ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว

EFFECT OF NUTRIENT DEPRIVATION ON HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR GREEN ALGAE

กรกฎ โพธิ์พนา
ฐิติมา จิตนอก
พลรัตน์ หลวงพล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว

EFFECT OF NUTRIENT DEPRIVATION ON HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR GREEN ALGAE

กรกฎ โพธิ์พนา

ฐิติมา จิตนอก

พลรัตน์ หลวงพล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF NUTRIENT DEPRIVATION ON HYDROGEN PRODUCTION BY UNICELLULAR GREEN ALGAE

KORAKOTH PHOPANA

THITIMA JITNOK

PHONRAT LUANGPHON

A SPECIAL PROJECT SUMMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว
Effect of nutrient deprivation on hydrogen production by unicellular green algae

ชื่อนักศึกษา นายกรกฎ โพธิ์พนา รหัสนักศึกษา 56050960
นางสาวฐิติมา จิตนอก รหัสนักศึกษา 56050982
นายพลรัตน์ หลวงพล รหัสนักศึกษา 56051032

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2559

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

T 149 556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์เป็นอย่างดีจากหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาเสียสละเวลาในการให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และจุดประกายความคิดในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงาน พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกและสนับสนุนด้านข้อมูล เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาโครงงานพิเศษนี้ ตลอดจนการตรวจทานและการแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง คณะผู้จัดทำจึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ใน ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ผู้เข้าสอนทุกท่าน ที่ได้อบรม สั่งสอน และให้ความรู้ ทั้งทฤษฎีและปฏิบัติในทุกรายวิชา ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณนักศึกษาปริญญาโท และปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ชี้แนวทางการศึกษาและวิธีดำเนินงานให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ทั้งยังแนะนำข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว รวมถึงผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความสำเร็จทั้งหมดของโครงงานพิเศษฉบับนี้ที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ข้างต้น ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจมาตลอดจนสำเร็จการศึกษา

กรกฎ โพธิ์พนา
ฐิติมา จิตนอก
พลรัตน์ หลวงพล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว
ชื่อนักศึกษา นายกรกฎ โพธิ์พนา รหัสนักศึกษา 56050960
นางสาวฐิติมา จิตนอก รหัสนักศึกษา 56050984
นายพลรัตน์ หลวงพล รหัสนักศึกษา 56051032
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
คณะ วิทยาศาสตร์
ภาควิชา ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตไฮโดรเจนจาก 2 กระบวนการหลัก คือ กระบวนการสังเคราะห์แสง โดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานและน้ำเป็นแหล่งอิเล็กตรอนและกระบวนการหมักในที่ไม่มีแสง โดยใช้แป้งที่เก็บสะสมไว้เป็นแหล่งอิเล็กตรอน การผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวจะถูกกระตุ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว 3 ชนิด ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 จากการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวทั้ง 3 ชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร Tris acetate phosphate (TAP) โดยเฉพาะ *Chlorella* sp. 2Sins4 มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าสาหร่ายอีก 2 ชนิด สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดที่อายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 การขาดซัลเฟอร์สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ในขณะที่การขาดโพแทสเซียมสามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่าย *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 สุดท้ายนี้ การขาดธาตุอาหารแบบร่วมไม่ส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของอัตราการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิด

คำสำคัญ : การผลิตไฮโดรเจน, สาหร่ายสีเขียว, การขาดอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of nutrient deprivation on hydrogen production by unicellular green algae		
Students	Mr. Korakoth Phophana	Student ID	56050960
	Miss Thitima Jitnok	Student ID	56050984
	Mr. Phonrat Luangphon	Student ID	56051032
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Asst.Prof.Dr.Saranya Phunphruch		

Abstract

Hydrogen can be produced by green algae via two main processes; photosynthetic process using light as an energy source and water as an electron source, and dark fermentative process using accumulated starch as an electron source. H_2 production by green algae is catalyzed by the action of hydrogenase enzyme. This research aims to investigate the effect of nutrient deprivation on H_2 production by 3 types of unicellular green algae; *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 and *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546. It was found that all unicellular green algae strains could grow well in Tris acetate phosphate (TAP) medium; especially *Chlorella* sp. 2Sins4 gave a higher growth rate than the other two strains. All of them showed the highest H_2 production rate when using 36-h old cells with the cell concentration at initial OD_{750} as 0.8. The sulfur deprivation increased H_2 production rate in *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 whereas potassium deprivation increased H_2 production rate in *Chlorella* sp. 2Sins4 and *Scenedesmus obliiquus* TISTR 8546. The double nutrient deprivation could not promote an increase of H_2 production rate in all investigated green algae strains.

Keywords : Hydrogen production, green algae, nutrient deprivation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ไฮโดรเจน	4
2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน	5
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี	5
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า	5
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิต	6
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย	6
2.4 สาหร่ายสีเขียว	8
2.4.1 *Chlamydomonas* sp.	8
2.4.2 *Chorella* sp.	9
2.4.3 *Scenedesmus* sp.	9
2.5 ธาตุอาหารของสาหร่าย	9
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	10
2.6.1 ไนโตรเจน	10
2.6.2 ฟอสฟอรัส	10
2.6.3 โพตัสเซียม	10
2.6.4 ซัลเฟอร์	11
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	14
3.2 สารเคมี	14
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย	14
3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	14
3.2.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน	15
3.3 อุปกรณ์	15
3.4 วิธีการทดลอง	16
3.4.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว	16
3.4.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว	16
3.4.3 วิธีการเตรียมตัวอย่างและการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	16
3.4.4 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 โดยการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรปและแปรผันปัจจัยที่ต่างกัน	17
3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	20
4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย	20
4.2 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	21
4.3 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	24
4.4 ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	27
4.4.1 ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	27
4.4.2 ผลของการขาดธาตุอาหารแบบร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ 36
5.1 สรุปผลวิจัย 36
5.2 ข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง 38
ภาคผนวก ก 41
ภาคผนวก ข 44
ภาคผนวก ค 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	6
2.2	การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	7
4.1	การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP	20
4.2	อัตราการผลิตไฮโดรเจนในช่วงอายุเซลล์ต่างๆ ของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546	22
4.3	กราฟสะสมการผลิตไฮโดรเจนในช่วงอายุเซลล์ต่างๆ ของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2sSins4 และ *Scenedrsmus obliquus* TISTR 8546	23
4.4	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ โดยให้ค่า OD_{750} ที่แตกต่างกัน	25
4.5	การสะสมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ โดยให้ค่า OD_{750} ที่แตกต่างกัน	26
4.6	อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว	29
4.7	การสะสมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124, *Chlorella sp.* 2sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบร่วม 33

4.9 การสะสมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124, *Chlorella sp.* 2sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบร่วม 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (GC-TCD) 17

4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่ขาดธาตุแบบเดี่ยว 31

4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่ขาดธาตุแบบร่วม 35

ค.1 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะอายุเซลล์ที่แตกต่างกัน 45

ค.2 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่ความแปรผันความเข้มข้นเซลล์โดยให้ค่า OD_{750} ที่แตกต่างกัน 46

ค.3 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124, *Chlorella sp.* 2sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว 47

ค.4 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124, *Chlorella sp.* 2sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบร่วม 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบัน พลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกเป็นอีกหนึ่งแนวคิดที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมนุษย์จำเป็นต้องใช้แหล่งพลังงานและเชื้อเพลิงในชีวิตประจำวันและในด้านต่างๆ อาทิเช่น อุตสาหกรรม การเกษตร และการคมนาคม เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นที่ต้องการเป็นปริมาณมาก แต่เนื่องจากปริมาณน้ำมันเชื้อเพลิงมีจำนวนจำกัด จึงส่งผลให้ราคาน้ำมันดิบมีราคาสูงขึ้น การพัฒนาและการปรับปรุงรูปแบบของพลังงานต่างๆ ขึ้นมาทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากอีกหนึ่งชนิด พลังงานทดแทนมีหลากหลายรูปแบบ เช่น พลังงานลม น้ำ ก๊าซชีวภาพ พลังงานชีวมวล และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

ไฮโดรเจน (H) เป็นธาตุที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซับซ้อนและเป็นธาตุที่เบาที่สุด ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของน้ำ (H_2O) และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ โดยปกติ ไฮโดรเจนจะไม่อยู่อย่างอิสระ ไฮโดรเจนจะอยู่รวมตัวกันโดยประกอบด้วยธาตุ 2 อะตอม กลายเป็นไฮโดรเจนโมเลกุล (H_2) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ให้ค่าความร้อนจากการเผาไหม้สูง เผาไหม้สมบูรณ์ อีกทั้งยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไฮโดรเจนเป็นพลังงานที่สามารถผลิตได้จากกระบวนการดังต่อไปนี้ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยการใช้กระแสไฟฟ้าและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต

ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตหรือเรียกว่า “ไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen)” เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยกลไกหรือเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) และสาหร่ายสีเขียว (Green Algae)

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุเช่นเดียวกับรงควัตถุที่พบในพืชชั้นสูง คือ คลอโรฟิลล์ เอ และ บี แคโรทีนอยด์ และแซนโทฟิลล์ รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวยังมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยก๊าซไฮโดรเจนจะถูกผลิตขึ้นได้ดีเมื่อสาหร่ายอยู่ภายใต้สภาวะไร้อากาศทั้งในที่มีแสงและไม่มีแสง เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวคือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) สาหร่ายสีเขียวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนโดยการตรึงเซลล์สาหร่าย การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสงต่างๆ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในถังหมัก และการขาดธาตุอาหารแต่ละชนิดของสาหร่ายสีเขียว ฯลฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธาตุอาหารแต่ละชนิดของสาหร่ายสีเขียวมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจน โดยธาตุอาหารหลักที่สาหร่ายต้องการ (Macronutrient) ในกระบวนการดังกล่าวคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม และซัลเฟอร์ หากสาหร่ายสีเขียวขาดธาตุไนโตรเจน (N) จะทำให้สาหร่ายสีเขียวมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลง รวมทั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิคก็ลดลงเช่นกัน การขาดธาตุฟอสฟอรัส (P) จะทำให้การเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไปรวมถึงลดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเช่นกัน การขาดธาตุโปตัสเซียม (K) จะทำให้การทำงานของเอนไซม์ Pyruvate kinase ถูกขัดขวาง พลังงานที่ใช้จึงไม่เพียงพอต่อการสร้าง ATP และการขนส่งอิเล็กตรอน ทำให้มีการสะสมแป้งและน้ำตาลมากขึ้น น้ำตาลจึงถูกนำไปใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนเพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจน จึงเป็นผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น การขาดธาตุซัลเฟอร์ (S) จะทำให้การสังเคราะห์กรดอะมิโนและปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำจากระบบแสงสองลดลง ส่งผลให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีประสิทธิภาพในการทำงานได้เต็มที่ จึงทำให้ปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

โครงงานพิเศษนี้ จึงมีความสนใจศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว 3 ชนิด ได้แก่ (1) *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 (2) *Chlorella* sp. 2sins4 และ (3) *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 รวมทั้งศึกษาช่วงอายุเซลล์และความเข้มเซลล์ของสาหร่ายแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน เพื่อเป็นแนวทางในการนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ และพัฒนารูปแบบพลังงานในอนาคตให้ยั่งยืนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2Sins4, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

