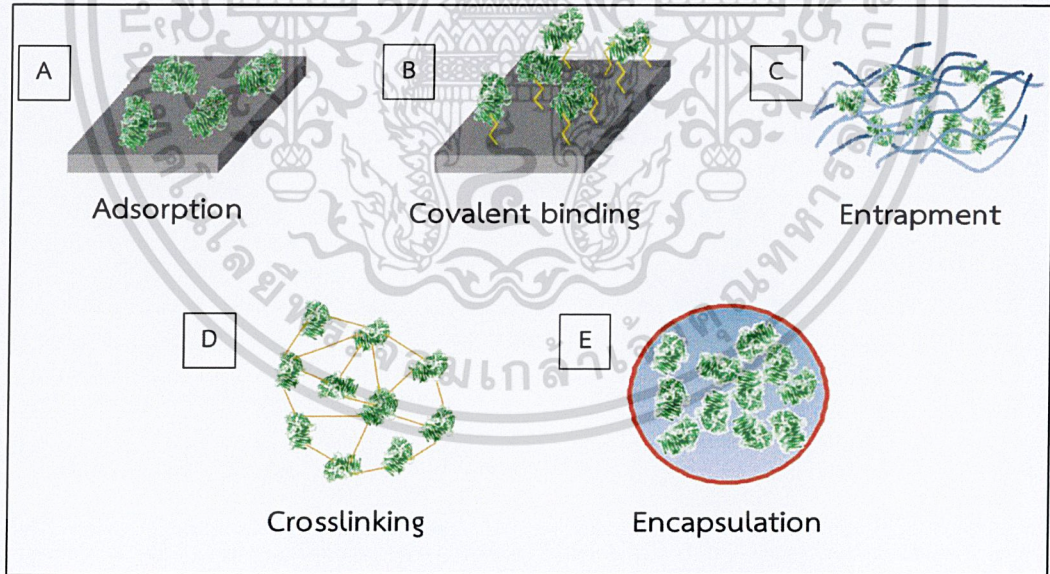
5) การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึง

กระบวนการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึง (Encapsulation) วิธีนี้เป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ โดยอาศัยการล้อมรอบเซลล์จุลินทรีย์ไว้ภายในโครงสร้างตาข่ายของเจล สามารถทำได้โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึงที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่านคล้ายๆ กับการตรึงเซลล์โดยวิธีการยึดจับเซลล์กับวัสดุตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงจะเป็นอิสระจากสารละลาย (Entrapment) แต่จะแตกต่างกันตรงที่เซลล์ที่ตรึงโดยวิธีนี้จะไม่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ การที่เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในลักษณะที่เป็นเมตนั้น จะทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านแผ่นเยื่อเลือกผ่านของวัสดุตรึงได้ ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กนั้น สามารถเคลื่อนที่เข้าออกจากเมตเจลได้อย่างอิสระ ซึ่งมีการนำวัสดุจำนวนมากมาใช้เพื่อให้เกิดการก่อตัวขึ้นเป็นเมตเจล โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10 ถึง 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ในเชิงพาณิชย์ การค้า
ไมโครเมตร สารที่ใช้ ได้แก่ ไนลอน เซลลูโลสไนเตรต ฯลฯ การตรึงเซลล์โดยวิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแพร่ของสาร การรวมตัวของผลิตภัณฑ์ และจะมีสภาวะความหนาแน่นคล้ายๆ กับสารละลาย ซึ่งจะมีผลต่อสภาวะภายนอกของถังหมัก กลศาสตร์การไหลและสภาวะอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องอีกมากมาย กระบวนการตรึงเซลล์ในลักษณะนี้มีความคล้ายกับทฤษฎีการแพร่แบบออสโมซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดง (รูปที่ 2.11) (E)

กระบวนการตรึงเซลล์เป็นการเพิ่มการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเซลล์และยังเพิ่มคุณสมบัติในการดูดซับสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรดต่าง ความเข้มข้นของประจุ และช่วงระยะเวลาที่ทำการบ่ม ซึ่งผลของวัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์และการชะล้างเซลล์หลายๆ ครั้งจะไม่มีผลต่อพันธะของสารประกอบทางชีวภาพ ทำให้มีการทำลายเซลล์น้อย ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของวัสดุตรึงกับเซลล์ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับ คือ พีเอช พันผิว อายุของเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการจับกับวัสดุตรึงแปรไปตามอายุและสภาวะแวดล้อมของเซลล์ ส่วนข้อเสียของวิธีการนี้คือ เกิดการรั่วของเซลล์ของวัสดุตรึงกับเซลล์ที่ถูกตรึง จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดการปนเปื้อน การจับกันของหมู่เคมีของเซลล์กับวัสดุตรึง ปริมาณของวัสดุตรึงที่ห่อหุ้มเซลล์มีมากเกินไป จึงทำให้เกิดการกีดขวางการดูดซับสารอาหารของเซลล์



รูปที่ 2.11 รูปแบบของการตรึงเซลล์แบบต่างๆ ได้แก่ การตรึงเซลล์โดยวิธีการดูดซับ (Adsorption) (A) การตรึงเซลล์โดยการยึดจับกับวัสดุตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding) (B) การตรึงเซลล์โดยการยึดจับ (Entrapment) (C) การตรึงเซลล์โดยการเชื่อมโยงกัน (Crosslinking) (D) และการตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ในวัสดุตรึง (Encapsulation) (E)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดยเจ้าของสิทธิ์ในเอกสารฉบับนี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://www.franciscoploulab.eu/p/research-lines.html> ที่มีการนำไปใช้

2.7.2 วัสดุจริง

วัสดุที่สามารถใช้ในการตรึงเซลล์ ได้แก่

ก. พอลิอะคริลาไมด์เจล เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ แต่เป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ เนื่องจากปฏิกิริยาการพอลิเมอร์เซชันเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน อาจทำให้จุลินทรีย์บางชนิดตายได้ โดยทั่วไป จะป้องกันด้วยการทำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ (เช่นสารละลายในน้ำแข็ง)

ข. คอลลาเจน เป็นโปรตีนเส้นใย กระจายได้ดีเมื่ออยู่สารละลายที่พีเอช 2.5-4.5 คอลลาเจนกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะไอออนิก

ค. เจลาติน เป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์คอลลาเจน ถูกนำมาใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

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

จ. เคปฮา-คาร์ราจีแนน เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดงสกุล *Euclima* มีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วย 3,6-anhydro-D-galactose เชื่อมต่อกับ D-galactose-4-sulfate ด้วยพันธะ 1,4 แบบไกลโคซิดิก

ฉ. ไคโตแซน คือ อนุพันธ์ของไคตินที่มีหมู่อะซิติลบางส่วนถูกจัดออกไปด้วยการไฮโดรไลซ์ด้วยด่างเข้มข้น ละลายได้ในกรดอินทรีย์เจือจางที่มีพีเอชต่ำกว่า 6 เกิดจากการจับอออนตรงข้ามเป็นเจล

ช. แคลเซียมอัลจินเต กรดอัลจินิกเป็นโคพอลิเมอร์ของกรดแมนูโรนิกที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-ดี (1,4) ไกลโคซิดิก ถูกสกัดออกมาจากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Laminaria* ด้วยน้ำร้อนที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์เล็กน้อย

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยอัลจินเตนั้น ทำได้โดยการดูดสารผสมของเซลล์ (1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเซลล์เปียก) กับโซเดียมอัลจินเต (1-7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ผ่านกระบอกฉีดยาแล้วปล่อยให้หยดลงสู่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05-0.5 โมลาร์ที่เย็นปล่อยให้เม็ดเจลเอกสารอยู่ในสารละลายนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้แคลเซียมไอออนเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออน ความแข็งของเม็ดกระดาษไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของโซเดียมอัลจิเนต ซึ่งถ้าใช้ชนิดที่มีอัตราส่วนของกรดกลูโรนิก ต่อแมนูโรนิกสูง ก็จะกลายเป็นเม็ดเจลที่มีความเสถียรสูง จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตในเม็ดเจลได้ เนื่องจากโครงสร้างของเม็ดเจลที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตเป็นโครงสร้างร่างตาข่ายที่เกิดจากการจับตัวกันในไอออนของตัววัสดุตรึงกับสารที่ช่วยก่อตัวเป็นเม็ดเจลของอัลจิเนต (CaCl_2) และยังมีไอออนสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วย จึงทำให้เซลล์ที่อยู่ในเม็ดเจลจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ และเกิดเป็นช่องเล็กทำให้โมเลกุลของสารอาหาร อากาศ และผลิตภัณฑ์ที่เซลล์ผลิตขึ้นเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกจากเม็ดเจลได้ทำให้เซลล์ได้รับสารอาหารและปล่อยผลิตภัณฑ์ที่เซลล์ผลิตขึ้นได้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Laurinavichene และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่ตรึงกับแก้วอะลูมิเนียมโบโรซิลิเกต โดยเลี้ยงสาหร่ายไว้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 160 มิลลิลิตรในสภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์ จากการทดลองพบว่า การขาดซัลเฟอร์เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึง ซึ่งปริมาณไฮโดรเจนสูงสุดที่ผลิตได้ทั้งหมดเป็น 380 มิลลิลิตร ในระยะเวลามากกว่า 23 วัน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเป็น 45 มิลลิลิตรต่อวัน

Hahn และคณะ (2007) ศึกษาการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ต่อการผลิตไฮโดรเจน เซลล์สาหร่ายจะยึดเกาะกับอนุภาคของแข็ง ซึ่งวัสดุตรึงที่ถูกนำมาใช้คือ ซิลิกา เนื่องจากเป็นวัสดุที่ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายในสภาวะที่ปริมาณซัลเฟอร์สูง จากผลการทดลองพบว่า ไฮโดรเจนที่ผลิตจากเซลล์ตรึงมีปริมาณใกล้เคียงกับเซลล์อิสระ

Kosourov และ Seibert (2008) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่ปราศจากธาตุอาหารของเซลล์ตรึง *C. reinhardtii* CC-124 ในฟิล์มอัลจิเนต ภายใต้สภาวะมือออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยทำการตรึงเซลล์ในแผ่นฟิล์มอัลจิเนตบาง (น้อยกว่า 400 ไมโครเมตร) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส จากการทดลองพบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนจำเพาะเพิ่มสูงขึ้นถึง 12.5 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าการตรึงเซลล์ช่วยลดการรบกวนจากออกซิเจนในการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากคุณสมบัติของอัลจิเนตจะแยกเซลล์ที่ถูกตรึงจากออกซิเจนในอาหาร และบริเวณ Headspace รวมทั้งช่วยจำกัดการแพร่ของออกซิเจนเข้าสู่เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Song และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอะการ โดยขั้นแรกจะบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต จากนั้นจึงบ่มในสภาวะไร้อากาศและขาดซัลเฟอร์เพื่อให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจน จากผลการทดลองพบว่า การเติมกลูโคสจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจน (ไม่เกิน 30 มิลลิโมลาร์) และการเพิ่มอุณหภูมิทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นจาก 183 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็น 238 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 37 องศาเซลเซียส เป็น 40 องศาเซลเซียส

Antal และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. reinhardtii* ภายใต้สภาวะขาดซัลเฟอร์ เพื่อตรวจสอบผลของความเข้มแสงและค่าพีเอชเริ่มต้น จากผลการทดลองพบว่า การตรึงเซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* ในแผ่นฟิล์มอัลจินเตตช่วยเพิ่มระยะเวลาการบ่มในการผลิตไฮโดรเจนได้นานถึง 3 สัปดาห์ และความเข้มแสงที่เหมาะสมกับเซลล์ตรึงในการผลิตไฮโดรเจนจะอยู่ที่ 80 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ซึ่งปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้เป็น 0.8 มิลลิโมลต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจะอยู่ในช่วง 6.5-7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายสีเขียวที่ใช้ในโครงการพิเศษ

Chlamydomonas reinhardtii CC-124 จาก Chlamydomonas Resource Center
ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP (Tris Acetate Phosphate medium) (Harris, 1989)
(ภาคผนวก ก)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.3.1.1 กรดกลacialอะซิติก (Glacial acetic acid)
- 3.3.1.2 กรดบอริก (H_3BO_3)
- 3.3.1.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 3.3.1.4 คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)
- 3.3.1.5 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- 3.3.1.6 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- 3.3.1.7 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)
- 3.3.1.8 ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)
- 3.3.1.9 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 3.3.1.10 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 3.3.1.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.3.1.12 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)
- 3.3.1.13 ไดอะมีโนอีเทนเตตระอะซิติกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Na_2EDTA)
- 3.3.1.14 ทริสเบส (Tris base)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 3.3.1.15 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.1.16 เฟอร์ริคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.1.17 เฟอร์ริซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.1.18 แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.1.19 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.1.20 แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 3.3.1.21 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์

- 3.3.2.1 อัลจิเนต (Alginate) (Analytical grade, Sigma, USA)
- 3.3.2.2 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) (Analytical grade, Analar®, England)
- 3.3.2.3 อะการ์ (Agar) (Analytical grade, Difco, USA)
- 3.3.2.4 อะการ์โรส (Agarose) (Analytical grade, Research organics, USA)

3.3.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์คลอโรฟิลล์

- อะซีโตน (CH_3COCH_3) (Analytical grade, Fisher Scientific, England)

3.3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

- 3.3.4.1 ก๊าซอาร์กอน (ความบริสุทธิ์ 99.999 เปอร์เซ็นต์) (Praxair, Thailand)
- 3.3.4.2 ก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (Thonburiwattana, Thailand)
- 3.3.4.3 ก๊าซออกซิเจน

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 กระจกบอดวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
- 3.4.2 กระจกกรอง GFC (Glass Microfiber Filters) (GE Healthcare companies, UK)
- 3.4.3 กระจกฉีดยา (Syring)
- 3.4.4 ขวดแก้ว (Glass-vial) ขนาด 21 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด
- 3.4.5 เข็มฉีดก๊าซ (Syring) (Scientific Glass Engineering, Australia)
- 3.4.6 คิวเวตควอตซ์ (Semi-micro Quartz cuvette) (Starna Scientific, UK)

เอกสารนี้เป็น 3.4.7 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares) (Pyrex, USA) อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.8 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (Gas Chromatograph-Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)) (Hewlett-Packard, HP5890A GC, Japan)
- 3.4.9 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)
- 3.4.10 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.4.11 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan)
- 3.4.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 3.4.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Hermle Labortechnik Z38K, Germany)
- 3.4.14 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Genies-2, Scientific Industries, USA)
- 3.4.15 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.4.16 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-601, Japan)
- 3.4.17 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) (Vision VS130SH, Korea)
- 3.4.18 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.4.19 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.4.20 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.4.21 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.4.22 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Heto Agrotechnics, Denmark)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวเพื่อใช้เป็น Starter เริ่มจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวบนจานอาหารแข็ง TAP (ภาคผนวก ก) จากนั้น จึงนำโคลนเดี่ยว 1 โคลนบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้
 36 ชั่วโมง ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 วิธีการตรึงเซลล์

3.5.2.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

นำเซลล์แขวนลอยของสายรหัสจีโนมมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.1 เพาะเลี้ยงสายรหัสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใส่ที่ล้างเซลล์ด้วยอาหารทดสอบ 3 ครั้ง และกระจายเซลล์ในอาหารทดสอบ

3.5.2.2 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงด้วยอัลจินเต

3.5.2.2.1 ขั้นตอนการเตรียมแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 7.351 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ โดยให้ความร้อนที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.2.2.2 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุตรึง

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจินเต 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยการชั่งโซเดียมอัลจินเต 1.5 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP หรือ TAP-S ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการละลายโซเดียมอัลจินเตโดยต้มให้โซเดียมอัลจินเตละลายจนหมดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ โดยให้ความร้อนที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.2.2.3 ขั้นตอนการหยดเจล

นำเซลล์แขวนลอยจากข้อ 3.5.2.1 ที่ผ่านการล้างและกระจายเซลล์ด้วยอาหารทดสอบมา ผสมกับวัสดุตรึงคือ โซเดียมอัลจินเตจากข้อ 3.5.2.2.2 โดยอัตราส่วนเซลล์แขวนลอยต่อสารละลายโซเดียมอัลจินเตเป็น 1 ต่อ 9 ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดเจล ปริมาตร 6 มิลลิลิตร หยดลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งหนึ่งหยดเจลเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
1 เม็ดเจลของเซลล์ที่ถูกตรึง หลังจากนั้นทำการล้างเม็ดเจล ที่ตรึงได้ในอาหารทดสอบ และตักเม็ดเจล

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่ขวดแก้วขนาด 21 มิลลิลิตร ใส่อาหารทดสอบให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) 5 มิลลิลิตร จากนั้น ปิดฝาขวด นำไปวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

3.5.2.3 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ตรึงด้วยอะการ์และอะกาโรส

3.5.2.3.1 การเตรียมอะการ์และอะกาโรส

เตรียมอะการ์และอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งวุ้น 0.45 กรัม ใส่ลงในอาหารทดสอบ 27 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ โดยให้ความร้อนที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.2.3.2 ขั้นตอนการตัดวุ้น

นำเซลล์แขวนลอยจากข้อ 3.5.2.1 ที่ผ่านการล้างด้วยอาหารทดสอบมาผสมกับวัสดุตรึงคือ อะการ์และอะกาโรส จากข้อ 3.5.2.3.1 โดยอัตราส่วนเซลล์แขวนลอยต่อเจลวุ้นทั้งหมดเป็น 1 ต่อ 9 ผสมโดยนำไป vortex จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น นำสารละลายที่ผสมแล้ว เทใส่ในเพลทรอให้วุ้นแห้ง ทำการตัดวุ้นให้เป็นสี่เหลี่ยมปริมาตร 0.125 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตักวุ้นทั้งหมดใส่ขวดแก้วขนาด 21 มิลลิลิตร ใส่อาหารทดสอบให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาขวด นำไปวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจน

3.5.2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึง

นำเซลล์ที่ถูกตรึงไปบ่ม โดยนำขวดไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.5.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

นำเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงมาทำการไล่อากาศ โดยพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ตูดก๊าซบริเวณช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph) ซึ่งการทดลองนี้จะใช้แก๊สไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐาน สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซแสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีเทอร์มอลคอนดักทีวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromatograph – Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)]

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Packed SS Column 2m x 4mm OD x 3mm ID p/w Molecular sieve 5 °A mesh 60/80
Detector	Thermal Conductivity Detector (TCD)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Column temperature : 50 °C Detector temperature : 100 °C
Carrier gas	Argon flow rate 20 ml/min (99.999 % purity)

3.5.4 วิธีการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

อบกระดาษกรองที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง นำกระดาษกรองไปทำขั้นตอนนี้ซ้ำจนได้น้ำหนักกระดาษกรองที่คงที่ นำเซลล์แขวนลอยมากรองผ่านกระดาษกรอง โดยใช้ตัวกรองและบีบดูดอากาศ หลังจากนั้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งหลังอบ คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.5 วิธีการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

เจือจางสารละลายเซลล์ด้วยอาหารทดสอบ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยดูดเซลล์แขวนลอย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น ดูดส่วนใสออก 900 ไมโครลิตร และเติมอะซีโตน 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสไปวัดปริมาณคลอโรฟิลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร และ 647 นาโนเมตร คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดตามวิธีของ Jeffrey และ Humphrey, 1975

3.5.6 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงครบตามเวลาที่กำหนด จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำเซลล์มากระจายในอาหาร TAP และ TAP-S (อาหาร TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์) จากนั้น นำเซลล์มาตรึงเซลล์ด้วยวัสดุตรึงที่เหมาะสม นำเซลล์ตรึงมาใส่ขวดแก้วปริมาตร 21 มิลลิลิตร ใส่อาหารทดสอบให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) 5 มิลลิลิตร จากนั้น ปิดฝาขวด ไล่อากาศด้วยการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.5.7 วิธีการศึกษาผลของความเข้มข้นของวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายในอาหาร TAP และ TAP-S (อาหาร TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์) นำเซลล์มาตรึงด้วยวัสดุตรึงที่เหมาะสม โดยแปรผันความเข้มข้นของวัสดุตรึง นำเซลล์ตรึงมาใส่ขวดแก้วปริมาตร 21 มิลลิลิตร ใส่อาหารทดสอบให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) 5 มิลลิลิตร จากนั้น ปิดฝาขวด ไล่อากาศด้วยการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

3.5.8 วิธีการศึกษาผลของขนาดวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำมากระจายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า อาหาร TAP และ TAP-S (อาหาร TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์) นำเซลล์มาตรึงด้วยวัสดุตรึงที่เหมาะสม ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และความเข้มข้นของวัสดุรีงที่เหมาะสมนำเซลล์มารีงด้วยวัสดุรีงที่เหมาะสม โดยแปรผันความเข้มข้นของวัสดุรีง นำเซลล์รีงมาใส่ขวดแก้วปริมาตร 21 มิลลิลิตร ใส่อาหารทดสอบให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) 5 มิลลิลิตร จากนั้น ปิดฝาขวด ไล่อากาศด้วยการพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน โดยเริ่มจากการศึกษาชนิดของวัสดุตรึงที่เหมาะสม ต่อการผลิตไฮโดรเจน รวมทั้งผลของชนิดอาหารที่ใช้บ่ม ได้แก่ อาหารเหลว TAP สูตรปกติ และ อาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) ต่อการผลิตไฮโดรเจน จากนั้น ทำการตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในวัสดุตรึงที่คัดเลือกและเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม เพื่อศึกษาผลของอายุเซลล์ ความเข้มข้นของวัสดุตรึงและขนาดวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจน

4.1 ผลของชนิดวัสดุตรึงและชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

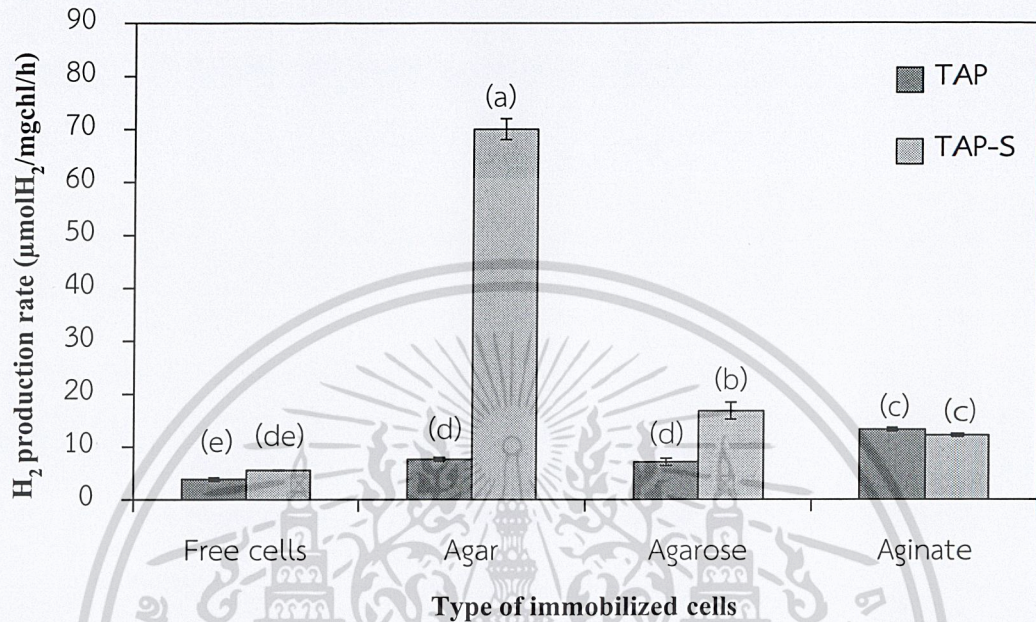
จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์และกระจายในอาหาร TAP และ TAP-S จากนั้นทำการตรึงเซลล์โดยใช้วัสดุตรึง 3 ชนิด คือ อัลจิเนต อะกาโรส และ อะการ์