งานวิจัยนี้ ทำโดยนำสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 มาศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่างๆ ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยการเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้นในอาหาร TAP, TAP-N, TAP-P, TAP-K, TAP-S, TAP-NS, TAP-PK และ TAP-KS จากนั้น นำเซลล์ไปวิเคราะห์ไฮโดรเจนโดยเครื่อง Gas-chromotograph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถทราบถึงผลของการขาดธาตุอาหารแต่ละชนิดต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด รวมถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน แหล่งพลังงานที่มนุษย์ใช้ในโลกส่วนมากมาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล แหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลมีหลายชนิด เช่น น้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ฯลฯ เชื้อเพลิงฟอสซิลจัดเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป ไม่สามารถหามาทดแทนใหม่ได้ในเวลาอันใกล้ การใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งทั้ง ภาคคมนาคม ภาคการท่องเที่ยว ภาคอุตสาหกรรม ภาคครัวเรือน ภาคการเกษตร เป็นต้น ในปัจจุบัน ผลผลิตส่วนใหญ่มาจากภาคอุตสาหกรรม ซึ่งจากการขยายตัวในส่วนของภาคอุตสาหกรรมและการเพิ่มขึ้นของประชากรในโลกอย่างต่อเนื่อง ได้ส่งผลให้โลกต้องพึ่งพาน้ำมันปิโตรเลียมมากขึ้น เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ในขณะที่ปริมาณการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น แหล่งเชื้อเพลิงสำคัญอย่างน้ำมันปิโตรเลียมกลับลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้น้ำมันปิโตรเลียมไม่เพียงพอต่อปริมาณความต้องการ นอกจากนี้ มนุษย์ยังใช้พลังงานอย่างไม่คุ้มค่า และขาดจิตสำนักในการใช้พลังงานทำให้ปริมาณเชื้อเพลิงลดลงอย่างรวดเร็ว จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นักวิจัยจึงต้องคิดค้นและพัฒนาพลังงานรูปแบบใหม่มาทดแทน พลังงานทดแทนที่สำคัญ ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม พลังงานชีวภาพ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน ไฮโดรเจน (อังกฤษ: Hydrogen; ละติน: Hydrogenium) เป็นธาตุลำดับแรกในตารางธาตุ มีสัญลักษณ์ธาตุ คือ H มีเลขอะตอมเท่ากับ 1 และมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดหรือเวเลนซ์อิเล็กตรอนตัวเดียว ไฮโดรเจนสามารถพบในองค์ประกอบของน้ำ ในสารประกอบอินทรีย์ทุกตัว ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไฮโดรเจนสามารถทำปฏิกิริยากับคาร์บอน ไนโตรเจน และออกซิเจน เป็นต้น ที่อุณหภูมิห้องและภายใต้สภาวะความดันบรรยากาศ ไฮโดรเจนมีสถานะเป็นก๊าซที่มี 2 อะตอม (H_2) ก๊าซไฮโดรเจนมีคุณสมบัติไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย และให้พลังงานเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูง ก๊าซไฮโดรเจนมีจุดหลอมเหลวที่ -259 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่ต่ำมากที่ -253 องศาเซลเซียส ก๊าซไฮโดรเจนให้พลังงานต่อหน่วยได้สูงสุดในบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ และมีค่าพลังงานเชื้อเพลิงสูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงถึง 3 เท่า ก๊าซไฮโดรเจนสามารถติดไฟได้แต่ไม่ได้ช่วยให้ไฟติด โดยจะต้องอาศัยออกซิเจนในการเผาไหม้ ก๊าซไฮโดรเจนถือว่ามีอันตรายน้อยกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นมาก เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนเบากว่าอากาศถึง 14 เท่า เมื่อมีการรั่วไหล ก๊าซไฮโดรเจนจะกระจายตัวไปในอากาศอย่างรวดเร็ว และเมื่อเกิดการเผาไหม้เปลวไฟจะขึ้นข้างบนและจะหมดไปอย่างรวดเร็ว โดยเกิดการเผาไหม้เร็วมากและมีการแผ่รังสีความร้อนในระดับต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้หลายกระบวนการ ทั้งการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ โดยกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

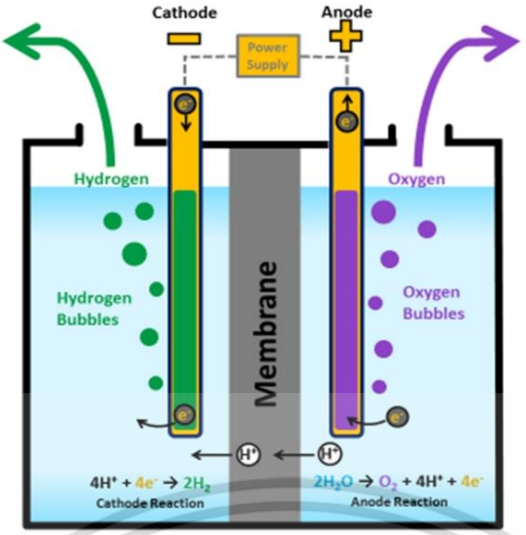
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาเคมี (Thermo-chemical process) เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยการใช้ความร้อนเปลี่ยนมวลชีวภาพหรือถ่านหินให้เป็นก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และ น้ำ (H_2O) เป็นต้น กระบวนการนี้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถนำความร้อนที่ได้จากถังปฏิกรณ์นิวเคลียร์มาผลิตไฮโดรเจนได้ โดยพลังงานทั้งหมดจึงจะถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่กระบวนการนี้มีข้อเสียคือ เกิดปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนัก และเป็นการใช้วัตถุดิบที่มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งมีอยู่ในปริมาณจำกัด

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีเคมีไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเคมีไฟฟ้า (Electro-chemical process) เป็นวิธีการที่ใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกโมเลกุลของน้ำโดยตรง (Water electrolysis) ทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอม และออกซิเจนอะตอม โดยอาศัยอิเล็กโทรด (Electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกันคือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (Anode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (Cathode) วิธีการเตรียมคือจุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้มีความเป็นตัวนำมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโทรไลท์ (Electrolyte) เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไป ไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก (รูปที่ 2.1) วิธีนี้ต้องใช้กระแสไฟฟ้าสูงถึง 90 กิโลวัตต์ โดยสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีนี้จะให้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้กระแสไฟฟ้าจำนวนมาก และต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า
ที่มา : http://www. http://voravitpower.weebly.com

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิต

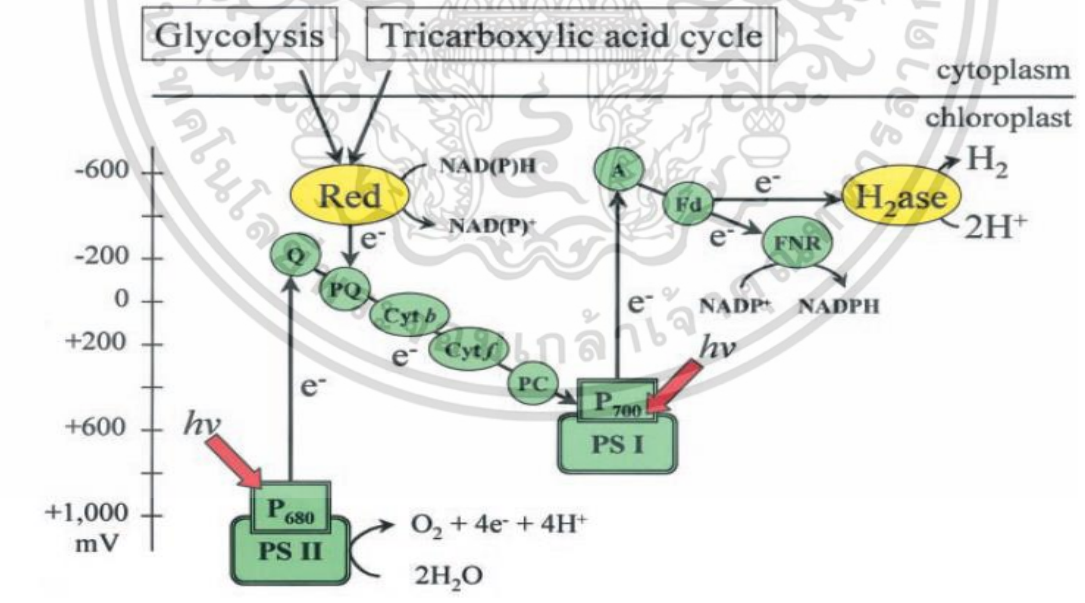
ไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่า“ไบโอไฮโดรเจน(Biohydrogen)” ผลิตมาจากกระบวนการทางชีวภาพที่อาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ จากกระบวนการหมักหรือจากปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำด้วยการสังเคราะห์ด้วยแสง เมื่อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสงแล้วจะใช้น้ำและแสงเป็นวัตถุดิบสำหรับเป็นแหล่งอิเล็กตรอนและแหล่งพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ กระบวนการนี้ยังผลิตก๊าซไฮโดรเจนอีกด้วย ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ ได้ก๊าซไฮโดรเจนซึ่งได้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด และไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ เช่น แบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว และไซยาโนแบคทีเรีย เป็นต้น แบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหมัก และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย (Kosaric และ Lyng, 1988)

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย (สุรัตน์ติพร รัตนะ, 2554)

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสง จะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิดทั้ง แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงาน แล้วส่งพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลดปล่อยอิเล็กตรอนนี้ให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อพลังงานในรูปของแสงมาตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PS II) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : Primary electron acceptor of PS II) อิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : Plastoquinone) ต่อมา เมื่อมีการแตกตัวของน้ำออกหรือที่เรียกว่า Water splitting ที่ระบบแสงสองได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไปแทนที่อิเล็กตรอนที่คลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไปในระบบ จากนั้น อิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PS I) ระแบบแสงหนึ่งจะประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้น จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาและส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (A : primary electron acceptor of PS I) และเมื่อแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin : Fd) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอน ที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการผลิตก๊าซไฮโดรเจนขึ้น (รูปที่ 2.2) (Melis และ Happe, 2001)



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง
ที่มา : Melis และ Happe (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สาหร่ายสีเขียว (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2549)

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา (Chlorophyta) พบได้ทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล น้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง หรือน้ำลึกที่แสงส่องถึง สาหร่ายสีเขียวบางชนิดก็ขึ้นอยู่บนก้อนหิน ทราย โคลน เปลือกหอยบนพืช หรือสัตว์อื่น หรืออาจเจริญอยู่ในพืช หรือสัตว์ สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุเช่นเดียวกับรงควัตถุที่พบในพืชชั้นสูง คือ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แคโรทีนอยด์ และแซนโทฟิลล์ แซนโทฟิลล์มีหลายชนิด แต่ชนิดที่มากที่สุด คือ ลูทีน (Lutein) รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ โดยคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะเป็นเกลียว รูปดาว แผ่นแบน 1 แผ่น ร่างแห กระบอกตวง หัวท้ายเปิด และ รูปถ้วย สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะมีไพรีนอยด์ ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการสร้างแป้ง โดยจะมีเอนไซม์สร้างแป้ง (Amylose synthetase) ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแป้ง แต่สาหร่ายที่สร้างแป้งบางชนิดอาจไม่มีไพรีนอยด์ ลักษณะและจำนวนของไพรีนอยด์ในสาหร่ายแต่ละชนิดจะไม่เท่ากัน ซึ่งอาจใช้เป็นหลักในการจัดจำแนกสาหร่ายได้ สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะแบ่งออก 2 แบบ ได้แก่ (1) การแบ่งนิวเคลียสแล้วตามด้วยการแบ่งไซโตพลาสซึม และการแบ่งนิวเคลียสให้ได้จำนวนครบแล้วตามด้วยการแบ่งไซโตพลาสซึมอาจเรียกว่า โปรเกรสซีฟคลีเวจ (Progressive cleavage) (2) การสร้างสปอร์จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ ซูโอสปอร์ อะพลาโนสปอร์ ฮิพโนสปอร์ และออโตสปอร์ ฯลฯ รวมทั้งการขาดออกเป็นท่อน และการสร้างอะคินีทก็เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วย ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือ เกิดจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า แกมีท (Gamete) โดยจะมีแกมีทเพศผู้ (Male gamete) และแกมีทเพศเมีย (Female gamete) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเกิดการรวมกันของแกมีท ซึ่งมีทั้ง Isogamy, Anisogamy และ Oogamy สาหร่ายที่ใช้ในโครงงานพิเศษที่มีทั้งหมด 3 ชนิด ดังนี้

2.4.1 *Chlamydomonas* sp.

สาหร่าย *Chlamydomonas* sp. จะมีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย รูปโกฐ รูปตัว H หรือคลอโรพลาสต์อาจอยู่ข้างๆ เซลล์ อาจมีไพรีนอยด์ 1 อัน หรือมากกว่า มีคอนแทร็กไทล์แวคิวโอล 1 หรือ 2 อัน บริเวณที่ไม่มีคลอโรพลาสต์ทางด้านหน้า มีแฟลกเจลลัม 2 เส้นทางด้านหน้า มีอายสปอตฝังอยู่ในคลอโรพลาสต์บริเวณด้านหน้า เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม สาหร่าย *Chlamydomonas* sp. บางชนิดอาจสร้างแคโรทีนอยด์ ทำให้มีสีส้มหรือสีแดง และผนังเซลล์หนาขึ้นกลายเป็นอะคินีทได้ ส่วนการสืบพันธุ์ของ *Chlamydomonas* sp. มีทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 *Chorella* sp.