นำเซลล์ตรึงไปบ่มในอาหาร TAP และ TAP-S ฟันอาร์กอนเพื่อไล่อากาศภายในขวด นำก๊าซบริเวณ Headspace มาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีในช่วงเวลาที่ 2, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง โดยมีเซลล์อิสระเป็นตัวเปรียบเทียบ จากการทดลองพบว่าเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเซลล์อิสระอย่างเห็นได้ชัด เซลล์ตรึงและเซลล์อิสระผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้นเมื่อบ่มในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ในอาหาร TAP-S (รูปที่ 4.1) เซลล์สาหร่ายที่ตรึงในอะการ์ในอาหาร TAP-S จะให้อัตราการผลิตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 70.02 ± 1.98 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง

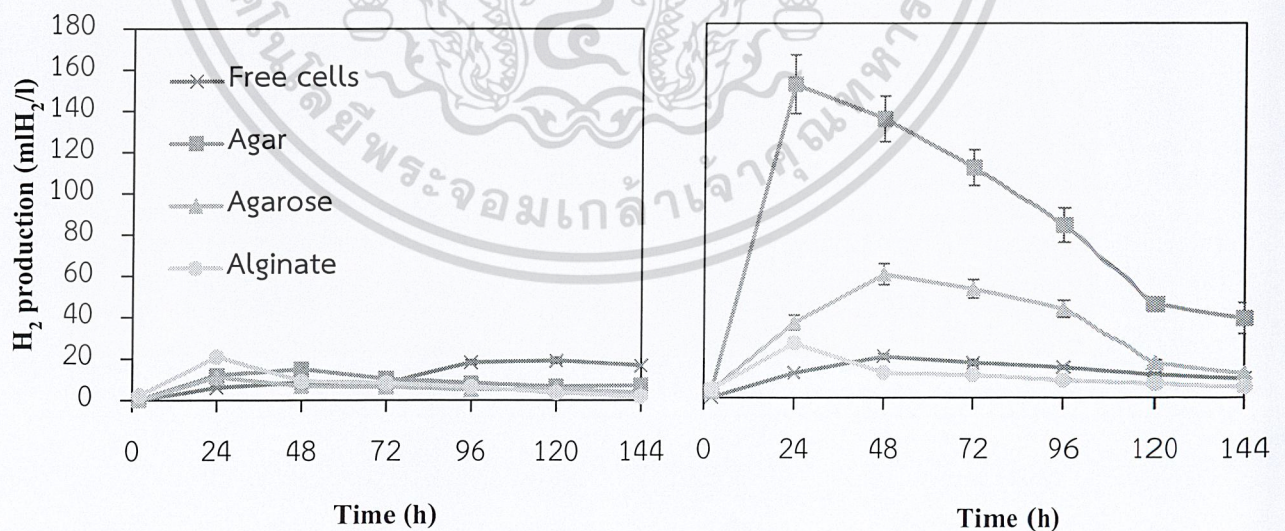
เมื่อศึกษาปริมาณไฮโดรเจนสะสมในเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระในอาหาร TAP และอาหาร TAP-S เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่า ในอาหาร TAP เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงผลิตไฮโดรเจนในปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
น้อยตลอดระยะเวลาของการบ่ม ในขณะที่เซลล์ตรึงในอะการ์ในอาหาร TAP-S ผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง 24 ของการบ่มหลังจากนั้น ปริมาณไฮโดรเจนจะลดลง (รูปที่ 4.2) ปริมาณไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระในอาหาร TAP และ TAP-S ที่ชั่วโมงที่ 24 ในหน่วยต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่ชั่วโมง 24 ในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ และอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) เทียบกับเซลล์อิสระ



รูปที่ 4.2 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่เวลาชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว

C. reinhardtii CC-124 ในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ (A) และอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (TAP-S) (B)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ และอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S)

Type of immobilized cells	Medium	Hydrogen production (\pm SD)		
		$\mu\text{molH}_2/\text{mgchl}$	$\mu\text{molH}_2/\text{mgdw}$	mlH_2/L
Free cells	TAP	92.98 \pm 8.06	0.34 \pm 0.03	6.12 \pm 0.60
Agar - immobilized cells		183.04 \pm 8.74	0.67 \pm 0.07	12.04 \pm 1.20
Agarose - immobilized cells		170.91 \pm 17.10	0.63 \pm 0.06	11.26 \pm 1.12
Alginate - immobilized cells		318.12 \pm 9.32	1.17 \pm 0.03	20.94 \pm 0.62
Free cells	TAP-S	133.70 \pm 1.79	0.67 \pm 0.01	11.98 \pm 0.16
Agar - immobilized cells		1,680.44 \pm 47.60	8.40 \pm 0.83	150.56 \pm 14.10
Agarose - immobilized cells		402.98 \pm 38.85	2.02 \pm 0.19	36.10 \pm 3.48
Alginate - immobilized cells		292.49 \pm 7.03	1.46 \pm 0.04	26.20 \pm 0.64

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการขาดซัลเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึง เนื่องจากซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนเมไทโอนีน และซิสเทอีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญต่อโปรตีนในระบบแสงสอง (PS II) การขาดซัลเฟอร์ทำให้การทำงานของระบบแสงสองถูกขัดขวาง ส่งผลให้การผลิตออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการแตกตัวของน้ำลดลง (Zhang และคณะ, 2002) ออกซิเจนบางส่วนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย เมื่ออัตราการใช้ออกซิเจนในเซลล์เพิ่มสูงกว่าอัตราการผลิตออกซิเจน ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย ดังนั้นเซลล์จึงใช้อิเล็กตรอนที่ได้จากการย่อยสลายแป้งภายในเซลล์ในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งการตรึงเซลล์ถือเป็นการจำกัดขอบเขตของเซลล์ให้อยู่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง ทำให้ความต้องการพลังงานของเซลล์ลดลง และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะขาดซัลเฟอร์ จะมีการสะสมของแป้งโดยพบว่าในเซลล์ตรึงมีการสะสมของแป้งสูงกว่าในเซลล์อิสระ (Antal และคณะ, 2014) แป้งถือเป็นแหล่งอิเล็กตรอนในการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้เซลล์ตรึงผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

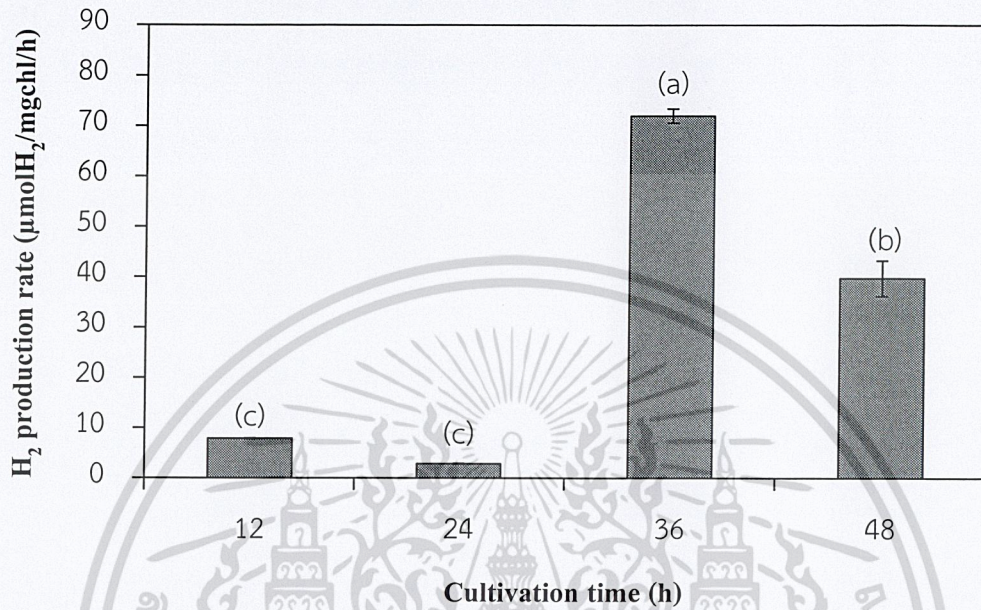
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองศึกษาวัสดุที่ตรงที่เหมาะสม โดยวัสดุที่ตรงแต่ละชนิดจะมีหลักการตรงเซลล์ที่เหมือนกันคือ การตรงเซลล์แบบห่อหุ้มเซลล์ไว้ในโครงร่างตาข่ายเจลของวัสดุที่ตรง ซึ่งเซลล์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้หรือที่เรียกว่า Entrapment แต่ในวัสดุที่ตรงแต่ละชนิดจะมีหลักการเกิดเจลที่ต่างกัน เซลล์ที่ตรงด้วยอัลจินเตจจะรวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกับวัสดุที่ตรง โดยมีอาหารผสมอยู่ และเมื่อนำมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จะเกิดการก่อตัวเป็นเม็ดเจลซึ่งเกิดจากการจับกันของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) กับสายพอลิเมอร์ของอัลจินเตจ โดยโครงร่างของเจลจะมีลักษณะคล้ายกล่อง (Egg box) แต่อัลจินเตจจะมีความไวต่อสารคีแลนต์ เช่น ฟอสเฟต จะไปจับกับไอออนของโลหะซึ่งก็คือแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ทำให้เจลถูกทำลาย (Kosourov และ Seibert, 2008) การตรงเซลล์ในอเนกประสงค์จะใช้คุณสมบัติในการก่อตัวเป็นเจลเท่านั้นและไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเจลจึงมีความคงตัว และเมื่อพิจารณาจากลักษณะของเจล พบว่าอเนกประสงค์จะมีความโปร่งใสมากกว่าอัลจินเตจ ดังนั้น การกระจายของแสงเข้าไปยังภายในเม็ดเจลจึงดีกว่าทำให้เซลล์ภายในผลิตไฮโดรเจนมากกว่า นอกจากนี้ อเนกประสงค์ยังมีข้อดีคือเป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาถูก และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงเลือกวัสดุที่ตรงคือ อเนกประสงค์และชนิดของอาหารคือ TAP-S มาใช้ในการศึกษาต่อไป

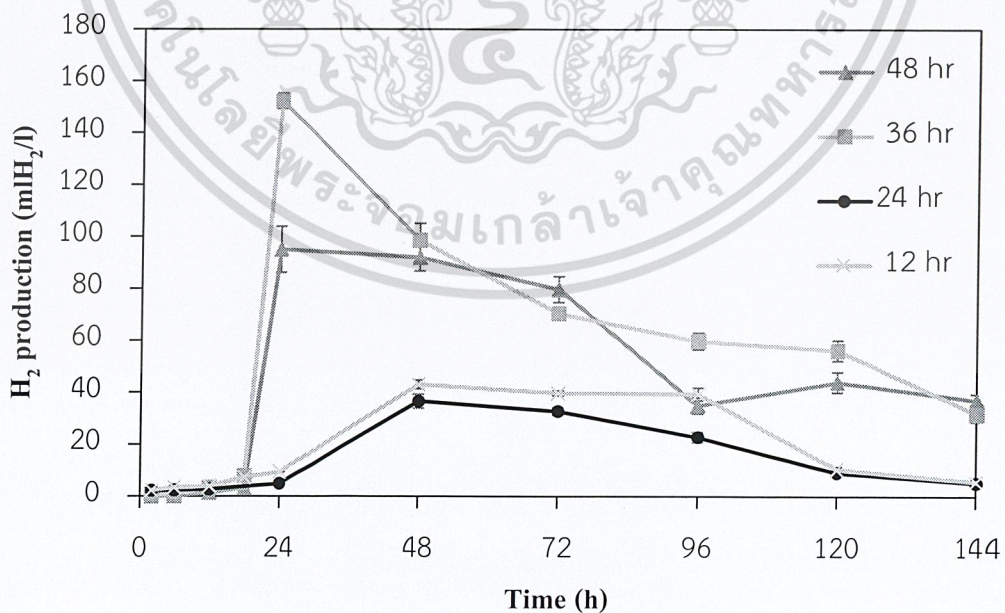
4.2 ผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ที่ตรงสำหรับสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

จากการนำสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP สูตรปกติ โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์นำมากระจายในอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) และทำการตรงเซลล์ในอเนกประสงค์ นำขึ้นวันที่ตรงใส่ลงในขวด GC-vial ปิดเตอาหารเหลว TAP-S ใส่ขวดให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) 5 มิลลิลิตร และพันก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที บ่มเป็นเวลา 2, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณพื้นที่ว่างด้านบนของขวดไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า เซลล์ที่ตรงของสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดอย่างเห็นได้ชัด โดยผลิตได้ 72.03 ± 1.40 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.3) ตามมาด้วยเซลล์ที่มีอายุเซลล์ 48 ชั่วโมง เมื่อวัดปริมาณไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ที่ตรงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ที่ตรงสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง สะสมไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อบ่มใน

อาหารที่ขาดซัลเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด 152.26 ± 2.96 มิลลิตรไฮโดรเจนต่อลิตร (รูปที่ 4.4) ปริมาณไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ตรึงสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ต่างๆ ในอาหาร TAP-S ที่ชั่วโมงที่ 24 ในหน่วยต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.3 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีอายุเซลล์ต่างๆ เมื่อป้อนในอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.4 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเวลาชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีอายุเซลล์ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ในอาหาร TAP-S

ตารางที่ 4.2 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่มีอายุเซลล์ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และบ่มในอาหาร TAP-S