เซลล์ของ *Chorella* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-12 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ คลอโรพลาสต์มักอยู่ด้านข้างหรือเป็นรูปถ้วย มีไพรีนอยด์ มีผนังเซลล์ของ *Chorella* sp. พบว่าประกอบไปด้วยสารพวก Sporopollenin เซลล์ *Chorella* sp. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโตสปอร์ ซึ่งปกติจะมีจำนวน 4-8 เซลล์ บางครั้งอาจพบถึง 16 เซลล์ ซึ่งพบได้น้อยมาก นอกจากนี้ ยังพบว่า *Chorella* sp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีชื่อว่า คลอเรลลิน (Chlorellin) อีกด้วย

2.4.3 *Scenedesmus* sp.

เซลล์ *Scenedesmus* sp. เป็นโคโลนีที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 2, 4, 8 หรือ 16 เซลล์มาเรียงต่อกันด้านข้างตามความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ทรงกระบอก หรือพระจันทร์ครึ่งซีก เซลล์ที่อยู่ด้านริมสุดทั้งสองด้านอาจมีหนาม (Spine) ยื่นออกมา บางชนิดก็ไม่มี คลอโรพลาสต์เป็นแผ่นเต็มเซลล์ มีไพรีนอยด์และนิวเคลียสเซลล์ละ 1 อันเท่ากับจำนวนเซลล์ปกติของ *Scenedesmus* sp. ชนิดนั้น เมื่อแก่ก็จะหลุดออกจากผนังเซลล์ของแม่จับกันเป็นโคโลนีใหม่ ส่วนการสืบพันธุ์เป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ *Scenedesmus* sp. เป็นสาหร่ายที่มีชีวิตแบบแพลงก์ตอนพืชในน้ำจืด หรืออาจพบในดินได้

2.5 ธาตุอาหารของสาหร่าย (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2549)

สาหร่ายมีความจำเป็นต้องใช้ธาตุอาหารในการเจริญเติบโต การสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลและใช้กระบวนการต่างๆ ในการดำรงชีวิต ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการในการเจริญเติบโตคล้ายกับพืชขั้นสูง แต่ธาตุอาหารบางตัวอาจมีความต้องการแตกต่างจากพืชโดยทั่วไป ธาตุอาหารจำเป็นที่ต้องการในปริมาณมาก (Macronutrient elements) ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ ส่วนธาตุอาหารจำเป็นที่ต้องการในปริมาณน้อย (Micronutrient elements) ได้แก่ เหล็ก คลอไรด์ แมงกานีส โบรอน ทองแดง โมลิบดีนัม และสังกะสี นอกจากนี้ สาหร่ายยังต้องการสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ ในการเจริญเติบโต เช่น วิตามินบี 12 ซึ่งเป็นวิตามินที่สาหร่ายต้องการ โดยพบว่า *Chlorella* และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ด้วย วิตามินบี 1 เป็นส่วนประกอบของโคเอนไซม์ ไบโอตินเป็นวิตามินที่สาหร่ายต้องการแต่ต้องการน้อยกว่าวิตามินบี 12 และวิตามินบี 1 สาหร่ายที่ต้องการวิตามินบี 12 และวิตามินบี 1 มักต้องการไบโอตินด้วยเสมอ นอกจากนี้ ยังมีสารอีกหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายแต่ละชนิดซึ่งต้องการมากน้อยไม่เท่ากัน

สารดังกล่าว ได้แก่ ไนอาซิน กรดพาราแอมมิโนเบนโซอิค กรดโฟลิค กรดแพนโทธินิค ไพริดอกซิน กรดแอสคอร์บิค ไกลซีน และฮิสทิดีน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

2.6.1 ไนโตรเจน

ไนโตรเจน (N) เป็นธาตุที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ เมื่อขาดไนโตรเจน (-N) การสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์จะลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองลดลง เมื่อกิจกรรมของระบบแสงสองลดลงจะเกิดการขัดขวางการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองไปยังควิโนน (Q : Quinone) ทำให้ไม่มีอิเล็กตรอนไปกระตุ้นการรีดิวซ์พลาสโตควิโนน ออกซิเจนจึงถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ ส่งผลให้ระดับปริมาณออกซิเจนลดลง จึงช่วยส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังมีการสะสมแป้งและไขมัน ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ส่งผลให้โปรตีนที่ดูดซับพลังงานแสง (LHC : Light harvesting complex) ของศูนย์กลางปฏิกิริยา เอนไซม์ Rubisco และกิจกรรมระบบแสงสองลดลง

2.6.2 ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัส (P) เป็นธาตุที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต การหายใจ การแบ่งเซลล์ และเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกและสารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งมีบทบาทในการถ่ายทอดพลังงานภายในเซลล์ พลังงานภายในเซลล์มีการสะสมพลังงานในรูป ATP และ NADPH เมื่อขาดฟอสฟอรัส (-P) จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงพลังงานแสง และปริมาณสารตัวกลางในวิถีเพนโตสฟอสเฟตลดลง ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการถ่ายทอดพลังงาน ดังนั้น การถ่ายทอดอิเล็กตรอนของการสังเคราะห์แสงจึงถูกยับยั้ง อัตราการอิ่มตัวของแสงลดลง และยับยั้งการปลดปล่อยออกซิเจนออกสู่สิ่งแวดล้อม จากการเปลี่ยนแปลงที่กล่าวมานำไปสู่มีการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้น

2.6.3 โพแทสเซียม

โพแทสเซียม (K) เป็นโคแฟกเตอร์และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ประมาณ 30 ชนิด โพแทสเซียมช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการต่างๆ เช่น การสังเคราะห์แสง การหายใจ และการสังเคราะห์แป้งและโปรตีน เป็นต้น อีกทั้งยังช่วยในการเจริญเติบโต สร้างแป้งและน้ำตาล ควบคุมแรงดันภายในเซลล์ และขนย้ายสารจากการสังเคราะห์แสงไปแหล่งสะสมเพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Nitrate reductase ให้เปลี่ยนไนเทรต (NO_3^-) เป็นแอมโมเนียม (NH_4^+) เพื่อสร้างกรดอะมิโนและโปรตีน เมื่อขาดโพแทสเซียม (-K) เซลล์จะมีการสะสมคาร์โบไฮเดรต และน้ำตาลจะถูกรีดิวซ์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง และยังส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Pyruvate kinase ทำให้มีแหล่งพลังงานไม่เพียงพอต่อการสร้าง ATP และยังทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนลดลง นอกจากนี้ การขาดโพแทสเซียม (-K) ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Aldolase และส่งผลต่อกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแป้ง เมื่อน้ำตาลไม่ถูกนำไปสะสมเป็นแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงเหลือน้ำตาลสำหรับใช้เป็นอิเล็กตรอนเพื่อส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : Plastoquinone) และใช้ในการผลิตไฮโดรเจน การขาดโพตัสเซียม (-K) ยังทำให้การสังเคราะห์โปรตีน และสารต่างๆ ลดลง ส่งผลให้สูญเสียการทำงานของระบบแสงสอง และโปรตีน D_1 บกพร่อง จึงทำให้อัตราการผลิตออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำลดลง เมื่อการแตกตัวของน้ำลดลง มีออกซิเจนเกิดขึ้นน้อย จึงทำให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำงานได้ดีขึ้น และผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น

2.6.4 ซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์ (S) เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการสร้างโปรตีนในเซลล์ โดยจะถูกจัดเก็บในเซลล์ส่วนใหญ่ในรูปของกรดอะมิโน เช่น Cysteine และ Methionine กรดอะมิโน Cysteine มีการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (-S-S-) ซึ่งมีผลต่อรูปร่างโปรตีน และ Methionine จะอยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีน เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ (-S) ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดอะมิโน Cysteine และ Methionine ลดลง และมีผลต่อการทำงานของโปรตีน D_1 ในระบบแสงสองทำให้เกิดการยับยั้งการแตกตัวของน้ำ ส่งผลให้ปริมาณการเกิดออกซิเจนลดลง ซึ่งในที่สุดจะทำให้เซลล์ผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Winkler และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella fusca* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเฮเทอโรโทรป แล้วชักนำให้อยู่ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน หลังจากนั้น นำสาหร่ายสีเขียวมาวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C.reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดในชั่วโมงที่ 2 ของการชักนำให้ปราศจากออกซิเจน หลังจากนั้น การผลิตไฮโดรเจนคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 4 ส่วนสาหร่ายสีเขียว *C. fusca* ผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และผลิตได้มากที่สุดในชั่วโมงที่ 3 แต่การผลิตไฮโดรเจนจะลดลงในชั่วโมงที่ 4 นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสาหร่ายสีเขียว *C. fusca*

Fouchard และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะ คือ สภาวะมิกโซโทรปและโฟโตออโตโทรป ภายใต้สภาวะมิกโซโทรปนั้น จะทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร TAP ที่ขาดซัลเฟอร์ และเติมสาร 3-(3,4-dichlorophenyl) 1-1 dimethylurea (DCMU) เป็นตัวยับยั้งการทำงานของระบบแสงสอง พบว่า สาหร่ายมีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น พร้อมกับการสะสมแป้ง แต่ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป สาหร่ายจะไม่ผลิตไฮโดรเจนและไม่มีการสะสมแป้งเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tsygankov และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. reinhardtii* ในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์และให้อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้ความเข้มแสงต่ำ 25 ไมโครโมลไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จากการทดลองพบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 56.4±16.7 มิลลิลิตรต่อลิตร หรือ 56.4×10^{-3} ลูกบาศก์เมตรต่อลูกบาศก์เมตรของสารละลายเซลล์ และพบว่า ยิ่งถ้าให้ความเข้มแสงสูงประมาณ 110-120 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที จะส่งผลให้มีการผลิตออกซิเจนมากขึ้น การผลิตไฮโดรเจนจึงลดลง แต่ถ้าให้ความเข้มแสงในปริมาณต่ำประมาณ 20-25 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ออกซิเจนจะถูกใช้มาก ส่งผลให้มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น

Skjånes และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 21 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากน้ำทะเล น้ำจืด และจากสิ่งแวดล้อมทั่วไป พบว่ามีสาหร่ายสีเขียว 7 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์และชักนำให้อยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii, Chlamydomonas noctigama, Chlamydomonas euryale, Chlamydomonas vectensis, Chlorella pyrenoidosa, Desmodesmus subspicatus* และ *Pseudokirchneriella subcapitata* จากนั้น นำสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงในถังหมัก โดยเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซัลเฟอร์ และใช้อะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ให้แสงสว่างและปรับ pH ของอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงให้มีค่าคงที่ จากการทดลองพบว่า ส่วนประกอบหลายๆ อย่างที่ใช้ในการทำถังหมัก เช่น ยาง พลาสติก และโลหะผสม (Steel alloy) นั้นส่งผลกระทบต่อสาหร่ายหลายชนิดที่เพาะเลี้ยง จากการนำสาหร่ายที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ทั้ง 7 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยง พบว่าสาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* ผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุด รองลงมาคือ *C. noctigama* และ *C. Euryale* ตามลำดับ นอกจากนี้ ในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.9 สาหร่ายสีเขียว *C. noctigama* เจริญเติบโตได้ดีที่สุด

Chader และคณะ (2009) ศึกษาอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากดินและแหล่งน้ำ foggara ในซาฮารา ประเทศแอลจีเรีย ได้แก่ *Chlorella sorokiniana* สายพันธุ์ Ce, *Chlorella salina* สายพันธุ์ Mt, *Chlorella* สายพันธุ์ Pt6 พบว่าสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์ สาหร่าย *C. sorokiniana* สายพันธุ์ Ce ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดคือ 147 มิลลิลิตร ณ เวลา 222 ชั่วโมง ที่ความดันของออกซิเจน 2 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlorella* ทั้ง 3 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *C. reinhardtii* พบว่าสาหร่าย *Chlorella* ทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

He และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และระบบแสงสองของ *Chlorella protothecoides* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ขาดไนโตรเจนและซัลเฟอร์ พบว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ขาดทั้งไนโตรเจนและซัลเฟอร์จะมีอัตราการผลิตไฮโดรเจนต่ำ แต่เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ขาดซัลเฟอร์เพียงอย่างเดียวนั้นจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูง เนื่องจากการขาดซัลเฟอร์นั้นจะช่วยลดกิจกรรมของออกซิเจนในระบบแสงสองได้

Papazi และคณะ (2014) ศึกษาการขาดโพแทสเซียมในเซลล์สาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ที่มีการผลิตไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการขาดโพแทสเซียมให้ผลการผลิตไฮโดรเจนดีที่สุดใน *Scenedesmus obliquus*

Ling และคณะ (2015) ศึกษาการเพิ่มขึ้นของการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายทะเล *Chlorella pyrenoidosa* ในการขาดธาตุไนโตรเจน พบว่าการขาดธาตุไนโตรเจนทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองในสภาวะที่มีแสงลดลง และประสิทธิภาพการทำงานของออกซิเจนในระบบแสงสองลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งส่งผลให้สาหร่ายสีเขียว *C. pyrenoidosa* มีการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

1. สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่ซื้อมาจาก Chlamydomonas Resource center ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2Sins4 ที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งน้ำจากนาข้าว จังหวัดสิงห์บุรี
3. สาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

อาหาร TAP (Tris acetate phosphate medium) (ภาคผนวก ก)

3.2.2 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กรดบอริก (H_3BO_3)
2. กรดอะซิติก (CH_3COOH)
3. กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (EDTA)
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)
5. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)
6. โคบอลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)
7. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)
8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
10. โซเดียมโมลิเบตเฮปตะไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)
11. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
12. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
13. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
15. เฟอรัสซัสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)
16. เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2.6H_2O$)
17. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)
18. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

3.2.3 ก๊าซมาตรฐานและก๊าซที่ใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4 เปอร์เซ็นต์ในอาร์กอน (Praxair, Thailand)
2. ก๊าซอาร์กอน (Thonburiwattana Ltd, Thailand) (ความบริสุทธิ์ 99.999%)

3.3 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
2. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
4. ขวดดูแรน (Duran bottle) ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
5. ขวดแก้ว (Headspace vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร
6. คิวเวต (Semimicro cuvette rectangular 10 mm)
7. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph)
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centeifuge)
10. เครื่องผสมสาร (Vortex)
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
12. จานเพาะเชื้อ (Pertridish)
13. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)
14. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
15. ไมโครปิเปต (Micropipette)
16. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
17. หลอดเซ็นตริฟิวจ์ (Centrifuge tube)
18. สไลด์ (Slide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียว

นำสาหร่ายทั้งสามชนิดมาทำการเพาะเลี้ยงบนจานอาหารที่มีอาหารแข็ง TAP (ภาคผนวก ก) โดยเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีมาลากบนอาหารแข็ง นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น นำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร TAP (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเป็นหัวเชื้อในการทดลอง

3.4.2 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่ายเป็นเวลา 3 วัน นำเซลล์แขวนลอยมาใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้น นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้น กระจายเซลล์ในอาหาร TAP ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในฟลาสก์ที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรประมาณ 0.100 จากนั้น นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงที่ 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญเติบโตทุก 6 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เป็นเวลาทั้งหมด 4 วัน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.4.3 วิธีการเตรียมตัวอย่างและการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว TAP เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากหัวข้อ 3.4.2 มาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารทดสอบจำนวน 2 ครั้ง จากนั้น นำเซลล์มากระจายอาหารทดสอบ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ปิเปตเซลล์แขวนลอยในขวด vial ขนาด 10 มิลลิลิตร 3 ขวด ขวดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาขวด นำตัวอย่างไปพ่นก๊าซอาร์กอน เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น นำก๊าซตรงบริเวณส่วนของช่องว่างเหนือสารตัวอย่างภายในขวดบรรจุสาร (Head space) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยจะใช้ไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thermal conductivity detector (Gas chromotograph; GC-TCD) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1 นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากผลของ GC-TCD ไปคำนวณปริมาณก๊าซไฮโดรเจนดังแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเทอร์มอลคอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ [Gas Chromotograph-Thermal conductivity detector (GC-TCD)]

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Column	Pack column 2 m; 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)

3.4.4 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 โดยการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตเฮเทอโรโทรปและแปรผันปัจจัยที่ต่างกัน

3.4.4.1 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่แปรผันอายุเซลล์ของการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.100 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสงที่ 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงครบเวลาที่กำหนด เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.4.3 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนโดยจะใช้ไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี Thermal conductivity detector (Gas chromotograph; GC-TCD) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.2 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่แปรผันค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.100 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลาที่เหมาะสม นำเซลล์ที่มีอายุเซลล์ที่เหมาะสมมาปรับ OD_{750} ให้มีค่าเท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 จากนั้น นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจน โดยจะใช้ไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี Thermal conductivity detector (Gas chromotograph; GC-TCD) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1

3.4.4.3 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสอรัส โพแทสเซียม และซัลเฟอร์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.100 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลาที่เหมาะสม จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยมาทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กระจายเซลล์ลงในอาหาร TAP ที่ขาด N, P, K, S และ TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.4.3 โดยล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ขาด N, P, K และ S จากนั้น ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนโดยจะใช้ไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี Thermal conductivity detector (Gas chromotograph; GC-TCD) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.4 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบร่วม

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.100 นำเซลล์ไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลาที่เหมาะสม จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยมาทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กระจายเซลล์ลงในอาหาร TAP ที่ขาดอาหารร่วมกัน และอาหาร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 30 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา เตรียมตัวอย่างสาหร่ายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ไฮโดรเจนตามวิธีในข้อ 3.4.3 โดยล้างเซลล์ด้วยอาหาร TAP และอาหาร TAP ที่ขาดอาหารอาหารแบบร่วม จากนั้น ทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม นำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนโดยจะใช้ไฮโดรเจนมาตรฐาน 4 เปอร์เซ็นต์ในก๊าซอาร์กอนเป็นก๊าซมาตรฐานด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟที่มี Thermal conductivity detector (Gas chromotograph; GC-TCD) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนแสดงในตารางที่ 3.1

3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

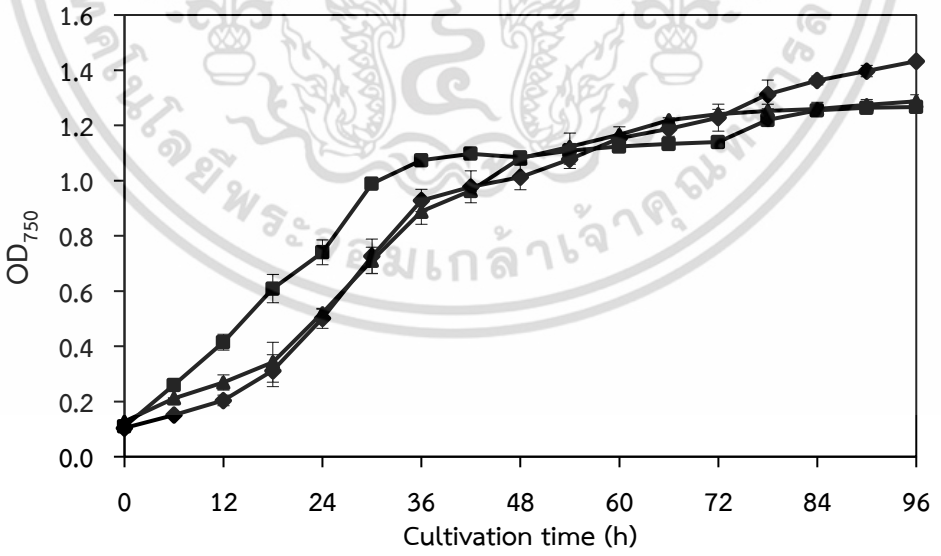
ออกแบบชุดการทดลองเป็นแบบปัจจัยเดียว (Single-Factor Analysis) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดยวิธี One way ANOVA แล้ววัดค่าความแตกต่างของข้อมูลตามวิธีของ Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS Statitistic ver. 23 โดยตั้งสมมติฐานคือยอมรับสมมติฐาน H_0 เมื่อค่า $P \leq 0.05$ มีปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่แตกต่างกัน และปฏิเสธสมมติฐาน H_1 เมื่อค่า $P > 0.05$ คือปัจจัยอย่างน้อย 1 ปัจจัยที่มีค่าไม่แตกต่างกัน ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย TAP โดยปรับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ประมาณ 0.1 ภายใต้สภาวะเขย่าและมีแสง พบว่า สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดมีรูปแบบการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับแบคทีเรีย คือ มีระยะพัก (Lag phase), ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log phase) และระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2Sins4 มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (รูปที่ 4.1) โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 เท่ากับ 0.030 ± 0.021, 0.026 ± 0.006 และ 0.025 ± 0.021 ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก สาหร่ายแต่ละชนิดมีลักษณะทางเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกัน ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนจากอาหารในการทำกิจกรรมภายในเซลล์แตกต่างกัน รวมทั้งสาหร่ายแต่ละชนิดจะเจริญในอุณหภูมิและความเข้มแสงที่แตกต่างกัน (Papazi *et al*., 2014) ส่งผลให้สาหร่ายแต่ละชนิดเจริญเติบโตและเข้าสู่ช่วงระยะต่างๆ ไม่เท่ากัน



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (◆), *Chlorella* sp. 2Sins4 (■) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (▲) ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP

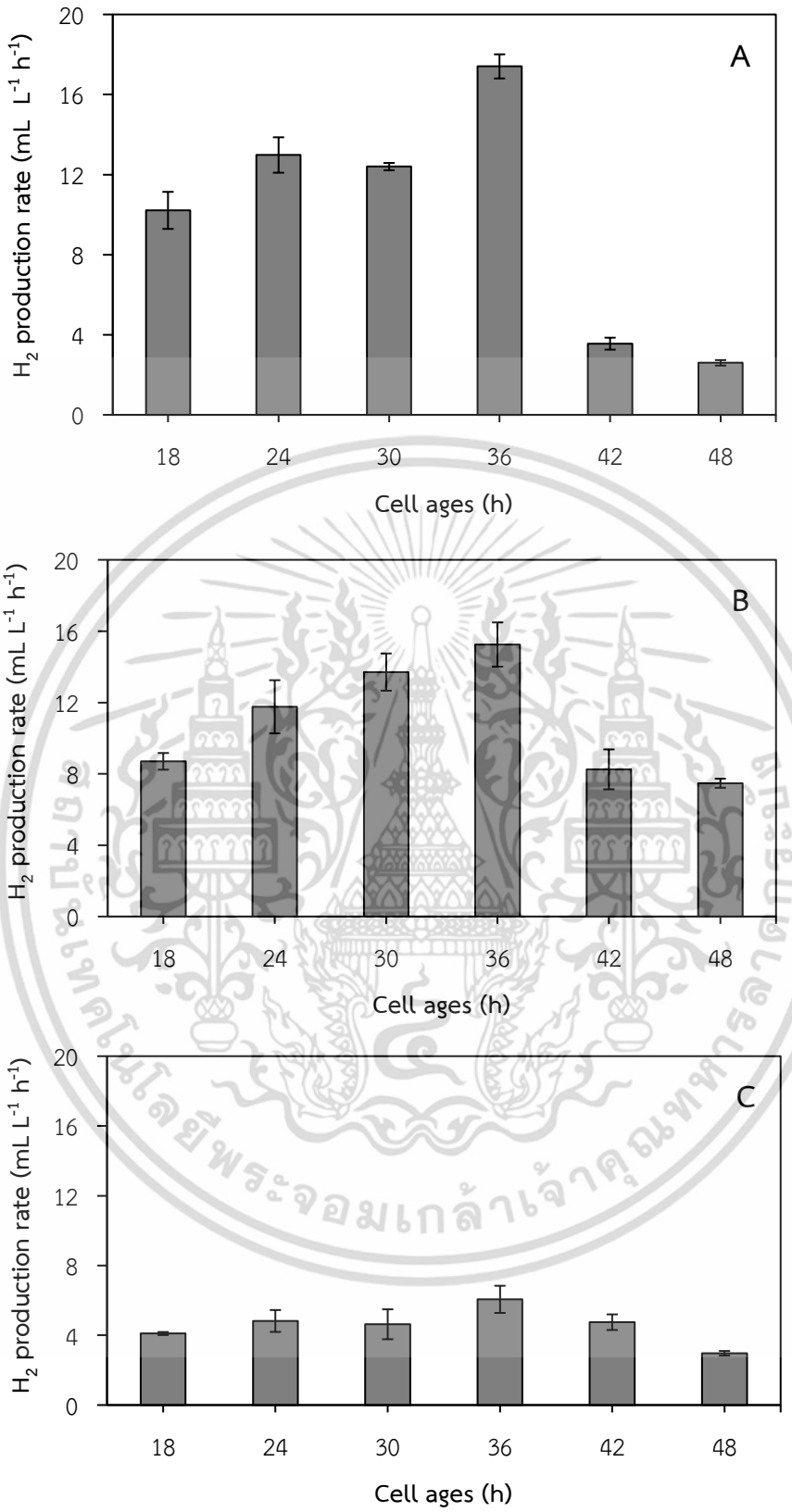
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