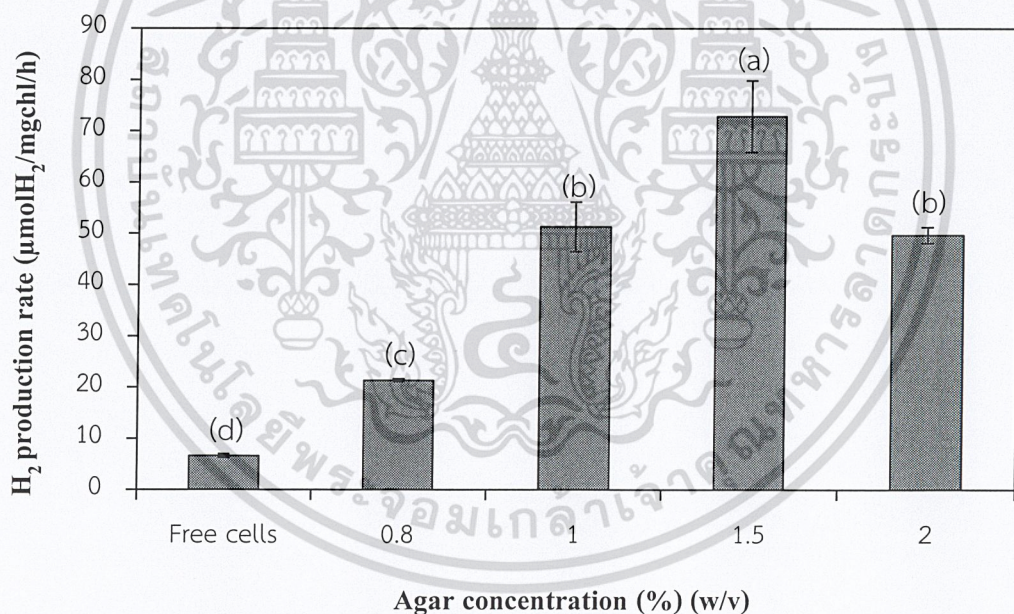
Cultivation time (h)	Hydrogen production (\pm SD)		
	$\mu\text{molH}_2/\text{mgchl}$	$\mu\text{molH}_2/\text{mgdw}$	mlH_2/L
12	189.08 \pm 2.03	0.53 \pm 0.01	9.42 \pm 0.10
24	68.89 \pm 0.97	0.27 \pm 0.01	4.90 \pm 0.06
36	1728.71 \pm 33.51	8.50 \pm 0.17	152.26 \pm 2.96
48	953.74 \pm 84.46	5.30 \pm 0.39	94.98 \pm 8.82

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงเป็นอายุเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากสาหร่ายที่อยู่ในช่วงการเจริญเติบโตระยะ Late-exponential phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์ไม่ต้องการพลังงานไปใช้ในการแบ่งเซลล์และกระบวนการสังเคราะห์สังเคราะห์แสงหรือวิถีเมแทบอลิซึมอื่นๆ ดังนั้น พลังงานและตัวรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในเซลล์จึงถูกนำไปใช้ผลิตไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการสังเคราะห์แสงเพิ่มมากขึ้น ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลามากขึ้น การผลิตไฮโดรเจนจะลดลง เนื่องจากเซลล์ที่เก็บเกี่ยวในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากกว่า 36 ชั่วโมง เซลล์จะอยู่ในการเจริญเติบโตระยะ Stationary ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีอัตราการเจริญคงที่คือมีอัตราการการเกิดเท่ากับอัตราการตาย สารอาหารจึงถูกใช้จนเกือบหมดทำให้พลังงานและตัวรีดิวซ์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น การทดลองต่อไปจึงเลือกเซลล์สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงมาตรึงเซลล์และศึกษาการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.3 ผลของความเข้มข้นวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

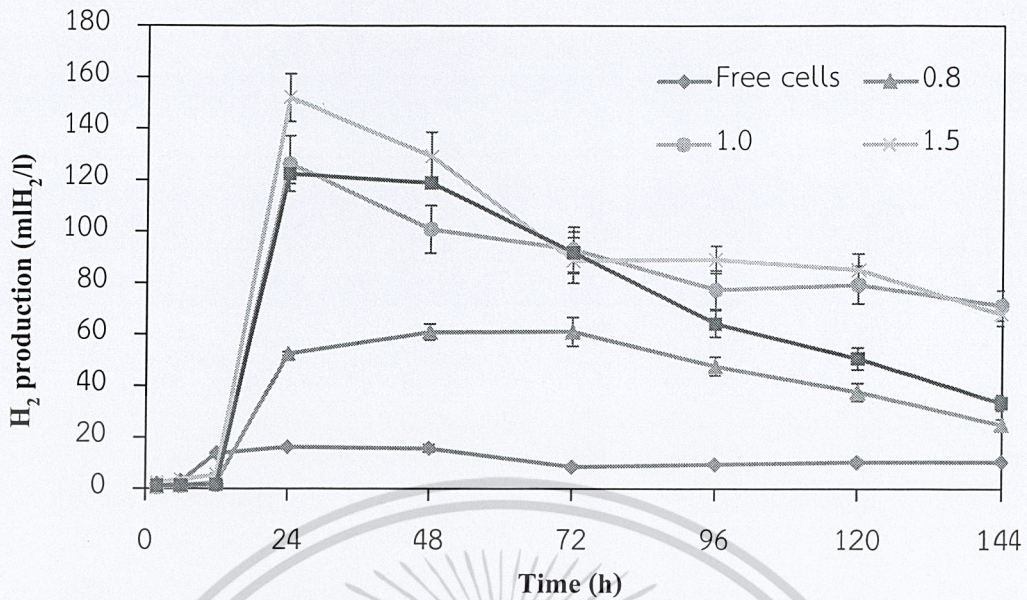
จากการนำเซลล์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เจริญอยู่ในช่วงที่มีอัตราการเจริญสูงสุด (Late-exponential phase) มาเก็บเกี่ยวและกระจายในอาหาร TAP-S แล้วทำการตรึงเซลล์ในอัตรที่ความเข้มข้นของอะการ์ 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำขึ้นวันที่ตรึงใส่ลงในขวด Glass-vial ปิดอาหารเหลว TAP-S ใส่ขวดให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 มิลลิลิตร ฟันก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที เป็นเวลา 2, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณพื้นที่ว่างด้านบนของขวดไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ จากผลการทดลองพบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะการ์ โดยที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ตรึงมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยผลิตได้ 72.88 ± 6.99 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะการ์กลับพบว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงจะลดลง (รูปที่ 4.5) ปริมาณไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ตรึงสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ความเข้มข้นอะการ์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เซลล์ตรึงให้ผลการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดคือ 152.04 ± 9.24 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อลิตรที่ชั่วโมง 24 จากนั้น ปริมาณไฮโดรเจนจึงค่อยๆ ลดลงในชั่วโมงถัดไป (รูปที่ 4.6) ปริมาณไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นอะการ์ 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหาร TAP-S ที่ชั่วโมงที่ 24 ในหน่วยต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในวัฒนธรรมที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่ชั่วโมง 24 ในอาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซิลเฟออร์ (TAP-S)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่เวลาชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นอะการ์ 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหาร TAP-S

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงที่ความเข้มข้นอะการ์ 0.8, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหารเหลว TAP-S

Gel concentration (%)(w/v)	Hydrogen production (\pm SD)		
	$\mu\text{molH}_2/\text{mgchl}$	$\mu\text{molH}_2/\text{mgdw}$	mLH_2/L
Free cells	158.09 ± 9.06	0.76 ± 0.04	16.22 ± 0.92
0.8	512.03 ± 6.29	2.46 ± 0.03	52.52 ± 0.64
1	1231.75 ± 46.23	5.92 ± 0.56	126.34 ± 10.80
1.5	1749.22 ± 115.59	8.41 ± 0.58	152.04 ± 9.24
2	1193.42 ± 37.43	5.74 ± 0.18	122.42 ± 3.84