จากการนำเซลล์สาหร่ายที่ช่วงอายุเซลล์ต่างๆ ได้แก่ 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP ซึ่งมีการปรับให้มีค่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.1 จากนั้นมาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และบรรจุลงขวด Vial นำเซลล์แขวนลอยมาพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 10 นาทีและนำก๊าซใน Head space ไปวิเคราะห์ค่าไฮโดรเจน พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุดเท่ากับ 17.406, 15.250 และ 6.059 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2) และมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 80.548, 74.292 และ 43.378 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3) และให้อัตราการผลิตที่น้อยที่สุดเท่ากับ 2.599, 7.474 และ 2.967 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะ Late log phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด และเป็นระยะที่เซลล์มีการสังเคราะห์แสง การแบ่งเซลล์ และกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ลดลง จึงส่งผลให้เซลล์มีพลังงานและอิเล็กตรอนเหลือเก็บภายในเซลล์มากขึ้น ซึ่งเพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน และทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้น ในทางกลับกัน เซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์เข้าสู่ระยะ Stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับอัตราการเกิด เนื่องจากปริมาณอาหารที่ไม่เพียงพอจากการบริโภค ส่งผลให้พลังงานภายในเซลล์ลดลง ไม่เพียงพอต่อกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์และการสังเคราะห์แสงลดลง เป็นผลให้อิเล็กตรอนไม่เพียงพอต่อการผลิตไฮโดรเจน จึงส่งผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลงเช่นกัน

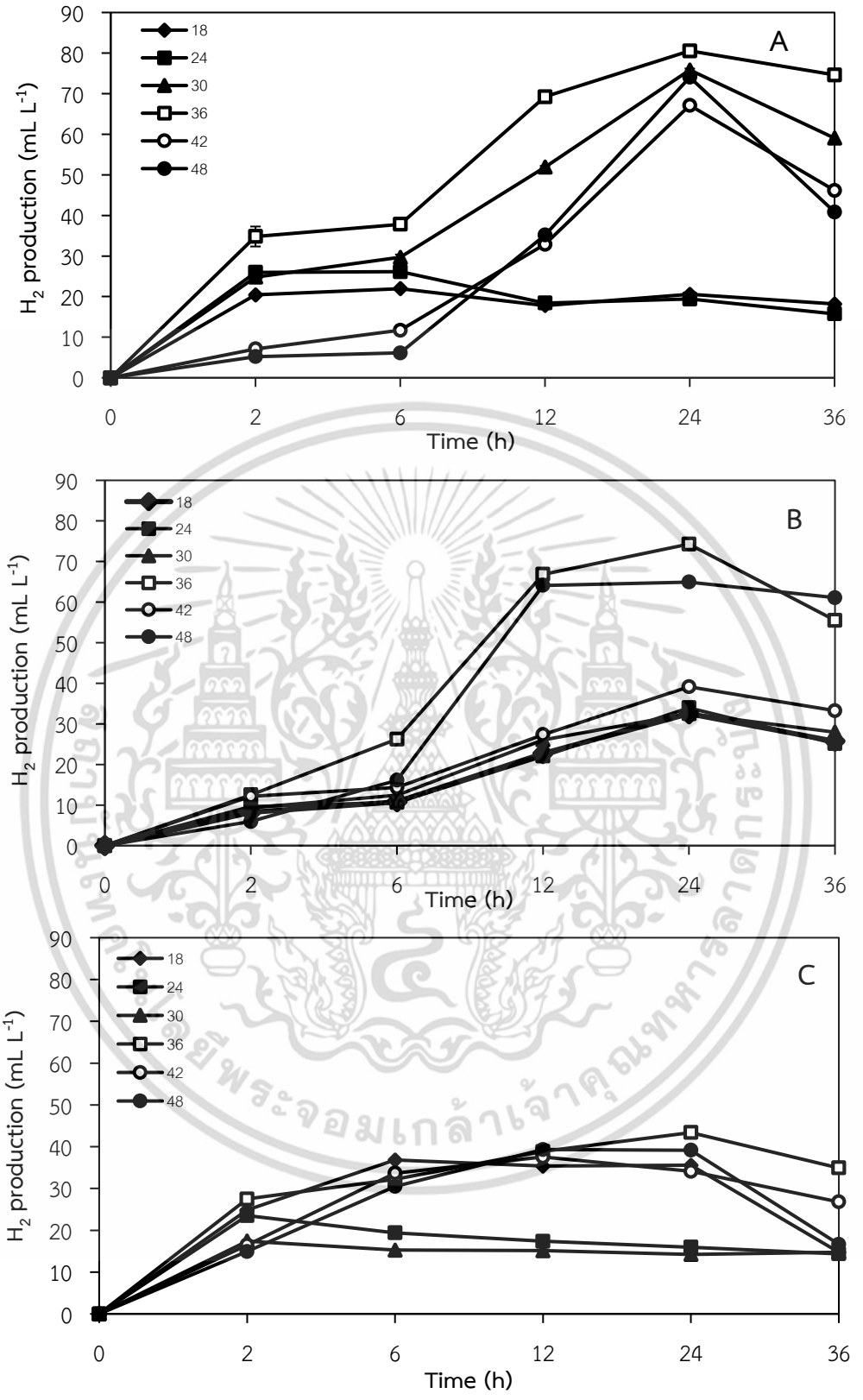
จากการทดลองศึกษาผลของอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดในอาหาร TAP สามารถสรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิด ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ในการศึกษาขั้นต่อไป จึงนำสาหร่ายที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ไปศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนในช่วงอายุเซลล์ต่างๆ ของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การสะสมการผลิตไฮโดรเจนในช่วงอายุเซลล์ต่างๆ ของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (C)

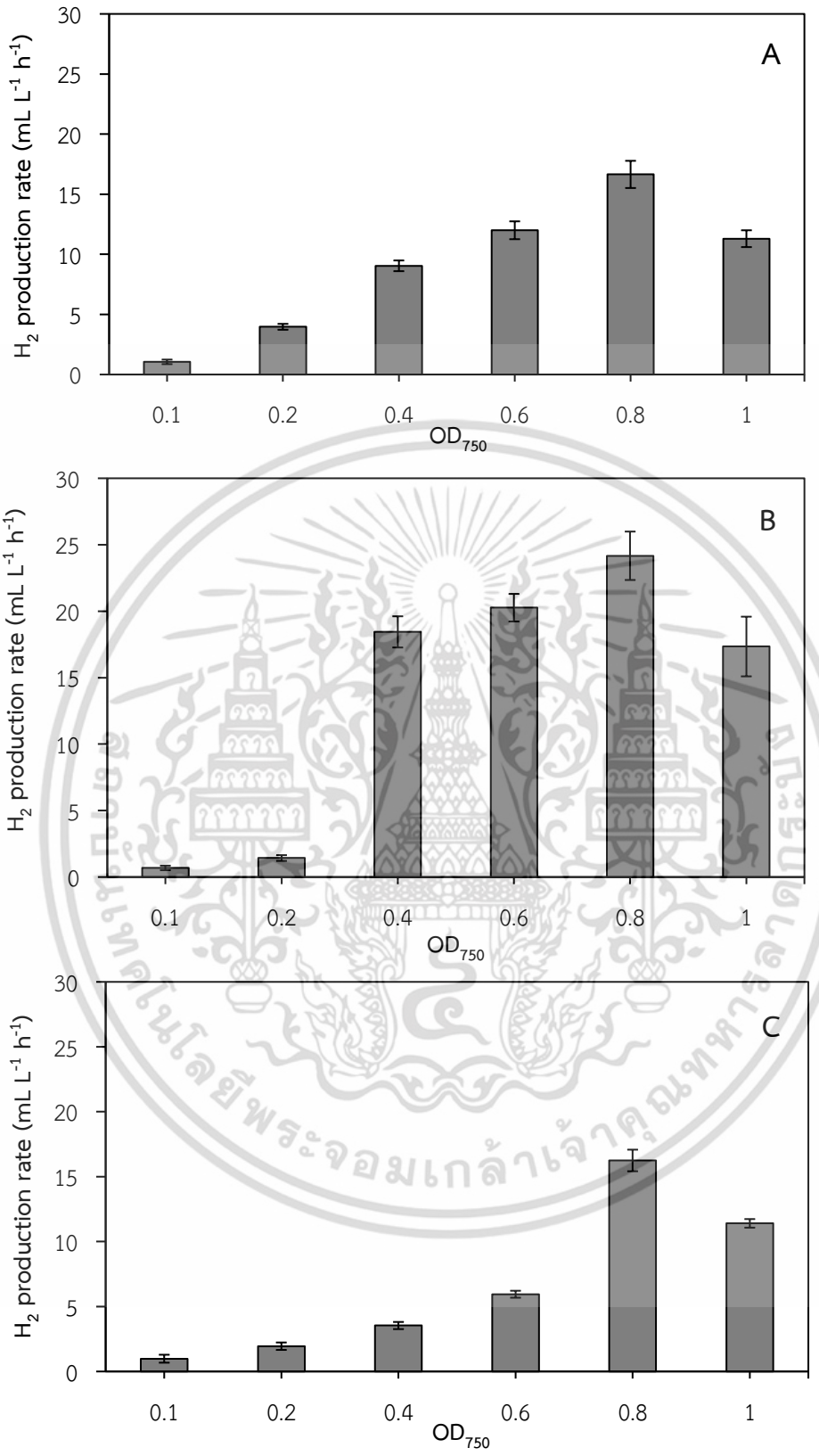
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 โดยนำเซลล์แขวนลอยของสาหร่ายมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรให้เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 และนำไปวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน พบว่า สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุดเท่ากับ 16.647, 24.170 และ 16.250 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 (รูปที่ 4.4) และมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่สูงที่สุดเท่ากับ 122.892, 103.521 และ 87.147 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรเท่ากับ 0.8 และการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.5) สาหร่ายที่มีค่า OD_{750} เท่ากับ 0.1 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่น้อยที่สุดเท่ากับ 1.052, 0.687 และ 0.983 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) จากการทดลอง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเซลล์ต่ำ การผลิตไฮโดรเจนจะลดลง เนื่องจากมีปริมาณเซลล์น้อย และเมื่อความเข้มข้นของเซลล์มากขึ้น จนถึงค่า OD_{750} เท่ากับ 0.8 เซลล์จะผลิตไฮโดรเจนสูงสุด แสดงว่า มีปริมาณของเซลล์ที่มากพอ แต่ถ้าความเข้มข้นของเซลล์มากจนเกินไป จะทำให้เซลล์เกิดการบดบังแสงกันเอง ไม่สามารถรับพลังงานแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง และส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Hahn *et al*., 2004)

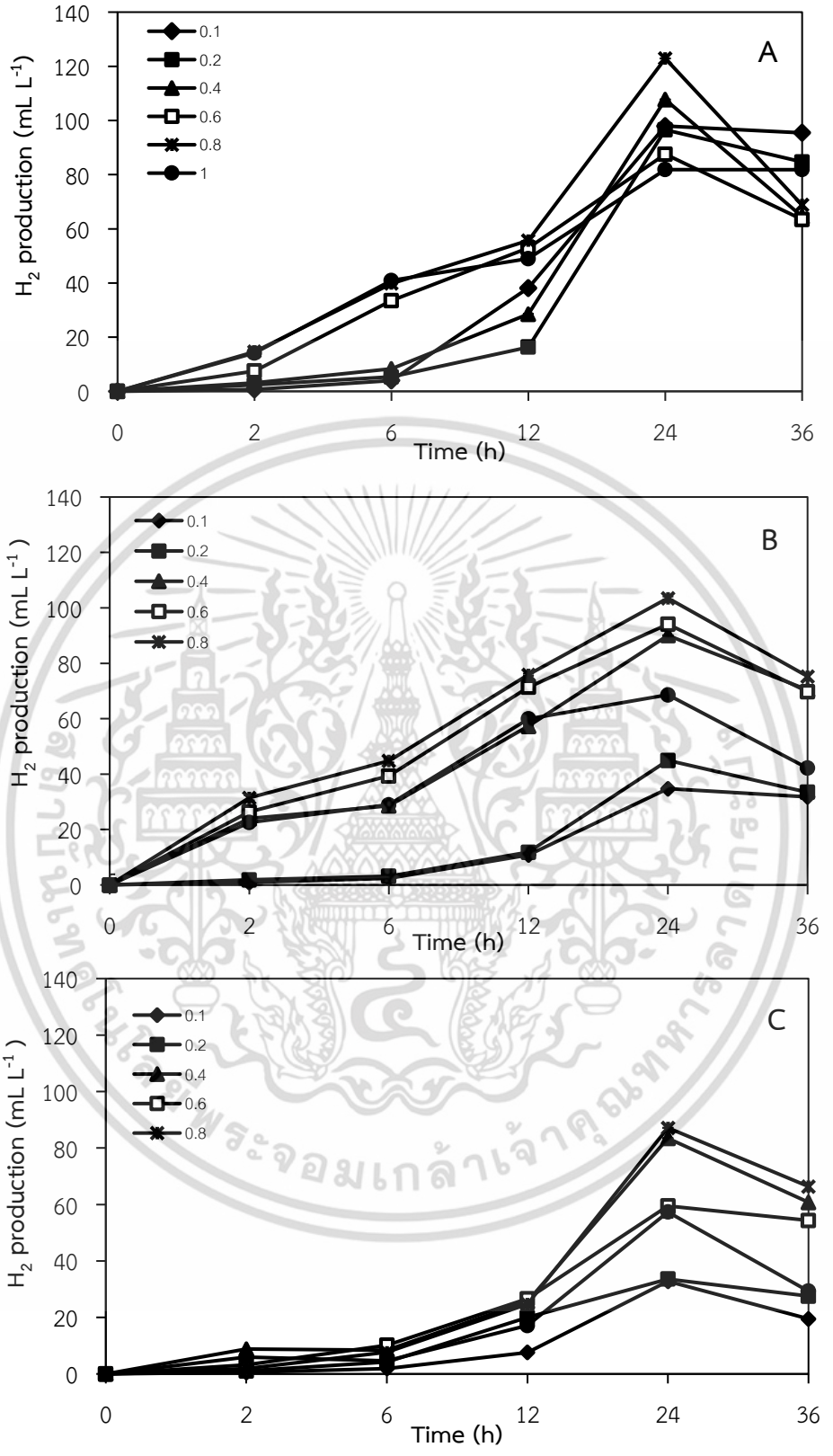
จากการศึกษาผลของความเข้มเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิด สามารถสรุปได้ว่า เซลล์สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและที่ความเข้มข้นเซลล์ที่มีค่า OD_{750} เท่ากับ 0.8 ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ในการศึกษาขั้นถัดไป จึงนำสาหร่ายที่มีอายุเซลล์และความเข้มข้นเซลล์ที่เหมาะสมนี้ ไปศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (C) ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง และแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ โดยให้ค่า OD_{750} ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การสะสมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (C) ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง และแปรผันความเข้มข้นของเซลล์ โดยให้ค่า OD_{750} ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