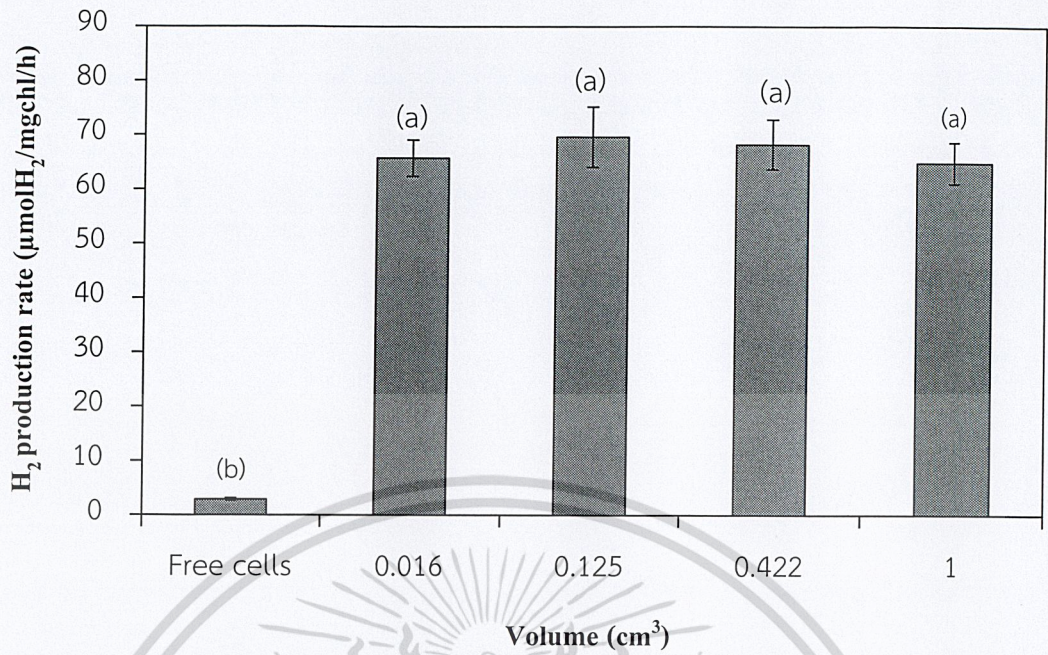
จากผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นอะการ์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์สาหร่ายสีเขียว เนื่องจากความเข้มข้นอะการ์ที่ต่ำเมื่อเกิดเจลรูพรุนจะมีความกว้างมาก ทำให้โครงร่างค้ำช่วยเจลห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในได้ไม่ดี โดยอาจมีเซลล์บางส่วนรั่วหลุดออกจากเจล ดังนั้น ปริมาณเซลล์ในวัสดูตรึงจึงลดลงส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนที่ได้

จากเซลล์ตรึงลดลง ส่วนความเข้มข้นอะการ์ที่สูงเมื่อเกิดเจลรูพรุนจะมีความแคบมาก อาจจะไปไม่ทั่วกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

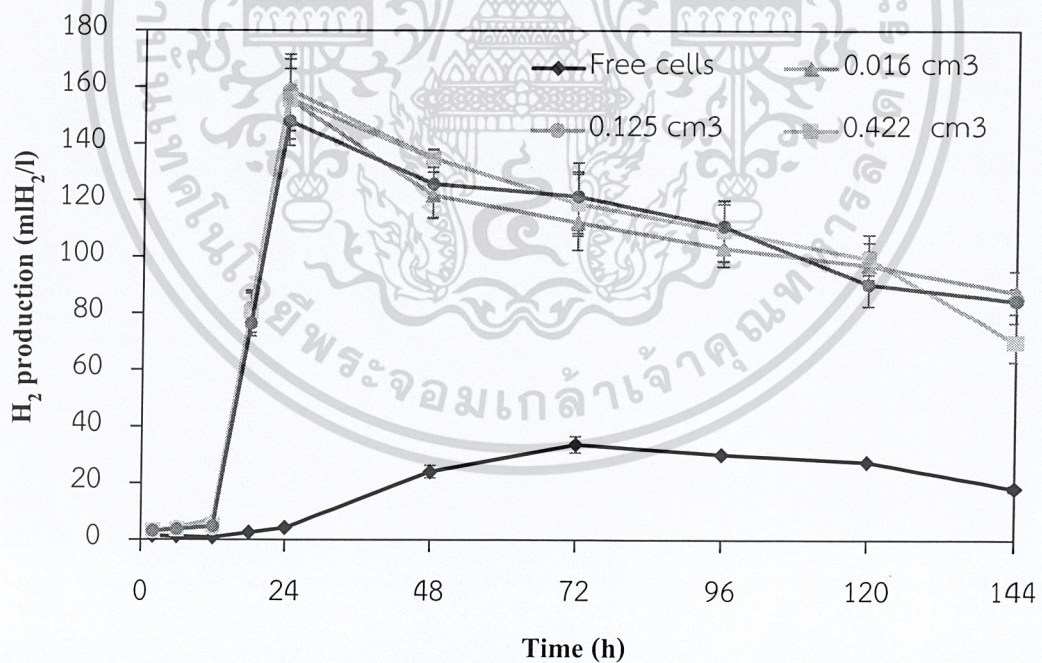
จำกัดการแพร่ของสารอาหารภายนอกขึ้นวันเข้าสู่เซลล์สหาย ทำให้สหายผลิตไฮโดรเจนลดลง ดังนั้น การทดลองต่อไปจึงเลือกความเข้มข้นอะคาร์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาตรึงเซลล์ และศึกษาการผลิตไฮโดรเจนต่อไป

4.4 ผลของขนาดวัสดุตรึงต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสหายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

จากการนำเซลล์สหายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงมาเก็บเกี่ยวและกระจายในอาหาร TAP-S แล้วทำการตรึงเซลล์ในอะคาร์ ที่ความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมคือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และตัดวันเป็นทรงสี่เหลี่ยม ปริมาตร 0.016 ($0.25 \times 0.25 \times 0.25$ เซนติเมตร), 0.125 ($0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร), 0.422 ($0.75 \times 0.75 \times 0.75$ เซนติเมตร) และ 1 ($1 \times 1 \times 1$ เซนติเมตร) ลูกบาศก์เซนติเมตร นำขึ้นวันที่ตรึงใส่ลงในขวด Glass-vial ปิดต่ออาหารเหลว TAP ที่ปราศจากซัลเฟอร์ (TAP-S) ใส่ขวดให้เหลือช่องว่างเหนือของเหลวด้านบน (Head space) 5 มิลลิเมตร ฟันก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาที บ่มเป็นเวลา 2, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง นำก๊าซบริเวณพื้นที่ว่างด้านบนของขวดไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ พบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกัน จากการวิเคราะห์ทางสถิติ (IBM SPSS statistics version 23, Dancan) วันทุกปริมาตรมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (รูปที่ 4.7) ปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมง 24 ในเซลล์ตรึงและค่อยๆ ลดลงในชั่วโมงถัดไป (รูปที่ 4.8) ปริมาณไฮโดรเจนสะสมของเซลล์ตรึงที่มีขนาดวันปริมาตรต่างๆ ในอาหาร TAP-S ที่ชั่วโมงที่ 24 ในหน่วยต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงที่มีขนาดวุ้นปริมาตรต่างๆ ของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่ชั่วโมง 24 ในอาหาร TAP-S



รูปที่ 4.8 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมงต่างๆ ของเซลล์ตรึงที่มีขนาดวุ้นปริมาตร 0.016, 0.125, 0.422 และ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหารเหลว TAP-S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ไฮโดรเจนสะสมที่ชั่วโมง 24 ของเซลล์ตรึงที่มีขนาดวุ้นปริมาตร 0.016, 0.125, 0.422 และ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของสายร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ในอาหารเหลว TAP-S

Volume (cm ³)	Hydrogen production (±SD)		
	μmolH ₂ /mgchl	μmolH ₂ /mgdw	mlH ₂ /L
Free cells	69.90 ± 5.71	0.35 ± 0.02	4.30 ± 0.04
0.016	1636.39 ± 115.89	8.18 ± 0.58	155.50 ± 11.02
0.125	1671.96 ± 132.81	8.36 ± 0.66	158.88 ± 12.62
0.422	1638.33 ± 109.88	8.19 ± 0.80	155.68 ± 14.18
1	1609.37 ± 7.24	7.78 ± 0.46	147.94 ± 8.66



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. เซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ
2. เซลล์ที่ถูกตรึงในอะการ์ มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงใน อะกาโรส และอัลจิเนต
3. การขาดซัลเฟอร์ในอาหารที่ใช้ผสมกับวัสดุตรึงและในอาหารที่ใช้บ่มเซลล์ตรึงจะส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-124 ในอะการ์
4. สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรึงและบ่มในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์สามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด
5. ความเข้มข้นของอะการ์ที่เหมาะสมและทำให้สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124 ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดคือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
6. ขนาดของวัสดุตรึงไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ตรึงสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* CC-124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฤษณา แซ่เฮ้ง. 2554. พลังงานไฮโดรเจน แรงขับเคลื่อนใหม่ ที่ใช้แทนน้ำมันและก๊าซธรรมชาติ.