4.4.1 ผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

จากการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยนำเซลล์แขวนลอยสาหร่ายที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมงและมีค่า OD_{750} เท่ากับ 0.8 มาบ่มในอาหารสูตร TAP ที่มีการขาดธาตุอาหารต่างๆ ได้แก่ TAP-N, TAP-P และ TAP-K โดยมีอาหาร TAP ปกติเป็นตัวควบคุม พบว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-S และ TAP-N ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 30.898 และ 21.588 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 A) และที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-S มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 276.501 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.7 A) สาหร่าย *Chlorella* sp. 2Sins4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-K และ TAP-P ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 33.885 25.399 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 B) และที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-K มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 283.557 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.7 B) สาหร่าย *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-K และ TAP-S ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 30.125 และ 23.334 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.6 C) และที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TAP-P มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 209.637 มิลลิลิตรต่อลิตร (รูปที่ 4.7 C)

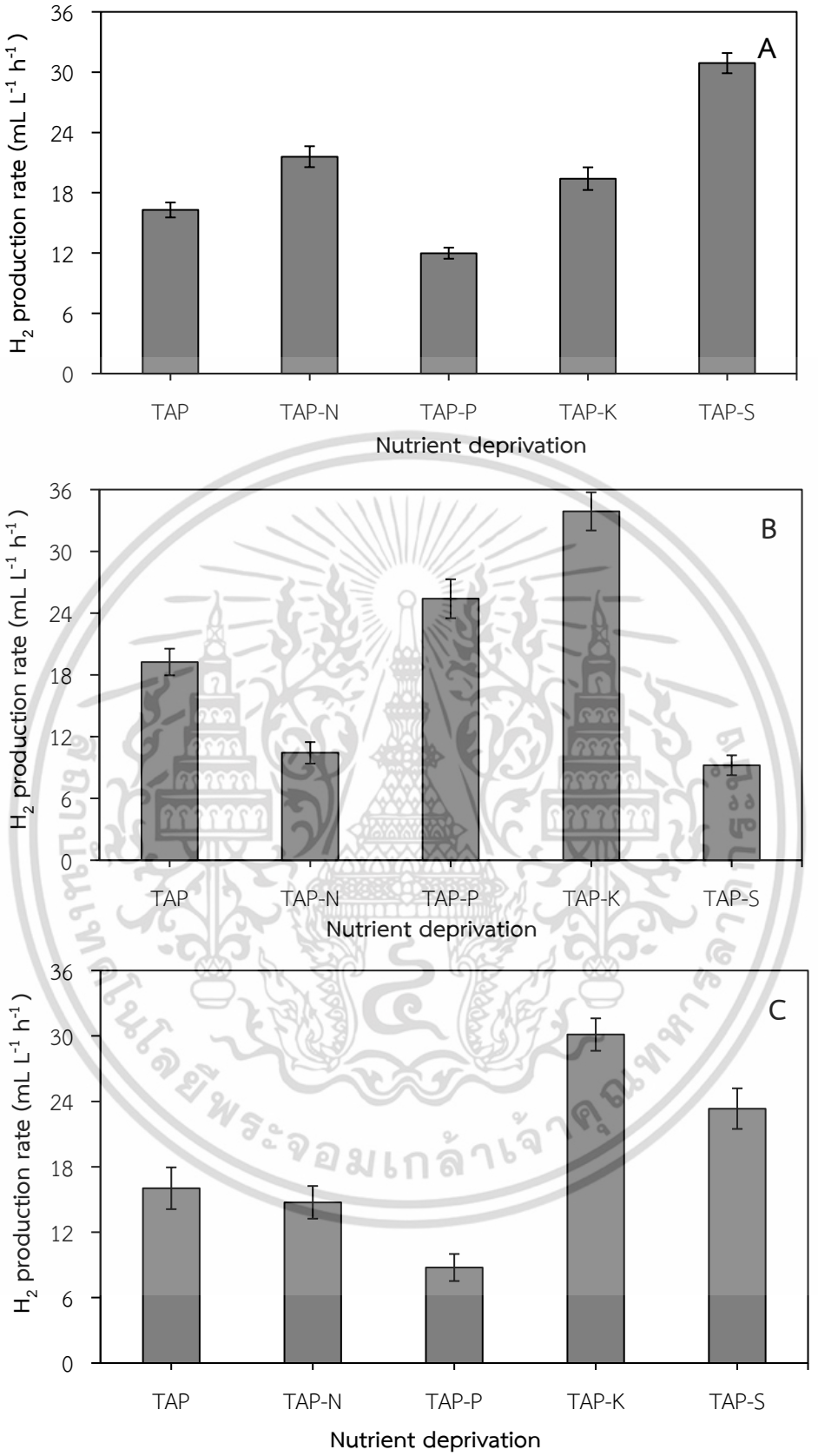
จากผลการทดลองสังเกตได้ว่า การขาดธาตุอาหารต่างๆ มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยซัลเฟอร์ (S) และโพแทสเซียม (K) มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายอย่างเด่นชัด เนื่องจากซัลเฟอร์ (S) เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน Cysteine และ Methionine เมื่อขาดซัลเฟอร์จะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโน ส่งผลให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีน D1 ที่เป็นองค์ประกอบของระบบแสงสอง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงสองลดลง ปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำถูกยับยั้งและปริมาณออกซิเจนลดลง เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ เป็นผลให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้น (Wykoff *et al*., 1998) ส่วนโพแทสเซียม (K) เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ในกระบวนการต่างๆ เช่น การสังเคราะห์แสง การหายใจ การขนย้ายสารจากการสังเคราะห์แสงและการกระตุ้นการทำงานของ Aldolase และ Pyruvate kinase ในวิถีไกลโคลิซิส เมื่อขาดโพแทสเซียมจะส่งผลให้เซลล์เกิดการสะสมของคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาล กิจกรรมต่างๆ ของเอนไซม์จึงลดลงมีผลต่อการขัดขวางการกระตุ้นเอนไซม์ Pyruvate kinase ทำให้แหล่งพลังงานไม่เพียงพอต่อการสร้าง ATP และกระตุ้นเอนไซม์ Aldolase กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นไพรูเวทจึงถูกระงับ น้ำตาลที่สะสมอยู่จึงถูกนำไปใช้เป็นแหล่งอิเล็กตรอนโดยอิเล็กตรอนถูกขนส่งผ่าน Plastoquinone เพื่อใช้ในการผลิตไฮโดรเจน จึงเป็นผลให้มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูง ในการทดลองนี้ การขาดธาตุไนโตรเจน (-N) และฟอสฟอรัส (-P) มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดเพียงเล็กน้อย เนื่องจากการขาดธาตุทั้ง 2 ชนิดนี้ส่งผลต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ โดยเมื่อขาดไนโตรเจน (-N) ซึ่งเป็นธาตุสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนและเป็นหน่วยโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ ส่งผลให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน ระบบแสงสองถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขัดขวางการทำงาน การถ่ายทอดอิเล็กตรอนจากระบบแสงสองไปสู่ Q_A และ Q_B ถูกระงับ ปริมาณออกซิเจนจากการแตกตัวของน้ำลดลงและออกซิเจนบางส่วนถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถทำงานได้ดีขึ้น ส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนเพิ่มมากขึ้น (Cournac *et al*., 2000) ในการขาดฟอสฟอรัส (-P) ซึ่งเป็นธาตุที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง การหายใจและเป็นองค์ประกอบของพลังงาน ATP จึงมีผลต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนพลังงานแสงลดลง ทำให้สารตัวกลางในการขนส่งพลังงานลดลง การถ่ายทอดอิเล็กตรอนถูกขัดขวาง ปริมาณออกซิเจนลดลง จึงมีการผลิตไฮโดรเจนในอัตราที่สูงขึ้น (Rowan, 1989)

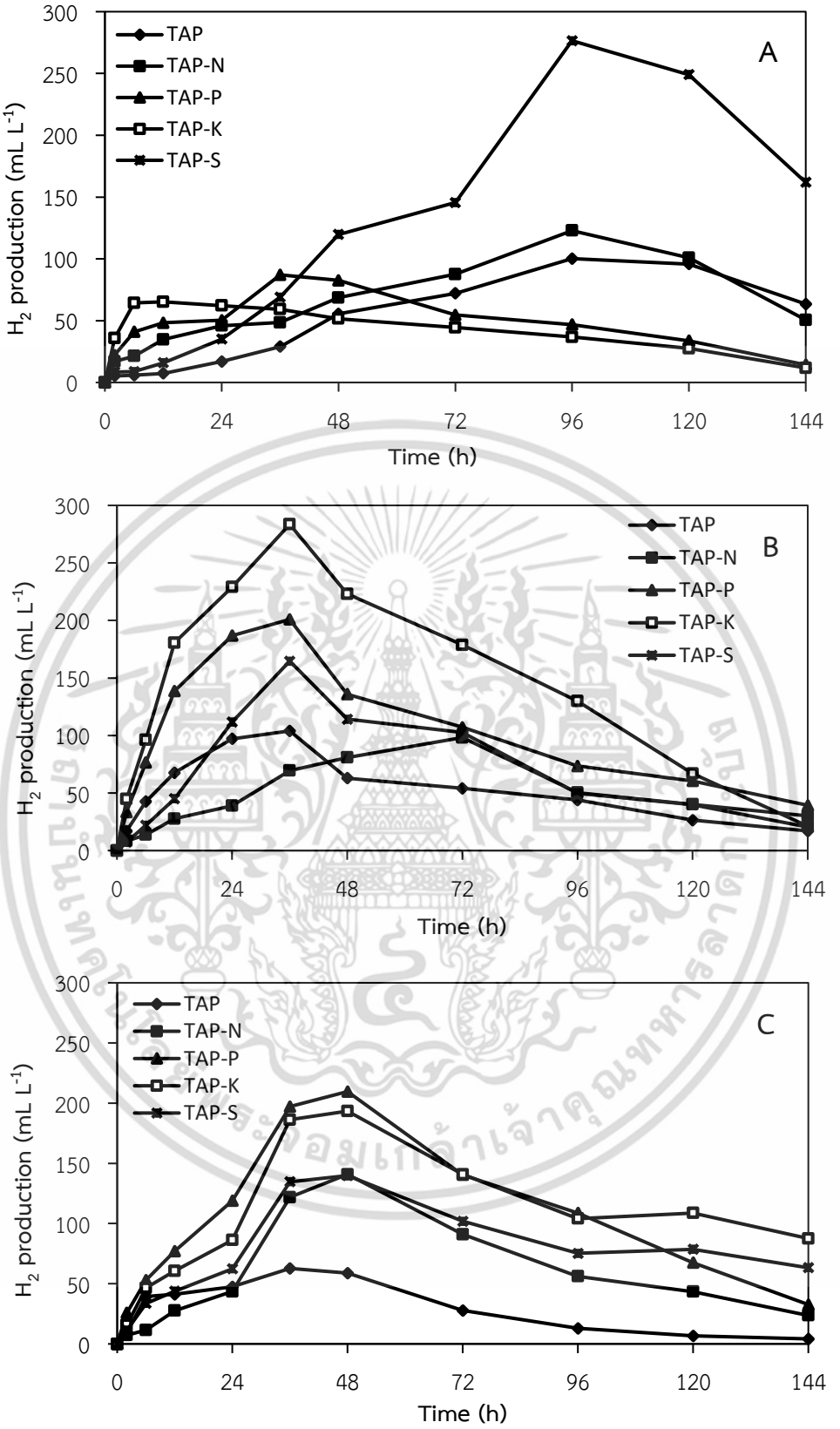
จากการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยวต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิด สามารถสรุปได้ว่า การขาดซัลเฟอร์ (-S) และขาดไนโตรเจน (-N) มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และการขาดโพแทสเซียม (-K) และขาดฟอสฟอรัส (-P) มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Chlorella* sp. 2Sins4 และการขาดโพแทสเซียม (-K) และขาดซัลเฟอร์ (-S) มีผลต่ออัตราการผลิตไฮโดรเจนของ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในการศึกษาขั้นถัดไป จึงสนใจศึกษาการขาดธาตุอาหารแบบร่วมที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (C) ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 การสะสมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A),*Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 (C) ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่ขาดธาตุแบบเดี่ยว

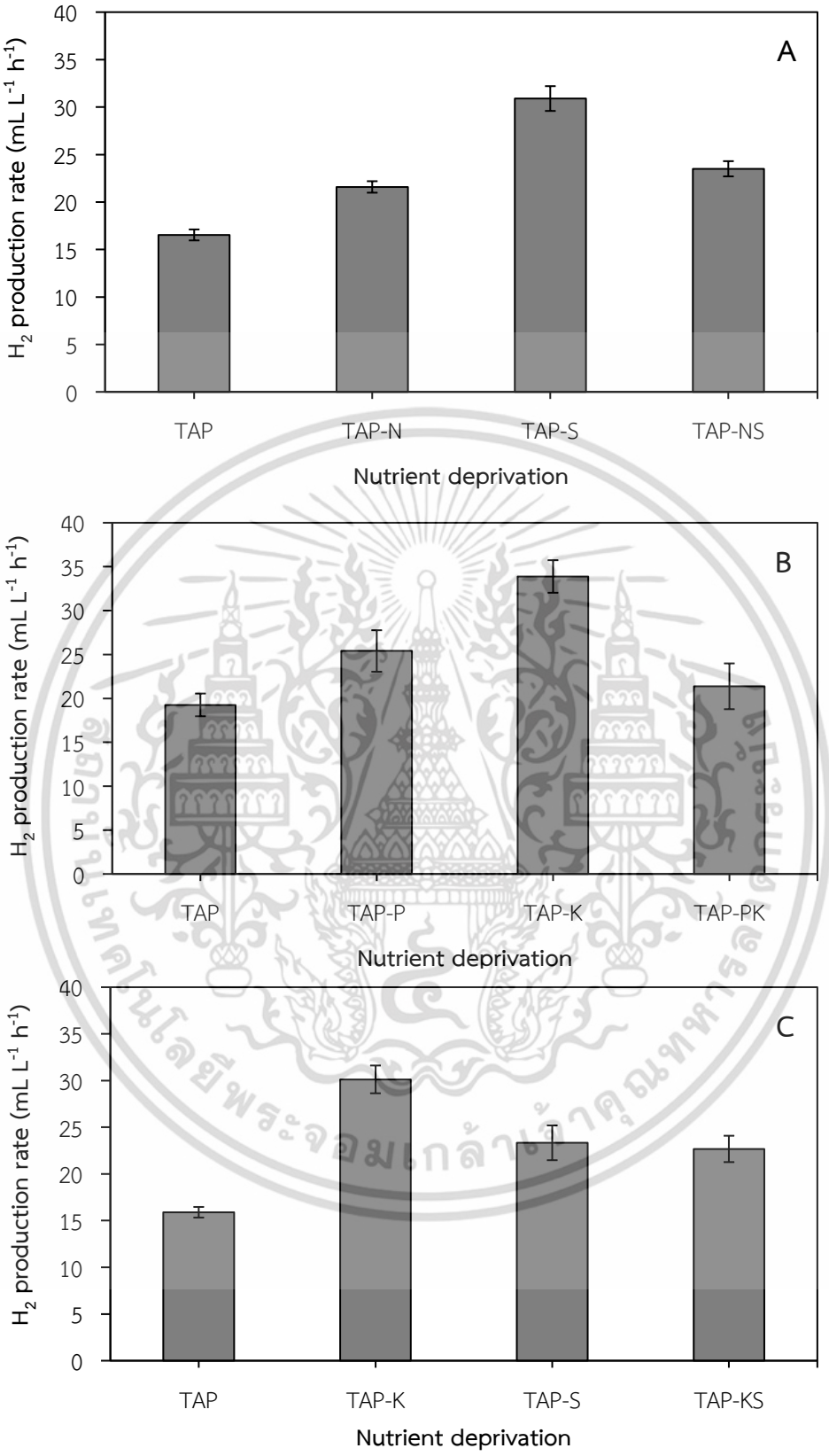
ชนิดของสาหร่ายสีเขียว	อาหารเพาะเลี้ยง	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ($mL\ L^{-1}\ h^{-1}$)	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด ($mL\ L^{-1}$)
Chlamydomonas reinhardtii CC124	TAP	16.287 ± 0.560	100.200 ± 0.440 (96 h)
	TAP-N	21.588 ± 0.600	122.813 ± 1.100 (96 h)
	TAP-P	11.984 ± 0.540	87.046 ± 0.340 (36 h)
	TAP-K	19.404 ± 1.120	65.234 ± 0.640 (12 h)
	TAP-S	30.898 ± 1.000	276.501 ± 2.600 (96 h)
Chlorella sp. 2Sins4	TAP	19.256 ± 1.280	104.018 ± 1.380 (36 h)
	TAP-N	10.433 ± 1.040	98.256 ± 0.800 (72 h)
	TAP-P	25.399 ± 1.880	200.923 ± 1.760 (36 h)
	TAP-K	33.885 ± 1.840	283.557 ± 2.360 (36 h)
	TAP-S	9.225 ± 0.960	164.661 ± 1.900 (36 h)
Scenedesmus obliquus TISTR 8546	TAP	16.030 ± 1.900	62.735 ± 0.540 (36 h)
	TAP-N	14.740 ± 1.480	140.883 ± 0.460 (48 h)
	TAP-P	8.763 ± 1.240	209.637 ± 0.620 (48 h)
	TAP-K	30.125 ± 1.480	193.401 ± 0.360 (48 h)
	TAP-S	23.334 ± 1.8860	139.865 ± 0.440 (48 h)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลของการขาดธาตุอาหารแบบร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว

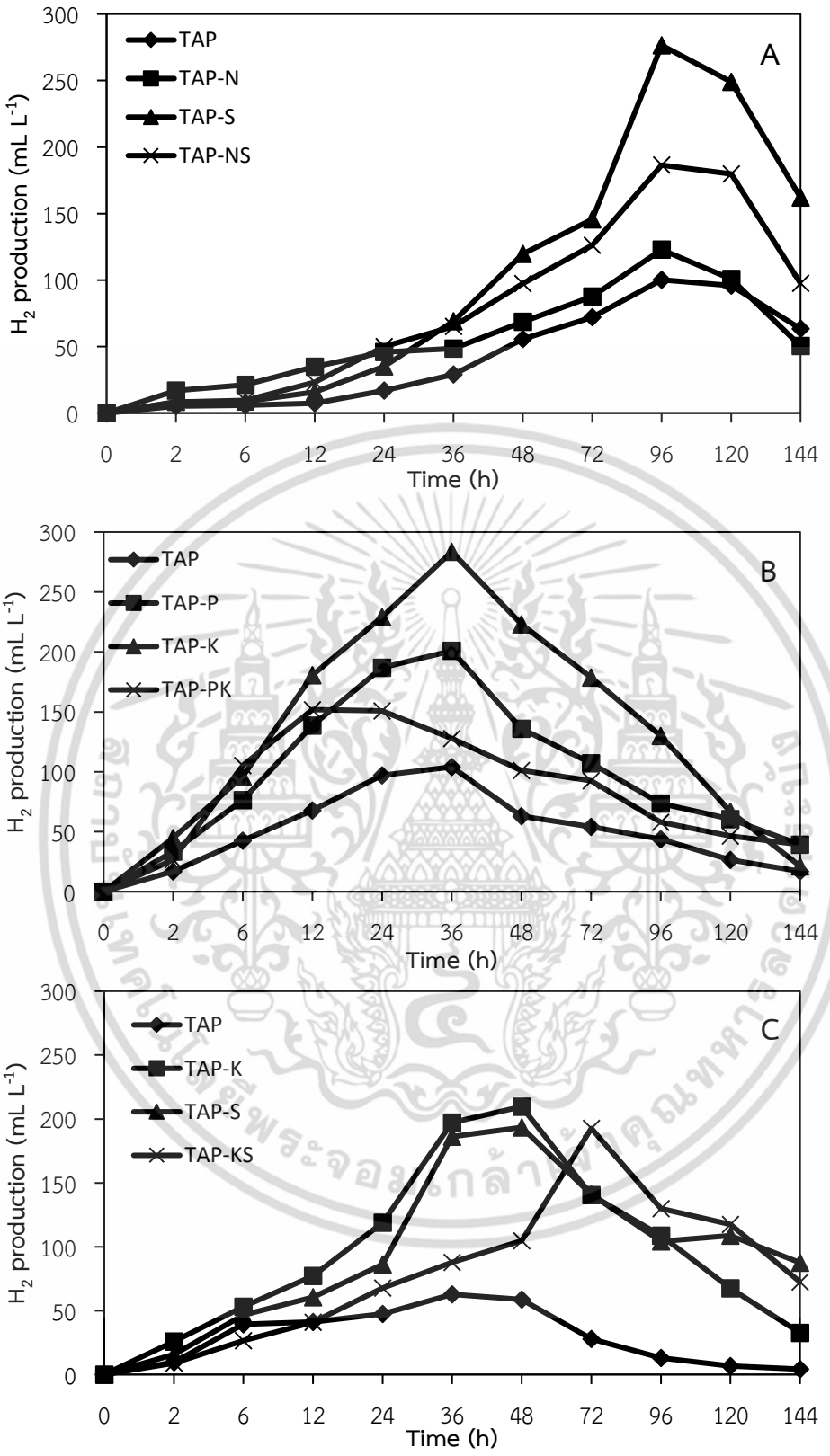
จากการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารแบบร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย โดยการนำธาตุอาหาร 2 ชนิดที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในสาหร่ายที่บ่มในอาหารที่ขาดธาตุอาหารแบบร่วม การศึกษาการขาดธาตุอาหารแบบร่วมในสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด มีดังต่อไปนี้ 1) การขาดธาตุอาหารแบบร่วม TAP-NS ในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 2) การขาดธาตุอาหารแบบร่วม TAP-PK ในสาหร่าย *Chlorella* sp. 2Sins4 และ 3) การขาดธาตุอาหารแบบร่วม TAP-KS ในสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 พบว่า การขาดธาตุอาหารแบบร่วมของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลต่อการส่งเสริมการผลิตไฮโดรเจนให้สูงขึ้น เมื่อเทียบกับการทดลองการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว (รูปที่ 4.8) ทั้งนี้เนื่องมาจาก การขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยวมีผลโดยตรงและจำเพาะต่อสาหร่ายแต่ละชนิด ซึ่งเมื่อมีการขาดธาตุอาหารแบบร่วม อาจส่งผลให้เกิดสภาวะขาดแคลนแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ ระบบต่างๆ จึงถูกระงับการทำงาน ทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อเทียบกับการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว (He *et al*., 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 อัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 (A), *Chlorella sp.* 2sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR8546 (C) ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การสะสมการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 (A), *Chlorella sp.* 2sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR8546 (C) ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดและปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิดในอาหารที่ขาดธาตุแบบร่วม