วารสารผู้จัดการ 26 มิถุนายน 2554.

ชนิษฐา หมูโสภิญ. 2553. ไปไฮโดรเจนพลังงานทางเลือกใหม่. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่

21 พฤษภาคม 2560. จาก

https://home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf.

ธรรมบุญ ศรีทะวงศ์. 2551. ปฏิกริยาแยกโมเลกุลน้ำเพื่อผลิตพลังงานไฮโดรเจน. วารสารส่งเสริม

เทคโนโลยี 197 หน้า 99-104.

นิสิต ตันทวีเชฐ. 2553. เทคโนโลยี ผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สะอาดและยั่งยืน. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อ

วันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

http://www.tpa.or.th/publisher/pdfFileDownloadS/TN209A_p59-62.pdf.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัชนิกร วันจันทิก. 2554. ก๊าซไฮโดรเจน: ความคาดหวังเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน. [ออนไลน์].

สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

http://digital_collect.lib.buu.ac.th/journal/Science/v16n1/131-140.pdf.

วิทวัส แจ่มเอี่ยม. 2553. กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่

21 พฤษภาคม 2560. จาก

<https://www.tci-thaijo.org/index.php/tsujournal/article/viewFile/68530/55800>.

สถาบันพลาสติก. เทคโนโลยีแก๊สซิฟิเคชันเศษไม้. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560.

จาก http://rubber.oie.go.th/file/8_เทคโนโลยีแก๊สซิฟิเคชันเศษไม้.pdf.

สุมิตรา จรสรโรจน์กุล. 2556. พลังงานไฮโดรเจน. หน่วยวิจัยวัสดุสำหรับพลังงาน ศูนย์เทคโนโลยีโลหะ

และวัสดุแห่งชาติ. 10, 12: 24-25

สรัญญา พันธุ์พุกษ์ และอรัญญา อินเจริญศักดิ์. 2556. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* โดยการตรึงเซลล์. คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัญชลี ศิริขจรกิจ. 2554. สำหรับายเซลล์เดี่ยวแคลมีโดโมแนส (*Chlamydomonas reinhardtii*)
กับงานวิจัยทางพันธุศาสตร์. [ออนไลน์]. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560.
จาก <http://www.thaiscience.info/journals/Article/TJOG/10890124.pdf>.

อศกฤตา โลหพรหม. 2557. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์. ภาควิชา
วิศวกรรมศาสตร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

Antal K, Matorin N, Kukarskikh P, Krendeleva E, Rubin B. 2014. Pathways of hydrogen
photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived
of sulfur. *Int J Hydrog Energy*. 39:18194-18203

Antal K, Kukarskikh P, Volgusheva A, Krendeleva E, Rubin B. 2016. Hydrogen
photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*:
Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH. *Algal research*.
17:38-45

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(10):991-1022.

Bailliez C., Largeau C., Berkaloff C., Casadevall E. 1986. Immobilization of
Botryococcus braunii in alginate: influence on chlorophyll content,
photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. *Applied
Microbiology and Biotechnology*. 23(5):361-366

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

Fujimura M., Kato J., Tosa T., Chibata I. 1984. Continuous production of L-arginine
using immobilized growing *Serratia marcescens* cells: Effectiveness of supply of
oxygen gas. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 19:79-84

Gaffron H. 1939. Reduction of CO₂ with H₂ in green plants. *Nature*. 143:204-205.

Gaffron H., Rubin J. 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen
in algae. *The Journal of General Physiology*. 26:219-240.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานที่ระบุไว้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hartman H., Krasna A. 1963. Studies on the "adaptation" of hydrogenase in *Scenedesmus*. *The journal of Biological Chemistry*. 238(2):749-757
- Hahn JJ, Ghirardi ML, Jacoby WA. 2007. Immobilized algal cells used for hydrogen production. *Biochem Eng J*. 37:75–79
- Healey FP. 1970. The Mechanism of Hydrogen Evolution by *Chlamydomonas moewusii*. *Plant Physiol*. 45(2):153-159
- Jeffrey S.W, Humphrey G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a,b,c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen*. 167:191-194
- Karel, S.F., Libicki S.B. and Robertson C.R. 1985. The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles. *Chemical Engineering Science*. 40(8):1321-1354
- Kessler E. 1974. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. IX. Salt tolerance as a taxonomic character. *Archives of Microbiology*. 100:51–56
- Kosourov SN, Seibert M. 2009. Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng*. 102:50–58
- Laurinavichene TV., Fedorov AS., Ghirardi ML., Seibert M., Tsygankov AA. 2006. Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Int J Hydrog Energy*. 31:659–667
- Madawar D., Garg N., Shah V. 2000. Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16:757-767
- Maness P., Yu J., Eckert C. and Ghirardi M. 2009. Photobiological Hydrogen Production–Prospects and Challenges. *Microbe magazine*. 4:275-280
- Schulz R., Schnackenberg J., Stangier K., Wunschiers R., Zinn T. and Senger H. 1998. Light dependent hydrogen production of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *BioHydrogen*. 32:243-251
- Song W, Rashid N, Choi W, Lee K. 2011. Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresour. Technol*. 102:8676–8681

Zhang L., Happe T., Melis A. 2002. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*. 214:552–561

การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง.

สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก <http://photobiology.info/Seibert.html>

กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

<http://www.making-hydrogen.com/steam-reforming-hydrogen.html>

กระบวนการแก๊สซิฟิเคชันจากชีวมวล. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

http://rubber.oie.go.th/file/8_เทคโนโลยีแก๊สซิฟิเคชันเศษไม้.pdf

กระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

<http://www.thaiseoboard.com/index.php/topic302500.0.html>

คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

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

รูปแบบของการตรึงเซลล์แบบต่างๆ. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

<http://www.franciscoploulab.eu/p/research-lines.html>

สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*. สืบค้นเมื่อวันที่ 21 พฤษภาคม 2560. จาก

http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Chlamydomonas/Euchlamydomonas/reinhardtii/sp_02.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP (Tris Acetate Phosphate medium) (Harris, 1989)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernick Solution

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	8	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution

ประกอบด้วยสารละลาย Disodium EDTA 5 กรัม ในน้ำ 400 มิลลิลิตร ให้ความร้อนและคนให้เข้ากัน จากนั้นปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และเติมสารละลาย ดังนี้

เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.2	กรัม
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.14	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.51	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.016	กรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.073	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.016	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนประกอบ 1M Potassium Phosphate Stock

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 6.8 กรัม ต่อ 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชเป็น 7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบอาหาร TAP

2X Filner's Beijernick Solution	25 มิลลิลิตร
Trace Mineral Solution	5 มิลลิลิตร
1M Potassium Phosphate Stock	1 มิลลิลิตร
กรดกลาเซียอะซิติก (Glacial acetic acid) (17.4 มิลลิโมลาร์ อะซิเตต)	1 มิลลิลิตร
Tris base	2.42 กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อผสมส่วนประกอบทั้งหมดแล้วจะได้พีเอชเท่ากับ 7.2 สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร TAP ทำได้โดยใส่ส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ของอาหาร

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-S (Tris Acetate Phosphate – Sulfur medium)

ส่วนประกอบ 2X Filner's Beijernick Solution

- แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1.642 กรัม
แทน แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	

ส่วนประกอบ Trace Mineral Solution

- เฟอร์รัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.486 กรัม
แทน เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	
- ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	1.042 กรัม
แทน ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	
- คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.0125 กรัม
แทน คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้