ชนิดของสาหร่ายสีเขียว	อาหารเพาะเลี้ยง	อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด ($mL\ L^{-1}\ h^{-1}$)	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด ($mL\ L^{-1}$)
Chlamydomonas reinhardtii CC124	TAP	16.534 ± 0.040	100.200 ± 0.140 (96 h)
	TAP-N	21.588 ± 0.600	122.813 ± 1.100 (96 h)
	TAP-S	30.898 ± 1.000	276.501 ± 2.600 (96 h)
	TAP-NS	23.501 ± 0.520	186.375 ± 0.500 (96 h)
Chlorella sp. 2Sins4	TAP	19.256 ± 0.840	104.018 ± 0.360 (36 h)
	TAP-P	25.399 ± 1.880	200.923 ± 1.760 (36 h)
	TAP-K	33.885 ± 1.840	283.557 ± 2.360 (36 h)
	TAP-PK	21.374 ± 0.760	151.880 ± 0.240 (12 h)
Scenedesmus obliquus TISTR 8546	TAP	15.899 ± 0.020	62.735 ± 0.140 (36 h)
	TAP-K	30.125 ± 1.480	193.401 ± 0.360 (48 h)
	TAP-S	23.334 ± 1.8860	139.865 ± 0.440 (48 h)
	TAP-KS	22.679 ± 0.040	192.636 ± 0.620 (72 h)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

จากการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆได้แก่ การแปรผันอายุเซลล์ในการเพาะเลี้ยง การแปรผันค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น สภาวะการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยวและแบบร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว 3 ชนิด คือ *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 สรุปได้ดังนี้

1. สาหร่ายสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย TAP โดยปรับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (OD_{750}) ประมาณ 0.1 ภายใต้สภาวะเขย่าและมีแสง พบว่า สาหร่ายทั้ง 3 ชนิด มีรูปแบบการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับแบคทีเรีย คือ มีระยะพัก (Lag phase), ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log phase) และระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary phase) สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2Sins4 มีการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546

2. จากการแปรผันอายุเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ต่อการผลิตไฮโดรเจน สรุปได้ว่า สาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ที่มีอายุเซลล์ 36 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 17.406, 15.250 และ 6.059 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 80.548, 74.292 และ 43.378 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ

3. จากการแปรผันค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ค่า OD_{750} เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง สรุปได้ว่า สาหร่ายทั้ง 3 ชนิด ที่มีค่า OD_{750} เท่ากับ 0.8 มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด คือ 16.647, 24.170 และ 16.250 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีปริมาณการผลิตไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 122.892, 103.521 และ 87.147 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ

4. จากการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และซัลเฟอร์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้ง 3 สรุปได้ว่า สาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 ที่บ่มในอาหารที่ขาดซัลเฟอร์ให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คือ 30.898 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 276.501 มิลลิลิตรต่อลิตร สำหรับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. 2Sins4 และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่บ่มในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ขาดโพแทสเซียม ให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงที่สุด คือ 33.885 และ 30.125 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่สูงที่สุดเท่ากับ 283.557 มิลลิลิตรต่อลิตร

5. จากการศึกษาผลของการขาดธาตุอาหารแบบร่วมต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 3 ชนิด สรุปได้ว่า การขาดธาตุอาหารแบบร่วมไม่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนให้สูงขึ้นในสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้งสามชนิดในปัจจัยต่างๆ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีเพียงหน่วยเดียวที่เราได้รายงานผล ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรศึกษาและรายงานในหลายๆ หน่วย เพื่อเป็นการเปรียบเทียบค่าการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายทั้งสามชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. **สาหร่ายวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 13-63, 142-163.

สุรัตน์ติพร รัตนะ. 2554. “การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Chader, S., Hacene, H. and Agathos, S. N. 2009. “Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara.” **Int. J. Hydrogen Energy.** 34 : 4941-4946.

Cournac, L., Josse, E., Joe, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M. and Peltier, G, B. 2000. “Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration.” **The Royal Society.** 355 : 1447-1454.

Fourchard, S., Hemschemmeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Pltier, G. and Cournae, L. 2005. “Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur- deprived *Chlamydomonas* cell.” **Appl. Environ. Microbiol.** 10: 6199-6205.

Hahn, J. J., Ghirardi, L. M. and Jacoboy, A. W., P. 2004. “Effect of process variables on photosynthetic algal hydrogen.” **Biotechnol.** 20 : 989-991.

He M., Li L., Zhang L., Liu J. 2012. The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella* Protothecoides exposed to nitrogen limition and Sulphur deprivation: **Int. J. Hydrogen Energy.** 37 : 16903-16915

Jaroenbundidchai V., 2017. **งานวิจัยน้ำดื่มไฮโดรออกซิเจน.** [online]. Available : http://www.voravitpower.weebly.com

Kosaric, N. and Lyng, R.P. 1988. “Microbial production of hydrogen.” In: Rehm, H. J. [Eds], Biotechnology Vol. 6b (special microbial processes). VCH. Pp. 101-134.

Ling L., Zhang L., Liu J., A. 2015. “The enhancement of hydrogen photoproduction in marine *Chlorella pyrenoidosa* under nitrogen deprivation.” **Int. J. Hydrogen Energy.** 40: 14784-14789.

Melis, A. and Happe, T. 2001. “Hydrogen production: green algae as a source of energy.” **Plant Physiol.** 3 : 740-748.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Papazi, A., Gjindali, A., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K., Kotzabasis K., A. 2014. "Potassium deficiency, a "smart" cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*." **Int. J. Hydrogen Energy.** 39 : 19452-19464.

Rowan, K. S. 1989. **Photosynthetic pigments of algae.** 1st ed. New York : USA.

Skjånes, K., Knutsena, G., Källqvist, T. and Lindblad, P. 2008. "H_2 production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for Bioreactor design." **Int. J. Hydrogen Energy.** 33: 511-521.

Tsygankov, A. A., Kosourov, S. N., Tolstygina, I. V., Ghirardi, M. L. and Seibert, M. 2006. "Hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under Photoautotrophic conditions." **Int. J. Hydrogen Energy.** 31: 1574-1584.

Winkler, M., Hemschemerier, A., Gotor, C., Melis, A. and Happe, T. 2002. "[Fe]-hydrogenase in green algae : photp-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation." **Int. J. Hydrogen Energy**, 27: 1431-1439.

Wykoff, D. D., Davies P. J., Melis A. and Grossman R. A. 1998. "The regulation of Photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*." **Plant Physiol.** 117 (1): 129-139.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris-acetate phosphate medium (TAP)

อาหาร TAP 1 ลิตรประกอบด้วย

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

(ปรับพีเอชเป็น 7.2)

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

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

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้ว Autoclave เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ Trace mineral solution (500 มิลลิลิตร)

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

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

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะมีสีเหลืองเขียว เปลี่ยนเป็นสีม่วง หลังจากนั้น เติมสารละลายตามด้านล่างตามลำดับ

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

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

(ปรับพีเอช 7.2) สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้น 1.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-N

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-N เป็นอาหารที่ปราศจากแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยไม่มีการใช้สารเคมีตัวอื่นมาแทนที่

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP–P

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP–P เป็นอาหารที่ปราศจากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยใช้ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) มาแทนที่

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP–K

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP–K เป็นอาหารที่ปราศจากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยใช้ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) มาแทนที่

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP–S

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP–S เป็นอาหารที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) เฟอรัสซัสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยใช้ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2.6H_2O$) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ตามลำดับ มาแทนที่

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-NS

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-NS เป็นอาหารที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) เฟอรัสซัสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยใช้ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2.6H_2O$) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ตามลำดับ มาแทนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-PK

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-PK เป็นอาหารที่ปราศจากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยไม่มีการใช้สารเคมีตัวอื่นมาแทนที่

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-KS

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TAP-KS เป็นอาหารที่ปราศจากแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) เฟอรัสซัสเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) และ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โดยใช้ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) เฟอรัสคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_2.6H_2O$) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2.2H_2O$) ตามลำดับ มาแทนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณการผลิตไฮโดรเจน

1. นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละ (%) จากกราฟมาตรฐาน
2. นำค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนในหน่วยร้อยละมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตร
3. นำปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิลิตรมาเปรียบเป็นปริมาณไฮโดรเจนในหน่วยมิลลิโมล โดยคิดจากที่ความดัน 1 บรรยากาศ ก๊าซไฮโดรเจนมีปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับปริมาตรไฮโดรเจน 1 มิลลิโมล
4. นำปริมาณไฮโดรเจนที่ได้มาหารจำนวนชั่วโมงจะได้ปริมาณไฮโดรเจนต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค.1 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ภายใต้สภาวะอายุเซลล์ที่แตกต่างกัน

A

		Subset			
Sample 124	N	1	2	3	4
48.0	3	2.6995263			
42.0	3	3.5566483			
18.0	3		10.2137621		
30.0	3			12.4012449	
24.0	3			12.9788693	
36.0	3				17.4060749
Sig.		.073	1.000	.259	1.000

B

		Subset			
Sample 2Sins4	N	1	2	3	4
48.0	3	7.4745870			
42.0	3		8.2524211		
18.0	3		8.7013336		
24.0	3			11.7602878	
30.0	3			13.7061408	
36.0	3				15.2508611
Sig.		.073	1.000	.259	1.000

C

		Subset		
Sample 8546	N	1	2	3
48.0	3	2.9672443		
18.0	3		4.0993303	
32.0	3		4.6303696	
30.0	3		4.7500138	
24.0	3		4.8193050	
36.0	3			6.0592745
Sig.		1.000	.178	1.000

***วิเคราะห์ค่าด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว: One-way ANOVA

ระดับนัยสำคัญ = 0.05 และช่วงความเชื่อมั่น = 95.0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 (A), *Chlorella* sp. 2Sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ที่ความแปรผันความเข้มข้นเซลล์โดยให้ค่า OD_{750} ที่แตกต่างกัน

A

		Subset			
Sample 124	N	1	2	3	4
0.1	3	1.0525680			
0.2	3	3.9674705			
0.4	3		9.0427962		
1.0	3			11.3002761	
0.6	3			12.0005574	
0.8	3				16.6475891
Sig.		.402	1.000	.141	1.000

B

		Subset			
Sample 2Sins4	N	1	2	3	4
0.1	3	0.6875234			
0.2	3	1.4320087			
1.0	3		17.3443769		
0.4	3		18.4447335		
0.6	3			20.2654533	
0.8	3				24.1703559
Sig.		.402	1.000	.141	1.000

C

		Subset			
Sample 8546	N	1	2	3	4
0.1	3	0.9838825			
0.2	3	1.9468985			
0.4	3		3.5387922		
0.6	3		5.9483687		
1.0	3			11.4068759	
0.8	3				16.2501813
Sig.		.402	.141	1.000	1.000

*** วิเคราะห์ค่าด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว: One-way ANOVA

ระดับนัยสำคัญ = 0.05 และช่วงความเชื่อมั่น = 95.0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 (A), *Chlorella sp.* 2sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบเดี่ยว

A

		Subset			
Sample 124	N	1	2	3	4
TAP-P	3	11.984			
TAP	3		16.287		
TAP-K	3			19.404	
TAP-N	3			21.588	
TAP-S	3				30.898
Sig.		1.000	1.000	.143	1.000

B

		Subset			
Sample 2Sins4	N	1	2	3	4
TAP-S	3	9.225			
TAP-N	3	10.433			
TAP	3		19.256		
TAP-P	3			25.399	
TAP-K	3				33.885
Sig.		.446	1.000	1.000	1.000

C

		Subset			
Sample 8546	N	1	2	3	4
TAP-P	3	8.763			
TAP-N	3		14.740		
TAP	3		16.030		
TAP-S	3			23.334	
TAP-K	3				30.125
Sig.		1.000	.359	1.000	1.000

*** วิเคราะห์ค่าด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว: One-way ANOVA

ระดับนัยสำคัญ = 0.05 และช่วงความเชื่อมั่น = 95.0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 ค่าวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 (A), *Chlorella sp.* 2sins4 (B) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR8546 ในสภาวะการขาดธาตุอาหารแบบร่วม

A

		Subset			
Sample 124	N	1	2	3	4
TAP	3	16.287			
TAP-N	3		21.588		
TAP-NS	3			23.501	
TAP-S	3				30.898
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

C

		Subset		
Sample 8546	N	1	2	3
TAP	3	16.030		
TAP-KS	3		22.679	
TAP-S	3		23.334	
TAP-K	3			30.125
Sig.		1.000	.138	1.000

B

		Subset		
Sample 2Sins4	N	1	2	3
TAP	3	19.256		
TAP-PK	3	21.374		
TAP-P	3		25.399	
TAP-K	3			33.885
Sig.		.138	1.000	1.000

*** วิเคราะห์ค่าด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว: One-way ANOVA

ระดับนัยสำคัญ = 0.05 และช่วงความเชื่อมั่น = 95.0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้